UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
INSTITUTO DO CÉREBRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

Alterações da *default mode network* provocadas pela ingestão de Ayahuasca investigadas por Ressonância Magnética Funcional

Fernanda Palhano Xavier de Fontes

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências da UFRN como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências.
Área de concentração: Neurociências

Natal-RN
Maio de 2012

Fernanda Palhano Xavier de Fontes

Alterações da *default mode network* provocadas pela ingestão de Ayahuasca investigadas por Ressonância Magnética Funcional

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências da UFRN como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências.
Área de concentração: Neurociências

Orientador: Prof. Dr. Dráulio Barros de Araújo

Natal-RN
Maio de 2012

Alterações da *default mode network* provocadas pela ingestão de Ayahuasca investigadas por Ressonância Magnética Funcional

Fernanda Palhano Xavier de Fontes

Apresentada em 25 de maio de 2012

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Edson Amaro Junior
USP

Prof. Dr. Sidarta Tollendal Gomes Ribeiro
UFRN

Prof. Dr. Dráulio Barros de Araújo
UFRN

Natal-RN
Maio de 2012

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dráulio Barros de Araújo por ter me dado a oportunidade de trabalhar neste projeto, pela confiança depositada, pela paciência nos momentos de insegurança e por todos os ensinamentos acadêmicos e pessoais, serei sempre grata.

Aos amigos do grupo Neuroimago: Kátia, André, Márcio e Bruno, pelas dúvidas respondidas e pelos momentos de descontração.

A minha amiga Morgana, pelo apoio, pelas conversas estimuladoras, e por ter me deixado participar do seu projeto, contribuido para o meu crescimento profissional.

Aos amigos do Instituto do Cérebro, pelas discussões científicas ou nem tão científicas assim.

A todos os amigos, de longa data ou mais recentes, que sempre torceram pelo meu sucesso. Menciono aqui aqueles que estiveram mais próximos: Ana Paula, Honda, Vítor, Lara e Júlia.

A Fabrício, que me acompanhou durante o último ano do mestrado, tentando entender minha pesquisa e me motivando.

A minha família, em especial a meus pais, Plínio e Margareth, sempre dispostos a me apoiarem e acreditando de forma sincera no meu potencial.

RESUMO

A Ayahusca é uma bebida psicotrópica que tem sido utilizada há séculos por populações originais da América do Sul, notadamente da região Amazônica, com fins religiosos e medicinais. O chá é obtido pela decocção de folhas de *Psychotria viridis* com a casca e tronco de um arbusto, *Banisteriopsis caapi*. A primeira é rica em N,N-dimetiltriptamina (DMT), que tem importante e bem conhecido efeito alucinógeno devido a sua atuação agonista nos receptores de serotonina, especificamente 5-HT_{2A}. Por outro lado, as β-carbolinas presentes na *B. caapi*, particularmente a harmina e a harmalina, são potentes inibidores da monoamina oxidase (iMAO). Além disso, a tetrahidroharmina (THH), também presente na *B. caapi*, atua como leve inibidor seletivo da recaptação de serotonina e um fraco inibidor de MAO. A DMT, por si só não é ativa por via oral, uma vez que é degradada pela MAO. No entanto, a presença de iMAO na bebida permite que a DMT seja psicoativa quando ingerida. O acesso da DMT à circulação sistêmica e ao sistema nervoso central provoca uma série de alterações afetivas, perceptivas e cognitivas. Além disso, os seus efeitos têm sido associados ao aumento da atenção interoceptiva. Por outro lado, existe um interesse crescente na rede de modo padrão (DMN), que tem sido amplamente detectada em estudos de neuroimagem funcional e tem sido associada com atividade mental introspectiva. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar, por meio de ressonância magnética funcional – fMRI, as possíveis mudanças da DMN causadas pela ingestão da Ayahuasca em 10 voluntários saudáveis enquanto executavam uma tarefa de fluência verbal e protocolo de *resting state*. De maneira geral, observa-se que a Ayahuasca provoca redução na amplitude do sinal BOLD nos nodos centrais da DMN, tais como o cíngulo anterior, o córtex pré-frontal medial, o cíngulo posterior, o pré-cuneus e o lobo parietal inferior. Além disso, também foram observadas alterações no padrão de conectividade funcional da DMN, em particular, diminuição na conectividade funcional no pré-cuneus. Juntos, esses achados indicam que, sob efeito da Ayahuasca, os indivíduos apresentam um estado alterado de consciência, no qual o fluxo de pensamentos espontâneos é alterado, e sugerem um potencial uso terapêutico da Ayahuasca em transtornos mentais nos quais a DMN se mostra alterada.

ABSTRACT

Ayahuasca is psychotropic beverage that has been used for ages by indigenous populations in South America, notably in the Amazon region, for religious and medicinal purposes. The tea is obtained by the decoction of leaves from Psychotria viridis with the bark and stalk of a shrub, Banisteriopsis caapi. The first is rich in N-dimethyltryptamine (DMT), which has an important and well-known hallucinogenic effect due to its agonistic effects in serotonin receptors, specifically 5-HT2A. On the other hand, β-carbolines present in B. caapi, particularly harmine and harmaline, are potent monoamine oxidase inhibitors (MAOi). In addition, the tetrahydroharmine (THH), also present in B. caapi, acts as mild selective serotonin reuptake inhibitor and a weak MAOi. DMT in itself it is not orally active since it is inactivated by MAO. However, the presence of MAOi in the drink allows DMT to be psychoactive when ingested. The access of DMT to the systemic circulation and the central nervous system causes a number of affective, perceptual and cognitive changes. Moreover, its effects have been linked to increased interoceptive attention. On the other hand, there is a growing interest in the default mode network (DMN), which has been widely detected in functional neuroimaging studies and has been associated with introspective mental activity. Therefore, this study aimed to evaluate, through functional magnetic resonance imaging – fMRI, possible changes in DMN caused by ingestion of Ayahuasca in 10 healthy subjects while performing a verbal fluency task and resting state protocols. In general, it was observed that Ayahuasca causes a reduction in BOLD signal amplitude in central nodes of DMN, such as the anterior cingulate cortex, the medial prefrontal cortex, the posterior cingulate cortex, the precuneus and inferior parietal lobe. Furthermore, changes in the pattern of functional connectivity of the DMN were observed, especially, a decrease in the functional connectivity in the precuneus. Together, these findings indicate that, under the effect of Ayahuasca, individuals present an altered state of consciousness, in which the stream of spontaneous thoughts is altered, and suggest a potential therapeutic use of Ayahuasca in mental disorders in which the DMN is altered.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Cascata de eventos hemodinâmicos e magnéticos que ocorrem após atividade elétrica neuronal. O resultado é o aparecimento do contraste BOLD. (Figura modificada de (Bandettini, 2002)). 8

Figura 2 – Função resposta hemodinâmica típica que segue um estímulo breve com as diferentes fases: *dip inicial, resposta BOLD positiva e undershoot negativo*. Também são apresentados os diferentes cursos temporais dos parâmetros fisiológicos que seguem a HRF: $CMRO_2$, CBF e CBV. Adaptado de (Mulert et al., 2010). 10

Figura 3 – Representação das diferentes parcelas do modelo GLM. A série temporal *Y* que se deseja modelar (azul), a variável explanatória *X* multiplicada pelo β estimado (vermelho) e o erro residual ε (verde). 18

Figura 4 – Modelamento da HRF e da função estímulo. (A) Função da resposta hemodinâmica canônica proposta por Glover (1999). (B) Na parte superior, uma função quadrada que modela um estímulo em bloco. Na parte inferior, resposta BOLD prevista, resultante da convolução entre a função estímulo e a HRF (A). 19

Figura 5 – Anatomia da DMN delineada no trabalho de Shulman et al. As regiões em azul apresentaram um maior sinal durante as atividades passivas. Adaptado de (Buckner et al., 2008). 28

Figura 6 – Diferentes abordagens utilizando fMRI mostram resultados semelhantes na identificação da anatomia da DMN. (A) Cada linha da imagem mostra uma abordagem diferente para definir a DMN: protocolo em bloco (linha superior), protocolo evento-relacionado (linha do meio) e conectividade funcional com o hipocampo (linha inferior). Em cada abordagem, os mapas representam uma meta-análise de vários conjuntos de dados fornecendo assim uma estimativa conservadora da DMN. A escala de cores mostra o número de conjunto de dados com efeito significativo em cada análise. (B) A convergência entre abordagens revela as regiões centrais que compõem a DMN. Adaptado de (Buckner et al., 2008). 31

Figura 7 – Estrutura molecular dos principais alcaloides presentes na Ayahuasca e do neurotransmissor serotonina. As β-carbolinas harmina, harmalina e tetrahidroharmina estão contidas no cipó *Banisteriopsis caapi* enquanto a DMT está contida nas folhas da *Psychotria viridis*. Adaptado de (Callaway et al., 1999). 42

Figura 8 – Protocolo de fluência verbal utilizado para a aquisição dos dados. 53

Figura 9 – Regiões de interesse que definem a DMN. LMFG - giro frontal médio esquerdo, pC - pré-cuneus, LIPL - lobo parietal inferior esquerdo, RIPL - lobo parietal inferior direito, PCC - cíngulo posterior, MPFC - córtex pré-frontal medial, LMTG - giro temporal médio esquerdo, RMTG giro temporal médio direito e vACC - cíngulo anterior ventral. Adaptado de Laird et al., 2009. 56

Figura 10 – Protocolo experimental. Duas sessões experimentais foram realizadas no mesmo dia. Em cada uma delas foram realizadas duas aquisições iguais, tarefa de fluência verbal e *resting state*. A segunda sessão ocorreu 40 minutos após a ingestão de Ayahuasca. Além disso, pode-se observar os momentos em que foram aplicadas as escalas psicométricas. 59

Figura 11 – Conectividade funcional baseada em *seeds*. Observamos a localização das duas *seeds* utilizadas: PCC (-5, -49, 40) e mPFC (-1, 47, -4). 61

Figura 12 – Escores individuais nas escalas psicométricas BPRS, EAM e CADSS nos instantes 0 (T0), 40 (T40), 80(T80) e 200 (T200) minutos para todos os sujeitos. A CADSS não foi avaliada no instante T40 por motivos técnicos. Os participantes ingeriram a Ayahuasca no instante T0. Os efeitos avaliados alcançaram valores máximos em relação aos valores basais (T0) após 80 minutos ($p < 0,009$ para BPRS, $p < 0,009$ para EAM e $p < 0,004$ para CADSS). As linhas conectam os valores médios nos diferentes instantes de tempo. Observa-se também que os valores no T200 são bastante próximos dos valores basais. 65

Figura 13 – Máscara da DMN. Foram definidas 12 ROI que compõem a DMN: cíngulo anterior, cíngulo posterior, pré-cuneus, córtex pré-frontal medial, giro frontal médio esquerdo, giro temporal médio direito e esquerdo, lobo parietal inferior direito e esquerdo, formação hipocampal direita e esquerda e amígdala esquerda..... 66

Figura 14 – Mapas estatísticos mostrando a DMN no grupo de voluntários antes (a) e depois (b) da ingestão do chá. Os clusters foram determinados utilizando-se limiar $Z > 2,3$ e significância *whole-brain* de $p < 0,05$ (corrigidos para clusters – *cluster corrected*). 67

Figura 15 – Mapas estatísticos mostrando as regiões onde o sinal BOLD da DMN se altera após a ingestão da Ayahuasca. As cores frias representam as regiões em que houve diminuição do sinal BOLD, enquanto as cores quentes as regiões em que o sinal BOLD aumentou**.** Valores de $p < 0,05$ não corrigido. 68

Figura 16 – Regiões que apresentaram um comportamento diferente do esperado. Duas regiões, a formação hipocampal esquerda e a amígdala esquerda, apresentaram o sinal BOLD negativo e não positivo como as demais regiões. Como mostra a marcação na figura, não foram encontradas diferenças significativas nessa região quando utilizou-se um $p < 0,05$ não corrigido para fazer a comparação. 69

Figura 17 – Gráficos em barra mostrando os valores médios dos betas das regiões de interesse (ROI) analisadas que compõem a DMN. Apenas uma região não apresentou diferença estatisticamente significativa entre o antes e depois, o giro temporal médio direito. Duas regiões apresentaram um comportamento não esperado, a formação hipocampal esquerda e a amígdala esquerda. As demais regiões tiveram diferenças significativas, sendo o valor da significância indicado por *** $p<0,001$ ou **** $P<0,0001$. 70

Figura 18 – Correlação entre a diferença dos betas (antes e depois) de algumas regiões de interesse de cada sujeito e os escores da escala de mania de Young (EAM) individuais. Uma correlação negativa foi encontrada entre os escores e três regiões: cíngulo anterior ($r = -0,78$ e $p = 0,0065$), cíngulo posterior ($r = -0,59$ e $p = 0,046$) e córtex pré-frontal medial ($r = -0,68$ e $p = 0,022$). Em uma região, o pré-cuneus, a correlação não foi significativa. 72

Figura 19 – Mapas de conectividade funcional obtidos pelo uso de duas *seeds*. Do lado esquerdo observa-se o resultado da *seed* no mPFC enquanto do lado direito o resultado de quando a *seed* é colocada no PCC. Em ambos os casos são mostrados os mapas antes e após a ingestão de Ayahuasca. Valores de p não corrigidos para múltiplas comparações ($p < 0,05$). 73

Figura 20 – Alterações na conectividade funcional da DMN. A conectividade diminuiu entre o pré-cuneus e as demais regiões da DMN após a ingestão da Ayahuasca. Valores de p corrigidos para múltiplas comparações por FDR, $p < 0,05$. 73

Figura 21 – Mapas de conectividade funcional obtidos pelo uso do método GLM no software SPM. Observa-se a semelhança entre esses mapas e àqueles obtidos pelo cálculo de correlações de Pearson (Figura 19). Valores de p não corrigidos para múltiplas comparações ($p < 0,05$). 97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Regiões anatômicas que apresentaram variação do sinal BOLD após a ingestão da Ayahuasca. Observamos a quantidade de voxels em cada região (Nvoxel), bem como a média e o desvio padrão dos valores de β antes e após a ingestão do chá. * p<0,00083, representando um p<0,01 corrigido para múltiplas comparações pelo número de ROIs. 68

Tabela 2 – Conectividade funcional ROI-*wise*. Média dos z-escores em cada par antes e depois da Ayahuasca. Abaixo da diagonal principal, os valores do teste t entre cada situação, antes e depois. Em vermelho, os pares que foram estatisticamente significativos: PCC/IPL_L (p = 0,024), HF_R/HF_L (p = 0,015), MFG_L/IPL_L (p = 0,043), MTG_R/pC (p = 0,018) e IPL_L/pC (p = 0,001). Valor de p não corrigido para múltiplas comparações (p<0,05). 75

SUMÁRIO

1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS 1

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA 5

2.1. IMAGEM POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA FUNCIONAL 6
2.1.1. O SINAL BOLD E SUAS CARACTERÍSTICAS 6
2.1.2. AQUISIÇÃO DAS IMAGENS 10
2.1.3. PRÉ-PROCESSAMENTO DAS IMAGENS 12
2.1.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS IMAGENS 15
2.1.5. ANÁLISE DE CONECTIVIDADE 24
2.2. DEFAULT MODE NETWORK 27
2.2.1. FUNÇÕES DA DMN 31
2.2.2. ALTERAÇÕES NA DMN 35
2.3. AYAHUASCA 37
2.3.1. ORIGEM E USOS 37
2.3.2. PRINCÍPIO ATIVO 40
2.3.3. EFEITOS SUBJETIVOS 42
2.3.4. EFEITOS NEUROENDÓCRINOS, AUTONÔMICOS E CARDIOVASCULARES 43
2.3.5. EFEITOS NEUROFISIOLÓGICOS 44
2.3.6. ESTUDOS DE NEUROIMAGEM 46

3. OBJETIVOS 48

4. MATERIAL E MÉTODOS 50

4.1. SUJEITOS 51
4.1.1. ASPECTOS ÉTICOS 51
4.2. DEFINIÇÃO DA DMN 52
4.2.1. AQUISIÇÃO DAS IMAGENS 52
4.2.2. PRÉ-PROCESSAMENTO E ANÁLISE DAS IMAGENS 53
4.2.3. REGIÕES DE INTERESSE DA DMN 54
4.3. ANÁLISES DOS DADOS DE AYAHUSCA 57
4.3.1. AYAHUASCA 57
4.3.2. ESCALAS 57
4.3.3. PROTOCOLO EXPERIMENTAL 59
4.3.4. ANÁLISE DO SINAL DE FMRI 60
4.3.5. ANÁLISE DE CONECTIVIDADE FUNCIONAL 60

5. RESULTADOS 63

5.1. CASUÍSTICA 64
5.2. DADOS PSICOMÉTRICOS 64
5.3. DADOS DE FMRI 65
5.3.1. DEFINIÇÃO DAS REGIÕES DE INTERESSE 65
5.3.2. ANÁLISE DO GRUPO REPOUSO 66

5.3.3. ANÁLISE DE CONECTIVIDADE FUNCIONAL 72

6. DISCUSSÃO 76

7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS 86

8. REFERÊNCIAS 88

APÊNDICE 96

APÊNDICE A – CONECTIVIDADE FUNCIONAL CALCULADA UTILIZANDO-SE O SPM 97

ANEXOS 98

ANEXO A – TERMO DE CONSENTIMENTO 99

1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

A Ayahuasca é uma bebida psicoativa utilizada desde períodos entre 1500 a.C. e 2000 a.C. por populações indígenas da região amazônica, com fins religiosos e medicinais (Callaway et al., 1999). A partir da primeira metade do século XX, a bebida passou a ser usada ritualisticamente em áreas urbanas por igrejas sincréticas modernas brasileiras, tendo sido reconhecido e autorizado pelo governo Brasileiro, em 1987, o uso ritual da Ayahuasca. Atualmente, dentre os principais grupos religiosos que a utilizam estão o Santo Daime, a União do Vegetal e a Barquinha.

Tradicionalmente, o chá é preparado pela decocção de duas plantas: a casca e tronco de um arbusto, a *Banisteriopsis caapi* e as folhas da *Psychotria viridis*. A B. *caapi* é rica em β-carbolinas, principalmente harmina, harmalina e tetrahidroharmina (THH). A harmina e a harmalina são inibidores seletivos da enzima monoamina oxidase (iMAO) enquanto a THH é um fraco inibidor da recaptação de serotonina e fraco inibidor da MAO. Já a P. *viridis* contém a triptamina alucinógena N,N-dimetiltriptamina (DMT) que atua principalmente como agonista nos receptores serotoninérgicos, principalmente o 5-HT_{2A} (McKenna et al., 1998).

Quando administrada por via oral, a DMT é inativa, pois é degradada pela monoamina oxidase (MAO) presente no fígado e via gastrointestinal. No entanto, a presença de iMAO na bebida impede a degradação da DMT e possibilita seu alcance até o sistema nervoso central (Callaway et al., 1999).

A combinação dessas duas espécies de vegetais faz com que a bebida proporcione sensações únicas, sendo comuns alterações sensitivas, cognitivas, da percepção e do afeto (Riba et al., 2001). Entre esses efeitos, estão: aumento da introspecção, sensação de bem estar, pensamentos complexos e rápidos, sensação de apreensão, imagens mentais nítidas, alterações visuais da cor, forma e movimento de objetos, sensação de percepção mais clara e distinta do som (Shanon, 2002; Riba et al., 2003).

Apesar do grande o número de estudos existentes sobre a Ayahuasca, a maioria se concentra em aspectos farmacológicos e antropológicos. Apenas recentemente, começaram a surgir pesquisas focando no entendimento das alterações cognitivas como, por exemplo, pela utilização de técnicas de neuroimagem (Riba et al., 2006, Prado et al., 2009, Pinto, 2010, de Araujo et al., 2011).

Entre as técnicas de neuroimagem, a ressonância magnética funcional (do inglês, *functional Magnetic Resonance Imaging* – fMRI) tem sido largamente utilizada em estudos sobre as bases neurais da percepção, cognição e emoção. O foco da imensa maioria desses estudos tem sido a localização das regiões cerebrais onde houve aumento da atividade elétrica de neurônios devido à execução de uma tarefa, em comparação a um estado de base, tipicamente repouso. Curiosamente, no final dos anos 1990, foi descoberto um conjunto de regiões que apresentavam maior atividade durante o repouso que durante a execução de uma tarefa ativa (Shulman et al., 1997; Mazoyer et al., 2001). O conjunto de regiões que compõe essa rede passou a ser conhecida pelo seu nome, em inglês, de *Default Mode Network* (DMN).

A DMN é composta por um sistema cerebral anatomicamente definido, estando preferencialmente ativo quando os indivíduos não estão focados no ambiente externo (Buckner et al., 2008). Desde sua descoberta, o interesse nessa rede tem crescido muito e tem se tornado tema central nas pesquisas em neurociências nos últimos anos, tendo aparecido como palavra-chave em 983 artigos de 2009 até os dias atuais.

Embora seja crescente a quantidade de estudos sobre a DMN, suas funções permanecem pouco compreendidas. Acredita-se que ela participe de tarefas que envolvem autojulgamentos, evocação de memórias autobiográficas, realização de simulações mentais, pensar em perspectiva, estados meditativos, entre outros (Buckner and Carroll, 2007; Northoff et al., 2006). Em termos gerais, uma característica comum dessas tarefas é que elas aumentam

a atenção dos sujeitos para si, tendo sido argumentado que a DMN estaria associada à atividade mental introspectiva.

Desse modo, tendo em vista que a Ayahuasca provoca mudanças relacionadas à introspecção, este estudo objetivou investigar possíveis alterações da DMN provocadas pela ingestão de Ayahuasca, utilizando fMRI. A hipótese é de que, caso a DMN esteja ligada a estados introspectivos, e a Ayahuasca promova a intensificação desses estados, observe-se uma alteração do sinal de fMRI da DMN durante períodos em que os indivíduos estão sob efeito da bebida.

Este trabalho está dividido em 7 seções principais. A primeira delas é a fundamentação teórica em que é apresentada a técnica de fMRI, com enfoque nas etapas de aquisição e análise dos dados. Em seguida, nessa mesma seção, introduz-se o conceito de DMN, abordando sua estrutura anatômica, funções e estados alterados. Por último, vários aspectos da Ayahuasca são apresentados.

As seções seguintes são, respectivamente, objetivos, material e métodos, resultados e discussão. As conclusões e perspectivas são apresentadas na última parte. Alguns resultados adicionais são mostrados nos apêndices, e nos anexos estão algumas informações que consideramos relevantes para o trabalho.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. IMAGEM POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA FUNCIONAL

A imagem funcional por ressonância magnética (fMRI) tem sido bastante utilizada, há quase duas décadas, no estudo de alguns aspectos das funções cerebrais, tanto de cérebros saudáveis como em diferentes doenças. A fMRI apoia-se em efeitos hemodinâmicos, em particular no fato de que alterações da atividade elétrica neural estão associadas a mudanças no fluxo sanguíneo cerebral. Nesse contexto, o mecanismo de contraste mais utilizado é conhecido por BOLD (*Blood Oxygenation Level Dependent*), que é sensível a alterações no nível de oxigenação do sangue, em coincidência com estímulos que promovem a modulação da atividade neuronal, descrito em mais detalhes a seguir.

2.1.1. O sinal BOLD e suas características

A ideia de que variações no sistema vascular cerebral refletem variações na função cerebral não é nova. No final do século XIX, os fisiologistas britânicos Roy e Sherrington verificaram que variações da atividade elétrica de neurônios poderiam resultar no aumento local do fluxo sanguíneo. Eles indicaram que alguns produtos do metabolismo do cérebro estimulavam a atividade vasomotora o que provavelmente alteraria o abastecimento vascular regional em resposta a variações locais da atividade elétrica neuronal (Roy and Sherrington, 1890 *apud* (Huettel et al., 2004; Logothetis, 2002).

Outra descoberta importante que levou ao contraste BOLD foi feita pelos químicos Linus Pauling e Charles Coryell. Em 1936, eles demonstraram que as propriedades magnéticas da hemoglobina dependiam do seu estado de oxigenação (Pauling and Coryell, 1936), isto é, quando a hemoglobina está ligada a uma molécula de oxigênio (oxi-Hb) ela é diamagnética, ou seja, não possui elétrons desemparelhados e seu momento magnético permanente é nulo. Em contraste, quando não está ligada ao oxigênio (deoxi-Hb) ela é paramagnética, possuindo susceptibilidade magnética cerca de 20% maior que a oxi-Hb. Em

1982, um experimento *in vitro* mostrou que a constante de decaimento T_2 do sangue dependia da proporção de oxi-Hb contida em um tubo de ensaio (Thulborn et al., 1982).

No final dos anos 1980, Ogawa e colaboradores investigaram a hipótese de que a manipulação da proporção de oxigênio no sangue alteraria a visibilidade de vasos sanguíneos em imagens ponderadas em T2*. Esta hipótese foi testada em ratos anestesiados utilizando campos magnéticos elevados (7 T). Manipulando níveis de O_2 e CO_2 eles mostraram que o sangue com deoxi-Hb diminuía o sinal próximo aos vasos e que este podia ser revertido com o aumento do fluxo sanguíneo oxigenado (Huettel et al., 2004; Ogawa et al., 1990).

Curiosamente, embora pareça intuitivo que o aumento da atividade neural leve ao aumento de consumo de oxigênio e, portanto, à diminuição do sinal BOLD, os experimentos mostraram exatamente o contrário. Foi observado o aumento do sinal relacionado à atividade neural, devido ao aumento do fluxo sanguíneo cerebral (do inglês, *Cerebral Blood Flow* – CBF) e do volume sanguíneo cerebral (do inglês, *Cerebral Blood Volume* – CBV). Uma vez que os aumentos no CBF e no CBV são muito maiores do que a demanda metabólica por oxigênio, o resultado é o aumento da razão entre a oxi-Hb e a deoxi-Hb, com consequente diminuição da concentração de deoxi-Hb (Fox and Raichle, 1986). Como resultado, essa diminuição aumenta ligeiramente o tempo de relaxação T2*, levando ao aumento da amplitude do sinal de ressonância magnética de imagens ponderadas em T2*, como é o caso das sequências do tipo eco-planar (do inglês, *echo-planar imaging* – EPI).

Em resumo, o diagrama na Figura 1 mostra a sequência dos principais eventos que resultam na formação do contraste (efeito) BOLD.

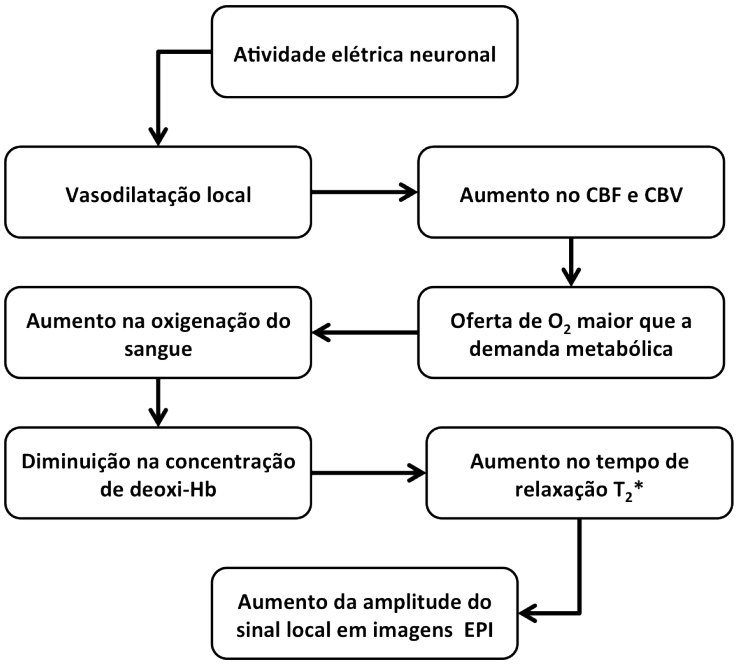


Figura 1 – Cascata de eventos hemodinâmicos e magnéticos que ocorrem após atividade elétrica neuronal. O resultado é o aparecimento do contraste BOLD. Modificado de (Bandettini, 2002).

Dois anos mais tarde, três grupos, simultaneamente e de maneira independente, utilizaram o mecanismo BOLD para relacionar atividade neuronal, mudanças na oxigenação do sangue e fluxo sanguíneo no córtex motor e visual em humanos (Bandettini et al., 1992; Kwong et al., 1992; Ogawa et al., 1992).

Com relação aos efeitos vasculares, os parâmetros fisiológicos que influenciam o contraste BOLD são a taxa de metabolismo do consumo de oxigênio (do inglês, *Cerebral Metabolic Rate of Oxygen* – $CMRO_2$), o CBF (do inglês, *Cerebral Blood Flow*), e o CBV (do inglês, *Cerebral Blood Volume*) (Buxton et al., 2004). O curso temporal desses parâmetros são esquematizados na Figura 2. Imediatamente após o início do estímulo ocorre um aumento na extração de oxigênio (maior $CMRO_2$). Depois de um curto período de latência, o CBF e o CBV aumentam. O aumento de CBV com alta $CMRO_2$ causam aumento na concentração da deoxi-Hb e consequente redução do sinal. No entanto, o aumento do CBF supera a $CMRO_2$ e o oxigênio transportado para o local de aumento da atividade elétrica neuronal diminui a concentração da deoxi-Hb aumentando o sinal, resultando no BOLD positivo. Cessada a

atividade neuronal, o CBF decresce mais rapidamente que o CBV. Depois de aproximadamente 10s, a $CMRO_2$ e o CBF retornam aos seus níveis basais. Nesse momento, a redução do CBV continua lenta por um certo intervalo, aumentando dessa forma a concentração da deoxi-Hb e reduzindo o sinal.

A variação no sinal de ressonância magnética ao longo do tempo, em resposta à atividade elétrica neuronal, é conhecida como função da resposta hemodinâmica (do inglês, *Hemodynamic Response Function* – HRF). A Figura 2 mostra a evolução temporal esquemática do sinal BOLD em resposta a um estímulo breve. Logo após a apresentação do estímulo, a resposta decresce (*initial dip*) por um breve intervalo de tempo (1-2 segundos). Esse comportamento não é observado de maneira consistente em todos os estudos, e seu mecanismo fisiológico é assunto controverso (Huettel et al., 2004). Após essa depressão inicial, o sinal inicia a fase de resposta BOLD positiva, que chega ao valor máximo em aproximadamente 5 segundos. Após atingir o pico, o sinal decresce em amplitude, permanecendo, contudo, positivo. Essa etapa (sinal positivo) tem duração entre 5 e 10 segundos. Em seguida, o sinal tende a decrescer para valores abaixo da linha de base (*post-undershoot*), retornando a valores basais em cerca de 20 segundos.

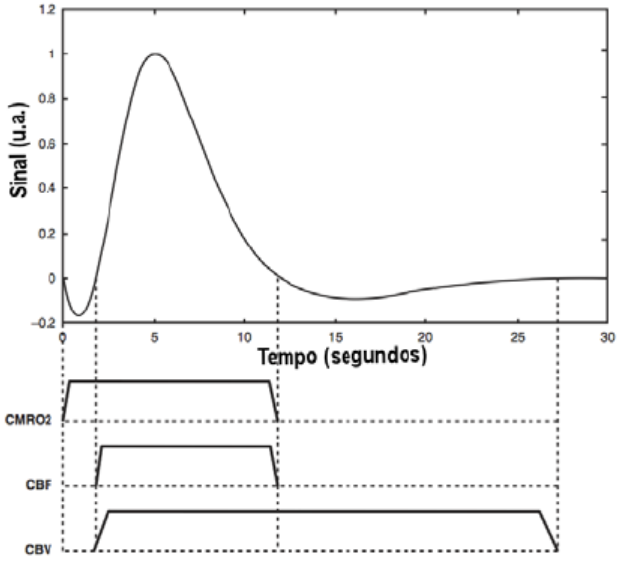


Figura 2 – Função resposta hemodinâmica típica que segue um estímulo breve com as diferentes fases: *dip inicial, resposta BOLD positiva e undershoot negativo*. Também são apresentados os diferentes cursos temporais dos parâmetros fisiológicos que seguem a HRF: $CMRO_2$, CBF e CBV. Adaptado de (Mulert et al., 2010).

2.1.2. Aquisição das imagens

Comparada a outras técnicas de neuroimagem funcional, a fMRI apresenta resolução espacial razoavelmente alta, os voxels da imagem são tipicamente da ordem de 8 mm^3. Entretanto, como é possível observar pelas características do sinal BOLD descritas acima, sua resolução temporal é da ordem de segundos, sendo limitada tanto pelos mecanismos vasculares que resultam na HRF lenta quanto por fatores técnicos, como veremos a seguir.

Um experimento de fMRI, de maneira geral, consiste de ter um indivíduo realizando alguma tarefa de interesse dentro de um tomógrafo de imagem por ressonância magnética (do inglês, *Magnetic Resonance Imaging* – MRI) enquanto várias imagens do seu cérebro são adquiridas em intervalos relativamente curtos de tempo (1-3 s). As imagens, adquiridas por sequências rápidas conhecida como eco-planar (do inglês, *echo-planar imaging* – EPI), são sensíveis ao contraste BOLD e mostram mudanças sutis no brilho das imagens nas áreas que seletivamente tiveram modulação da atividade elétrica neural pela tarefa. Desse modo, a estratégia utilizada em experimentos de fMRI é geralmente baseada na tentativa de modular a

resposta BOLD da rede neuronal estimulada pela tarefa. Ao desenho experimental de fMRI dá-se o nome de paradigma (Amaro Jr and Barker, 2006). Em outras palavras, o paradigma é a construção que leva em conta a estrutura temporal e as previsões comportamentais das tarefas executadas pelo sujeito.

Quanto à forma de apresentação dos estímulos, dois desenhos experimentais são os mais utilizados: os desenhos em bloco (*block design*) e relacionados a eventos (*event-related design* – ER).

O paradigma em blocos foi o primeiro a ser utilizado em fMRI e provavelmente ainda é uma das estratégias mais adotadas. A ideia central consiste em manter o engajamento do indivíduo em determinada tarefa por períodos relativamente longos (da ordem de 20 s). Esses períodos são alternados com outros, de "repouso", igualmente longos, que construirão a linha de base. Apesar do paradigma em bloco não permitir a estimativa precisa da HRF, ele é bastante preciso na detecção da resposta e consequente localização do efeito (Buxton et al., 1998). Por outro lado, no paradigma ER os estímulos são curtos (1-5 s) e os períodos de repouso são relativamente longos, da ordem de 20 segundos (Bandettini and Cox, 2000). A principal vantagem desta estratégia é a possibilidade de detectar variações transitórias da HRF, permitindo a caracterização mais precisa do sinal BOLD. Além disso, esse desenho reduz a adaptação do sujeito à tarefa e permite a elaboração de desenhos experimentais mais complexos (D'Esposito et al., 1999). Por outro lado, seu poder de detecção é significativamente reduzido quando comparado ao paradigma em bloco além de serem relativamente mais longos (Bandettini and Cox, 2000).

Uma variável comum aos desenhos ER e em blocos é a necessidade do indivíduo estar engajado em alguma tarefa. Desse modo, uma alternativa para os estudos envolvendo fMRI tem sido a caracterização das variações da resposta BOLD relacionadas à atividade espontânea, ou "estado de repouso" (Amaro Jr and Barker, 2006). Conhecido como protocolos

de *resting state*, este paradigma consiste em medir flutuações espontâneas do sinal BOLD de baixa frequência (< 0,1 Hz). Essa estratégia abre um novo cenário de perspectiva, permitindo por exemplo a avaliação de indivíduos com disfunções cognitivas ou físicas, assim como em crianças (Shimony et al., 2009). Além disso, tem sido bastante utilizado em estudos que tem por objetivo avaliar a conectividade entre diferentes regiões cerebrais (Biswal et al., 1995; Fox et al., 2005).

2.1.3. Pré-processamento das imagens

Uma vez adquiridas as imagens devem passar pela etapa de pré-processamento. Isso porque a amplitude do sinal BOLD é pequena tanto se comparada à intensidade total do sinal de ressonância magnética quanto com a variabilidade espacial e temporal das imagens. O contraste BOLD provoca aumentos da ordem de apenas 1 a 5% no sinal, fazendo com que vários fatores influenciem e confundam a análise das imagens. Assim, o pré-processamento tem dois objetivos principais: remover a variabilidade do dado que não interessa e prepara-lo para a análise estatística.

Dentre as principais estratégias utilizadas estão o controle de qualidade dos dados brutos, a correção de movimento, correção temporal entre as fatias, aplicação de filtros espaciais e temporais, o corregistro das imagens e a normalização para um espaço anatômico padrão.

Controle de qualidade

Essa primeira etapa consiste basicamente em examinar visualmente o dado bruto. Como as imagens de fMRI são adquiridas em fatias bidimensionais ao longo do tempo, elas são suscetíveis a artefatos como os ruídos de radiofrequência, artefatos de gradiente, dentre outros. Tendo em vista as milhares de fatias que precisam ser vistas, uma maneira efetiva de realizar essa tarefa é visualizar todos os volumes de uma sessão experimental como um filme,

no qual as fatias são rapidamente exibidas uma após a outra, possibilitando assim a detecção de artefatos transitórios (Strother, 2006).

Correção temporal entre as fatias

A aquisição das imagens se dá de forma sequencial, uma fatia por vez. Dessa forma, as fatias que compõem um volume estão discretamente defasadas no tempo. As análises subsequentes, entretanto, consideram que toda a informação de um volume foi adquirida simultaneamente (Smith, 2001), o que torna necessária a correção de tempo entre as fatias. O problema é ainda mais crítico em aquisições do tipo *interleaved*, nas quais primeiramente todas as fatias pares são adquiridas seguidas das ímpares, ou vice-versa. Nesses casos, fatias vizinhas podem estar consideravelmente afastadas no tempo, em especial se o TR (Tempo de Repetição) é longo. Comumente, esse problema é corrigido pela interpolação temporal entre voxels adjacentes (Huettel et al., 2004)

Correção de movimentos

Provavelmente o problema mais prejudicial em estudos de fMRI é a movimentação involuntária da cabeça do indivíduo em estudo. Decorrentes da própria tarefa experimental, da deglutição e do desconforto do indivíduo, esse problema pode ser minimizado com uso de técnicas de imobilização da cabeça e aumento de conforto. Contudo, o uso dessas estratégias não é suficiente para retirar os artefatos, sendo necessária a utilização de algoritmos específicos. Essas técnicas tipicamente consideram que todas as imagens do volume são adquiridas instantaneamente, e que apenas movimentos de corpos rígidos ocorrem ao longo do exame, isto é, que a cabeça mudou sua orientação e posição mas não sofreu deformações. Uma função de custo mede a similaridade de cada volume da série com um volume referência, usualmente a primeira imagem adquirida na sessão, ou a do meio. A função de

custo é usada para determinar as melhores estimativas das seis variáveis de movimento de corpo rígido (três rotações e três translações) (Strother, 2006).

O realinhamento espacial realizado desta forma minimiza grande parte da variância decorrente do movimento da cabeça durante o experimento e assegura que o valor de um dado voxel em cada volume corresponde anatomicamente ao mesmo ponto em todas as imagens adquiridas. Esse método, contudo, não é suficiente para eliminar totalmente os artefatos. É possível que artefatos residuais e sinais de movimento correlacionados com o estímulo permaneçam. Uma forma de verificar se há relação entre o movimento e o estímulo é testar se os parâmetros de movimento estão correlacionadas com o paradigma do estímulo. Altos valores de correlação sugerem que falsos positivos podem surgir, e o dado deve ser descartado.

Filtros espaciais

A utilização de filtros espaciais é importante para o aumento da relação sinal-ruído (do inglês, *signal to noise ratio* – SNR). A suavização é frequentemente implementada convoluindo-se as imagens com um filtro Gaussiano no domínio espacial com os parâmetros do filtro especificados pela largura a meia altura da função Gaussiana, ou FWHM (do inglês, *full width at half maximum*). Essa etapa tanto é importante como controversa, apresentando vantagens e desvantagens (Mikl et al., 2008).

Além de melhorar a SNR, outras duas razões para o uso de filtros espaciais são o aprimoramento da validade de testes estatísticos paramétricos e ajustes de variações anatômicas e funcionais entre sujeitos. A suavização espacial faz com que a distribuição de erros se aproxime da distribuição normal, garantindo a validade dos testes paramétricos. Já nos estudos de comparação entre grupos, é necessário que os cérebros individuais sejam normalizados e transformados para um espaço padrão a fim de estabelecer correspondência

espacial. A suavização ainda é necessária caso se opte por utilizar estratégias de correção para múltiplas comparações baseadas na teoria de campos aleatórios (Worsley et al., 1992).

A principal desvantagem dos filtros espaciais resultam da imperfeição na correspondência entre a largura do filtro e o tamanho da área modulada pela tarefa. Por exemplo, se o filtro utilizado é muito largo (FWHM grande), o sinal de áreas cerebrais pequenas podem ser atenuadas abaixo do limiar de significância estatística (Huettel et al., 2004).

Filtros temporais

Os filtros temporais buscam remover componentes de frequência indesejáveis da série temporal, sem modificar o sinal de interesse. A maior parte do ruído nas séries temporais de fMRI ocorrem em baixas frequências ($f < 0,05$ Hz), e tem origem principalmente na variação linear lenta do sinal[1], ao efeito *aliasing* do ruído fisiológico cardíaco e ao ruído proveniente da respiração (Strother, 2006). De regra, a remoção desses ruídos é feita por um filtro passa-alta. No entanto, deve-se ter cuidado para não se retirar o sinal relacionado ao estímulo. Se a frequência de corte do filtro for muito alta, o sinal de interesse será reduzido ou até mesmo eliminado, principalmente se considerarmos os protocolos em bloco, os quais possuem, em geral, baixa frequência.

2.1.4. Análise estatística das imagens

Uma vez realizado o pré-processamento, os dados estão prontos para a análise estatística. Nesta esta etapa, o objetivo é identificar as regiões cerebrais que foram moduladas por alguma condição experimental. Para tanto, vários métodos têm sido propostos e desenvolvidos. Aqui, no entanto, optou-se por descrever o Modelo Linear Geral (do inglês,

[1] Do inglês *drift,* podem surgir da instabilidade do aparelho de ressonância magnética e reduzir o poder estatístico na detecção de ativações (Smith et al., 1999).

General Linear Model – GLM) (Friston et al., 1994), tendo em vista que esse foi o método utilizado neste estudo. Esse é o método mais empregado em estudos de fMRI principalmente por sua flexibilidade na implementação diferentes testes estatísticos paramétricos e na incorporação de múltiplas variáveis independentes (Friston et al., 1994). Cabe notar que a maioria dos modelos estatísticos usados são casos especiais do GLM, como os testes de correlação, teste-t simples, ANOVA e ANCOVA.

O GLM é um método predominantemente paramétrico: formas específicas da função de distribuição de probabilidade e hipóteses específicas em termos dos modelos e parâmetros dessas distribuições são estabelecidas *a priori*. Após a estimação dos parâmetros, são aplicados métodos estatísticos que refletem a evidência contra a hipótese nula. Estatísticas com distribuição nula conhecida são usadas.

No contexto das análises de fMRI o GLM é utilizado para realizar inferências estatísticas por meio de testes univariados. Ou seja, a análise estatística é realizada separadamente para cada série temporal de cada voxel (variável dependente), conhecido como mapeamento estatístico paramétrico (SPM[2]) (Friston et al., 1995).

O princípio do GLM consiste em explicar o comportamento de uma variável Y_j ao longo de J observações em termos de uma combinação linear de variáveis explanatórias x_{jl}, com l =1,..., L, mais um termo de erro ε_j, e pode ser resumido na equação:

$$Y_j = x_{j1}\beta_1 + \cdots + x_{jl}\beta_l + \cdots + x_{jL}\beta_L + \cdots + \varepsilon_j \qquad (1)$$

em que β_l são parâmetros desconhecidos, correspondendo a cada uma das L variáveis explanatórias x_{jl}. Para maior clareza, a equação 1 pode ser expandida para um conjunto de equações, uma para cada observação j:

[2] Do inglês, *statistical parametric mapping (SPM)*. Não confundir com o *software* de mesmo nome criado pelo *Wellcome Department of Imaging Neuroscience, University College London* para realizar tais análises.

$$
\begin{aligned}
&Y_1 = x_{11}\beta_1 + \cdots + x_{1l}\beta_l + \cdots + x_{1L}\beta_L + \cdots + \varepsilon_1 \\
&\vdots = \\
&Y_j = x_{j1}\beta_1 + \cdots + x_{jl}\beta_l + \cdots + x_{jL}\beta_L + \cdots + \varepsilon_j \\
&\vdots = \\
&Y_J = x_{J1}\beta_1 + \cdots + x_{Jl}\beta_l + \cdots + x_{JL}\beta_L + \cdots + \varepsilon_J
\end{aligned}
$$

que podem ser representadas na forma matricial como:

$$
\begin{pmatrix} Y_1 \\ \vdots \\ Y_j \\ \vdots \\ Y_J \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} x_{11} & \cdots & x_{1l} & \cdots & x_{1L} \\ \vdots & \ddots & \vdots & \ddots & \vdots \\ x_{j1} & \cdots & x_{jl} & \cdots & x_{jL} \\ \vdots & \ddots & \vdots & \ddots & \vdots \\ x_{J1} & \cdots & x_{Jl} & \cdots & x_{JL} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \beta_1 \\ \vdots \\ \beta_l \\ \vdots \\ \beta_L \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} \varepsilon_1 \\ \vdots \\ \varepsilon_j \\ \vdots \\ \varepsilon_J \end{pmatrix}
$$

que pode ser escrito de forma simplificada como:

$$
Y = X\beta + \varepsilon \qquad (2)
$$

Y é o vetor coluna das *J* observações; *X* é a matriz de desenho[3], em que cada coluna representa uma dentre as *L* variáveis explanatórias para cada observação *J*; β é o vetor coluna dos parâmetros que representa o peso com que cada variável explanatória contribui para o resultado observado *Y*; ε é o vetor de resíduos, ou seja, a porção de *Y* não explicável pelas variáveis de *X*.

A variável dependente corresponde à série temporal de fMRI e as funções de referência correspondem aos modelos das respostas de fMRI esperadas e determinadas pelo paradigma experimental, que corresponde à matriz de desenho.

É importante notar que o vetor de parâmetros estimados (PE) β tem a primeira linha correspondente a β_0. O correspondente curso temporal do preditor X_0 tem o valor de 1 para todos os pontos da série, sendo chamado de termo constante. O valor de β_0 representa o nível de sinal da condição de linha de base.

A contribuição de cada modelo inserido na matriz de desenho é medida pela estimação do parâmetro β. No entanto, não é possível resolver a equação 2 simultaneamente e para valores exatos (ε = 0), uma vez que o número de observações é maior do que o número de

[3] Em inglês, *design matrix*.

variáveis explanatórias e erros experimentais podem estar presentes. A solução possível é estimar os valores de β_j que melhor se ajustem aos dados minimizando o erro residual. A abordagem matemática utilizada para resolver este problema é conhecida por método dos mínimos quadrados ou mínimos quadrados ordinários (OLS – *Ordinary Least Square*).

Cada série temporal preditora tem um coeficiente β associado, quantificando sua potencial contribuição na explicação da série temporal do voxel Y . Enquanto que a exata interpretação dos valores de beta dependem de detalhes da matriz, betas positivos (ou negativos) indicam que o voxel exibe forte modulação durante a condição experimental, relativa à linha de base. A Figura 3 representa as parcelas Y, $X\beta$ e ε de uma série temporal de um voxel modulada por um experimento em bloco.

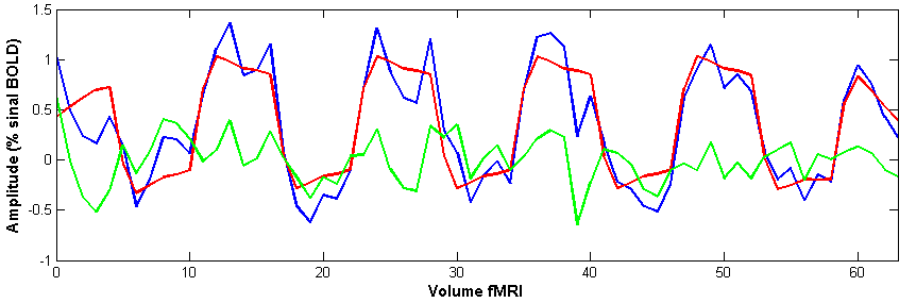


Figura 3 – Representação das diferentes parcelas do modelo GLM. A série temporal Y que se deseja modelar (azul), a variável explanatória X multiplicada pelo β estimado (vermelho) e o erro residual ε (verde).

Modelamento da função de estímulo e da resposta hemodinâmica

O tipo mais simples de regressor utilizado na matriz experimental do GLM é a função de estímulo. Essa função é usualmente representada matematicamente pela função *stick* (delta) ou *boxcar* que codifica a ocorrência de um evento ou uma época. Contudo, utilizar a função de estímulo diretamente na matriz de desenho resulta em baixa sensibilidade. Deve-se levar em conta, o atraso da resposta BOLD, que não se inicia exatamente após a apresentação do estímulo e sua forma característica. Isso é feito por meio do modelamento da HRF. Ela

pode ser modelada como uma simples função de distribuição gama (Lange and Zeger, 1997) ou Poisson (Friston et al., 1994).

Um modelo muito utilizado foi proposto por Glover (1999) como respostas da área auditiva primária:

$$h(t) = \left(\frac{t}{d_1}\right)^{a_1} \exp\left(\frac{-(t-d_1)}{b_1}\right) - c\left(\frac{t}{d_2}\right)^{a_2} \exp\left(\frac{-(t-d_2)}{b_2}\right) \qquad (3)$$

em que t é o tempo em segundos, $d_j = a_j b_j$ é o tempo ao pico (j = 1) e o tempo para o *undershoot* (j = 2). Um exemplo para $a_1 = 6$, $a_2 = 12$, $b_1 = b_2 = 0{,}9$s, e $c = 0{,}35$ (Glover, 1999) é mostrado na **Figura 4**. Ainda, se considerarmos que o sinal BOLD é resultado de um sistema linear invariante no tempo (Boynton et al., 1996), isto é, que a resposta BOLD para um breve estímulo tem uma duração finita e é independente do tempo, e que as respostas para sucessivos estímulos somam-se linearmente, então podemos expressar o regressor como a convolução entre a função de estímulo e uma HRF canônica (**Figura 4**).

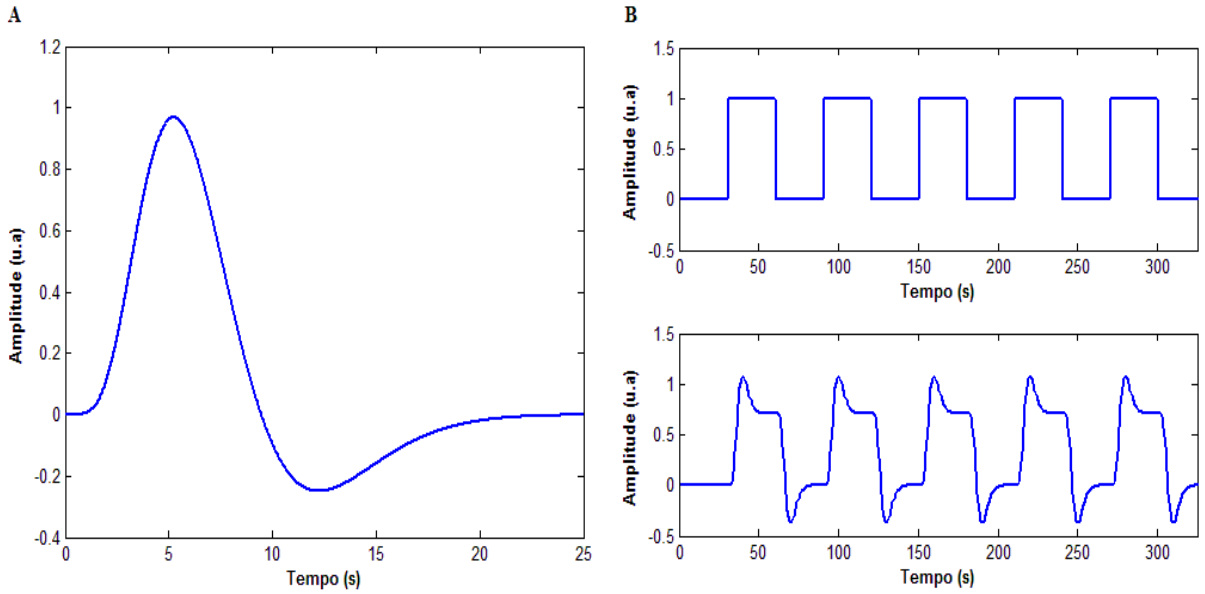


Figura 4 – Modelamento da HRF e da função estímulo. (A) Função da resposta hemodinâmica canônica proposta por Glover (1999). (B) Na parte superior, uma função quadrada que modela um estímulo em bloco. Na parte inferior, resposta BOLD prevista, resultante da convolução entre a função estímulo e a HRF (A).

Contraste e inferência

Para se fazer afirmações a partir dos valores β estimados, ou seja, para identificar se o parâmetro estimado representa a resposta BOLD modulada pelo desenho experimental, realiza-se um *teste de hipóteses* sob o efeito de interesse, por meio da utilização de *contrastes*.

De maneira geral, o objetivo do pesquisador é rejeitar a hipótese que não existe efeito da tarefa associado à série temporal de um dado voxel. Esta é a denominada hipótese nula H_0. Se a hipótese nula é rejeitada, a hipótese alternativa, H_1, é declarada verdadeira, indicando que a série temporal daquele voxel está correlacionado com a tarefa experimental.

Os contrastes são combinações lineares das estimativas dos parâmetros, organizados na forma de vetores ou matrizes. Eles permitem testar vários efeitos sem a necessidade de refazer a regressão, etapa computacionalmente custosa. Para um contraste c, as hipóteses podem ser definidas como :

$$H_0 : c^T\beta = 0$$

$$H_1 : c^T\beta \neq 0$$

em que c^T é um vetor linha[4] e permite a comparação direta entre diferentes condições na estatística T. Para testar, por exemplo, o efeito da condição experimental modelada na primeira coluna da matriz de desenho X, o vetor de contraste c^T deve ser igual a [1 0 0 ... 0]. Para testar a diferença entre a primeira e segunda coluna da matriz o contraste seria c^T = [1 -1 0 ... 0]. O que corresponde ao efeito $c^T\hat{\beta} = \hat{\beta}_1 - \hat{\beta}_2$. Portanto, se considerarmos que as variáveis de resposta são independentes e idênticas ao longo dos TRs então, sob a hipótese nula, a estatística T pode ser calculada dividindo um contraste dos parâmetros estimados $c^T\hat{\beta}$ pelo seu erro padrão estimado:

[4] Na forma matricial, o contraste c pode ser usado para calcular a estatística F.

$$T = \frac{c^T \hat{\beta}}{\sqrt{\hat{\sigma}^2 c^T (X^T X)^{-1} c}} \qquad (4)$$

que segue distribuição T com número de graus de liberdade (dof - *degrees of freedom*) igual a $dof = J - 1 - L$. O estimador de quadrados mínimos de $\hat{\sigma}^2$ é:

$$\hat{\sigma}^2 = \frac{1}{dof} \left(Y - X\hat{\beta}\right)^T \left(Y - X\hat{\beta}\right). \qquad (5)$$

Os valores para a estatística T são computadas para cada voxel individualmente. Grandes valores de T correspondem aos voxels que apresentam modulação com a tarefa experimental.

Resta ainda a decisão se determinado voxel é estatisticamente significativo, de acordo com a magnitude da estatística T calculada. Essa decisão é realizada conhecendo-se as distribuições de probabilidade para os valores de T sob a hipótese nula, e encontrando-se os p-valores para cada voxel. No teste de hipótese, esses p-valores são utilizados para rejeitar H_0 mediante nível descritivo fixo, α, definido como a probabilidade de se obter estatística de teste igual ou mais extrema que aquela observada em uma amostra considerando verdadeira a hipótese nula. O valor descritivo $\alpha = 0{,}05$ é geralmente adotado para os testes de hipóteses. A estatística que produz $p = \alpha$ é utilizada para testar a H_0, se ao final do experimento a estatística obtida for maior ou igual à estatística fixada, ou seja $p \leq \alpha$, então a H_0 é rejeitada.

<u>O problema dos testes múltiplos</u>

Um dos problemas importantes na análise de dados de fMRI são os testes múltiplos. Uma vez que o número de testes estatísticos realizados é muito grande, já que é feito um teste para cada voxel, e um conjunto de dados de fMRI contém milhares de voxels, a probabilidade de se ter falsos positivos (erro do tipo I) também é muito grande. Surge a necessidade de utilizar correções para múltiplas comparações.

A estratégia padrão para superar esse problema é reduzir o valor de α. Assim, a probabilidade dos voxels serem significativos devido ao acaso diminui. Um método comum e bastante restritivo é a correção de Bonferroni, na qual o valor de α decresce proporcionalmente com o número de testes realizados e considera independência entre os voxels (Huettel et al., 2004). Outra abordagem menos conservativa, leva em consideração a observação explícita de que voxels vizinhos estão conectados funcionalmente. Conhecida como teoria dos campos aleatórios (*Gaussian Randon Field* – GRF), apresenta resultados mais robustos, porém com suposições mais restritivas, pois exige a suavização dos dados comprometendo a resolução espacial da técnica (Worsley et al., 2002). Alternativo aos procedimentos que controlam a probabilidade de erro para a família de testes, está o controle da proporção esperada de falsos positivos entre todos os testes, ou seja, controlar a taxa de falsas descobertas, FDR (False Discovery Rate) (Benjamini and Hochberg, 1995; Genovese et al., 2002).

Uma opção interessante é aplicar limiares menores e não tão conservativos quanto ao limiar único, e levar em conta o número de voxels conectados. Um método baseado em simulação de Monte Carlo que calcula a probabilidade de obter diferentes tamanhos de cluster foi proposta por Forman e colaboradores (1995). Combinado com limiares críticos menos conservativos, os limiares de extensão de cluster calculados são aplicados para os mapas estatísticos considerando que a probabilidade de erro global de $p < 0,05$ é satisfeita (Forman et al., 1995). Assim como a abordagem GRF, essa abordagem incorpora a observação de que os voxels vizinhos ativam em cluster, entretanto, não requerem suavização espacial. É uma abordagem que parece ser muito adequada para os dados de fMRI apesar de apresentar um alto custo computacional.

Apresentação dos mapas estatísticos

O objetivo principal dos testes estatísticos é avaliar a probabilidade de cada voxel sob a hipótese nula. Quando os testes estatísticos de todos os voxels são combinados, o resultado é um mapa estatístico. Em geral, esses mapas são coloridos de acordo com os valores de probabilidade de cada voxel, mostrando apenas os voxels significativos, ou seja, aqueles cujo p-valor é inferior ao limiar estatístico estabelecido (α). A escala de cores varia, sendo normalmente adotada a seguinte convenção: cores mais escuras para indicar níveis de significância mais baixos, e cores mais brilhantes para níveis mais elevados (Huettel et al., 2004).

Corregistro e normalização

Em estudos de fMRI envolvendo humanos, os mapas são habitualmente gerados a partir de imagens EPI, as quais possuem baixa resolução e baixo contraste. Enquanto que as outras imagens de MRI podem ter contraste e resolução anatômica melhores, da ordem de 1 mm^3. Dessa forma, a combinação entre imagens EPI e imagem ponderada em T_1 pode prover muito mais informação do que a análise das imagens isoladamente. O registro entre imagens de diferentes modalidades é conhecido como *corregistro*.

Para permitir comparações entre resultados de experimentos de fMRI obtidos de diferentes indivíduos sob a forma de coordenadas estereotáxicas (x, y, z), ou ainda, para permitir que experimentos de diversos indivíduos sejam analisados em conjunto, é necessário que as imagens sejam registradas entre si. Esse processo, chamado de normalização, consiste na transformação espacial de cérebros de indivíduos para um sistema de coordenadas padrão (cérebro de referência). O objetivo final é remover a variabilidade devido a diferenças anatômicas entre as imagens dos indivíduos.

Existem inúmeras abordagens para realizar esse procedimento, incluindo manuais *vs*. automáticas e lineares *vs*. não-lineares (Laird et al., 2010). Além disso, há diferentes espaços padrões que são usados para a normalização espacial. Os dois mais usados atualmente são baseados no atlas Talairach (Talairach and Tournoux, 1988) e o padrão MNI (Montreal Neurological Institute) (Brett et al., 2002). O espaço Talairach, criado pelo médico francês Jean Talairach e colegas, é baseado em medidas obtidas a partir da dissecção *post-mortem* de um único cérebro, o de uma mulher europeia de cerca de 60 anos. Apesar desse método de normalização ter sido de extrema importância para a neurociência, o uso de um único cérebro como padrão apresenta muitos problemas. Uma abordagem mais recente tem usado um padrão populacional definido por imagens de vários sujeitos *in vivo* desenvolvido pelo Montreal Neurological Institute (MNI). A versão atual, chamada de MNI-152, foi gerada a partir de imagens de 152 voluntários (Brett et al., 2002). É importante notar que embora o sistema de coordenadas utilizado pelo atlas MNI seja semelhante ao do atlas Talairach, há diferenças na definição da origem, orientação e dimensão dos dois (Lancaster et al., 2007). Assim, as coordenadas Talairach não coincidem com as coordenadas MNI, sendo possível, no entanto a aplicação de transformações que levam de um espaço ao outro (Laird et al., 2010).

2.1.5. Análise de conectividade

No últimos anos, além da identificação das regiões que foram moduladas pela tarefa, tem surgido estratégias que visam caracterizar de forma mais abrangente as redes neurais envolvidas. Dentre estas, foco especial é voltado para a maneira como as diferentes regiões se relacionam entre si, por meio da análise de conectividade.

Recentemente, duas estratégias têm sido empregadas para caracterizar aspectos de integração funcional por fMRI: a conectividade efetiva e a conectividade funcional (fcMRI). A primeira busca caracterizar explicitamente à influência que um sistema neural exerce sobre

outro. Esse tipo de conectividade leva em conta dois aspectos importantes: a dinamicidade e o modelo de interação ou acoplamento entre as regiões (Friston, 2011). Por outro lado, a conectividade funcional (fcMRI), utilizada neste trabalho, é geralmente inferida a partir de correlações cruzadas entre as flutuações do sinal BOLD de diferentes regiões. Ela é, dessa forma, definida como dependências estatísticas entre eventos neurofisiológicos remotos e pode ser quantificada por correlações, coerência, ou transferência de entropia.

Em estudo pioneiro, Biswal e colegas (1995) mediram as flutuações espontâneas do sinal BOLD durante o estado de repouso do sinal BOLD do córtex sensóriomotor. Em outras palavras, os indivíduos não realizavam nenhuma tarefa motora. Utilizando abordagem similar àquela de estudos de eletroencefalografia (EEG) para o estudo de oscilações cerebrais, eles identificaram voxels cujas séries temporais se mostraram significativamente correlacionadas entre si (Biswal et al., 1995).

Atualmente, duas abordagens principais são utilizadas para avaliar a conectividade funcional em dados de repouso: a análise baseada em sementes (do inglês, *Seed Voxel Correlation Analysis* – SCA) (Biswal et al., 1995)) e a análise de componentes independentes (do inglês, *Independent Component Analysis* – ICA; (McKeown et al., 1998)).

A SCA, utilizada neste trabalho, é baseada no cálculo dos coeficientes de correlação cruzada de Pearson (Eq. 6) entre as séries temporais de uma região (*seed*) de interesse (do inglês, *Region of Interest* – ROI) com todos os outros voxels do cérebro.

$$r_{xy} = \frac{\sum_{i=1}^{n}(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sigma_x \sigma_y} \qquad (6)$$

em que x e y são duas séries temporais, $\bar{x}$, σ_x, $\bar{y}$ e σ_y são as respectivas médias e desvios padrões.

Uma vez calculados os coeficientes, obtém-se um mapa de correlação, que revela a conectividade funcional entre a ROI (*seed*) e o resto do cérebro. Esses mapas são convertidos em z-valores por meio da transformação de Fisher:

$$z_{xy} = 0.5.\, ln\left(\frac{1 + r_{xy}}{1 - r_{xy}}\right). \qquad (7)$$

Desse modo, testes estatísticos paramétricos podem ser realizados posteriormente a fim de se estabelecer o limiar estatístico nesses mapas. Além dessa estratégia, conhecida como correlação *voxel-wise*, é possível também calcular a correlação entre um conjunto de regiões de interesse, conhecida como correlação *ROI-wise*, e com isso obter-se uma matriz de correlação. Em ambos os casos, o método depende de uma hipótese *a priori*, uma vez que é necessário escolher uma, ou várias ROI (*seed*) para se computar os mapas de conectividade.

Diferentemente, a ICA representa uma análise exploratória, na qual os dados do repouso são decompostos em diversas componentes. Dessa forma, a análise em componentes independentes requer a intervenção significativa do operador, a fim de distinguir essas componentes representativas das de ruído e artefato (Weissenbacher et al., 2009).

Independentemente do método utilizado, a análise de conectividade funcional envolve basicamente a verificação de coerências temporais entre diferentes estruturas cerebrais. Porém, sabe-se que os dados de fMRI são contaminados com várias flutuações que não estão relacionadas à atividade neural, tais como, movimentos da cabeça, artefatos fisiológicos (causados pela respiração e batimento cardíaco), bem como instabilidades do *hardware* e *drifts* do campo magnético. Desse modo, além das etapas de pré-processamento dos dados, muitas vezes se torna necessária a remoção dos componentes de flutuação espúria e de grande coerência temporal, o que é geralmente realizado pela remoção dos componentes do sinal ligados à substância branca, líquor e sinal global (Weissenbacher et al., 2009).

2.2. DEFAULT MODE NETWORK

Cerca de uma década atrás, duas meta-análises de estudos com PET (tomografia por emissão de pósitrons), envolvendo aproximadamente 200 sujeitos, concluíram que existe um conjunto de regiões que apresenta maior atividade durante condições de controle passivas (repouso ou fixação passiva, por exemplo) do que durante a execução de determinada tarefa ativa (Mazoyer et al., 2001; Shulman et al., 1997).

A consistência dos achados e a observação desse mesmo fenômeno em vários outros trabalhos que usaram diferentes técnicas de neuroimagem funcional levou Raichle e colaboradores a proporem a ideia de que existe um modo organizado de funcionamento do cérebro durante o estado de repouso. A essa rede deu-se o nome, em inglês, de *Default Mode Network* (DMN) (Raichle et al., 2001). Desde então, o conceito de DMN tem sido explorado de maneira crescente como tema central em diversas áreas da neurociência.

As principais componentes dessa rede são estruturas da linha média do córtex cerebral, como o córtex frontomedial anterior, córtex frontomedial ventral, o giro cingulado posterior e pré-cuneus. Algumas regiões do lobo parietal inferior e do giro temporal médio também estão incluídas.

A anatomia da DMN foi caracterizada utilizando-se diversas abordagens. Inicialmente, foi identificada como um aumento consistente na atividade cerebral durante estados passivos quando comparado a uma diferentes tarefas ativas, fenômeno que ficou conhecido como *task-induced deactivation* (TID). Dois estudos foram determinantes para a definição inicial da DMN. No primeiro deles, Shulman e colegas (1997) reanalisaram nove estudos de PET, contabilizando um total de 132 sujeitos. Todos os estudos envolviam comparações entre tarefas ativas nas quais os participantes fizeram julgamentos baseados em um estímulo visual enquanto mantinham o olhar fixo em uma cruz central e tarefas passivas nas quais o mesmo estímulo ou outro muito similar era apresentado, mas os participantes eram orientados a

apenas fixarem o olhar na cruz central. Apesar de cada experimento apresentar características próprias, eles puderam ser agrupados em dois tipos: os que não envolviam nenhum processo linguístico e que exigiam como resposta o ato de apertar um botão; e os que envolviam processamentos relacionados à linguagem e exigiam uma resposta vocal. Quando a tarefa ativa foi usada como referência para a condição de fixação o fluxo sanguíneo diminuiu de maneira geral tanto para tarefas relacionadas à linguagem como para aquelas não relacionadas. As regiões que mostraram diminuições consistentes incluíam o cíngulo posterior/pré-cuneus (BA[5] 31/7), o córtex parietal inferior bilateral (BA 40 e 39/19), o córtex frontal dorsolateral esquerdo (BA 8), o córtex frontal inferior lateral esquerdo (BA 10/47), o giro temporal inferior esquerdo (BA 20), regiões frontais mediais do eixo dorsoventral (BAs 8, 9, 10 e 32) e a amígdala direita. No trabalho de revisão de Buckner e colaboradores (2008), esse mesmo resultado é apresentado sobreposto a um cérebro inflado (apenas o hemisfério esquerdo), ilustrando a topografia da DMN (Figura 5).

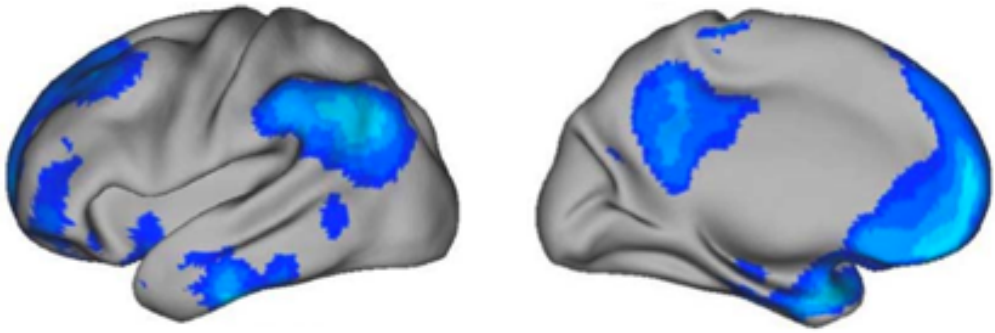


Figura 5 – Anatomia da DMN delineada no trabalho de Shulman et al. As regiões em azul apresentaram um maior sinal durante as atividades passivas. Adaptado de (Buckner et al., 2008).

No segundo trabalho, Mazoyer e colaboradores (2001) estudaram a anatomia cortical do estado de repouso consciente por meio de uma meta-análise de nove experimentos que utilizaram PET, que usaram tarefas cognitivas diferentes mas compartilhavam o repouso como estado de controle. Durante o repouso, os sujeitos permaneceram em silêncio e no

[5] Do inglês, *Brodmann Area (BA)*

escuro, sendo instruídos a relaxarem, a não se mexerem e a evitarem pensamentos sistemáticos. As tarefas cognitivas incluíam protocolos de linguagem, imagem mental, cálculo mental, movimento dos dedos ou memória de trabalho. Quando havia estímulos estes eram apresentados tanto de maneira visual quanto auditiva e as tarefas podiam exigir resposta visual, motora ou, ainda, nenhuma resposta. Ao todo foram reanalisados exames de 63 voluntários. As análises revelaram uma rede de áreas cerebrais que estavam engajadas durante o repouso consciente quando este era comparado aos períodos de execução da tarefa. Essas áreas incluíam o giro angular bilateralmente, o córtex cingulado posterior/pré-cuneus, o córtex frontal medial e o cíngulo anterior, os sulcos frontal medial e superior esquerdo e o córtex frontal inferior esquerdo.

Em um dos primeiros estudos que utilizaram fMRI para estudar o período de repouso, Binder e colaboradores (1999) propuseram a avaliação do sinal BOLD em três condições distintas: estado de repouso, tarefa de monitoramento sonoro e tarefa de recuperação semântica. Curiosamente, essas análises identificaram regiões que tinham maior sinal durante o repouso que durante a execução de uma ou outra tarefa ativa. Em outras palavras, o sinal dessa rede composta pelo giro angular, córtex pré-frontal dorsal, cíngulo posterior e córtex temporal ventral foi sistematicamente reduzido pela execução da tarefa, independente do tipo da tarefa (Binder et al., 1999).

Em 2006, utilizando dados de fMRI, Shannon realizou uma meta-análise de dois estudos, em um total de 49 indivíduos, ambos envolvendo tarefas de linguagem (Shannon, 2006). Diferentemente dos trabalhos citados acima que utilizaram tarefas em bloco para identificar a DMN, o trabalho de Shannon foi baseado em estudos que utilizaram um paradigma evento-relacionado. O resultado encontrado foi bastante similar àqueles obtidos por protocolos em bloco, mostrando que o engajamento da DMN pode emergir rapidamente quando os indivíduos passam de uma tarefa ativa para o repouso.

Uma abordagem mais recente tem utilizado o conceito de conectividade funcional (fcMRI) para caracterizar a DMN. Para tanto, de regra dados de fMRI são adquiridos durante o estado de repouso de modo a avaliar as regiões cerebrais cujas flutuações no sinal BOLD apresentam correlações temporais entre si. Os resultados desses estudos são bastante coerentes permitindo afirmar que a DMN existe como uma rede do estado de repouso, do inglês *resting state network* (RSN), intrinsecamente conectada (Damoiseaux et al., 2006; Fox et al., 2005; Greicius et al., 2003; Greicius and Menon, 2004). Desse modo, é sugerido que o conjunto de regiões cerebrais cuja atividade diminui durante a realização de tarefas apresentam fcMRI significativa durante o repouso (*resting state*), fornecendo evidência para a existência de uma rede de modo padrão coesa e tonicamente ativa (Greicius et al., 2003). Por exemplo, Greicius e colegas (2003) fizeram uso do sinal de duas regiões centrais da DMN, o cíngulo posterior (PCC) e o cíngulo anterior ventral (vACC), e observaram que os mapas de fcMRI dessas regiões estavam correlacionadas temporalmente com as demais regiões que fazem parte da DMN. Em particular, o mapa de conectividade do PCC apresentou as mesmas regiões descritas em Shulman e colaboradores (1997), com exceção da amígdala direita e do córtex frontal inferior lateral esquerdo.

A Figura 6 mostra a coerência dos achados a partir da sobreposição dos mapas obtidos pelos três diferentes métodos apresentados anteriormente (paradigma em bloco, paradigma evento-relacionado e conectividade funcional). Os resultados são bastante consistentes e as regiões envolvidas são praticamente as mesmas, o que mais uma vez corrobora para a definição da DMN como uma rede organizada.

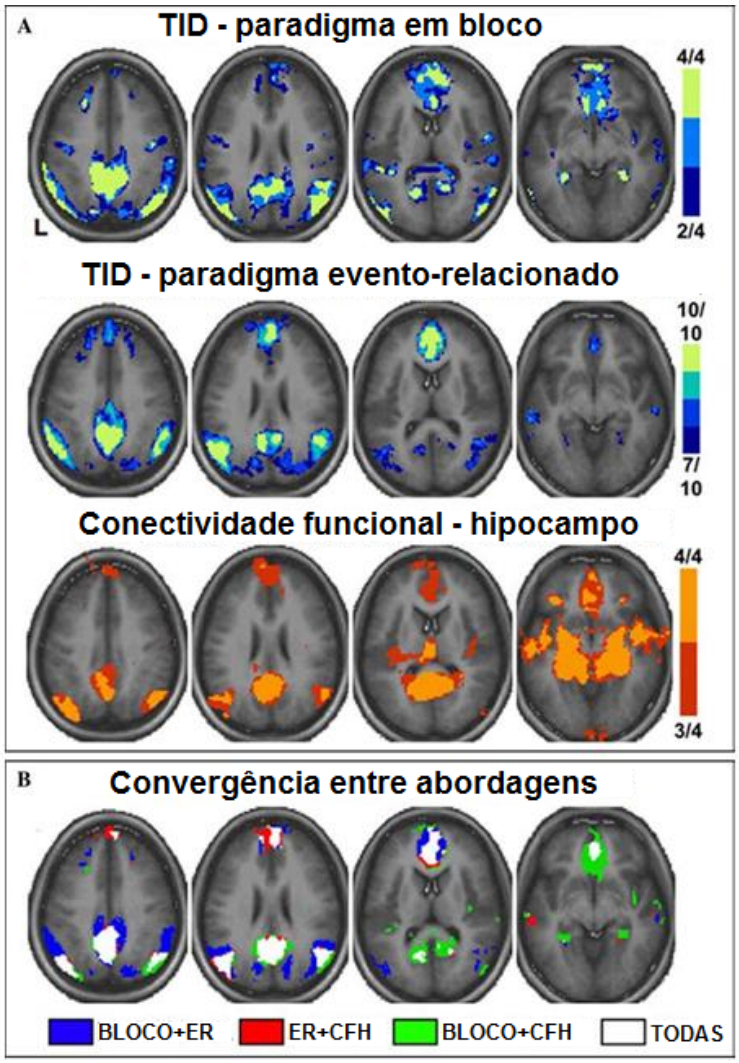


Figura 6 – Diferentes abordagens utilizando fMRI mostram resultados semelhantes na identificação da anatomia da DMN. (A) Cada linha da imagem mostra uma abordagem diferente para definir a DMN: protocolo em bloco (linha superior), protocolo evento-relacionado (linha do meio) e conectividade funcional com o hipocampo (linha inferior). Em cada abordagem, os mapas representam uma meta-análise de vários conjuntos de dados fornecendo assim uma estimativa conservadora da DMN. A escala de cores mostra o número de conjunto de dados com efeito significativo em cada análise. (B) A convergência entre abordagens revela as regiões centrais que compõem a DMN. Adaptado de (Buckner et al., 2008).

2.2.1. Funções da DMN

O estudo do estado de repouso tem sido tema recorrente nos estudos envolvendo neuroimagem na última década. Em parte, esse fato se dá pela necessidade da grande maioria dos estudos de neuroimagem de definir uma condição de linha de base que tem sido geralmente associada à condição de repouso. Porém, sabe-se que no estado de repouso o cérebro é responsável por 20% do consumo total de oxigênio do corpo (Clark and Sokoloff,

1999). Além disso, observações indicam que mais de 80% desse consumo energético é dedicado a aspectos funcionais como a manutenção do potencial elétrico de repouso neuronal (Gusnard and Raichle, 2001; Sibson et al., 1998). Fica, portanto, comprometida a ideia de que o estado de repouso caracteriza uma linha de base bem definida.

Raichle e colegas mapearam a fração de extração de oxigênio (do inglês, *oxygen extraction fraction* – OEF), razão entre a quantidade de oxigênio usado localmente e o oxigênio fornecido pelo fluxo sanguíneo. A OEF parece ser notavelmente uniforme durante o estado de repouso (com o indivíduo acordado mas com os olhos fechados). Por outro lado, a uniformidade da OEF indica equilíbrio entre a demanda metabólica local necessária para manter a atividade neuronal e o nível do fluxo sanguíneo na região. Assim, esse estado de equilíbrio tem sido proposto para definir o nível basal de atividade neuronal, de forma que a OEF média representaria a base fisiológica da função cerebral no modo padrão (Raichle et al., 2001).

A partir dessas observações dois outros estudos mostraram as implicações teóricas e empíricas de se definir um estado como linha de base, e neste momento tem início a discussão do eventual papel funcional da DMN (Gusnard et al., 2001b; Gusnard and Raichle, 2001). Além disso, foram levantadas algumas hipóteses sobre como as diferentes áreas que compõem a DMN estão relacionadas, como por exemplo que o córtex pré-frontal medial estaria relacionado ao processamento autorreferencial (Gusnard et al., 2001b; Gusnard and Raichle, 2001).

Apesar do grande número de estudos que procuram investigar as bases neurais da DMN, pouco ainda se sabe sobre suas funções. De forma geral, parece começar a aparecer o consenso que essa rede está diretamente envolvida em processos mentais internos. Uma experiência compartilhada pelos humanos é a intensa atividade mental interna. Deixados sem uma tarefa imediata que exija total atenção, nossas mentes divagam, passando de um assunto

a outro – o que William James (1890) chamou de "fluxo de consciência". É comum pensar sobre acontecimentos passados, prever possíveis eventos futuros e se deixar levar por ideias que estão além da realidade vivida. Em outras palavras, esses são os processos mentais que compõem a fantasia, imaginação, devaneios e pensamentos. A observação de que o sinal da DMN é maior durante estados cognitivos passivos, quando o pensamento está voltado para o interior, levanta a possibilidade de que a DMN esteja associada à cognição espontânea, e de que, além disso, a DMN estaria engajada durante os momentos em que os indivíduos não estão ocupados com uma tarefa externa. Dentro dessa perspectiva, a DMN teria papel importante na construção de simulações mentais (Buckner et al., 2008).

Na ausência de uma tarefa que requer processamento deliberativo, a mente é ocupada com pensamentos ditos independentes de estímulos (*stimulus-independent thoughts* – SIT). A literatura tem se referido a esse estado como um divagar da mente (*mind wandering*), uma linha de base psicológica da qual as pessoas partem quando a atenção é necessária em outros lugares e para a qual voltam quando as tarefas não requerem mais uma supervisão consciente (Smallwood and Schooler, 2006). Outro termo que tem sido bastante utilizado é o de *daydreaming* (Buckner et al., 2008).

Vários estudos combinando amostragem de pensamentos e de neuroimagem têm implicado a DMN na produção interna e consciência dos momentos de *mind wandering* durante o repouso e várias tarefas cognitivas (Mason et al., 2007; McKiernan et al., 2006). Esses estudos tem revelado, por exemplo, que o engajamento dessa rede está positivamente correlacionado à frequência de *mind wandering* informada pelos indivíduos. Por exemplo, Mason e colaboradores buscando investigar a relação entre DMN e *mind wandering* treinaram voluntários em tarefas de memória de trabalho (verbal e visual/espacial) e verificaram que os períodos de *mind wandering* coincidiam com o recrutamento aumento da DMN acessada por meio de fMRI. Também relacionaram o padrão de atividade da DMN de cada indivíduo com

a propensão para divagarem, ou seja de se encontrarem no estado de *mind wandering* (relatada pelo próprio participante). Os resultados demonstraram que reduções na exigência da tarefa foram acompanhadas por aumentos tanto no *mind wandering* quanto no sinal da DMN. Além disso, os indivíduos que apresentaram maior magnitude do sinal BOLD durante a tarefa se auto-descreveram como com alta tendência a divagarem (*daydreamers*).

Alguns autores levantam outra hipótese para a função da DMN. Eles sugerem que a DMN estaria engajada no monitoramento do ambiente externo quando o foco de atenção não está direcionado para uma determinada tarefa (Shulman et al., 1997). A hipótese é que a diferença fundamental entre as condições de tarefas orientadas a um objetivo específico, associadas à redução do sinal da DMN, e as condições passivas, associadas ao aumento do sinal dessa rede, é a forma do foco de atenção no mundo externo. Tarefas ativas normalmente requerem atenção concentrada em estímulos foveais ou em outro tipo de dica previsível. Por outro lado, as condições passivas liberam o participante para monitorar o ambiente externo, denominado um estado exploratório (*exploratory state*) (Shulman et al. 1997) ou vigilância (*watchfulness*) (Gilbert et al., 2007). Gusnard e Raichle, apontam o PCC/pré-cuneus como sendo uma região tonicamente ativa, que estaria continuamente coletando informações sobre o mundo ao nosso redor. Essa seria, segundo os autores, uma função da DMN com significado evolutivo óbvio. Por exemplo, na detecção de predadores os recursos atencionais devem ser alocados automaticamente e estar continuamente disponíveis (Gusnard e Raichle, 2001). Dentro dessa possibilidade, a DMN hipoteticamente apoiaria um foco amplo, mas com um nível de atenção baixo. Buckner e colaboradores (2008) nomeiam essa hipótese de "hipótese do sentinela", associando esse estado de atenção à atividade de um sentinela que monitora o mundo externo sempre atento a eventos inesperados.

2.2.2. Alterações na DMN

Recentemente, alguns trabalhos têm procurado por relações entre alterações da DMN e alguns distúrbios mentais, dentre as quais o autismo (Kennedy and Courchesne, 2008), a esquizofrenia (Garrity et al., 2007), e a doença de Alzheimer (Greicius et al., 2004). Essas doenças causam disfunções cognitivas em domínios que estão relacionados à DMN. Além disso, outros estudos mostram que indivíduos apresentando doenças psiquiátricas, tais como depressão (Greicius et al., 2007; Sheline et al., 2009; Sheline et al., 2010), transtorno do déficit de atenção com hiperatividade (Castellanos et al., 2008) e stress pós-traumático (Buckner et al., 2008) têm a DMN alterada. Por exemplo, Sheline e colaboradores buscaram examinar a funcionalidade da DMN em pacientes com depressão maior, investigando se a capacidade de regular sua atividade e, portanto, seu papel no processamento autorreferencial estava prejudicada. Para tanto, eles pediram a um grupo de pacientes e controles para examinarem passivamente imagens com conteúdo negativo e reavaliá-las ativamente. Os indivíduos com depressão apresentaram falha na redução do sinal em diferentes regiões da DMN, incluindo o cíngulo anterior, o córtex parietal lateral, o córtex pré-frontal medial e o córtex temporal lateral. Essa falha ocorreu tanto quando da visualização passiva das imagens, quanto durante a fase de reavaliação. Além disso, olhar para as fotos negativas provocou aumento significativo do sinal em outras regiões da DMN (amígdala, parahipocampo e hipocampo) em deprimidos do que nos indivíduos controle. Dessa forma, segundo os autores, esses dados sugerem que a depressão pode ser caracterizada tanto pelo aumento de atividade induzida por estímulos como pela falha na redução da atividade em estruturas específicas da DMN (Sheline et al., 2009).

Por outro lado, existem estados não patológicos que também podem promover alterações na DMN. Entre eles podemos citar o sono (Horovitz et al., 2009; Koike et al., 2011; Saemann et al., 2011), a hipnose (McGeown et al., 2009), os estados meditativos (Brewer et

al., 2011; Jang et al., 2011) e o uso de substâncias como anestésicos (Greicius et al., 2008) e psicodélicos (Carhart-Harris et al., 2012).

Alterações na DMN foram estudadas em diferentes fases do sono. Saemann e colegas mostraram que a medida que o sono não REM[6] se torna mais profundo o sinal é reduzido em regiões importantes da DMN, como o cíngulo posterior, o córtex pré-frontal medial e o giro parahipocampal. Além disso, foi observada diminuição da conectividade funcional entre as regiões posteriores e anteriores da DMN (Saemann et al., 2011). Em outro estudo, Koike et al. (2011) mostraram que o padrão de conectividade funcional entre os diversos componentes da DMN é diferente no sono REM quando comparado ao sono não REM. Dividindo a DMN em regiões *core* (cíngulo anterior rostral, cíngulo posterior, lobo parietal inferior bilateral e giro angular) e subsistemas (giros temporal inferior e médio bilateral e córtex pré-frontal medial), foi observado que a conectividade dentro das regiões *core* não variou durante os diferentes estágios do sono, enquanto que entre elas e os subsistemas houve um aumento da conectividade durante o sono REM quando comparado ao sono NREM.

Os estados meditativos também podem modificar a atividade da DMN. Sabe-se que áreas associadas à DMN são bastante similares àquelas associadas à prática da meditação (Jang et al., 2011). Utilizando práticas meditativas diversas, Brewer e colaboradores (Brewer et al., 2011) investigaram meditadores experientes e novatos por fMRI. Eles mostraram que dois dos principais nós da DMN (cíngulo posterior e o córtex pré-frontal medial) tiveram sua atividade reduzida nos meditadores experientes para todos os tipos de meditação. Também foi realizada análise de conectividade funcional, que revelou maior acoplamento entre o cíngulo posterior e o cíngulo anterior/córtex pré-frontal medial nos meditadores experientes, tanto enquanto praticavam a meditação, quanto no estado de repouso.

[6] Do inglês, *rapid eye movement.*

O uso de substâncias psicoativas é outro fator que pode provocar mudanças na maneira como a DMN se apresenta normalmente. Em um trabalho no qual se buscava investigar os correlatos neurais do estado psicodélico induzido pela psilocibina, uma pró-droga da psilocina (4-hidroxi-dimetiltriptamina) que é um psicodélico clássico, Carhart-Harris e colegas (2012) encontraram decréscimo na atividade do córtex cingulado anterior e córtex pré-frontal medial quando os indivíduos estavam sob efeito da droga. Essa diminuição mostrou-se correlacionada aos efeitos subjetivos induzidos, de maneira que quanto maior a diminuição, maiores os efeitos subjetivos avaliados por meio de uma escala visual analógica que variava de 0 a 10 (efeitos extremamente intensos). Além disso, a psilocibina provocou diminuição significativa no acoplamento positivo entre o córtex cingulado posterior e o córtex pré-frontal medial, duas regiões centrais da DMN.

2.3. AYAHUASCA

2.3.1. Origem e usos

A Ayahuasca é uma bebida psicoativa que vem sendo utilizada há séculos com fins religiosos e medicinais por populações originais da América do Sul, marcadamente da região amazônica. O nome em quéchua, Ayahuasca, cujo significado é “videira das almas” (Aya – "Alma" ou "espírito morto" e Waska – "corda" ou "vinha") faz referência tanto à bebida em si quanto à *Banisteriopsis caapi*, o cipó usado como ingrediente principal na sua elaboração. Dependendo da região geográfica e do contexto do uso, a bebida também é conhecida por uma variedade de nomes tais como *caapi, daime, yagê, pinde, mihi, dapa, natem, mariri, vegetal* e *hoasca.*

Tradicionalmente, o chá é preparado pela decocção da casca e tronco de um arbusto, *Banisteriopsis sp*., escaldados com folhas de outro vegetal, a *Psychotria sp*. As espécies

comumente utilizadas são, respectivamente, a *Banisteriopsis caapi* e *Psychotria viridis*, embora haja relatos da rara utilização de outras espécies além das plantas citadas (Schultes, 1972 *apud* (McKenna et al., 1998). Por exemplo, no nordeste da Amazônia, particularmente no Equador e Colômbia, as folhas da *Diplopterys cabrerana*, um cipó da mesma família da *Banisteriopsis*, são adicionadas a bebida em vez das folhas da *Psychotria*. Há, ainda, relatos do uso de outras plantas no preparo do chá, dependendo do propósito para o qual a bebida está sendo preparada, em adição aos componentes padrões – *B. caapi* e *P. viridis* – tais como *Nicotina sp., Brugmania sp., e Brunfelsia sp.,* todas contendo substâncias ativas sobre o sistema nervoso central (SNC) (Schultes, 1972 *apud* (McKenna et al., 1998).

Utilizada por mais de 70 diferentes grupos indígenas da Amazônia, pertencentes a diferentes famílias linguísticas, seu uso se espalhou pelo Brasil, Colômbia, Peru, Venezuela, Bolívia e Equador (Luna, 1986; Luna, 2011; Shanon, 2002).

A origem do uso da Ayahuasca na bacia amazônica é desconhecida. Não se sabe ao certo onde essa prática começou, e embora haja evidências arqueológicas do uso de plantas alucinógenas na Amazônia equatoriana desde períodos entre 1500 e 2000 A.C, não existe nada na forma de materiais iconográficos ou restos botânicos preservados que estabeleça incontestavelmente o uso pré-histórico da Ayahuasca (McKenna, 2004). O uso da Ayahuasca nas suas mais variadas denominações é prática comum entre as tribos indígenas endêmicas da bacia amazônica (Schultes, 1957 *apud* (McKenna, 2004). A bebida é utilizada para fins mágico-religiosos. Entre esses usos estão a invocação de espíritos protetores, que determinam as causas e curas de doenças e profetizam o futuro, as preparações para a guerra ou expedições de caça, o estabelecimento e manutenção das relações entre aldeias, a obtenção de prazer e o uso como afrodisíaco. Além desses, o chá também faz parte de ritos de passagem e de cerimônias envolvendo cantos e danças (Luna, 1986; Luna, 2011; Shanon, 2002).

Desde o início do século XX, a Ayahuasca tem sido utilizada ritualisticamente por igrejas sincréticas originárias dos estados amazônicos brasileiros do Acre e Rondônia, resultado do encontro de seringueiros e agricultores com as populações indígenas locais. Entre as organizações religiosas que utilizam a Ayahuasca em seus rituais, as mais conhecidas são o Santo Daime, a União do Vegetal, e a Barquinha. Nesse novo contexto, o chá é utilizado como um instrumento de cura, para o desenvolvimento espiritual, e como um veículo para acessar o reino divino (Callaway et al., 1999; Shanon, 2002).

Entre esses grupos, a Igreja do Santo Daime é a mais antiga, tendo sido fundada em meados de 1930. Essa igreja une elementos indígenas às práticas do cristianismo, e o chá, chamado de *Daime*, é consumido como um sacramento. As sessões do Daime, denominadas *trabalhos*, são geralmente realizadas duas vezes por mês, e todos os participantes ingerem a bebida no início da celebração e muitas vezes uma segunda vez no decorrer desta. A União do Vegetal, criada em 1961, também incorpora elementos cristãos nos seus rituais. Lá, a Ayahuasca é chamada de *vegetal*, ou *planta professora*, e assim como no Daime, as sessões são realizadas duas vezes por mês. Nos dois grupos, sessões especiais são realizadas para o preparo do chá. A menos conhecida das igrejas, a Barquinha, une o uso da Ayahuasca com a tradição afro-brasileira da umbanda. Nesse grupo, não é incomum os participantes ingerirem o chá até quatro vezes na semana (Shanon, 2002).

Em 1987, o governo brasileiro autorizou o uso ritualístico da Ayahuasca no contexto das cerimônias religiosas. Essa atitude trouxe implicações significativas no âmbito da política contra as drogas de maneira geral, uma vez que pela primeira vez foi permitido, por um governo, o uso de substância psicodélica em um contexto religioso não indígena (McKenna, 2004).

2.3.2. Princípio ativo

Os principais componentes químicos da Ayahuasca são os alcaloides harmina, tetrahidroharmina (THH) e, em menor quantidade, a harmalina, todos pertencentes ao grupo das β-carbolinas, e a triptamina alucinógena N,N-dimetiltriptamina (DMT) (Callaway et al., 1999; Grob et al., 1996; Mckenna et al., 1984).

As β-carbolinas estão presentes na *Banisteriopsis caapi* representando entre 0,05 a 1,36% (média de 0,4%) do peso seco do vegetal (Riba, 2003). Callaway e colaboradores (Callaway et al., 2005) reportaram a seguinte composição global média para a *B. caapi* (peso seco): 4,83 mg/g harmina; 1,00 mg/g THH; 0,46 mg/g harmalina. Em ensaios realizados com amostras de Ayahuasca, as concentrações das β-carbolinas variaram de 0,07 a 22,85 mg/ml para harmina; de 0,05 para 23,80 mg/ml para THH; e de 0,00 para 1,72 mg/ml para harmalina. Além disso, harmol e harmalol que também são β-carbolinas estão presentes na *B. caapi* (Santos, 2011).

Por sua vez, a *Psychotria viridis* fornece a triptamina alucinógena N,N-dimetiltriptamina (DMT), que corresponde entre 0,1 a 0,66% do peso seco do vegetal (Riba, 2003). Callaway e colaboradores (2005) encontraram na composição global média cerca de 7,50 mg/g de DMT, 0,75% nas folhas da *P. viridis.* Já a quantidade de DMT presente em amostras de Ayahuasca podem variar de 0,00 a 14,15 mg/ml (Santos, 2011).

A DMT é encontrada em raízes, caules e folhas de diversas plantas e em tecidos animais. Em humanos está presente no sangue, urina e no fluído cerebroespinhal, sendo portanto substância endógena (Strassman, 2001). Estudos em humanos têm mostrado que quando administrada por via intravenosa ela provoca profundas modificações na percepção e realidade, as quais podem ser bastante intensas mas de curta duração (Strassman, 2001). No entanto, quando administrada isoladamente por via oral, ela mostra-se inativa, mesmo em

doses superiores a 1000 mg (McKenna et al., 1998), decorrente da sua metabolização realizada pela MAO (monoamina oxidase) hepática e intestinal (Mckenna et al., 1984).

Por outro lado, as β-carbolinas, especificamente a harmina e a harmalina, atuam como agente protetor da DMT, tendo em vista que são potentes inibidores reversíveis da MAO, mais especificamente da MAO-A (Callaway et al., 1999; McKenna et al., 1998). Além disso, a tetrahidroharmina (THH), a segunda β-carbolina em concentração na Ayahuasca, age como fraco inibidor da recaptação de serotonina e fraco inibidor da MAO (Callaway et al., 1999).

Assim, a inibição periférica da MAO permite que adequados níveis de DMT presente na bebida alcancem o SNC, causando os efeitos únicos desse preparo (Callaway et al., 1999). Além disso, também tem sido especulado que as β-carbolinas podem contribuir para os efeitos globais da Ayahuasca bloqueando a MAO cerebral e inibindo de forma leve a recaptação de serotonina, o que combinados levaria a um aumento nos níveis de neurotransmissores e modularia os efeitos da DMT (Riba et al., 2003).

A DMT tem importante efeito alucinógeno em especial devido à estimulação de receptores serotoninérgicos, mais especificamente receptores 5-HT_{2A}, sendo, ainda, possivelmente modulada pela ação dos receptores 5-HT_{2C} (Fantegrossi et al., 2006; Smith et al., 1998; Yritia et al., 2002). A Figura 7 mostra as estruturas moleculares da DMT e das β-carbolinas, ilustrando suas semelhanças químicas com a serotonina. Além disso, foi mostrado recentemente que a DMT também se liga a receptores sigma-1 (Su et al., 2009). Duas formas de atuação foram propostas. Em pequenas concentrações, a DMT faz com que os receptores sigma-1 atuem como proteínas chaperonas nos receptores inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3), favorecendo a sinalização de cálcio. Já em concentrações mais elevadas, a DMT atua nos receptores sigma-1 fazendo com que esses passem a inibir canais iônicos dependentes de voltagem. Os autores não sugerem, entretanto, qual desses mecanismos estaria relacionado aos efeitos psicodélicos induzidos pela DMT.

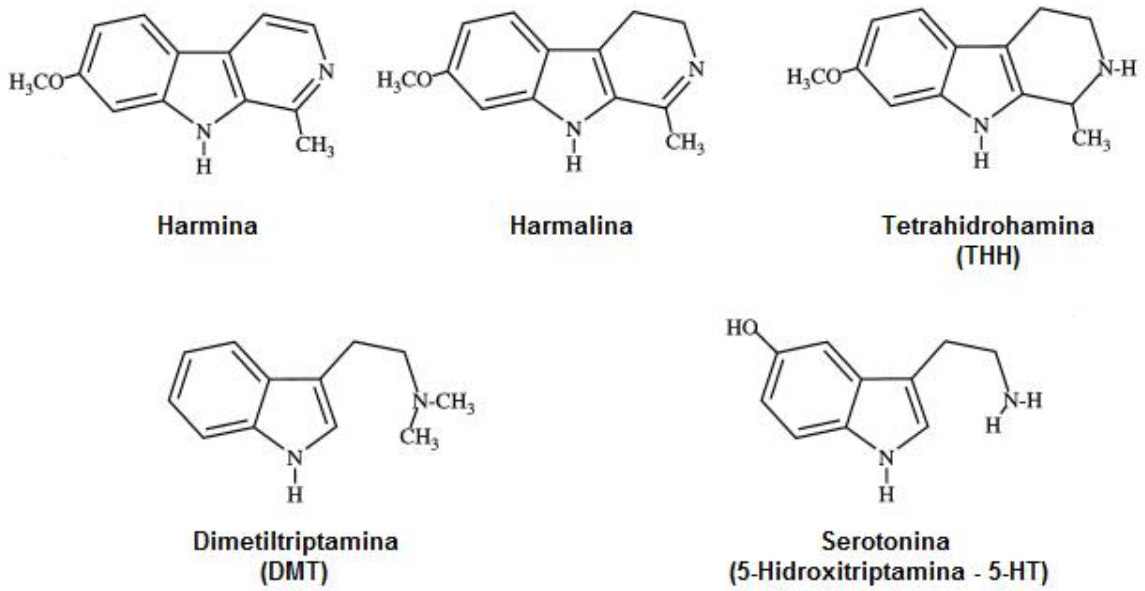


Figura 7 – Estrutura molecular dos principais alcaloides presentes na Ayahuasca e do neurotransmissor serotonina. As β-carbolinas harmina, harmalina e tetrahidroharmina estão contidas no cipó *Banisteriopsis caapi* enquanto a DMT está contida nas folhas da *Psychotria viridis*. Adaptado de (Callaway et al., 1999).

2.3.3. Efeitos subjetivos

Os efeitos subjetivos provocados pela Ayahuasca são complexos e atuam em várias esferas, cabendo destacar: aumento da introspecção, sensação predominante de bem-estar; sensação fugaz de apreensão; pensamentos complexos; novas experiências sobre a própria identidade; imagens mentais nítidas, visíveis mesmo com olhos fechados; alterações visuais da cor, forma e movimento de objetos; sensação de percepção mais clara e distinta do som; e alteração do tato (de Araujo et al., 2011; Riba et al., 2001; Shanon, 2002). Mesmo com todas as alterações perceptuais e cognitivas, os usuários da bebida permanecem conscientes do seu entorno e são capazes de se comunicarem de forma coerente (Riba et al., 2001). De maneira geral, os efeitos subjetivos provocados pela Ayahuasca são mais leves do que aqueles encontrados anteriormente para a DMT intravenosa (Grob et al., 1996). Tais efeitos iniciam-se entre 30 e 40 minutos após a ingestão do chá, alcançando um máximo de intensidade entre 90 e 120 minutos, e se encerrando após cerca de 4 horas da administração do preparo (Grob et

al., 1996; Riba et al., 2001; Riba et al., 2003). A duração e o pico de intensidade dos efeitos psicoativos da Ayahuasca coincidem com os níveis plasmáticos dos alcaloides contidos no chá, em particular da DMT (Riba et al., 2003).

Dentre todos os estudos realizados com a Ayahuasca, cabe destacar o *Hoasca Project*, conduzido no Brasil por um grupo internacional de cientistas em 1993. Nesse trabalho participaram 15 voluntários membros da União do Vegetal usuários de Ayahuasca há pelo menos 10 anos, sobre os quais diversas medidas foram realizadas com o objetivo de investigar as propriedades psicofarmacológicas desse chá (Callaway et al., 1999). Ainda como parte desse projeto e com o intuito de investigar o caminho que a Ayahuasca percorre até sua eliminação pelo organismo, (Callaway et al., 1999) coletaram dados que permitiram a medição de alguns parâmetros farmacocinéticos dos alcaloides encontrados na Ayahuasca. Alguns dos parâmetros utilizados foram a concentração máxima da substância no plasma (C_{max}) e o T_{max}, o tempo para se alcançar a concentração máxima. Para a DMT: C_{max} de 15,8 ± 4,4 ng/ml, T_{max} de 107,5 ± 32,5 min; para a TTH: C_{max} = 114,8 ± 61,7 ng/ml, T_{max} = 102,0 ± 58,3 min; para a harmina: C_{max} = 91,0 ± 22,0 ng/ml, T_{max} de 174,0 ± 39,6 min.

2.3.4. Efeitos neuroendócrinos, autonômicos e cardiovasculares

Os efeitos neuroendócrinos provocados pela Ayahuasca estão associados ao aumento do nível plasmático de prolactina, cortisol e hormônio do crescimento (Callaway et al., 1999). A resposta neuroendócrina observada é típica de agonistas serotoninérgicos, e o aumento nos níveis de prolactina e hormônio do crescimento provavelmente refletem o aumento na ativação dos receptores 5-HT (Callaway et al., 1999). Além disso, o resultado encontrado é comparável à da DMT administrada via intravenosa, apenas apresentando atraso da ordem de 4 ou 5 vezes no tempo de resposta (Strassman and Qualls, 1994).

Além disso, são observados alguns efeitos autonômicos tais como: aumento do diâmetro pupilar, em média de 3,7 mm para 4,9 mm; discreto aumento da frequência respiratória, em média 18,4 respirações/min para 21,5 respirações/min; discreto aumento da temperatura oral, em média de 37,0˚C para 37,3 ˚C (Callaway et al., 1999). Tem sido observado, ainda, elevação moderada dos parâmetros cardiovasculares (Riba et al., 2003). Alterações significativas em relação ao placebo foram encontradas somente para a pressão arterial diastólica (9 mm Hg após 75 min da ingestão) na dose mais alta utilizada no estudo (0,125 g de Ayahuasca), enquanto a pressão arterial sistólica e a frequência cardíaca aumentaram levemente e não foram significativamente diferentes do placebo.

De forma geral, esses estudos demonstram boa segurança e tolerabilidade da Ayahuasca, com relato de indivíduos em uso por mais de 30 anos sem evidência de prejuízo à saúde (Callaway et al., 1999; Grob et al., 1996; Riba et al., 2001; Riba et al., 2003). Além disso, um estudo recente mostrou que o uso ritual frequente da Ayahuasca não parece estar associado com os problemas psicossociais que drogas de abuso normalmente causam (Fabregas et al., 2010).

2.3.5. Efeitos neurofisiológicos

Riba e colegas realizaram uma série de estudos para avaliar alterações neurofisiológicas induzidas pela Ayahuasca. Em um primeiro estudo, eles verificaram a biodisponibilidade cerebral e o curso temporal dos efeitos da Ayahuasca por meio de eletroencefalografia quantitativa (q-EEG), um método não-invasivo que permite caracterizar flutuações da atividade elétrica cerebral com excelente resolução temporal. A potência absoluta do sinal de EEG diminuiu em todas as bandas de frequências, destacadamente na banda teta (de 4 a 8 Hz). Já as potências relativas diminuíram nas bandas teta e delta (de 1 a 4 Hz), enquanto aumentaram na banda beta (de 13 a 30 Hz). Esses efeitos atingiram

significância estatística em 1 h, apresentaram um pico entre 1,5 e 2 h e foram gradualmente diminuindo até desaparecerem entre 6 e 8 h após, um padrão temporal que é muito similar aos dos efeitos subjetivos previamente relatados. As modificações vistas em variáveis individuais do q-EEG estavam em conformidade com as descritas anteriormente para outros psicodélicos serotoninérgicos e partilham algumas características com o perfil de efeitos mostrados por drogas pró-serotoninérgicas e pró-dopaminérgicas (Riba et al., 2002a).

O mesmo grupo explorou a possibilidade de que a Ayahuasca pudesse interromper temporariamente mecanismos inibitórios neuronais os quais poderiam intervir na filtragem de informações irrelevantes. Para tanto foram investigados os efeitos agudos da Ayahuasca no *gating* sensorial e sensório-motor medido pela supressão do P50 e inibição pré-pulsiva do reflexo de sobressalto (PPI), respectivamente (Riba et al., 2002b). A Ayahuasca produziu reduções significativas, dependentes da dose, na supressão do P50, mas não foram observados efeitos significativos na resposta do sobressalto, na sua taxa de habituação, ou no PPI em qualquer dos intervalos estudados. Nas doses testadas, essas descobertas indicam a presença de efeito decremental no *gating* sensorial, tal como medido pela supressão do P50, mas sem efeitos sobre as respostas sensório-motoras, medido por PPI (Riba et al., 2002b).

Em outro estudo foi realizado mapeamento, também por EEG, utilizando a técnica de tomografia de baixa resolução eletromagnética (LORETA)[7] das regiões corticais que tiveram sua atividade elétrica modificada pela administração aguda de Ayahuasca. Os registros de EEG foram obtidos em intervalos de tempo regulares após placebo e ingestão do chá (doses baixa e alta). A análise mostrou diminuição na potência do sinal predominantemente sobre a junção temporoparieto-occipital, no córtex temporomedial e em regiões frontomediais, regiões com papel relevante nos processos que envolvem emoção e memória. (Riba et al., 2004).

[7] Em inglês, *low-resolution electromagnetic tomography.*

2.3.6. Estudos de neuroimagem

Embora seja crescente o número de estudos envolvendo a Ayahuasca, em especial na antropologia e farmacologia, na área de neuroimagem esse número ainda é bastante reduzido.

Motivados pelas características psicotrópicas da Ayahuasca, em particular pelo aumento da atenção introspectiva, e relatos de alterações na percepção somática e modificações emocionais intensas, acompanhadas frequentemente por alucinações visuais, um primeiro estudo de neuroimagem foi conduzido a fim de avaliar mudanças no fluxo sanguíneo cerebral por meio da SPECT (*Single Photon Emission Computed Tomography*), em usuários experientes. Esta dose levou a mudanças significativas de regiões cerebrais frontais e paralímbicas. Foi observado aumento da perfusão sanguínea bilateralmente na ínsula anterior, e no cíngulo anterior/córtex frontomedial do hemisfério direito. Foi observado, também, aumentos mais sutis na amígdala/giro parahipocampal esquerdos. De forma geral, os resultados desse trabalho trazem a indicação da possível e interação da Ayahuasca com os sistemas centrais para o processamento emocional e interoceptivo.

Recentemente, alguns experimentos envolvendo voluntários saudáveis foram conduzidos pelo nosso grupo (Pinto, 2010; Prado et al., 2009). Em um desses estudos, mudanças no fluxo cerebral sanguíneo foram avaliadas usando SPECT em 10 voluntários que nunca tinham usado psicodélicos antes (Pinto, 2010). Em outro estudo, 10 usuários experientes de Ayahuasca, membros da Igreja do Santo Daime, realizaram uma tarefa de fluência verbal enquanto eram submetidos a um exame de fMRI (Prado et al., 2009). De acordo com os autores, as mudanças comportamentais foram similares nos dois experimentos, compreendendo alterações perceptuais e do pensamento, elevações do humor/afeto, e sem perda de contato com a realidade. Os resultados do SPECT mostraram aumento de fluxo sanguíneo nos córtices temporal e frontal e em áreas límbicas (giro parahipocampal/cíngulo anterior/córtex frontomedial). Foram detectadas reduções de fluxo no cerebelo direito e em

áreas dos lóbulos parietal e temporal. Já os dados de fMRI mostraram redução do sinal em áreas envolvidas com o processamento da linguagem (área de Broca, regiões dos lóbulos frontal, temporal, occipital e parietal, áreas límbicas e tálamo).

Outro estudo recente utilizando fMRI realizado pelo nosso grupo investigou as bases neurais das imagens mentais visuais, conhecidas como "mirações", produzidas pela Ayahuasca (de Araujo et al., 2011). Nove usuários experientes do chá participaram de uma tarefa de geração de imagens mentais na qual permaneciam com os olhos fechados. Duas sessões foram realizadas, uma antes da ingestão da Ayahuasca e outra logo após a ingestão. A Ayahuasca produziu aumentos no sinal de diversas áreas frontais, temporais e occipitais. Na área visual primária, o efeito foi comparável em magnitude aos níveis de ativação de uma imagem natural vista com os olhos abertos, e foi correlacionado à ocorrência de mudanças perceptuais individuais medidas por escalas psicométricas. A Ayahuasca potencializou a atividade de regiões envolvidas em memórias episódicas e associações contextuais (BA 30 e 37). Além disso, houve modulação positiva na área de Brodmann 10. Essa região participa de memórias de trabalho, da imaginação prospectiva intencional e do processamento de informações de fontes internas. Assim, os autores concluem que as visões provocadas pela Ayahuasca têm origem na ativação de uma extensa rede geralmente envolvida na visão, memória e intenção.

3. OBJETIVOS

OBJETIVO PRINCIPAL

Caracterizar, por meio da fMRI, eventuais alterações na *default mode network* ocasionadas pela ingestão da Ayahuasca.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Implementar uma estratégia de análise capaz de avaliar o sinal de fMRI sobre a DMN;
- Avaliar se o sinal de fMRI sobre a DMN do grupo de indivíduos que participaram deste estudo é maior no estado de repouso que no período em que a tarefa está sendo realizada;
- Avaliar se o sinal de fMRI da DMN se altera pela ingestão da Ayahuasca;
- Correlacionar os achados de sinal da fMRI na DMN a medidas de instrumentos psicométricos;
- Analisar a conectividade funcional da DMN, bem como possíveis alterações provocadas pela ingestão da Ayahuasca.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Sujeitos

Os experimentos cujos dados foram analisados neste projeto foram realizados previamente na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP/USP). Dez voluntários saudáveis (5 homens e 5 mulheres, com idade média de 33,7 anos) foram selecionados junto à Igreja do Santo Daime Rainha do Céu, de acordo com os seguintes critérios de inclusão: idade mínima de 18 anos, escolaridade mínima de 8 anos, ter dominância manual à direita demonstrado pelo *Edinburgh Handedness Inventory* (Oldfield, 1971), não ter feito uso de qualquer medicação no período de 3 meses anteriores ao estudo, não possuir histórico de trauma crânio-encefálico ou doença clínica baseado em questionário semiestruturado e em exame físico, não possuir histórico de doença psiquiátrica baseado na Entrevista Clínica Estruturada para o DSM-IV (DelBen et al., 1996), não possuir impedimento para a realização de um exame de rotina de imagem por ressonância magnética e ser usuário frequente da Ayahuasca há pelo menos 5 anos.

Além disso, para a construção da máscara da DMN, foram analisadas as imagens de 26 indivíduos controle (12 homens e 14 mulheres) que realizaram um protocolo de fluência verbal.

4.1.1. Aspectos éticos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Médica do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, FMRP/USP, de acordo com o processo HCRP n° 14672/2006 (Anexo A). Todos os sujeitos preencheram e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido antes do início do experimento. Todos os sujeitos foram informados sobre os procedimentos e possíveis riscos associados a exames de imagens por ressonância magnética e que poderiam retirar seu consentimento em qualquer momento no transcorrer da pesquisa e deixar de participar do estudo sem qualquer prejuízo para si.

4.2. Definição da DMN

Inicialmente, o grupo de 26 controles foi utilizado para definirmos regiões de interesse que compõem a DMN, que serviram para as análises estatísticas do grupo que participou do experimento com a Ayahuasca. Esse cuidado foi tomado para que não houvesse problemas de circularidade nas análises estatísticas (Kriegeskorte et al., 2010; Kriegeskorte et al., 2009) e porque precisávamos definir a DMN antes de estudá-la.

4.2.1. Aquisição das imagens

As imagens foram adquiridas em um aparelho de ressonância magnética Siemens, modelo Magneton Vision, de 1.5 Tesla, com bobina de cabeça de quadratura e polarização circular comercialmente disponível. O aparelho estava em atividade regular no HCFMRP (Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto) - Serviço de Radiodiagnóstico, em condições normais de funcionamento, com manutenção periódica.

Para a aquisição da série de imagens funcionais, utilizou-se sequências do tipo EPI, com os seguintes parâmetros: número de fatias = 16, TR = 4600 ms, TE = 66 ms, FOV = 220 mm, tamanho do voxel = 1.64 mm x 1.64 mm x 5.00 mm, número de volumes = 64. Para a sobreposição dos resultados estatísticos, foram adquiridas imagens de boa resolução anatômica 3DT1, por uma sequência Gradiente Echo do tipo MPR (*multiplanar reconstructed*) composta por 156 cortes sagitais, resultando em voxels de 1 mm^3, cobrindo ambos hemisférios cerebrais, com tempo de aquisição de aproximadamente 7 minutos.

O desenho experimental seguiu um protocolo de fluência verbal que vem sendo utilizado corriqueiramente pelo nosso grupo para o mapeamento pré-cirúrgico de linguagem (Figura 8). Neste, a cada bloco uma letra é apresentada por interlocução auditiva e os participantes devem gerar mentalmente o maior número de palavras que conseguirem pensar, e que comecem por aquela letra. Seis blocos, de 27.5 segundos de repouso, foram intercalados

por cinco blocos, também de 27.5 segundos, com a apresentação da tarefa. O tempo total de realização dessa parte do exame de fMRI foi de aproximadamente 5 minutos.

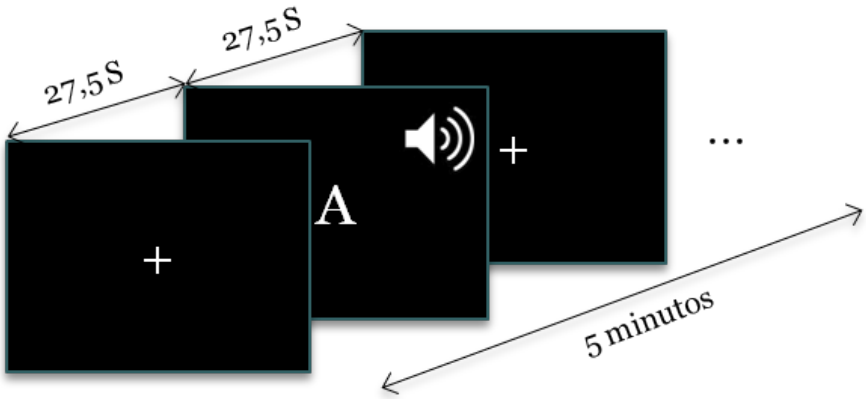


Figura 8 – Protocolo de fluência verbal utilizado para a aquisição dos dados.

4.2.2. Pré-processamento e análise das imagens

O pré-processamento dos dados foi realizado no programa de uso livre FSL (FRMIB Software Library), versão 4.1.5, (Analysis Group FRMIB, Oxford, United Kingdom).

Inicialmente utilizou-se as rotinas *mcflirt* e *slicetimer* do FSL (Jenkinson et al., 2002) (http://fsl.fmrib.ox.ac.uk/fsl/mcflirt e http://fsl.fmrib.ox.ac.uk/fsl/slicetimer) para a correção de movimento e correção temporal entre as fatias. Foram também aplicados um filtro temporal (passa-alta de 0.015 Hz) e um filtro de suavização espacial (filtro gaussiano com FWHM de 5 mm). Os parâmetros obtidos na correção de movimento foram inspecionados em cada sujeito para garantir que em nenhum deles os movimentos excedessem 2 mm de translação e 1˚ de rotação. Em seguida, as imagens foram transformadas para o espaço padrão MNI com a finalidade de mapear o cérebro de todos os indivíduos dentro de uma estrutura cerebral normalizada. Foi utilizada a rotina *flirt* (Jenkinson et al., 2002; Jenkinson and Smith, 2001), que realiza apenas transformações lineares, para fazer o corregistro das imagens anatômicas e funcionais com o *template* MNI 152.

As análises das imagens já pré-processadas foram realizadas no software SPM5 (Statistical Parametric Mapping, Wellcome Institute of Cognitive Neurology, London, United Kingdom). Inicialmente foram realizadas análises individuais em cada sujeito.

A tarefa de fluência verbal foi modelada por um só regressor no qual os períodos de repouso estavam implicitamente modelados. Uma operação de convolução foi realizada entre esse regressor e a função de resposta hemodinâmica canônica (dupla gama). Esse modelo estatístico foi estimado utilizando-se o algoritmo GLM (Modelo Linear Geral) e o resultado obtido foi uma imagem com os valores dos β (parâmetros estimados).

Duas imagens de contraste foram geradas por meio de um teste t: uma relativa à tarefa (tarefa > repouso) e outra relativa ao repouso (repouso > tarefa). Como o nosso interesse está na DMN, ou seja, regiões em que o sinal durante o repouso é maior que na tarefa, apenas o contraste **repouso > tarefa** foi analisada. Esse contraste foi em seguida utilizado como entrada em a análise de segundo nível ou de efeito aleatório (*random effects analysis*). Com esse tipo de análise pode-se inferir o efeito populacional baseado em amostras de poucos sujeitos. Utilizando o teste-t de Student de uma amostra nas imagens de contraste, foi obtido o Grupo Repouso Controle. Em seguida, esse resultado foi utilizado para a definição de regiões de interesse (*region of interest* – ROI).

4.2.3. Regiões de Interesse da DMN

A definição das ROI da DMN foi feita com base no estudo de (Laird et al., 2009), uma meta-análise de 62 trabalhos pertencentes ao banco de dados *BrainMap*, incluindo um total de 840 sujeitos. Nesse estudo foram identificadas as regiões com maior frequência de detecção em tarefas que a DMN estaria envolvida. O resultado das análises revelou um conjunto de 9 regiões principais Figura 9: cíngulo anterior (ACC), cíngulo posterior (PCC), pré-cuneus (pC), córtex pré-frontal medial (mPFC), giro frontal médio esquerdo (MFG_L), giro temporal

médio direito (MTG_R) e esquerdo (MTG_L) e lobo parietal inferior direito (IPL_R) e esquerdo (IPL_L).

Essas mesmas regiões foram selecionadas para a definição da DMN neste estudo. Para isso, uma vez obtidos os parâmetros estimados (β) para o Grupo Repouso Controle, foi estabelecido o limiar estatístico de $p < 0,01$ corrigido para múltiplas comparações por FDR (*False Discovery Rate*), equivalente a $p < 0,002$ não corrigido. Foram, ainda, selecionadas apenas os clusters com tamanho mínimo de 50 voxels contíguos (equivalente a 400 mm^3). Um total de 7 clusters foram obtidos após essa análise, representando as regiões cerebrais que estão engajadas durante o repouso. Esses clusters foram em seguida anatomicamente divididos de acordo como descrito em Laird et al. (2009), para obtermos as regiões de interesse que compõem a DMN. Essa divisão foi realizada utilizando-se rotinas do *fslmaths*, pertencente ao FSL e seguiu os seguintes passos: o mapa obtido no grupo repouso foi transformado em uma imagem binária e multiplicado por uma imagem de um atlas anatômico fornecido pelo FSL (*Harvard-Oxford cortical and subcortical structural atlases*) (http://www.fmrib.ox.ac.uk/fsl/data/atlas-descriptions.html#ho). Nesse atlas os voxels possuem intensidades que variam de acordo com a região anatômica a qual eles pertencem. Assim, após a multiplicação, obtivemos uma nova imagem cujos voxels da imagem original (repouso) possuíam agora valores que os diferenciavam em regiões anatômicas, o que possibilitou criar uma máscara para cada ROI.

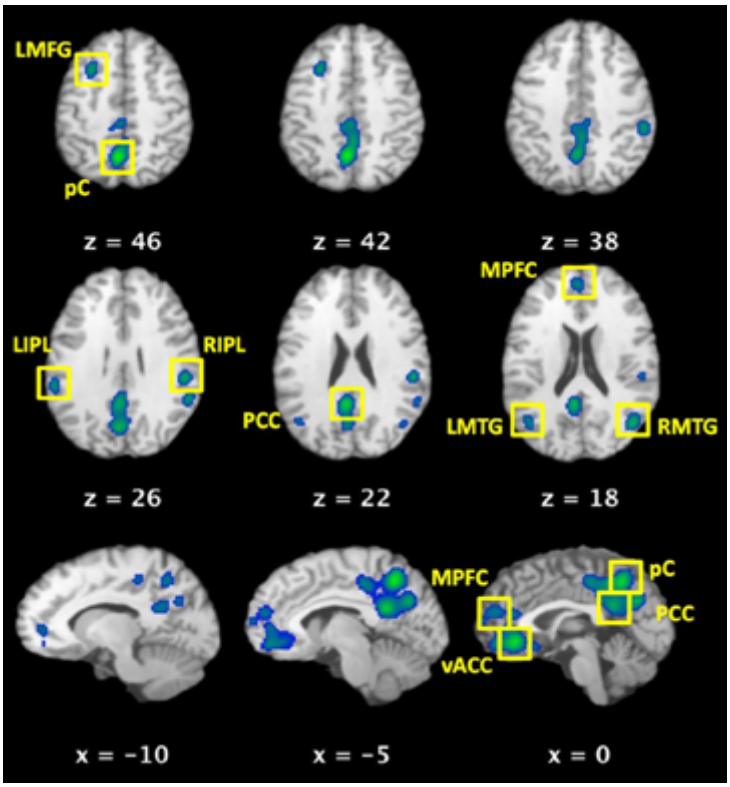


Figura 9 – Regiões de interesse que definem a DMN. LMFG - giro frontal médio esquerdo, pC - pré-cuneus, LIPL - lobo parietal inferior esquerdo, RIPL - lobo parietal inferior direito, PCC - cíngulo posterior, MPFC - córtex pré-frontal medial, LMTG - giro temporal médio esquerdo, RMTG giro temporal médio direito e vACC - cíngulo anterior ventral. Adaptado de Laird et al., 2009.

Além dessas áreas, também foram criadas máscaras para a formação hipocampal (giro parahipocampal + hipocampo) direita (HF_R) e esquerda (HF_L) e amígdala. A amígdala direita não possuía voxels significativos no grupo controle, por isso não foi levada em consideração. Essas regiões são menos consistentes e achadas de forma menos frequente nos trabalhos que compõem a DMN (Buckner et al., 2008). Apesar disso, resolvemos incluí-las a fim de possibilitar a avaliação de mudanças em estruturas importantes nos processos de memória e emoção. Desse modo, no total foram obtidas 12 máscaras que juntas compõem a DMN.

4.3. Análises dos dados de Ayahusca

4.3.1. Ayahuasca

A Igreja do Santo Daime Rainha do Céu forneceu a Ayahuasca a ser utilizada. O chá foi quimicamente analisado por cromatografia no Laboratório de Toxicologia Analítica Forense do Centro de Medicina Legal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) da Universidade de São Paulo (USP).

Cada sujeito bebeu entre 120 e 200 ml de Ayahuasca (2,2 ml/kg de peso corporal). A Ayahuasca usada no experimento continha 0,8 mg/ml de DMT e 0,21 mg/ml de harmina. Não foi detectada a presença de harmalina na amostra, sendo o limiar de detecção de cromatografia de 0,02 mg/ml.

4.3.2. Escalas

A Entrevista Clínica Estruturada para o DSM-IV (DelBen et al., 1996) foi utilizada na seleção dos voluntários para excluir aqueles com diagnóstico de doença psiquiátrica. Para a avaliação psicológica/psiquiátrica dos participantes antes, durante e após o efeito do chá, foram utilizadas três escalas: Escala Breve de Avaliação Psiquiátrica (*Brief Psychiatric Rating Scale* – BPRS) (Zuardi et al., 1994), Escala de Avaliação de Estados Dissociativos Administrada pelo Clínico (*Clinician Administered Dissociative States Scale* – CADSS) (Bremner et al., 1998) e Escala de Avaliação de Mania de Young (*Young Mania Rating Scale* – EAM) (Vilela et al., 2005). As escalas foram aplicadas nos instantes 0 (basal), 40 minutos, 80 minutos e 200 minutos após a ingestão do chá.

O DSM-IV (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*) é um manual para diagnóstico de transtornos mentais elaborado pela Associação Americana de Psiquiatria (*American Psychiatric Association* – APA) que tem sido bastante utilizado em pesquisas, na

indústria farmacêutica e em menor escala na clínica psiquiátrica. Ele apresenta um sistema de classificação categórico, em que o diagnóstico psiquiátrico é inserido dentro de 5 eixos principais. Por meio de uma entrevista estruturada (*Structured Clinical Interview for DSM Disorders* – SCID), o examinador atribui uma pontuação para o indivíduo que está sendo avaliado e o enquadra em alguma categoria. Neste estudo, essa escala foi utilizada para excluir voluntários que apresentassem algum transtorno psiquiátrico.

Para avaliar algumas alterações comportamentais dos voluntários durante a ação da Ayahuasca foi utilizada a BPRS (Overall and Gorham, 1962) modificada por (Bech et al., 1986), traduzida e adaptada para o português (Zuardi et al., 1994). Por meio desse instrumento foram avaliados quatro dimensões sintomatológicas: sintomas positivos, sintomas negativos, ansiedade/depressão e ativação (sintomas do tipo maníaco).

A CADSS é uma escala composta de 27 itens graduados de zero (absolutamente não) a quatro (extremamente). Os primeiros 19 itens são subjetivos ou de auto-avaliação, e os oito restantes são de observação, respondidos pelo examinador. Os itens de auto-avaliação são ainda agrupados em três fatores: desrealização, despersonalização e amnésia. Essa escala foi traduzida para o português independentemente por três psiquiatras bilíngues e em seguida submetidas a dois juízes que compararam as três traduções, decidindo, por consenso, os pontos discordantes (Bremner et al., 1998). Com a aplicação dessa escala foram avaliados nos voluntários sintomas como lapsos de memória, experiência fora do corpo, distorções de percepção visual, distúrbios de identidade, entre outros.

A EAM é composta por 11 questões de múltipla escolha e é utilizada na clínica para mensurar a severidade de episódios maníacos em pacientes. Essa escala foi traduzida e adaptada para o português por (Vilela et al., 2005), sendo utilizada para avaliação da presença de sintomas maniatiformes durante a ação da Ayahuasca. A pontuação de cada um dos 11

itens varia de 0 a 4, de forma que após o somatório de todas as questões, pontuações mais elevadas indicam maior quantidade de sintomas presentes.

4.3.3. Protocolo experimental

O protocolo experimental do grupo que ingeriu Ayahuasca foi composto por 2 sessões experimentais. Em cada sessão, duas aquisições foram realizadas: tarefa de fluência verbal e *resting state*. A tarefa de fluência verbal foi realizada da mesma forma como descrito acima, no estudo para a definição das ROI da DMN. Já no protocolo de *resting state*, os voluntários foram orientados a permanecerem em repouso com os olhos fechados e evitarem movimentos. O esquema representado na Figura 10 mostra o protocolo experimental.

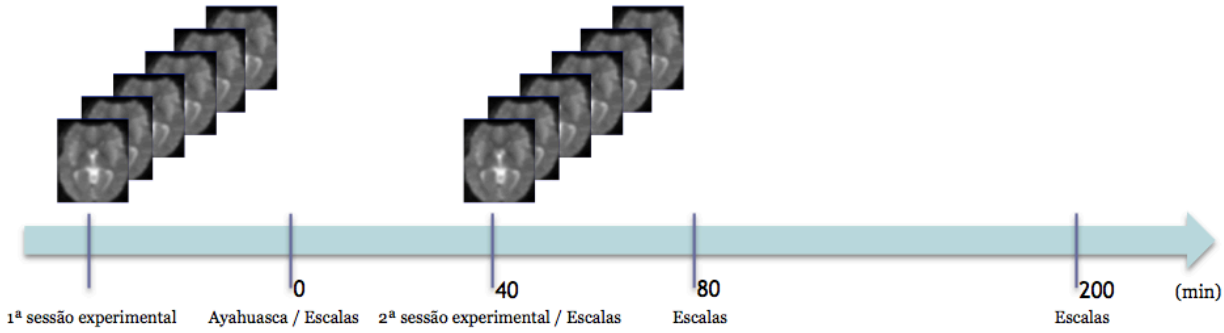


Figura 10 – Protocolo experimental. Duas sessões experimentais foram realizadas no mesmo dia. Em cada uma delas foram realizadas duas aquisições iguais, tarefa de fluência verbal e *resting state*. A segunda sessão ocorreu 40 minutos após a ingestão de Ayahuasca. Além disso, pode-se observar os momentos em que foram aplicadas as escalas psicométricas.

Para a aquisição das imagens durante a tarefa de fluência verbal foram utilizados os mesmos parâmetros já descritos anteriormente. Já para a aquisição dos dados durante o protocolo de *resting state*, utilizou-se sequências do tipo EPI, com os seguintes parâmetros de imagens: número de fatias = 16, TR = 1700 ms, TE = 66 ms, FOV = 220 mm, tamanho do voxel = 1.64 mm x 1.64 mm x 5.00 mm. As imagens de boa resolução anatômica foram adquiridas usando os mesmos parâmetros que aqueles descritos anteriormente.

4.3.4. Análise do sinal de fMRI

As etapas de pré-processamento e análise das imagens seguiram os mesmos passos descritos anteriormente. Como resultado da análise de segundo nível, dois grupos foram obtidos: Grupo Repouso Antes e Grupo Repouso Depois.

Para comparar os grupos foram avaliadas as diferenças entre os valores de β nos grupos Repouso Antes e Depois, nas ROI da DMN. Para extração dos valores de β, foi utilizado o *toolbox* Marsbar, do SPM5. Esse programa usa as máscaras criadas, e gera um arquivo texto contendo todos os valores de β por voxel dentro daquela máscara.

As análises estatísticas *post-hoc* foram realizadas no software GraphPad Prism versão 4.00 (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA). Inicialmente foi feito o teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Como o resultado foi negativo para a maioria dos dados, optou-se por utilizar um teste não paramétrico, o teste de Wilcoxon para dados pareados. O resultado do teste foi corrigido para múltiplas comparações pelo número de ROI utilizadas (12). Foram consideradas significativas diferenças com $p < 0{,}01/12 = 0{,}00083$.

Também foram extraídos os valores de β dos mapas individuais de cada sujeito antes e após a ingestão da Ayahuasca. Com isso, foi possível calcular correlações entre a diferença dos β médios de cada indivíduo ($\Delta\beta = \beta depois - \beta antes$) em cada ROI e as pontuações individuais das escalas psicométricas. Isso foi feito para todas as escalas em todos os instantes de aplicação (0, 40, 80 e 200 minutos).

4.3.5. Análise de conectividade funcional

Para avaliar a conectividade funcional da DMN nos indivíduos antes e após a ingestão de Ayahuasca, utilizou-se os dados adquiridos durante o protocolo de *resting state*. O pré-processamento foi realizado da mesma forma como descrito anteriormente, com exceção do filtro temporal (passa-alta de 0.015 Hz) que não foi aplicado. Seguimos a sequência proposta

por Weissenbacher e colegas (Weissenbacher et al., 2009) para calcular a conectividade baseada em *seeds* (*seed voxel correlation analysis* – SCA).

Em um primeiro momento utilizamos o SPM para realizar a regressão linear entre o dado e nove confundidores para evitar a possibilidade de correlações espúrias: seis parâmetros de correção de movimento (três rotações e três translações), o sinal da substância branca, o sinal do fluido cerebroespinhal e o sinal médio global. As imagens resíduos (parte do sinal que não foi relacionada com os confundidores) obtidas após a regressão foram utilizadas para a análise de fcMRI.

Sobre esses dados foi utilizado o programa REST (Resting-state fMRI Data Analysis Toolkit, versão 1.7, (Song et al., 2011). Em primeiro lugar, os dados foram filtrados por um filtro passa-banda de 0,01 a 0,08 Hz. Duas *seeds* foram definidas, uma no PCC e outra no mPFC, localizadas tendo como base o trabalho de Jang et al. (2011), definidas da seguinte forma: esferas de 10 mm de raio, centradas nas coordenadas do PCC (-5, -49, 40) e do mPFC (-1, 47, -4). A Figura 11 ilustra a localização das *seeds*. As séries temporais médias de cada *seed* foram obtidas e os mapas de correlação foram produzidos computando-se o coeficiente de correlação de Pearson entre a série temporal de cada voxel e a série média da *seed*. Finalmente, os mapas de coeficiente de correlação foram convertidos em mapas de *z-score* aplicando-se a transformada de Fisher para garantir uma distribuição normal dos dados.

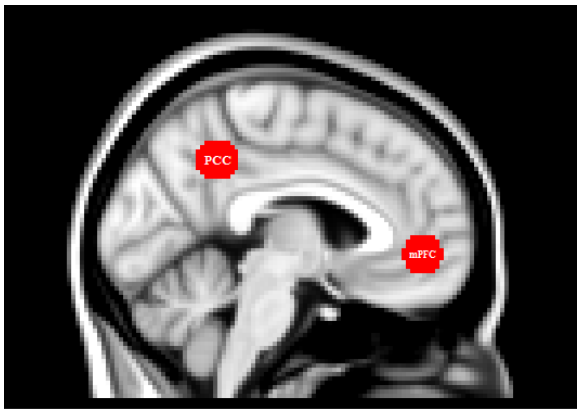


Figura 11 – Conectividade funcional baseada em *seeds*. Observamos a localização das duas *seeds* utilizadas: PCC (-5, -49, 40) e mPFC (-1, 47, -4).

Para revelar as diferenças entre os padrões de conectividade funcional de cada grupo (Antes e Depois), foi aplicado o teste-t de Student pareado. Os mapas de *z-score* das duas *seeds* foram comparados ao mesmo tempo, resultando na análise de 18 pares de mapas de conectividade (9 sujeitos x 2 *seeds*). Para evitar possíveis resultados que não fizessem parte do escopo deste trabalho, utilizamos a máscara da DMN definida acima para procurar por diferenças apenas nas ROI. Dois contrastes foram calculados, grupo Antes > Depois e Depois > Antes. Os valores de significância foram estabelecidos em q(FDR) < 0,05.

Para a confirmação dos resultados, a análise de fcMRI *voxel-wise* foi conduzida utilizando-se o SPM. A diferença é que ao invés de se utilizar as séries temporais médias das *seeds* para se calcular os coeficientes de correlação de Pearson, essas séries foram usadas como regressores, uma de cada vez, no modelo do GLM. Os mapas de parâmetros estimados obtidos, representam assim os mapas de conectividade funcional (Apêndice A).

Outra maneira de se calcular a conectividade funcional se dá a partir da correlação entre regiões de interesse (ROI), duas a duas. Essa abordagem também foi utilizada entre todas as regiões que compõem a DMN. Para tanto, as séries temporais médias de cada uma das ROI foram extraídas. Nessa análise foram unidas em uma só ROI a formação hipocampal esquerda e amígdala esquerda. O resultado, conhecido como matriz de correlação, foi transformado em *z-score* por meio da transformada de Fisher. Em seguida, o *z-score* médio foi calculado para cada par e um test-t pareado foi realizado para verificar se havia diferença entre os grupos. O valor de p utilizado foi corrigido para múltiplas comparações por Bonferroni, $p < 0.05/55$ (número de comparações realizadas).

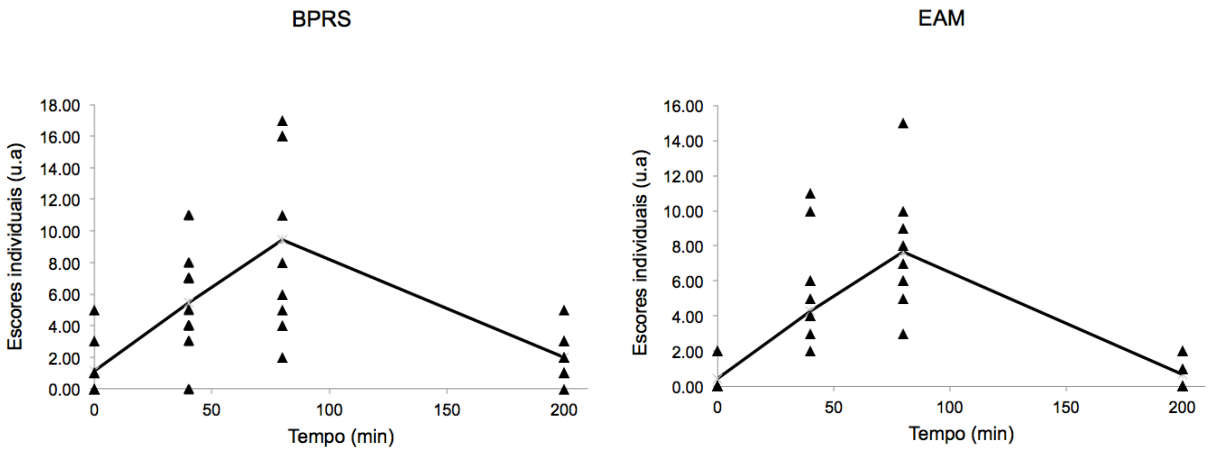
5. RESULTADOS

5.1. CASUÍSTICA

Neste estudo foi realizado um total de 66 aquisições (*runs*) de fMRI. Destas, um primeiro grupo de 26 indivíduos controle realizaram uma tarefa de fluência verbal, cada. Esses dados serviram para a definição das ROI que compõem a DMN. Outros 10 indivíduos participaram do estudo que envolvia a ingestão da Ayahuasca, tendo sido constituído por 4 avaliações em cada um dos indivíduos. Dois protocolos de aquisição foram realizados. No primeiro, o indivíduo realizou uma tarefa de fluência verbal, no segundo ele ficou em repouso dentro do tomógrafo enquanto aquisições de fMRI eram realizadas. Foram realizadas 2 sessões para cada uma dessas tarefas: uma antes e outra após a ingestão da Ayahuasca. Um dos indivíduos do grupo da Ayahuasca teve que ser excluído em virtude do excesso de movimento involuntário da cabeça.

5.2. DADOS PSICOMÉTRICOS

Na Figura 12 apresentamos os resultados obtidos nas observações comportamentais medidas com as escalas clínicas BPRS, EAM e CADSS para cada voluntário nos instantes de tempo 0 (T0), 40 (T40), 80 (T80) e 200 (T200) minutos após a ingestão da Ayahuasca. Por questões técnicas, a escala CADSS não foi aplicada no instante T40.



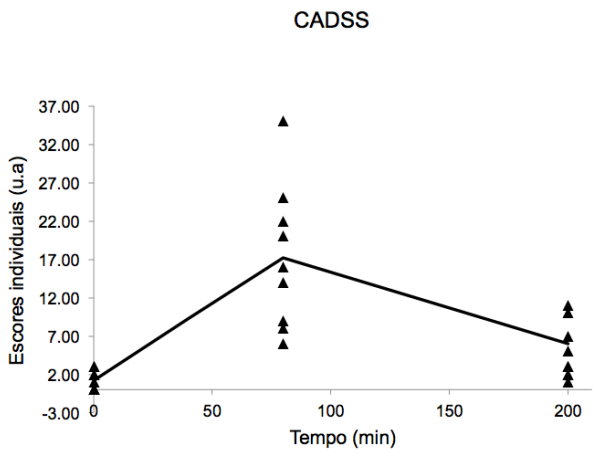


Figura 12 – Escores individuais nas escalas psicométricas BPRS, EAM e CADSS nos instantes 0 (T0), 40 (T40), 80(T80) e 200 (T200) minutos para todos os sujeitos. A CADSS não foi avaliada no instante T40 por motivos técnicos. Os participantes ingeriram a Ayahuasca no instante T0. Os efeitos avaliados alcançaram valores máximos em relação aos valores basais (T0) após 80 minutos ($p < 0,009$ para BPRS, $p < 0,009$ para EAM e $p < 0,004$ para CADSS). As linhas conectam os valores médios nos diferentes instantes de tempo. Observa-se também que os valores no T200 são bastante próximos dos valores basais.

A partir da figura acima é possível notar que a ingestão da Ayahuasca promoveu alterações importantes nas três escadas psicométricas, em relação aos valores de linha de base. Os valores da BPRS passaram de 1,11 ± 1,76 no instante T0 para 9,44 ± 5,75 no instante T80 ($p < 0,009$), momento cuja alteração foi máxima. Da mesma forma, a EAM e a CADSS também apresentaram valor máximo no T80, passando de 0,44 ± 0,88 no instante T0 para 7,67 ± 3,46 no instante T80 ($p < 0,009$) e 1,22 ± 1,30 no instante T0 para 17,22 ± 9,34 no instante T80 ($p < 0,004$), respectivamente.

5.3. DADOS DE FMRI

5.3.1. Definição das regiões de interesse

A primeira etapa deste estudo teve por objetivo definir a DMN a partir de um grupo diferente de indivíduos daqueles que participaram da etapa experimental envolvendo a Ayahuasca. Esse tipo de procedimento tem se tornado cada vez mais comum e importante em estudos de fMRI, e tem o propósito de evitar circularidade estatística (*double dipping*) na

análise de dados. A partir desses dados foi criada a máscara que contém as áreas cerebrais mais consistentes que definem a DMN. A Figura 13 mostra as 12 ROI extraídas e que seguem a meta-análise conduzida por Laird et al. (2009) e Buckner et al. (2008): cíngulo anterior (ACC), cíngulo posterior (PCC), pré-cuneus (pC), córtex pré-frontal medial (mPFC), giro frontal médio esquerdo (MFG_L), giro temporal médio direito (MTG_R) e esquerdo (MTG_L), lobo parietal inferior direito (IPL_R) e esquerdo (IPL_L), formação hipocampal (hipocampo + giro parahipocampal) direita e esquerda e amígdala esquerda.

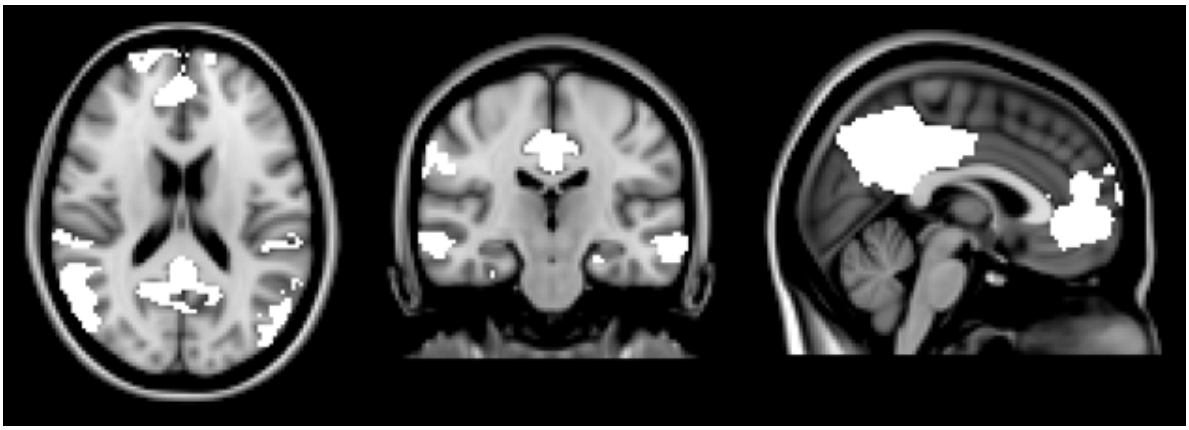


Figura 13 – Máscara da DMN. Foram definidas 12 ROI que compõem a DMN: cíngulo anterior, cíngulo posterior, pré-cuneus, córtex pré-frontal medial, giro frontal médio esquerdo, giro temporal médio direito e esquerdo, lobo parietal inferior direito e esquerdo, formação hipocampal direita e esquerda e amígdala esquerda.

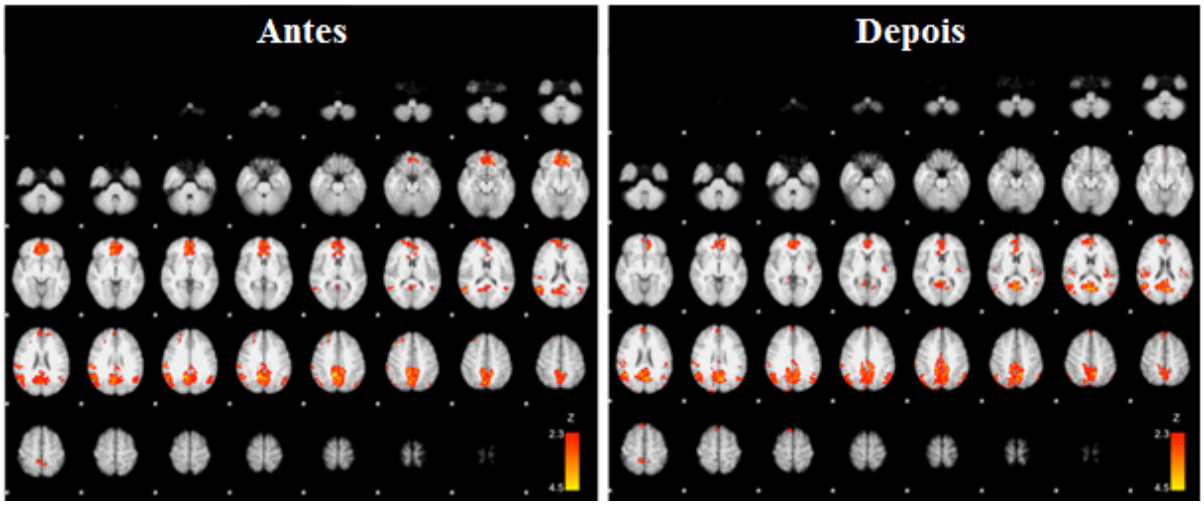
5.3.2. Análise do grupo Repouso

Uma vez definidas as ROI da DMN, foram realizadas as comparações estatísticas sobre as estruturas que compõem a DMN. Em um primeiro momento, foi avaliado se o grupo experimental apresentava modulação significativa da DMN pela tarefa. Em outras palavras, foi avaliado se as estruturas da DMN foram moduladas negativamente pela tarefa em relação ao estado de repouso. Para tanto foi aplicado o teste-t de Student de uma amostra comparando os períodos de repouso *versus* tarefa, antes dos sujeitos terem bebido a Ayahuasca. Os resultados revelaram que a amplitude da resposta durante o período de repouso foi maior que durante o da tarefa na maior parte das regiões que compõem a DMN (a)

(b)

Figura 14-a). Exceção para a formação hipocampal direita e esquerda e a amígdala esquerda que não mostraram modulação pela tarefa no grupo experimental. De maneira análoga, o teste-t de Student foi aplicado na condição pós-Ayahuasca. Os resultados foram bastante semelhantes à avaliação pré-Ayahuasca no que diz respeito às áreas da DMN moduladas ((a) **(b)**

Figura 14-b). Nesse caso, a formação hipocampal esquerda e a amígdala esquerda foram as únicas que não apresentaram resultados significativos para a modulação negativa pela tarefa.



(a) **(b)**

Figura 14 – Mapas estatísticos mostrando a DMN no grupo de voluntários antes (a) e depois (b) da ingestão do chá. Os clusters foram determinados utilizando-se limiar $Z > 2,3$ e significância *whole-brain* de $p < 0,05$ (corrigidos para clusters – *cluster corrected*).

A comparação entre os grupos (Antes e Depois), por meio do teste-t de Student pareado mostrou que existe uma modulação do sinal pela Ayahuasca nas estruturas que compõem a DMN. Para observação dessa modulação foram utilizados dois contrastes: Repouso Antes > Repouso Depois; e Repouso Depois > Repouso Antes.

Os resultados mostram que a ingestão da Ayahuasca levou à redução dos valores de β na maior parte das ROI da DMN, enquanto que em algumas outras os valores de β foram aumentados (Figura 15 e Tabela 1). A redução do sinal foi observada no ($p < 0,05$): cíngulo

anterior, cíngulo posterior, córtex pré-frontal medial, lobo parietal inferior bilateralmente, e pré-cuneus. Já o giro frontal médio esquerdo, o giro temporal médio esquerdo e a formação hipocampal direita apresentaram aumento dos valores de β.

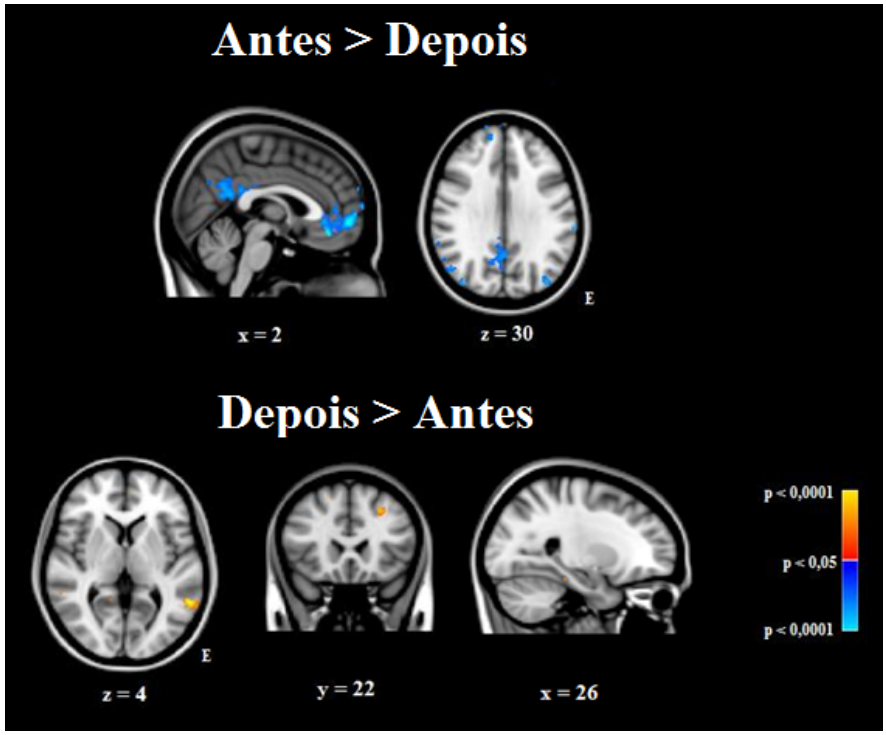


Figura 15 – Mapas estatísticos mostrando as regiões onde o sinal BOLD da DMN se altera após a ingestão da Ayahuasca. As cores frias representam as regiões em que houve diminuição do sinal BOLD, enquanto as cores quentes as regiões em que o sinal BOLD aumentou. Valores de p < 0,05 não corrigido.

Tabela 1 – Regiões anatômicas que apresentaram variação do sinal BOLD após a ingestão da Ayahuasca. Observamos a quantidade de voxels em cada região (Nvoxel), bem como a média e o desvio padrão dos valores de β antes e após a ingestão do chá. * p<0,00083, representando um p<0,01 corrigido para múltiplas comparações pelo número de ROI.

		Antes da Ayahuasca		*Depois da Ayahuasca*		
Regiões anatômicas	**Nvoxel**	**Média**	**Desvio padrão**	**Média**	**Desvio padrão**	**Valor de p**
Diminuição do sinal						
Cíngulo anterior	606	0.4193	0.2797	0.3188	0.1497	< 0.0001 *
Cíngulo posterior	2058	0.6409	0.3636	0.5378	0.2397	< 0.0001 *
Córtex pré-frontal medial	2963	0.551	0.3701	0.4211	0.2854	< 0.0001 *
Lobo parietal inferior direito	3216	0.5226	0.2997	0.462	0.2612	< 0.0001 *
Lobo parietal inferior esquerdo	1749	0.4464	0.265	0.3795	0.2392	< 0.0001 *
Pré-cuneus	3929	0.8131	0.3491	0.7818	0.3482	< 0.0001 *

Formação hipocampal esquerda	69	-0.0621	0.1295	-0.07473	0.165	0.226
Aumento do sinal						
Giro frontal médio esquerdo	98	0.07978	0.08331	0.214	0.1419	< 0.0001 *
Giro temporal médio direito	1731	0.1858	0.1631	0.186	0.1309	0.7996
Giro temporal médio esquerdo	1028	-0.0211	0.1868	0.06514	0.174	< 0.0001 *
Formação hipocampal direita	76	0.06865	0.0646	0.1161	0.09524	0.0002 *
Amígdala esquerda	23	-0.1698	0.0506	-0.06331	0.09885	0.0007

Ainda, dentre as regiões de interesse, o giro temporal médio direito não apresentou diferença significativa; a formação hipocampal esquerda e a amígdala esquerda apresentaram valores de β negativos, muito embora pela definição da DMN esperava-se sinal positivo. Como pode-se observar na Figura 16, não foi detectada diferença significativa entre o Antes e o Depois nessas ROI na comparação utilizando $p < 0,05$ não corrigido.

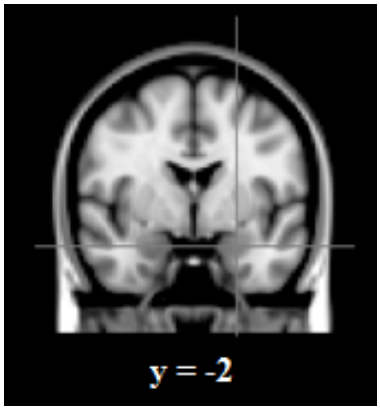


Figura 16 – Regiões que apresentaram um comportamento diferente do esperado. Duas regiões, a formação hipocampal esquerda e a amígdala esquerda, apresentaram o sinal BOLD negativo e não positivo como as demais regiões. Como mostra a marcação na figura, não foram encontradas diferenças significativas nessa região quando utilizou-se um $p < 0,05$ não corrigido para fazer a comparação.

Nas outras 9 regiões de interesse, observamos diferenças estatisticamente significativas na comparação do grupo Antes com o Depois, com $p < 0,01$ corrigido para múltiplas comparações ($p<0,01/12$ (número de ROI) = 0,00083).

Para se promover avaliação mais clara, foi realizada análise post-hoc sobre os valores de β, em todas as regiões que compõem a DMN, por meio do teste de Wilcoxon, um teste

pareado para dados não paramétricos. A Figura 17 apresenta os valores de β médio e respectivos erros médios padrão, de cada ROI estudada nas duas situações (Antes e Depois).

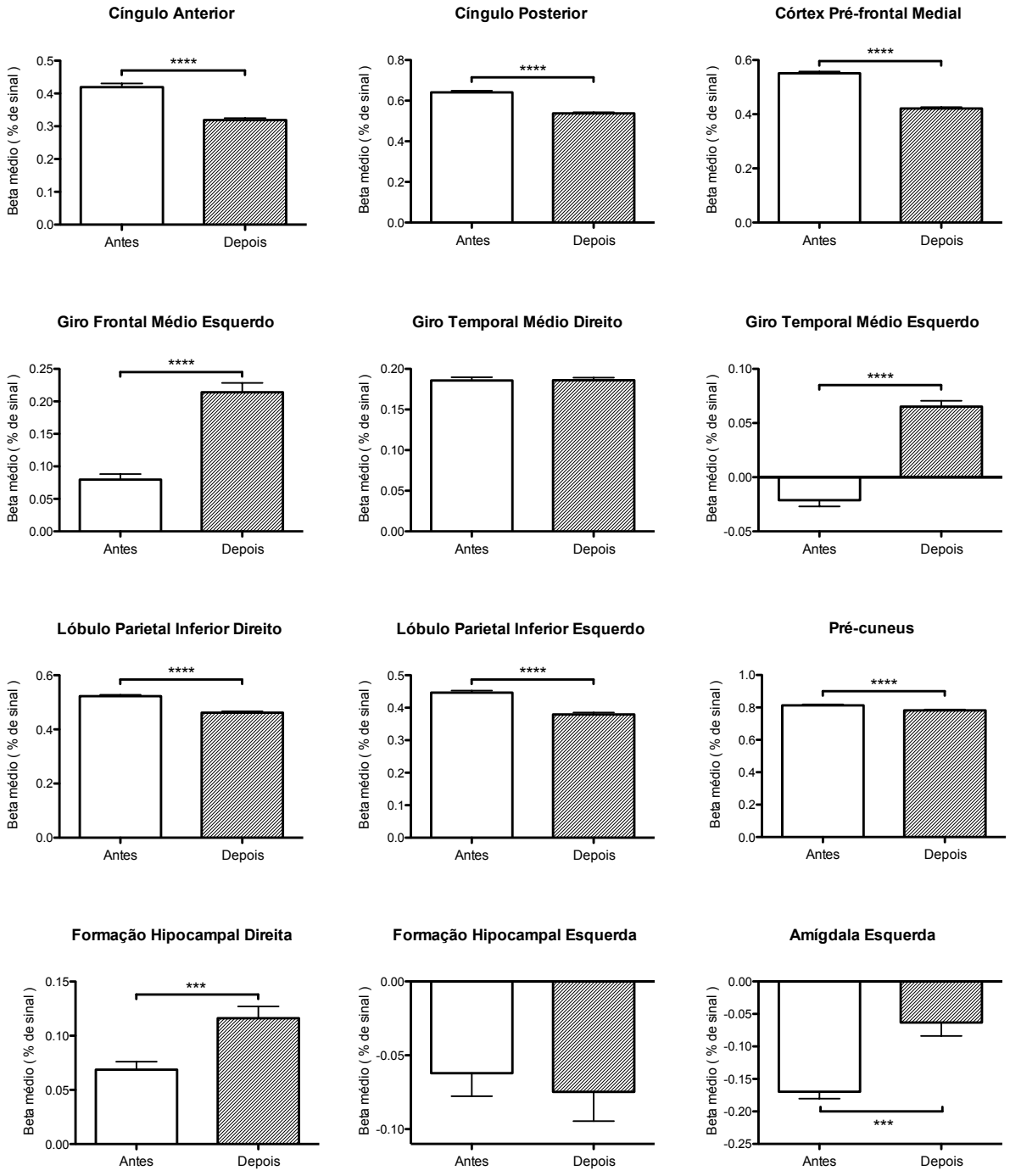


Figura 17 – Gráficos em barra mostrando os valores médios dos betas das regiões de interesse (ROI) analisadas que compõem a DMN. Apenas uma região não apresentou diferença estatisticamente significativa entre o antes e depois, o giro temporal médio direito. Duas regiões apresentaram um comportamento não esperado, a formação hipocampal esquerda e a amígdala esquerda. As demais regiões tiveram diferenças significativas, sendo o valor da significância indicado por *** p<0,001 ou **** P<0,0001.

A fim de verificar a eventual relação entre os dados de fMRI e as avaliações comportamentais, foi realizada a correlação entre a diferença dos valores de β médios individuais ($\Delta\beta = \beta depois - \beta antes$) em todas as ROI da DMN e os valores individuais das escalas psicométricas. Embora bastante sutil, e pontual, foi encontrada co-variação entre os escores da EAM no instante 80 minutos após a ingestão da Ayahuasca e o cíngulo anterior, cíngulo posterior, córtex pré-frontal medial e pré-cuneus. De acordo com a Figura 18 podemos observar que essa correlação é negativa, ou seja, quanto maior a redução dos valores individuais de Δβ, maior a pontuação do indivíduo na EAM. As correlações entre o cíngulo anterior, o cíngulo posterior e o córtex medial pré-frontal foram estatisticamente significativas com coeficientes de Pearson e valores de p (*one-tailed*) respectivamente iguais a $r = -0,78$ e $p = 0,0065$; $r = -0,59$ e $p = 0,046$; $r = -0,68$ e $p = 0,022$. A correlação entre o pré-cuneus e os escores da EAM não foi significativa ($r = -0,57$ e $p = 0,052$). No entanto, quando esse resultado é corrigido para múltiplas comparações pelo número de regiões significativas analisadas (9 ROI), ele perde significância, demonstrando certa fragilidade nessas correlações.

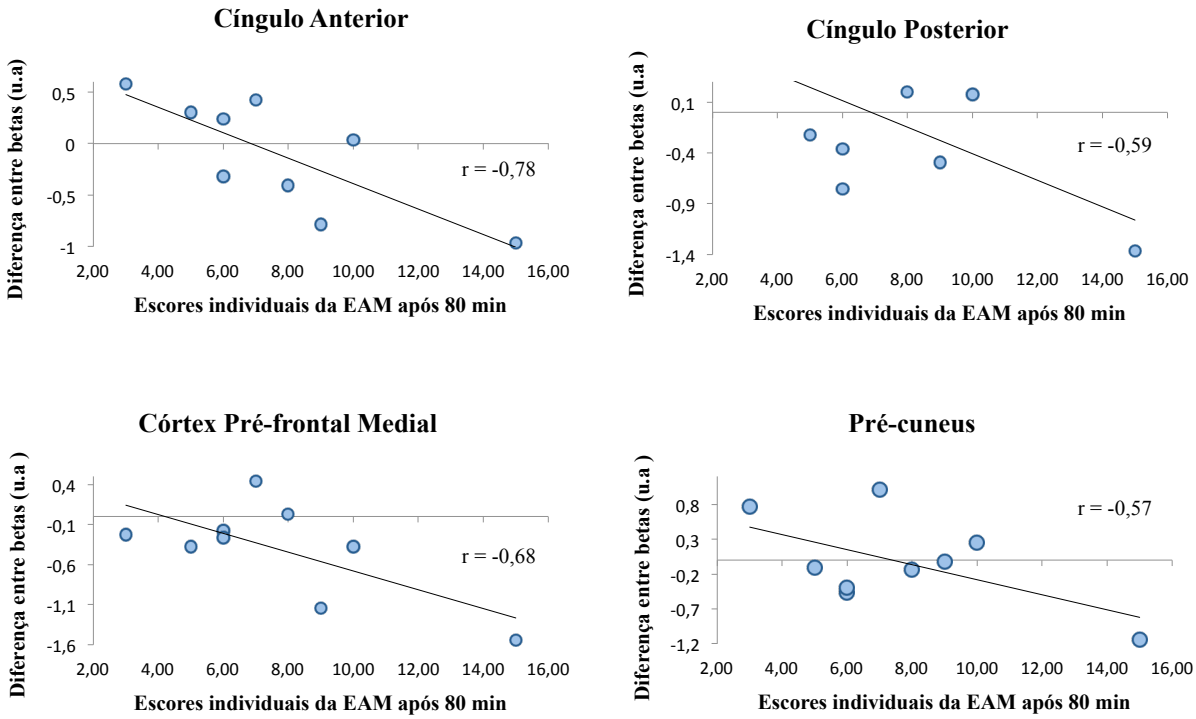


Figura 18 – Correlação entre a diferença dos betas (antes e depois) de algumas regiões de interesse de cada sujeito e os escores da escala de mania de Young (EAM) individuais. Uma correlação negativa foi encontrada entre os escores e três regiões: cíngulo anterior (r = -0,78 e p = 0,0065), cíngulo posterior (r = -0,59 e p = 0,046) e córtex pré-frontal medial (r = -0,68 e p = 0,022). Em uma região, o pré-cuneus, a correlação não foi significativa.

5.3.3. Análise de conectividade funcional

Para avaliarmos como as diferentes regiões da DMN se relacionam entre si, foi realizada uma análise de conectividade funcional. Primeiramente, foram utilizadas duas *seeds*: o cíngulo posterior (PCC) e o córtex pré-frontal medial (mPFC) para calcular as correlações temporais com as demais regiões da DMN. Como é possível observar na Figura 19 quando obtemos os mapas de conectividade para o grupo Antes e Depois tanto para a *seed* no PCC no mPFC, o padrão encontrado é bastante consistente. Em outras palavras, a DMN pôde ser identificada dessa forma assim como foi dectectada empregando-se a tarefa de fluência verbal.

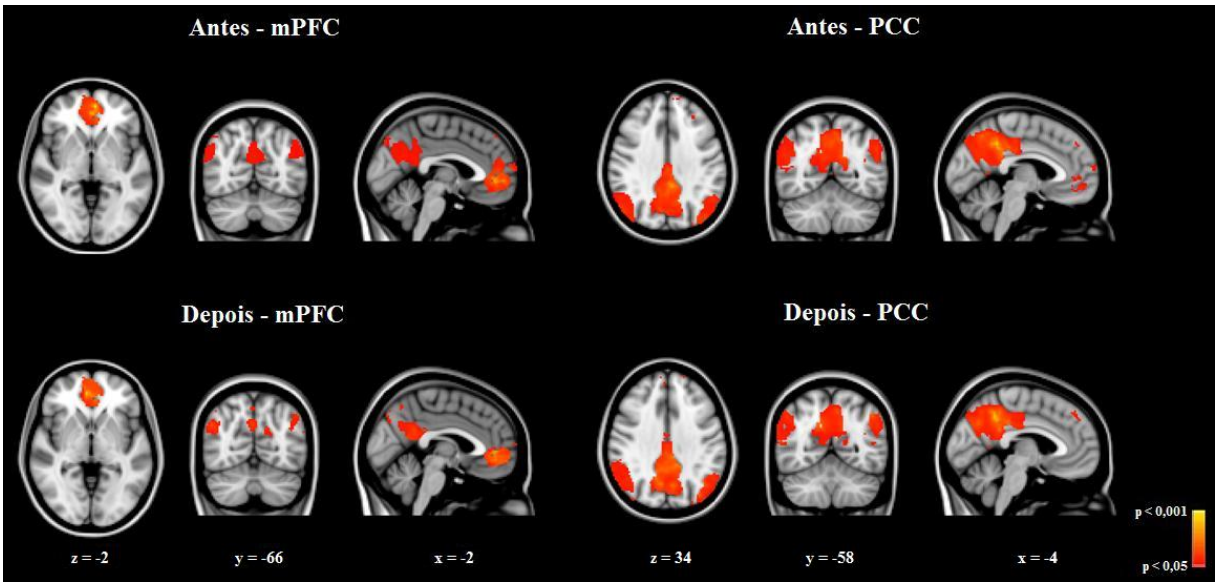


Figura 19 – Mapas de conectividade funcional obtidos pelo uso de duas *seeds*. Do lado esquerdo observa-se o resultado da *seed* no mPFC enquanto do lado direito o resultado de quando a *seed* é colocada no PCC. Em ambos os casos são mostrados os mapas antes e após a ingestão de Ayahuasca. Valores de p não corrigidos para múltiplas comparações ($p < 0,05$).

Em seguida, para identificar possíveis diferenças na conectividade causadas pela ingestão da Ayahuasca, foi aplicado o teste-t de Student pareado nos grupos Antes e Depois. Essa análise mostrou que o padrão de conectividade se altera no pré-cuneus (tamanho do *cluster* = 48 voxels), observando-se diminuição na conectividade entre essa região e todas as demais da DMN após a ingestão da bebida (Figura 20) ($p < 0,05$ corrigido por FDR).

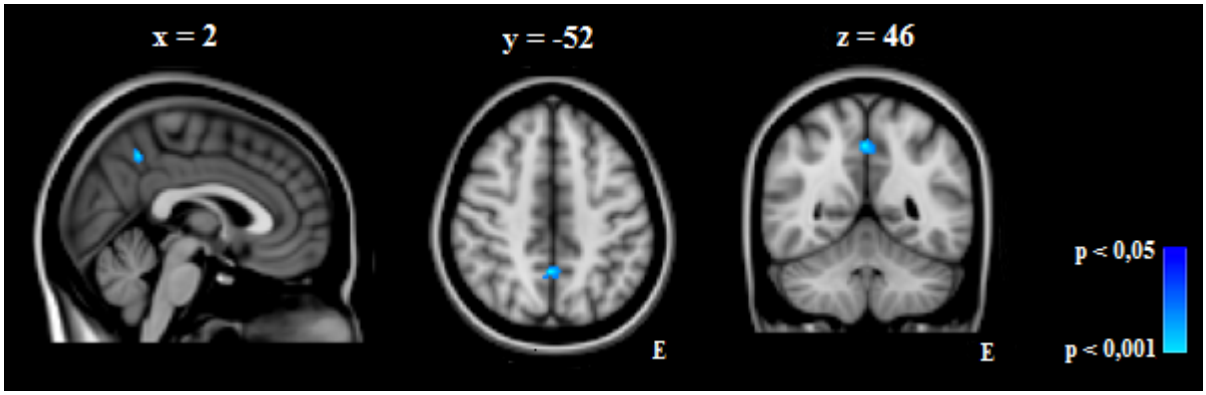


Figura 20 – Alterações na conectividade funcional da DMN. A conectividade diminuiu entre o pré-cuneus e as demais regiões da DMN após a ingestão da Ayahuasca. Valores de p corrigidos para múltiplas comparações por FDR, $p < 0,05$.

Em um segundo momento foi conduzida a análise de conectividade entre as ROI da DMN, duas a duas. Como pode-se observar na Tabela 1 o número de voxels da Amígdala

esquerda é muito pequeno. Dessa forma, unimos essa região à formação hipocampal esquerda uma única ROI. Assim, a conectividade dita ROI-*wise* foi calculada para 11 regiões de interesse.

Diferenças significativas ($p < 0,05$, não corrigido) entre os grupos Antes e Depois foram encontradas em alguns pares de regiões: PCC/IPL_L ($p = 0,024$), HF_R/HF_L ($p = 0,015$), MFG_L/IPL_L ($p = 0,043$), MTG_R/pC ($p = 0,018$) e IPL_L/pC ($p = 0,001$). Em todos os casos ocorreu uma diminuição na conectividade entre as regiões. A Tabela 2 mostra os valores dos z-escores médios para o grupo Antes e Depois, bem como os valores de p para cada comparação realizada. No entanto, percebemos que, aplicando correção para múltiplas comparações pelo número de correlações calculadas (55), nenhum par de regiões apresentou diferença significativa entre as condições Antes e Depois. Dessa forma, esse resultado apesar de indicar que diferenças na conectividade funcional podem ser vistas entre determinadas ROI, não é tão consistente como o resultado encontrado na análise voxel-*wise*.

Tabela 2 – Conectividade funcional ROI-*wise*. Média dos z-escores em cada par antes e depois da Ayahuasca. Abaixo da diagonal principal, os valores do teste t entre cada situação, antes e depois. Em vermelho, os pares que foram estatisticamente significativos: PCC/IPL_L (p = 0,024), HF_R/HF_L (p = 0,015), MFG_L/IPL_L (p = 0,043), MTG_R/pC (p = 0,018) e IPL_L/pC (p = 0,001). Valor de p não corrigido para múltiplas comparações (p<0,05).

ACC	PCC		mPFC		HF_R		HF_L		MFG_L		MTG_R		MTG_L		IPL_R		IPL_L		pC		
	Antes	**Depois**	**Antes**	**Depois**	**Antes**	**Depois**	**Antes**	**Depois**	**Antes**	**Depois**	**Antes**	**Depois**	**Antes**	**Depois**	**Antes**	**Depois**	**Antes**	**Depois**	**Antes**	**Depois**	
	0,155	0,172	0,720	0,590	0,012	-0,009	0,032	0,082	0,078	0,048	0,015	0,000	0,014	-0,037	-0,015	-0,050	-0,014	0,000	0,096	0,069	ACC
0,831			0,232	0,249	0,212	0,140	0,111	0,054	0,341	0,231	0,055	0,076	0,154	-0,031	0,322	0,379	0,479	0,302	0,903	0,829	PCC
0,242	0,780				0,048	0,037	0,009	0,081	0,342	0,315	0,016	-0,034	0,108	-0,025	0,044	0,092	0,381	0,247	0,201	0,207	mPFC
0,850	0,307		0,918				0,508	0,361	0,220	0,055	-0,147	-0,047	-0,044	0,015	0,047	-0,008	0,119	0,058	0,190	0,121	HF_R
0,599	0,619		0,310		**0,015**				0,193	0,127	-0,098	-0,173	0,034	-0,005	-0,131	-0,052	0,047	0,076	-0,001	0,030	HF_L
0,750	0,410		0,736		0,066		0,500				-0,081	-0,029	0,158	0,100	0,038	0,035	0,471	0,315	0,214	0,170	MFG_L
0,904	0,749		0,641		0,220		0,409		0,484				0,470	0,433	0,347	0,306	0,031	-0,065	0,121	0,061	MTG_R
0,716	0,130		0,408		0,504		0,733		0,430		0,635				0,012	-0,048	0,469	0,357	0,199	-0,056	MTGL
0,649	0,558		0,575		0,560		0,446		0,977		0,523		0,457				0,268	0,196	0,361	0,424	IPL_R
0,896	**0,024**		0,238		0,542		0,781		**0,043**		0,259		0,217		0,444				0,542	0,302	IPL_L
0,647	0,488		0,949		0,345		0,733		0,665		**0,018**		0,067		0,490		**0,001**				pC

6. DISCUSSÃO

Este trabalho teve por objetivo investigar possíveis alterações sobre a *Default Mode Network* (DMN) induzidas pela Ayahuasca em voluntários experientes no uso ritualístico desse chá. Utilizando um protocolo de linguagem bem estabelecido, de fluência verbal, em um primeiro momento foi realizado o mapeamento da DMN desse grupo de indivíduos para, em seguida, avaliar as mudanças causadas pela ingestão de Ayahuasca nessa rede por meio de fMRI.

Primeiramente, foram identificadas as regiões em que o sinal era maior durante o período de repouso que durante a execução da tarefa. Essa estratégia tem sido utilizada em diversos trabalhos, tendo sido, inclusive, empregada nos trabalhos que lançaram as bases do estudo da DMN (Mazoyer et al., 2001; Shulman et al., 1997). Os mapas estatísticos resultantes dessa análise revelaram a modulação robusta da DMN no grupo de indivíduos que compuseram este estudo. As regiões de interesse escolhidas para as análises de grupo foram baseadas em uma meta-análise (Laird et al., 2009) e em um trabalho de revisão sobre a DMN (Buckner et al., 2008).

Para evitar problemas de circularidade, utilizou-se um grupo controle que realizou o mesmo protocolo do grupo experimental. Essa análise revelou as seguintes regiões: cíngulo anterior, cíngulo posterior, pré-cuneus, córtex pré-frontal medial, giro frontal médio esquerdo, giro temporal bilateral, lobo parietal inferior bilateral, amígdala esquerda e formação hipocampal bilateral (hipocampo e giro parahipocampal). A partir da definição dessas regiões de interesse, buscou-se avaliar as alterações provocadas pela ingestão de Ayahuasca sobre o sinal de fMRI na DMN.

O resultado das análises mostrou que a Ayahuasca provoca variações no sinal BOLD em todas as ROI investigadas. Predominantemente, o que se observa é a redução do sinal nas principais regiões da DMN após a ingestão da bebida, a saber: cíngulo anterior, cíngulo posterior, córtex pré-frontal medial, lobo parietal inferior bilateral, pré-cuneus. Três das 12

regiões investigadas (giro frontal médio esquerdo, giro temporal médio esquerdo e formação hipocampal direita) apresentaram comportamento inverso, ou seja, tiveram aumento do sinal pós-Ayahuasca.

Uma possível interpretação para as mudanças provocadas pela Ayahuasca e a relevância dessas alterações da DMN podem ser apreciadas a partir de evidências de estudos que mostram alterações nessa rede, tanto em indivíduos saudáveis como em casos de doenças neurológicas e psiquiátricas.

A DMN tem recebido atenção considerável por sua possível participação em funções que refletem mais do que um estado de repouso do cérebro (Gusnard and Raichle, 2001; Raichle et al., 2001). Entre as múltiplas possibilidades, é recorrente o tema que essa rede contribui para processos mentais internos que se tornam proeminentes quando as pessoas não estão envolvidas em interações externas e suas mentes divagam (Buckner et al., 2008). Como chamado por William James, esse "fluxo de consciência" pode refletir o que os seres humanos fazem a maior parte do tempo (James, 1890), provavelmente sinalizando importantes funções adaptativas (Buckner et al., 2008). A natureza da contribuição da DMN para essas funções, no entanto, tem sido amplamente debatida. Enquanto algumas teorias enfatizam o seu papel no monitoramento do ambiente externo (Gusnard et al., 2001a; Shulman et al., 1997), outras destacam seu engajamento nos processos autorreferenciais (Gusnard et al., 2001b).

A DMN também tem sido implicada no chamado estado de *daydreaming* ou *mind wandering*. No cotidiano, é comum notar desvios no foco de atenção quando se está realizando alguma atividade corriqueira. No entanto, geralmente não se tem consciência de quando esses desvios ocorrem e é comum que quando eles sejam percebidos já tenha decorrido certo tempo que a atenção teve o foco alterado (Mason et al., 2007; Smallwood and Schooler, 2006). Assim, dois fatos importantes ligados ao *daydreaming* devem ser destacados. Primeiro, que o foco de atenção é flutuante, e segundo que nos falta consciência

dessas flutuações. Condizente com essa interpretação, trabalhos que avaliam indivíduos em estados meditativos tem mostrado consistentemente redução no sinal da DMN nas principais regiões que a compõe (Brefczynski-Lewis et al., 2007; Brewer et al., 2011; Farb et al., 2007; Jang et al., 2011; Pagnoni et al., 2008).

Em muitos casos, a prática da meditação requer o direcionamento do foco de atenção em determinado elemento, externo ou interno, por exemplo, um pequeno estímulo visual ou a própria respiração do praticante. Também é objetivo da meditação perceber quando esse foco mudou de lugar e trazê-lo de volta. De forma esquemática seria possível dizer que a base da meditação seria o foco no "aqui e agora" permitindo que o fluxo de pensamentos e sentimentos ocorram de forma natural mas dentro do foco da atenção. Em outras palavras, tornar consciente os momentos em que o *daydreaming* acontece, e permanecer focado na experiência momento a momento (Lutz et al., 2008). Dessa forma, pode-se dizer que o estado meditativo se contrapõe ao *daydreaming*, já que este representaria estar distante do "aqui e agora", tendo o foco de atenção (ainda que de forma não consciente) no fluxo de pensamentos espontâneos. Corroborando essa hipótese, Farb e colaboradores (2007) revelaram diferentes padrões de atividade neural quando compararam indivíduos controles com os que haviam praticado 8 semanas de meditação *mindfulness*, um tipo de prática que treina os indivíduos a desenvolverem a atenção com foco no presente. Eles encontraram redução no sinal do mPFC nos indivíduos treinados ao executar uma tarefa em que eles se engajaram na consciência de pensamentos, sentimentos e sensações corporais (Farb et al., 2007). Em outro estudo que avaliou a DMN durante a prática da meditação, Brewer e colegas (2011) observaram que meditadores apresentaram sinal relativamente menor no mPFC e PCC, dois nodos principais da DMN durante a meditação. Esse achado é especialmente relevante, pois os meditadores relataram significativamente menos *mind wandering* durante os períodos de meditação relativamente aos controles. Tomados em conjunto, e na medida em que a atividade em

regiões da DMN reflete processamento autorreferencial e *mind wandering*, esses dados sugerem que os meditadores estão menos envolvidos nestes processos do que os não meditadores.

Ainda com relação a estudos que avaliaram alterações na DMN, McGeown et al. (2009) relataram que indivíduos sugestionáveis sob efeito da hipnose têm diminuição significativa na atividade da parte anterior da DMN. A hipnose tem sido associada a um estado de prontidão para reagir a qualquer comando assim que sugestões são dadas. Assim, indivíduos em estado de hipnose podem ter sucesso em suspenderem a atividade cognitiva espontânea em preparação para o que poderá ser demandado futuramente. Os autores sugerem, ainda, que esse seria um estado no qual os processos de pensamento irrelevantes são inibidos.

Outro estudo, que buscou investigar os correlatos neurais induzidos pela psilocibina, uma substância psicoativa que assim como a Ayahuasca possui mecanismo de ação por meio da estimulação de receptores serotoninérgicos, principalmente o 5-HT_{2A}, também relatou diminuição no sinal BOLD no cíngulo posterior, cíngulo anterior e córtex pré-frontal medial (Carhart-Harris et al., 2012). De acordo com os autores, esses resultados podem explicar como psilocibina atua no cérebro, implicando que a DMN é crucial para a manutenção da integração cognitiva sob condições normais.

Com relação às regiões que apresentaram sinal maior durante o efeito da Ayahuasca, como regiões do lobo temporal médio, sugerimos considerar uma divisão da DMN na qual um dos subsistemas que a compõe, o lobo temporal medial, fornece informações a partir de experiências anteriores na forma de lembranças e associações que são os blocos de construção da simulação mental (Andrews-Hanna et al., 2010). Por exemplo, esse subsistema aumentou a sua atividade preferencialmente quando indivíduos tomaram decisões episódicas sobre seu futuro. Esse padrão de atividade é consistente com um grande número de estudos de

neuroimagem e neuropsicológicos que destacam o papel da DMN tanto em recordar o passado quanto em imaginar o futuro (Schacter et al., 2007).

Outro estudo mostrou que a DMN é modulada diferentemente via receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A}. Especificamente, ambos os tipos de receptores 5-HT_{1A} (auto e heteroreceptores) parecem regular a parte posterior da DMN. Em contraste, somente a inibição de 5-HT_{1A} local influencia as sub-partes da DMN envolvidas nas previsões do futuro baseadas na memória e julgamentos autorreferenciais. Assim, parece que as diferentes áreas cerebrais, que envolvem vários aspectos funcionais do processamento autorreferencial, experimentam regulações marcadamente distintas através de diferentes sítios de ligação 5-HT_{1A}. Essa especificidade regional por meio de modulações de neurotransmissores complementa o trabalho de Andrews-Hanna e colegas, mostrando que a DMN pode ser ainda mais segregada levando-se em conta a especialização funcional de diferentes regiões do cérebro (Hahn et al., 2012).

Outro resultado obtido foi a correlação negativa entre os escores individuais da escala de mania de Young (EAM) e o decréscimo do sinal BOLD em algumas regiões de interesse da DMN. Segundo (Pinto, 2010), o aumento nos escores da EAM se deu principalmente por alteração de elementos centrais na avaliação de estados maniatiformes, como a elevação do humor e do afeto, energia aumentada, aceleração e aumento da quantidade de fala e alteração do conteúdo do pensamento. Esse achado aponta para a possibilidade da Ayahuasca induzir alterações psicopatológicas a partir da alteração primária do humor/afeto, podendo constituir um modelo induzido de psicose afetiva-maniatiforme. Não há, porém, na literatura nenhum trabalho que avalie a DMN durante episódios de psicose maniatiforme. Ainda com relação a associações entre escores de escalas psicométricas e mudanças na magnitude do sinal de fMRI, destacamos que no estudo de Carhart-Harris e colaboradores (2012) foi encontrada

correlação negativa entre uma escala que media a intensidade dos efeitos subjetivos induzidos pela psilocibina e a diminuição do sinal do cíngulo anterior/córtex pré-frontal medial.

Diante da associação feita entre os nossos resultados àqueles encontrados durante a meditação, e visto que a meditação também provoca mudanças na conectividade funcional da DMN, realizou-se um estudo com o objetivo de verificar se a conectividade funcional da DMN também era alterada pela Ayahuasca, e de que maneira se dariam essas alterações. Curiosamente, o resultado descrito na literatura para a conectividade funcional na meditação vai no sentindo inverso ao que foi encontrado neste trabalho. Enquanto os trabalhos com práticas meditativas relatam aumento na conectividade funcional na região do córtex pré-frontal medial em meditadores (Brewer et al., 2011; Jang et al., 2011), utilizando as mesmas *seeds*, observamos decréscimo na conectividade no pré-cuneus.

O pré-cuneus, porção posteromedial do lobo parietal, tem recebido tradicionalmente pouca atenção em parte decorrente de sua localização anatômica e da escassez de estudos de lesões focais nessa área. No entanto, trabalhos recentes de neuroimagem sugerem um papel relevante do pré-cuneus em uma vasta gama de funções cognitivas com elevado grau de integração que não podem mais ser consideradas como simples extensão dos processos visuo-espaciais atribuídos ao córtex parietal lateral (Cavanna and Trimble, 2006). Dentre essas funções estão o processamento visuo-espacial, no qual o pré-cuneus em associação com outras áreas do córtex lateral atuaria deslocando a atenção entre diferentes alvos no espaço e entre características de objetos diferentes, e em tarefas de imagética motora; a evocação de memórias episódicas, principalmente com conteúdo autobibliográfico; além de também ser implicado no processamento autorreferencial e na consciência (Cavanna and Trimble, 2006).

Fransson e Marrelac destacam ainda o papel central do pré-cuneus, juntamente com o cíngulo posterior (PCC) na DMN. Investigando a conectividade funcional entre os diferentes nós da DMN, os autores mostram que essa região foi a única que interagiu com praticamente

todos os outros nodos. Eles afirmam, assim, que o pré-cuneus/PCC podem ter papel pivotal em como a atividade intrínseca é mediada pela DMN (Fransson and Marrelec, 2008). Essa interpretação está de acordo com a noção de que essa é uma região chave na rede neuronal que mantém o sentido de auto-consciência e que está engajada nos processos autorrefenciais que ocorrem durante o repouso. Além disso, tem sido demonstrado que essa área é menos ativa em estados mentais de consciência diminuída ou abolida, como o sono, estado hipnótico, sedação farmacológica e estado vegetativo (Cavanna and Trimble, 2006). Uma hipótese seria a de que o pré-cuneus desempenha um papel central na modulação de processos conscientes, e que pertença a uma rede neural medial que está envolvida na representação mental do *self*.

Assim como foi observado neste estudo, a redução da conectividade da DMN também foi observada em diversos trabalhos. Estudos que avaliam a DMN durante o sono, mostram que essa rede vai se desintegrando, e a conectividade entre os nodos anteriores e posteriores diminui (Horovitz et al., 2009; Koike et al., 2011; Saemann et al., 2011). Carhart-Harris e colaboradores (2012) também realizaram uma análise de conectividade funcional em seu estudo com psilocibina. Utilizando um método conhecido por interação fármaco-fisiológica (do inglês, *Pharmaco-Physiological Interaction – PPI*) e uma *seed* no córtex pré-frontal ventromedial, eles observaram diminuição significativa no acoplamento positivo entre o cíngulo posterior e o córtex pré-frontal medial.

Além disso, Greicius e colegas (2008) mostraram que embora a DMN apresente conectividade funcional durante o repouso e sedação consciente por midazolam, a comparação direta mostrou que a conectividade funcional no córtex cingulado posterior foi significativamente reduzida durante a sedação consciente. Esses resultados confirmam que as oscilações de baixa frequência na DMN persistem e continuam altamente correlacionados, mesmo em níveis reduzidos de consciência. Assim, as reduções focais na conectividade da

DMN, como nesse caso no córtex cingulado posterior, podem representar correlato da consciência reduzida (Greicius et al., 2008).

É interessante perceber que se aliarmos os dois resultados principais encontrados neste trabalho, a diminuição do sinal BOLD na DMN à diminuição da conectividade funcional da DMN no pré-cuneus, podemos levantar a hipótese de que a Ayahuasca provoca diminuição no estado de *daydreaming*, ao mesmo tempo que a diminuição da conectividade funcional indica um estado de consciência alterado, levando a um estado de consciência no qual os pensamentos deixam de ser desordenados e passamos a ter observação mais atenta e focada sobre o fluxo de pensamentos espontâneos. Essa característica pode sugerir aplicação para o uso da Ayahuasca como facilitador no processo de psicoterapia. Esse uso foi observado para o LSD (ácido lisérgico), o qual aumentaria a auto-consciência e a capacidade de evocar mémorias com carga emocional facilitando o processo psicodinâmico durante a psicoterapia (Vollenweider and Kometer, 2010).

O LSD faz parte dos chamados alucinógenos clássicos, os quais podem ser agrupados em três classes principais: as triptaminas derivadas de plantas (por exemplo, psilocibina), as fenetilaminas (por exemplo, mescalina), e as ergolinas semissintéticas (por exemplo, LSD). Todos eles têm alta afinidade pelos receptores 5-HT_{2A}, mas também interagem com outros receptores 5-HT (5-HT_1, 5-HT_4, 5-HT_5, 5-HT_6, 5-HT_7). O uso dessas substâncias com fins terapêuticos tem sido observado em diferentes transtornos, tais como distúrbios de ansiedade, transtorno obsessivo-compulsivo (TOC), depressão, disfunções sexuais e abuso de álcool (Vollenweider and Kometer, 2010).

Também foi mostrado que agonistas 5-HT_{2A} alucinógenos ou não alucinógenos regulam de forma diferente as vias de sinalização intracelular em neurônios piramidais corticais, resultando em expressão diferente de algumas proteínas (Gonzalez-Maeso et al., 2007). Isso sugere que a elucidação de vias de sinalização específicas dos alucinógenos pode

ajudar o desenvolvimento de ligantes funcionalmente seletivos com propriedades terapêuticas específicas, por exemplo, ligantes que têm efeitos antidepressivos, mas não tem efeitos alucinógenos (Vollenweider and Kometer, 2010).

Curiosamente, recentemente alguns trabalhos que utilizaram fMRI mostraram que pacientes depressivos apresentam aumento de atividade induzida por estímulos negativos na amígdala, giro parahipocampal e hipocampo, além da falha em reduzir a atividade em algumas regiões da DMN, incluindo o cíngulo anterior, o córtex parietal lateral e o córtex pré-frontal. Ou seja, esses indivíduos apresentam aumento do sinal BOLD nessas regiões quando comparados a indivíduos não depressivos (Sheline et al., 2009). Por outro lado, nossos resultados mostram que sob efeito da Ayahuasca, ocorre o fenômeno inverso. Essas mesmas regiões cujo sinal é maior nos pacientes com depressão sofrem redução no sinal BOLD.

Em outro estudo que avaliou a conectividade funcional da DMN em pacientes depressivos, foi verificado aumento da conectividade funcional no cíngulo subgenual, no tálamo, no córtex orbitofrontal e no pré-cuneus (Greicius et al., 2007). Já o resultado encontrado com o uso da Ayahuasca foi a redução da conectividade do pré-cuneus. Assim, uma hipótese para a ação da Ayahuasca como forma de tratamento, especificamente no caso da depressão, seria em parte pela modulaçao da DMN, no intiuito de torná-la similar ao padrão encontrado em indivíduos saudáveis.

7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A estratégia utilizada para a detecção da DMN foi bem sucedida, podendo nossos resultados serem validados por meio da comparação com diversos outros trabalhos existentes na literatura.

A Ayahuasca provocou alterações na DMN. Essas alterações se deram de duas formas: diminuição no sinal BOLD na maioria das ROI investigadas e aumento no sinal em três regiões de interesse. Considerando como resultado global, a redução do sinal da DMN quando os voluntários estavam sob efeito do chá, uma hipótese seria a de que, nesse estado, haveria redução no *daydreaming* e maior atenção no fluxo de pensamentos espontâneos.

Além disso, encontrou-se correlação negativa entre os escores da escala de mania de Young (EAM) e a magnitude das reduções do sinal BOLD em algumas regiões principais da DMN.

Verificou-se também que a conectividade funcional da DMN sofre modificações quando os indivíduos estão sob efeito da Ayahuasca. Observou-se diminuição na conectividade do pré-cuneus, que poderia indicar um estado de consciência alterado, mas no qual a conectividade entre os nós DMN ainda persiste.

Como perspectivas de trabalhos futuros, uma possibilidade é avaliar o potencial terapêutico da Ayahuasca em doenças psiquiátricas que apresentam alterações na DMN, como por exemplo, a depressão.

8. REFERÊNCIAS

Amaro Jr E, Barker GJ. (2006): Study design in fMRI: Basic principles. Brain and Cognition 60(3):220-232.

Andrews-Hanna JR, Reidler JS, Sepulcre J, Poulin R, Buckner RL. (2010): Functional-Anatomic Fractionation of the Brain's Default Network. Neuron 65(4):550-562.

Bandettini PA. 2002. The spatial, temporal, and interpretive limits of functional MRI. In: Davis KL, Charney D, Coyle JT, Nemeroff C, editors. Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress: Lippincott Williams and Williams. p 343-356.

Bandettini PA, Cox RW. (2000): Event-related fMRI contrast when using constant interstimulus interval: Theory and experiment. Magnetic Resonance in Medicine 43(4):540-548.

Bandettini PA, Wong EC, Hinks RS, Tikofsky RS, Hyde JS. (1992): Time Course EPI Of Human Brain-Function During Task Activation. Magnetic Resonance in Medicine 25(2):390-397.

Bech P, Kastrup M, Rafaelsen OJ. (1986): Mini-Compendium of Rating-Scales for States of Anxiety Depression Mania Schizophrenia with Corresponding Dsm-Iii Syndromes. Acta Psychiatrica Scandinavica 73:1-37.

Benjamini Y, Hochberg Y. (1995): Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological) 57(1):289-300.

Binder JR, Frost JA, Hammeke TA, Bellgowan PSF, Rao SM, Cox RW. (1999): Conceptual processing during the conscious resting state: A functional MRI study. Journal of Cognitive Neuroscience 11(1):80-93.

Biswal B, Yetkin FZ, Haughton VM, Hyde JS. (1995): Functional connectivity in the motor cortex of resting human brain using echo-planar MRI. Magnetic Resonance in Medicine 34(4):537-541.

Boynton GM, Engel SA, Glover GH, Heeger DJ. (1996): Linear systems analysis of functional magnetic resonance imaging in human V1. Journal of Neuroscience 16(13):4207-4221.

Brefczynski-Lewis JA, Lutz A, Schaefer HS, Levinson DB, Davidson RJ. (2007): Neural correlates of attentional expertise in long-term meditation practitioners. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104(27):11483-11488.

Bremner JD, Krystal JH, Putnam FW, Southwick SM, Marmar C, Charney DS, Mazure CM. (1998): Measurement of dissociative states with the Clinician-Administered Dissociative States Scale (CADSS). Journal of Traumatic Stress 11(1):125-136.

Brett M, Johnsrude IS, Owen AM. (2002): The problem of functional localization in the human brain. Nature Reviews Neuroscience 3(3):243-249.

Brewer JA, Worhunsky PD, Gray JR, Tang Y-Y, Weber J, Kober H. (2011): Meditation experience is associated with differences in default mode network activity and connectivity. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 108(50):20254-20259.

Buckner RL, Andrews-Hanna JR, Schacter DL. (2008): The brain's default network - Anatomy, function, and relevance to disease. Year in Cognitive Neuroscience 2008 1124:1-38.

Buckner RL, Carroll DC. (2007): Self-projection and the brain. Trends in Cognitive Sciences 11(2):49-57.

Buxton RB, Uludag K, Dubowitz DJ, Liu TT. (2004): Modeling the hemodynamic response to brain activation. Neuroimage 23:S220-S233.

Buxton RB, Wong EC, Frank LR. (1998): Dynamics of blood flow and oxygenation changes during brain activation: The balloon model. Magnetic Resonance in Medicine 39(6):855-864.

Callaway JC, Brito GS, Neves ES. (2005): Phytochemical analyses of Banisteriopsis caapi and Psychotria viridis. Journal of Psychoactive Drugs 37(2):145-150.

Callaway JC, McKenna DJ, Grob CS, Brito GS, Raymon LP, Poland RE, Andrade EN, Andrade EO, Mash DC. (1999): Pharmacokinetics of Hoasca alkaloids in healthy humans. Journal of Ethnopharmacology 65(3):243-256.

Carhart-Harris RL, Erritzoe D, Williams T, Stone JM, Reed LJ, Colasanti A, Tyacke RJ, Leech R, Malizia AL, Murphy K and others. (2012): Neural correlates of the psychedelic state as determined by fMRI studies with psilocybin. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 109(6):2138-2143.

Castellanos FX, Margulies DS, Kelly C, Uddin LQ, Ghaffari M, Kirsch A, Shaw D, Shehzad Z, Di Martino A, Biswal B and others. (2008): Cingulate-precuneus interactions: A new locus of dysfunction in adult attention-deficit/hyperactivity disorder. Biological Psychiatry 63(3):332-337.

Cavanna AE, Trimble MR. (2006): The precuneus: a review of its functional anatomy and behavioural correlates. Brain 129:564-583.

Clark DD, Sokoloff L. 1999. Circulation and energy metabolism of the brain. In: Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Fisher SK, Uhler MD, editors. Basic neurochemistry. Molecular, cellular and medical aspects. Philadelphia: Lippincott-Raven. p 637-670.

D'Esposito M, Zarahn E, Aguirre GK. (1999): Event-related functional MRI: Implications for cognitive psychology. Psychological Bulletin 125(1):155-164.

Damoiseaux JS, Rombouts SARB, Barkhof F, Scheltens P, Stam CJ, Smith SM, Beckmann CF. (2006): Consistent resting-state networks across healthy subjects. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103(37):13848-13853.

de Araujo DB, Ribeiro S, Cecchi GA, Carvalho FM, Sanchez TA, Pinto JP, de Martinis BS, Crippa JA, Hallak JEC, Santos AC. (2011): Seeing with the eyes shut: Neural basis of enhanced imagery following ayahuasca ingestion.- n/a.

DelBen CM, Rodrigues CRC, Zuardi AW. (1996): Reliability of the Portuguese version of the structured clinical interview for DSM-III-R (SCID) in a Brazilian sample of psychiatric outpatients. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 29(12):1675-1682.

Fabregas JM, Gonzalez D, Fondevila S, Cutchet M, Fernandez X, Ribeiro Barbosa PC, Alcazar-Corcoles MA, Barbanoj MJ, Riba J, Carlos Bouso J. (2010): Assessment of addiction severity among ritual users of ayahuasca. Drug and Alcohol Dependence 111(3):257-261.

Fantegrossi WE, Harrington AW, Kiessel CL, Eckler JR, Rabin RA, Winter JC, Coop A, Rice KC, Woods JH. (2006): Hallucinogen-like actions of 5-methoxy-N,N-diisopropyltryptamine in mice and rats. Pharmacology Biochemistry and Behavior 83(1):122-129.

Farb NAS, Segal ZV, Mayberg H, Bean J, McKeon D, Fatima Z, Anderson AK. (2007): Attending to the present: mindfulness meditation reveals distinct neural modes of self-reference. Social Cognitive and Affective Neuroscience 2(4):313-322.

Forman SD, Cohen JD, Fitzgerald M, Eddy WF, Mintun MA, Noll DC. (1995): Improved assessment of significant activation in functional magnetic resonance imaging (fMRI): use of a cluster-size threshold. Magnetic Resonance in Medicine 33(5):636-647.

Fox MD, Snyder AZ, Vincent JL, Corbetta M, Van Essen DC, Raichle ME. (2005): The human brain is intrinsically organized into dynamic, anticorrelated functional networks. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102(27):9673-9678.

Fox PT, Raichle ME. (1986): Focal physiological uncoupling of cerebral blood-flow and oxidative-metabolism during somatosensory stimulation in human-subjects. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 83(4):1140-1144.

Fransson P, Marrelec G. (2008): The precuneus/posterior cingulate cortex plays a pivotal role in the default mode network: Evidence from a partial correlation network analysis. Neuroimage 42(3):1178-1184.

Friston KJ. (2011): Functional and effective connectivity: a review. Brain Connect 1(1):13-36.

Friston KJ, Holmes AP, Poline JB, Grasby PJ, Williams SCR, Frackowiak RSJ, Turner R. (1995): Analysis of fMRI Time-Series Revisited. Neuroimage 2(1):45-53.

Friston KJ, Jezzard P, Turner R. (1994): Analysis of functional MRI time-series. 1(2):171.

Garrity AG, Pearlson GD, McKiernan K, Lloyd D, Kiehl KA, Calhoun VD. (2007): Aberrant "default mode" functional connectivity in schizophrenia. American Journal of Psychiatry 164(3):450-457.

Genovese CR, Lazar NA, Nichols T. (2002): Thresholding of statistical maps in functional neuroimaging using the false discovery rate. Neuroimage 15(4):870-878.

Gilbert SJ, Dumontheil I, Simons JS, Frith CD, Burgess PW. (2007): Comment on "Wandering minds: The default network and stimulus-independent thought". Science 317(5834):43-+.

Glover GH. (1999): Deconvolution of impulse response in event-related BOLD fMRI. Neuroimage 9(4):416-429.

Gonzalez-Maeso J, Weisstaub NV, Zhou M, Chan P, Ivic L, Ang R, Lira A, Bradley-Moore M, Ge Y, Zhou Q and others. (2007): Hallucinogens recruit specific cortical 5-HT2A receptor-mediated signaling pathways to affect behavior. Neuron 53(3):439-452.

Greicius MD, Flores BH, Menon V, Glover GH, Solvason HB, Kenna H, Reiss AL, Schatzberg AF. (2007): Resting-state functional connectivity in major depression: Abnormally increased contributions from subgenual cingulate cortex and thalamus. Biological Psychiatry 62(5):429-437.

Greicius MD, Kiviniemi V, Tervonen O, Vainionpaa V, Alahuhta S, Reiss AL, Menon V. (2008): Persistent default-mode network connectivity during light sedation. Human Brain Mapping 29(7):839-847.

Greicius MD, Krasnow B, Reiss AL, Menon V. (2003): Functional connectivity in the resting brain: A network analysis of the default mode hypothesis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 100(1):253-258.

Greicius MD, Menon V. (2004): Default-mode activity during a passive sensory task: uncoupled from deactivation but impacting activation. J Cogn Neurosci 16(9):1484-92.

Greicius MD, Srivastava G, Reiss AL, Menon V. (2004): Default-mode network activity distinguishes Alzheimer's disease from healthy aging: Evidence from functional MRI. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101(13):4637-4642.

Grob CS, McKenna DJ, Callaway JC, Brito GS, Neves ES, Oberlaender G, Saide OL, Labigalini E, Tacla C, Miranda CT and others. (1996): Human psychopharmacology of hoasca, a plant hallucinogen used in ritual context in Brazil. Journal of Nervous and Mental Disease 184(2):86-94.

Gusnard D, Akbudak E, Shulman G, Raichle ME. (2001a): Role of medial prefrontal cortex in a default mode of brain function. Neuroimage 13(6):S414-S414.

Gusnard DA, Akbudak E, Shulman GL, Raichle ME. (2001b): Medial prefrontal cortex and self-referential mental activity: Relation to a default mode of brain function. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 98(7):4259-4264.

Gusnard DA, Raichle ME. (2001): Searching for a baseline: Functional imaging and the resting human brain. Nat Rev Neurosci 2(10):685-694.

Hahn A, Wadsak W, Windischberger C, Baldinger P, Hoflich AS, Losak J, Nics L, Philippe C, Kranz GS, Kraus C and others. (2012): Differential modulation of the default mode network via serotonin-1A receptors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 109(7):2619-2624.

Horovitz SG, Braun AR, Carr WS, Picchioni D, Balkin TJ, Fukunaga M, Duyn JH. (2009): Decoupling of the brain's default mode network during deep sleep. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 106(27):11376-11381.

Huettel S, Song A, McCarthy G. 2004. Functional Magnetic Resonance Imaging: {Sinauer Associates}.

James W. 1890. The principles of psychology. New York: H. Holt and company. 2 v. p.

Jang JH, Jung WH, Kang D-H, Byun MS, Kwon SJ, Choi C-H, Kwon JS. (2011): Increased default mode network connectivity associated with meditation. Neuroscience Letters 487(3):358-362.

Jenkinson M, Bannister P, Brady M, Smith S. (2002): Improved optimization for the robust and accurate linear registration and motion correction of brain images. Neuroimage 17(2):825-841.

Jenkinson M, Smith S. (2001): A global optimisation method for robust affine registration of brain images. Medical Image Analysis 5(2):143-156.

Kennedy DP, Courchesne E. (2008): The intrinsic functional organization of the brain is altered in autism. Neuroimage 39(4):1877-1885.

Koike T, Kan S, Misaki M, Miyauchi S. (2011): Connectivity pattern changes in default-mode network with deep non-REM and REM sleep. Neuroscience Research 69(4):322-330.

Kriegeskorte N, Lindquist MA, Nichols TE, Poldrack RA, Vul E. (2010): Everything you never wanted to know about circular analysis, but were afraid to ask. 30(9):1557.

Kriegeskorte N, Simmons WK, Bellgowan PSF, Baker CI. (2009): Circular analysis in systems neuroscience: the dangers of double dipping. 12(5):540.

Kwong KK, Belliveau JW, Chesler DA, Goldberg IE, Weisskoff RM, Poncelet BP, Kennedy DN, Hoppel BE, Cohen MS, Turner R and others. (1992): Dynamic magnetic resonance imaging of human brain activity during primary sensory stimulation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 89(12):5675-5679.

Laird AR, Eickhoff SB, Li K, Robin DA, Glahn DC, Fox PT. (2009): Investigating the Functional Heterogeneity of the Default Mode Network Using Coordinate-Based Meta-Analytic Modeling. Journal of Neuroscience 29(46):14496-14505.

Laird AR, Robinson JL, McMillan KM, Tordesillas-Gutierrez D, Moran ST, Gonzales SM, Ray KL, Franklin C, Glahn DC, Fox PT and others. (2010): Comparison of the disparity between Talairach and MNI coordinates in functional neuroimaging data: Validation of the Lancaster transform. Neuroimage 51(2):677-683.

Lancaster JL, Tordesillas-Gutierrez D, Martinez M, Salinas F, Evans A, ZilleS K, Mazziotta JC, Fox PT. (2007): Bias between MNI and talairach coordinates analyzed using the ICBM-152 brain template. Human Brain Mapping 28(11):1194-1205.

Lange N, Zeger SL. (1997): Non-linear Fourier time series analysis for human brain mapping by functional magnetic resonance imaging. Applied Statistics-Journal of the Royal Statistical Society Series C 46(1):1-19.

Logothetis NK. (2002): The neural basis of the blood-oxygen-level-dependent functional magnetic resonance imaging signal. Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences 357(1424):1003-1037.

Luna LE. 1986. Vegetalismo shamanism among the mestizo population of the Peruvian Amazon. Stockholm: Almqvist and Wiksell International: Stockholm Studies in Comparative Religion #27.

Luna LE. 2011. Indigenous and mestizo use of ayahuasca. An overview.: Tivandrum: Transworld Research Network.

Lutz A, Slagter H, Dunne J, Davidson R. (2008): Cognitive-emotional interactions - Attention regulation and monitoring in meditation. Trends in Cognitive Sciences 12(4):163-169.

Mason MF, Norton MI, Van Horn JD, Wegner DM, Grafton ST, Macrae CN. (2007): Wandering minds: The default network and stimulus-independent thought. Science 315(5810):393-395.

Mazoyer B, Zago L, Mellet E, Bricogne S, Etard O, Houde O, Crivello F, Joliot M, Petit L, Tzourio-Mazoyer N. (2001): Cortical networks for working memory and executive functions sustain the conscious resting state in man. Brain Research Bulletin 54(3):287-298.

McGeown WJ, Mazzoni G, Venneri A, Kirsch I. (2009): Hypnotic induction decreases anterior default mode activity. Consciousness and Cognition 18(4):848-855.

McKenna D, Callaway J, Grob C. (1998): The Scientific Investigation of Ayahuasca: A Review of Past and Current Research. The Heffter Review of Psychedelic Research 1:65-76.

McKenna DJ. (2004): Clinical investigations of the therapeutic potential of ayahuasca: rationale and regulatory challenges. Pharmacology & Therapeutics 102(2):111-129.

Mckenna DJ, Towers GHN, Abbott F. (1984): Monoamine-Oxidase Inhibitors in South-American Hallucinogenic Plants - Tryptamine and Beta-Carboline Constituents of Ayahuasca. Journal of Ethnopharmacology 10(2):195-223.

McKeown MJ, Makeig S, Brown GG, Jung TP, Kindermann SS, Bell AJ, Sejnowski TJ. (1998): Analysis of fMRI data by blind separation into independent spatial components. Human Brain Mapping 6(3):160-188.

McKiernan KA, D'Angelo BR, Kaufman JN, Binder JR. (2006): Interrupting the "stream of consciousness": An fMRI investigation. Neuroimage 29(4):1185-1191.

Mikl M, Marecek R, Hlustik P, Pavlicova M, Drastich A, Chlebus P, Brazdil M, Krupa P. (2008): Effects of spatial smoothing on fMRI group inferences. Magnetic Resonance Imaging 26(4):490-503.

Mulert C, Lemieux L, SpringerLink (Online service). 2010. EEG-fMRI physiological basis, technique, and applications. Berlin ; Heidelberg: Springer-Verlag.

Northoff G, Heinzel A, Greck M, Bennpohl F, Dobrowolny H, Panksepp J. (2006): Self-referential processing in our brain - A meta-analysis of imaging studies on the self. Neuroimage 31(1):440-457.

Ogawa S, Lee TM, Kay AR, Tank DW. (1990): BRAIN MAGNETIC-RESONANCE-IMAGING WITH CONTRAST DEPENDENT ON BLOOD OXYGENATION. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 87(24):9868-9872.

Ogawa S, Tank DW, Menon R, Ellermann JM, Kim SG, Merkle H, Ugurbil K. (1992): Intrinsic signal changes accompanying sensory stimulation: functional brain mapping with magnetic resonance imaging. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 89(13):5951-5955.

Oldfield RC. (1971): Assessment and Analysis of Handedness - Edinburgh Inventory. Neuropsychologia 9(1):97-113.

Overall JE, Gorham DR. (1962): THE BRIEF PSYCHIATRIC RATING-SCALE. Psychological Reports 10(3):799-812.

Pagnoni G, Cekic M, Guo Y. (2008): "Thinking about Not-Thinking": Neural Correlates of Conceptual Processing during Zen Meditation. Plos One 3(9):-.

Pauling L, Coryell CD. (1936): The Magnetic Properties and Structure of Hemoglobin, Oxyhemoglobin and Carbonmonoxyhemoglobin. Proc Natl Acad Sci U S A 22(4):210-6.

Pinto JP. 2010. *Estudo sobre alterações neurofuncionais após ingestão de ayahuasca*: Universidade de São Paulo.

Prado DA, Pinto J, Crippa J, Santos A, Ribeiro S, Araujo D, Zuardi A, Chaves C, Hallak J. (2009): Effects of the Amazonian psychoactive plant beverage ayahuasca on prefrontal and limbic regions during a language task: a fMRI study. European Neuropsychopharmacology 19:S314-S315.

Raichle ME, MacLeod AM, Snyder AZ, Powers WJ, Gusnard DA, Shulman GL. (2001): A default mode of brain function. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 98(2):676-682.

Riba J. 2003. Human pharmacology of ayahuasca: Universitat Autònoma de Barcelona.

Riba J, Anderer P, Jane F, Saletu B, Barbanoj MJ. (2004): Effects of the South American psychoactive beverage Ayahuasca on regional brain electrical activity in humans: A functional neuroimaging study using low-resolution electromagnetic tomography. Neuropsychobiology 50(1):89-101.

Riba J, Anderer P, Morte A, Urbano G, Jane F, Saletu B, Barbanoj MJ. (2002a): Topographic pharmaco-EEG mapping of the effects of the South American psychoactive beverage ayahuasca in healthy volunteers. British Journal of Clinical Pharmacology 53(6):613-628.

Riba J, Rodriguez-Fornells A, Barbanoj MJ. (2002b): Effects of ayahuasca on sensory and sensorimotor gating in humans as measured by P50 suppression and prepulse inhibition of the startle reflex, respectively. Psychopharmacology 165(1):18-28.

Riba J, Rodriguez-Fornells A, Urbano G, Morte A, Antonijoan R, Montero M, Callaway JC, Barbanoj MJ. (2001): Subjective effects and tolerability of the South American psychoactive beverage Ayahuasca in healthy volunteers. Psychopharmacology 154(1):85-95.

Riba J, Valle M, Urbano G, Yritia M, Morte A, Barbanoj MJ. (2003): Human pharmacology of ayahuasca: Subjective and cardiovascular effects, monoamine metabolite excretion, and pharmacokinetics. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 306(1):73-83.

Saemann PG, Wehrle R, Hoehn D, Spoormaker VI, Peters H, Tully C, Holsboer F, Czisch M. (2011): Development of the Brain's Default Mode Network from Wakefulness to Slow Wave Sleep. Cerebral Cortex 21(9):2082-2093.

Santos R. 2011. Ayahuasca: physiological and subjective effects, comparison with d-amphetamine, and repeated dose assessment: Universitat Autonoma de Barcelona.

Schacter DL, Addis DR, Buckner RL. (2007): Remembering the past to imagine the future: the prospective brain. Nature Reviews Neuroscience 8(9):657-661.

Shannon BJ. 2006. Functional anatomic studies of memory retrieval and the default mode. St. Louis, St.Louis: Washington University.

Shanon B. 2002. The antipodes of the mind : charting the phenomenology of the Ayahuasca experience. Oxford ; New York: Oxford University Press. vi, 475 p. p.

Sheline YI, Barch DM, Price JL, Rundle MM, Vaishnavi SN, Snyder AZ, Mintun MA, Wang S, Coalson RS, Raichle ME. (2009): The default mode network and self-referential processes in depression. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 106(6):1942-1947.

Sheline YI, Price JL, Yan Z, Mintun MA. (2010): Resting-state functional MRI in depression unmasks increased connectivity between networks via the dorsal nexus. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 107(24):11020-11025.

Shimony JS, Zhang D, Johnston JM, Fox MD, Roy A, Leuthardt EC. (2009): Resting-state Spontaneous Fluctuations in Brain Activity: A New Paradigm for Presurgical Planning Using fMRI. Academic Radiology 16(5):578-583.

Shulman GL, Fiez JA, Corbetta M, Buckner RL, Miezin FM, Raichle ME, Petersen SE. (1997): Common blood flow changes across visual tasks: II.: decreases in cerebral cortex. Journal of Cognitive Neuroscience 9(5):648-663.

Sibson NR, Dhankhar A, Mason GF, Rothman DL, Behar KL, Shulman RG. (1998): Stoichiometric coupling of brain glucose metabolism and glutamatergic neuronal activity. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95(1):316-321.

Smallwood J, Schooler JW. (2006): The restless mind. Psychological Bulletin 132(6):946-958.

Smith RL, Canton H, Barrett RJ, Sanders-Bush E. (1998): Agonist properties of N,N-Dimethyltryptamine at serotonin 5-HT2A and 5-HT2C receptors. Pharmacology Biochemistry and Behavior 61(3):323-330.

Smith SM. 2001. Preparing fMRI data for statistical analysis. In: Jezzard P, Matthews PM, Smith SM, editors. Functional MRI an introduction to methods. Oxford: Oxford Univ. Press. p 229-241.

Song X-W, Dong Z-Y, Long X-Y, Li S-F, Zuo X-N, Zhu C-Z, He Y, Yan C-G, Zang Y-F. (2011): REST: A Toolkit for Resting-State Functional Magnetic Resonance Imaging Data Processing. Plos One 6(9).

Strassman RJ. 2001. DMT: the spirit molecule. Rochester, Vermont: Park Street Press.

Strassman RJ, Qualls CR. (1994): Dose-response study of N,N-dimethyltryptamine in humans: I. Neuroendocrine, autonomic, and cardiovascular effects. Archives of General Psychiatry 51(2):85-97.

Strother SC. (2006): Evaluating fMRI preprocessing pipelines - Review of preprocessing steps for BOLD fMRI. Ieee Engineering in Medicine and Biology Magazine 25(2):27-41.

Su T-P, Hayashi T, Vaupel DB. (2009): When the Endogenous Hallucinogenic Trace Amine N,N-Dimethyltryptamine Meets the Sigma-1 Receptor. Science Signaling 2(61).

Talairach J, Tournoux P. 1988. Co-planar stereotaxic atlas of the human brain. Stuttgart: Thieme.

Thulborn KR, Waterton JC, Matthews PM, Radda GK. (1982): OXYGENATION DEPENDENCE OF THE TRANSVERSE RELAXATION-TIME OF WATER PROTONS IN WHOLE-BLOOD AT HIGH-FIELD. Biochimica Et Biophysica Acta 714(2):265-270.

Vilela JAA, Crippa JAS, Del-Ben CM, Loureiro SR. (2005): Reliability and validity of a Portuguese version of the Young Mania Rating Scale. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 38:1429-1439.

Vollenweider FX, Kometer M. (2010): OPINION The neurobiology of psychedelic drugs: implications for the treatment of mood disorders. Nature Reviews Neuroscience 11(9):642-651.

Weissenbacher A, Kasess C, Gerstl F, Lanzenberger R, Moser E, Windischberger C. (2009): Correlations and anticorrelations in resting-state functional connectivity MRI: A quantitative comparison of preprocessing strategies. Neuroimage 47(4):1408-1416.

Worsley KJ, Evans AC, Marrett S, Neelin P. (1992): A three-dimensional statistical analysis for CBF activation studies in human brain. J Cereb Blood Flow Metab 12(6):900-18.

Worsley KJ, Liao CH, Aston J, Petre V, Duncan GH, Morales F, Evans AC. (2002): A general statistical analysis for fMRI data. Neuroimage 15(1):1-15.

Yritia M, Riba J, Ortuno J, Ramirez A, Castillo A, Alfaro Y, de la Torre R, Barbanoj MJ. (2002): Determination of N,N-dimethyltryptamine and beta-carboline alkaloids in human plasma following oral administration of Ayahuasca. Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences 779(2):271-281.

Zuardi A, Loureiro S, Rodrigues C, Correa A, Glock S. (1994): Estudo da estrutura fatorial, fidedignidade e validade da tradução e adaptaçäo para o português da Escala de Avaliaçäo Psiqui trica Breve (BPRS) modificada. ABP-APAL 16(2):63-8.

APÊNDICE

8.1. Apêndice A – Conectividade funcional calculada utilizando-se o SPM

Além de realizarmos a análise de conectividade calculando correlações de Pearson entre as *seeds* (PCC e mPFC), também foi conduzida a análise de fcMRI *voxel-wise* utilizando-se o SPM. A diferença é utiliza-se as séries temporais médias das *seeds* para se como regressores, uma de cada vez, no modelo do GLM. Os mapas de parâmetros estimados obtidos, representam assim os mapas de conectividade funcional (Figura 21).

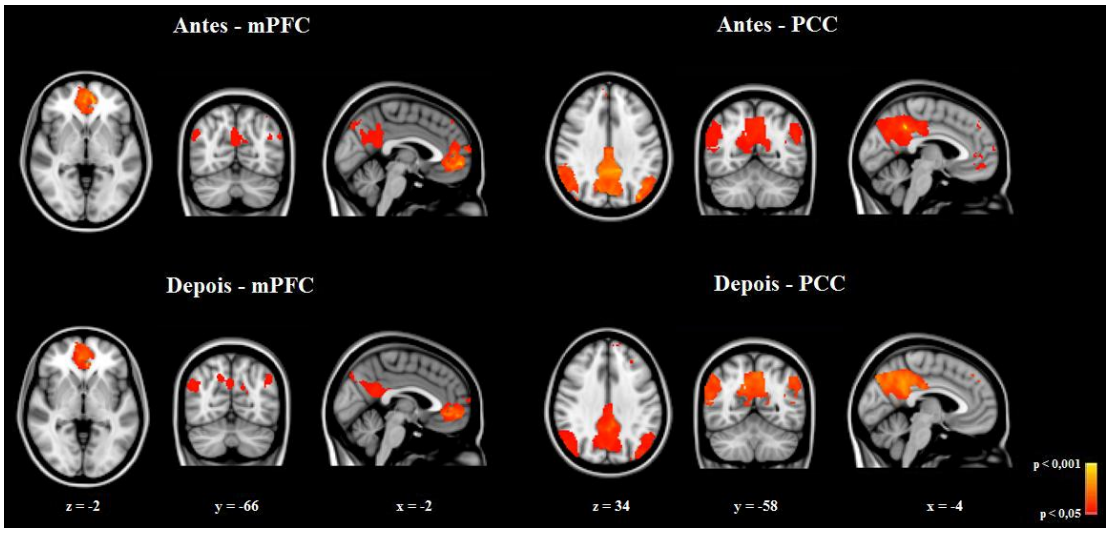


Figura 21 – Mapas de conectividade funcional obtidos pelo uso do método GLM no software SPM. Observa-se a semelhança entre esses mapas e àqueles obtidos pelo cálculo de correlações de Pearson (Figura 19). Valores de p não corrigidos para múltiplas comparações ($p < 0,05$).

ANEXOS

8.2. ANEXO A – Termo de consentimento

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

www.hcrp.fmrp.usp.br

HC USP - RIBEIRÃO 50 anos

Ribeirão Preto, 11 de abril de 2007

Ofício nº 1132/2007
CEP/SPC

Prezado Senhor,

O trabalho intitulado **"ESTUDO SOBRE ALTERAÇÕES NEUROFUNCIONAIS APÓS INGESTÃO DE AYAHUASCA",** foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 244ª Reunião Ordinária realizada em 09/04/2007, e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido,** de acordo com o Processo HCRP nº 14672/2006.

Atenciosamente.

PROF. DR. SÉRGIO PEREIRA DA CUNHA
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimo Senhor
JOEL PORFÍRIO PINTO
PROF. DR. JAIME EDUARDO CECÍLIO HALLAK (Orientador)
Depto. de Neurologia, Psiquiatria e Psicologia Médica

Comitê de Ética em Pesquisa HC e FMRP-USP - Campus Universitário
FWA – 0000 2733; IRB – 0000 2186
Fone (16) 3602-2228 - E-mail : cep@hcrp.fmrp.usp.br
Monte Alegre 14048-900 Ribeirão Preto SP