

ROSANE SCHENKEL DE AQUINO

**AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA DAS AÇÕES CENTRAIS DA
PLANTA *Thitonia diversifolia* USADA POPULARMENTE NO
TRATAMENTO DA DEPENDÊNCIA A DROGAS**

**Dissertação apresentada ao Curso de
Mestrado em Ciências Médicas da
Universidade Federal de Santa Catarina,
para obtenção do título de Mestre em
Ciências Médicas.**

Florianópolis

2006

ROSANE SCHENKEL DE AQUINO

**AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA DAS AÇÕES CENTRAIS DA
PLANTA *Thitonia diversifolia* USADA POPULARMENTE NO
TRATAMENTO DA DEPENDÊNCIA A DROGAS**

**Dissertação apresentada ao Curso de
Mestrado em Ciências Médicas da
Universidade Federal de Santa Catarina,
para obtenção do título de Mestre em
Ciências Médicas.**

**Coordenador do Curso: Profa. Dra. Márcia Margaret Menezes Pizzichini
Orientador: Prof. Dr. Tadeu Lemos**

Florianópolis

2006

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Tadeu Lemos, meu orientador, à Profa. Dra. Thereza C. M. de Lima, que abriu as portas para o meu trabalho, apresentando-me ao meu orientador. Agradecer aos dois não só pelo apoio técnico, mas pelo respeito e carinho com que sempre me trataram.

À equipe da Profa. Thereza que, além do apoio técnico na realização deste sonho, foram muito mais que colegas, foram AMIGOS, sempre prontos a me ajudar nas minhas dificuldades. Filipe Duarte, sorriso aberto, amigo de todas as horas, nosso grande companheiro; Ana Calixto, onde a doçura e carinho fazem com que nos sintamos em casa; Rebeca, companheira de mestrado, de angústias, de conquistas, nossa “gerenciadora” de animais.

Ao Prof. Dr. Moacir Pizzolatti, do departamento de Química – UFSC, e aos seus alunos pelo preparo e fornecimento do extrato para que este trabalho se realizasse.

Aos professores e funcionários da Farmacologia que sempre tiveram um sorriso no rosto para me receber e ajudar.

À UDESC, ao Prof. Alexandre Macedo, ao Prof. Dr. Alceu Mezzalira e Joana Mezzalira, sua filha e minha aluna, que gentilmente cederam animais para a continuidade do trabalho. Aos professores do Departamento de Morfofisiologia e aos meus queridos alunos que tiveram que entender algumas trocas, transferências de aulas para que pudesse conciliar o meu trabalho ao meu aprendizado.

A UNIPLAC, pela estrutura, pelos professores, principalmente aos professores: Denise de Melo, Sandra Brum, pela disponibilidade da estrutura física e humana desta instituição. Ao Prof. Jonas Lemhkul, que “tocava” a tutoria, sozinho, para eu poder viajar. Aos demais amigos, professores e alunos do curso de medicina. Às técnicas de laboratório, em especial à Ana Lígia, que cuidaram dos animais para o andamento do trabalho. Aos seguranças que, “cuidavam” de mim nos finais de semana enquanto fazia a pesquisa.

Ao secretário do mestrado de Ciências Médicas, Sr. Ivo Soares, que sempre nos apoiou.

A Sra. Tânia Tavares que prontamente ajudou na formatação deste trabalho.

Aos meus amigos lageanos que diretamente e indiretamente me deram força durante todo o trabalho.

À Patrícia que trata a Amanda e o Arthur como filhos, trazendo tranquilidade durante a minha ausência.

Aos meus tios Ilena e Solon, aos primos Gabriel e Renata, que me receberam com todo carinho e apoio familiar necessários quando estava fora de casa.

Ao carinho das minhas cunhadas, as Flávias Ramos. A credibilidade em mim sempre foi uma força propulsora para a realização deste trabalho. Aos meus sobrinhos, Felipe, Juliana, Isabella e Carolina, companheiros da Amanda e do Arthur.

Aos meus queridos e amados irmãos, Christian e Ronald, eternos protetores e companheiros de todas, realmente, todas as horas. Todos deveriam ter irmãos como vocês!

Ao Robson, que foi meu companheiro por 18 anos, desde o tempo de faculdade, aliás, do vestibular, pelo apoio durante toda a nossa caminhada e na construção desta etapa da nossa vida. Na verdade, já conseguimos um bem muito maior, nossos filhos. Seja feliz!

Aos meus filhos, que tiveram que entender, mesmo sem compreender, que viagens, ausências e muita dedicação fazem parte da vida. Ao Arthur, meu Arthur arteiro, obrigada pelo abraço apertado, que faz com que me sinta sempre, amada, protegida e importante. A Amanda, minha sempre Amanda amada, pelo carinho, doçura, questionadora da minha ausência, minha companheira de todas as horas. Juntos, sempre seremos os “Três Mosqueteiros”.

A DEUS, que me carregou no colo em muitos momentos desta caminhada para que o desânimo, cansaço, angústias fossem embora. Minha fonte eterna de fé. Companheiro de muita meditação, muitos pedidos e agradecimentos.

E, finalmente aos meus pais, Hélio e Eneita. Minha mãe, exemplo de garra, de força, de determinação e de amor, MUITO amor. Minha melhor amiga. Por ser, sempre, a nossa babá-mor, sempre acompanhando, cuidando e amando a Amanda e o Arthur. Meu pai, um exemplo de vida, de equilíbrio, de questionamentos, de serenidade. Obrigada por tudo! É difícil transformar em palavras o AMOR e ORGULHO que sinto por vocês!

SUMÁRIO

RESUMO	5
ABSTRACT	6
INTRODUÇÃO	7
JUSTIFICATIVA.....	22
OBJETIVOS	23
MÉTODO	24
RESULTADOS.....	34
DISCUSSÃO.....	63
CONCLUSÕES	72
CONSIDERAÇÕES FINAIS	73
REFERÊNCIAS	75
NORMAS ADOTADAS.....	83

RESUMO

Objetivo: A planta *Tithonia diversifolia*, conhecida popularmente como margaridão, mini-girassol ou mão de Deus, tem sido utilizada popularmente para atenuar a síndrome de abstinência a drogas psicotrópicas em dependentes químicos em Florianópolis, SC. Este trabalho tem por objetivo avaliar possíveis atividades centrais desta planta.

Métodos: Para a avaliação das atividades centrais, camundongos Swiss adultos foram tratados agudamente por via intragástrica com o extrato bruto da *T. diversifolia* (100, 300 e 600mg/Kg) ou veículo (água). Para escolha da dose efetiva a ser usada nos outros testes comportamentais, assim como o tempo de pré-tratamento ideal, utilizou-se o teste do sono induzido por barbitúrico e por éter. Foram também realizados testes de subida e catatonía para verificar possíveis atividades no sistema dopaminérgico, de suspensão pela cauda para verificarmos atividade tipo antidepressiva, do campo aberto para verificarmos a atividade locomotora e do labirinto em cruz para a atividade ansiolítica. Além do tratamento agudo, foi realizado tratamento sub crônico, na dose de 300mg/Kg, utilizando-se os métodos do sono induzido por barbitúrico e por éter, da suspensão pela cauda, do campo aberto e do labirinto em cruz para avaliar as atividades já citadas acima. O modelo da hipertermia causada pelo stress foi usado na avaliação da redução da síndrome de abstinência, que foi causada pelo tratamento com álcool a 10%, 2g/Kg, durante seis dias. No sétimo dia os animais foram tratados com o extrato bruto da *T. diversifolia* a 300mg/Kg.

Resultados: No tratamento agudo observamos uma potencialização do sono induzido por barbitúrico na dose de 300 mg/Kg de *T. diversifolia* no tempo de 2 h, sendo que este efeito não foi confirmado no teste do sono etéreo. Os demais testes farmacológicos, tanto no tratamento agudo como no sub crônico, não revelaram atividade desta planta no SNC. A abstinência também não foi atenuada com o tratamento.

Conclusão: Os resultados do tratamento agudo e sub crônico mostraram somente uma possível atividade hipno-sedativa no teste do sono barbitúrico, a qual não foi confirmada pelo teste de sono etéreo, o que parece ser devido mais a uma interferência na farmacocinética do barbitúrico que a um efeito central. O tratamento agudo com a planta também não atenuou a síndrome de abstinência, apesar de seu uso e indicação popular.

Palavras-chave: transtornos relacionados ao uso de substâncias, psicofarmacologia, alcoolismo, plantas medicinais, *Tithonia diversifolia*.

ABSTRACT

Objetivo: The plant *Tithonia diversifolia*, known like margaridão, small girasol or God's hand, popularly used in Florianópolis, (Santa Catarina state, Brazil) on the treatment of addiction to some substances of abuse such as alcohol. Its extract is used to reduce the withdrawal symptoms observed after stopping the use of some psychotropic drugs.

Methods: The present study aims to evaluate the putative central activity of this plant. Swiss adult mice were acutely treated with vehicle (tap water p.o.) and *T. diversifolia* extract (100, 300, 600mg/Kg p.o.). To choose an effective dose and the pretreatment period for the central actions, we have used the sedative effect induced by barbiturate and ethyl ether. After the determination of the doses range and time of observation, we have used the climbing behavior and the catalepsy tests to verify a dopaminergic activity; the tail suspension test to an antidepressant activity, the open-field test to locomotor activity and the plus-maze test to evaluate an anxiolytic/anxiogenic action. The sedative effect, induced by barbiturate and by ether, tail suspension, open field and plus-maze tests were repeated after a sub-chronic treatment (300mg/Kg p.o.). The stress-induced hyperthermia test was used to evaluate the attenuation of the anxiety on the withdrawal. The withdrawal happens of previous treatment the swiss adult male mice with alcohol (10%, 2Kg/Kg) twice daily, for six days. On the 7 day, the animals were treated with *T. diversifolia* extract (300mg/Kg, p.o.).

Results: The acute treatment showed a potential sedative action in the barbiturate test at the dose of 300 of *T. diversifolia* in the 2nd h, but this action were not confirmed on the ethyl ether-induced sleep. Moreover, the extract, when evaluated in the other pharmacological tests, after acute and sub-chronic treatments, do not present any central activity. The acute treatment do not reduced the anxiety caused by the withdrawal.

Conclusion: The results only showed a possible sedative effect in the barbiturate-induced sleep that were not confirmed after the use of another agent to induce sleep (ether). Thus, a hypothesis to explain this effect can be a pharmacokinetic interference. Despite popular use the extract (300mg/Kg, p.o.) of this plant to reduce the withdrawal, the acute treatment do not present this effect.

Keywords: substance-related disorders, psychopharmacology, alcoholism, plants medicinal, *Tithonia diversifolia*,

1 INTRODUÇÃO

Nos dias atuais, a prevalência de dependência de álcool e outras drogas tem aumentado de forma significativa, trazendo diversos problemas biopsicossociais e elevando o custo social, do Sistema Único de Saúde, da educação, da assistência social devido aos acidentes, as mortes, o desemprego, a desagregação familiar, a violência e criminalidade. Seus usuários estão sujeitos a complicações neurológicas, tais como traumas, infecções, derrames, convulsões, déficits cognitivos e lesões fetais¹. Drogas de abuso e adicção tem uma enorme implicação na saúde pública, pois o uso das drogas é um dos maiores vetores de transmissão de várias doenças infecciosas sérias como AIDS, hepatite, tuberculose². Os fatores que podem levar ao uso, abuso e dependência de drogas são variados, podendo ser de origem biológica, psicológica, sócio-cultural ou ainda envolver todos ou alguns destes fatores^{3,4}.

As drogas que podem levar a dependência são chamadas drogas de abuso ou psicotrópicas. Elas se caracterizam pela ação psicoativa, no sistema nervoso central (SNC), interferindo na sua fisiologia, alterando o humor, o comportamento e/ou a cognição; apresentando propriedades reforçadoras, isto é, o estímulo para o uso da droga^{5,6}. Farmacologicamente, conforme classificação de Chalout (1971) as drogas ou substâncias psicotrópicas são classificadas em três grupos: estimulantes (psicoanalépticas), depressoras (psicolépticas) e perturbadoras (alucinógenas ou psicodislépticas) da atividade do SNC, como apresentado na Tabela 1, a seguir.

TABELA 1 - CLASSIFICAÇÃO DAS DROGAS PSICOTRÓPICAS
(ADAPTADO DE L. CHALOUT, 1971)

GRUPO	CONCEITO	DROGAS (Substâncias)
Estimulantes (Psicoanalépticas)	Drogas que estimulam as funções psíquicas. Têm ação tônica, revigorante e euforizante.	<ul style="list-style-type: none"> - Tabaco, cafeína - Cocaína - Anfetaminas <ul style="list-style-type: none"> • d-anfetamina (Glucoenergan®, Reactivan®) • metanfetamina (Pervitin®) • fenfluramina (Isomerid®, Minifage®) • mazindol (Dasten®, Fagolipo®) • dietilpropriona ou anfepramona (Hipofagin®, Inibex®, Dualid®, Moderine®) • femproporex (Desobesi®, Inobesin®) • metilfenidato (Ritalina®) • fenmetrazina (Preludin®)
Depressoras (Psicolépticas)	Drogas que inibem as funções psíquicas. Têm ação relaxante ou calmante.	<ul style="list-style-type: none"> - Álcool - Hipnóticos barbitúricos <ul style="list-style-type: none"> • pentobarbital (Hypnol®) • fenobarbital (Fenobarbital®, Gardenal®, Fenocris®, Edhanol®) - Ansiolíticos benzodiazepínicos <ul style="list-style-type: none"> • bromazepam (Bromazepam®, Lexotan®, Somalium®, Nervium®, Novazepam®, Deptran®, Brozepam®) • clobazam (Frisium®, Urbanil®) • clorazepam (Tranxilene®) • clordiazepóxido (Psicosedin®, Limbitrol®, Menotensil®) • diazepam (Diazepam®, Dienpax®, Kiatrium®, Ansilive®, Compaz®, Calmociteno®, Letansil®, Noan®, Somaplus®) • estazolam (Noctal®) • flunitrazepam (Rohypnol®, Fluserin®) • flurazepam (Dalmadorm®) • lorazepam (Lorax®, Lorium®, Mesmerin®, Calmogénol®) • midazolam (Dormonid®) • nitrazepam (Nitrapan®, Nitrazepol®, Sonebon®) - Narcóticos (analgésicos opióides) - Naturais: <ul style="list-style-type: none"> • ópio • morfina (Dimorf®, MS Long®, MST®) • codeína (Antitussígenos: Belacodid®, Setux®, Tilex®) - Semi-sintético: <ul style="list-style-type: none"> • heroína • metadona - Sintéticos: <ul style="list-style-type: none"> • meperidina (Dolosal®, Dolantina®) • fentanil (Fentanil®, Inoval®, Nilperidol®, Durogesic®)

		<ul style="list-style-type: none"> • propoxifeno (Doloxene-A®) - Solventes inalantes <ul style="list-style-type: none"> • acetona, água-raz, benzina, removedores de tinta, cola de sapateiro, outras colas, esmalte, éter, fluido de isqueiro, gasolina, lança perfume, loló, tintas, solventes em geral.
Perturbadoras (Psicodislépticas, Psicodélicas, Psicoticomiméticas, alucinógenas)	Drogas que perturbam as funções psíquicas. Têm ação confusional, alucinógena.	- Naturais <ul style="list-style-type: none"> • derivados indólicos: plantas jurema e caapi (huasca), cogumelos: psilocibina • derivados da cannabis (THC): maconha, haxixe. • Derivados do peiote (cacto): mescalina • Anticolinérgicos daturas (lírio, saia branca, zabumba, trombeta) - Sintéticos <ul style="list-style-type: none"> • LSD-25 • MDMA (êxtase) - Anticolinérgicos: <ul style="list-style-type: none"> • triexfenidila (Artane®, Triexidyl®) • dicitomina (Bentyl®) • biperideno (Akineton®)

Das drogas de abuso, a mais consumida é o álcool. Trata-se de uma droga lícita, com grande aceitação social. Esta aceitação provavelmente tenha origem em fatos históricos, já que há relatos de que há 6000 a.C. a bebida alcoólica já estava inserida nos hábitos e costumes do homem, sendo em muitas culturas considerada uma substância divina, que favorecia o contato com os deuses^{7,8}. A partir da Revolução Industrial registrou-se um grande aumento na oferta de bebidas destiladas, contribuindo para um maior consumo e, conseqüentemente, gerando um aumento no número de pessoas que passaram a apresentar algum tipo de problema devido ao uso excessivo de álcool. Os alcoólatras eram considerados criaturas imorais, preguiçosas e vagabundas⁹.

A dependência de drogas passou a ser vista como uma doença há menos de duzentos anos. Até então, apenas as complicações do consumo, tais como demência e surtos psicóticos despertavam a atenção dos médicos. Somente a partir de 1850 é que os estudos começaram a desvendar os “mistérios” da dependência a drogas. Nos últimos trinta anos ela passou a ser vista como uma doença com sinais e sintomas específicos^{2,9}. Cada indivíduo tem um padrão de consumo diferente, que varia do consumo de baixo risco até à dependência. Há, portanto, diferentes níveis de gravidade, onde os fatores genéticos deixam alguns indivíduos ainda mais susceptíveis ao uso nocivo de substâncias psicoativas¹ e a motivação para a mudança de hábito, também é diferente de pessoa para pessoa². Trabalhos recentes apontam para um sinal

de intoxicação quando do uso de drogas que funcionaria como um sistema de *feedback* negativo para este comportamento e que funcionaria, na maioria das pessoas, como um sistema de proteção efetivo contra a ingestão, compulsiva, da droga. No entanto, isto ainda não está bem definido³.

Os levantamentos epidemiológicos mostram que 200 milhões de pessoas, ou seja, 5% da população mundial, na idade de 15-54 anos, consumiram drogas ilícitas, pelo menos 1 vez em 12 meses. Já o álcool, que é uma droga lícita, durante o mesmo período, foi consumido por 50% da população mundial¹⁰. Levantamentos do consumo de drogas pelos jovens brasileiros nas 10 maiores capitais brasileiras, realizada pelo CEBRID (Centro Brasileiro de Informação sobre Drogas Psicotrópicas) trazem os seguintes dados:

- 1997 – 7,0% dos estudantes (maioria menores de 18 anos) de Belém bebem 20 ou mais vezes por mês (uso pesado); na faixa de 10-12 anos, 53,2% já usaram álcool ao menos uma vez. Em Porto Alegre, os números são: 7,7% e 55,2% respectivamente.
- 2001 – Levantamento domiciliar em 107 maiores cidades brasileiras, 1,5% de 12 – 24 anos declararam consumir álcool ao menos três vezes por semana.
- 2004 – V Levantamento Nacional entre estudantes mostra que 6,6% destes na faixa etária de 10 – 18 anos fazem uso pesado de álcool, entre 10 – 12 anos o uso chegou a 41,5% dos entrevistados.

A dependência de álcool é ainda a principal causa das internações psiquiátricas que acontecem em decorrência do uso de drogas psicotrópicas. Ela foi responsável, em média, por 90% das 726.429 internações registradas entre 1988 e 1999. Dados do Ministério da Saúde apontam como a segunda causa de todas as internações psiquiátricas, ficando atrás apenas da esquizofrenia. Dos 471 milhões de reais gastos com internações psiquiátricas no ano de 2000, 12% foram destinados àquelas relacionadas ao uso abusivo do álcool¹¹.

Considerando as drogas ilícitas, estas são consumidas por, pelo menos, 4,2% da população mundial, sendo que, em primeiro lugar, encontra-se a maconha, seguida pelas anfetaminas, cocaína e os opiáceos¹⁰. Os benzodiazepínicos, devido a sua relativa segurança e baixa toxicidade, são ainda usados indiscriminadamente por alguns profissionais médicos, que desconsideram o aspecto de tolerância e dependência desenvolvido por este grupo de drogas

ansiolíticas. Atualmente, um em cada 10 adultos recebe receitas de benzodiazepínicos a cada ano¹², sendo que 50% dos pacientes que fazem uso de benzodiazepínicos por mais de 12 meses evoluem para uma síndrome de abstinência¹³. Os solventes também são usados, principalmente por pessoas carentes, devido ao seu baixo custo e desempenham um papel 'anestésico' e de alívio, contra situações tais como dor e fome¹⁴. Os solventes já foram utilizados pelo menos uma vez na vida por quase 6% da população brasileira, sendo a quarta substância mais comum de abuso.

A Figura 1 mostra a prevalência de uso das drogas psicoativas lícitas e ilícitas no Brasil.

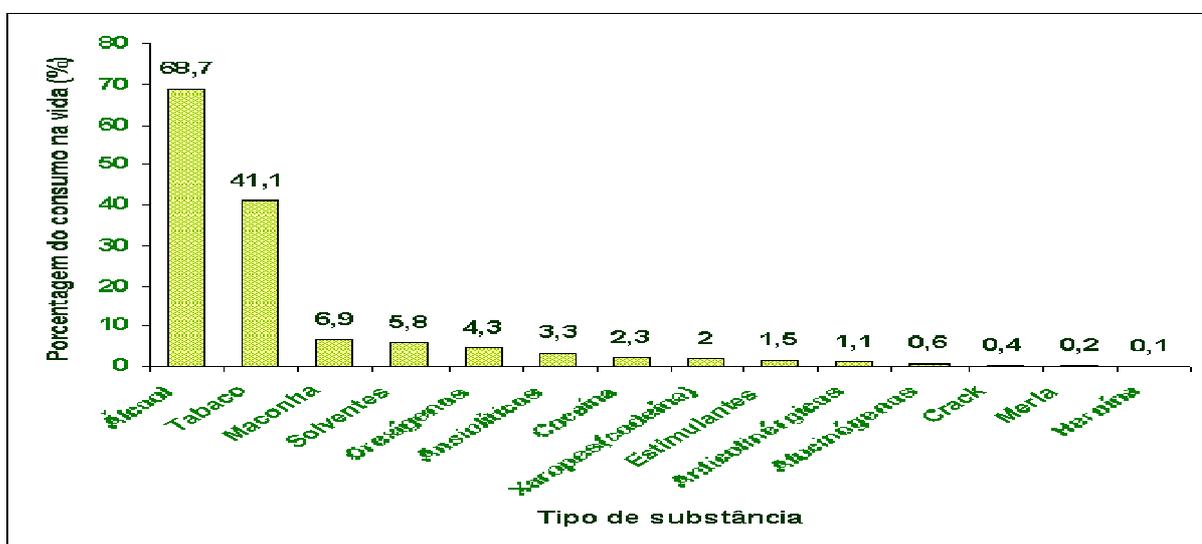


Figura 1 - Prevalência de uso das drogas psicoativas lícitas e ilícitas no Brasil.

FONTE: Galduróz et al (2002). I Levantamento Domiciliar sobre Uso de Drogas no Brasil ~ Centro Brasileiro de Informação sobre Drogas Psicotrópicas (CEBRID)¹⁵.

A dependência as drogas pode ser definida como uma síndrome comportamental, com fatores neurobiológicos, caracterizada pelo consumo compulsivo de drogas com recaídas freqüentes. Este comportamento é comum e pode ocorrer mesmo depois de muitos anos de abstinência e está associado a conseqüências desastrosas para o indivíduo, incluindo a morte³. A compulsão pelo uso da substância, relacionada ao reforço positivo (prazer) para a continuidade do uso, é considerada como o componente psicológico da dependência, sendo, por alguns autores, diferenciada da dependência física e da síndrome de abstinência^{1,3}. Na prática clínica, os componentes psicológicos e físicos são considerados de forma integrada, pois, não existe dependência apenas psicológica ou apenas física, já que algumas e perigosas

drogas, como o crack, cocaína e metanfetamina, são altamente aditivas, mas não produzem grandes manifestações físicas na síndrome de abstinência².

Devido a isso, na 9ª Revisão da Classificação Internacional das Doenças os aspectos psicológicos e físicos foram unificados sob a definição de dependência de drogas¹⁶. Assim, hoje, aceita-se que uma pessoa seja dependente, sem qualificação, enfatizando-se que a condição de dependência seja encarada como um quadro clínico.

O entendimento do circuito de recompensa nos anos 50, com a descoberta dos receptores opióides endógenos e dos peptídeos nos anos 70, levaram os cientistas a procurar entender a dependência através da ação neuromolecular, no processo de recaída e adicção⁴. Muitos estudos, nas últimas duas décadas, têm focado no entendimento dos mecanismos e sistemas que medeiam o reforço positivo para a adicção. O principal sistema neurotransmissor envolvido é o dopaminérgico mesocorticolímbico, relacionado com o controle das emoções e padrões comportamentais, cuja ativação desencadeia uma sensação de prazer. Esta via de neurotransmissão dopaminérgica é também conhecida como via reforçadora, do prazer ou das emoções^{2,4}.

A plasticidade estrutural induzida pelas drogas de abuso é longa (muitos meses) e os trabalhos sugerem que estas produzem uma persistente reorganização de padrões de sinapses cognitivas^{4,17}. Não está claro ainda se estas mudanças estruturais alteram a operação de células e circuitos, mas a reorganização destas regiões cerebrais devem contribuir para algumas das persistentes seqüelas associadas ao uso repetido das drogas, incluindo da hipersensibilidade ao incentivo emocional e as alterações cognitivas que são características marcantes da adicção^{4,18}. Estas mudanças ocorrem nas microestruturas dos dentritos de uma população de neurônios dentro do sistema mesolímbico dopaminérgico^{4,17}.

A dopamina é o principal neurotransmissor, descrito até então, envolvido no mecanismo de adicção, não somente como um agente de recaída, mas de uma maneira geral, como um agente no aprendizado e na neuroadaptação relacionado à droga^{4,19}. A transmissão dopaminérgica, eventualmente, excede os limites ao redor das sinapses, envolvendo receptores somatodendríticos e pré-sinápticos seguida de difusão da transmissão através do espaço extracelular¹⁹. A excitação dos neurônios dopaminérgicos se dá de duas formas: um único pico tônico e uma fásica. As mudanças fásicas excitatórias fornecem somente uma

figura parcial na resposta da transmissão dopaminérgica para o estímulo motivacional²⁰. As propriedades da transmissão dopaminérgica, no núcleo *accumbens* e no córtex pré-frontal, são mais consistentes na motivação e no reforço, de acordo com a noção de que o núcleo *accumbens* atua como uma interface entre a motivação e a ação^{20,21,22}. Mais do que uma série de estímulos e respostas acredita-se, que a dopamina tem uma ação moduladora na habilidade de incitar uma resposta²⁰. Assim, os estudos têm mostrado o papel da dopamina no mecanismo de adicção, sensitização e recaída, mas os resultados não têm sido suficientes para explicar o mecanismo de neuroplasticidade envolvido.

Os trabalhos recentes em modelos animais de adicção, de neuroimagem, de fisiologia celular e de biologia molecular têm ajudado a entender o circuito neuronal envolvido na adicção^{4,22}. Este circuito envolve as regiões do córtex pré-frontal, amígdala, núcleo *accumbens*, área tegmentar ventral e núcleo pálido ventral, conforme descrito abaixo. O núcleo *accumbens*, que por diversos anos tem sido considerado como a área principal envolvida no mecanismo da adicção, apresenta uma grande concentração de receptores dopaminérgicos D3, além da amígdala e da área tegmentar ventral. Drogas agonistas parciais e antagonistas deste receptor diminuem o uso da droga ou a recaída a ela, sendo que a amígdala parece ser a primeira região envolvida no processo de recaída²²⁻²⁵. O circuito que está envolvido neste processo parece ter os seguintes componentes: projeções da amígdala para o córtex pré-frontal, deste para o núcleo *accumbens*, para a amígdala basolateral e para a área tegmentar ventral, sendo estas projeções glutamatérgicas. Há ainda uma conexão dopaminérgica da área tegmentar ventral para a amígdala e o núcleo *accumbens* tem eferência neuronal GABAérgica e peptídica para o núcleo pálido ventral e a área tegmentar ventral²².

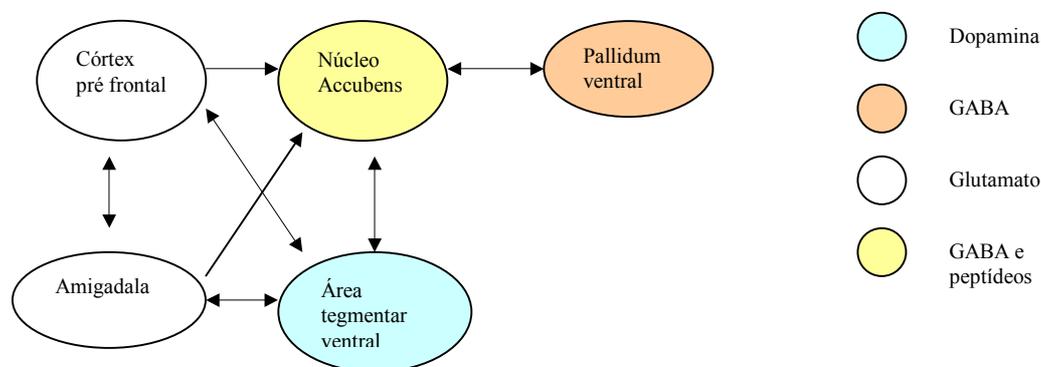


Figura 2 - Esquema proposto por KALIVAS, 2004.

Parece que as mudanças dependentes do sistema dopaminérgico, ligadas às adaptações rápidas moleculares na área tegmentar ventral, são mais críticas para o desenvolvimento do comportamento de adicção e a transmissão glutamatérgica está ligada na regulação das alterações dependentes de dopamina^{6,22}. Tudo indica que esta região é importante na manutenção do comportamento compulsivo do álcool e que a prolongada hipofunção do sistema dopaminérgico na área tegmentar ventral está associada com a longa potencialização das sinapses GABAérgicas no lugar dos neurônios dopaminérgicos²⁶. Assim, o déficit de liberação dopaminérgica na área tegmentar ventral pode ser a base para o intenso desejo e recaída pelo álcool⁶. Terminais axônicos dopaminérgicos e glutamatérgicos, freqüentemente formam uma árvore sináptica no dendrito pós-sináptico. Isto pode justificar a modulação da neurotransmissão excitatória^{4,6}.

Além do sistema mesolímbico dopaminérgico deve haver outro sistema ativado, já que os fatos e as mudanças irreversíveis deste sistema citados acima não explicam totalmente a adicção. Trabalhos mostram que o sistema nigrostriatal é ativado no uso de drogas de abuso, já que mudanças de hábitos estão presentes em dependentes químicos, como comportamento padrão estereotipado e rigidez, contribuindo para as recaídas³.

Existem pequenas diferenças no mecanismo de adicção entre as drogas psicotrópicas. O uso compulsivo do álcool diminui o efeito excitatório do sistema glutamatérgico, pois bloqueia a ligação da glicina aos receptores de glutamato. A glicina facilita a despolarização da membrana pelo glutamato. Esta redução de ação provoca proliferação e aumento da sensibilidade dos receptores de glutamato, levando aos sintomas de hipersensibilidade presentes na abstinência, tais como convulsões, delirium tremens e síndrome alcoólica fetal, além de aumento da secreção de dopamina no sistema de recompensa. O déficit do sistema glutamatérgico também prejudica a memória de curta duração, sendo, provavelmente, a base neurobiológica para a amnésia alcoólica ou *blackouts*¹.

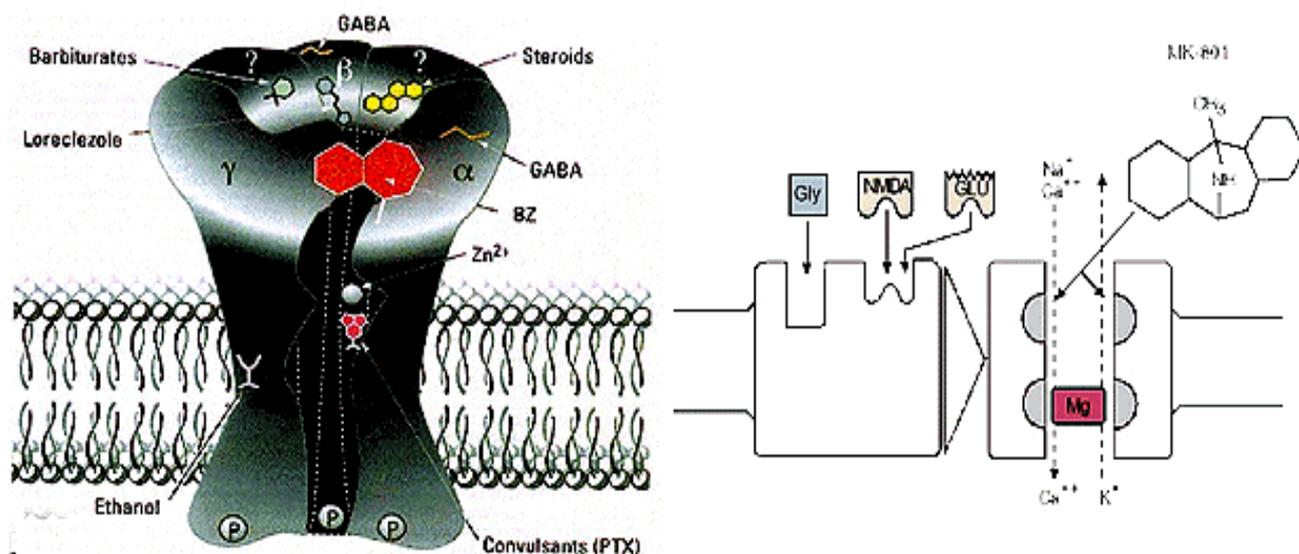


Figura 3 - Os sistemas GABAérgico e glutamatérgico são responsáveis pela inibição e excitação do sistema nervoso central respectivamente. À esquerda, um receptor GABA tipo A (GABA-A), que pode ser estimulado pelo álcool, barbitúricos e benzodiazepínicos. À direita, um receptor de glutamato (NMDA e GLU). A glicina (GLY) potencializa a ação dos neurotransmissores. O álcool é capaz de bloquear sua ligação, piorando o desempenho desse sistema¹.

Fonte: Burst JCM. Substance abuse, neurobiology, and ideology. Arch Neurol 1999.

A síndrome de abstinência, por sua vez, parece estar ligada ao sistema de recaída. Há diminuição da liberação de dopamina durante a abstinência, resultado da ação de três fatores principais: aumento da inibição via receptores GABAB, aumento da inibição via receptores mGlu e aumento da liberação de GABA. Esta redução parece explicar a diminuição da sensibilidade aos efeitos de recaída e o aumento das doses das drogas que caracterizam os trabalhos de adicção⁴.

A alta prevalência de abuso de drogas associada ao avanço dos métodos de diagnósticos, da caracterização dos mecanismos neurobiológicos e da farmacologia das drogas, trouxe uma nova compreensão da dependência química como um transtorno de saúde pública, que pode ser abordado por qualquer profissional treinado na área de saúde.

Hoje os tratamentos para dependentes químicos são realizados com grupo de diferentes áreas da saúde, medicina, assistência social, enfermagem, psicologia e sociologia, além de líderes comunitários e advogados, tendo, assim, um dinâmico caráter biopsicossocial². Além disso, o entendimento da dependência química como uma doença crônica muda o modo do tratamento e a consciência de que este não traz a cura do paciente, mas o gerenciamento da mesma².

Além das terapias em grupo e terapias individuais, vêm sendo hoje usadas como tratamento farmacológico substâncias que diminuem os efeitos na compulsão pelo uso da droga, nas recaídas e na síndrome de abstinência, evitando, conseqüentemente o abandono do tratamento, tão freqüente entre os usuários de drogas.

As substâncias têm sido desenvolvidas e utilizadas a partir da descoberta e do entendimento do mecanismo biológico da dependência em drogas. As substâncias aprovadas no momento para este tratamento são o dissulfiram, acamprosato e naltrexona. O dissulfiram atua inibindo a aldeidodesidrogenase e a não metabolização do acetaldeído leva a efeitos tóxicos, tendo um mecanismo de aversão ao uso do álcool. O acamprosato é um fraco antagonista de receptores NMDA, podendo agir na plasticidade sináptica, sendo usado para diminuir a compulsão no uso da droga e a naltrexona, que é um antagonista opióide, é usado para diminuir a sensação de recompensa pelo uso da droga. As substâncias que atuam sobre o sistema dopaminérgico e serotoninérgico têm sido estudadas e usadas, mas ainda não estão aprovadas para o uso em dependentes químicos. Drogas ansiolíticas e anticonvulsivantes, entre outras, têm sido também propostas e testadas²⁷⁻³⁰.

Além destes tratamentos, tem sido relatado o uso popular de plantas medicinais. A medicina chinesa já utiliza plantas medicinais há longo tempo para o tratamento de dependentes de drogas. Estas plantas, como por exemplo, os alcalóides da *Tabernanthe iboga*³¹⁻³³, *Hypericum perforatum*^{31, 32} (Erva de São João), *Pueraria lobata*³¹ (Kudzu, Ge-gen) *Passiflora incarnata* Linneaus³⁴ (Maracujá), *Thunbergia laurifolia*³⁵ (allamanda roxa) e *Simplocos racemosa*³⁵, *Salvia miltiorrhiza* e *Panax ginseng*³² parecem atenuar a síndrome de abstinência e a ingestão da droga³¹ ou diminuir a absorção da mesma³². Bastante conhecidas dos brasileiros são o limão (*Citrus limonum*) e o maracujá-açú (*Passiflora quadrangulares*), cujos supostos benefícios no tratamento de alcoolistas aparecem já há muitas décadas na farmacopéia fitoterápica³⁶. Alguns trabalhos já foram desenvolvidos com estas plantas tentando relacionar seus efeitos “anti-drogas” com seus possíveis mecanismos de ações, tais como:

Hypericum perforatum – Usado no tratamento de depressão moderada e no tratamento do abuso de drogas. Existe uma associação entre depressão e abuso de álcool, já tendo sido relatado substratos neuroquímicos em comum para estas duas situações³¹.

Trabalhos realizados em animais tem demonstrado a diminuição do uso de álcool em tratamentos por gavagem ou ingestão voluntária³⁷. O *H. perforatum* atua sobre o sistema serotoninérgico, noradrenérgico, dopaminérgico, glutamatérgico e gabaérgico, inibindo a recaptação neuronal e, a atividade da monoamino-oxidase (MAO)^{31,38-40}. Além disso, trabalhos demonstram a ação do *H. perforatum* sobre o sistema opióide, devido à alta afinidade por receptores sigma e uma alta afinidade desta planta sobre receptores GABA_B e moderada afinidade sobre GABA_A. Estas ações ocorrem na região mesolímbica e parecem explicar a ação desta erva na depressão moderada e no tratamento da dependência de álcool³¹.

Pueraria lobata – Tem como princípio ativo a puerarina. Há estudos pré-clínicos demonstrando os efeitos benéficos de puerarina sobre a ingestão de álcool, sugerindo uma ação desta planta no tratamento da compulsão pela droga. O extrato da *P. lobata* é capaz de reduzir a ansiedade, melhorando a interação social na abstinência, sendo que este feito parece ocorrer devido um fraco antagonismo dos receptores benzodiazepínicos^{31,41}.

Tabernanthe iboga – Seu princípio ativo, a ibogaina tem sido usada no tratamento de abuso de drogas por exercer um efeito anticomulsivo, devido ação estimulatória sobre os sistemas dopaminérgicos e serotoninérgicos. A ibogaina aumenta os níveis de dopamina no cérebro, diminui os níveis dos seus metabólitos no núcleo accumbens, estriato e córtex pré-frontal, áreas envolvidas com a dependência. A ibogaina também interage com o sistema serotoninérgico, aumentando a sua atividade no núcleo accumbens. Tem uma ação inibitória sobre receptores pré-sinápticos 5HT_{1b}, bloqueando a modulação inibitória da serotonina sobre o sistema dopaminérgico. Sabe-se que a ibogaina ativa o receptor kappa opióide, inibindo a liberação de dopamina mediada por este receptor. Também apresenta ações sobre o sistema glutamatérgico e gabaérgico, principais neuromoduladores da atividade cerebral^{31,42}. Além disso, a ibogaina altera a regulação de cálcio intracelular e dos canais de sódio dependentes de voltagem⁴². Embora a somatória destes efeitos contribua para a sua ação antiadictiva (atenuação da tolerância, da abstinência e a compulsão pelo uso da droga), os efeitos serotoninérgicos parecem ser os mais relevantes^{43,44}.

Passiflora incarnata L. – Em muitos países há relatos do uso desta planta para atenuação da adicção por álcool, tendo um efeito do tipo ansiolítico no SNC e vários trabalhos têm demonstrado resultados encorajadores com relação a seus efeitos em reverter a tolerância

e sobre a dependência de álcool, morfina e canabinóides³⁴. Sua ação, entretanto, não parece ser sobre os receptores benzodiazepínicos⁴⁵. Cohen⁴⁶ demonstrou que a *P. incarnata* inibe uma aromatase, enzima do sistema da citocromo P-450, que faz a conversão da testosterona em seus metabólitos. Assim, aumenta o nível de testosterona livre, diminui o de estrogênio reduzindo o feedback negativo do estrogênio, contribuindo também para a manutenção de uma alta concentração de testosterona sanguínea. Sabe-se que o álcool leva a hiperestrogenização e redução da testosterona sanguínea e que os neuroesteróides cerebrais são os responsáveis pelo efeito ansiogênico e pró-convulsivante observados na abstinência e administração crônica de álcool⁴⁷. Desta forma, o uso desta planta ajuda na normalização das alterações comportamentais, como a intensa ansiedade manifestada na abstinência, comuns no uso crônico e dependência de álcool e outras drogas³⁴.

Stichaster striatus – Há poucos estudos sobre esta planta. Foi descrito que ela diminui a ingestão voluntária de álcool, mas ainda não está bem determinado o mecanismo de ação. Sabe-se, porém, que esta planta não bloqueia a enzima aldeído desidrogenase, como faz o dissulfiram, reconhecido pelo seu efeito antietanol⁴⁸.

Thunbergia laurifolia Linn. – É bastante pobre a literatura científica sobre esta planta. Sugere-se que o extrato desta planta teria uma potente ação estimulante da liberação de dopamina no estriato, o que poderia justificar seu uso no tratamento do abuso e dependência de drogas³³.

Panax Ginseng e Salvia miltiorrhiza – Há relatos de que estas plantas diminuem a absorção de álcool no trato gastrointestinal, reduzindo a concentração sanguínea e consequentemente os efeitos da droga³².

O presente trabalho pretende estudar uma planta popularmente utilizada no tratamento da compulsão a drogas, a *Thitonia diversifolia* (Fig. 5 e 6), conhecida popularmente como margaridão, mini-girassol ou mão de Deus. Esta planta é nativa do México e da América Central e difundida em outras partes do mundo⁴⁹, como pode ser visto na Fig. 4, inclusive no Brasil. É usada no tratamento de problemas de estômago, indigestão, dores de garganta e no fígado⁵⁰.

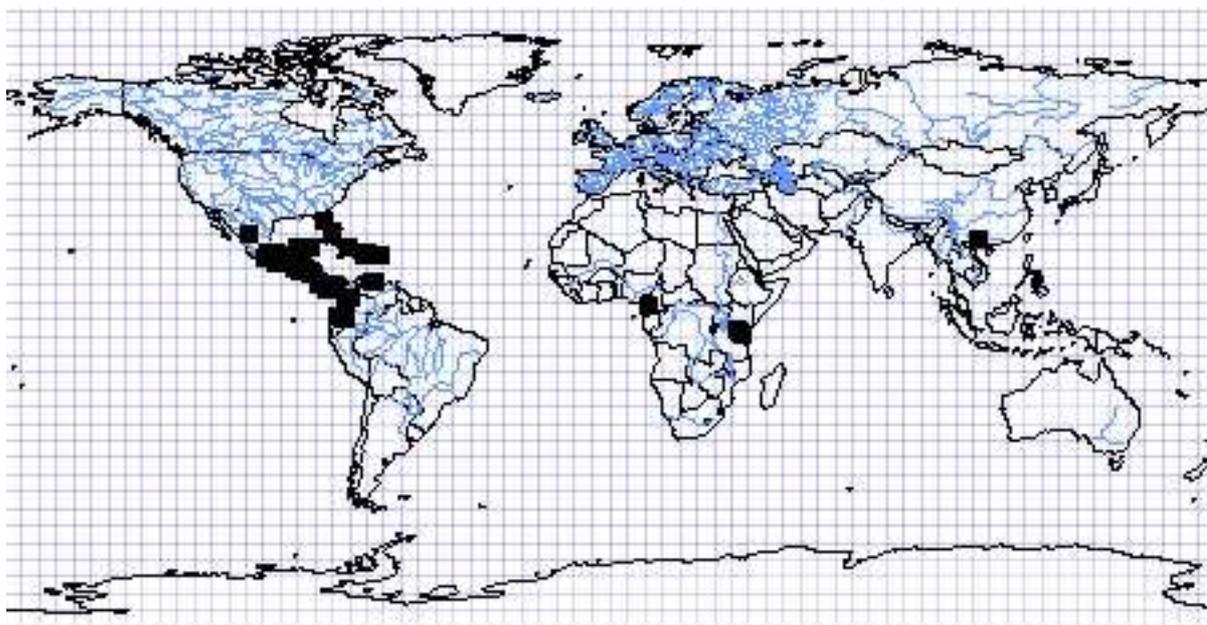


Figura 4 – Distribuição mundial da *Thitonia diversifolia*, segundo o Botanical Garden of Missouri (www.Mobot123807049297)

Trabalhos científicos mostraram que a *Thitonia diversifolia* contém compostos bioativos, compostos que possuem atividade antimalárica, antiinflamatória, antidiarréica, antiamébrica, antimicrobiana e atividade espasmolítica⁵⁰⁻⁵⁵. Alguns compostos bioativos têm sido isolados a partir das folhas e raízes, dentre estes se incluem as lactonas sesquiterpênicas, saponinas e alcalóides^{56,57}. Pouco se sabe, no entanto, sobre as ações desta planta no SNC, as quais poderiam justificar este uso medicinal. Acredita-se que esta ação da *Thitonia diversifolia* esteja relacionada à presença de lactonas sesquiterpênicas na sua estrutura química⁴⁹, pois há relatos de que estas têm várias ações sobre o organismo, incluindo ações centrais⁵⁸, as quais poderiam favorecer seu uso no tratamento da síndrome de abstinência a drogas.



Figura 5 – Espécime de *Thitonia diversifolia*. FONTE <http://davesgarden.com/pf/go/59827/index.html>.



Figura 6 - Espécime da *T. diversifolia*. Fonte: <http://davesgarden.com/pf/go/59827/index.html>

2 JUSTIFICATIVA

Com o uso cada vez mais freqüente e precoce de drogas lícitas e ilícitas que levam à dependência e à necessidade de apoio farmacológico no seu tratamento, este trabalho visa determinar as possíveis ações centrais da *Tithonia diversifolia* que corroborem sua eficácia e segurança no tratamento de dependências químicas. Até o momento, os trabalhos científicos existentes identificaram quimicamente as substâncias contidas nesta planta, muitas destas com potencial terapêutico, mas sem estudos sistemáticos de suas atividades farmacológicas centrais. Pretendemos verificar, experimentalmente, a existência ou não da propriedade terapêutica central, o que justificaria um estudo mais aprofundado dos princípios ativos desta planta, os quais poderiam ter uma ação antiabuso. Uma vez confirmada, vislumbramos a possibilidade de continuidade da pesquisa com estudos clínicos, que possam vir a corroborar ou não seu uso terapêutico.

3 OBJETIVOS

Objetivo Geral

O presente estudo teve por objetivo avaliar as ações farmacológicas centrais da *Tithonia diversifolia* nos sistemas de neurotransmissão envolvidos na neurobiologia da dependência a drogas que possam dar suporte ao seu potencial terapêutico.

Objetivos Específicos

- Avaliar a ação da *Tithonia diversifolia* no sistema dopaminérgico.
- Avaliar a ação da *Tithonia diversifolia* no sistema serotoninérgico.
- Avaliar a ação da *Tithonia diversifolia* no sistema noradrenérgico.
- Avaliar a ação da *Tithonia diversifolia* no sistema GABA e glutamatérgico.

4 MÉTODO

4.1 Materiais

Animais

Foram utilizados camundongos Suíços, de ambos os sexos, com 3 meses de idade, pesando entre 30-40g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina, mantidos até o momento do experimento no Biotério do Setorial da Coordenadoria Especial de Farmacologia, sob condições controladas de temperatura ambiente ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$) e luz o ciclo (ciclo claro/escuro de 12h: (luz acesa das 07:00 às 19:00h). Os animais tiveram livre acesso a água e comida, exceto durante a realização dos experimentos. Todos os animais foram habituados nas condições do laboratório por, pelo menos, uma semana antes do início dos testes comportamentais. Todos os animais não haviam sido previamente usados, sendo testados apenas uma vez, exceto quando explicitamente indicado em testes não invasivos. Os experimentos comportamentais e os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (# 23080.027554/2004-49/UFSC). O número mínimo de animais e a duração mínima de observação que permitiram obter dados consistentes foram usados em todos os experimentos.

Drogas

Foram utilizadas as seguintes drogas:

- **Haloperidol – Sigma Chemical Co** (St. Louis, MO, USA) - Diluído em salina (0,9% de NaCl), administrado via i.p., na concentração de 1,0 mg/Kg, no momento do teste. Esta droga foi gentilmente doada pelo Prof. Dr. Reinaldo Naoto Takahashi.
- **Apomorfina – RBI (Research Biochemicals International)** - Diluído em salina (0,9% de NaCl), administrado via i.p., na concentração de 10 mg/Kg, no momento do teste.

- **Imipramina - Sigma (I – 7379, lote 79H0847 Biochemical International D-004, lote KPF – 195A)** - Diluído em salina (0,9% de NaCl), administrado via i.p., na concentração de 15 mg/Kg, 30 minutos antes do teste.
- **Diazepam – Diempax® - SANOFI Winthrop Lab.** - Ampola de 10mg/2ml, diluído em salina (0,9% de NaCl) e propilenoglicol, administrado via i.p., na concentração de 1,0 mg/Kg, 30 minutos antes do teste.
- **Pentilenotetrazol – Sigma (P-6500, lote 28F0161)** - Diluído em salina (0,9% de NaCl), administrado via i.p., na concentração de 10%, no momento dos testes.
- **Pentobarbital – Laboratório Abbott – São Paulo, SP.** - Diluído em salina (0,9% de NaCl), administrado via i.p., na concentração de 50 mg/Kg, no momento dos testes. Esta droga foi gentilmente doada pelo prof. Antônio J. Lapa, setor de Produtos Naturais, Farmacologia, EPM / UNIFESP.
- **Éter Etilico – Laboratório Dinâmica.** - Algodão de 6g embebido com 5 ml de éter, colocado em uma câmara hermeticamente fechada. Administrado no momento do teste.
- **Álcool Etilico (P.A .) – VETEC (Lote 048897).** - Diluído em água destilada, administrado por via intra-gástrica, na concentração de 10% a 2 mg/Kg. Administrado por 6 dias, 2 vezes ao dia (09:00 e 17:00h) por via intragástrica.
- **Extrato bruto da planta *Tithonia diversifolia*.** - As folhas de *T. diversifolia* foram colhidas no Horto Botânico do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina, pela aluna Rosane Schenkel de Aquino no mês de Abril de 2004. As folhas foram entregues no laboratório de Química do Prof. Dr. Moacir G. Pizzollati, o qual é professor titular do departamento de química desta mesma universidade, a fim de se obter o extrato bruto da planta. As folhas de *Tithonia diversifolia* foram secas em estufa de ar circulante e, posteriormente submetidas à maceração em etanol 96%, realizando-se quatro extrações consecutivas. O extrato hidroalcoólico, destas quatro extrações, foi concentrado em rota evaporador e, posteriormente, deixado sob refrigeração para decantar as

graxas e a clorofila. Realizada esta etapa, submeteu-se o extrato à separação do precipitado, através de filtração simples, obtendo assim, o extrato bruto desta planta a ser testado sobre possíveis ações no SNC e na dependência química.

4.2 Metodologia

Os grupos controle e experimentais, com N variando de 4 a 8 animais por grupo, foram escolhidos aleatoriamente. Todos os experimentos foram realizados entre 09:00h – 17:00h. Uma semana antes dos testes os animais eram deslocados do Biotério Setorial para o biotério do laboratório, sendo mantidas as mesmas condições ambientais. No dia de cada experimento os animais eram retirados do biotério e mantidos dentro das condições experimentais numa ante-sala onde eram pesados, marcados e ocorria a administração das drogas para a realização do teste em questão. No momento do teste eram colocados na sala de experimento, a qual também mantinha a temperatura entre 21 - 25°C, com iluminação de luz vermelha de 15w, quando necessário, e em silêncio. Cada animal foi utilizado somente uma vez.

Tratamentos

O extrato hidroalcoólico das folhas da planta *Tithonia diversifolia* foi diluído em água destilada e administrado por via intragástrica, nas concentrações de 100, 300, 600 e 900 mg/Kg. Para o tratamento agudo o extrato foi administrado por via intragástrica (p.o.), duas horas antes dos testes. No tratamento sub-crônico o extrato foi administrado por via intragástrica 24h – 5h - 2h antes dos testes. O grupo controle foi tratado com água da rede (0,1ml/10g de peso), pela mesma via e no mesmo esquema de tratamento.

Como não foram encontrados dados de literatura acerca dos efeitos da *T. diversifolia* no SNC, inicialmente, utilizou-se o Teste de Irwin⁵⁹ (movimentação espontânea em caixas plásticas (42 x 26 x 15 cm)), para verificar se havia qualquer alteração de comportamento após a administração por via intragástrica do extrato bruto da planta na concentração de 100, 300 e 600 e 900 mg/Kg. Após a administração do extrato, os animais foram acompanhados com intervalos de 10 min. com o tempo máximo de observação de 3 h. Nenhuma diferença evidente de comportamento foi observada. Assim, decidimos utilizar diferentes modelos

comportamentais validados para avaliação da atividade de substâncias no SNC, como segue abaixo.

1. Sono Induzido por Barbitúrico

Objetivo:

*Verificar uma possível atividade hipnosedativa da *Tithonia diversifolia*, construindo uma curva dose-tempo repostada para determinar a dose e o tempo de tratamento ideal a serem usados nos demais testes.*

Os animais foram separados nos diferentes grupos e foram tratados com o extrato hidroalcoólico da *Tithonia diversifolia*, água ou diazepam. Duas horas após o tratamento com o extrato ou água, e 30 min do tratamento com o diazepam, benzodiazepínico usado como hipnosedativo-padrão no teste, os animais receberam, por via intraperitoneal, pentobarbital sódico (50 mg/Kg). A latência e a duração da perda do reflexo postural dos animais foi registrada após a injeção do pentobarbital, colocando-os em decúbito dorsal para registro da duração do sono. A recuperação da postura normal (3 tentativas) foi considerada como o término do período do sono. Cada animal foi observado por um tempo máximo de 180 min consecutivos⁶⁰.

2. Sono Induzido por Éter Etilico

Objetivo:

*Confirmar o possível efeito hipnosedativo do extrato hidroalcoólico da *T. diversifolia*, observado no experimento do sono induzido por barbitúrico, usando um agente hipnótico não metabolizado hepaticamente.*

Os animais foram separados em grupos e foram tratados com o extrato hidroalcoólico da *Tithonia diversifolia*, água ou diazepam. Duas horas após o tratamento com o extrato ou água, e 30 min do tratamento com o diazepam, foram colocados em uma câmara (30 cm X 20 cm de diâmetro), de vidro transparente hermeticamente fechada, saturada com éter etílico. O ambiente foi saturado utilizando um algodão de 6 g

umedecido com 5ml de éter etílico, colocado na câmara 10 min antes de iniciar os testes, a 20 cm do nível do chão da câmara.

Transcorrido o tempo de saturação e início de ação das drogas, os animais foram colocados individualmente na câmara e foi registrado o tempo de latência e duração da hipnose induzida pelo éter. O sono etéreo foi igualmente caracterizado pela perda do reflexo postural, após a qual se esperou 60s para retirar o animal da câmara de saturação, colocando-os em decúbito dorsal para registro da duração da hipnose. A recuperação da postura normal (três tentativas) foi considerada como o término do período do sono⁶¹.

3. Teste de subida (“Climbing Behavior”)

Objetivo:

*Investigar se o tratamento agudo com o extrato hidroalcoólico de *T. diversifolia* tem atividade no sistema dopaminérgico.*

Duas horas após o tratamento com o extrato da planta, água ou haloperidol, os camundongos receberam cloridrato de apomorfina (10mg/Kg), por via intraperitoneal e foram colocados individualmente em gaiolas de arame para observação do comportamento estereotipados (comportamento repetitivo, sem finalidade definida = *climbing behavior*), conforme a escala de grau de esterotipia abaixo:

- 4 patas no piso da gaiola – 0
- 2 patas na grade da gaiola – 1
- 4 patas nas grades(intermitente) – 2
- 4 patas nas grades(constantemente) – 3

O comportamento foi observado durante 30 min, a intervalos de 5 min⁶².

4. Teste de Catalepsia ou Catatonia

Objetivo:

*Verificar se o extrato hidroalcoólico de *T. diversifolia* tem atividade antagonista no sistema dopaminérgico.*

Os animais foram tratados com água e extrato da planta por via intragástrica e, duas horas após o tratamento, foi administrado por via intraperitoneal, 1 mg/Kg de haloperidol. Os animais foram então colocados com as duas patas dianteiras sobre uma barra vertical de vidro, a 5 cm da mesa, a intervalos de 10 min⁶³, por 1 hora.

5. Teste da Suspensão pela Cauda (“Tail Suspension Test”)

Objetivo:

*Investigar se o extrato hidroalcoólico da *T. diversifolia* possui atividade antidepressiva.*

Camundongos foram separados em grupos e cada grupo foi tratado com água, extrato da planta e imipramina, respectivamente. Duas horas após o tratamento com água e extrato da planta e, 30 min do tratamento com imipramina, os animais foram presos pela cauda com fita adesiva e permaneceram nesta situação por 5 min. Neste período foi registrado o período de latência, até ficar imóvel e também o tempo em que o animal permaneceu imóvel, a partir do período de latência⁶⁴.

6. Campo Aberto (CA) ou “Open Field”

Objetivo:

*Verificar se a atividade exploratória em um novo ambiente é modificada pelo extrato hidroalcoólico da *T. diversifolia* (atividade anti-estresse ou ansiolítica).*

Duas horas após o tratamento com o extrato hidroalcoólico da *Tithonia diversifolia* e, 30 min do tratamento com diazepam, os camundongos foram colocados no campo aberto. O campo aberto é um quadrado confeccionado em acrílico com paredes transparentes e, chão preto, medindo 30 X 30 X 15 cm. Este equipamento foi usado para avaliar a atividade exploratória dos animais, e os parâmetros utilizados para esta avaliação foram: sua movimentação espontânea (número de cruzamentos com as quatro patas entre as divisões do campo), número de comportamentos de auto-limpeza (“grooming”), de levantar (“rearing”) e o número de bolos fecais, por 5 min consecutivos^{65,66}. A iluminação neste modelo foi feita com luz vermelha de 15w.

7. Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

Objetivo:

Investigar se a administração oral do extrato hidroalcoólico de T. diversifolia possui efeito ansiolítico ou ansiogênico.

O LCE foi construído em acrílico transparente, de acordo com as especificações para o teste em camundongos⁶⁷. O aparelho consiste de dois braços abertos opostos (30 x 5 cm) cruzados em ângulo reto com outros dois braços, do mesmo tamanho, cercados por uma parede de acrílico transparente de 15 cm de altura, ao qual se chama braços fechados. O assoalho do aparelho é de acrílico preto. Para evitar a queda dos animais dos braços abertos, uma pequena borda de acrílico transparente (1 cm) foi colocada nos braços abertos. O aparelho fica elevado a 45 cm do nível do chão. Os quatro braços delimitam uma área central de 5 x 5 cm, conhecida como área central. O aparelho era limpo com etanol a 10% e secado, antes de cada animal ser avaliado no teste. Os animais foram testados por 5 min neste aparelho, sob iluminação de luz vermelha de 15w.

Foram registrados os parâmetros convencionais para este método: frequência de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos e fechados, sendo considerada como entrada em um dos braços, quando o animal coloca as quatro patas dentro do respectivo braço⁶⁸. Também foi registrado a frequência total de entradas, a qual foi obtida pela soma das frequências de entradas nos braços abertos e fechados. Para a análise

estatística dos dados e para a elaboração dos gráficos a percentagem de entradas nos braços abertos foi calculada dividindo-se a frequência de entradas nos braços abertos pela frequência total de entradas e este índice foi multiplicado por cem ($[(EA/EA+EF) \times 100]$). Calculou-se também o tempo percentual de permanência nos braços abertos, usando o somatório de tempo de permanência nos braços abertos e fechados ($[(TA/TA+TF) \times 100]$)^{67,69-71}. Drogas e situações ansiolíticas, normalmente, aumentam o tempo de permanência e o número de entradas nos braços abertos, enquanto drogas e situações ansiogênicas aumentam o tempo de permanência e o número de entradas nos braços fechados^{69,71,72}. Além destes parâmetros, para aumentar a sensibilidade deste teste, os parâmetros conhecidos como etológicos também foram observados e registrados, tais como: número de comportamento de estiramento (*stretch attend posture*), imersões de cabeça (*head dipping*), levantamentos (*rearing*), auto-limpeza (*grooming*) e número de bolos fecais⁷³.

8. Convulsões induzidas quimicamente por pentilenotetrazol (PTZ)

Objetivos:

Verificar se a administração oral do extrato hidroalcoólico de T. diversifolia modifica as convulsões causadas pelo pentilenotetrazol (PTZ).

Duas horas após o tratamento com o extrato da planta ou água e 30min após o tratamento com Diazepam, o pentilenotetrazol foi injetado por via intraperitoneal e os animais colocados em caixas plásticas para as observações. O tempo para manifestação da primeira convulsão (latência), a duração, a incidência e a severidade das convulsões foram observadas e registradas até 30 min após a injeção de pentilenotetrazol⁷⁴.

A severidade das convulsões foi avaliada conforme a escala de reatividade convulsiva de Czuczwar & Frey (1986)⁷⁵:

- Nenhum comportamento convulsivo – 0
- Abalos mioclônicos (*myoclonic jerks*) – 1

- Crises clônicas sem perda do reflexo de endireitamento – 2
- Crises clônicas com perda do reflexo postural – 3
- Extensão tônica com morte – 5

As convulsões clônicas se caracterizam por movimentação anormal das orelhas, vibrissas, patas anteriores ou posteriores; todo o corpo em contrações arrítmicas assimétricas e pode ocorrer corrida – “wild running” – do animal na caixa. As convulsões tônicas levam o animal a apresentar uma fase inicial de flexão, seguida por uma fase de extensão característica, podendo levar a morte.

9. Hipertermia causada por estresse modificado por van der Heyden et al. (1997)

Objetivos:

Validar o teste de hipertermia causada por estresse, estabelecendo o efeito ansiolítico do diazepam neste experimento e o tempo para a medida de temperatura após a exposição do animal ao novo ambiente no qual a diferença de temperatura seja estatisticamente significativa.

Camundongos alojados em caixas plásticas (42 x 26 x 15 cm) com 18 – 30 animais por caixa foram individualmente colocados em caixas plásticas (26 x 21 x 14 cm) 24 h antes do teste. No dia do teste, os animais foram tratados com água ou com o extrato da planta por via intragástrica, ou com diazepam (1,5mg/Kg) por via intraperitoneal, e após 2 h do tratamento com água ou extrato da planta ou, 30 min do tratamento com diazepam, a temperatura retal dos animais foi medida (T₁). Logo após a medida de T₁, metade dos animais de cada grupo de tratamento, voltou a caixa em que estava e a outra metade foi colocada em caixas novas, com as mesmas características e dimensões que as caixas-moradia. A temperatura retal de cada camundongo foi novamente medida com intervalos de 15 (T₂), 30 (T₃) e 60 min (T₄) de exposição à nova caixa^{76,77}.

10. Abstinência ao álcool

Objetivo:

*Verificar se o tratamento agudo com o extrato de *T. diversifolia* interfere com a dependência química ao álcool causada pelo tratamento repetido (6 dias, 2X por dia) com álcool etílico.*

Inicialmente, camundongos machos foram tratados, por via oral (intragástrica), com álcool etílico a 10%, 2g/Kg, duas vezes ao dia (09:00h e 17:00h), por seis dias consecutivos³⁴. Outro grupo de camundongos foi tratado com água na mesma frequência e pela mesma via de administração.

No sétimo dia, camundongos *naive*, tratados com água ou com álcool foram utilizados para caracterizar a dependência pelo aumento de locomoção motora proveniente da abstinência, utilizando para isso o modelo do campo aberto.

Também no sétimo dia, foi realizado o tratamento agudo com o extrato bruto de *T. diversifolia* na concentração de 300 mg/Kg, nos grupos previamente tratados com água e álcool durante os seis dias consecutivos. Duas horas após o tratamento com o extrato os grupos foram submetidos ao modelo da hipertermia causada pelo estresse.

11. Tratamento subcrônico com a *T. diversifolia*

O tratamento subcrônico foi realizado administrando três vezes consecutivas o extrato hidroalcoólico de *T. diversifolia* e água, com intervalos de 24, 5 e 2 horas antes do teste experimental, com o objetivo de verificar se o tratamento subcrônico poderia melhorar a farmacocinética da droga, favorecendo a sua ação no SNC. Após o tratamento subcrônico, foram realizados os testes do sono induzido por barbitúrico ou éter etílico, suspensão pela cauda, labirinto em cruz elevado, campo aberto e convulsão induzida por pentilenotetrazol (PTZ).

5 RESULTADOS

Como não foram encontrados dados de literatura acerca dos efeitos da *T. diversifolia* no SNC, utilizou-se o teste de movimentação espontânea em caixas plásticas (42 x 26 x 15 cm), para verificar se havia alteração de comportamento após a administração por via intragástrica do extrato bruto da planta na concentração de 100, 300 e 600 mg/Kg. Após a administração do extrato, os animais foram acompanhados com intervalos de 10 min, com o tempo máximo de observação de 3 h. Nenhuma diferença de comportamento foi observada em nenhum dos tempos de observação para nenhuma das doses usadas. Devido a isso, foram utilizados os modelos clássicos de avaliação da atividade de substâncias no SNC, como segue.

1. Efeito do tratamento agudo do extrato bruto da *T. diversifolia* no Sono Induzido por Barbitúrico

Na Figura 7 estão os resultados deste experimento 2 h após a administração por via oral de água ou de *Tithonia diversifolia* nas concentrações de 100, 300 e 600 mg/Kg e de diazepam (i.p.) a 1,0 mg/Kg (C = 28,0±6,0; TD100 = 30,0±6,1; TD300 = 48,4±5,8; TD600 = 50,9±10,0; DZP = 65,9±8,7). Houve potencialização ($p < 0,05$) da duração do efeito hipnosedativo do pentobarbital nas concentrações de 300 e 600mg/Kg e, como esperado, do diazepam em comparação ao grupo controle.

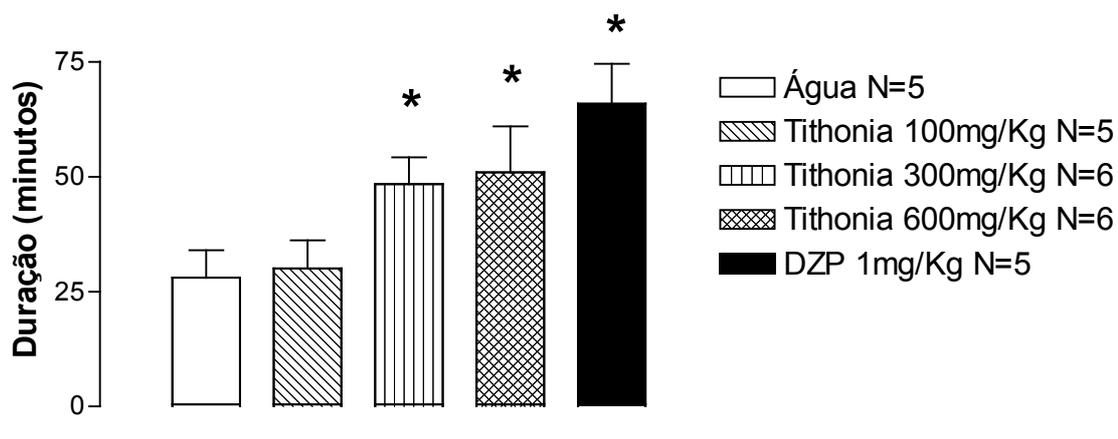


Figura 7 – Efeito do tratamento agudo com *Tithonia diversifolia*, 2 h após sua administração oral, na duração do sono barbitúrico (pentobarbital sódico 50 mg/kg i.p.) avaliado em camundongos fêmeas. A duração do teste foi de no máximo 180 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais os EPM (erros padrões da média). Os asteriscos apontam diferenças significativas em relação aos valores obtidos no grupo controle ($p < 0,05$), usando-se a análise de variância ANOVA seguida do teste Dunnett ou teste “t” de Student (bicaudal não pareado).

A Figura 8 mostra o resultado deste experimento, 3 h após a administração, por via oral de água ou *Tithonia diversifolia* nas concentrações de 100, 300 e 600 mg/Kg, e da administração intraperitoneal de diazepam a 1,0 mg/Kg ($C = 59,5 \pm 6,7$; $TD100 = 68,2 \pm 11,0$; $TD300 = 78,0 \pm 12,4$; $TD600 = 74,2 \pm 16,0$; $DZP = 127,4 \pm 8,1$). Não houve potencialização da duração do efeito hipnosedativo do pentobarbital em comparação ao grupo controle ($p > 0,05$), exceto para a droga padrão, diazepam.

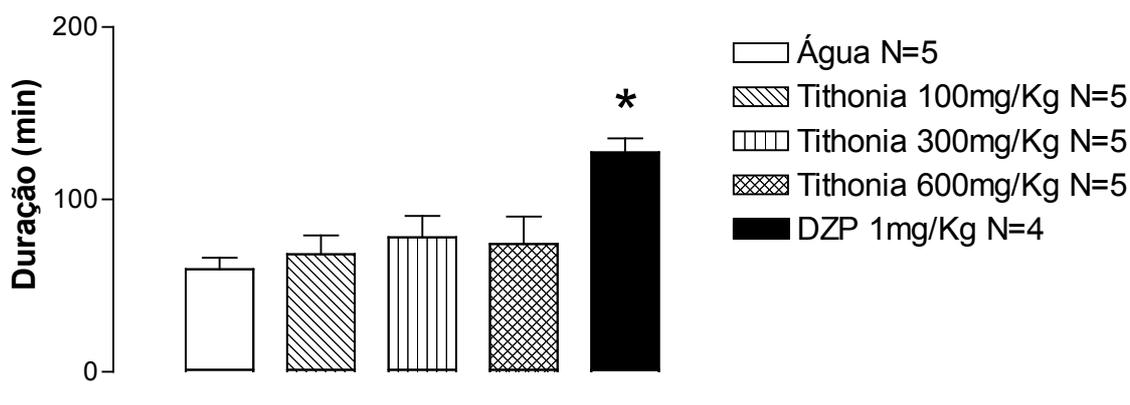


Figura 8 – Efeito do tratamento agudo com *Tithonia diversifolia*, 3 h após sua administração oral, na duração do sono barbitúrico (pentobarbital sódico 50 mg/kg i.p.) avaliado em camundongos fêmeas. A duração do teste foi de no máximo 180 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais os EPM (erros padrões da média). Os asteriscos apontam diferenças significativas em relação aos valores obtidos no grupo controle ($p < 0,05$), usando a análise de variância ANOVA seguida do teste Dunnett ou teste “t” de Student (bicaudal não pareado).

As Tabelas 2 e 3 mostram que o período de latência para início do efeito hipnosedativo não sofreu alteração comparando o grupo controle ($p > 0,05$), diazepam e os grupos de extrato da *T. diversifolia* nas concentrações de 100, 300 e 600mg/Kg, 2 e 3 h após o tratamento com o extrato, respectivamente.

TABELA 2 – Efeito do tratamento com *Tithonia diversifolia* nas concentrações de 100, 300 e 600 mg/Kg, após 2 h da administração por via oral, na latência para o sono barbitúrico (pentobarbital sódico 50 mg/kg i.p.). A duração do teste é de no máximo 180 min. A coluna da latência representa a média dos resultados obtidos mais os EPM (erros padrões da média), utilizando a análise de variância ANOVA seguida do teste Dunnett.

Tratamento	Dose(mg/Kg)	Latência (segundos)
Água	-	240,8 ± 17,9 (N=5)
Tithonia	100	250,6 ± 7,9 (N=5)
Tithonia	300	257,2 ± 18,9 (N=6)
Tithonia	600	224,8 ± 7,0 (N=6)
Diazepam	1	232,2 ± 30,0 (N=5)

TABELA 3 – Efeito do tratamento com *Tithonia diversifolia* nas concentrações de 100, 300 e 600mg/Kg, 3 h após da administração por via oral, na latência para o sono barbitúrico (pentobarbital sódico 50 mg/kg i.p.). A duração do teste é de no máximo 180 min. A coluna da latência representa a média dos resultados obtidos mais os EPM (erros padrões da média) utilizando a análise de variância ANOVA seguida do teste Dunnett.

Tratamento	Dose(mg/Kg)	Latência (segundos)
Água	-	241,4 ± 17,8 (N=5)
Tithonia	100	262,8 ± 49,4 (N=5)
Tithonia	300	213,2 ± 11,3 (N=5)
Tithonia	600	251,6 ± 8,8 (N=5)
Diazepam	1	186,7 ± 13,3 (N=5)

Em função dos dados aqui obtidos, passamos a verificar os possíveis efeitos centrais da *T. diversifolia* 2 h após sua administração oral e na dose efetiva de 300 mg/Kg.

2. Efeito do tratamento agudo do extrato hidroalcoólico da *T. diversifolia* no Sono Induzido por Éter Etilico

A Figura 9 mostra que 2 h após a administração por via oral do extrato bruto da *T. diversifolia* (300 mg/Kg) não houve potencialização da duração do sono induzido pelo éter etílico ($p > 0,05$), em comparação ao grupo controle, o que não confirma uma ação hipnosedativa do extrato da planta. Por outro lado, a administração intraperitoneal de diazepam a 1,0 mg/Kg, o hipnosedativo padrão, potencializou o efeito hipnótico do éter, mostrando a validade do experimento ($p < 0,05$; C = $1,8 \pm 0,2$; TD300 = $1,8 \pm 0,2$; DZP = $3,5 \pm 0,4$).

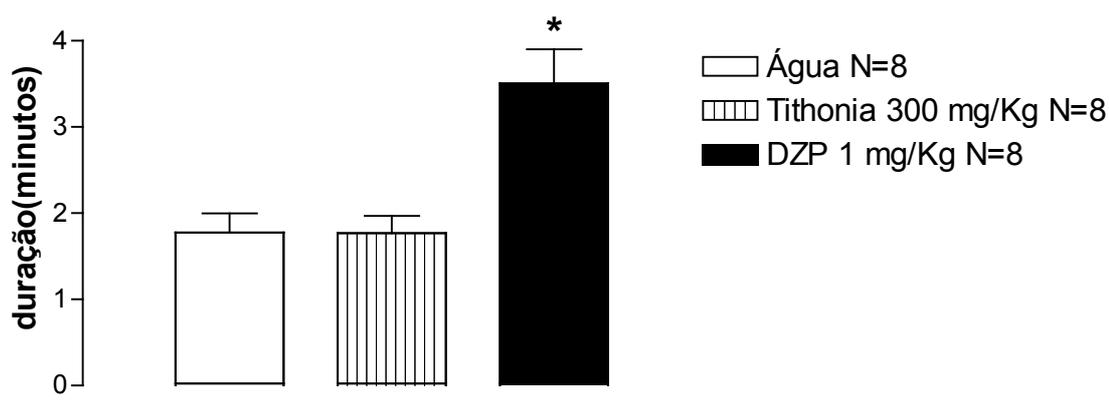


Figura 9 – Efeito do tratamento de *Tithonia diversifolia* (300 mg/Kg), por via oral 2 h após a administração do extrato bruto, na duração do sono etéreo (5 ml/10 min) avaliado em camundongos fêmeas. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais os EPM (erros padrões da média). Os asteriscos apontam diferenças significativas em relação aos valores obtidos nos grupos controle ($p < 0,05$), usando-se a análise de variância ANOVA seguida do teste Dunnett.

A Tabela 4 mostra que 2h após a administração por via oral do extrato bruto da *T. diversifolia*, na concentração de 300 mg/Kg, não houve diferença significativa no tempo de latência para a indução do sono entre os grupos do controle, do extrato e do diazepam a 1,0 mg/Kg ($p > 0,05$).

TABELA 4 – Efeito do tratamento de *Tithonia diversifolia* (300 mg/Kg), 2 h após a administração do extrato, na latência para o sono etéreo (5 ml/10 min). Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais os EPM (erros padrões da média). Foi usada a análise de variância ANOVA seguida do teste Dunnett.

Tratamento	Dose(mg/Kg)	Latência (segundos)
Água	-	130 ± 3,12 (N=8)
Tithonia	300	128,3 ± 5,39 (N=8)
Diazepam	1	117,1 ± 3,16 (N=8)

3. Efeito do tratamento agudo com o extrato de *T. diversifolia* no Teste de subida (“Climbing Behavior”)

A Figura 10 mostra que a administração do extrato de *T. diversifolia* (v.o.), nas concentrações de 100, 300 e 600mg/Kg, não bloqueou de forma estatisticamente significativa a atividade de subir as grades das gaiolas, promovida pela administração de apomorfina (10 mg/Kg i.p.), comparando os grupos tratados ao controle (C = 9,0±3,1; TD100 = 8,6±2,5; TD300 = 8,5±1,9; TD600 = 8,0±2,4), mostrando que o extrato não atua sobre o sistema dopaminérgico ($p>0,05$). O tratamento com haloperidol (1,0 mg/Kg i.p.), antipsicótico padrão, diminui significativamente ($p<0,05$) a intensidade de subida nas grades das gaiolas (EPM = HP = 0,4±0,3), mostrando sua atividade antidopaminérgica, validando o modelo utilizado.

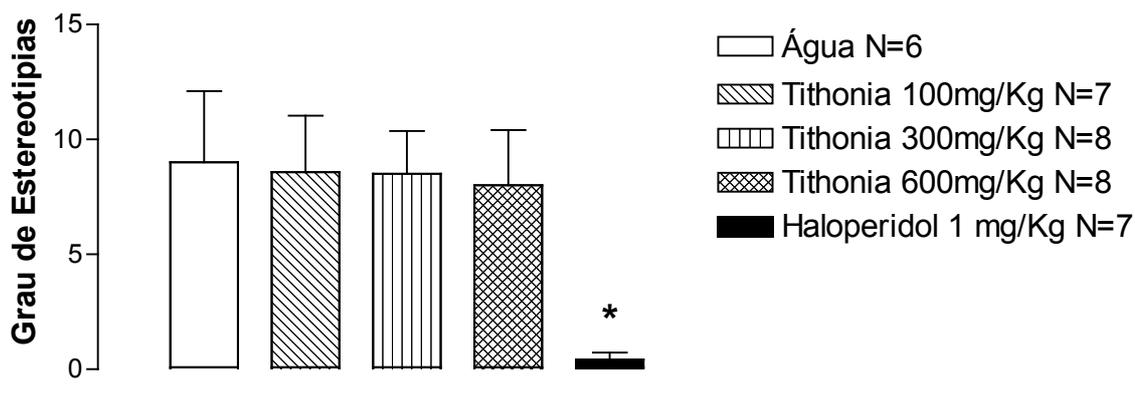


Figura 10 – Efeito do tratamento oral em camundongos fêmeas com extrato de *Tithonia diversifolia* (100, 300 e 600 mg/Kg) no comportamento de subir as grades promovido pelo tratamento i.p. com apomorfina (10mg/Kg). O haloperidol (1mg/Kg, i.p.) foi usado como controle positivo do teste. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais os EPM (erros padrões da média). Os asteriscos apontam diferenças significativas em relação aos valores obtidos no grupo controle ($p<0,05$). Foi utilizada a análise de variância ANOVA seguida do teste Dunnett.

4. Efeito do tratamento oral agudo com a *T. diversifolia* no Teste de Catalepsia (Catatonia)

Na Figura 11 estão os dados referentes ao tratamento agudo com o extrato de *T. diversifolia* (v.o.) nas concentrações de 100, 300 e 600 mg/Kg, mostrando que este extrato não foi capaz de induzir os animais à catatonia, já que a diferença estatística não foi significativa ($p > 0,05$), entre o grupo controle e o grupo tratado com o extrato bruto da *T. diversifolia* (100, 300 e 600mg/Kg). Houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) entre o grupo controle e o grupo tratado com haloperidol a 1mg/Kg (droga padrão, indutora de catalepsia; C=1,25±1,25; TD 100=0,75±0,75; TD 300=1,5±1,5; TD 600=1,0±1,0; HP=47,5±1,4). A Figura 12 mostra que não há diferença significativa entre o grupo controle e os grupos tratados previamente com a água e com a *T. diversifolia* ($p > 0,05$) e posteriormente tratados com haloperidol, isto é, a *T. diversifolia* não foi capaz de bloquear a catatonia induzida pelo haloperidol (C = 54,5±0,9; TD100 = 53,0±2,7; TD300 = 55,8±1,8; TD600 = 55,0±1,9; HP = 54,3±0,3). Os dois resultados mostram que este extrato não possui atividade agonista sobre o sistema dopaminérgico.

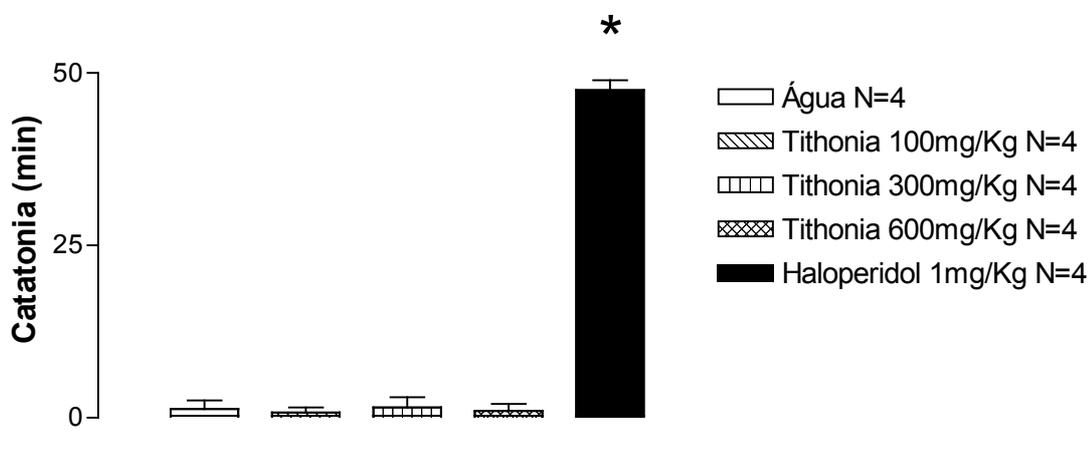


Figura 11 – Efeito do tratamento oral com água, *Tithonia diversifolia* (100, 300 e 600 mg/Kg) ou haloperidol i.p. (1mg/Kg) na duração da catatonia, avaliada em camundongos fêmeas. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais os EPM (erros padrões da média). Os asteriscos apontam diferenças significativas em relação aos valores obtidos no grupo controle ($p < 0,05$). Foi utilizada a análise de variância ANOVA seguida do teste Dunnett.

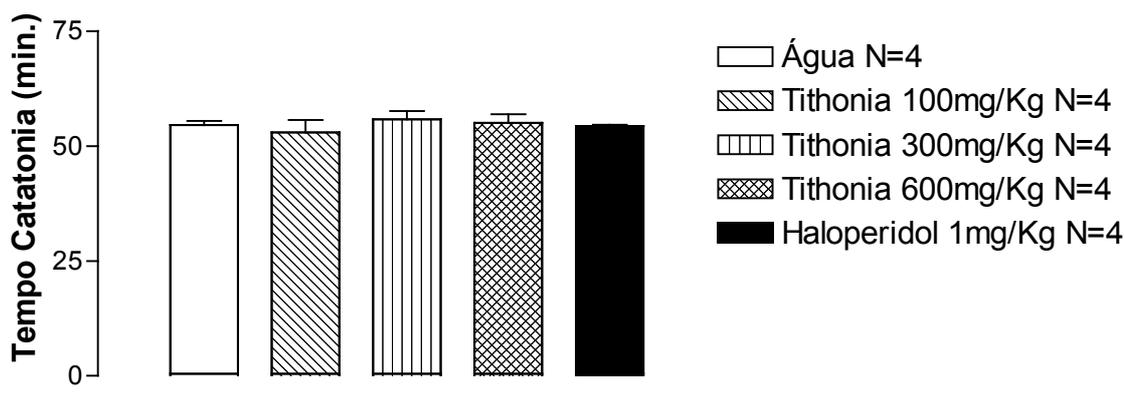


Figura 12 – Efeito do pré-tratamento oral de água ou *Tithonia diversifolia* (100, 300 e 600 mg/Kg) na duração da catatonía promovida pela administração i.p. de haloperidol 1mg/Kg, em camundongos fêmeas. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais os EPM (erros padrões da média). Foi utilizada a análise de variância ANOVA seguida do teste Dunnett.

5. Efeito do tratamento agudo com o extrato de *T. diversifolia* no Teste da Suspensão pela Cauda (“Tail Suspension Test”)

Os resultados da Figura 13 mostram que a administração aguda do extrato de *T. diversifolia* (v.o.), nas concentrações de 100, 300 e 600 mg/Kg, não apresentou diferenças estatísticas significantes com relação ao grupo controle ($p > 0,05$; C = $145,0 \pm 20,6$; TD100 = $138,6 \pm 14,9$; TD300 = $148,1 \pm 11,6$; TD600 = $155,4 \pm 15,9$) na duração (tempo) da imobilidade tratado com Imipramina, antidepressivo padrão, o que validou o modelo utilizado ($p < 0,05$; IMI = $72,6 \pm 13,0$).

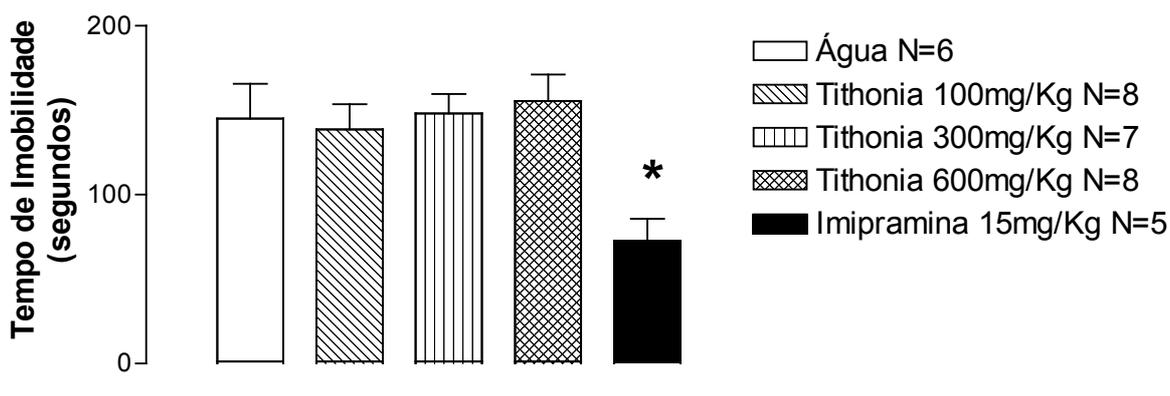


Figura 13 – Efeito do tratamento oral com água ou *Tithonia diversifolia* (100, 300 e 600 mg/Kg) e da administração i.p. de imipramina a 15mg/Kg no tempo de imobilidade registrado no teste de suspensão pela cauda em camundongos fêmeas. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais os EPM (erros padrões da média). Os asteriscos apontam diferenças significativas em relação aos valores obtidos nos grupos controle ($p < 0,05$) utilizando a análise de variância ANOVA seguida do teste Dunnett.

6. Efeito do tratamento agudo com o extrato de *T. diversifolia* após no teste do Campo Aberto (CA) ou “Open Field”

Os dados apresentados na Figura 14 mostram que a administração do extrato de *T. diversifolia*, nas concentrações de 100, 300 e 600 mg/Kg, não promoveu diferenças estatísticas significantes na movimentação espontânea dos animais registrada no campo aberto, quando comparado ao grupo controle ($p > 0,05$; C = $53,0 \pm 9,4$; TD100 = $57,5 \pm 5,8$; TD300 = $59,3 \pm 4,0$; TD600 = $63,7 \pm 2,9$). O grupo tratado com o diazepam mostrou um aumento significativo da movimentação espontânea dos animais no campo aberto ($p < 0,05$; DZP = $117,0 \pm 15,0$), validando o teste.

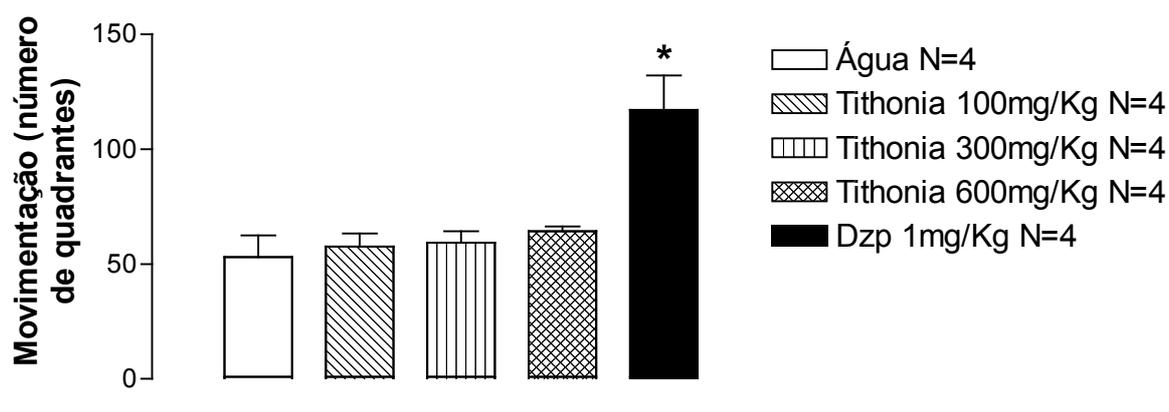


Figura 14 – Efeito do tratamento oral com água ou *Tithonia diversifolia* (100, 300 e 600 mg/Kg) e da administração i.p. de diazepam (1mg/Kg) na movimentação espontânea dos camundongos machos, registrada no campo-aberto. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais os EPM (erros padrões da média). Os asteriscos apontam diferenças significativas em relação aos valores obtidos nos grupos controle ($p < 0,05$). Foi utilizada a análise de variância ANOVA seguida do teste Dunnett.

A tabela 5 mostra os resultados de outro parâmetro da atividade exploratória, o comportamento de levantar (*rearing*), no qual não houve diferença estatística significativa ($p > 0,05$) entre o grupo controle e os tratados com o extrato de *T. diversifolia* nas concentrações de 100, 300 e 600mg/Kg.

TABELA 5 – Efeito do tratamento oral agudo com o extrato de *Tithonia diversifolia*, 2 h após a sua administração, na atividade vertical de camundongos avaliada no campo-aberto. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos mais os EPM (erros padrões da média). Foi utilizada a análise de variância ANOVA seguida do teste Dunnett.

Tratamento	Dose(mg/Kg)	Levantar (número)
Água	-	22,3 ± 5,5 (N=4)
Tithonia	100	23,5 ± 10,0 (N=4)
Tithonia	300	21,3 ± 4,0 (N=4)
Tithonia	600	27,7 ± 5,3 (N=4)
Diazepam	1	30,2 ± 3,9 (N=4)

7. Efeito do tratamento oral agudo com o extrato de *T. diversifolia* no Teste de Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

A Figura 15 mostra que a administração do extrato de *T. diversifolia* por via oral, nas concentrações de 100, 300 e 600 mg/Kg, não modificou significativamente a frequência de entradas nos braços abertos (A) ($p > 0,05$; C = $16,8 \pm 6,5$; TD100 = $7,1 \pm 4,1$; TD300 = $0,0 \pm 0,0$; TD600 = $12,4 \pm 5,5$) e o tempo de permanência dos animais nestes braços (B) ($p > 0,05$; EPM= C= $5,0 \pm 3,0$; TD100 = $1,3 \pm 0,9$; TD300 = $0,0 \pm 0,0$; TD600 = $4,0 \pm 1,4$) do LCE. Houve diferença estatística significativa ($p < 0,001$) entre o grupo controle e o grupo em que foi administrado com o diazepam 1mg/Kg, tanto aumentando a frequência de entradas nos braços abertos (DZP = $63,2 \pm 2,8$) quanto o tempo de permanência nestes braços (DZP = $72,8 \pm 1,9$), como esperado para ansiolíticos, mostrando a validade do experimento.

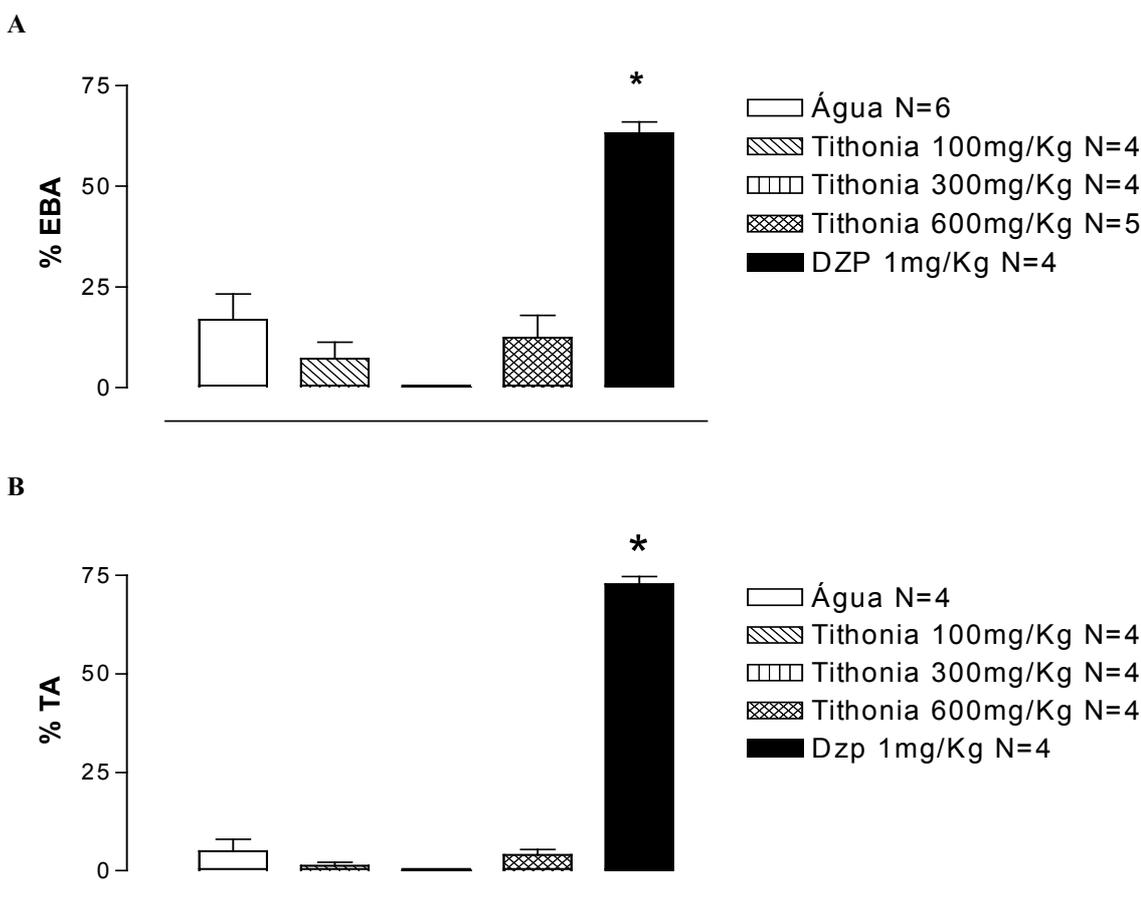


Figura 15 – Efeito do tratamento oral com o extrato de *Tithonia diversifolia* e i.p. de diazepam 1mg/Kg, em camundongos machos, na frequência de entradas (A) e no tempo de permanência (B) nos braços abertos do LCE. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais os EPM (erros padrões da média). Os asteriscos apontam diferenças significativas em relação aos valores obtidos nos grupos controle ($p < 0,05$). Foi utilizada a análise de variância ANOVA seguida do teste Dunnett.

Na tabela 6 estão os resultados referentes aos parâmetros etológicos: número de estiramentos (*stretch attend posture*, SAP) e imersões de cabeça (*head dipping*, HD). A análise estatística destes parâmetros mostra que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) com a administração oral do extrato de *T. diversifolia* e que houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre o grupo controle e o diazepam, que diminuiu significativamente o número de estiramentos e aumentou o número de imersões de cabeça.

TABELA 6 – Efeito do tratamento oral com o extrato de *Tithonia diversifolia* e i.p. de diazepam 1mg/Kg, no número de estiramentos e imersões de cabeça no LCE. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e os EPM. Foi utilizada a análise de variância ANOVA seguida do teste Dunnett.

Tratamento	Dose(mg/Kg)	SAP (número)	HD (número)
Água	-	28,0 ± 3,5 (N=6)	2,5 ± 0,5 (N=6)
Tithonia	100	27,8 ± 6,3 (N=4)	3,0 ± 1,0 (N=4)
Tithonia	300	22,8 ± 6,3 (N=4)	3,8 ± 0,5 (N=4)
Tithonia	600	23,5 ± 0,6 (N=5)	2,8 ± 0,8 (N=5)
Diazepam	1	6,3 ± 1,5 (N=4)	31,3 ± 1,5 (N=4)

8. Efeito do tratamento oral agudo com *T. diversifolia* no teste de convulsões induzidas quimicamente por pentilenotetrazol (PTZ)

A tabela 7 mostra os resultados da administração oral com o extrato de *T. diversifolia* (300 mg/Kg) e da administração i.p. de diazepam 1,0 mg/Kg nas convulsões induzidas pelo PTZ (75mg/Kg). Nesta figura verificamos que não houve diferença estatística significativa ($p > 0,05$) do grupo controle e do grupo de *T. diversifolia* quanto: ao tempo de latência para a primeira convulsão e a duração da primeira convulsão. Na Figura 16 está apresentada a severidade das convulsões em uma hora de observação dos animais, após tratamento i.p. de PTZ. A administração de diazepam (i.p.) diminuiu de maneira significativa ($p < 0,05$) a latência, duração da primeira convulsão, o número de convulsões e a severidade de

convulsões ($C = 37,4 \pm 6,4$; $TD300 = 37,0 \pm 7,7$; $DZP = 0,0 \pm 0,0$), comparado ao grupo controle, após o tratamento i.p. de PTZ, como esperado.

TABELA 7 – Efeito do tratamento oral com o extrato de *Tithonia diversifolia* mg/Kg e da administração i.p. de diazepam 1mg/Kg, em camundongos machos, na latência (s) para início das convulsões e duração da primeira convulsão, induzidas por pentilenotetrazol (PTZ 75 mg/Kg i.p.). Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e os EPM (erros padrões da média). Foi utilizada a análise de variância ANOVA seguida do teste Dunnett.

Tratamento	Dose(mg/Kg)	Latência (segundos)	Duração 1ª convulsão (segundos)
Água	-	$68,5 \pm 9,3$ (N=6)	$12,3 \pm 2,3$ (N=6)
Tithonia	300	$61,6 \pm 3,6$ (N=8)	$14,4 \pm 2,9$ (N=8)
Diazepam	1	$0,0 \pm 0,0$ (N=4)	$0,0 \pm 0,0$ (N=4)

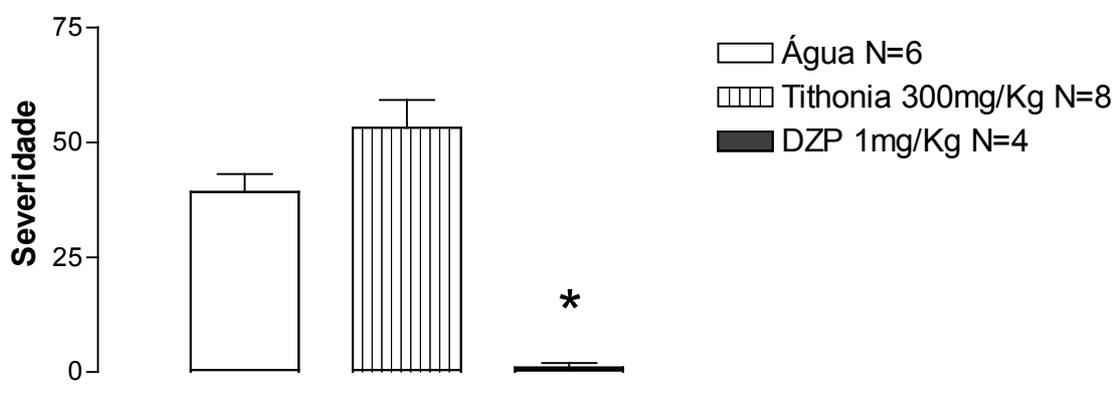
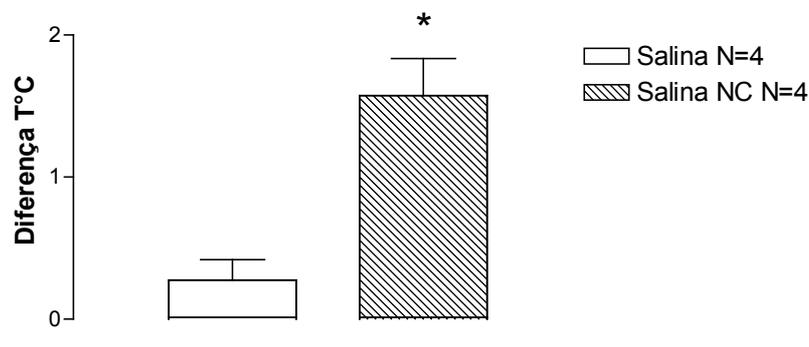


Figura 16 – Efeito do tratamento oral com o extrato de *Tithonia diversifolia* (300 mg/Kg) e administração i.p. de diazepam a 1mg/Kg, em camundongos machos, na severidade das convulsões induzidas por pentilenotetrazol (75 mg/Kg, i.p.). Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais os EPM (erros padrões da média). Os asteriscos apontam diferenças significativas em relação aos valores obtidos nos grupos controle ($p < 0,05$). Foi utilizada a análise de variância ANOVA seguida do teste Dunnett.

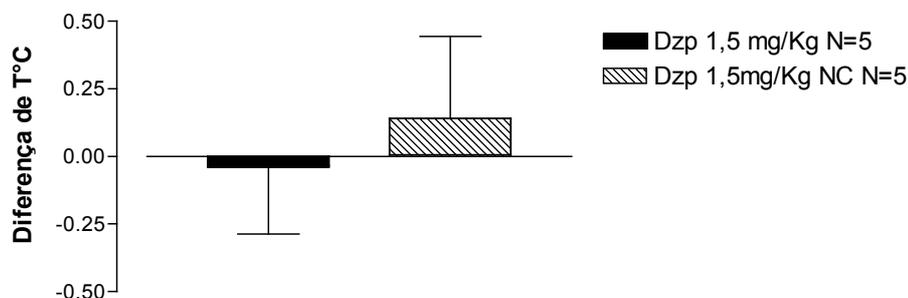
9. Validação do teste de hipertermia causada por estresse – Efeito do pré-tratamento com diazepam

A Figura 17 mostra o efeito do tratamento dos camundongos machos com salina ou diazepam 1,5mg/Kg, i.p., após 15 min de exposição ou não ao novo ambiente, na temperatura retal dos animais. A) Mostra que o grupo tratado com salina apresentou hipertermia significativa ($p < 0,05$) após a exposição a um novo ambiente (NC; $0,27 \pm 0,14$; $1,58 \pm 0,26$), quando comparado ao grupo controle que não foi exposto a um novo ambiente; B) mostra que o grupo tratado com diazepam não apresentou diferença de temperatura estatisticamente significante ($p > 0,05$) após a exposição a um novo ambiente (NC), quando comparado ao grupo de diazepam 1,5 mg/Kg que não foi exposto ao novo ambiente ($-0,04 \pm 0,25$; $0,14 \pm 0,30$); C) mostra que houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre o grupo controle e o grupo tratado com diazepam 1,5 mg/Kg após a exposição a um novo ambiente (NC; $1,4 \pm 0,2$; $0,1 \pm 0,3$).

A



B



C

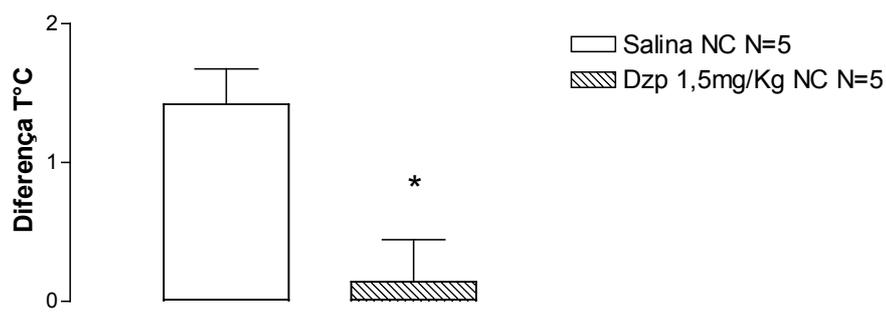


Figura 17 – **A** - Temperatura corporal de camundongos machos, do grupo controle (NaCl 0,9% i.p.), 15 min após a exposição a um novo ambiente (NC). **B** - Efeito do tratamento i.p. com diazepam 1,5 mg/Kg na temperatura corporal de camundongos machos, 15 min após a exposição a um novo ambiente (NC). **C** - Temperatura corporal de camundongos machos após o tratamento i.p. com salina ou diazepam 1,5 mg/Kg 15 min após a exposição a um novo ambiente (NC). Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais os EPM (erros padrões da média). Os asteriscos apontam diferenças significativas em relação aos valores obtidos nos grupos controle ($p < 0,05$) utilizando o teste *t* de Student não pareado bicaudal.

A Figura 18 mostra que, 15 e 30 min após a exposição ao novo ambiente (NC), o grupo experimental apresentou hipertemia ($p < 0,05$), quando comparado ao grupo controle. A mesma figura também mostra que, após 60 min, não houve diferença significativa no grupo exposto ao novo ambiente em relação ao grupo controle (EPM = $0,45 \pm 0,3$; $1,4 \pm 0,2$; $1,4 \pm 0,3$; $0,6 \pm 0,3$).

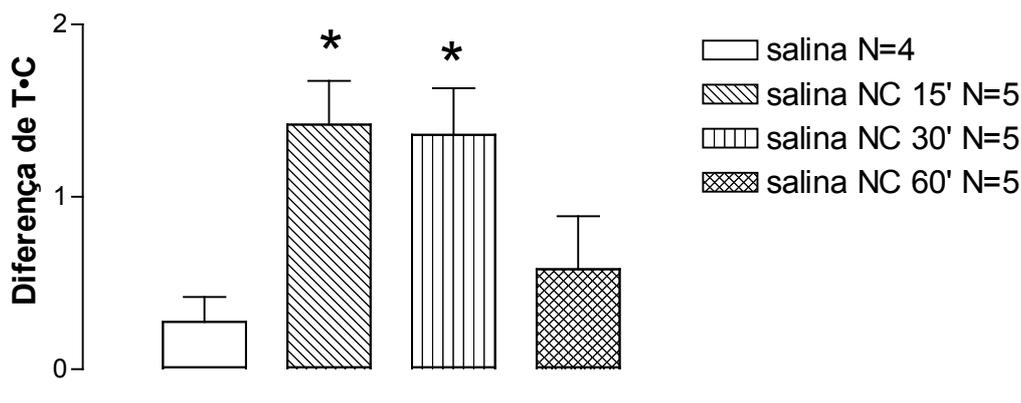


Figura 18 – Temperatura corporal de camundongos machos após a exposição a um novo ambiente (NC). Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais os EPM (erros padrões da média). Os asteriscos apontam diferenças significativas em relação aos valores obtidos nos grupos controle ($p < 0,05$), utilizando-se a análise de variância ANOVA seguida do teste Dunnett.

A Figura 19 mostra que não houve diferença significativa de temperatura corporal ($p > 0,05$) entre o grupo tratado com diazepam i.p. a $1,5 \text{ mg/Kg}$ após a exposição ao novo ambiente (NC; 15, 30 e 60 min), em relação ao grupo controle (não exposto a um ambiente novo; DZP = $-0,04 \pm 0,25$; DZP NC 15' = $0,14 \pm 0,30$; DZP NC 30' = $0,56 \pm 0,16$; DZP NC 60' = $0,34 \pm 0,22$).

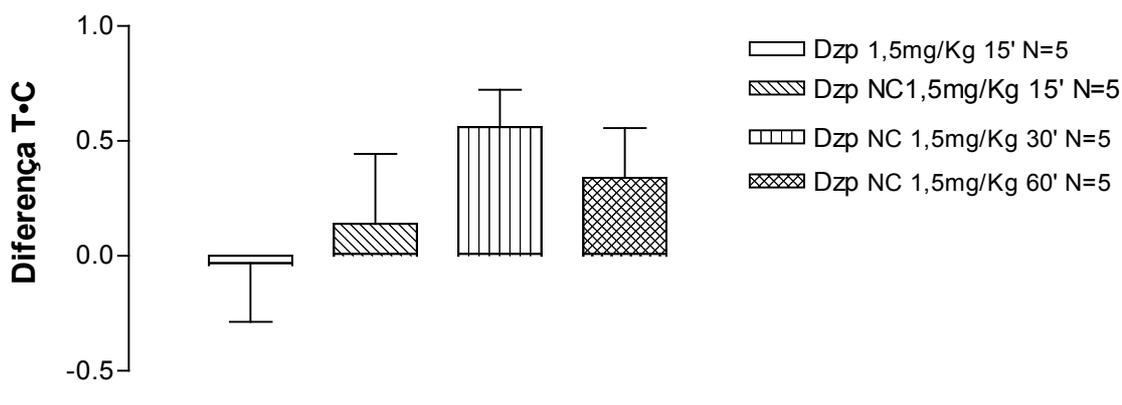


Figura 19 – Efeito do tratamento i.p. com diazepam (1,5mg/Kg) na temperatura corporal de camundongos machos expostos a um novo ambiente (NC). Cada coluna representa a média dos resultados obtidos, e as barras verticais os EPM (erros padrões da média; análise de variância ANOVA, seguida do teste Dunnett).

Na Figura 20 estão os resultados da análise estatística relacionando o grupo controle 15 min após a exposição ao novo ambiente, aos grupos que foram administrados via i.p. com diazepam 1,5mg/Kg. Estes resultados mostram que a diferença de temperatura após 15 min de exposição ao novo ambiente em relação à temperatura inicial foi significativamente maior ($p < 0,05$) no grupo controle, do que a diferença de temperatura nos grupos pré-tratados com diazepam (EPM = C = $1,42 \pm 0,25$; DZP NC 15' = $0,14 \pm 0,30$; DZP NC 30' = $0,56 \pm 0,16$; DZP NC 60' = $0,34 \pm 0,22$).

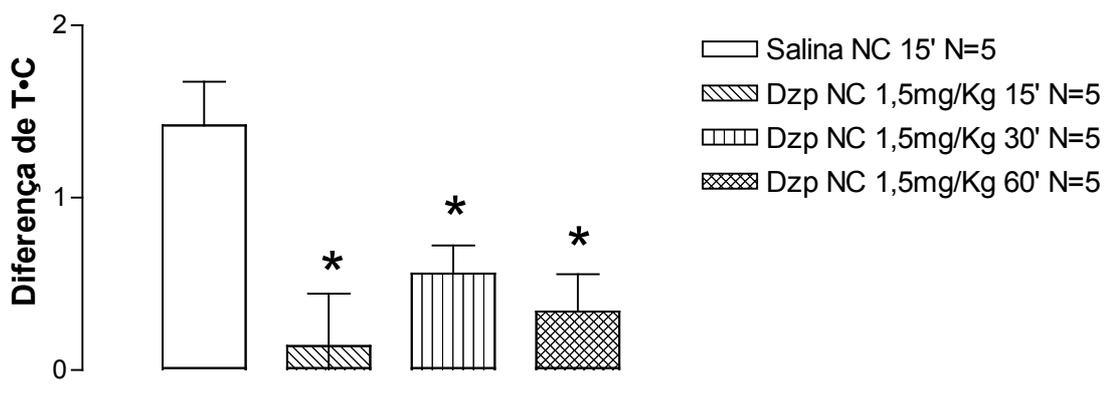


Figura 20 – Efeito do tratamento i.p. com diazepam 1,5mg/Kg na temperatura corporal de camundongos machos, expostos a um novo ambiente (NC). Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais os EPM (erros padrões da média). Os asteriscos apontam diferenças significativas em relação aos valores obtidos nos grupos controle ($p < 0,05$), utilizando a análise de variância ANOVA seguida do teste Dunnett.

10. Efeito de abstinência após tratamento com álcool utilizando o modelo de campo aberto.

A Figura 21 mostra que houve um aumento significativo na movimentação espontânea dos animais no campo aberto, no grupo tratado via oral com álcool a 10% (2g/Kg), em comparação com o grupo controle, tratados com água durante o mesmo período de tratamento, e o grupo *naive*, sendo a diferença estatisticamente relevante ($p < 0,001$; $C = 63,8 \pm 2,5$; $N = 59,8 \pm 4,6$; Álcool = $99,3 \pm 4,6$).

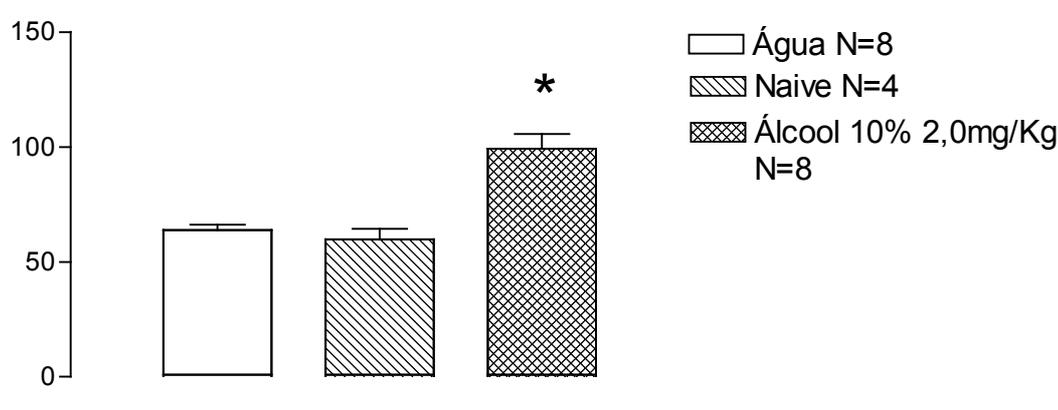


Figura 21 – Efeito do tratamento v.o. com álcool a 10% (2g/Kg) na movimentação espontânea de camundongos machos, tratados durante seis dias, duas vezes ao dia. A duração do experimento foi de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais os EPM (erros padrões da média). Os asteriscos apontam diferenças significativas em relação aos valores obtidos nos grupos controle ($p < 0,05$) Foi utilizada a análise de variância ANOVA seguida do teste Dunnett.

11. Avaliação do tratamento com o extrato de *Tithonia diversifolia* na abstinência ao álcool usando o modelo de hipertermia causada por estresse

O resultado do grupo controle (água) abstinente ao álcool está mostrado na Figura 22 A, mostrando um aumento na temperatura retal do grupo exposto (NC) em relação ao não exposto a um novo ambiente ($p < 0,0001$; $C = 0,25 \pm 0,10$; $NC = 1,35 \pm 0,05$), já o tratamento i.p. com diazepam (1,5mg/Kg) impediu a hipertermia produzida pelo novo ambiente ($C = 0,28 \pm 0,8$; $NC = 0,25 \pm 0,09$; Figura 22 B), enquanto o tratamento com o extrato bruto de *T. diversifolia* (300mg/Kg v.o.) não alterou a hipertermia induzida pelo estresse da exposição ao novo ambiente ($C = 0,55 \pm 0,06$; $NC = 1,27 \pm 0,14$; Figura 22 C).

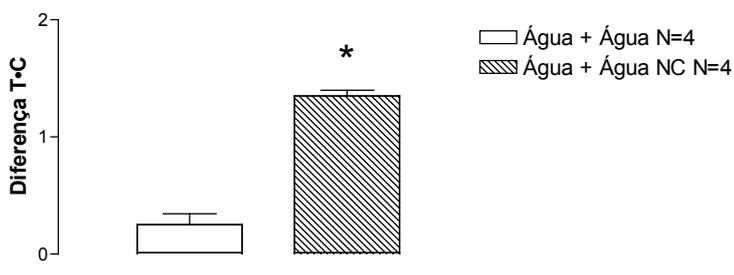
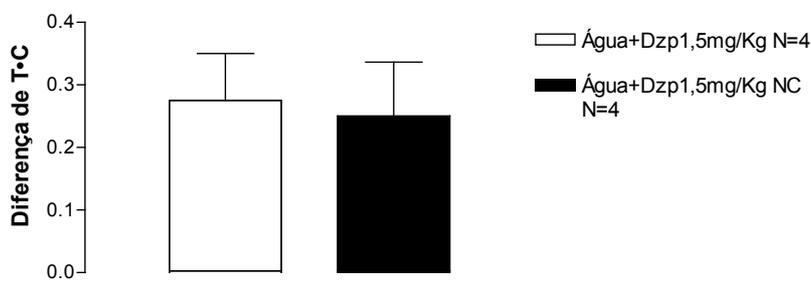
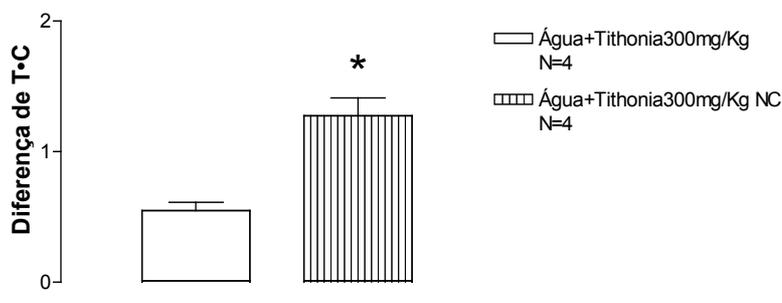
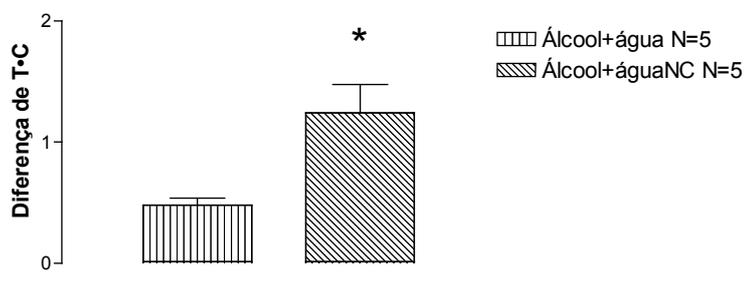
A**B****C**

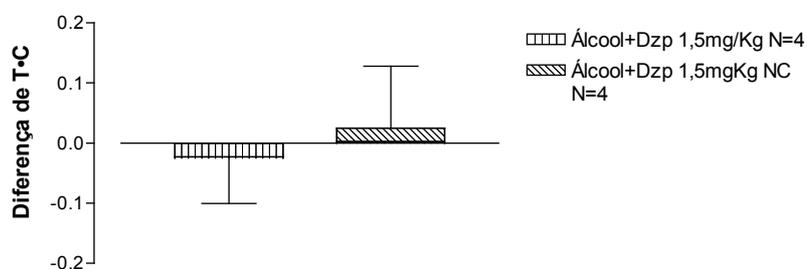
Figura 22 – **A** - Efeito do tratamento oral com água (grupo controle) na temperatura corporal durante a abstinência ao álcool em camundongos machos não expostos e expostos ao novo ambiente (NC). **B** - Efeito do tratamento i.p. de camundongos machos, com diazepam 1,5mg/Kg na temperatura corporal do grupo controle abstinente ao álcool não exposto e no exposto ao novo ambiente (NC). **C** - Efeito do tratamento oral de camundongos machos, com *T. diversifolia* 300mg/Kg na temperatura corporal do grupo controle abstinente ao álcool não exposto e no exposto ao novo ambiente (NC). O tempo de exposição ao novo ambiente foi de 15 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais os EPM (erros padrões da média). Os asteriscos apontam diferenças significativas em relação aos valores obtidos nos grupos controle ($p < 0,0001$; teste *t* de Student bicaudal não pareado).

A Figura 23A mostra a análise estatística dos resultados referentes ao tratamento com água do grupo abstinente ao álcool exposto ao novo ambiente (NC) e os animais do mesmo grupo que não foram expostos ao novo ambiente, mostrando que a exposição ao novo ambiente promove hipertermia ($p < 0,05$; C= $0,48 \pm 0,06$; NC= $1,24 \pm 0,24$). Em contraste, o grupo tratado com diazepam e, exposto a um novo ambiente ($0,03 \pm 0,10$) não diferiu estatisticamente do respectivo grupo abstinente não exposto ($0,03 \pm 0,08$; $p > 0,05$; Figura 23B). O tratamento oral agudo com *T. diversifolia* não alterou a diferença de temperatura observada entre o grupo abstinente ao álcool (10%, 2g/Kg) exposto (NC; $0,29 \pm 0,10$) e o não exposto ($1,04 \pm 0,19$) ao novo ambiente ($p < 0,05$; Figura 23C).

A



B



C

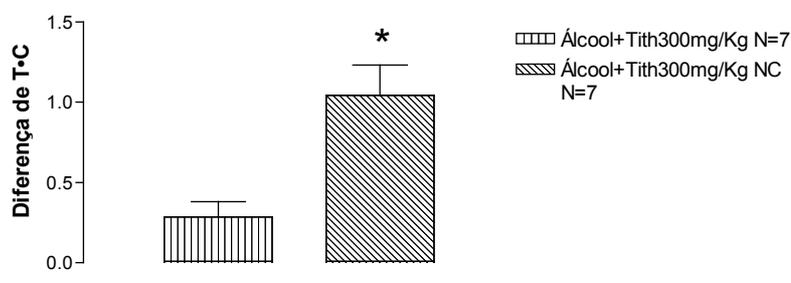


Figura 23 – **A** - Efeito do tratamento oral de camundongos machos, com água no grupo abstínente ao álcool não exposto e o exposto ao novo ambiente (NC). **B** - Efeito do tratamento i.p. de camundongos machos, com diazepam 1,5 mg/Kg no grupo abstínente ao álcool não exposto e o exposto ao novo ambiente (NC). **C** - Efeito do tratamento oral de camundongos machos, com *T. diversifolia* no grupo abstínente ao álcool não exposto e exposto ao novo ambiente (NC), O tempo de exposição ao novo ambiente foi de 15 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais os EPM (erros padrões da média). Os asteriscos apontam diferenças significativas em relação aos valores obtidos nos grupos controle ($p < 0,05$; teste *t* de Student bicaudal não pareado).

A Figura 24 mostra os resultados do grupo controle abstinente ao álcool, após a exposição ao novo ambiente, comparado com o grupo controle (salina) não exposto ao novo ambiente, pertencente à validação do modelo de hipertermia (fig.17A), com o grupo abstinente tratado com água, com o extrato bruto de *T. diversifolia* 300mg/Kg (p.o) e com diazepam 1,5mg/Kg (i.p.), expostos ao novo ambiente. Houve diferença significativa ($p<0,001$) entre o grupo controle e o grupo abstinente tratado com diazepam 1,5mg/Kg ($0,13\pm0,20$), mas não entre o grupo controle e os grupos abstinentes tratados com água ou com o extrato da *T. diversifolia* ($C = 1,35\pm0,05$; Álcool+H₂O = $1,24\pm0,24$; Álcool+TD300 = $1,04\pm0,19$).

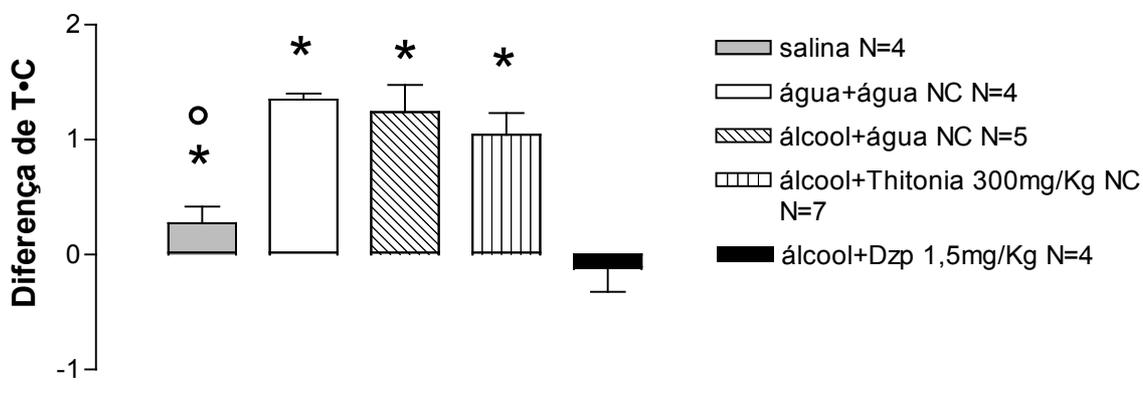


Figura 24 – Efeito do tratamento oral com água, com o extrato bruto de *T. diversifolia* 300mg/Kg e i.p. com diazepam 1,5mg/Kg na temperatura corporal de camundongos machos abstinentes ao álcool e expostos ao novo ambiente. O grupo tratado com salina (O) representa o grupo controle da validação do experimento. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais os EPM (erros padrões da média). Os asteriscos apontam diferenças significativas em relação aos valores obtidos nos grupos controle ($p<0,05$; análise de variância ANOVA, seguida do teste Dunnett).

12. Efeito do tratamento subcrônico com o extrato da *T. diversifolia* no sono induzido por barbitúrico

A Tabela 8 mostra os resultados referentes à análise da latência (segundos) para o início do sono induzido pelo barbitúrico, após o tratamento oral subcrônico com água e com extrato de *T. diversifolia* 300mg/Kg, e também o tratamento i.p. com diazepam 1,0mg/Kg., onde não se observou diferença estatística significativa em relação ao grupo controle ($p<0,05$).

TABELA 8 – Efeito do tratamento subcrônico oral com *T. diversifolia* 300 mg/Kg na latência para a indução de sono pelo pentobarbital 50 mg/kg i.p. Os dados são representados pela média dos resultados obtidos mais os EPM (erros padrões da média) usando-se a análise de variância ANOVA, teste Dunnett e o teste *t* de Student (bicaudal não pareado). Foram usados camundongos machos.

Tratamento	Dose(mg/Kg)	Latência (segundos)
Água	-	233,4 ± 0,001 (N=6)
Tithonia	300	113,5 ± 0,001 (N=8)
Diazepam	1	164,3 ± 0,001 (N=4)

A Figura 25 mostra que tanto a administração via oral subcrônica do extrato bruto de *T. diversifolia* 300 mg/Kg, quanto o tratamento intraperitoneal com diazepam 1,0 mg/Kg potencializaram significativamente ($p < 0,05$) a duração do sono induzido pelo pentobarbital 50mg/Kg (i.p.), quando comparado ao grupo controle (C = 57,5±0,001; TD300 = 113,5±0,001; DZP = 161,3±0,001).

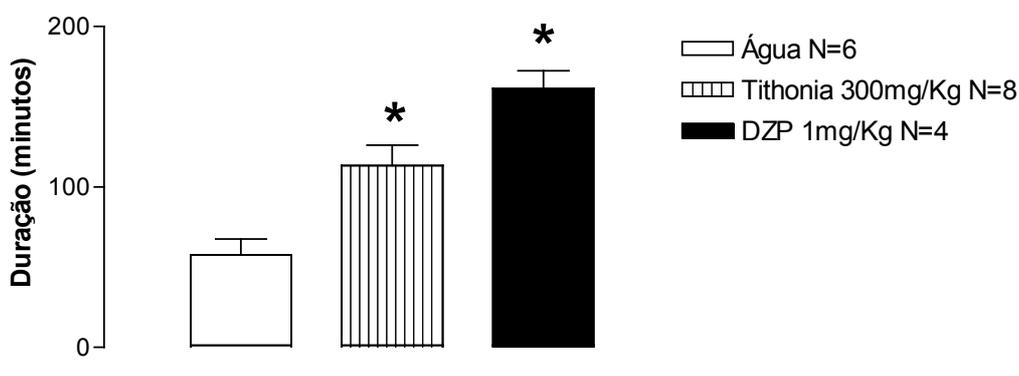


Figura 25 – Efeito do tratamento subcrônico oral de camundongos machos, com o extrato de *Tithonia diversifolia* (300 mg/kg, 3 doses em 24h) na duração do sono pelo pentobarbital sódico (50 mg/kg i.p.). Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais os EPM (erros padrões da média). Os asteriscos apontam diferenças significativas em relação aos valores obtidos no grupo controle ($p < 0,05$), quando comparado ao grupo tratado com o extrato bruto de *T. diversifolia* (300 mg/Kg) e o grupo tratado com o diazepam (1,0 mg/Kg). Foram usadas as análises estatísticas de variância, ANOVA, teste Dunnett e o teste *t* de Student (bicaudal não pareado).

13. Efeito do tratamento subcrônico com o extrato da *T. diversifolia* no sono induzido por éter etílico

A Tabela 9 mostra os resultados referentes à latência (segundos) para o início do sono induzido pelo éter etílico, após o tratamento oral subcrônico com água e com extrato bruto de *T. diversifolia* 300mg/Kg, e o tratamento i.p. com diazepam 1,0mg/Kg, onde não se observou diferença estatística significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

TABELA 9 – Efeito do tratamento subcrônico oral de camundongos machos com *T. diversifolia* 300mg/Kg na latência para indução do sono etéreo. A coluna da latência representa a média dos resultados obtidos mais os EPM (erros padrões da média) ($p > 0,05$), usando-se a análise de variância ANOVA, teste Dunnet e o teste *t* de Student (bicaudal não pareado).

Tratamento	Dose(mg/Kg)	Latência (segundos)
Água	-	139 ± 11,0 (N=4)
Tithonia	300	124,0 ± 5,2 (N=4)
Diazepam	1	114,3 ± 3,7 (N=4)

A Figura 26 mostra que após tratamento subcrônico oral com o extrato da *T. diversifolia*, na concentração de 300 mg/Kg, não houve potencialização da duração do sono induzido pelo éter etílico ($p > 0,05$), em comparação ao grupo controle. A administração intraperitoneal de diazepam a 1,0mg/Kg potencializou o efeito hipnosedativo do éter demonstrando a validade do experimento ($p < 0,05$; C = 2,2±0,5; TD300 = 2,8± 0,1; DZP = 4,0±0,6).

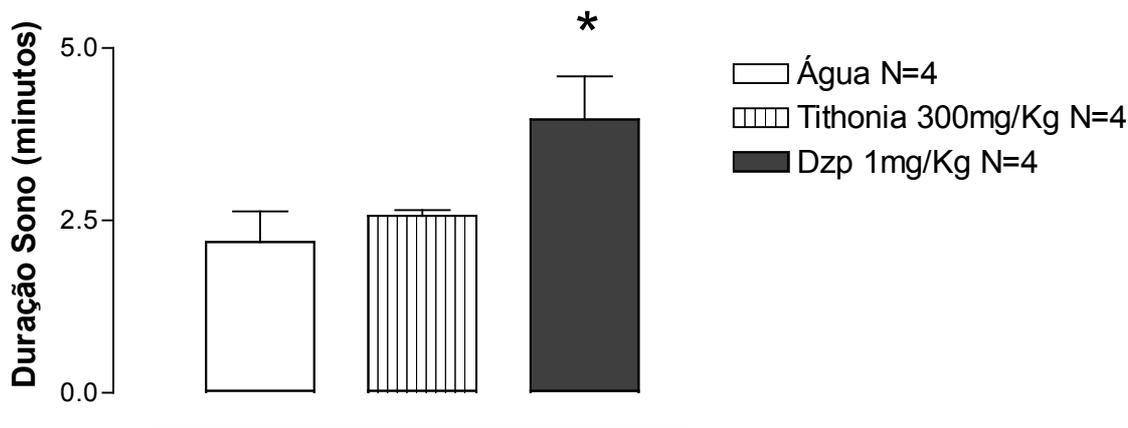


Figura 26 – Efeito do tratamento subcrônico oral com o extrato de *Tithonia diversifolia* na duração sono induzido pelo éter etílico em camundongos machos. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais os EPM (erros padrões da média). O asterisco aponta diferença significativa em relação aos valores obtidos no grupo controle ($p < 0,05$), usando-se a análise de variância ANOVA, teste Dunnett e o teste t de Student (bicaudal não pareado).

14. Efeito do tratamento subcrônico com o extrato de *T. diversifolia* no teste de suspensão pela cauda (“Tail Suspension”)

A Figura 27 mostra os resultados da administração subcrônica de água, de extrato de *T. diversifolia* (v.o.) e imipramina 1,5 mg/Kg (i.p.). A análise estatística do tempo de imobilidade (segundos) não mostrou diferenças significativas entre o grupo controle e o grupo tratado com *T. diversifolia* ($p > 0,05$), em contraste com a redução significativa da imobilidade observada no grupo tratado com a imipramina (C = $138 \pm 5,0$; TD300 = $141,3 \pm 17,7$; IMI = $67,0 \pm 28,1$), como esperado para o antidepressivo padrão.

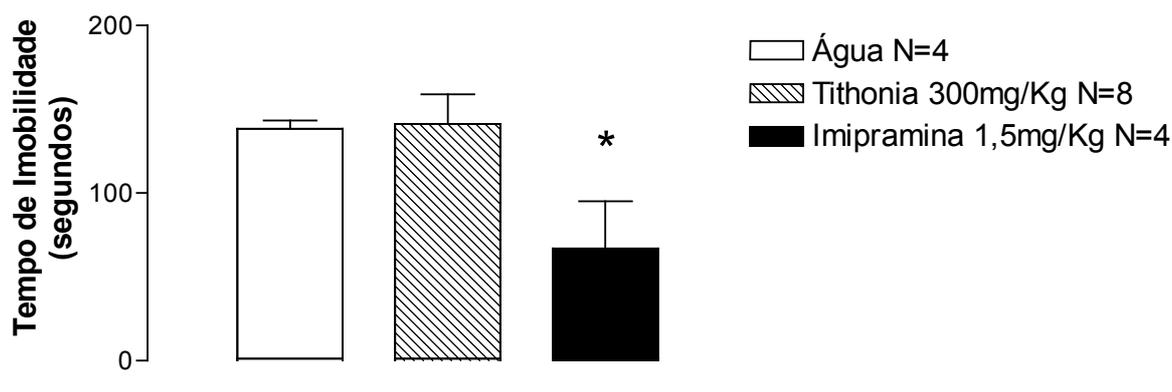


Figura 27 – Efeito do tratamento subcrônico com água ou *Tithonia diversifolia* 300 mg/Kg (v. o) e da administração i.p. de imipramina 15mg/Kg no tempo de imobilidade do teste de suspensão pela cauda, avaliado em camundongos machos. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais os EPM (erros padrões da média). Os asteriscos apontam diferenças significativas em relação aos valores obtidos nos grupos controle ($p < 0,05$; análise de variância ANOVA, seguida do teste Dunnett).

15. Efeito do extrato de *T. diversifolia* após tratamento subcrônico no teste do campo-aberto (CA) ou “Open Field”

Os dados presentes na Figura 28 mostram que a administração subcrônica v.o. do extrato de *T. diversifolia*, na concentração de 300 mg/Kg, não promoveu qualquer diferença estatisticamente significante com relação ao grupo controle ($p > 0,05$; $C = 60,5 \pm 1,3$; $TD300 = 56,3 \pm 5,2$) no que diz respeito à movimentação espontânea dos animais registrada no campo-aberto. O diazepam (1,0 mg/Kg i.p.), por outro lado, aumentou significativamente a movimentação espontânea dos animais no campo aberto ($p < 0,05$; $DZP = 117,5 \pm 14,6$).

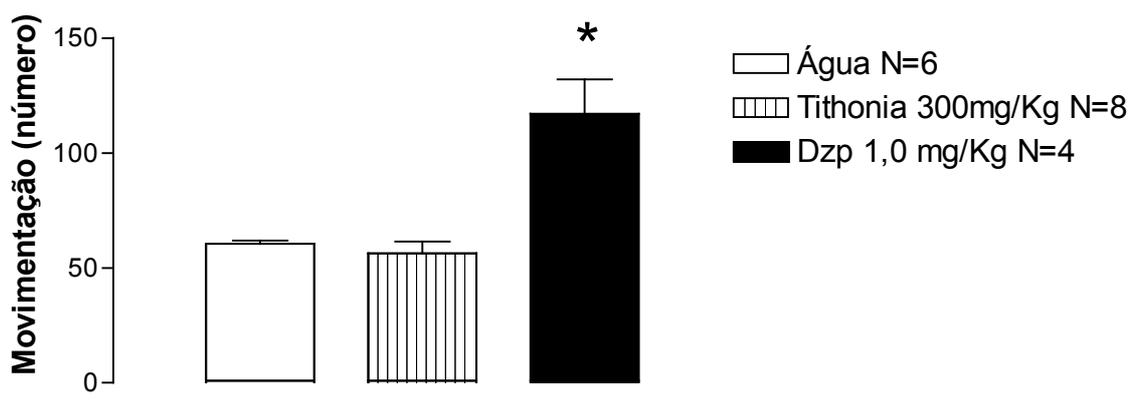
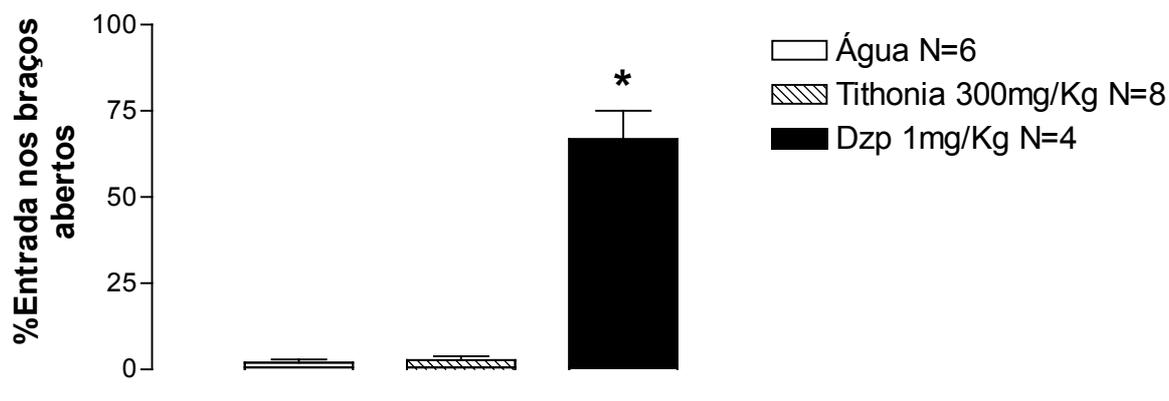


Figura 28 – Efeito do tratamento subcrônico oral de camundongos machos, com água (p.o) ou *T. diversifolia* 300 mg/Kg e da administração i.p. de diazepam 1mg/Kg na moviemntação espontânea de camundongos avaliados no campo-aberto. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais os EPM (erros padrões da média). Os asteriscos apontam diferenças significativas em relação aos valores obtidos nos grupos controle ($p < 0,05$; análise de variância ANOVA, seguida do teste Dunnett).

16. Efeito da *T. diversifolia*, após o tratamento oral subcrônico, no teste de Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

A Figura 29 mostra que a administração subcrônica do extrato de *T. diversifolia* por via oral, na concentração de 300mg/Kg, não modificou significativamente a frequência de entrada nos braços abertos (A; $p > 0,05$; $C = 2,0 \pm 0,9$; TD300 = $2,8 \pm 1,1$) e o tempo de permanência dos animais nos braços abertos (B; $p > 0,05$; $C = 2,2 \pm 1,4$; TD300 = $3,1 \pm 1,6$). O diazepam 1 mg/Kg aumentou de forma significativa a frequência de entradas nos braços abertos ($64,3 \pm 11,1$) e o tempo de permanência nos braços abertos ($72,3 \pm 8,8$), validando o experimento.

A



B

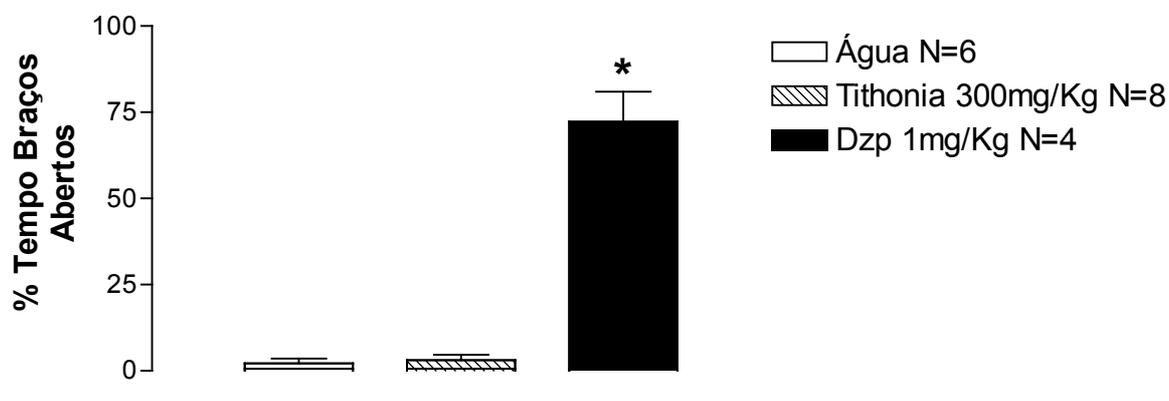


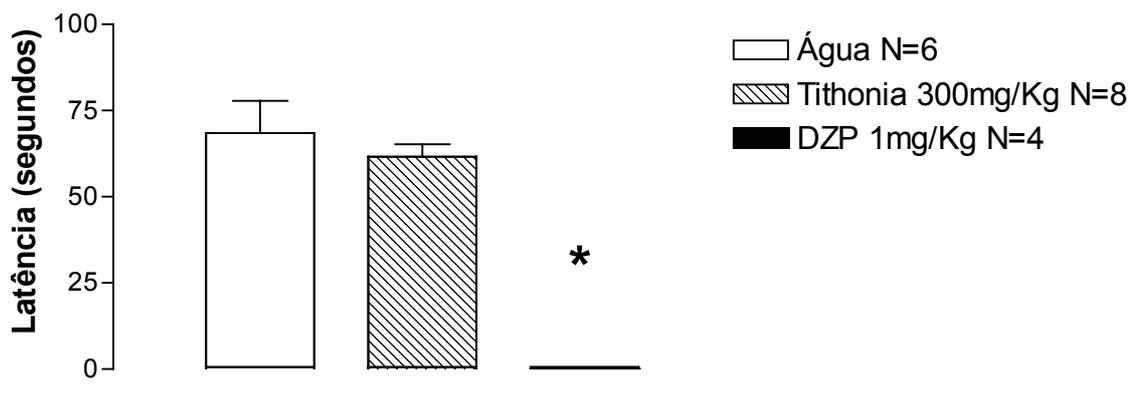
Figura 29 – Efeito do tratamento subcrônico oral com água ou extrato de *T. diversifolia* 300mg/Kg, e da administração i.p. de diazepam 1mg/Kg, em camundongos machos, na frequência de entradas (A) e no tempo de permanência (B) nos braços abertos do LCE. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais os EPM (erros padrões da média). Os asteriscos apontam diferenças significativas em relação aos valores obtidos nos grupos controle ($p < 0,05$; análise de variância ANOVA seguida do teste Dunnett).

17. Efeito do tratamento oral subcrônico com *T. diversifolia* no teste de convulsões induzidas quimicamente pelo Pentilenotetrazol (PTZ)

A Figura 30 mostra os resultados da administração oral subcrônica de água ou extrato de *T. diversifolia* 300 mg/Kg e da administração i.p. de diazepam 1,0 mg/Kg nos parâmetros da convulsão induzida por PTZ. Nesta figura verificamos que não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) do grupo controle e do grupo de *T. diversifolia* quanto:

(A) tempo de latência para a primeira convulsão e (B) severidade das convulsões até uma hora após a administração i.p. de PTZ. A administração de diazepam (i.p.) diminuiu de maneira significativa ($p < 0,05$) o número de convulsões e a severidade de convulsões, comparado ao tratamento com água (controle), como esperado.

A



B

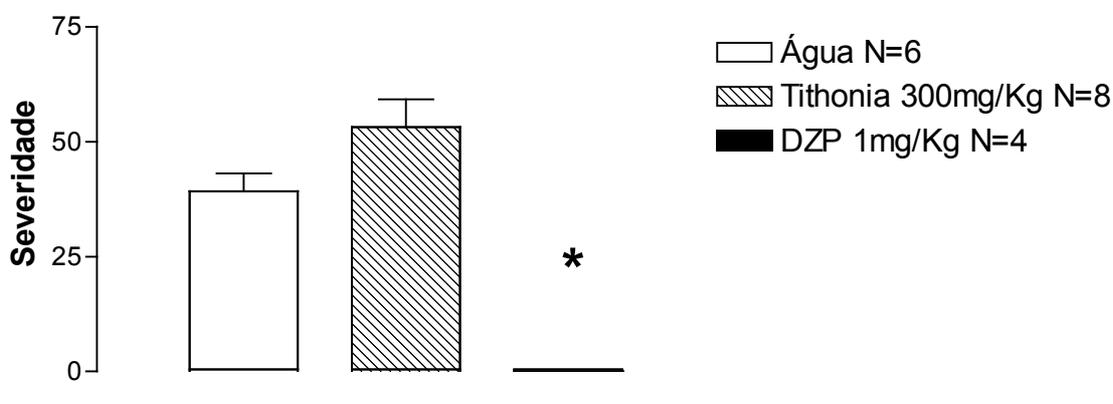


Figura 30 – Efeito do tratamento oral subcrônico com água ou *T. diversifolia* 300 mg/Kg e da administração i.p. de diazepam 1mg/Kg em camundongos machos, na latência para indução da primeira convulsão (A) e na severidade (B) da convulsão induzida por pentilenotetrazol 80 mg/kg i.p.. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e os EPM (erros padrões da média). Foi utilizada a análise de variância ANOVA seguida do teste Dunnett.

6 DISCUSSÃO

O álcool e outras drogas psicotrópicas estão entre as causas de prejuízos à saúde que demandam maior custo público. Este alto custo financeiro e social tem estimulado investimentos em prevenção e tratamento, num grande esforço para reduzir a incidência de abuso de drogas. Uma importante área de pesquisa tem sido a dos aspectos neurobiológicos da adicção. Se este processo puder ser alterado farmacologicamente, a dependência poderá ser efetivamente tratada. No entanto, até o momento não dispomos de drogas específicas, 100% efetivas para o tratamento das dependências químicas, embora a medicina popular, especialmente a chinesa tenha apontado algumas plantas que teriam esta propriedade.

Em Florianópolis encontramos relatos do uso da *T. diversifolia* para o tratamento de dependentes químicos. O uso popular da folha de *T. diversifolia* pelos dependentes químicos é feito quando estes sentem uma vontade incontrolável em utilizar a droga (fissura/*craving*), o que faz parte da síndrome de abstinência a drogas. A explicação neurobiológica para a fissura, assim como para a sensação de prazer induzido pelas drogas psicotrópicas ainda carece de melhor elucidação. Já se sabe que vários sistemas farmacológicos de neurotransmissão estão envolvidos com os processos cerebrais da dependência e abstinência a drogas. Entre eles destacam-se os sistemas dopaminérgico, GABAérgico, noradrenérgico, glutamatérgico, serotoninérgico, opioidérgico e dos canabinóides²⁴. Por isso, neste trabalho foram utilizados modelos experimentais em camundongos que avaliam a possibilidade de ação do extrato de *T. diversifolia* nestes sistemas centrais de neurotransmissão.

Como a utilização popular é a colocação da folha seca triturada na boca, quando o paciente sente vontade de utilizar a droga, o trabalho foi realizado utilizando o extrato hidroalcolico da planta por via oral (intragástrica, mais precisamente) para garantir a quantidade de substância administrada aos animais.

No início dos experimentos, face ao desconhecimento da atividade do extrato bruto de *T. diversifolia* no SNC, uma vez que não se encontrou qualquer referência a esta planta e o sistema em questão na extensa revisão literária feita ao início e ao longo deste trabalho, para

iniciar o *screening* da possível atividade central desta espécie vegetal, foi escolhido o teste do sono induzido por barbitúrico⁶⁰, por ser um teste de fácil realização e que sugere uma ação sobre o receptor GABA, o que aumenta o influxo de Cloro para o interior da célula, hiperpolarizando - a, levando a uma ação inibitória sobre o SNC, o que poderia justificar a utilização desta planta em dependentes químicos. O extrato de *T. diversifolia* (300 e 600mg/Kg) potencializou a duração do sono induzido por pentobarbital, 2 h após o tratamento oral agudo, mas não houve alteração significativa 1 ou 3 h após a sua administração, o que levou à escolha deste período de tempo para as outras observações comportamentais. A droga padrão, diazepam 1mg/Kg, um benzodiazepínico, que atua no seu sítio próprio no complexo receptor GABA_A causa o efeito hipnosedativo, como esperado, reduzindo a latência e aumentando a duração do sono barbitúrico.

Entre as doses de 300 e 600mg/Kg, foi escolhida a dose de 300 mg/Kg para dar continuidade aos estudos, pois a diferença estatística na potencialização do sono entre as duas doses foi relativamente pequena e o uso de doses menores é sempre mais vantajoso quando diz respeito ao consumo do extrato da planta pela população. Por outro lado, a potencialização do sono sugere uma possível atividade hipnosedativa no SNC. Isto pode estar ocorrendo pela ação do pentobarbital, um barbitúrico, que como outros do mesmo grupo químico, age em sítio próprio localizado no canal iônico do complexo receptor GABA_A. Desta maneira, o extrato de *T. diversifolia* parece também interagir com o receptor GABA_A, o que levaria a potencialização do sono barbitúrico e justificaria seu uso popular na dependência química, especialmente ao álcool. No entanto, a potencialização do sono neste modelo também pode ser consequência de uma interação farmacocinética do extrato da planta com o pentobarbital, com ambos competindo pelas mesmas enzimas microssomais hepáticas de metabolização de drogas. Para verificar esta possibilidade, foi utilizado o modelo do sono induzido pelo éter etílico⁶¹. Este modelo também avalia a duração do sono, já que o éter etílico atua sobre o receptor GABA_A, mas, diferentemente do pentobarbital, o éter etílico tem a sua absorção e eliminação através do sistema respiratório, o que descarta a possibilidade de interação farmacocinética hepática do extrato bruto da *T. diversifolia* com o agente anestésico.

Os resultados do experimento do sono induzido pelo éter etílico mostram que não houve diferença significativa na latência e na duração do sono induzido por este agente. Isto sugere que a potencialização do sono induzido pelo pentobarbital não ocorre pela ação central

do extrato de *T. diversifolia*, mas sim provavelmente por uma interação farmacocinética, o que, por competição pela enzima de metabolização hepática, mantém os níveis plasmáticos de barbitúrico mais altos, proporcionando um maior tempo de interação do pentobarbital com o receptor GABA_A.

Buscando ainda investigar uma possível base científica para o uso popular da *T. diversifolia*, foi verificada uma possível ação dopaminérgica realizando-se dois testes (modelos) clássicos que avaliam a atividade neste sistema: o teste de subida (*climbing behavior*)⁶² e o teste de catatonía (catalepsia)⁶³.

O teste de subida é utilizado para avaliar a ação de drogas antipsicóticas/neurolépticas típicas e atípicas e estudar mudanças na sensibilidade de receptores dopaminérgicos, o que sugere uma ação neste sistema, indicando outras avaliações para justificarem seu efeito no SNC^{78,79}. O comportamento de subida depende de uma interação com os receptores D₁ (D₁-D₅) e D₂ (D₂, D₃ e D₄)^{80,81}. Lesões realizadas por cirurgia estereotaxia no núcleo *accumbens*, região ativada no sistema de adicção/dependência química, diminuem o *climbing* dos animais, mostrando que esta área é requerida para mediar ou iniciar este comportamento⁸². Foram testadas, 2 h após o tratamento agudo, as doses de 100, 300 e 600mg/Kg do extrato bruto de *T. diversifolia* e em nenhuma delas houve inibição da atividade de subida nas grades das gaiolas, induzida, pela administração de apomorfina, um agonista dopaminérgico, como acontece com o haloperidol, antagonista dopaminérgico, bloqueador de receptores do tipo D₁ e D₂, usado como controle positivo do teste. Neste modelo não observamos qualquer atividade do extrato bruto da planta no sistema dopaminérgico, nas doses usadas.

A catatonía, por sua vez, é um comportamento onde o animal é colocado em uma posição não habitual e este é incapaz de voluntariamente sair da mesma devido ao bloqueio neuroquímico, na região dos gânglios basais, das funções extrapiramidais. O modelo da catatonía é validado e muito utilizado pelos neurocientistas sendo modulado por vários neurotransmissores. Sabe-se que o bloqueio dopaminérgico dos receptores D₁ e D₂ tem papel importante neste comportamento e que drogas neurolépticas causam a catatonía^{83,84}. Além da dopamina, sabe-se que há participação do aminoácido inibitório GABA, que regula a ação dopaminérgica no sistema extrapiramidal (gânglios da base). Doses, menores de drogas que

atuam no sistema GABA, agem nos receptores pré-sinápticos inibindo a atividade colinérgica neste sistema, fazendo um balanço de neurotransmissores e diminuindo assim o efeito de catatonía com drogas como o haloperidol. O aumento da dose de drogas GABAérgicas aumenta a atividade nos receptores pós-sinápticos o que potencializa o efeito bloqueador dopaminérgico, favorecendo o efeito catatónico^{83,85}. O modelo de catatonía foi realizado também utilizando doses de 100, 300 e 600mg/Kg do extrato bruto da planta em questão, e os resultados foram insignificantes estatisticamente. Não houve indução de catatonía por bloqueio de receptores dopaminérgicos, não caracterizando, assim, uma atividade antidopaminérgica deste extrato.

Como o tratamento dos pacientes em dependência química envolve drogas ansiolíticas e drogas antidepressivas cujos mecanismos moleculares de ação farmacológica estão envolvidos com a neurobiologia da adicção, foram também utilizados modelos clássicos que pudessem demonstrar alguma atividade ansiolítica ou antidepressiva no tratamento dos animais com o extrato da *T. diversifolia*.

Para verificar uma possível atividade antidepressiva do extrato, foi utilizado o modelo do teste de suspensão pela cauda (*tail suspension*)⁶⁴. Este modelo é utilizado há 20 anos, sendo um modelo poderoso para a detecção de drogas antidepressivas^{86,87}. A imobilidade gerada pela situação de estresse hemodinâmico é alterada com o uso de drogas antidepressivas. A imobilidade neste teste é proveniente da relutância em manter um esforço maior que a hipotividade generalizada⁸⁶. A droga padrão utilizada neste modelo foi a imipramina, um inibidor da recaptação de noradrenalina e serotonina. No caso da dependência química deve-se cuidar com o diagnóstico de depressão. Sabe-se que o tratamento com antidepressivos diminui a utilização da droga em questão, com uma leve tendência de uma melhor ação de antidepressivos para pacientes dependentes em álcool do que os dependentes em outras drogas⁸⁸⁻⁹⁰. Os resultados neste modelo não foram significativos para o tempo de latência e tempo de imobilidade, não indicando, assim, qualquer atividade antidepressiva deste extrato.

Para a avaliação da atividade ansiolítica foi usado o modelo do labirinto em cruz elevado, o mais utilizado para avaliação da ansiedade nos últimos 20 anos⁶⁹⁻⁷³. Drogas ansiolíticas aumentam e drogas ansiogênicas diminuem a exploração dos braços abertos do

labirinto^{69,72}. A droga ansiolítica típica e, padrão neste modelo é o diazepam, um benzodiazepínico que atua no complexo receptor GABA_A. Estudos bioquímicos e comportamentais mostram que a fisiopatologia da ansiedade envolve vários sistemas, como o sistema serotoninérgico, glutamatérgico e dopaminérgico⁹¹⁻⁹³, além de outros, não menos importantes, mas que para este trabalho não são relevantes. Assim, drogas que atuam no sistema GABAérgico, serotoninérgico⁹¹ e sistema dopaminérgico, mais precisamente os receptores D₂ e D₃, podem ser utilizadas para diminuir a ansiedade⁹². Trabalhos recentes apontam que o receptor D₃ é predominantemente encontrado na região mesocorticolímbica e em áreas relacionados com a emoção e o comportamento, também envolvidas com a adicção^{3,24,93}. Está claro que o estresse ativa o sistema dopaminérgico da região mesocorticolímbica e aumenta a dopamina extracelular no núcleo *accumbens* e córtex medial pré-frontal, induzindo comportamentos do tipo ansiolítico. Também há evidências que drogas como diazepam diminuem o metabolismo de dopamina nestas situações. Como o sistema de adicção envolve as áreas descritas acima e, vários trabalhos demonstram uma importante participação do receptor D₃ neste processo^{23,24,25}, este modelo foi utilizado para verificar uma possível atividade ansiolítica e, posteriormente, definir o provável mecanismo de ação. A análise dos resultados de atividade exploratória (porcentagem de entradas e tempo de permanência nos braços abertos) e dos resultados dos parâmetros etológicos (número de comportamentos de estiramento e de imersões de cabeça) não foram significativos. Isso indica que o extrato bruto da *T. diversifolia* não possui atividade ansiolítica, o que poderia ser uma das atividades farmacológicas úteis para validar o uso desta planta no tratamento de dependentes químicos.

Outro método utilizado para investigar uma possível atividade central do extrato da *T. diversifolia* foi o modelo de campo aberto (*open-field*), o qual mede a reação dos animais frente a um novo ambiente. As atividades normalmente determinadas são: locomoção (comportamento exploratório horizontal), *rearing* (comportamento exploratório vertical), *grooming* (auto-limpeza) e número de bolos fecais (medida de emocionalidade em roedores)⁶⁶. Estes parâmetros sugerem atividade exploratória e o comportamento de medo frente a este novo ambiente. Este modelo normalmente é utilizado para testes de que envolvem emoção, avaliando o comportamento frente a novos ambientes⁹⁴. O tratamento com drogas ansiolíticas não aumenta diretamente a exploração do animal no campo aberto, mas

diminui a inibição da exploração do novo ambiente pela diminuição do efeito do estresse induzido pela exposição a ele⁹⁵. O campo-aberto tem sido usado para mostrar a ação de drogas ansiolíticas, estimulantes e sedativas. Ainda, o aumento da locomoção e do *rearing* pode sugerir um efeito estimulante e a diminuição destes comportamentos, um efeito sedativo⁹⁵.

A ação do diazepam, droga padrão utilizada neste modelo, se dá por interação com o complexo receptor GABA_A. Este receptor possui pelo menos 6 sítios de ligação específicos, entre eles o sítio de ligação a drogas benzodiazepínicas (ex.: diazepam), a barbitúricos, a neuroesteróides, a drogas convulsivantes, entre outras. Sabe-se também que a atividade exploratória pode ser alterada por drogas que atuam no sistema serotoninérgico e dopaminérgico^{95,96}. Foi avaliado se a administração do extrato da *T. diversifolia*, ou da droga padrão diazepam, poderia alterar os parâmetros de locomoção e de *rearing* neste modelo. O extrato bruto da planta não mostrou atividade no sistema GABAérgico ou em outro sistema que pudesse alterar a atividade exploratória, como o serotoninérgico ou dopaminérgico, sistemas envolvidos na dependência química. Houve sim, uma diminuição da ansiedade e, conseqüentemente, uma maior exploração do ambiente no tratamento com o diazepam, como esperado.

Ainda na tentativa de verificar alguma atividade central da planta, utilizou-se o modelo da convulsão induzida pelo pentilenotetrazol (PTZ)⁷⁴, servindo para verificar se o extrato possui a capacidade de diminuir o número ou a severidade das convulsões induzidas pelo PTZ, pois este é o protótipo de droga convulsivante sistêmica que atua no receptor GABA_A. Este é um dos modelos padrão – ouro para iniciar as pesquisas de drogas anticonvulsivantes. Ele é eficiente e dá ferramentas para identificar novos compostos com atividade anticonvulsivante com potencial clínico, além de ter grande poder no auxílio de determinar novos alvos moleculares para a terapia anticonvulsivante⁹⁷. Quando administrado i.p., o PTZ promove convulsões em camundongos, ratos, gatos e primatas. Inicialmente produz convulsões mioclônicas e depois convulsões generalizadas tônico-clônicas. Este modelo permite a avaliação de drogas anti e pró-convulsivantes. Ao nível sináptico, o PTZ interage com o receptor GABA_A, possivelmente no sítio de ligação da picrotoxina^{95,98}, e é o mais indicado para pesquisar substâncias que atuam no sistema GABAérgico⁹⁹. A droga padrão neste modelo, para inibir as convulsões é o diazepam 1,0 mg/Kg. Na dose de 300

mg/Kg, com o tratamento agudo, o extrato não apresentou nenhuma atividade protetora para as convulsões induzidas pelo PTZ.

Como não se observou nenhum efeito central após o tratamento oral agudo com uma única dose do extrato de *T. diversifolia* foi realizado o tratamento sub-crônico, para verificar se, a possível atividade anti-adicção deste extrato bruto dependeria da manutenção de um certo nível plasmático dos compostos, descartando assim, um resultado falso-negativo. Os animais foram então tratados por três vezes consecutivas num período de 24 h (24, 5 e 2 h antes do início do teste). Os modelos utilizados para verificar a influência deste tratamento sub-crônico foram: o teste do sono induzido por barbitúrico e por éter, o labirinto em cruz elevado, a convulsão induzida por PTZ, o campo-aberto e o teste da suspensão pela cauda.

A administração sub-crônica de extrato bruto de *T. diversifolia* não promoveu quaisquer atividades do extrato no SNC, da mesma forma que o ocorrido no tratamento agudo. No teste de sono induzido pelo barbitúrico observamos novamente uma potencialização da duração do sono, mas, quando realizado o teste de sono induzido pelo éter etílico, não houve potencialização do sono, descartando uma atividade hipnosedativa do extrato e, novamente, indicando uma provável interação farmacocinética, como ocorreu no tratamento agudo com o extrato. Os demais modelos testados repetiram os resultados não significativos para uma possível atividade antidepressiva, ansiolítica, alteração na movimentação e efeito anticonvulsivante.

Mesmo com os resultados do extrato bruto da *T. diversifolia*, até então obtidos não apontando uma atividade central um teste de abstinência foi utilizado na tentativa de verificar uma possível ação central que justificasse a utilização desta planta em pacientes com dependência química. Para isto, foi utilizado o modelo de tratamento utilizado por Dhawan e colaboradores³⁴.

Após o tratamento com álcool (grupo experimental) ou água (grupo controle), os animais foram testados no modelo de hipertemia causada pelo estresse, que avalia a diferença de temperatura entre animais expostos e não expostos a um novo ambiente, após o tratamento com as drogas em questão. A exposição ao novo ambiente leva a uma situação de conflito que traz à tona mecanismos comportamentais, fisiológicos, psicológicos e endocrinológicos. A ansiedade traz manifestações físicas, como o aumento dos batimentos cardíacos, do suor e da

temperatura corporal. O modelo de hipertermia causada pelo estresse foi validado farmacologicamente e atualmente é considerado um teste confiável e reprodutível, sendo sensível a compostos ansiolíticos usados clinicamente¹⁰⁰, mas utiliza um grande número de animais, o que dificulta a sua aplicação num *screening*. Para tentar solucionar este problema, o modelo foi modificado por van der Heyden, 1997⁷⁷. Spooren, et al, 2002⁷⁷, testaram vários grupos de drogas ansiolíticas, com o modelo de hipertermia modificado, demonstrando sua eficiência, a boa reprodutibilidade e a sensibilidade a vários compostos ansiolíticos usados no mercado, como o modelo de hipertermia original⁷⁷.

No presente trabalho, o modelo de hipertermia causada pelo estresse modificado foi utilizado para testar o tratamento intragástrico agudo com o extrato bruto de *T. diversifolia* (300mg/Kg), após a dependência e abstinência aguda **ao álcool** nos animais. Pois, além de possuir as vantagens acima mencionadas, possui vantagens sobre o método clássico de avaliação de ansiedade, o labirinto em cruz elevado, o qual é reprodutível dentro do mesmo laboratório, porém os resultados entre laboratórios podem ser inconsistentes e contraditórios¹⁰¹.

Inicialmente, a preocupação foi com a padronização do modelo de hipertermia, sua reprodutibilidade e definir a concentração da droga padrão, diazepam, a ser utilizada. Os resultados destes testes demonstraram boa reprodutibilidade e que a dose ideal de diazepam para este modelo é de 1,5 mg/Kg, i.p., já que nesta concentração não houve diferença de temperatura entre o grupo exposto com o não exposto ao novo ambiente, um efeito claramente ansiolítico. A manifestação da ansiedade leva a ativação do eixo hipotálamo/hipófise/suprarrenal com liberação de ACTH e corticosterona, o que leva ao aumento de temperatura do animal⁷⁷.

A dependência ao álcool foi induzida pelo tratamento de álcool, durante 6 dias. No sétimo dia, os animais foram testados durante a abstinência (aguda) e obtiveram diferença significativa entre o grupo exposto e não exposto ao novo ambiente, não se observando, no entanto, qualquer ação ansiolítica do extrato de *T. diversifolia* após o tratamento oral agudo nos camundongos em abstinência de álcool.

A abstinência também leva a um aumento de movimentação espontânea^{34,102,103} que foi caracterizado utilizando o modelo de campo-aberto. Neste modelo, os animais em

abstinência apresentaram movimentação significativamente maior do que os animais tratados com água, durante o mesmo período que os animais tratados com álcool, quando comparados aos animais *naive*. Assim, caracterizou-se que o tratamento com álcool foi capaz de tornar os animais dependentes e desencadear a síndrome de abstinência no sétimo dia de teste, quando o álcool foi retirado. Esta síndrome de abstinência foi aliviada pelo uso de diazepam, mas não pelo extrato de *T. diversifolia*.

Assim, os vários testes farmacológicos utilizados neste estudo não demonstraram qualquer ação central da *T. diversifolia*, não corroborando seu possível efeito “anti-fissura”, no uso popular desta planta no tratamento de dependentes químicos.

7 CONCLUSÕES

- O extrato bruto da planta *T. diversifolia*, nas doses e vias de administração aqui empregadas, não apresentou atividade no SNC, nos modelos estudados.
- O tratamento agudo com o extrato bruto da *T. diversifolia*, na concentração de 300mg/Kg, não foi eficaz no tratamento da abstinência de álcool, no modelo estudado.
- Os testes farmacológicos realizados neste estudo não corroboram o uso popular da *T. diversifolia* como uma planta útil no tratamento da dependência química.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

É possível que a redução do desejo de usar droga, quando a planta é administrada por via oral ao dependente químico, esteja relacionado ao sabor amargo da mesma. Este sabor amargo induziria um comportamento aversivo associado ao uso da droga, provocando desconforto e desviando o foco da fissura.

Evidências mostram que as regiões envolvidas com a adicção, como o nucleus accumbens, pálido ventral, área tegmentar ventral e amígdala também estão presentes no controle do apetite, sendo ativadas pela palatabilidade dos alimentos. Assim, a “distração” da palatabilidade pelo sabor amargo da *T. diversifolia* atuaria sobre as áreas envolvidas com adicção, diminuindo a vontade de utilizar a droga. Como o sabor amargo traz um comportamento aversivo a ingestão de alimentos, também o faria para o uso da droga, diminuindo a ativação do pálido ventral pela inibição das aferências dopaminérgicas da área tegmentar ventral, a qual está relacionada ao ato de “querer” e não de “gostar”¹⁰⁴.

Outros estudos sugerem o envolvimento da modulação glutamatérgica do nucleus accumbens em processos associados com a inibição do apetite, como resposta a um sinal aversivo¹⁰⁵. Assim, no caso da *T. diversifolia*, devido ao amargor da planta, haveria estímulo da atividade glutamatérgica sobre o nucleus accumbens, o que poderia diminuir o desejo de usar a droga.

Outra possibilidade é a ação desta planta como um efeito placebo, que embora amplamente conhecido na medicina, ainda não teve seus mecanismos fisiológicos e psicológicos bem esclarecidos. Há relato de que a esperança e otimismo inerente a credibilidade do paciente em seu médico e ao tratamento pode aumentar ou obscurecer os efeitos de intervenções terapêuticas, representando uma interação “mente-corpo”, no qual as expectativas cognitivas influenciam as respostas corporais^{106,107}. Estudos em neuroimunofarmacologia, com técnicas avançadas de neuroimagem descreveram alguns dos potentes mecanismos do efeito placebo na dor, depressão e doença de Parkinson¹⁰⁸⁻¹¹³. Foi

demonstrado que no efeito placebo analgésico, a expectativa consciente de melhora induz a liberação de opióides endógenos e que no efeito placebo antidepressivo e antiparkinsoniano ocorre liberação de dopamina¹⁰⁶. É possível que no efeito placebo na dependência química ocorra a ativação dopaminérgica do sistema de recompensa (via mesocorticolímbico). Alguns estudos têm tentado explicar os mecanismos neurofisiológicos e psicológicos deste fenômeno. Os estudos sobre o efeito placebo analgésico evidenciaram o envolvimento da amígdala, do nucleus accumbens e do globo pálido ventral no fenômeno. Estas regiões também estão envolvidas na neurobiologia da adicção^{107,114-117}.

Portanto, uma vez que não foram observadas ações farmacológicas induzidas pela *T. diversifolia* que pudessem explicar o efeito ‘antifissura’ descrito pelos usuários desta planta, é possível que esta resposta se deva a um efeito placebo, fenômeno cientificamente reconhecido.

Ainda, devido a diversas ações periféricas da *T. diversifolia*, a ação antifissura desta planta poderia ser proveniente da diminuição dos efeitos periféricos da síndrome de abstinência, principalmente a ação antiespasmódica, pois estes sintomas são estímulos ao uso da droga e colaboram com as recaídas durante o tratamento dos dependentes químicos.

9 REFERÊNCIAS

1. Burst JCM. Substance abuse, neurobiology, and ideology. *Arch Neurol* 1999; 56:1528-31.
2. Leshner AI. Addiction is a brain disease, and it matters. *Science* 1997; 278: 45-47.
3. Spanagel R, Heilig M. Addiction and its brain science. *Addiction*, 2005; 100: 1813-22.
4. Wise RA. Addiction becomes a brain disease. *Neuron* 2000; 26:27-33.
5. Graeff, F.G.. Drogas e comportamento. *Ciência e Cultura*, 36 (3), março, 1984.
6. Chandler JL. Ethanol and brain plasticity: receptors and molecular networks of the postsynaptic density as targets of ethanol. *Pharmacology & Therapeutics* 2003; 99: 311-26.
7. Dependência em drogas. [homepage na Internet]. [Acessado em mar. 2006]. Disponível em: www.oficina.Cienciaviva.pt
8. Dependência em drogas. [homepage na Internet]. [Acessado em mar. 2006]. Disponível em: www.cebrid.epm.br/folhetos/álcool.
9. Qual o mais indicado? Álcool e drogas sem distorção – Albert Einstein.
10. Dependência em drogas. [homepage na Internet]. [Acessado em mar. 2006]. Disponível em: www.unodc.org/brazil/pt/articles/_speechs_ABEAD.html.
11. Noto AR. Álcool é principal causa de internação por uso de drogas psicotrópicas. *Jornal da Paulista* 2001 Setembro; 159.
12. Hirschfeld RMA. General Introduction in Benzodiazepines – Report of the W. P. A. Presidential Educational Task Force 1993; Edited by Y. Pelicier.
13. Bateson, AN. Basic. Pharmacologic mechanisms involved in benzodiazepine tolerance and withdrawal. *Curr Pharm Des*, 2002, 8:5-21
14. Jesus MD, Silva OA. Inalantes de abuso: exposição humana e efeitos tóxicos. *Rev Farm Bioquim Univ São Paulo* 1998; 34(1): 1-14.
15. Galduróz JC, Noto AR, Nappo SA, Carlini EA. I Levantamento Domiciliar sobre o Uso de Drogas no Brasil. São Paulo: Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas (CEBRID) ~ Universidade Federal de São Paulo & Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) 2002.
16. Dependência em drogas. [homepage na Internet]. [Acessado em mar. 2006]. Disponível em: www.imesc.sp.gov.br/infodrogas/Psicotro.htm.
17. Robinson TE, Kolb B. Structural plasticity associated with exposure to drugs of abuse. *Neuropharmacology* 2004; 47 Suppl 1:33-46.
18. Robinson TE, Berridge KC. *Addiction*. *Annu Rev Psychol*. 2003; 54:25-53.

19. Venton BJ, Zhang H, Garris PA, Phillips PE, Sulzer D, Wightman RM. Real-time decoding of dopamine concentration changes in caudate – putamen during tonic and phasic firing. *Journal of Neurochemistry* 2004; 89: 526.
20. Di Chiara G, Bassareo V, Fenu S, De Luca MA, Spina L, Cadoni C, et al. Dopamine and drug addiction: the nucleus accubens shell connection. *Neuropharmacology* 2004; 47: 227-41.
21. Cardinal RN, Everitt BJ. Neural and psychological mechanisms underlying appetitive learning: links to drug addiction. *Current opinion in neurobiology* 2004; 14: 156-162.
22. Kalivas PW. Glutamate systems in cocaine addiction. *Current Opinion in Pharmacology* 2004; 4:23-29.
23. Le Foll B, Diaz J, Sokoloff P. Neuroadaptations to hyperdopaminergia in dopamine D3 receptor-deficient mice. *Life Science* 2005; 76(11): 1281-96.
24. Thanos PK, Katana JM, Ashby CR Jr, Michaelides M, Gardner EL, Heidbreder CA, et al. The selective dopamine D3 receptor antagonist SB-277011-A attenuates ethanol consumption in ethanol preferring (P) and non-preferring (NP) rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 2005; 81(1): 190-7.
25. Heidbreder CA, Gardner EL, Xi ZX, Thanos PK, Mugnaini M, Hagan JJ, et al. The role of central dopamine D3 receptors in drug addiction: a review of pharmacological evidence. *Brain Research Review* 2005; 49(1):77-105.
26. Melis M, Camarini R, Ungless MA & Bonci A. Long-lasting potentiation of GABAergic synapses in dopamine neurons after a single in vivo ethanol exposure. *Journal of Neuroscience* 2002; 22:2074-82.
27. Kiefer F, Mann K. New achievements and pharmacotherapeutic approaches in the treatment of alcohol dependence. *European Journal of Pharmacology*, 2005; 526: 163-171.
28. Maisonneuve IM, Glick SD. Anti-addictive actions of an iboga alkaloid congener: a novel mechanism for a novel treatment. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 2003; 75: 607-18.
29. Williams SH. Medications for treating alcohol dependence. *American Family Physician* 2005; 72(9):1775 – 80.
30. Roozen HG, Waart R de, Van der Windt DAWM, Van der Brink W, de Jong CAJ, Kerkhof AJFM. A systematic review of the effectiveness of naltrexone in the maintenance treatment of opioid and alcohol dependence. *European Neuropsychopharmacology*, in press.
31. Rezvani AH, Overstreet DH, Perfumi M, Massi M. Plant derivatives in the treatment of alcohol dependency. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 2003; 75:593-606.
32. Carai MAM, Agabio R, Bombardelli E, Bourov I, Gessa GL, Lobina C, et al. Potential use of medicinal plants in the treatment of alcoholism. *Fitoterapia* 2000; 71: S38-S42.
33. Levant, B., Pazdernik, T.L. Differential effects of ibogaine on local cerebral glucose utilization in drug-naive and morphine-dependent rats.

34. Dhawan K, Kumar S, Sharma A. Suppression of alcohol-cessation-oriented hyper-anxiety by the benzoflavone moiety of *Passiflora incarnata* Linneaus in mice. *Journal of Pharmacology* 2002; 81: 239-44.
35. Thongsaard W & Marsden CA. An herbal medicine in used the treatment of addiction mimics the action of amphetamine on in vitro rat striatal dopamine release. *Neuroscience Letters* 2002; 329: 129-32.
36. Alfonsas Balbachas. *As Plantas Curam*. São Paulo: Ed. Missionária; 1957.
37. Rezvani AH, Overstreet DH, Yang Y, Clark Jr E. Attenuation of alcohol intake by the extract of *Hypericum perforatum* (St John's Wort) in two different strains of alcohol preferring rats. *Alcohol Alcohol* 1999; 34:699-705.
38. Perfumi M, Panocka I, Ciccocioppo R, Vitali D, Frolidi R, Massi M. Effect of a methanolic extract and a hyperforin-enriched CO₂ extract of *Hypericum perforatum* on alcohol intake in rats. *Alcohol Alcohol* 2001; 36:199-206.
39. Calapai G, Crupi A, Firenzuoli F, Costantino G, Infrerrea G, Campo GM, et al. Effects of *Hypericum perforatum* on levels of 5-hydroxytryptamine, noradrenaline and dopamine in the cortex, diencephalons and brainstem of the rat. *Journal of Pharm Pharmacology* 1999; 51:723-8.
40. Nathan PJ. *Hypericum perforatum* (St John's wort): a non-selective reuptake initor? A review of the recent advances in its pharmacology. *Journal of Psychopharmacology* 2001; 15:47-54.
41. Overstreet, DH, Kralic, JE, Morrow AL, Ma ZZ, Zhang YW, Lee DYW. NPI-031G (puerarin) reduces anxiogenic effects of alcohol withdrawal or benzodiazepine inverse or 5-HT_{2C} agonists. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 2003; 75:619-25.
42. Carlini EA. Plants and the central nervous system. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 2003; 75:501-12.
43. Sershen H, Hashim A, Lajtha A. Ibogaine and Cocaine Abuse: Pharmacological Interactions at Dopamine and Serotonin Receptors. *Brain Research Bulletin* 1997; 42 (3):161-68.
44. Leal MB, Michelin K, Souza DO, Elisabetsky E. Ibogaine attenuation of morphine withdrawal in mice: role of glutamate N-methyl-D-aspartate receptors. *Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 2003; 27:781- 85.
45. Soleimani R, Younos C, Jarmouni S, Bousta D, Misslin R, Mortier F. Behavioural effects of *Passiflora incarnata* L. and its indole alkaloid and flavonoid derivatives and maltol in the mouse. *J Ethnopharmacol* 1997; 57:11 - 20
46. Cohen R. 2001. Estrogen – The Unrecognized Male Hormone. International Anti-aging Systems, Les Autelets Suite A, Sark GY9 0SF, Channel Islands, Great Britain, trough <http://www.smart-drugs.com>
47. Barbosa AD, Morato GS. Influence of neuro-steroids on the development of rapid tolerance to ethanol en mice. *European Journal of Pharmacology*, 2001; 431:179-188.
48. Font M., Bilbeny N., Contreras S., Paeile C., Garcya H. Effect of ME-3451-106, an aqueous extract of *Stichaster striatus* with inhibitory activity of voluntary alcohol intake,

- in genetically drinker rats: Isolation and identification of the active fraction. *Journal of Ethnopharmacology* 2006; 105: 26–33.
49. Schuster A, Stokes S, Papastergiou F, Castro V, Poveda L and Jakupovic J. Sesquiterpene Lactones from two *Tithonia* species. *Phytochemistry* 1992; 31 (9): 3139-41.
 50. Taiwo LB, Makinde J. Influence of water extract of Mexican sunflower (*Tithonia diversifolia*) on growth of cowpea (*Vigna unguiculata*). *African Journal of Biotechnology* 2005; 4 (4): 355-60.
 51. Owoyele VB, Wuraola CO, Soladoye AO, Olaleye SB. Studies on the anti-inflammatory and analgesic properties of *Tithonia diversifolia* leaf extract. *Journal of Ethnopharmacology* 2004; 90: 317-21.
 52. Ziémons E, Goffin E, Lejeune R, Proença da Cunha A, Angenot L, Thunus L. Supercritical carbon dioxide extraction of tagitinin C from *Tithonia diversifolia*. *Journal of Supercritical Fluids* 2005; 33: 53–59.
 53. Elufioye TO, Agbedahunsi JM. Antimalarial activities of *Tithonia diversifolia* (Asteraceae) and *Crossopteryx febrifuga* (Rubiaceae) on mice in vivo. *Journal of Ethnopharmacology* 2004; 93:167–71.
 54. Gu JQ, Gills JJ, Park EJ, Mata-Greenwood E, Hawthorne ME, Axelrod F, et al. Sesquiterpenoids from *Tithonia diversifolia* with Potential Cancer Chemopreventive Activity. *Journal Nat. Prod.* 2002; 65: 532-36.
 55. Madureira MC, Martins AP, Gomes M, Paiva J, Cunha A P da, Rosário V. Antimalarial activity of medicinal plants used in traditional medicine in S. Tomé Príncipe islands. *Journal of Ethnopharmacology* 2002; 81:23-29.
 56. Pereira PS, Dias DA, Vichnewski W, Nasi AMTT and Herz W. Sesquiterpene lactones from Brazilian *Tithonia diversifolia*. *Phytochemistry* 1997; 45(7):1445-48.
 57. Bordoloi M, Nabin C, Barua NC, Ghosh AC. An artemisinic acid analogue from *Tithonia diversifolia*. *Phytochemistry* 1996; 41 (2): 557-59.
 58. Fiebich BL, Lieb K, Engels S, Heinrich M. Inhibition of LPS-induced p42/44 MAP kinase activation and iNOS/NO synthesis by parthenolide in rat primary microglial cells. *Journal of Neuroimmunology* 2002; 132: 18-24.
 59. Irwin S. Comparative observational assessment: I.a. A systematic quantitative procedure for assessing the behavioral and physiologic state of the mouse. *Psychopharmacologia (Berlin)* 1968; 13: 222-57.
 60. Carlini EA, Contar JDP, Silva-Filho AR, Silveira-Filho NG, Frochtengarten ML & Bueno, OF. Pharmacology of lemongrass *Cymbopogon citratus* Stapf. *J. Ethnopharmacol* 1986; 17: 1,37-64.
 61. Vieira RA. Avaliação da possível atividade central da *Stachytarpheta cayennensis* (gervão-roxo)[dissertação]. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina; 2001.
 62. Costall B, Kelly ME, Naylor RJ & Nohria V. Climbing behavior induced by apomorphine in mice: a potential model for the detection of neuroleptic activity. *European Journal of Pharmacology* 1978; 50: 39-50.

63. Costall B & Naylor RJ. On catalepsy and catatonia and the predictability of catalepsy test for neuroleptic activity. *Psychopharmacologia* 1974; 34: 233-41.
64. Stéru L, Chermat R, Thierry B & Simon P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology* 1985; 85: 367-70.
65. Siegel PS. A simple electronic device for the measurement of gross activity of small animals. *J. Psychol.* 1946; 21: 227-36.
66. Archer J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. *Animal Behavior* 1973; 21(2): 205-35.
67. Lister RG. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology* 1987; 92: 180-185.
68. Rodgers RJ, Cao BJ, Dalvi A & Holmes A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 1997; 30: 289-304.
69. Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Methods* 1985; 14(3): 149-67.
70. Cruz APM, Frei F, Graeff FG. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1994; 49: 171-76.
71. Pellow S, File SE. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1986; 24: 525-29.
72. Cole BJ, Hillmann M, Seidelmann D, Klewer M, Jones GH. Effects of benzodiazepine receptor partial inverse agonists in the elevated plus maze test of anxiety in the rat. *Psychopharmacology (Berl)*, 1995; 121(1): 118-26.
73. Rodgers RJ, Cole JC. *The elevated plus-maze: Pharmacology, Methodology and Ethology*, 1994; Chichester: Willey: 9-14.
74. Swinyard EA, Brown WC & Goodman LS. Comparative assays of antiepileptic drugs in mice and rats. *Journal of Pharmacology Experimental Therapy* 1952; 106: 319-30.
75. Czuczwar SJ & Frey HH. Effect of morphine and morphine-like analgesics on susceptibility to seizures in mice. *Neuropharmacology* 1986; 25(5): 465-469.
76. Van der Heyden JAM, Zethof TJJ, Olivier B. Stress-induced hyperthermia in singly housed mice. *Phys. Behav.* 1997; 62:463-470.
77. Spooen WPJM, Schoeffter P, Gasparini F, Kuhn R, Gentsch C. Pharmacological and endocrinological characterization of stress-induced hyperthermia in singly housed mice using classical and candidate anxiolytics (LY314582, MPEP and NK608). *European Journal of Pharmacology* 2002; 435: 161-70.
78. Wallach MB, Hedley LR, Peterson KE, Schulz CH. Antagonism of apomorphine induced climbing: is it a valid model for neuroleptic activity? *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 1980; 23: 93-98.
79. Robertson A, MacDonald C. The effects of some atypical neuroleptics on apomorphine-induced behaviors as a measure of their relative potencies in blocking presynaptic versus

- postsynaptic dopamine receptors. *Pharmacology Biochemistry & Behavior* 1986; 24: 1639-43.
80. Moore AN and Axton MS. Production of climbing behaviour in mice requires both D1 and D2 receptor activation. *Psychopharmacology* 1988; 94: 263-66.
 81. Davis A, Jenner P, Marsden CD. Differential ability of selective and non-selective dopamine agonists to induce climbing in the rat indicates the involvement of both D-1 and D-2 receptors in this behaviour. *Psychopharmacology* 1990; 100: 19-26.
 82. Costall B, Eniojukan JF, Naylor RJ. Spontaneous climbing behaviour of mice, its measurement and dopaminergic involvement. *European Journal of Pharmacology* 1982; 85: 125-32.
 83. Sanberg PR, Giordano M, Bunsey MD, Norman AB. The catalepsy test: Its ups and downs. *Behavioral Neuroscience* 1988; 102 (5): 748-59.
 84. Klemm WR, Block H. D-1 and D-2 receptor blockade have additive cataleptic effects in mice, but receptor effects may interact in opposite ways. *Pharmacology Biochemistry & Behavior* 1988; 29(2): 223-29.
 85. Ögren SO, Fuxe K. D1 - and D2 – receptor antagonists induce catalepsy via different efferent striatal pathways. *Neuroscience Letters* 1988; 85: 333-38.
 86. Cryan JF, Mombereau C, Vassout A. The tail suspension test is a model for assessing antidepressant activity: Review of pharmacological and genetical studies in mice. *Neuroscience Biobehavioral Reviews* 2005; 29: 571 – 625.
 87. Dhingra D, Sharma A. Antidepressant-like activity of *Glycyrrhiza glabra* L. in mouse models of immobility tests. *Neuro – Psychopharmacology & Biological Psychiatry*; in progress.
 88. Nunes EV, Levin FR. Treatment of Depression in Patients With Alcohol or Other Drug Dependence: A Meta-analysis. *JAMA* 2004; 291(15): 1887–96.
 89. Miller NS, Guttman JC. The integration of pharmacological therapy for comorbid psychiatric and addictive disorders. *Journal of Psychoactive drugs* 1997; 29(3): 249-54.
 90. Miller NS. Pharmacotherapy in alcoholism. *Journal of Addictive diseases* 1995; 14(1):23-46.
 91. Graeff FG, Guimaraes FS, De Andrade TG, Deakin JF. Role of 5-HT in stress, anxiety, and depression. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 1996; 54(1): 129-41.
 92. Salamone JD. The involvement of nucleus accumbens dopamine in appetitive and aversive motivation. *Behav Brain Res.* 1994; 61(2):117-33.
 93. Rogoz Z, Skuza G, Klodzinska A. Anxiolytic- and antidepressant-like effects of 7-OH-DPAT, preferential dopamine D3 receptor agonist, in rats. *Polish Journal of Pharmacology* 2004; 56(5):519-26.
 94. Magistretti P. Analysis of behavior. *Discussions in Neurosciences* 1988; 5(1), 1988.
 95. Prut L, Belzung C. The open-fields as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European Journal of Pharmacology* 2003; 463: 3-33.

96. Agmo A, Belzung C, Giordano M. Interactions between dopamine and GABA in the control of ambulatory activity. *Journal of Neural Transmission* 1996; 103(8-9):925-34.
97. Rogawski MA. Molecular targets versus models for new antiepileptic drug discovery. *Epilepsy Research* 2006; 68: 22-28.
98. De Deyen PP, D'Hooge R, Marescau B, Pei Y. Chemical models of epilepsy with some reference to their applicability in the development of anticonvulsants. *Epilepsy Research* 1992; 12: 87-110.
99. Meldrum B. Do preclinical seizure models preselect certain adverse effects of antiepileptic drugs. *Epilepsy Research* 2002; 50:33-40.
100. Lecci A, Borsini F, Volterra G, Meli A. Pharmacological validation of a novel model of anticipatory anxiety in mice. *Psychopharmacology* 1990; 101: 255-61.
101. Hoog S. A Review of the Validity and Variability of the Elevated Plus-Maze as an Animal Model of Anxiety. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 1996; 54 (1): 21-30.
102. Madden JS. Psychiatric advances in the understanding and treatment of alcohol dependence. *Alcohol and Alcoholism* 1984; 19: 339-53.
103. Roelofs SM. Hyperventilation, anxiety, craving for alcohol: a sub-acute alcohol withdrawal syndrome. *Alcohol* 1985; 2 (3): 501-05.
104. Shimura T, Imaoka H, Yamamoto T. Neurochemical modulation of ingestive behavior in the ventral pallidum. *European Journal of Neuroscience* 2006; 23:1596–1604.
105. Saul'skaya NB, Solov'eva NA, Savel'ev SA. Glutamate Release in the Nucleus Accumbens During Competitive Presentation of Aversive and Appetitive Stimuli. *Neuroscience and Behavioral Physiology* 2006; 36 (3): 247-52.
106. Fricchione G, Stefano GB. Placebo neural systems: nitric oxide, morphine and the dopamine brain reward and motivation circuitries. *Med Sci Monit* 2005; 11(5): MS64-65.
107. Zubieta JK, Bueller JA, Jackson LR, Scott DJ, Xu Y, Koeppe RA, Nichols TE, Stohler CS. Placebo Effects Mediated by Endogenous Opioid Activity on μ -Opioid Receptors. *The Journal of Neuroscience* 2005; 25 (34): 7754 –62.
108. Ader R, Cohen N. Behaviorally conditioned immunosuppression and murine systemic lupus erythematosus. *Science* 1982; 215 (4539): 1534–36.
109. Goebel MU, Trebst AE, Steiner J, Xie YF, Exton MS, Frede S, Canbay AE, Michel MC, Heemann U, Schedlowski M. Behavioral conditioning of immunosuppression is possible in humans. *FASEB Journal* 2002; 16 (14): 1869–73.
110. Wager TD, Nitschke JB. Placebo effects in the brain: Linking mental and physiological processes. *Named Series: Brain Mechanisms of Placebo. Brain, Behavior, and Immunity* 2005; 19: 281–82.
111. Benedetti F, Colloca L, Torre E, Lanotte M, Melcarne A, Pesare M, Bergamasco B, Lopiano L. Placebo-responsive Parkinson patients show decreased activity in single neurons of subthalamic nucleus. *Nature Neuroscience* 2004; 7 (6): 587–88.

112. Mayberg HS, Silva JA, Brannan SK, Tekell JL, Mahurin RK, McGinnis S, et al. The functional neuroanatomy of the placebo effect. *The American Journal of Psychiatry* 2002; 159 (5): 728–37.
113. Petrovic P, Kalso E, Petersson KM, Ingvar M. Placebo and opioid analgesia—imaging a shared neuronal network. *Science* 2002; 295 (5560): 1737–40.
114. Gear R, Aley K, Levine J. Pain-induced analgesia mediated by mesolimbic reward circuits. *Journal of Neuroscience* 1999; 19:7175–81.
115. Horvitz J. Mesolimbic and nigrostriatal dopamine responses to salient non-rewarding stimuli. *Neuroscience* 2000; 96: 651– 56.
116. Berridge KC, Robinson TE What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience? *Brain Research Review* 1998; 28: 309 –69.
117. Will MJ, Franzblau EB, Kelley AE. Nucleus accumbens μ -opioids regulate intake of a high-fat diet via activation of a distributed brain network. *Journal of Neuroscience* 2003; 23: 2882–88.

10 NORMAS ADOTADAS

Ficha catalográfica (descritores):

BIREME – Centro Latino-Americano e do Caribe de informações em Ciências da Saúde.

DeCS – Descritores em Ciências da Saúde 3.ed.São Paulo: Bireme, 1996.

Relatório:

Normas Regulamentadoras de Pesquisa envolvendo Seres Humanos – Resoluções 196/96 e 251/97 do Conselho Nacional de Saúde – Brasil.

Normas para elaboração de Dissertação do Curso de Mestrado em Ciências Médicas. Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Mestrado em Ciências Médicas. Florianópolis-SC, 2001.

Referências:

Normas do Comitê Internacional de Editores de Revistas Médicas (Vancouver).

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. Ann Inter Med, 1997, 126:36-47.

D'Acampora AJ. Investigação Experimental: do planejamento à redação final. 1.ed. Florianópolis: Papa-Livro, 2001.