

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE BRASILEIRA

Leandro Vespoli Campos

**EFEITO DO EXTRATO DE *Hypericum perforatum* ADMINISTRADO DURANTE A
GESTAÇÃO SOBRE AS ATIVIDADES ANTINOCICEPTIVA E
ANTICONVULSIVANTE EM RATAS (F1) ADULTAS**

Juiz de Fora
2017

Leandro Vespoli Campos

Efeito do extrato de *Hypericum perforatum* administrado durante a gestação sobre as atividades antinociceptiva e anticonvulsivante em ratas (F1) adultas

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Brasileira, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial a obtenção do grau de Doutor em Saúde. Área de concentração: Saúde Brasileira.

Orientadora: Dra. Vera Marias Peters.

Co-orientadora: Dra. Rita de Cássia da Silveira e Sá

Juiz de Fora

2017

Imprimir na parte inferior, no verso da folha de rosto a ficha disponível em:
<http://www.ufjf.br/biblioteca/servicos/usando-a-ficha-catalografica/>

Leandro Vespoli Campos

Efeito do extrato de *Hypericum perforatum* administrado durante a gestação sobre as atividades antinociceptiva e anticonvulsivante em ratas (F1) adultas.

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Brasileira, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial a obtenção do grau de Doutor em Saúde. Área de concentração: Saúde Brasileira.

Aprovada em ____ de _____ de 2017.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Vera Maria Peters - Orientadora
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dra. Beatriz Julião Vieira Aarestrup
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dra. Rita de Cássia da Silveira e Sá –
Co-orientadora
Universidade Federal da Paraíba

Dra. Martha de Oliveira Guerra
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dr. Roberto Sotto Maior Fortes de Oliveira
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dra. Rachel Rocha Pinheiro Machado
Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde
de Juiz de Fora - Suprema

Dr. Hussien Machado
Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde
de Juiz de Fora – Suprema

Dr. Fernando Monteiro Aarestrup
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dr João Evangelista de Paula Reis
Universidade Federal de Minas Gerais

Dedico este trabalho aos meus pais Sebastião e Denísia,
à minha esposa Juliana e aos meus filhos Gustavo e Yasmin.

AGRADECIMENTOS

A execução desta tese teve a contribuição de pessoas importantes que conviveram e compartilharam comigo a vontade de que fosse concretizada. Alguns participaram rapidamente, enquanto outros, por mais tempo, ao longo desses anos. Todos igualmente importantes, pois, aos seus modos, fizeram-me pensar e refletir sobre como minhas atitudes estavam me conduzindo a alcançar meu objetivo.

Num primeiro momento, o apoio familiar, o consentimento de que minha convivência para realização deste sonho implicaria em abster-me da presença por inúmeras vezes da rotina familiar. Contudo, Juliana, Gustavo e Yasmin, saibam que escolhi viver minha vida com (e por) vocês e por este motivo essa conquista é nossa. A você Juliana, minha parceira incondicional, meu sol, somos cúmplices de mais essa vitória. E a vocês, meus filhos, caso se interessem por ler esta mensagem algum dia, saibam que são capazes de realizar seus sonhos. Para aqueles que me mostraram com sua dedicação e amor à família, que isso era possível, meus pais (Sebastião e Denísia), meu imensurável agradecimento. Aos meus irmãos (Fernando, Fábio, Flávio, Cintia e Maria Emília) dedico o sorriso de cada degrau superado.

A efetividade desse sonho tornou-se mais próxima, quando minha professora da graduação, Dra. Vera M. Peters me aceitou como seu orientando e, assim, deu-me condições para executar mais esse projeto de vida. Meu muito obrigado, professora, por todas as nossas conversas, pelos conselhos e ensinamentos dentro e fora das salas de aula e dos laboratórios. Também destaco os momentos em que não conversamos, mas que a confiança em nosso acordo prevalecera. Ao mesmo tempo, eu ganhava uma nova orientadora, também, até então professora da graduação, a quem tive a honra de conviver e aprender junto, meu muito obrigado à Dra. Martha O. Guerra por toda a sabedoria, delicadeza e confiança que lhe são peculiares e que me permitiram evoluir nessa etapa de minha vida. Também tive a orientação da competente Dra. Rita C. S. Sá, capaz de, mesmo que fisicamente distante, fazer-se presente em nossas conversas e trocas de arquivos e e-mails; meu muito obrigado, professora, pelo tempo dedicado e pela orientação.

Sou imensamente grato ao meu eterno amigo que iniciou essa jornada junto a mim e que com seu sorriso fraterno, incumbiu-me de ter a honra de contribuir um pouco com a realização do seu sonho: muito obrigado por tudo, meu camarada Vinícius A.

Vieira. Compartilhamos momentos em comum de estudo, sorrisos e trocas de experiências de vida...

Lorena R. Silva, minha priminha, sua presença foi fundamental para que eu nunca me esquecesse para onde e principalmente como deveria prosseguir, meu muito obrigado.

Aos amigos que fiz no CBR, professores, técnicos, alunos de graduação e pós-graduação, cujos nomes estão em meu coração, meu muito obrigado pelo apoio com os animais e com os experimentos e, principalmente, pela sinceridade e certeza de que nossas amizades continuarão.

Também não poderia deixar de agradecer aos meus amigos docentes que indubitável e diariamente compartilham dessa alegria. Meu muito obrigado por terem me acolhido e me substituído durante as aulas das quais precisei me ausentar, mas principalmente, pelas discussões e aprendizados que, na maioria das vezes, aconteceram na sala dos professores, bancadas de laboratórios e corredores: Fabrício Oliveira, Rachel Machado e Celso Matias, além daqueles que também estão em meu coração, meus sinceros agradecimentos. Aos meus coordenadores e gestores de curso que permitiram que essa conquista fosse possível, ao confiarem em mim e remanejarem os horários de aulas, quando foi necessário.

Agradeço à Rede Mineira de Bioterismo (FAPEMIG – CVZ RED 00009/14) à Rede Mineira de Toxicologia (FAPEMIG – CBB RED 00008/14) pelo fornecimento dos animais e equipamentos necessários para a realização desta pesquisa.

Meu muito obrigado a todos...

“Se eu vi mais longe, foi por estar de pé sobre ombros de gigantes.”
Isaac Newton

RESUMO

O *Hypericum perforatum* (HP) é uma espécie utilizada classicamente como um fitoterápico antidepressivo e ansiolítico. Seus diferentes compostos (hipericina e hiperforina) proporcionam muitos outros efeitos, tais como: antinociceptivo e anticonvulsivante. O objetivo desta tese foi investigar a passagem do extrato hidroalcoólico de *H. perforatum* pelas barreiras placentária e hematoencefálica fetal e seus prováveis efeitos antinociceptivo, anticonvulsivante, ansiolítico e antidepressivo sobre os descendentes ao atingirem a idade adulta. Para isto, ratas Wistar receberam doses de 36, 72 e 144 mg/kg de HP ao longo de toda a gestação, por via oral. A fluorescência observada demonstrou a presença do extrato de HP em todos os tecidos analisados tanto das ratas gestantes, quanto dos fetos. Testes para avaliação da atividade antinociceptiva e anticonvulsivante do extrato de HP foram realizados em ratas F1 adultas, as quais apresentaram aumento de ambas as respostas. Testes para avaliação das atividades ansiolítica e antidepressiva do extrato de HP foram realizados com ratos F1 adultos, resultando também em aumento desses efeitos. Estes resultados sugerem que a administração de HP durante a gestação provocou mudanças no neurodesenvolvimento de regiões cerebrais relacionadas com o controle da dor, convulsão, ansiedade e depressão em seus descendentes.

Palavras-chave: *Hypericum perforatum*, dor aguda, convulsão epiléptica, ansiedade, depressão, distúrbios do neurodesenvolvimento, reprogramação celular.

ABSTRACT

Hypericum perforatum (HP) is a classically used species as an antidepressant and anxiolytic herbal remedy. Its different compounds (hypericin and hyperforin) provide many other effects, such as: antinociceptive and anticonvulsive. The objective of this thesis was to investigate the passage of the hydroalcoholic extract of *H. perforatum* through placental and fetal blood-brain barrier and the probable antinociceptive, anticonvulsive, anxiolytic and antidepressant effects on offspring as they reach adulthood. Wistar rats received oral doses of 36, 72 and 144 mg/kg of HP throughout gestation. The observed fluorescence indicated the presence of the extract in all tissues analyzed from both pregnant rats and fetuses. Tests for evaluation of antinociceptive and anticonvulsant activity of HP extract were performed on adult F1 rats, which showed an increase in both responses. Tests for evaluation of anxiolytic and antidepressant activities of HP extract were performed on adult F1 rats, also resulting in an increase in these effects. These results suggest that the administration of HP during gestation caused changes in the neurodevelopment of brain regions related to the control of pain, seizure, anxiety and depression in their offspring.

Key words: *Hypericum perforatum*, acute pain, convulsion, anxiety, neurodevelopmental disorder, depression, cell reprogramming.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – <i>Hypericum perforatum</i>	4
Figura 2 - <i>Hypericum perforatum</i>	5
Figura 3 – (A) Hipericina; (B) – Hiperforina.....	9
Figura 4 - Mecanismos de ação do extrato de <i>Hypericum perforatum</i>	14
Figura 5 - Esquema da via de transmissão nociceptiva e seus mecanismos de controle.	19
Figura 6 - Estímulos relacionados à propagação de impulsos convulsivantes.....	22
Figura 7 - Administração de extrato de <i>H. perforatum</i> (ou água destilada).....	31
Figura 8 - Aparelho KODAK in-Vivo Imaging System FX Pro para avaliação da biodistribuição do extrato hidro-alcoólico de <i>H. perforatum</i>	33
Figura 9 - Teste da placa quente (hot plate).....	34
Figura 10 - Teste de edema de pata, induzido por injeção plantar de formalina (50 µL de formalina - 0.92%).....	36
Figura 11 - Aparelho do teste da barra giratória – rotarod (modelo LE 8200, Panlab ^R) para observação de coordenação motora.....	39
Figura 12 - Labirinto em cruz elevado.....	41
Figura 13 - Aparelho para teste da placa perfurada (LE 8811, Panlab ^R).....	42
Figura 14 - Artigo 1: “Rats treated with <i>Hypericum perforatum</i> during pregnancy generate offspring with behavioral changes in adulthood”	44
Figura 15 - Artigo 2: “Effect of the extract of <i>Hypericum perforatum</i> on neurodevelopment of regions related to pain control and convulsion”	45

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1.	<i>Hypericum perforatum</i>	4
2.1.1.	Uso terapêutico	9
2.1.1.1.	Depressão.....	9
2.1.1.2.	Mecanismo de ação do <i>Hypericum perforatum</i>	11
2.2.	AÇÃO DO EXTRATO DE <i>H. perforatum</i> SOBRE O SISTEMA NERVOSO CENTRAL	14
2.2.1.	Extrato de <i>H. perforatum</i> e atividade antinociceptiva	17
2.2.2.	Extrato de <i>H. perforatum</i> e a atividade anticonvulsivante	21
2.3.	EXTRATO DE <i>H. perforatum</i> E O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO	23
3.	HIPÓTESE	28
4.	OBJETIVOS	28
4.1.	OBJETIVO GERAL.....	28
4.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
5.	MATERIAL E MÉTODOS	30
5.1.	ANIMAIS E ALOJAMENTO.....	30
5.2.	TRATAMENTO COM EXTRATO DE <i>H. perforatum</i>	31
5.3.	ENSAIO DE BIODISTRIBUIÇÃO DO EXTRATO DE <i>H. Perforatum</i>	32
5.4.	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA.....	33
5.4.1.	Teste da placa quente (<i>hot plate</i>)	33
5.4.2.	Teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético	34
5.4.3.	Teste do edema de pata	35
5.5.	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICONVULSIVANTE.....	36
5.5.1.	Episódios convulsivos induzidos por pentilenotetrazol (PTZ)	36
5.5.2.	Convulsão induzida por pilocarpina (PLC)	37
5.5.3.	Convulsão induzida por eletrochoque auricular	38
5.6.	AVALIAÇÃO DOS EFEITOS NÃO ESPECÍFICOS SOBRE O SISTEMA NERVOSO CENTRAL	39
5.6.1.	Teste da barra giratória (rotarod)	39

5.6.2.	Tempo de sono induzido por pentobarbital	40
5.7.	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANSIOLÍTICA	40
5.7.1.	Ensaio de labirinto em cruz elevado	40
5.7.2	Teste da placa perfurada	41
5.8.	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIDEPRESSIVA	42
5.8.1.	Teste do nado forçado	42
5.9.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	43
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
6.1.	ARTIGO 1	44
6.2.	ARTIGO 2	45
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	46
8.	CONCLUSÃO	47
9.	REFERÊNCIAS	48
	APÊNDICE A	60
	APÊNDICE B	83

1. INTRODUÇÃO

Os fitoterápicos são utilizados há séculos pela população mundial para o tratamento de uma grande variedade de enfermidades. Dentre as espécies utilizadas como fitoterápicos, tem-se a espécie¹ *Hypericum perforatum* que é conhecida popular e comercialmente como erva de São João ou hipérico. Ela pertence à família *Hypericaceae*, que pode ser encontrada sob a forma de árvores ou arbustos, com distribuição ampla pelo planeta, em especial, no hemisfério Norte (GREESON *et al.*, 2001; LINDE, 2009). Dentre outros componentes, o *H. perforatum* contém: naftodiantronas (hipericina), fluroglucinois (hiperforina), biflavonoides, diferentes substâncias presentes em seus óleos essenciais e procianidinas (BARNES, J. *et al.*, 2001; MENNINI, 2004).

Alguns dos efeitos descritos para o *H. perforatum* são: antidepressivo, ansiolítico, antinociceptivo, anticonvulsivante (MÜLLER, 2003; VIEIRA *et al.*, 2013), além de ser usada no tratamento contra úlcera péptica, mialgia, queimadura, cefaleia, paralisia, tétano, insônia, histeria; também possui ação hipoglicemiante, antiaterogênica e para o tratamento do alcoolismo e do tabagismo (OZTURK, 1997; SHARPLEY *et al.*, 1998; PANOCKA *et al.*, 2000; LAGNER *et al.*, 2007).

Classicamente, atua contra quadros depressivos que manifestam episódios de leve a moderado e contra episódios de ansiedade, os quais se tornam mais acentuados durante a gravidez (HOBAN *et al.*, 2015). Essas ações acontecem através de diferentes mecanismos, como da inibição da

¹Como o termo *Hypericum perforatum* refere-se à espécie, o uso do artigo feminino faz-se necessário. Contudo, devido ao uso popular e científico deste termo, nesta tese, a espécie será precedida do artigo masculino, sendo tratada como "o *H. perforatum*".

recaptação de serotonina (5-HT), noradrenalina, dopamina, ácido γ - aminobutírico (GABA) em diferentes regiões cerebrais; além do aumento da liberação destes neurotransmissores nas fendas sinápticas (SCHMIDT, 2015).

Segundo a Organização mundial de Saúde, a depressão será a segunda maior comorbidade mundial em 2020 (SCHMIDT, 2015). As mulheres são as principais afetadas pela depressão, as quais podem manifestá-la em diferentes fases da vida, como no período gestacional (HOBAN *et al.*, 2015). Cerca de 10% das gestantes apresentam depressão gestacional (BENNETT *et al.*, 2004). Apesar de fármacos antidepressivos e ansiolíticos poderem atravessar a barreira placentária e serem encontrados no líquido amniótico (MOORE *et al.*, 2013), não há relatos na literatura demonstrando que o mesmo acontece com o extrato de *H. perforatum*.

Ações antidepressiva e ansiolítica do extrato hidroalcoólico de *H. perforatum* foram demonstradas em ratas Wistar que receberam 144 mg/kg durante toda a gestação em até 10 e 60 dias após o término do tratamento, caracterizando eficiência e manutenção dos efeitos desse extrato sobre o sistema nervoso central (VIEIRA *et al.*, 2013).

O efeito anticonvulsivante se deve à ativação de receptores para opioides e para serotonina (5HT), mas principalmente pela ativação de receptores para GABA localizados principalmente no hipocampo (HOSSEINZADEH *et al.*, 2005; IVETIC *et al.*, 2011).

O efeito antinociceptivo decorre da ativação de receptores para GABA, opioides, noradrenérgicos e serotoninérgicos tanto na região periaqueducal (no mesencéfalo), quanto na medula espinhal. Além disso, o extrato de *Hypericum perforatum* (EHP) também apresenta esta ação ao inibir a liberação de

mediadores álgicos associados ao quadro de inflamação (UCHIDA *et al.*, 2008; OZDEMIR *et al.*, 2012).

A ANVISA preconiza que as formas comerciais usadas para o tratamento destes distúrbios possuam 0,3% de hipericina (ANVISA, 2008). Tal dosagem permite que esse fitoterápico manifeste menos efeitos adversos do que os fármacos antidepressivos clássicos (BRATTSTROM, 2009). Ele possui metabolização hepática e por este motivo é capaz de interagir com uma grande diversidade de drogas: anticoagulantes, drogas anti-HIV, anti-inflamatórios, contraceptivos e imunossupressores (RUSSO *et al.*, 2014), as quais também são metabolizadas através de isoformas das enzimas P450 (MÜLLER, 2003). Além disso, possui excreção renal e pode ser encontrado no leite materno (MÜLLER, 2003). Contudo, não é conhecida sua relação com a barreira hematoencefálica fetal em formação, nem as consequências sobre a neurogênese diante da exposição a este extrato.

Dessa forma, o objetivo deste estudo foi investigar a passagem do extrato hidroalcoólico de *H. perforatum* pelas barreiras placentária e hematoencefálica fetal e seus prováveis efeitos antinociceptivo, anticonvulsivante, ansiolítico e antidepressivo sobre os descendentes.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Hypericum perforatum*

Hypericum perforatum (HP) (Figura 1), conhecido popularmente como erva de São João, hipérico ou milfurada, possui flores com coloração amarelada e é uma erva nativa da Europa, oeste da Ásia, Norte da África, como também da América do norte e do Sul. O gênero *Hypericum* pertence à família *Hypericaceae* e contém aproximadamente 370 espécies descritas (CECCHINI, 1980; PINTO, 1987; GREESON *et al.*, 2001; LINDE, 2009).

Figura 1: *Hypericum perforatum*

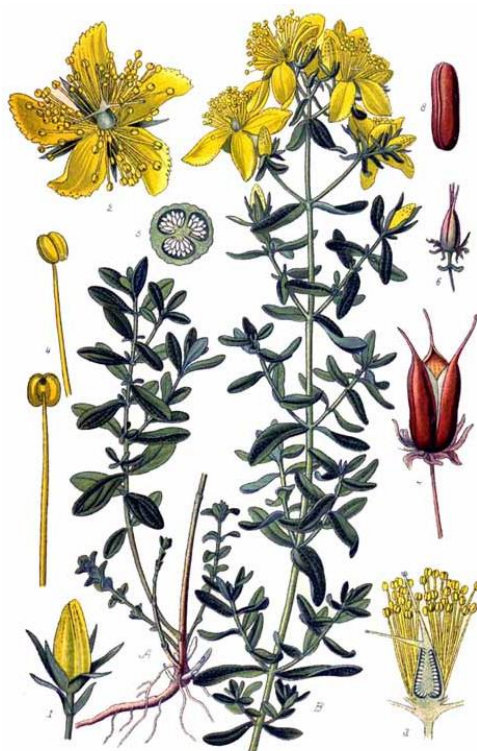


Fonte: <http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/geral/ExibeFiguraFSIUC/ExibeFiguraFSIUC.do?idFigura=17023381> acessado em 01/03/2017.

Essa família possui árvores ou arbustos e apresentam glândulas translúcidas, vermelhas ou pretas, ricas em óleos essenciais, os quais são compostos por diversas substâncias (Figura 2). Suas folhas são simples, opostas, sem estípulas, possuem de quatro a cinco sépalas com estivação imbricada (sobrepõem-se umas às outras). As flores são hermafroditas, actinomórficas (simetria radial). As pétalas (de quatro a cinco) são livres, com

prefloração contorcida (sobrepõem-se umas às outras). Os estames são poliadelfos (possuem filetes separados). O ovário pode ser bi, tri ou pentacelular e súpero (localizado no centro do receptáculo), com placentação axial (seus óvulos inseridos na borda). Os frutos são cápsulas (secos deiscentes), septicidas (abrem-se por fendas entre os septos), bagas ou drupas, dependendo da espécie. Suas sementes não são ariladas e as quantidades de seus componentes variam de acordo com a espécie (PINTO, 1987; HAMMER, 2014).

Figura 2: *Hypericum perforatum*



Pl. 61. *Millepertuis perforé*. *Hypericum perforatum* L.

Fonte: http://www.hear.org/pier/imagepages/singles/61_Hypericum_perforatum_L.htm acessado em 01/03/2017

A palavra “*Hypericum*” é originada do grego e significa hiperativo (sobre), enquanto “*Eikon*”, imagem, faz referência ao seu uso como uma planta que era pendurada sobre quadros de deuses (ícones) para manter o controle sobre poderes de mal. A denotação “*perforatum*” decorre da presença de pequenas

glândulas de óleo nas folhas que parecem perfurações (CECCHINI, 1980; PINTO, 1987; GREESON *et al.*, 2001; LINDE, 2009). A nomenclatura erva de São João faz referência à floração que ocorre próximo à data de comemoração de São João (24 de Junho) (BARNES, J. *et al.*, 2001).

Partes secas desta planta como caule, folhas e flores, proporcionam o preparo de extratos, chás e o isolamento de óleos. Fatores externos, tais como, clima e estação do ano, interferem sobre a quantidade de componentes químicos encontrados na planta. De acordo com o processo industrial utilizado para extração de seus componentes, as combinações que contém suas preparações podem variar em qualidade e quantidade de produtos, sendo o extrato alcoólico o mais encontrado na literatura (GREESON *et al.*, 2001; WILHELM *et al.*, 2001; KUMAR, 2006; LINDE, 2009).

Em 1996, na Alemanha, onde seu uso é licenciado, o EHP foi o fitoterápico mais utilizado no país, sendo prescritos 131,5 milhões de doses diárias. Na maioria delas (50 – 80 %), foi utilizado extrato etanólico em concentrações de 500 – 1200 mg. Rússia e Polônia são os países que lideram o uso deste extrato. Porém, em parte da Europa e nos Estados Unidos, seu extrato é utilizado como suplemento alimentar, o que dificulta acesso às informações a respeito de sua utilização popular (GREESON *et al.*, 2001; NEWPORT *et al.*, 2001; KNUPPEL, 2004; LINDE, 2009).

Esse extrato também apresenta propriedades sedativa e antioxidante. Preparações baseadas em óleos podem ser usadas para tratamento contra úlceras pépticas, mialgias e queimaduras, cefaleia, paralisia, tétano e histeria (OZTURK, 1997; SHARPLEY *et al.*, 1998). Além disso, apresenta efeito

hipoglicemiante, antiaterogênico e é usado no tratamento de casos com abuso de álcool e de nicotina, em alguns casos, de insônia (por aumentar a latência para início do sono REM) (PANOCKA *et al.*, 2000; LAGGNER *et al.*, 2007; UZBAY, 2008; LINDE, 2009).

Os principais componentes químicos isolados desta espécie pertencem a grupos lipofílicos e hidrofílicos de moléculas. No primeiro caso, têm-se: naftodiantronas (hipericina e pseudohipericina); fluroglucinois (hiperforina e adhiperforina); biflavonoides (biapigenina) e óleos essenciais (terpenos e álcoois). Alguns de seus componentes hidrofílicos são: procianidinas (catequina e pro-catequina); fenois (vanílico, hidroxibenzoico), flavonoides (quercetina e rutina) e ácidos (isovalerianico, nicotínico, palmítico, dentre outros) (GREESON *et al.*, 2001; KNUPPEL, 2004; LINDE, 2009).

Esta grande variedade de componentes pode atuar em conjunto (sinergicamente), ou seja, cada um deles contribui parcialmente para determinado efeito, como também individualmente. Isto faz com que esta planta seja considerada de ação polivalente quanto às suas atividades biológicas. Entretanto, quando alguns de seus princípios ativos são utilizados isoladamente, podem não ser observadas as mesmas ações encontradas após a administração do extrato. Alguns componentes necessitam de ativação pela luz, ao contrário de outros, o que também interfere nos efeitos do extrato, enquanto que outros podem interferir sobre o grau de absorção e distribuição de outros componentes do extrato (SARRIS *et al.*, 2011; HAMMER, 2014).

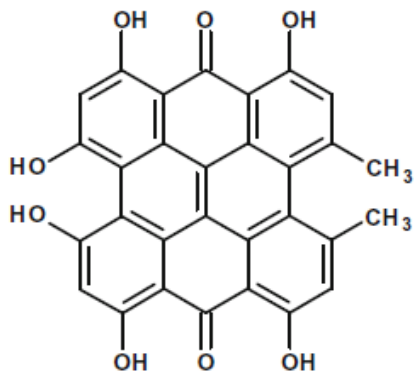
Os princípios ativos mais importantes do *H. perforatum* são as naftodiantronas (hipericina e pseudo-hipericina, iso-hipericina) e os

fluroglucinois (hiperforina e ad-hiperforina), relacionados à sua atividade antidepressiva. Dependendo da fase do desenvolvimento da planta, a concentração do primeiro grupo pode variar entre 0,03% a 0,3% do extrato bruto e a concentração de hiperforina, entre 0% e 6%. Contudo, suas concentrações em preparações do extrato variam de acordo com o solvente, sendo a hipericina extraída mais facilmente a partir de extratos que contenham concentração maior ou igual a 50% de etanol ou metanol (LINDE, 2009; HAMMER, 2014).

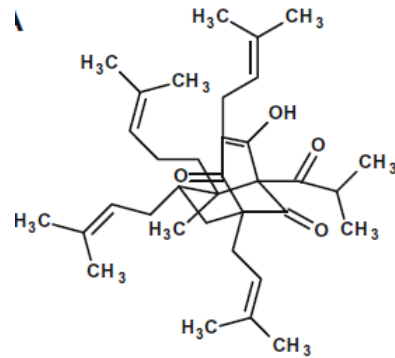
A hipericina (Figura 3A) é encontrada principalmente nas folhas e flores da planta. Administrada isoladamente atinge concentrações nanomolares no plasma, das quais 8 % a 40 % alcançam o cérebro (MENNINI, 2004). Seu pico de concentração plasmática é atingido entre 2 h a 2h 40 minutos e sua meia-vida, entre 24 h e 26 h (BARNES, J. *et al.*, 2001).

A hiperforina (Figura 3B) é mais encontrada em frutos verdes de algumas espécies de *Hypericum sp.* Seu pico de concentração plasmática é atingido entre 3h e 30 minutos e apresenta meia – vida de 9 h (BARNES, J. *et al.*, 2001; MEDINA *et al.*, 2006).

Figura 3: A- Hipericina; B- Hiperforina.



A- Hipericina



B- Hiperforina

Fonte: (FRIEDLAND, 2015)

2. 1. 1. Uso terapêutico

2.1.1.1. Depressão

Classicamente, o EHP é usado como fitoterápico para o tratamento contra depressão de leve a moderada, ansiedade e episódios de agitação nervosa. Estima-se que a depressão será a segunda maior comorbidade em 2020, ficando atrás dos problemas cardiovasculares, o que causará um grande impacto socioeconômico à população mundial (SARRIS *et al.*, 2011).

A depressão é um tipo de distúrbio de humor com características complexas e sintomas variados como humor depressivo e anedonia; pode estar acompanhada de ansiedade e falta de interesse em geral pelo aprendizado e por atividades práticas do dia-a-dia (FAROOQ *et al.*, 2017). Geralmente associada à ansiedade, a fisiopatologia de ambas envolve anormalidades na neurotransmissão de 5-HT, GABA, noradrenalina e glutamato. Por isso, os inibidores de recaptação de 5-HT e/ou de noradrenalina e os benzodiazepínicos são os fármacos de escolha para seu tratamento (SARRIS *et al.*, 2011; MARRELLI *et al.*, 2015). Medidas de ordem

geral como atividade física regular e controle alimentar podem contribuir com a melhoria da qualidade de vida do paciente, principalmente nos casos de depressão maior (NAHAS, 2011).

Suas causas são desconhecidas, apesar de muita pesquisa envolvida no tema. Alguns estudos tentam associar a fisiopatologia da depressão com uma alteração no eixo hipotálamo - hipófise – adrenal, com momentos de maior e outros de menor ativação deste eixo, em pacientes com depressão grave (O'KEANE *et al.*, 2012). Contudo, suas causas são bastante complexas, com hipóteses que a associam desde às alterações no neurodesenvolvimento (neurogênese e sinaptogênese) até aos fatores ambientais pós-natais (CAVIEDES *et al.*, 2017). Essas alterações somadas à liberação de citocinas pró-inflamatórias (interleucina-1 β) tem sido relacionadas com o desenvolvimento da depressão, ao provocarem aumento da produção glutamato, neurotransmissor causador de estresse oxidativo, o que leva à degeneração neuronal comum em quadros depressivos (FAROOQ, 2017).

Cerca de 10 % das gestantes apresentam depressão pós-parto, mais comumente com sintomas aparecendo entre o segundo e terceiro trimestre de gestação (BENNETT *et al.*, 2004). Apesar de suas causas serem, até certo ponto desconhecidas, alguns estudos estão relacionando o surgimento de sintomas depressivos aos distúrbios endócrinos envolvendo estrógeno e progesterona (BLOCH *et al.*, 2003). Sua identificação precoce e tratamento são fundamentais para prevenir a cronicidade desta patologia. Psicoterapia e uso de medicamentos são indicados para o tratamento durante este período, mas se deve atentar quanto aos efeitos indesejados que podem surgir na gestante, na lactante e no próprio feto

em desenvolvimento (TSCHUDIN, 2005). Os inibidores seletivos de recaptção de serotonina são os psicofármacos mais indicados para tratamento do que os antidepressivos tricíclicos (nestes casos), uma vez que apresentam pouco potencial teratogênico. Porém, há poucos registros na literatura de efeitos sobre os descendentes nascidos de mães tratadas com esses grupos de medicamentos durante a gestação (TSCHUDIN, 2005).

2.1.1.2. Mecanismo de ação do *Hypericum perforatum*

Estudos *in vitro* demonstraram a ação do EHP através da inibição da enzima metabolizadora monoaminoxidase (iMAO). Porém, isso não foi comprovado por estudos *in vivo*. O efeito antidepressivo do *H. perforatum* é atribuído principalmente aos metabólitos hipericina e hiperforina, mas principalmente ao último (MENNINI, 2004).

Os flavonoides, apesar de possuírem ação antidepressiva e anti-inflamatória, assim como outros componentes do EHP, atuam como coadjuvantes nas propriedades farmacológicas da hipericina e da hiperforina, tornando-os mais biodisponíveis no plasma e interferindo sobre a distribuição de ambos para tecidos específicos, como no sistema nervoso central (SNC) (SARRIS *et al.*, 2011; HAMMER, 2014).

As hiperforina e ad-hiperforina atuam pouco sobre a inibição da recaptção de serotonina, dopamina, noradrenalina, GABA e glutamato. Especificamente, ligam-se e ativam receptor tipo canal de cátion de potencial transitório, membro 6 (TRPC6) (do inglês, *Transient Receptor Potential cation Channel Subfamily C member 6*), induzindo a entrada de cálcio (Ca^{2+}) e sódio (Na^+) na célula, o que causa liberação

de neurotransmissores na fenda sináptica, funcionando, portanto, como um agonista indireto. Eles também atuam sobre a membrana externa da mitocôndria, promovendo a saída de cátions (H^+ , Ca^{2+} e Zn^+) para o citoplasma, o que leva à saída dos neurotransmissores de suas vesículas para o citoplasma e a sua consequente liberação para a fenda sináptica. O TRPC6 é codificado pelo gene do mesmo nome, cuja expressão está sendo associada à depressão e à ansiedade em humanos (LEUNER *et al.*, 2007; BOURON, 2014; FRIEDLAND, 2015; ZENG *et al.*, 2016). A hiperforina liga-se fracamente aos receptores para dopamina (D_1) (*in vitro*) e com alta afinidade aos receptores opioides e para serotonina ($5-HT_1$), dopamina (D_2, D_3, D_4 e D_5), neuropeptídeos Y_1 e Y_2 ; sigma; e $GABA_A$ (MENNINI, 2004; SCHMIDT, 2015).

Isoladamente a hipericina não promove inibição das recaptações dos neurotransmissores padrões mencionados, mas ativam receptores D_3 no SNC, o que ressalta sua importância como princípio psicoativo, uma vez que esta catecolamina interfere no funcionamento de diversos tipos de neurônios e células da neurógia (MÜLLER, 2003).

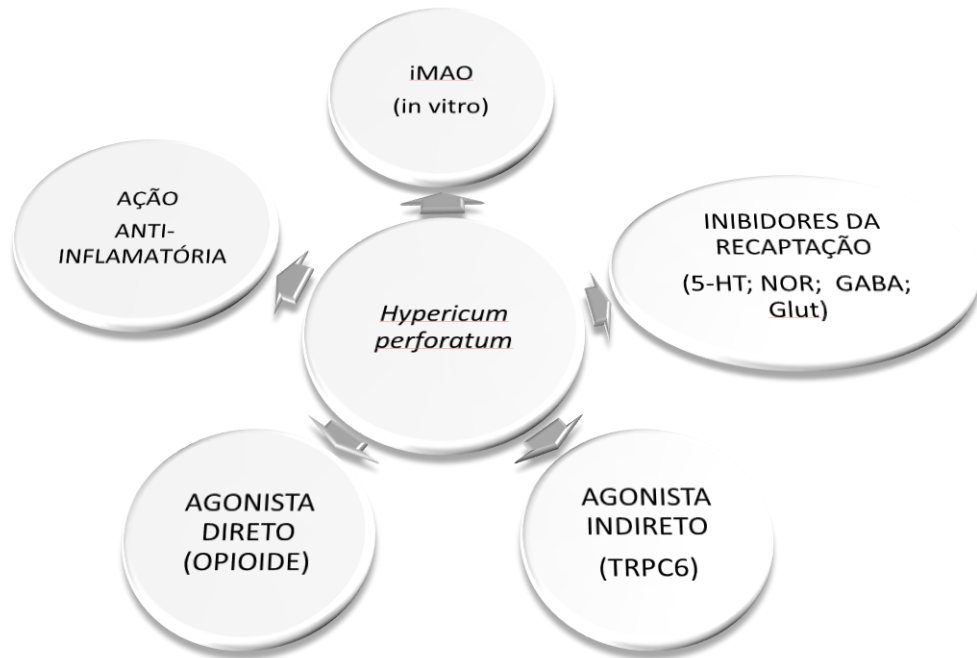
Estudos utilizando cultura de células PC-12 (linhagem celular derivada de feocromocitoma) expostas ao EHP demonstraram efeito inibidor de apoptose, induzida por peróxido de hidrogênio, como também sua participação no processo antioxidativo em cultura de células nervosas (HUNT *et al.*, 2001; BENEDI *et al.*, 2004; UZBAY *et al.*, 2007; ZOU *et al.*, 2010). Em ratos, o extrato apresentou efeito protetor contra doença inflamatória do intestino, induzida por ácido sulfônico 2,4,6-trinitrobenzeno (TNBS), provavelmente devido aos efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes (DOST *et al.*, 2009).

O Centro de Iowa para Pesquisa em Suplementos Dietéticos Botânicos demonstrou a ocorrência de propriedades antivirais e anti-inflamatórias através da inibição da síntese de prostaglandina E₂ (PGE₂) pelo *H. perforatum* (BIRT *et al.*, 2009). Outros estudos também demonstraram a ação anti-inflamatória deste extrato em diferentes órgãos de roedores, a saber: pulmões, pâncreas e intestino (BARNES, J. *et al.*, 2001; GENOVESE *et al.*, 2006; HU *et al.*, 2006; DI PAOLA *et al.*, 2007; HAMMER *et al.*, 2007).

A diversidade de substâncias presentes nos componentes do EHP é responsável pelo surgimento de efeitos adversos: fotossensibilidade, distúrbios gastrointestinais, reações cutâneas, hipersensibilidade em nervos sensoriais, neuropatia em regiões da pele expostas ao sol, alterações neurológicas e diminuição da mobilidade espermática (SARRIS *et al.*, 2011).

Ao ser administrado concomitantemente a outros fármacos, o EHP pode diminuir suas concentrações plasmáticas, apesar de também reduzir efeitos adversos de outros medicamentos (Figura 4) (HU *et al.*, 2005; SHIBAYAMA *et al.*, 2007; HOHMANN *et al.*, 2015). Tais interações estão relacionadas à variação nas concentrações de seus componentes, particularmente à hiperforina, uma vez que é ativador da família de enzimas metabolizadoras hepáticas P450 (CYP3A4, CYP1A2 e CYP2C9), além de inibidor de outras isoformas (CYP2D6, CYP2C9, CYP3A4, CYP1A2 e CYP2C19) (MÜLLER, 2003; RUSSO *et al.*, 2014).

Figura 4: Mecanismos de ação do extrato de *Hypericum perforatum*



5-HT: serotonina; NOR: noradrenalina; GABA: ac. γ amino-butírico; Glut: glutamato.

2.2. Ação do extrato de *H. perforatum* sobre o sistema nervoso central

O EHP possui ação sobre vários neurotransmissores no SNC, onde atua inibindo a recaptação de noradrenalina, serotonina, dopamina, GABA e L-glutamato e como agonista indireto destes neurotransmissores. Além disso, atua como agonista direto de receptores opioides (MÜLLER, 2003; SCHMIDT, 2015).

Estudos realizados em ratos evidenciaram que seu tratamento com EHP resultou no aumento das concentrações de noradrenalina nos neurônios localizados no *núcleo accubens* e núcleo estriado, apesar de não se saber se este efeito ocorreu devido à inibição da recaptação destes neurotransmissores ou se foi resultante de mecanismos indiretos, como aumento de sua síntese e/ou secreção ou diminuição

de sua degradação (MENNINI, 2004). Contudo, a maior disponibilidade de noradrenalina na fenda sináptica permite que estes neurotransmissores liguem-se aos seus diferentes tipos de receptores ($\alpha_{1,2}$ e $\beta_{1,2,3}$), os quais pertencem à família dos receptores acoplados à proteína G (RAPG) α_1 : PTNGq (ativação da fosfolipase C); α_2 : PTNGi (inibição da adenilatociclase); β_1 : PTNGs (ativação da adenilatociclase); β_2 : PTNGs (ativação da adenilatociclase); β_3 : PTNGs (ativação da adenilatociclase) (BRUNTON *et al.*, 2012). Tais mecanismos estão relacionados aos efeitos antinociceptivo, ansiolítico e antidepressivo do EHP (MÜLLER, 2003).

A serotonina (5-hidroxitriptamina - 5-HT) desencadeia seus efeitos a partir da ligação a uma grande variedade de tipos e subtipos de receptores (quatro tipos e 14 subtipos), todos RAPG (exceto o 5HT₃ – canal iônico), e tem sua concentração aumentada por ação da hiperforina, principalmente no *núcleo coeruleus* de ratos e nos núcleos da rafe (MENNINI, 2004). Estes mecanismos também estão relacionados aos efeitos antinociceptivo, ansiolítico e antidepressivo do EHP (MÜLLER, 2003).

O GABA liga-se a receptores dos tipos canais iônicos que permitem a entrada de cloreto (Cl⁻), responsável por hiperpolarizar a célula neuronal. Possui sua concentração na fenda sináptica regulada por transportadores pré- e pós-sinápticos distribuídos por diferentes regiões do SNC. O EHP promove a ativação desses canais e transportadores, que participam da manutenção de efeitos antinociceptivos e anticonvulsivantes (RANG *et al.*, 2007; BRUNTON, 2012; BONIN, 2013).

O EHP promove ativação direta de receptores opioides, principalmente através da hiperforina, os quais podem ser encontrados em diferentes regiões do encéfalo (núcleo do trato solitário, áreas límbicas, hipófise e tronco-cerebral) e

medula espinhal, além de outros órgãos: ilhotas pancreáticas, vasos sanguíneos, coração e pulmão (GALEOTTI *et al.*, 2010a; HOSSEINI *et al.*, 2011). Existem diferentes tipos de receptores: mi (μ), kappa (κ) e delta (δ), os quais também pertencem à família dos receptores acoplados a proteína G (RAPG). A associação dos ligantes aos respectivos receptores, todos do tipo G_i/G_0 , desencadeia os seguintes eventos intracelulares: inibição da adenililato ciclase, diminuição da abertura de canais de Ca^{2+} sensíveis à voltagem, abertura de canais de potássio (K^+) e ativação das fosfolipase C e fosfoquinase C (RANG *et al.*, 2007; BRUNTON, 2012). Tais mecanismos estão relacionados ao efeito antinociceptivo promovido pelo EHP (MÜLLER, 2003).

A exposição contínua das células a esses e outros neurotransmissores as leva a um estado de refratariedade funcional conhecido como hiporregulação (dessensibilização ou taquifilaxia), o qual se manifesta através da inacessibilidade temporária do receptor ao agonista (pela inibição enzimática de vias de sinalização intracelular) ou por meio da diminuição do número de receptores (*down-regulation*) (RANG *et al.*, 2007; BRUNTON, 2012). O EHP causa alterações em certos neurônios, tais como: diminuição do número de receptores β -adrenérgicos e de 5-HT_{2A} (córtex frontal) e aumento da densidade de receptores 5-HT_{1A}. Tais alterações são dependentes de fatores como dose, tempo de tratamento e área do cérebro analisada, os quais, conseqüentemente, interferem nos efeitos do extrato (LIANG *et al.*, 2007).

2.2.1. Extrato de *H. perforatum* e atividade antinociceptiva

Independentemente do seu mecanismo de ação, a dor possui importância evolutiva por alertar o organismo para situações de estresse (UCHIDA *et al.*, 2008).

O estímulo doloroso é captado por nociceptores que estão conectados a fibras aferentes nociceptivas, as quais possuem um limiar alto para excitação e podem ser estimuladas mecânica, térmica, ou quimicamente. Cerca de 80% delas (nos humanos) são fibras do tipo C, desmielinizadas (com baixa velocidade de condução do impulso); o restante corresponde às fibras mielinizadas, denominadas A δ (A-delta) que conduzem o impulso bem mais rapidamente. Ambas respondem a estímulos periféricos semelhantes (Figura 5-A). Experimentos em humanos mostraram que fibras C causam dor sob forma de queimação difusa, enquanto fibras A δ causam sensação de dor aguda e bem localizada na pele (BRANDÃO, 2004; RANG *et al.*, 2007; CORTEZ, 2008; SILVA, 2010; BRUNTON, 2012).

Distúrbios do SNC (acidente vascular cerebral e esclerose múltipla) ou afecções associadas às lesões de nervos periféricos (traumas mecânicos, neuropatia diabética ou infecções por *Herpes zoster*) caracterizam a chamada dor neuropática. Seus mecanismos, apesar de ainda pouco conhecidos, estão relacionados com redistribuição de canais de Na⁺ sensíveis à voltagem e até à expressão de receptores para noradrenalina (BRANDÃO, 2004; RANG *et al.*, 2007; CORTEZ, 2008; SILVA, 2010; BRUNTON, 2012). Dentre os principais sistemas envolvidos na percepção e geração dos estímulos da dor neuropática, estão os receptores ligados a diferentes canais iônicos: sensíveis aos ácidos (ácido vanílico); ao ATP (receptores P2x); a capsaicina (prótons); à temperatura e às cininas (bradicinina e calicreína), cuja ação é potencializada por prostaglandinas

(PG) e leucotrienos (LT). Além disso, participam deste processo, receptores excitatórios e inibitórios associados à proteína G (RAPG), fatores de crescimento, dentre outros (BRANDÃO, 2004; RANG *et al.*, 2007; CORTEZ, 2008; SILVA, 2010; BRUNTON, 2012).

A dor inflamatória é gerada a partir de autacoides sintetizados *de novo* (prostaglandinas, leucotrienos, histamina, serotonina, óxido nítrico e bradicinina) e pode ser controlada através da inibição de enzimas envolvidas com sua síntese (BRUNTON, 2012).

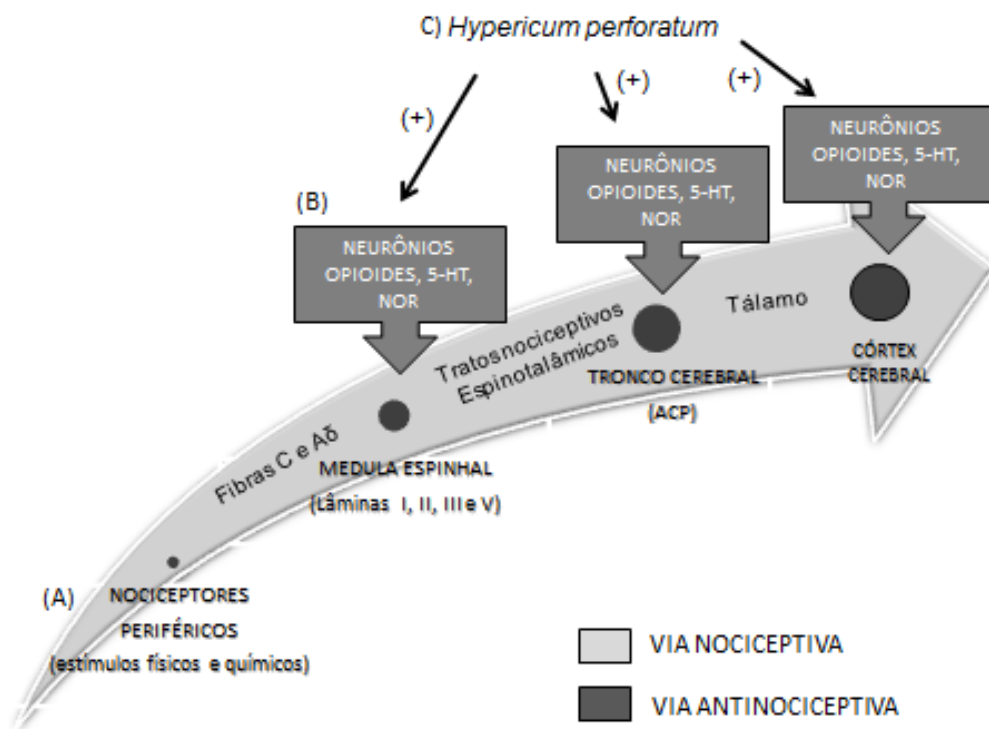
Dois neurotransmissores importantes que interferem sobre a via de transmissão da dor compreendem a 5-HT e as encefalinas (opioides), as quais atuam direta ou indiretamente ao inibir a descarga de neurônios espinotalâmicos. Esta via é um importante local de ação dos analgésicos opioides (Figura 5-B) (BRANDÃO, 2004; RANG *et al.*, 2007; CORTEZ, 2008; SILVA, 2010; BRUNTON, 2012).

Pesquisas estão sendo realizadas com o intuito de encontrarem substâncias que apresentem atividades analgésicas associadas ao mínimo de efeitos adversos. Neste contexto, destacam-se produtos naturais na forma de extratos preparados a partir de partes aéreas, raízes ou cascas de plantas, e de seus compostos isolados, como o extrato etanólico da casca da semente de *Dioclea grandiflora*, que exibe atividade antinociceptiva em camundongos, além de diferentes tipos de extratos de *H. perforatum* (SÁ *et al.*, 2010)

Estudos indicam que extratos etanólicos e metanólicos de *H. perforatum* apresentam ação antinociceptiva central (por inibição da via neurogênica) e/ou

periférica (através da inibição da via inflamatória) (Figura 5C). Entretanto, devido à variedade biológica dos modelos animais utilizados na pesquisa, assim como aos diferentes componentes dessa planta, os resultados relacionados ao seu mecanismo de ação são controversos e merecem ser esclarecidos (BUKHARI *et al.*, 2004).

Figura 5: Esquema da via de transmissão nociceptiva e seus mecanismos de controle



A) Via de transmissão do estímulo doloroso até o córtex cerebral; B) Via de controle da dor através da liberação de encefalinas e serotonina no SNC; C) Mecanismo de ação antinociceptiva do *H. perforatum*.

Quando administrado por via intraperitoneal (*i.p.*) (30-100 mg/kg), foi observado que o EHP induz efeito analgésico em 75% de camundongos albinos submetidos ao teste de contorções abdominais, efeito duas vezes maior que o

ibuprofeno- AINE. Outro experimento demonstrou atividade antinociceptiva do extrato dessa planta em ratos submetidos aos testes de excitação elétrica e da placa quente (ABDEL-SALAM, 2005).

No teste de edema de pata, foi evidenciado que o tratamento oral de ratos com extrato metanólico de *H. perforatum* (100–1000 mg/kg) aumentou significativamente a latência para a primeira lambida da pata (primeira fase do teste, que caracteriza dor neurogênica) e as reações características da segunda fase. Foi também observado que o mesmo tipo de extrato apresenta ação sinérgica ao efeito da morfina (0,3 mg/kg, s.c., controle positivo), sem alterar os níveis plasmáticos e cerebrais deste opioide (BUKHARI *et al.*, 2004; UCHIDA *et al.*, 2008).

Dentre os componentes isolados do extrato etanólico de *H. perforatum*: rutina, hiperforina, hipericina e pseudo-hipericina possuem ação antinociceptiva em roedores. Tais efeitos estão relacionados ao aumento da disponibilidade de noradrenalina e de 5-HT nas fendas sinápticas e com a ativação da via GABAérgica. A hipericina é fundamental para indução antinociceptiva por estímulo térmico e químico, cuja ação é mediada pela inibição da atividade das isoformas γ e ϵ da proteína quinase C (PKC) sobre a área periaqueducal cinzenta, através de sua desfosforilação. A hiperforina exerce sua ação antinociceptiva através da interação com receptores opioides no SNC, como evidenciado em estudos com roedores (camundongos e ratos), além de diminuir a expressão da PKC (GALEOTTI *et al.*, 2010a; 2010b).

Similarmente, o extrato hidroetanólico de partes aéreas (caules e folhas) de *H. perforatum* apresenta efeito mediado por ativação destes mesmos tipos de receptores em ratos, uma vez que o número de contorções abdominais induzidas

pelo ácido acético foi reduzido de forma dose-dependente após a administração do extrato, de maneira semelhante ao efeito causado pela naloxana (0.5 mg/kg; antagonista opioide) (SUBHAN *et al.*, 2007). Os mesmos mecanismos também estão relacionados à antinocicepção de outras espécies de *Hypericum* (*H. caprifoliatum* e *H. polyanthemum* e *H. braziliense*) (VIANA *et al.*, 2003; PERAZZO *et al.*, 2008).

Outros possíveis mecanismos antinociceptivos envolvidos na ação do EHP são aqueles relacionados com inibição de canais de Na⁺, Ca²⁺, substância P, cicloxigenases (COX-1, COX-2) e lipoxigenase (LOX-5) (SIMMEN *et al.*, 2001; PERAZZO *et al.*, 2008; CAN *et al.*, 2011).

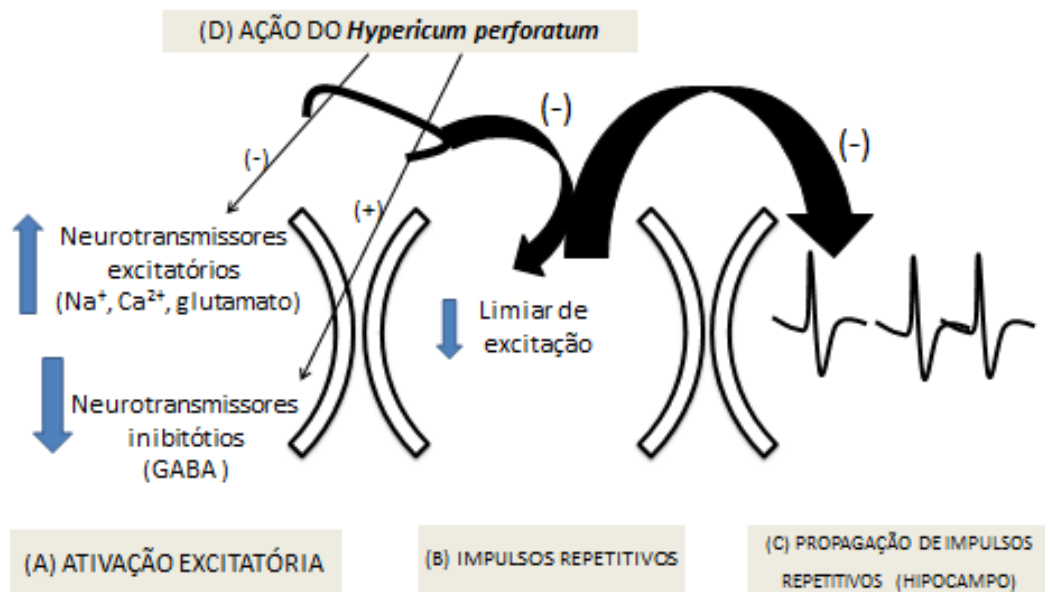
Assim, os extratos de *H. perforatum* podem apresentar efeito antinociceptivo através da atuação central por diferentes vias, incluindo aumento da produção de óxido nítrico, estímulo de receptores para opioides, inibição da recaptação de noradrenalina e 5-HT, aumento do efeito GABAérgico, diminuição da liberação de mediadores inflamatórios, dentre outros.

2.2.2. Extrato de *H. perforatum* e a atividade anticonvulsivante

Os episódios convulsivos compreendem o principal evento na epilepsia. Eles resultam de uma descarga periódica de impulsos nervosos de alta frequência em grupos de neurônios no cérebro, geralmente partindo do hipocampo. Como a convulsão surge a partir da excitação de certos grupos de neurônios, os principais neurotransmissores envolvidos são aqueles que diminuem o limiar de excitação, tornando-o mais próximo do potencial de ação, como o glutamato; ou aqueles que causam ativação de diferentes tipos de receptores ligados aos canais de Na⁺ e Ca²⁺.

Do mesmo modo, a inibição da hiperpolarização neuronal causada pela entrada de Cl^- resultante da ativação de receptores GABAérgicos também pode facilitar o alcance do potencial de ação (Figura 6 A-C) (BRANDÃO, 2004; RANG *et al.*, 2007; SILVA, 2010; BRUNTON, 2012).

Figura 6. Estímulos relacionados à propagação de impulsos convulsivantes



(A) Aumento da liberação de neurotransmissores (NT) excitatórios (Na^+ , Ca^{2+} , glutamato e estímulo elétrico) e/ou diminuição da liberação de neurotransmissores inibitórios (GABA e glutamina) causam diminuição do limiar de excitação nos neurônios pós-sinápticos (B). O aumento da frequência nestes disparos geram episódios convulsivos recorrentes que geralmente partem do hipocampo (C). (D) O *H. perforatum* aumenta o limiar de excitação, o que diminui a propagação de impulsos que geram episódios convulsivantes.

A ação anticonvulsivante de frações polares (etanólico – 1 ml/kg do peso corporal, *i.m.*) do extrato de *H. perforatum* demonstrou-se mais intensa do que frações menos polares (butanólico) sobre chinchilas estimuladas por eletrodos

implantados em regiões corticais e no hipocampo (IVETIC *et al.*, 2002). Similarmente, o extrato hidroalcoólico de *H. perforatum* pode manifestar esse efeito por diferentes mecanismos (Figura 6D): inibição da abertura de canais de Na⁺, Ca²⁺ e glutamato (IVETIC *et al.*, 2011), como também, pela promoção da abertura de canais de Cl⁻ (IVETIC *et al.*, 2011), o que hiperpolariza a célula neuronal e atrasa a propagação do impulso. O extrato alcoólico administrado em doses de 25, 50, 100 e 200 mg/kg (*i.p.*) reduziu os episódios de convulsões estimulados por picrotoxina, um antagonista GABAérgico em camundongos (IVETIC *et al.*, 2002). Tanto a geração de episódios convulsivos estimulados por pentilenotetrazol (PTZ; 0,1-1,0 mg/kg, *i.p.*) em camundongos, como por estimulação elétrica no hipocampo de lagomorfos, foram controladas por ação do EHP. Este controle pode ser observado através do aumento do tempo de latência para início dos episódios epiléticos, diminuição da duração dos mesmos, como também do número de morte de roedores e lagomorfos (HOSSEINZADEH *et al.*, 2005; ETEMAD *et al.*, 2011; IVETIC *et al.*, 2011).

2.3. Extrato de *H. perforatum* e o desenvolvimento embrionário

Episódios convulsivos, doenças neurodegenerativas, ansiedade, depressão e outras neuropatologias são mais frequentes em mulheres do que em homens e podem surgir em qualquer fase de suas vidas: infância, adolescência, gestacional, menopausa, dentre outras (MANSON, 2010; HOBAN *et al.*, 2015).

Centenas de extratos de plantas e de psicofármacos são utilizados para tratamento de distúrbios do SNC, inclusive durante a gravidez e no período perinatal. Contudo, seu uso deve ser feito com cautela, uma vez que a escolha do psicofármaco para uma gestante deve levar em consideração o risco de ela

desenvolver desordem psiquiátrica causada pelo próprio fármaco/planta, como também o surgimento de complicações morfofisiológicas fetais durante a embriogênese e, até mesmo, no período pós-natal (DESAI *et al.*, 2009).

Estudos *in vitro* demonstraram que a hiperforina e a hipericina presentes em células da placenta (JEG-3 cell line) expostas ao EHP causam alterações no seu funcionamento devido ao aumento na concentração intracelular de Ca^{2+} . Contudo, estudos *in vitro* com células trofoblásticas demonstraram que o EHP não causou alterações na produção de gonadotrofina coriônica (hCG) e que de acordo com o período de incubação, podem (ou não) apresentar aumento do Ca^{2+} intracelular (CONCEICAO *et al.*, 2010).

O metabolismo de moléculas que passam pela membrana placentária (e pelo fígado) ocorre a partir de várias enzimas, dentre elas a glutathione S transferase (GST). Estudos *in vitro* demonstraram que a hipericina é capaz de inibir a GST e, portanto, comprometer sua função, com possíveis efeitos deletérios acentuados sobre o funcionamento do fígado fetal (DALMIZRAK *et al.*, 2012).

Assim, a elevação dos níveis intracelulares de Ca^{2+} em células placentárias, bem como alterações de suas enzimas, é um ponto que merece atenção, pois pode alterar diretamente o funcionamento de suas células, alterando conseqüentemente o transporte de moléculas ou bloqueando outras. Ao atravessar a placenta, moléculas que chegam à circulação fetal são transportadas pela veia umbilical até o coração do feto e conduzidas até células dos diferentes tecidos em formação, como o tecido nervoso (MOORE, 2013).

Este tecido pode ser alvo da distribuição de certos fármacos e fitofármacos. Contudo, o acesso a ele é regulado pela barreira hematoencefálica, que começa a ser formada a partir da vascularização do tubo neural e das cristas neurais, seguida por estímulos parácrinos provenientes de astrócitos locais (MOORE, 2013).

Além da via placentária, o embrião/feto também pode ter contato com antidepressivos (fluvoxamina, sertralina e venlafaxina) e fitofármacos através do líquido amniótico, como também por várias outras vias: gastrointestinal; pela deglutição do próprio líquido amniótico, e pela absorção pulmonar fetal, dentre outros. Outro fator relevante que contribui com a exposição fetal a um medicamento corresponde ao grau de vascularização e ao fluxo sanguíneo da placenta fetal e materna, uma vez que influem sobre a taxa de trocas de moléculas (MOORE, 2013).

O EHP possui ampla utilização por gestantes devido a sua ação antidepressiva e, sobretudo, devido ao seu fácil acesso pela população. Entretanto, o conhecimento a respeito de sua segurança, eficácia e toxicidade sobre a gestante e sobre o embrião/feto é pequeno o suficiente, para que sua administração durante este período não seja recomendada pela ANVISA que o categoriza como pertencente à classe de risco C (ANVISA, 2008).

Estudos mostraram que o EHP não causaram modificações nos parâmetros de normalidade para fetos humanos e de roedores. A ingestão do EHP durante a gravidez não causou malformações fetais, nem variações nas taxas de nascimentos prematuros, nativos, nem de natimortos em humanos (MORETTI *et al.*, 2009). Alguns resultados evidenciaram ausência de toxicidade do EHP relacionada à diferenciação do trofoblasto em ratos (NEWPORT *et al.*, 2001). Do mesmo modo,

ratas tratadas com EHP (6 mg/kg ou 36 mg/kg), por via intragástrica, durante os dias 05, 06 e 07 pós-inseminação não manifestaram sinais de toxicidade materna ou embrionária, uma vez que sua administração não interferiu na implantação do blastocisto. Ratas prenhes, fetos e recém – nascidos expostos à dose de 36 mg/kg durante a organogênese (entre os dias 9 e 15 pós inseminação) não manifestaram toxicidade, nem interferência no desenvolvimento e na sobrevivência dos últimos (BORGES *et al.*, 2005a; b). Ratas Sprague-Dawley expostas a dietas com 0, 180, 900, 1800 ou 4500 ppm do EHP, entre o terceiro dia de gestação até o vigésimo primeiro após o nascimento, tiveram parâmetros fisiológicos, físicos e neuro-comportamentais das gestantes e da prole avaliados e normais (CADA *et al.*, 2001). A ausência de alterações morfofuncionais foi também demonstrada em fêmeas de camundongos prenhes que receberam o extrato, assim como em sua prole. Não houve modificação no crescimento, maturação física e reprodutiva, nem em certas tarefas cognitivas da prole (RAYBURN *et al.*, 2001; VIEIRA *et al.*, 2013). Filhotes originados de ratas prenhes tratadas com EHP durante a gestação (36, 72 e 144 mg/kg) não manifestaram alterações no seu desenvolvimento físico, reflexológico nem relacionados à memória (*dados não publicados*).

A hiperforina, um dos principais componentes do EHP, sob níveis prescritos pela ANVISA, não apresentam efeitos embriotóxicos *in vitro*. Porém, sob alta concentração, causou redução no crescimento celular de células-tronco embrionárias, direcionou sua diferenciação preferencialmente a cardiomiócitos e inibiu sua diferenciação em linhagens mesodérmicas e endodérmicas (NAKAMURA *et al.*, 2013).

Contudo, a administração oral (duas doses diárias de 100 mg/kg) do extrato em ratas, durante o período pré- e pós-natal (de 2 semanas antes do acasalamento a 21 dias depois do parto) causou danos morfológicos tanto nos rins, quanto no fígado dos recém nascidos (GREGORETTI *et al.*, 2004).

Dada a ampla utilização do EHP por gestantes, a possibilidade de sua passagem pelas barreiras placentária e hematoencefálica fetal, além das modificações comportamentais do tipo antidepressiva e ansiolítica observadas nas mães tratadas como em sua prole (F1), torna-se relevante avaliar se estes e outros efeitos também são observáveis em crias de mães tratadas com EHP.

Portanto, o presente estudo avaliou se crias provenientes de ratas Wistar tratadas com EHP durante toda a gestação apresentaram indicação de aumento de atividade antinociceptiva, anticonvulsivante, ansiolítica e antidepressiva na vida adulta. Com tais estudos pretende-se ampliar as informações sobre riscos e benefícios do uso de EHP durante a gestação e fomentar discussões sobre o uso de fitofármacos durante este período de vida da mulher.

3. HIPÓTESE

O extrato de *H. perforatum* administrado em ratas durante a gestação potencializa os efeitos antinociceptivo, anticonvulsivante, ansiolítico e antidepressivo de seus descendentes (F1) adultos.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

Investigar possíveis efeitos antinociceptivo e anticonvulsivante em descendentes (F1) fêmeas originadas de ratas prenhes tratadas com extrato de *H. perforatum* durante a gestação; e comprovar possíveis efeitos ansiolítico e antidepressivo nos descendentes (F1) machos.

4.2. Objetivos Específicos

1. Demonstrar a passagem do extrato hidroalcoólico de *H. perforatum* pela barreira placentária e pela barreira hematoencefálica fetal.

2. Investigar possíveis alterações nas respostas aos diferentes estímulos algicos (físicos e químicos) em ratas (F1) adultas, cujas mães foram tratadas com o extrato hidroalcoólico de *H. perforatum* durante a gestação.

3. Investigar possíveis alterações nas respostas aos diferentes agentes convulsivantes (físicos e químicos) em ratas (F1) adultas, cujas mães foram tratadas com o extrato hidroalcoólico de *H. perforatum* durante a gestação.

4. Comprovar possíveis alterações nas respostas ansiolítica e antidepressiva em ratos (F1) adultos, cujas mães foram tratadas com o extrato hidroalcoólico de *H. perforatum* durante a gestação.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Animais e alojamento

Os procedimentos experimentais deste projeto foram aprovados pelo Comitê de Ética Para Uso de Animais (CEUA/UFJF): 063/2013.

Os experimentos foram realizados em ratas Wistar (*Rattus norvegicus*) de 90 dias de idade, pesando entre 200 g a 350 g, nascidos de mães tratadas com EHP durante a gestação. Todos os animais foram provenientes do Biotério do Centro de Biologia da Reprodução (CBR) da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) (CIAPE 01.0048.2013).

As ratas foram alojadas em gaiolas de polietileno (30 × 14 x 16 cm), dentro de armários climatizados (Alesco^R) com fluxo de ar controlado e foram mantidas sob condições monitoradas de temperatura equivalente a $23 \pm 2^{\circ}$ C, com livre acesso à ração tipo *pellets* (Nuvilab^R) e água. Os animais foram mantidos em ciclo claro/escuro de 12 horas, sendo a fase clara de 6h às 18h e a fase escura de 18h às 6h.

As ratas dos diferentes grupos (controle e tratados descritos posteriormente) foram separadas em gaiolas individuais dois dias antes da data provável do parto. As crias F1 foram amamentadas até o 21^o dia de vida e, posteriormente as fêmeas (F1) foram separadas dos machos e conforme o grupo experimental. As fêmeas F1 foram destinadas aos experimentos de avaliação antinociceptiva e anticonvulsivante, enquanto os machos, para experimentos de avaliação ansiolítica e antidepressiva do EHP.

Foram colocados cinco animais em cada gaiola. Na sala de experimentação, as ratas foram mantidas em suas gaiolas individuais, com pelo menos 60 minutos de antecedência da execução dos testes, visando minimizar as possíveis alterações

comportamentais do animal. Os mesmos foram privados de água e ração 60 minutos antes dos testes (ALMEIDA, 2006).

5.2. Tratamento com extrato de *H. perforatum*

O extrato hidroalcoólico seco, contendo 0,3% de hipericina foi preparado pela Mbpharma manipulações - Lote 10124778.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2008) recomenda que a dose do EHP em humanos corresponda à ingestão de 600 a 900 mg do extrato padronizado em 0,3% de hipericina ao dia (ANVISA, 2008; RODRIGUES *et al.*, 2006). Com base na área da superfície corporal, a dose mínima para ratas seria 36 mg/kg (GREGORETTI *et al.*, 2004).

Os animais foram separados nos seguintes grupos experimentais: Controle: Ratas prenhes receberam água destilada durante todo o período de gestação; Tratados: Ratas prenhes foram agrupadas em: Tratado 1- 36 mg/kg; Tratado 2 – 72 mg/kg, e Tratado 3 – 144 mg/kg de extrato seco de *H. perforatum*, por via intragástrica (Figura 7), durante os 21 dias de gestação.

Figura 7: Administração de extrato de *H. perforatum* (ou água destilada)



Fonte: Arquivo pessoal

Aos 90 dias de vida, as ratas em fase de diestro, período com menor concentração plasmática de estrógeno, foram selecionadas para minimizar a possível interferência hormonal sobre respostas antinociceptivas (STOFFEL *et al.*, 2003). Posteriormente, os animais foram eutanasiados com o relaxante muscular xilasina (2% - Kensol^R), associado ao anestésico ketamina (5% - Vetanarcol^R) (COUNCIL, 2011; ANVISA, 2012), via *i.p.*, seguido de ruptura do diafragma.

5.3. Ensaio de biodistribuição do extrato de *H. perforatum*

O sistema de imagem *in vivo* (IVIS) foi empregado para visualizar a biodistribuição (quantificação da intensidade de fluorescência) do EHP em fêmeas grávidas e em seus respectivos fetos. Diferentemente do procedimento experimental mencionado anteriormente, administrou-se diariamente, por gavagem, água destilada aos animais controle (C) e EHP com doses de 36 mg/kg (T1), 72 mg/kg (T2) e 144 mg/kg (T3) às fêmeas grávidas a partir do dia 18 a 21 da gestação. Cada grupo experimental consistiu em quatro fêmeas ($n = 4$) e após cesariana, três filhotes foram selecionados aleatoriamente ($n = 12$ descendentes por grupo). Três horas após o último tratamento, as fêmeas foram eutanasiadas com solução de ketamina (90 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) seguida de coleta de sangue por punção cardíaca (WOLFENSOHN, 1994). As mães foram submetidas à laparotomia para remoção de gordura retroperitoneal, rim, coração, fígado, baço, pulmão, cérebro e placenta. Nos fetos, o fígado e o cérebro foram dissecados. Os tecidos e órgãos isolados foram então lavados em solução salina e imediatamente fotografados em IVIS Kodak Image Station 4000 MM PRO (Carestream Health Inc., Rochester, EUA) equipado com câmara CCD (dispositivo de carga acoplada) (Figura 13). Para a imagem de fluorescência, a máquina foi configurada para excitação de 610 nm,

filtros de emissão de 700 nm, exposição de 3 min e “binning” (para redução do número de pixels das imagens para melhor detecção da fluorescência) de 2 x 2.

As imagens adquiridas (intensidade média de cada amostra) foram analisadas com a aplicação Carestream MI Application versão 5.0.2.30E e, posteriormente, usadas para comparação com animais do grupo controle, que apresentaram valores normais de fluorescência = 1 (au = 1).

Figura 8: Aparelho KODAK *in-Vivo Imaging System FX Pro* para avaliação da biodistribuição do extrato hidro-alcoólico de *H. perforatum*



Fonte: Arquivo pessoal

5.4. Avaliação da atividade antinociceptiva

5.4.1. Teste da placa quente (*hot plate*)

Este teste foi descrito inicialmente por Woolfe e Macdonald (1974) para análise de substâncias analgésicas que possuem ação sobre o SNC, uma vez que aumentam a latência para levantar ou lambe as patas (WOOLFE, 1944). Ele faz

uso da temperatura como estímulo físico, a qual ativa receptores vaniloides nociceptivos a partir dos 43 °C em fibras nervosas C e A δ (SILVA *et al.*, 2013).

As ratas (F1) dos grupos controle e tratados (T1, T2 e T3) foram colocadas individualmente sobre a placa quente (LE 7406, Panlab^R), aquecida até a temperatura de $55 \pm 1^\circ$ C. (Figura 8). O aumento da latência (em segundos), caracterizada como o tempo decorrido até o aparecimento de uma primeira reação para o estímulo térmico (lambida de uma das patas), foi registrado como índice de antinocicepção ao estímulo físico. O tempo máximo de avaliação foi fixado em 30 segundos (latência máxima) para minimizar os danos às patas dos animais (KUMAR *et al.*, 2001; ABDEL-SALAM, 2005; ALMEIDA, 2006).

Figura 9: Teste da placa quente (hot plate)



Fonte: Arquivo pessoal

5.4.2. Teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético

Trata-se de um modelo de dor visceral química, induzida pela injeção de ácido acético glacial, pela via intraperitoneal (*i.p.*), que consiste na contração da

musculatura abdominal seguida pela rotação do quadril e alongamento do corpo e dos membros posteriores. O ácido age diretamente sobre o fluido do peritônio, provocando a liberação de mediadores endógenos inflamatórios, como prostaglandinas E_2 (PGE_2) e I_2 (PGI_2), dentre outros e, desta forma, sensibiliza as terminações nervosas da região. As ratas (F1) dos grupos controle e tratados (T1, T2 e T3) receberam 10 ml/kg (*i.p*) de 0.8% ácido acético (solução de v/v), exceto o grupo controle que recebeu o mesmo volume de água destilada (10 ml/kg). Cinco minutos após a administração do ácido acético, as ratas foram colocadas em caixas individuais, sendo observado o número de contorções abdominais durante 15 minutos. A atividade antinociceptiva foi expressa como a redução do número de contorções (KUMAR *et al.*, 2001; ABDEL-SALAM, 2005; ALMEIDA, 2006).

5.4.3. Teste do edema de pata

Consiste na indução de nocicepção causada por estimulação química através da injeção de 50 μ L de 2.5% solução de formalina (0.92% formaldeído) sob a pele da superfície plantar da pata traseira direita. Ele foi descrito por Dubuisson e Dennis (1977), utilizando modelos animais de ratos e gatos (DUBUISSON, 1977).

Após a injeção de formalina, as ratas (F1) dos grupos controle e tratados (T1, T2 e T3) foram colocados em ambientes de vidro com espelho nas laterais para proporcionar uma visão completa do comportamento dos animais. Os episódios de suspensão da pata traseira, que recebeu injeção com formalina (Figura 9) foram monitorados e interpretados como resposta à nocicepção (ALMEIDA, 2006). Dois períodos foram considerados: o primeiro, conhecido como inicial (ou de primeira fase) refere-se à fase de estimulação neurogênica da dor, que começa imediatamente após a injeção de formalina e perdura por cinco minutos, por

estimulação das fibras nervosas nociceptivas aferentes C e A δ , mediante liberação de aminoácidos excitatórios, óxido nítrico e substância P. O segundo, conhecido como fase tardia (ou segunda fase), faz referência à dor inflamatória e acontece entre 15 e 30 minutos após a injeção de formalina e resulta da liberação de mediadores pro-inflamatórios (bradicinina, serotonina, prostaglandinas e outros) (DUBUISSON, 1977). A atividade antinociceptiva foi expressa como a redução do tempo de suspensão da pata em ambas as fases. Além disso, a latência para início da suspensão da pata foi também avaliada, cujo aumento foi o parâmetro utilizado para verificação da ação antinociceptiva do extrato (ALMEIDA, 2006; UCHIDA *et al.*, 2008)

Figura 10: Teste de edema de pata, induzido por injeção plantar de formalina (50 μ L de formalina - 0.92%)



Fonte: Arquivo pessoal

5.5. Avaliação da atividade anticonvulsivante

5.5.1. Episódios convulsivos induzidos por pentilenotetrazol (PTZ)

Esse modelo de convulsão induzida por este estímulo químico mimetiza, nos roedores, convulsões de pequeno mal e de crise de ausência que acometem os

humanos (DHIR, 2012). Este é o modelo de indução químico mais aceito atualmente em animais de experimentação (ORLOFF *et al.*, 1949). O PTZ induz convulsões (agudas ou crônicas) por bloquear canais de Cl⁻ associados aos receptores para o GABA_A (BUKHARI *et al.*, 2004; HOSSEINZADEH *et al.*, 2005; ALMEIDA, 2006). Ao longo do episódio convulsivo o animal manifesta estágios de contrações involuntárias pelo corpo; rigidez da calda; movimentação circular dos membros anteriores; extensão das patas traseiras e morte (DHIR, 2012).

Fêmeas (F1) provenientes dos grupos controle e tratados (T1, T2 e T3) foram colocadas, individualmente, em uma gaiola, onde receberam injeção intraperitoneal de PTZ (60 mg/kg) para observação por 25 minutos. O tempo de latência para o início das convulsões agudas, assim como o número e duração dos episódios convulsivos, foi avaliado.

5.5.2. Convulsão induzida por pilocarpina (PLC)

A pilocarpina é um agonista muscarínico utilizado em modelo animal para simular o desenvolvimento do estado epilético manifestado por humanos (OLNEY *et al.*, 1983). Apesar de manifestar-se através de um mecanismo diferente daquele utilizado com o uso de pentilenotetrazol, ela pode causar perda de células no giro denteado e no hipocampo (áreas CA1 e CA3), além de desencadear episódios convulsivos recorrentes, quando administrada em camundongos e ratos (300 – 380 mg/kg, *i.p.*) (MELLO *et al.*, 1993; ALMEIDA, 2006).

Ratas (F1) provenientes dos grupos controle e tratados (T1, T2 e T3) foram colocadas individualmente em gaiolas, onde receberam injeção intraperitoneal de pilocarpina (350 mg/kg) para serem observadas por 60 minutos. O tempo (latência)

para o início das convulsões, assim como o número, duração dos episódios convulsivos e o número de mortes, foi avaliado.

5.5.3. Convulsão induzida por eletrochoque auricular

Herberg e Watkins (1966) demonstraram que a estimulação elétrica repetida em regiões subcorticais geravam episódios convulsivos recorrentes em ratos (HERBERG *et al*, 1966). O eletrochoque auricular corresponde a pulsos elétricos repetitivos que induzem, em diferentes estruturas neuronais, um padrão característico de atividade epiléptica, que quando mantida, é denominada pós-descarga (ALMEIDA, 2006). Este modelo simula, em roedores, episódios convulsivos de “grande mal” comum em humanos (DHIR, 2012). Para avaliar a possível atividade anticonvulsivante, ratas (F1) pertencentes aos grupos controle e tratados (T1, T2 e T3) foram submetidos ao choque auricular com corrente de 70 mA de intensidade, a uma frequência de 150 pulsos/segundo e duração de 2 segundos. Foram observados: latência para início dos episódios convulsivos, número de animais que apresentaram convulsões tônico-clônicas e duração do episódio convulsivo (flexão e extensão das patas) (ALMEIDA, 2006; PAHUJA *et al.*, 2012).

Com o intuito de avaliar a ocorrência de efeitos sedativos e de relaxamento muscular não específicos que poderiam interferir com a avaliação do comportamento nociceptivo, os animais foram submetidos aos testes de barra giratória e da placa perfurada. Os testes descritos abaixo foram realizados com diferentes grupos de machos F1 adultos.

5.6. Avaliação dos efeitos não específicos sobre o sistema nervoso central

5.6.1. Teste da barra giratória (rotarod)

O teste da barra giratória foi descrito inicialmente por Dunham e Miya (1957) para avaliar o equilíbrio e o desempenho motor de ratos sobre uma barra giratória. Posteriormente, o teste foi modificado por Jones e Roberts (1968) ao acrescentarem diferentes velocidades de rotação à barra giratória. Com isso, ele pode ser empregado no estudo de ratos submetidos a tratamentos com drogas que atuam possivelmente deprimindo o SNC (DUNHAM, 1957; JONES, 1968; HAMM *et al.*, 1994). O desempenho motor do animal foi medido como o tempo gasto para caminhar sobre uma barra rotativa (7 rpm) num só ensaio, isto é, depois de cair da barra o animal retornou para a gaiola. Para este efeito, os animais foram submetidos a uma pré-selecção 24 horas antes do ensaio e foram seleccionados apenas aqueles que permaneceram na barra rotativa do rotarod durante pelo menos 60 segundos numa das três tentativas (KANNAN *et al.*, 2013). O equipamento utilizado foi o barra giratória (rotarod) Panlab^R s.l. Mod. LE 8200 (Barcelona, Espanha) (Figura 10).

Figura 11: Aparelho do teste da barra giratória – rotarod (modelo LE 8200, Panlab^R) para observação de coordenação motora



Fonte: Arquivo pessoal

5.6.2. Tempo de sono induzido por pentobarbital

Esse teste tem por objetivo verificar se drogas testadas atuam deprimindo o SNC, uma vez que caso isso aconteça, sua ação potencializaria os efeitos hipnóticos do pentobarbital (RILEY, 1958). Os animais foram injetados, *i.p.*, com pentobarbital sódico (Syntec, Hypnol^R, 40 mg/kg - Juiz de Fora, Brasil) e a latência (em segundos) - intervalo entre a administração de pentobarbital e o início do tempo de sono - e a duração (segundos) para recuperação do reflexo de endireitamento foram considerados parâmetros de avaliação (WAMBEBE, 1985; ALMEIDA, 2006).

5.7. Avaliação da atividade ansiolítica

5.7.1. Ensaio de labirinto em cruz elevado

Este teste, utilizado inicialmente por Handley e Mithani (1984) e validado por Pelow e colaboradores (1985), tem por objetivo avaliar o possível efeito ansiolítico de drogas sobre o animal, a qual interfere sobre seu comportamento exploratório e de medo diante de uma situação de estresse (desconhecida) (HANDLEY, 1984; PELLOW *et al.*, 1985).

O aparelho de labirinto elevado (Novalab^R, Ribeirão Preto, Brasil) consiste em quatro braços (50 cm) elevados a 39 cm acima do chão. Cada braço está posicionado a 90° em relação aos braços adjacentes e todos os braços estão conectados através de uma área central (5 x 5 cm), formando uma cruz (Figura 11). Cada rato foi colocado no centro do labirinto virado para um dos braços abertos. O tempo gasto (em segundos) nos braços abertos (ou fechados) foi registrado durante 3 minutos. A entrada em um braço foi definida como a passagem das quatro patas do animal pela linha divisória entre a área central e o braço (HERRERA-RUIZ *et al.*, 2008; GRUNDMANN *et al.*, 2009). Após cada ensaio, o labirinto foi

cuidadosamente limpo com solução de etanol a 10%. O aumento da permanência do animal no braço aberto indica estado compatível com menor estado de ansiedade.

Figura 12: Labirinto em cruz elevado



Fonte: Arquivo pessoal

5.7.2. Teste da placa perfurada

A capacidade exploratória do roedor frente a um ambiente desconhecido serve de base para este teste que é usado para avaliação de comportamento como ansiedade dos animais. Os primeiros momentos de exploração são influenciados pelo medo do animal, enquanto que a avaliação de sua mobilidade pode ser avaliada após certo período de exploração do novo ambiente. Assim, o tempo de deambulação do animal, presença de movimentos esterotipados e capacidade exploratória (exploração de buracos) estão relacionados de maneira inversamente proporcional ao comportamento de ansiedade (TAKEDA, H. *et al.*, 1998).

O aparelho de placa perfurada (Panlab^R s.l. mod. LE 8811 - Barcelona, Espanha) consiste numa caixa de acrílico transparente com 16 furos equidistantes

na superfície e com células fotoelétricas nas placas laterais (Figura 12). Estas células são capazes de conduzir uma leitura automatizada dos movimentos dos animais, prevenindo possíveis erros humanos durante a observação. Cada animal foi colocado uma vez no centro da placa, voltada para longe do observador e o número de atividade de imersão na cabeça nos furos, atividade locomotora (ambulação) e movimentos estereotipados foram registados durante 5 min (HAN *et al.*, 2009). Após cada ensaio, a placa perfurada foi cuidadosamente limpa com solução de etanol a 10%.

Figura 13: Aparelho para teste da placa perfurada (LE 8811, Panlab^R)



Fonte: Arquivo pessoal.

5.8. Avaliação da atividade antidepressiva

5.8.1. Teste do nado forçado

O teste do nado forçado é bastante utilizado para avaliação de estudo de drogas com ação antidepressiva. Baseia-se na resposta do roedor em relação a uma situação de estresse não solucionável, supondo-se que os animais tentam escapar

de um estímulo aversivo, fornecendo informações sobre seu estado emocional (PORSOLT *et al.*, 1977).

Os ratos foram colocados em um cilindro de vidro transparente (altura: 50 cm, diâmetro: 20 cm) cheio de água e, dessa forma, foram expostos ao estímulo para natação durante 5 min. A água foi trocada após cada ensaio.

Os seguintes parâmetros foram avaliados quanto à análise do comportamento: tempo gasto pelo animal para parar de nadar (tempo de latência) e duração da imobilidade. Portanto, a diminuição da latência, assim como o aumento no tempo de imobilidade do animal são considerados parâmetros para comprovação da atividade antidepressiva sobre os mesmos (CARLINI, 2011).

5.9. Análise Estatística

A análise estatística dos dados foi elaborada com o uso do programa SPSS versão 21. Para verificação da normalidade, foram utilizados os testes Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk. Os dados paramétricos foram avaliados pelos testes estatísticos ANOVA e Teste T, seguido de post-hoc Tukey (ou Dunnett's) e para os dados não paramétricos, Kruskal-Wallis e Qui-quadrado, seguido de Mann-Witney. A confecção dos gráficos foi realizada com uso do programa GraphPad Prism 5.0 GraphPad Software (San Diego USA). Para todos os testes foram considerados significativos os valores que apresentaram nível de significância $p < 0,05$ e $\alpha = 0,95$ (SOKAL, 1994).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e as discussões são apresentados sob a forma de artigos.

Figura 14: Artigo 1: “Rats treated with *Hypericum perforatum* during pregnancy generate offspring with behavioral changes in adulthood” publicado pela revista Brazilian Journal of Pharmacognosy (Apêndice 1).



**Brazilian Journal
of Pharmacognosy**
REVISTA BRASILEIRA DE FARMACOGNOSIA

www.elsevier.com/locate/bjp



Original Article

Rats treated with *Hypericum perforatum* during pregnancy generate offspring with behavioral changes in adulthood

Leandro V. Campos^{a,b,*}, Vinícius A. Vieira^{a,1}, Lorena R. Silva^a, Jasmin Jasmin^c, Martha O. Guerra^a, Vera M. Peters^a, Rita de Cássia da Silveira e Sá^d

^a Centro de Biologia da Reprodução, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, Brazil
^b Hospital Maternidade Tereznha de Jesus, Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde de Juiz de Fora, Suprema, Juiz de Fora, MG, Brazil
^c Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil
^d Departamento de Fisiologia e Patologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil



ARTICLE INFO

Article history:
Received 30 June 2016
Accepted 31 January 2017
Available online 9 March 2017

Keywords:
Depression
Reprogramming
Gestation
Ontogeny
Fluorescence
Neurodevelopment

ABSTRACT

Drugs used in the treatment of depression can cross the placenta giving rise to questions regarding the effects these drugs exert on the fetus. *Hypericum perforatum* L., Hypericaceae, is a natural product used to treat depression. However, information about its toxicity and the occurrence of alterations in the central nervous system development of the offspring is scarce. This work assessed the behavior of adult male rats born from mothers treated with *Hypericum* extract during gestation and analyzed the fluorescence of the extract in different organs of mothers and fetuses. Male pups were divided into three treated groups, corresponding to the administration of the *Hypericum* extract to mothers at the dose levels of 36 mg/kg, 72 mg/kg and 144 mg/kg, and one control group in which the mothers received distilled water. At 90 days of age, the offspring underwent the following tests: rotarod, pentobarbital-induced sleep time, elevated plus maze, hole-board and forced swimming test. The observed fluorescence indicated the presence of the extract in all tissues analyzed. The obtained results suggest lasting changes in the performances displayed in the CNS, depression and anxiety tests, indicating that the use of *Hypericum* during gestation could interfere with the behavioral development of the offspring reducing anxiety and depression when they become adults. We suggest that these alterations are associated with the reprogramming of the brain regions related to changes in emotional reactivity.

© 2017 Sociedade Brasileira de Farmacognosia. Published by Elsevier Editora Ltda. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Figura 15: Artigo 2: “Effect of the extract of *Hypericum perforatum* on neurodevelopment of regions related to pain control and convulsion” publicado pela revista Journal of Medicinal Plants Research (Apêndice 2).

academicJournals

Journal of Medicinal Plants Research

Vol. 11(6), pp. 107-117, 10 February, 2017
 DOI: 10.5897/JMPR2016.6305
 Article Number: 4D8BECE62719
 ISSN 1996-0875
 Copyright © 2017
 Author(s) retain the copyright of this article
<http://www.academicjournals.org/JMPR>

Full Length Research Paper

Effect of the extract of *Hypericum perforatum* on neurodevelopment of regions related to pain control and convulsion

Leandro Véscoli Campos^{1,2*}, Martha de Oliveira Guerra¹, Vera Maria Peters¹ and Rita de Cássia da Silveira e Sá³

¹Centro de Biologia da Reprodução – Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, CEP: 36036-900, Brazil.
²Hospital Maternidade Terezinha de Jesus, da Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde de Juiz de Fora – SUPREMA, Juiz de Fora, MG, CEP: 36033-003, Brazil.
³Departamento de Fisiologia e Patologia - CCS – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, CEP: 58051-900, Brazil.

Received 20 November, 2016; Accepted 27 January, 2017

Hypericum perforatum (HP) is well-known by the population of the world as herb with antidepressant effect. Its various components, such as hypericin and hyperforin, provide many other effects for this plant, for example, antinociceptive and anticonvulsant. The aim of this work was to determine whether HP administration during pregnancy can cause changes in neurodevelopment related to pain control and seizures in rats (F1). For this, Wistar rats received oral doses of HP at 36, 72 and 144 mg/kg throughout pregnancy. Tests to evaluate the antinociceptive and anticonvulsant activity of HP were performed in adult F1 rats, which showed a decrease of both responses, suggesting therefore that HP exposition during pregnancy causes changes in neurodevelopment of brain regions related to pain control and seizures in rats.

Key words: *Hypericum perforatum*, antinociceptive effect, convulsion, neurodevelopment, reprogramming, ontogeny, epigenetic.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização científica e popular do EHP por milhares de pessoas no mundo e no Brasil, assim como a escassez de estudos, as possíveis consequências sobre o neurocomportamento de pacientes gestantes e sobre a neurogênese de seus descendentes ressaltam a necessidade de se avaliarem riscos e benefícios da utilização terapêutica e popular deste extrato.

Este estudo investigou se o extrato hidroalcoólico de *H. perforatum* administrado em ratas grávidas durante toda a gestação poderia atravessar as barreiras placentária e hematoencefálica. Também foi pesquisada sua capacidade de causar alterações sobre o neurodesenvolvimento de regiões cerebrais relacionadas ao controle da dor, convulsão, ansiedade e depressão em seus descendentes (F1).

A hipótese deste trabalho foi confirmada, uma vez que o EHP distribui-se por vários tecidos corporais, tanto nas ratas prenhes, quanto nos fetos (principalmente no fígado e cérebro de ambos), comprovando sua passagem pelas barreiras placentária e hematoencefálica.

Como o acesso ao SNC dos fetos ocorreu desde o início de sua formação, acredita-se que os componentes do EHP tenham sido responsáveis por alterar a expressão e/ou distribuição de receptores (ligantes de neurotransmissores - serotonina, noradrenalina, GABA e encefalinas) envolvidos com o neurodesenvolvimento de regiões cerebrais relacionadas ao controle da dor, convulsão, ansiedade e depressão. É possível que estas alterações tenham desencadeado tolerância gestacional (*down-regulation* pré-natal) e consequente hiper-regulação rebote pós-natal (*up-regulation*) dos receptores citados anteriormente, em regiões do SNC (encéfalo e medula espinhal) relacionadas a

esses efeitos. Essas alterações foram permanentes, uma vez que apesar da exposição aos componentes do EHP sobre os descendentes ter sido cessada com o fim da gestação, os resultados foram obtidos a partir de testes realizados aos 90 dias de idade dos descendentes.

As ações antinociceptiva, anticonvulsivante, ansiolítica e antidepressiva presentes na geração F1 de descendentes, e mencionadas nesta tese, comprovam a neurotoxicidade causada pelo EHP quando administrado durante a gestação e corroboram a necessidade de alerta pela ANVISA quanto ao seu uso neste período da vida da mulher.

O papel desempenhado por cada componente do extrato de *H. perforatum* (hiperforina e hipericina, principalmente) sobre a reprogramação do SNC, assim como sobre os mecanismos de hipo e hiper-regulação de receptores, além de sua distribuição no SNC dos descendentes são pontos importantes a serem pesquisados.

8. CONCLUSÃO

Ratas (F1) originadas de gestantes prenhes tratadas com extrato de *H. perforatum* durante toda a gestação apresentaram maiores respostas antinociceptiva e anticonvulsivante, do que as descendentes originadas de mães que não receberam este extrato durante toda a gestação. Além disso, os descendentes machos (F1) manifestaram respostas ansiolítica e antidepressiva mais intensas do que os descendentes originados de mães que não receberam este extrato durante toda a gestação. Todos estes efeitos foram mais expressivos nas gestantes tratadas com a dose de 144 mg/kg de extrato hidro-alcoolico de *H. perforatum*.

9. REFERÊNCIAS

ABDEL-SALAM, O. M. E. Anti-inflammatory, antinociceptive, and gastric effects of *Hypericum perforatum* in rats. **Scientific World Journal**, v. 5, p. 586-95, Aug 2005.

ALMEIDA, R. N. *Psicofarmacologia: fundamentos práticos*. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

ANVISA. **Resolução da diretoria colegiada - rdc nº 95, de 11 de dezembro de 2008**.

ANVISA. **Diretriz Brasileira de Prática para o Cuidado e Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos - DBPA, 2012**.

Atlas des plantes de France. ***Hypericum perforatum***. Disponível em: http://www.hear.org/pier/imagepages/singles/61_Hypericum_perforatum_L.htm

BARNES, J.; ANDERSON, L. A.; PHILLIPSON, J. D. St John's wort (*Hypericum perforatum* L.): a review of its chemistry, pharmacology and clinical properties. **J Pharm Pharmacol**, v. 53, n. 5, p. 583-600, May 2001.

BENEDI, J.; ARROYO, R.; ROMERO, C.; MARTIN-ARAGON, S.; VILLAR, A. M. Antioxidant properties and protective effects of a standardized extract of *Hypericum perforatum* on hydrogen peroxide-induced oxidative damage in PC12 cells. **Life Sci**, v. 75, n. 10, p. 1263-76, Jul 2004.

BENNETT, H. A.; EINARSON, A.; TADDIO, A.; KOREN, G.; EINARSON, T. R. Prevalence of depression during pregnancy: systematic review. **Obstetric & Gynecology**, v. 103, n. 4, p. 698-709, Apr 2004.

BIRT, D. F.; WIDRLECHNER, M. P.; HAMMER, K. D.; HILLWIG, M. L.; WEI, J.; KRAUS, G. A.; MURPHY, P. A.; MCCOY, J.; WURTELE, E. S.; NEIGHBORS, J. D.; WIEMER, D. F.; MAURY, W. J.; PRICE, J. P. *Hypericum* in infection: Identification of anti-viral and anti-inflammatory constituents. **Pharm Biol**, v. 47, n. 8, p. 774-782, Jul 2009.

BLOCH, M.; DALY, R. C.; RUBINOW, D. R. Endocrine factors in the etiology of postpartum depression. **Compr Psychiatry**, v. 44, n. 3, p. 234-46, May 2003.

BONIN, R. P. KININCK., Y. Restoring ionotropic inhibition as an analgesic strategy. **Neurosci Lett**, v. 557, p. 43-51, Dec 2013.

BORGES, L. V.; CANCINO, J. C. C.; PETERS, V. M.; LAS CASAS, L.; GUERRA, M. O. Development of pregnancy in rats treated with *Hypericum perforatum*. **Phytother Res**, v. 19, n. 10, p. 885-7, Oct 2005a.

BORGES, L. V.; CANCINO, J. C. C.; PETERS, V. M.; LAS CASAS, L.; GUERRA, M. O. Evaluation of *Hypericum perforatum* toxicity when administered to pregnant rats. **Rev Assoc Med Bras**, v. 51, n. 4, p. 206-8, Jul 2005b.

BOURON, A.; LORRAIN, E. Effets cellulaires et moléculaires de l'hyperforine, un antidépresseur végétal : revue de la littérature. **L'Encéphale**, v. 40, n. 2, p. 108-113, Apr 2014.

BRANDÃO, M. L. *As Bases Biológicas do Comportamento Introdução à Neurociência*. 1. ed. São Paulo: Pedagógica e Universitária, 2004.

BRUNTON, L., CHABNER, A., KNOLLMANN, C. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman*. 12. ed. Porto Alegre: AMGH, 2012.

BUKHARI, I. A.; DAR, A.; KHAN, R. A. Antinociceptive activity of methanolic extracts of St. John's Wort (*Hypericum perforatum*) preparation. **Pak J Pharm Sci**, v. 17, n. 2, p. 13-9, Jul 2004.

CADA, A. M.; HANSEN, D. K.; LABORDE, J. B.; FERGUSON, S. A. Minimal effects from developmental exposure to St. John's wort (*Hypericum perforatum*) in Sprague-Dawley rats. **Nutr Neurosci**, v. 4, n. 2, p. 135-41, Feb 2001.

CAMPOS, L.V.; VIEIRA, V.A.; SILVA, L.R.; JASMIN, J.; GUERRA, M.O.; PETERS, V.M.; SÁ, R.C.S. Rats treated with *Hypericum perforatum* during pregnancy generate offspring with behavioral changes in adulthood. **Rev. bras. farmacogn (in press)**.

CAN, O. D.; OZTURK, Y.; OZTURK, N.; SAGRATINI, G.; RICCIUTELLI, M.; VITTORI, S.; MAGGI, F. Effects of treatment with St. John's Wort on blood glucose levels and pain perceptions of streptozotocin-diabetic rats. **Fitoterapia**, v. 82, n. 4, p. 576-84, Jun 2011.

CARLINI, E. A.; MENDES, F. R. *Protocolos em psicofarmacologia comportamental: um guia para a pesquisa de drogas com ação sobre o SNC, com ênfase nas plantas medicinais*. São Paulo: Fap-Unifesp, 2011.

CAVIEDES, A.; LAFOURCADE, C.; SOTO, C.; WYNEKEN, U. BDNF/NF-κB signaling in the neurobiology of depression. **Curr Pharm Des**, Jan 2017.

CECCHINI, T. *Enciclopédia de las Hierbas y de las Plantas Medicinales*. Editorial de Vecchi. ed. Barcelona: 1980.

CONCEICAO, A. O.; TAKSER, L.; LAFOND, J. Effect of St. John's Wort standardized extract and hypericin on in vitro placental calcium transport. **J Med Food**, v. 13, n. 4, p. 934-42, Aug 2010.

CORTEZ, C. M.; SILVA, D. *Fisiologia aplicada à psicologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

COUNCIL. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* Eighth. ed.: National Academy of Sciences, 2011.

CRAFT, R. M. Modulation of pain by estrogens. **Pain**, v. 132 Suppl 1, p. S3-12, Nov 2007.

DALMIZRAK, O.; KULAKSIZ-ERKMEN, G.; OZER, N. Evaluation of the in vitro inhibitory impact of hypericin on placental glutathione S-transferase pi. **Protein J**, v. 31, n. 7, p. 544-549, Oct 2012.

DESAI, G.; BABU, G. N.; RAJKUMAR, R. P.; CHANDRA, P. S. More questions than answers! Clinical dilemmas in psychopharmacology in pregnancy and lactation. **Indian J Psychiatry**, v. 51, n. 1, p. 26-33, Jan 2009.

DHIR, A. Pentylentetrazol (PTZ) kindling model of epilepsy. **Curr Protoc Neurosci**, v. 9, n. 9.37, p. 1-12, Oct 2012.

DI PAOLA, R.; MAZZON, E.; MUIA, C.; CRISAFULLI, C.; GENOVESE, T.; DI BELLA, P.; ESPOSITO, E.; MENEGAZZI, M.; MELI, R.; SUZUKI, H.; CUZZOCREA, S. Protective effect of *Hypericum perforatum* in zymosan-induced multiple organ dysfunction syndrome: relationship to its inhibitory effect on nitric oxide production and its peroxynitrite scavenging activity. **Nitric Oxide**, v. 16, n. 1, p. 118-30, Feb 2007.

DOST, T.; OZKAYRAN, H.; GOKALP, F.; YENISEY, C.; BIRINCIOLU, M. The effect of *Hypericum perforatum* (St. John's Wort) on experimental colitis in rat. **Dig Dis Sci**, v. 54, n. 6, p. 1214-1221, Jun 2009.

DUBUISSON, D.; DENNIS, S. G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. **Pain**, v. 4, n. 2, p. 161-174, Dec 1977.

DUNHAM, N. W.; MYIA, T. S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. **J Am Pharm Assoc Am Pharm Assoc**, v. 46, n. 3, p. 208-9, Mar 1957.

ETEMAD, L.; HEIDARI, M. R.; HEIDARI, M.; MOSHIRI, M.; BEHRAVAN, E.; ABBASIFARD, M.; AZIMZADEH, B. S. Investigation of *Hypericum perforatum* extract on convulsion induced by picrotoxin in mice. **Pak J Pharm Sci**, v. 24, n. 2, p. 233-236, Apr 2011.

FAROOQ, R. K.; ASGHAR, K.; KANWAL, S.; ZULQERNAIN, A. Role of inflammatory cytokines in depression: Focus on interleukin-1beta. **Biomed Rep**, v. 6, n. 1, p. 15-20, Jan 2017.

FRIEDLAND, K.; HARTENECK, C. Hyperforin: To be or not to be an activator of TRPC(6). **Rev Physiol Biochem Pharmacol**, v. 169, p. 1-24, Sep 2015.

GALEOTTI, N.; VIVOLI, E.; BILIA, A. R.; BERGONZI, M. C.; BARTOLINI, A.; GHELARDINI, C. A prolonged protein kinase C-mediated, opioid-related antinociceptive effect of st John's Wort in mice. **J Pain**, v. 11, n. 2, p. 149-59, Feb 2010a.

GALEOTTI, N.; VIVOLI, E.; BILIA, A. R.; BERGONZI, M. C.; BARTOLINI, A.; GHELARDINI, C. St. John's Wort reduces neuropathic pain through a hypericin-mediated inhibition of the protein kinase C gamma and epsilon activity. **Biochem Pharmacol**, v. 79, n. 9, p. 1327-1336, May 2010b.

GENOVESE, T.; MAZZON, E.; DI PAOLA, R.; MUIA, C.; CRISAFULLI, C.; MENEGAZZI, M.; MALLEO, G.; SUZUKI, H.; CUZZOCREA, S. *Hypericum perforatum* attenuates the development of cerulein-induced acute pancreatitis in mice. **Shock**, v. 25, n. 2, p. 161-167, Feb 2006.

GREESON, J. M.; SANFORD, B.; MONTI, D. A. St. John's wort (*Hypericum perforatum*): a review of the current pharmacological, toxicological, and clinical literature. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 153, n. 4, p. 402-414, Feb 2001.

GREGORETTI, B.; STEBEL, M.; CANDUSSIO, L.; CRIVELLATO, E.; BARTOLI, F.; DECORTI, G. Toxicity of *Hypericum perforatum* (St. John's wort) administered during pregnancy and lactation in rats. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 200, n. 3, p. 201-205, Nov 2004.

GRUNDMANN, O.; NAKAJIMA, J.; KAMATA, K.; SEO, S.; BUTTERWECK, V. Kaempferol from the leaves of *Apocynum venetum* possesses anxiolytic activities in the elevated plus maze test in mice. **Phytomedicine**, v. 16, n. 4, p. 295-302, Apr 2009.

HAMM, R. J.; PIKE, B. R.; O'DELL, D. M.; LYETH, B. G.; JENKINS, L. W. The rotarod test: an evaluation of its effectiveness in assessing motor deficits following traumatic brain injury. **J Neurotrauma**, v. 11, n. 2, p. 187-196, Jan 1994.

HAMMER, K. D.; HILLWIG, M. L.; SOLCO, A. K.; DIXON, P. M.; DELATE, K.; MURPHY, P. A.; WURTELE, E. S.; BIRT, D. F. Inhibition of prostaglandin E(2) production by anti-inflammatory *Hypericum perforatum* extracts and constituents in RAW264.7 Mouse Macrophage Cells. **J Agric Food Chem**, v. 55, n. 18, p. 7323-7331, Sep 2007.

HAMMER, K. D.; BIRT, D. F. Evidence for contributions of interactions of constituents to the anti-inflammatory activity of *Hypericum perforatum*. **Crit Rev Food Sci Nutr**, v. 54, n. 6, p. 781-789, Dec 2014.

HAN, H.; MA, Y.; EUN, J. S.; LI, R.; HONG, J. T.; LEE, M. K.; OH, K. W. Anxiolytic-like effects of sanjoinine A isolated from *Zizyphi Spinosi* Semen: possible involvement of GABAergic transmission. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 92, n. 2, p. 206-213, Apr 2009.

HANDLEY, S. L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 327, n. 1, p. 1-5, Aug 1984.

Herbário Virtual Reflora. *Hypericum perforatum*. Disponível em: <http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/geral/ExibeFiguraFSIUC/ExibeFiguraFSIUC.do?idFigura=17023381>

HERBERG, L. J.; WATKINS., P. J. Epileptiform seizures induced by hypothalamic stimulation in the rat : resistance to fits following fits. **Nature**, v. 209, n. 5022, p. 515-516, Jan 1966.

HERRERA-RUIZ, M.; ROMAN-RAMOS, R.; ZAMILPA, A.; TORTORIELLO, J.; JIMENEZ-FERRER, J. E. Flavonoids from *Tilia americana* with anxiolytic activity in plus-maze test. **J Ethnopharmacol**, v. 118, n. 2, p. 312-317, Jul 2008.

HOBAN, C. L.; BYARD, R. W.; MUSGRAVE, I. F. A comparison of patterns of spontaneous adverse drug reaction reporting with St. John's Wort and fluoxetine during the period 2000-2013. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 42, n. 7, p. 747-751, Jul 2015.

HOHMANN, M. S. N.; CARDOSO, R. D. R.; FATTORI, V.; ARAKAWA, N. S.; TOMAZ, J. C.; LOPES, N. P.; CASAGRANDE, R.; VERRI, W. A. *Hypericum perforatum* reduces paracetamol-induced hepatotoxicity and lethality in mice by modulating inflammation and oxidative stress. **Phytother Res**, v. 29, n. 7, p. 1097-1101, Apr 2015.

HOSSEINI, M.; TAIARANI, Z.; HADJZADEH, M. A.; SALEHABADI, S.; TEHRANIPOUR, M.; ALAEI, H. A. Different responses of nitric oxide synthase inhibition on morphine-induced antinociception in male and female rats. **Pathophysiology**, v. 18, n. 2, p. 143-149, Apr 2011.

HOSSEINZADEH, H.; KARIMI, G. R.; RAKHSHANIZADEH, M. Anticonvulsant effect of *Hypericum perforatum*: role of nitric oxide. **J Ethnopharmacol**, v. 98, n. 1-2, p. 207-208, Apr 2005.

HU, Z.; YANG, X.; HO, P. C.; CHAN, E.; CHAN, S. Y.; XU, C.; LI, X.; ZHU, Y. Z.; DUAN, W.; CHEN, X.; HUANG, M.; YANG, H.; ZHOU, S. St. John's Wort modulates the toxicities and pharmacokinetics of CPT-11 (irinotecan) in rats. **Pharm Res**, v. 22, n. 6, p. 902-914, Jun 2005.

HU, Z. P.; YANG, X. X.; CHAN, S. Y.; XU, A. L.; DUAN, W.; ZHU, Y. Z.; SHEU, F. S.; BOELSTERLI, U. A.; CHAN, E.; ZHANG, Q.; WANG, J. C.; EE, P. L.; KOH, H. L.; HUANG, M.; ZHOU, S. F. St. John's wort attenuates irinotecan-induced diarrhea via down-regulation of intestinal pro-inflammatory cytokines and inhibition of intestinal epithelial apoptosis. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 216, n. 2, p. 225-237, Oct 2006.

HUNT, E. J.; LESTER, C. E.; LESTER, E. A.; TACKETT, R. L. Effect of St. John's wort on free radical production. **Life Sci**, v. 69, n. 2, p. 181-190, Jun 2001.

IVETIC, V.; POPOVIC, M.; MIMICA-DUKIC, N.; BARAK, O.; PILIJA, V. St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) and kindling epilepsy in rabbit. **Phytomedicine**, v. 9, n. 6, p. 496-499, Sep 2002.

IVETIC, V.; TRIVIC, S.; POGANCEV, M. K.; POPOVIC, M.; ZLINSKA, J. Effects of St John's wort (*Hypericum perforatum* L.) extracts on epileptogenesis. **Molecules**, v. 16, n. 9, p. 8062-8075, Sep 2011.

JONES, B. J.; ROBERTS, D. J. The quantitative measurement of motor inco-ordination in naive mice using an accelerating rotarod. **J Pharm Pharmacol**, v. 20, n. 4, p. 302-304, Apr 1968.

KANNAN, S.; VARKEY, D.; TYAGI, M. G. Influence of ATP sensitive potassium channels on intravenous thiopentone sodium: a rotarod test to evaluate the motor coordination of rodents. **Indian J Pharmacol**, v. 45, p. S245-S245, Dec 2013.

KNUPPEL, L.; LINDE, K. Adverse effects of St. John's Wort: a systematic review. **J Clin Psychiatry**, v. 65, n. 11, p. 1470-1479, Nov 2004.

KUMAR, V. Potential medicinal plants for CNS disorders: an overview. **Phytother Res**, v. 20, n. 12, p. 1023-1035, Dec 2006.

KUMAR, V.; SINGH, P. N.; BHATTACHARYA, S. K. Anti-inflammatory and analgesic activity of Indian *Hypericum perforatum* L. **Indian J Exp Biol**, v. 39, n. 4, p. 339-343, Apr 2001.

LAGGNER, H.; SCHREIER, S.; HERMANN, M.; EXNER, M.; MUHL, A.; GMEINER, B. M.; KAPIOTIS, S. The main components of St John's Wort inhibit low-density lipoprotein atherogenic modification: a beneficial "side effect" of an OTC antidepressant drug? **Free Radic Res**, v. 41, n. 2, p. 234-241, Feb 2007.

LEUNER, K.; KAZANSKI, V.; MULLER, M.; ESSIN, K.; HENKE, B.; GOLLASCH, M.; HARTENECK, C.; MULLER, W. E. Hyperforin-a key constituent of St. John's wort specifically activates TRPC6 channels. **Faseb j**, v. 21, n. 14, p. 4101-4111, Dec 2007.

LINDE, K. St. John's wort - an overview. **Forsch Komplementmed**, v. 16, n. 3, p. 146-155, Jun 2009.

MANSON, J. E. Pain: sex differences and implications for treatment. **Metabolism**, v. 59 Suppl 1, p. 16-20, Oct 2010.

MARRELLI, M.; STATTI, G.; CONFORTI, F.; MENICHINI, F. New Potential Pharmaceutical Applications of *Hypericum* Species. **Mini Rev Med Chem**, p. 1-21, Jul 2015.

MEDINA, M. A.; MARTÍNEZ-POVEDA, B.; AMORES-SÁNCHEZ, M. I.; QUESADA, A. R. Hyperforin: More than an antidepressant bioactive compound? **Life Sciences**, v. 79, n. 2, p. 105-111, Jun 2006.

MELLO, L. E.; CAVALHEIRO, E. A.; TAN, A. M.; KUPFER, W. R.; PRETORIUS, J. K.; BABB, T. L.; FINCH, D. M. Circuit mechanisms of seizures in the pilocarpine model of chronic epilepsy: cell loss and mossy fiber sprouting. **Epilepsia**, v. 34, n. 6, p. 985-995, Dec 1993.

MENNINI, T.; GOBBI, M. The antidepressant mechanism of *Hypericum perforatum*. **Life sciences**, v. 75, n. 9, p. 1021-1027, Jul 2004.

MOORE, K. L.; PERSALD, T. V. N.; TORCHIA, M. G. *Embriologia Clínica*. 9ª. ed. São Paulo: Elsevier, 2013.

MORETTI, M. E.; MAXSON, A.; HANNA, F.; KOREN, G. Evaluating the safety of St. John's Wort in human pregnancy. **Reprod Toxicol** v. 28, n. 1, p. 96-99, Jul 2009.

MÜLLER, W. E. Current St. John's wort research from mode of action to clinical efficacy. **Pharmacol. Res**, v. 47 p. 101-109, Oct 2003.

NAHAS, R.; SHEIKH, O. Complementary and alternative medicine for the treatment of major depressive disorder. **Can Fam Physician**, v. 57, n. 6, p. 659-663, Jun 2011.

NAKAMURA, K.; AIZAWA, K.; YAMAUCHI, J.; TANOUE, A. Hyperforin inhibits cell proliferation and differentiation in mouse embryonic stem cells. **Cell Proliferation**, v. 46, n. 5, p. 529-537, Ago 2013.

NEWPORT, D. J.; WILCOX, M. M.; STOWE, Z. N. Antidepressants during pregnancy and lactation: defining exposure and treatment issues. **Semin Perinatol**, v. 25, n. 3, p. 177-190, Jun 2001.

O'KEANE, V.; FRODL, T.; DINAN, T. G. A review of Atypical depression in relation to the course of depression and changes in HPA axis organization. **Psychoneuroendocrinology**, v. 37, n. 10, p. 1589-1599, Oct 2012.

OLNEY, J. W.; DE GUBAREFF, T.; LABRUYERE, J. Seizure-related brain damage induced by cholinergic agents. **Nature**, v. 301, n. 5900, p. 520-522, Feb 1983.

ORLOFF, M. J.; WILLIAMS, H. L.; PFEIFFER, C. C. Timed intravenous infusion of metrazol and strychnine for testing anticonvulsant drugs. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 70, n. 2, p. 254-257, Feb 1949.

OZTURK, Y. Testing the antidepressant effects of *Hypericum* species on animal models. **Pharmacopsychiatry**, v. 30 Suppl 2, p. 125-128, Sep 1997.

PAHUJA, M.; MEHLA, J.; KUMAR GUPTA, Y. Anticonvulsant and antioxidative activity of hydroalcoholic extract of tuber of *Orchis mascula* in pentylenetetrazole and maximal electroshock induced seizures in rats. **J Ethnopharmacol**, v. 142, n. 1, p. 23-27, Jun 2012.

PANOCCA, I.; PERFUMI, M.; ANGELETTI, S.; CICCOCIOPPO, R.; MASSI, M. Effects of *Hypericum perforatum* extract on ethanol intake, and on behavioral despair: a search for the neurochemical systems involved. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 66, n. 1, p. 105-111, May 2000.

PELLOW, S.; FILE, S. E.; BRILEY, M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **J Neurosci Methods**, v. 14, n. 3, p. 149-167, Aug 1985.

PERAZZO, F. F.; LIMA, L. M.; PADILHA, M. D.; ROCHA, L. M.; SOUSA, P. J. C.; CARVALHO, J. C. T. Anti-inflammatory and analgesic activities of *Hypericum brasiliense* (Willd) standardized extract. **Rev Bras Farmacogn**, v. 18, n. 3, p. 320-325, Sep 2008.

PINTO, R. M. M. S. **Contribuição para o estudo de compostos Flavónicos em espécies de *Hypericum* da flora Portuguesa**. 1987. 191, Universidade do Porto, Porto.

PORSOLT, R. D.; LE PICHON, M.; JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature**, v. 266, n. 5604, p. 730-732, Apr 1977.

RANG, H. P.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. *Farmacologia*. 8ed. São Paulo: Elsevier, 2016.

RAYBURN, W. F.; GONZALEZ, C. L.; CHRISTENSEN, H. D.; HARKINS, T. L.; KUPIEC, T. C. Impact of *Hypericum* (St.-John's-wort) given prenatally on cognition of mice offspring. **Neurotoxicol Teratol**, v. 23, n. 6, p. 629-637, Nov-Dec 2001.

REGITZ-ZAGROSEK, V.; SCHUBERT, C.; KRUGER, S. Gender differences in psychopharmacology. **Internist (Berl)**, v. 49, n. 12, p. 1516-1519, Dec 2008.

RILEY, H.; SPINKS, A. Biological assessment of tranquillisers. I. **J Pharm Pharmacol**, v. 10, n. 11, p. 657-671, Nov 1958.

RODRIGUES, M. G.; MENDONÇA, M. M.; PAULA, J. A. M. Analysis of the rational use of *Hypericum perforatum* from the profile of the lapsings prepared in Anápolis - GO pharmacies. **Rev. eletrônica farm.**, v. 3 (2), p. 42-52, Dez 2006.

RUSSO, E.; SCICCHITANO, F.; WHALLEY, B. J.; MAZZITELLO, C.; CIRIACO, M.; ESPOSITO, S.; PATANE, M.; UPTON, R.; PUGLIESE, M.; CHIMIRRI, S.; MAMMI, M.; PALLERIA, C.; DE SARRO, G. *Hypericum perforatum*: pharmacokinetic, mechanism of action, tolerability, and clinical drug-drug interactions. **Phytother Res**, v. 28, n. 5, p. 643-655, May 2014.

SÁ, R. C. S.; DE OLIVEIRA, L. E.; NOBREGA, F. F.; BHATTACHARYYA, J.; DE ALMEIDA, R. N. Antinociceptive and toxicological effects of *Dioeclea grandiflora* seed pod in mice. **J Biomed Biotechnol**, v. 2010, p. 606748, Apr 2010.

SARRIS, J.; PANOSSIAN, A.; SCHWEITZER, I.; STOUGH, C.; SCHOLEY, A. Herbal medicine for depression, anxiety and insomnia: a review of psychopharmacology and clinical evidence. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 21, n. 12, p. 841-860, Dec 2011.

SCHMIDT, M.; BUTTERWECK, V. The mechanisms of action of St. John's wort: an update. **Wien Med Wochenschr**, v. 165, n. 11-12, p. 229-235, Jun 2015.

SHARPLEY, A. L.; MCGAVIN, C. L.; WHALE, R.; COWEN, P. J. Antidepressant-like effect of *Hypericum perforatum* (St John's wort) on the sleep polysomnogram. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 139, n. 3, p. 286-287, Oct 1998.

SHIBAYAMA, Y.; KAWACHI, A.; ONIMARU, S.; TOKUNAGA, J.; IKEDA, R.; NISHIDA, K.; KUCHIWA, S.; NAKAGAWA, S.; TAKAMURA, N.; MOTOYA, T.; TAKEDA, Y.; YAMADA, K. Effect of pre-treatment with St John's Wort on nephrotoxicity of cisplatin in rats. **Life Sci**, v. 81, n. 2, p. 103-108, Jun 2007.

SILVA, J. C.; LIMA-SARAIVA, S.; OLIVEIRA-JUNIOR, R.; ALMEIDA, J. Modelos experimentais para avaliação da atividade antinociceptiva de produtos naturais: uma revisão. **Braz. J. Pharm.**, v. 94, p. 18-23, Fev 2013.

SILVA, P. *Farmacologia*. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

SIMMEN, U.; HIGELIN, J.; BERGER-BUTER, K.; SCHAFFNER, W.; LUNDSTROM, K. Neurochemical studies with St. John's wort in vitro. **Pharmacopsychiatry**, v. 34 Suppl 1, p. S137-142, Jul 2001.

SOKAL, R. R.; ROLF, F.J. *Biometry. The principles and practice of statistics in biological research*. 4. ed. New York W.H.: Freeman & Company, 1994.

STOFFEL, E. C.; ULIBARRI, C. M.; CRAFT, R. M. Gonadal steroid hormone modulation of nociception, morphine antinociception and reproductive indices in male and female rats. **Pain**, v. 103, n. 3, p. 285-302, Jun 2003.

SUBHAN, F.; KHAN, M.; IBRAR, M.; NAZAR UL, I.; KHAN, A.; GILANI, A. H. Antagonism of antinociceptive effect of hydro-ethanolic extract of *Hypericum perforatum* Linn. by a non selective opioid receptor antagonist, naloxone. **Pak J Biol Sci**, v. 10, n. 5, p. 792-796, Mar 2007.

TAKEDA H.; TSUJI, M.; MATSUMIYA, T. Changes in head-dipping behavior in the hole-board test reflect the anxiogenic and/or anxiolytic state in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 350, n.1, p. 21-29, May 1998.

TSCHUDIN; S. LAPAIRE, O. Antidepressants and pregnancy. **Ther Umsch**, v. 62, n. 1, p. 17-22, Jan 2005.

UCHIDA, S.; HIRAI, K.; HATANAKA, J.; HANATO, J.; UMEGAKI, K.; YAMADA, S. Antinociceptive effects of St. John's wort, *Harpagophytum procumbens* extract and Grape seed proanthocyanidins extract in mice. **Biol Pharm Bull**, v. 31, n. 2, p. 240-245, Feb 2008.

RODIE, J.U. Gender based psychopharmacology: gender influence in the pharmacological treatment of mental disorders. **Actas Esp Psiquiatr**, v. 32, n. 5, p. 307-313, Oct 2004.

UZBAY, I. T.; COSKUN, I.; KAYIR, H.; OZTURK, N.; OZTURK, Y. Extract of *Hypericum perforatum* blocks caffeine-induced locomotor activity in mice: a possible role of nitric oxide. **Phytother Res**, v. 21, n. 5, p. 415-419, May 2007.

UZBAY, T. I. *Hypericum perforatum* and substance dependence: a review. **Phytother Res**, v. 22, n. 5, p. 578-582, May 2008.

VIANA, A. F.; HECKLER, A. P.; FENNER, R.; RATES, S. M. Antinociceptive activity of *Hypericum caprifoliatum* and *Hypericum polyanthemum* (Guttiferae). **Braz J Med Biol Res**, v. 36, n. 5, p. 631-634, May 2003.

VIEIRA, M. L.; HAMADA, R. Y.; GONZAGA, N. I.; BACCHI, A. D.; BARBIERI, M.; MOREIRA, E. G.; MESQUITA SDE, F.; GERARDIN, D. C. Could maternal exposure to the antidepressants fluoxetine and St. John's Wort induce long-term reproductive effects on male rats? **Reprod Toxicol**, v. 35, p. 102-107, Jan 2013.

VIEIRA, V. A.; CAMPOS, L. V.; SILVA, L. R.; GUERRA, M. G.; PETERS, V. M.; SÁ, R. C. S. Evaluation of postpartum behaviour in rats treated with *Hypericum perforatum* during gestation. **Rev. bras. farmacogn.**, v. 23, p. 796-801, Sep 2013.

WAMBEBE, C. Influence of some agents that affect 5-hydroxytryptamine metabolism and receptors on nitrazepam-induced sleep in mice. **Br J Pharmacol**, v. 84, n. 1, p. 185-191, Jan 1985.

WILHELM, K. P.; BIEL, S.; SIEGERS, C. P. Role of flavonoids in controlling the phototoxicity of *Hypericum perforatum* extracts. **Phytomedicine**, v. 8, n. 4, p. 306-309, Jul 2001.

WISE, D. D.; FELKER, A.; STAHL, S. M. Tailoring treatment of depression for women across the reproductive lifecycle: the importance of pregnancy, vasomotor symptoms, and other estrogen-related events in psychopharmacology. **CNS Spectr**, v. 13, n. 8, p. 647-662, Aug 2008.

WOLFENSOHN, S.; LLOYD, M. *Handbook of laboratory animal management and welfare*. 4. ed. New York: Oxford University Press, 1994.

WOOLFE, G.; MACDONALD, A. D. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride (demerol). **J Pharmacol Exp Ther**, v. 80, n. 3, p. 300-307, 1944.

ZENG, C.; TIAN, F.; XIAO, B. TRPC channels: prominent candidates of underlying mechanism in neuropsychiatric diseases. **Mol Neurobiol**, v. 53, n. 1, p. 631-647, Jan 2016.

ZOU, Y. P.; LU, Y. H.; WEI, D. Z. Protective effects of a flavonoid-rich extract of *Hypericum perforatum* L. against hydrogen peroxide-induced apoptosis in PC12 cells. **Phytother Res**, v. 24 Suppl 1, p. S6-S10, Jan 2010.