

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE MEDICINA
MESTRADO EM SAÚDE

Lorena Ribeiro Silva

**Avaliação do desenvolvimento neonatal e do processo de memória dos filhotes de ratas
Wistar expostas ao extrato seco de *Hypericum perforatum* L. durante a gestação.**

Juiz de Fora
2015

Lorena Ribeiro Silva

**Avaliação do desenvolvimento neonatal e do processo de memória dos filhotes de ratas
Wistar expostas ao extrato seco de *Hypericum perforatum* L. durante a gestação.**

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

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Vera Maria Peters

Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª Rita de Cássia da Silveira e Sá

Juiz de Fora

2015

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao amigo Vinícius de Almeida Vieira (*in memoriam*), o qual foi o grande incentivador na realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me dar força e coragem para conquistar meus objetivos. Sem o temor a ti e ao nosso senhor Jesus Cristo, eu nada seria e teria.

À minha amada família, meus queridos pais e irmãos, pelo incentivo e apoio constante na conclusão de mais uma conquista. Vocês são o meu bem mais precioso...

À minha orientadora professora Dr^a. Vera, pelos ensinamentos diários e infinitos. Obrigada pela confiança prestada durante esta jornada e pelo exemplo de profissional e competência que representa.

À professora Dr^a. Martha, pela orientação e ensinamentos prestados com muita eficiência, paciência, disponibilidade e carinho.

À minha co-orientadora Dr^a. Rita, pela orientação e ajuda na execução deste trabalho.

Aos amigos do Centro de Biologia da Reprodução (CBR): Luiz Carlos Franco, pela ajuda incondicional; a Evelise pelo apoio, incentivo e carinho durante esta jornada; a Marcella pela grande ajuda na reta final do experimento e a Flávia pela disponibilidade em ajudar no que fosse preciso.

Ao estagiário de Iniciação Científica e amigo Zé Reinaldo, pela ajuda e disponibilidade imensurável na execução do trabalho.

Aos estagiários do CBR: Bianca, Emília, Felipe, Luciana e Fernanda, que participaram de alguma etapa do trabalho.

À amiga Mara, pelos conhecimentos transmitidos no início do trabalho.

À amiga Simone, pela ajuda na revisão deste trabalho e pelo apoio quando mais precisei.

À amiga Diane, pela disposição em ajudar na confecção dos gráficos do trabalho.

Aos meus queridos primos: Janaína, Juliana e Leandro, ao meu cunhado Rodney e minhas amigas: Karlinha, Mariza, Alessandra, Thaís, Letícia e Ângela que sempre tiveram uma palavra de conforto e incentivo e que torceram pela realização deste trabalho.

A todos os funcionários do Centro de Biologia da Reprodução (CBR), dos laboratórios, do biotério e secretaria que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Ao Centro de Biologia da Reprodução pelo fornecimento das instalações, laboratórios, modelo experimental, funcionários e toda a logística para o desenvolvimento do projeto.

À Pós-graduação em Saúde da Universidade Federal e Juiz de Fora, pela colaboração na conquista deste objetivo.

Às Redes Mineiras TOXIFAR e Bioterismo - FAPEMIG pelo financiamento do projeto.

Resumo

A depressão é uma das desordens psíquicas mais comuns distribuídas na população e que pode acometer mulheres durante o período gestacional. O extrato de *Hypericum perforatum* L. (Hp) tem sido utilizado para o tratamento de depressão leve a moderada e com menos efeitos adversos do que os antidepressivos alopáticos. Há poucos estudos sobre o seu uso seguro durante a gravidez e de sua interferência na geração exposta durante a vida intrauterina. Portanto, o presente trabalho propôs-se a estudar o efeito da exposição do extrato seco de Hp no desenvolvimento neonatal e no processo de aprendizagem e memória dos filhotes de ratas Wistar tratadas durante a gestação. Foram utilizados ratos Wistar (machos e fêmeas), obtidos da colônia do biotério do Centro de Biologia da Reprodução (CBR) - Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). Ratas Wistar prenhes foram distribuídas aleatoriamente em quatro grupos (n=10): um controle, que recebeu água filtrada, e três grupos tratados que receberam o extrato de Hp nas doses de 36 mg/kg/dia; 72 mg/kg/dia e 144 mg/kg/dia, durante toda a gestação, por via intragástrica. Após o parto, foram selecionados, aleatoriamente, 10 filhotes fêmeas e 10 filhotes machos de cada grupo experimental. Estes filhotes foram acompanhados no período neonatal para avaliação do desenvolvimento físico e reflexológico e na vida adulta, foram submetidos à avaliação do aprendizado e memória. Para avaliação do desenvolvimento neonatal foram observados os seguintes parâmetros: abertura dos olhos, desdobramento da orelha, aparecimento de lanugo e pelos, erupção do incisivo superior e inferior, abertura vaginal; descida dos testículos; resposta postural, preensão palmar, esquiva ao abismo, teste de orientação e geotaxia negativa. Para avaliação da memória foram utilizados o teste de esquiva inibitória e o teste de reconhecimento de objetos. O projeto foi aprovado pelo protocolo nº 101/2012, CEUA/UFJF. O desenvolvimento físico e reflexológico dos filhotes das ratas dos grupos experimentais ocorreram entre o segundo e o trigésimo sétimo dia de vida pós-natal, não apresentando diferença significativa entre os grupos. Os dados relativos ao aprendizado e memória também não demonstraram alteração significativa. Portanto, o Hp não interferiu no desenvolvimento neonatal e cognitivo em termos de aprendizado e memória dos filhotes das ratas que receberam o extrato durante a gestação.

Palavras-chave: *Hypericum perforatum*; gestação; desenvolvimento neonatal; memória.

Abstract

Depression is one of the most common mental disorders distributed in the population and that can affect women during pregnancy. *Hypericum perforatum* L. extract (Hp) has been used for the treatment of mild to moderate depression with fewer side effects than allopathic antidepressants. There are few studies on its safe use during pregnancy and its interference in the exposed generation during intrauterine life. Therefore, this study aimed to study the effect of exposure Hp dry extract neonatal development and the process of learning and memory of Wistar rats' pups treated during pregnancy. Wistar rats (male and female), obtained from the animal house of the colony Reproductive Biology Center (CBR) - Federal University of Juiz de Fora (UFJF). Pregnant Wistar rats were randomly distributed into four groups (n = 10) a control, which received filtered water, and three experimental groups that received the Hp extract in doses of 36 mg/ kg/day; 72 mg/kg/day and 144 mg/kg/day throughout gestation, intragastrically. After parturition, were randomly selected 10 young female and 10 male offspring from each experimental group. These puppies were followed in the neonatal period to assess the physical and reflexology and adulthood, underwent assessment of learning and memory. To evaluate the following neonatal development parameters were observed: eye opening, ear splitting, appearance of lanugo and hair, upper and lower incisor eruption, vaginal opening; descent of the testis; postural response, grasping reflex, cliff avoidance, orientation test and negative geotaxis. To assess memory we used the inhibitory avoidance task and the object recognition test. The project was approved by Protocol 101/2012, CEUA / UFJF. The physical and reflexology of the rats in the experimental groups occurred between the second and the thirty-seventh day of postnatal life, with no differences between groups. The data on learning and memory also showed no significant change. Therefore, the Hp did not interfere in the neonatal and cognitive development in terms of learning and memory of the rats receiving the extract during pregnancy.

Keywords: *Hypericum perforatum*; pregnancy; neonatal development; memory.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Fórmula estrutural da hipericina.....	21
Figura 2 - Fórmula estrutural da hiperforina.....	21
Figura 3 - Teste de preensão palmar.....	32
Figura 4 - Teste de resposta postural.....	33
Figura 5 - Teste de esquiva ao abismo (resposta positiva).....	33
Figura 6 - Teste de esquiva ao abismo (resposta negativa).....	34
Figura 7 - Teste de orientação.....	34
Figura 8 - Teste de geotaxia negativa.....	35
Figura 9 - Caixa de reconhecimento de objetos.....	35
Figura 10 - Objeto branco-familiar.....	36
Figura 11 - Objeto preto-novo.....	36
Figura 12 - Caixa de esquiva passiva.....	37

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 - Indicadores do desenvolvimento físico de filhotes machos de ratas Wistar dos grupos controle (água filtrada) e tratados com o Hp durante a gestação ($p > 0,05$).....67
- Gráfico 2 - Indicadores do desenvolvimento físico de filhotes fêmeas de ratas Wistar dos grupos controle (água filtrada) e tratados com o Hp durante a gestação ($p > 0,05$).....68
- Gráfico 3 - Indicadores do desenvolvimento reflexológico de filhotes fêmeas de ratas Wistar dos grupos controle (água filtrada) e tratados com o Hp durante a gestação ($p > 0,05$).....68
- Gráfico 4 - Indicadores do desenvolvimento reflexológico de filhotes machos de ratas Wistar dos grupos controle (água filtrada) e tratados com o Hp durante a gestação ($p > 0,05$).....69
- Gráfico 5 - Peso corporal de ratas gestantes dos grupos controle (água filtrada) e tratados com o Hp durante 20 dias. Resultados expressos em peso médio \pm desvio padrão ($p > 0,05$).....69
- Gráfico 6 - Tempo total de exploração do objeto novo, expresso pelo índice de reconhecimento (IR), no teste de reconhecimento de objetos, de filhotes machos de ratas Wistar dos grupos controle (água filtrada) e tratados com o Hp. Dados apresentados (média \pm desvio padrão) ($p > 0,05$).....70
- Gráfico 7 - Tempo total de exploração do objeto novo, expresso pelo Índice de Reconhecimento (IR), no teste de reconhecimento de objetos, de filhotes fêmeas de ratas Wistar dos grupos controle (água filtrada) e tratados com o extrato de Hp. Dados apresentados (média \pm desvio padrão) ($p > 0,05$).....71
- Gráfico 8 - Tempo de latência em segundos (expresso em média) observado no teste de esquiva inibitória dos filhotes machos dos grupos experimentais ($p > 0,05$).....72
- Gráfico 9 - Tempo de latência em segundos (expresso em média) observado no teste de esquiva inibitória, dos filhotes fêmeas dos grupos experimentais ($p > 0,05$).....72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Indicadores do desenvolvimento físico de ratos Wistar da colônia do Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora, 2004-2005.....24

Tabela 2 - Indicadores do desenvolvimento neuromotor de ratos Wistar da colônia do Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora, 2004-2005.....24

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ANOVA- Análise de Variância
CBR- Centro de Biologia da Reprodução
CEUA- Comissão de Ética no Uso de Animais
CID- Classificação Internacional de Doenças
CYP3A4- Citocromo P450 3A4
DA- Dopamina
FAPEMIG- Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais
GABA- Ácido gamaminobutírico
Hp- *Hypericum perforatum*
HPA- Hipotálamo hipófise adrenal
5-HT - 5-hidroxitriptamina ou serotonina
LTDA- Limitada
MAO- Monoamino oxidase
MDF-Medium Density Fiberboard
NE- Norepinefrina
NMDA- N-metil D-Aspartato
OECD- Organização para a Cooperação Econômica e Desenvolvimento
OMS- Organização Mundial da Saúde
SBCAL- Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório
SERT- Transportador de Serotonina
RDC- Resolução da Diretoria Colegiada
UFJF- Universidade Federal de Juiz de Fora
WHO- World Health Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 TRANSTORNOS DEPRESSIVOS	15
2.1.1 Depressão no período gestacional	16
2.2 NEUROTRANSMISSORES ENVOLVIDOS COM A DEPRESSÃO	17
2.3 TRATAMENTOS FARMACOLÓGICOS PARA A DEPRESSÃO	18
2.3.1 Medicamentos alopáticos	18
2.3.2 <i>Hypericum perforatum</i> L.	20
2.4 DESENVOLVIMENTO NEONATAL	23
2.5 APRENDIZAGEM E MEMÓRIA	25
3 HIPÓTESE	28
4 OBJETIVOS	29
4.1 GERAL	29
4.2 ESPECÍFICOS	29
5 MATERIAL E MÉTODOS	30
5.1 ANIMAIS	30
5.1.1 Diagnóstico de prenhez	30
5.1.2 Alojamento dos animais	30
5.2 EXTRATO DE <i>Hypericum perforatum</i> L.	30
5.3 DESENHO EXPERIMENTAL	31
5.4 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE MATERNA	31
5.5 AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO NEONATAL	31
5.5.1 Desenvolvimento físico	31
5.5.2 Desenvolvimento reflexológico	32
5.6 TESTES COMPORTAMENTAIS DE APRENDIZADO E MEMÓRIA	35
5.6.1 Teste de reconhecimento de objetos	35
5.6.2 Teste de esQUIVA INIBITÓRIA	37
5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
5.8 APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS:	38
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
6.1 RESUMO APRESENTADO NO CONGRESSO SBCAL-2014	39

6.2 RESUMO APRESENTADO NO SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFJF.....	39
6.3 ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA NEUROBIOLOGIA	40
6.4 ARTIGO SUBMETIDO À REVISTA REPRODUCTIVE TOXICOLOGY.....	41
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	42
8 CONCLUSÃO.....	43
REFERÊNCIAS	44
APÊNDICES.....	51
APÊNDICE A.....	51
APÊNDICE B.....	53
APÊNDICE C.....	55
APÊNDICE D:	61
ANEXO:.....	77
ANEXO A: PROTOCOLO DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	77
ANEXO B: CERTIFICADO DO PRÊMIO DE MENÇÃO HONROSA NO 20º SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFJF - ANO DE 2014.....	78

1 INTRODUÇÃO

De acordo com a Classificação Internacional de Doenças (CID 10), a depressão ou estado depressivo é caracterizado pelo sofrimento causado pela alteração do humor, acompanhado pela perda de interesse e de prazer, levando a um estado de fadiga intensa. Além desses sintomas, outros fatores presentes no quadro depressivo incluem: déficit de atenção e concentração, baixa autoestima, falta de autoconfiança, ideias de culpa e inutilidade, visões pessimistas do futuro, pensamentos ou atos de suicídio, sono perturbado e apetite alterado (OMS, 1993).

A depressão representa uma das mais prevalentes patologias psiquiátricas, afetando cerca de 340 milhões de pessoas em todo o mundo (WHO, 2004). A sua prevalência na população em geral varia de 3 a 11% e é duas vezes maior entre as mulheres do que entre os homens (BRASIL, 2006). A quantidade de serotonina, um dos neurotransmissores relacionados com a depressão, armazenada no cérebro de homens e mulheres é semelhante, porém a sua síntese é 52% maior em homens do que em mulheres (WURTMAN; WURTMAN, 1996).

Os sintomas típicos de depressão podem se manifestar na mulher durante o período gestacional e no pós-parto, uma vez que a gestação promove um momento de mudanças fisiológicas, sociais, familiares e psicológicas na sua vida (BAPTISTA; BAPTISTA; TORRES, 2006). A depressão durante a gestação implica na necessidade de tratamento para o qual deve ser avaliado o risco-benefício, pois os fármacos podem atravessar a placenta e provocar alterações no desenvolvimento embriofetal. Os medicamentos psicoativos utilizados para o tratamento da depressão ao atravessarem a barreira placentária (MARCUS et al., 2001) podem expor o feto a três tipos de riscos: malformações congênitas, síndromes perinatais e alterações na teratologia comportamental (CARVALHO, 2009; WARD; ZAMORSKI, 2002).

O uso de produtos naturais, como os fitoterápicos, tem sido cada vez mais difundido na população (CRAGG; NEWMAN, 2013) e um dos mais utilizados é o *Hypericum perforatum* L.(Hp), conhecido popularmente como Erva de São João. Este fitoterápico é utilizado no tratamento de depressão leve a moderada (ERDELMEIER; KOCH; HOERR, 2000), sendo o seu uso considerado uma alternativa vantajosa devido ao fato de ocasionar menos efeitos adversos, quando comparado aos medicamentos antidepressivos utilizados na clínica médica (LINDE et al., 1996; BILIA; GALLORI; VINCIERI, 2002).

Há estudos clínicos controlados que comprovam a eficácia antidepressiva do extrato em comparação com os antidepressivos alopáticos (CHIOVATTO et al., 2011; RYCHLIK et

al., 2001). Seus principais constituintes ativos responsáveis pela ação antidepressiva são a hipericina e a hiperforina, cujo mecanismo de ação é devido à inibição da recaptação da serotonina (5-HT), da norepinefrina (NE), dopamina (DA) e à ativação do ácido gamaminobutírico (GABA) e de receptores de glutamato, além de promover alteração no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) (LAWVERE; MAHONEY, 2005).

Sabe-se que a exposição intrauterina a agentes farmacológicos que alteram a homeostasia da 5-HT pode ocasionar perturbações neurais e comportamentais que persistem na idade adulta (FORCELLI; HEINRICHS, 2007). O papel da 5-HT é essencial para o desenvolvimento do cérebro, regulação do humor e estresse e suas alterações na sinalização fetal implica em riscos para a saúde ao longo da vida. Esta modificação nos sinais de 5-HT pode ser decorrente da exposição à inibidores da recaptação de serotonina durante a vida intrauterina e a variações genéticas do transportador de 5-HT (SLC6A4). O resultado desta alteração vai depender da interação entre a variação biológica, a fatores relacionados ao humor materno, a exposição pré-natal a fármacos e ao ambiente social pós-natal (OBERLANDER, 2012).

A exposição pré-natal a fluoxetina, um inibidor seletivo de receptação de serotonina, altera a densidade da proteína transportadora de serotonina no hipocampo e na amígdala de ratos machos (CABRERA-VERA; BATTAGLIA, 1998). Em ratos, os níveis de serotonina são altos no cérebro imaturo assim como a expressão de receptores de alta afinidade no período perinatal (BORELLA; BINDRA; WHITAKER-AZMITIA, 1997). Como o Hp, considerado o “Prozac natural”, também age como inibidor da recaptação de serotonina, este pode vir a alterar a homeostasia do neurotransmissor no feto em desenvolvimento. Estudo realizado no laboratório do Centro de Biologia da Reprodução que utilizou o sistema de imagem in vivo para determinar a biodistribuição do extrato na placenta e nos organismos fetal e materno de ratos Wistar, verificou a presença de constituintes do extrato no sangue, na gordura retroperitoneal, nos órgãos vitais e na placenta das mães tratadas e no fígado e cérebro dos filhotes, sugerindo que o Hp atravessa a barreira placentária e que pode atingir o feto em desenvolvimento (dados ainda não publicados).

Como o Hp tem sido amplamente prescrito para a depressão e utilizado por mulheres durante a gestação, este trabalho propôs-se a estudar se a utilização do Hp no período gestacional irá alterar o desenvolvimento fetal do cérebro resultando em alterações no desenvolvimento neonatal e comportamental em termos de aprendizado e memória dos filhotes de ratas Wistar expostos durante a vida intrauterina.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 TRANSTORNOS DEPRESSIVOS

O transtorno depressivo ou a depressão, na linguagem corrente, é caracterizado por alterações do humor (tristeza, irritabilidade, apatia e falta da capacidade de sentir prazer) e por outros aspectos, que inclui alterações cognitivas, psicomotoras e vegetativas (PORTO, 1999).

A principal teoria bioquímica da depressão está relacionada ao déficit funcional das monoaminas transmissoras, como a 5-HT e NE, em certas regiões cerebrais (RANG et al., 2004).

O CID-10 categoriza os transtornos depressivos em:

- F32- Episódio depressivo (episódio depressivo único), que pode ser classificado quanto à intensidade em:
 - F32.0- Episódio depressivo leve
 - F32.0-Episódio depressivo moderado
 - F32.0-Episódio depressivo grave
- F33 - Transtorno depressivo recorrente.

Os episódios leves e moderados podem ser classificados de acordo com a presença ou ausência de sintomas somáticos. Os episódios depressivos graves são subdivididos de acordo com a presença ou ausência de sintomas psicóticos.

Segundo Porto (1999), para o diagnóstico da depressão, deve-se levar em consideração:

- **os sintomas psíquicos:** como as alterações do humor (sensação de tristeza, autodesvalorização e sentimentos de culpa), redução da capacidade de sentir prazer nas atividades cotidianas, sensação de perda de energia ou fadiga, diminuição da capacidade de se concentrar e de tomar decisões.
- **os sintomas fisiológicos:** redução do interesse sexual, alterações do sono e do apetite.
- **as evidências comportamentais:** redução da interação social, crises de choro, comportamentos suicidas, retardo ou agitação psicomotora.

A depressão é considerada um transtorno crônico, incapacitante e recorrente, de forma que cerca de 80% dos indivíduos que receberam algum tratamento para um determinado episódio depressivo terão um segundo episódio ao longo de suas vidas, sendo na ordem de quatro a mediana de episódios ao longo da vida. Estima-se que a depressão é a quarta causa específica nos anos 90 de incapacitação, sendo que, para o ano de 2020, a previsão é a de que

será a segunda causa em países desenvolvidos e a primeira em países em desenvolvimento. A incapacitação da depressão causa maiores prejuízos no estado de saúde do que a angina, a artrite, a asma e o diabetes, tendo somente equivalência quando comparada às doenças isquêmicas cardíacas graves (FLECK et al., 2009).

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS, 2001), a depressão é apontada como a quinta maior questão de saúde pública, sendo que até 2020 deverá estar em segundo lugar. Sua ocorrência está associada a altos índices de incapacitação funcional, elevados custos socioeconômicos, queda da qualidade de vida, elevado risco de suicídio e desenvolvimento de outras doenças de alta mortalidade. A sua prevalência é maior em mulheres do que em homens, na proporção de 2:1, podendo atingir mulheres no período gestacional e no pós-parto (KESSLER, 2003; PICCINELLI; WILKINSON, 2000).

2.1.1 Depressão no período gestacional

A gestação é um período caracterizado por alterações físicas, hormonais, psíquicas e de inserção social que podem influenciar diretamente na saúde mental das mulheres (CAMACHO et al., 2006). Cerca de 10% delas apresentam episódios depressivos neste período (MARCUS et al., 2001) e esta condição pode afetar o desenvolvimento da gestação e trazer malefícios tanto para a mãe quanto para o feto, a curto e a longo prazo (CAMPAGNE, 2004).

Segundo Lima e Tsunehiro (2008), as repercussões materno-fetais da depressão na gravidez para a gestante são: alterações na qualidade de vida, fator de risco para a depressão puerperal, pré-eclâmpsia, trabalho de parto prematuro; e para o feto/criança: elevação de NE e cortisol, baixo peso ao nascer, distúrbios do sono e no desenvolvimento infantil.

A literatura científica indica que os períodos gestacional e puerperal são as fases de maior prevalência de transtornos mentais na mulher, principalmente no primeiro e no terceiro trimestre de gestação e nos primeiros 30 dias de puerpério. A intensidade das alterações psíquicas depende de fatores orgânicos, familiares, conjugais, sociais, culturais e da personalidade da gestante. Cerca de um quinto das mulheres no período gestacional e no puerpério apresenta depressão, mas a maioria dessas mulheres não é diagnosticada e tratada adequadamente (PEREIRA; LOVISI, 2008).

Devido à prevalência de transtornos psiquiátricos em mulheres férteis, muitas mulheres estão usando medicações psicotrópicas no momento da concepção. Como todos os medicamentos psicoativos cruzam a barreira placentária, a saúde da mulher e o tratamento da

doença devem ser balanceados contra o risco de exposição do feto durante a gravidez. Muitas vezes o risco de medicação é compensado pela substancial morbidade da doença quando não tratada (MARCUS et al., 2001).

Dados do sistema de saúde da universidade de Michigan sugerem que o diagnóstico da depressão é concluído em apenas 0,8% de mulheres férteis, sendo que a maioria delas recebe tratamento inadequado. Um dos problemas destes tratamentos é a sua adesão após o primeiro mês, devido à ocorrência de efeitos adversos. O diagnóstico e o tratamento incorreto da depressão em mulheres em idade fértil levam à substancial morbidade materna e infantil, além de acarretar uma alimentação inadequada, pré-natais desregrados, abuso de substâncias nocivas e comportamento perigoso, aumentando os riscos na gestação (MARCUS et al., 2001).

Portanto, o tratamento durante a gestação deve ser adequado e cauteloso, para que não prejudique o desenvolvimento fetal, uma vez que a exposição a substâncias psicoativas neste período pode alterar a formação do cérebro. Qualquer tipo de contato ou experiência durante a gestação ou após o parto e durante toda a vida pode promover a comunicação imediata entre os neurônios e desencadear processos moleculares que remodelam as conexões sinápticas (HYMAN, 2000).

2.2 NEUROTRANSMISSORES ENVOLVIDOS COM A DEPRESSÃO

A teoria bioquímica da depressão está relacionada a uma diminuição patológica na neurotransmissão de 5-HT e/ou NE. Estes neurotransmissores desempenham funções importantes na modulação do humor e do sono, na motivação, na percepção da dor e na função neuroendócrina (NADAL-VICENS; CHYUNG; TURNER, 2009). Com a redução destes neurotransmissores nos transtornos depressivos a bomba de recaptação e as enzimas permanecem trabalhando normalmente, porém os neurônios receptores capturam menos neurotransmissores e ocorre uma desregulação no humor (ANDRADE et al.; 2003).

A dopamina e a NE são aminas biogênicas derivadas da tirosina, armazenadas em vesículas e quando liberadas promovem a ativação de receptores pré e pós- sinápticos. Os transportadores destas catecolaminas são alvos de drogas que modulam suas ações e exercem efeitos terapêuticos em doenças como a depressão, ansiedade e transtorno obsessivo-compulsivo (JAYANTHI; RAMAMOORTHY, 2005).

A serotonina é um potente neurotransmissor, derivado do triptofano, que regula diversas funções fisiológicas e está presente em diferentes regiões cerebrais. Possui uma

ampla expressão de receptores, que são divididos em sete classes distintas (5-HT1 a 5-HT7), de acordo com suas características estruturais e operacionais e constitui o alvo de muitos dos fármacos utilizados no tratamento da depressão (HOYERA et al.,2002). Este neurotransmissor aparece cedo no desenvolvimento fetal e tem um amplo papel na morfogênese do cérebro.

Durante a fase pré-natal de desenvolvimento do cérebro, substâncias psicoativas podem modular os receptores e transportadores presentes e desta forma alterar a estrutura química e funcional do cérebro (THOMPSON; LEVITT; STANWOOD, 2009). Por exemplo, um estudo realizado em ratos para avaliar os efeitos fetais da exposição pré-natal a fluoxetina, um inibidor seletivo de recaptação de serotonina, muito utilizado no tratamento da depressão, demonstrou que este fármaco atravessa a placenta e atinge o tecido cerebral do feto (CALAPAI et al., 1999).

Como a maioria dos fármacos utilizados para o tratamento dos transtornos depressivos atua na homeostasia destes neurotransmissores, torna-se, portanto necessário avaliar os efeitos a curto e a longo prazo decorrentes desta exposição.

2.3 TRATAMENTOS FARMACOLÓGICOS PARA A DEPRESSÃO

2.3.1 Medicamentos alopáticos

Para o tratamento da depressão, são utilizados medicamentos das seguintes classes (RANG et al., 2004):

- **Inibidores da captação de monoaminas:**

- **antidepressivos tricíclicos:** inibidores não seletivos da captação das monoaminas (noradrenalina e serotonina), por competição pelo sítio ligante da proteína transportadora. Exemplos: imipramina e amitriptilina.

Os antidepressivos tricíclicos são bons agentes antidepressivos, porém tem mais efeitos colaterais do que os inibidores seletivos de serotonina, incluindo boca seca, visão turva, constipação, tonturas, sintomas cardíacos, sedação ou agitação e ganho de peso. Além destes efeitos, esses agentes podem ser letais se utilizados em doses altas.

Os estudos e dados a partir de acompanhamento em longo prazo sobre os resultados do desenvolvimento de crianças expostas aos antidepressivos tricíclicos através da lactação são

limitados. Esses agentes são secretados no leite materno e seus níveis no soro infantil são variáveis e, às vezes, indetectáveis (MARCUS et al., 2001).

- **inibidores seletivos da captação da serotonina** (exemplo: fluoxetina, sertralina e paroxetina): são excelentes agentes de primeira linha e também podem ser usados em pacientes com transtorno do pânico ou transtorno obsessivo-compulsivo. Os potenciais efeitos colaterais da fluoxetina incluem: agitação, insônia, desconforto gastrointestinal como náusea ou diarreia, tensão facial ou dores de cabeça, efeitos colaterais sexuais ou ganho de peso. A fluoxetina e a sertralina são secretadas no leite materno e há registros de irritabilidade infantil com exposição à fluoxetina através da lactação. Já a sertralina não possui relatos de interferências neonatais em recém-nascidos lactantes. A paroxetina não foi encontrada em quantidades mensuráveis no leite materno, e não houve relatos de situações adversas quando este agente foi usado (MARCUS et al., 2001).

- **Inibidores da enzima monoaminoxidase (MAO)** (exemplo: fenelzina, trancilpromina): inibem uma ou ambas as formas da MAO cerebral, aumentando assim os estoques de noradrenalina e de serotonina nos terminais nervosos.

Os antidepressivos inibidores da MAO oxidase foram associados com retardo de crescimento, anomalias congênitas e morte fetal em estudos realizados com animais e humanos, e estão contraindicados na gravidez (MARCUS et al., 2001).

Estes medicamentos atuam como descritos acima, por meio de mecanismos de ação distintos e sua escolha depende da história clínica do paciente (ALMEIDA, 2006). Embora estes fármacos sejam eficazes no tratamento da depressão, seus efeitos adversos levam muitos pacientes a buscarem tratamentos alternativos, como os fitoterápicos, cujo uso está cada vez mais difundido no país. Além disso, a escolha de substâncias naturais pelos próprios pacientes devido à dificuldade de adesão à farmacoterapia alopática, é uma realidade presente em nosso cotidiano.

Atualmente, a depressão está presente em 33,3% dos pacientes nos Estados Unidos e os antidepressivos são os medicamentos mais prescritos em 160 milhões de prescrições por ano. Conforme resultados de estudos recentes este é um cenário favorável para o trabalho com terapias naturais, pois concluiu-se que o tratamento da depressão leve a moderada não foi divergente quando utilizados e comparados os resultados com os antidepressivos alopáticos e o placebo (BONGIORNO ; LOGIUDICE, 2010).

2.3.2 *Hypericum perforatum* L.

O gênero *Hypericum* Linn. pertence à família Hypericaceae, compreendendo mais de 450 espécies, sendo *Hypericum perforatum* Linnaeus (1753) a mais representativa (ALVES et al., 2014).

O Hp popularmente conhecido como erva de São-João, é encontrado em regiões como a Europa, Ásia Ocidental e Norte da África. O Hp tem sido amplamente utilizado como antidepressivo no tratamento de transtornos de depressão leve a moderada (GUPTA; MÖLLER, 2003). O consumo de produtos derivados desta planta aumentou consideravelmente e é, atualmente, um dos fitoterápicos mais consumidos no mundo (WILLS; BONE; MORGAN, 2000).

Extratos orgânicos e aquosos de Hp são utilizados para o tratamento da depressão unipolar leve e moderada. Primeiramente, estas indicações surgiram através de estudos empíricos seguidos por testes clínicos. Foi seguindo estas etapas que a avaliação antidepressiva confirmou que os extratos de Hp são tão efetivos quanto os antidepressivos convencionais e com a vantagem de causar menos efeitos colaterais (ALVES et al., 2014).

Os princípios ativos estão presentes nas folhas e flores frescas ou secas da planta e possuem afinidade pelo sistema nervoso central e o sistema imune (BURKHART, 2007). Os constituintes químicos ativos são divididos nas seguintes classes: derivados das naftodiantronas (ex: a hipericina e a pseudohipericina); derivados dos floroglucinois (ex: hiperforina); os flavonoides; os fenilpropanos; as proantocianidinas; as xantonas, e os óleos essenciais (ERDELMEIER; KOCH; HOERR, 2000). Os constituintes responsáveis pelo efeito antidepressivo do extrato são a hipericina e a hiperforina, cujas fórmulas químicas estão representadas nas figuras 1 e 2 (BARNES; ANDERSON; PHILLIPSON, 2001). Estas substâncias são descritas como potentes moduladores de transmissão sináptica ao agir como inibidor da recaptação de neurotransmissores como a dopamina, a norepinefrina, a serotonina. Além disso, é capaz de bloquear a atividade dos receptores do GABA e do N-metil-D-aspartato (NMDA), e de atuar no mecanismo celular de íons de Cálcio (Ca^{2+}), Zinco (Zn^{2+}), Hidrogênio (H^+) e Sódio (Na^+), alterando as reservas na mitocôndria e canais celulares (BOURON; LORRAIN, 2013).

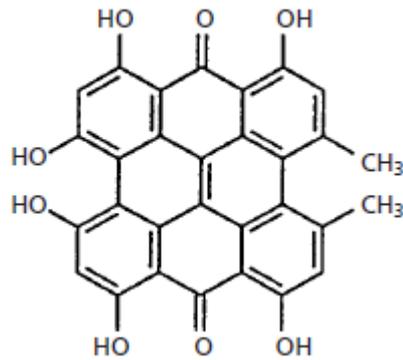


Figura 1: Fórmula estrutural da hipericina.

Fonte: BARNES; ANDERSON; PHILLIPSON, 2001.

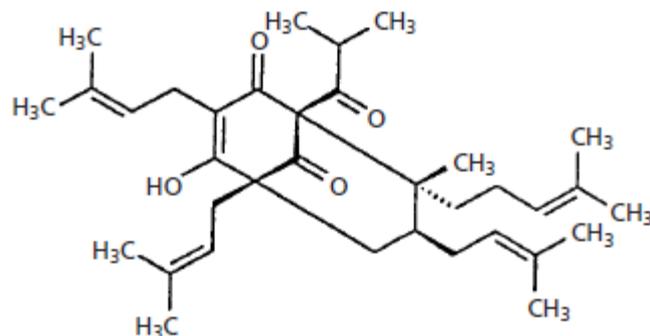


Figura 2: Fórmula estrutural da hiperforina.

Fonte: BARNES; ANDERSON; PHILLIPSON, 2001.

A hiperforina é descrita como o principal componente responsável pelo efeito antidepressivo do Hp, sendo caracterizada como um constituinte químico instável, sensível à temperatura e a luz. Além da ação antidepressiva possui outros efeitos farmacológicos, como por exemplo: *in vivo* é capaz de promover ganho cognitivo e ter ação ansiolítica, e *in vitro* promover efeito anticarcinogênico e antioxidante (ZANOLI, 2004).

Vários estudos clínicos demonstraram a eficácia terapêutica do Hp em relação ao placebo e aos antidepressivos clássicos (VOLZ; LAUX; WOELK, 2000). Um trabalho realizado com Hp e antidepressivos inibidores seletivos da receptação de serotonina demonstrou resultados similares em relação a taxa da resposta clínica para a depressão (RAHIMI et al., 2009). Em outro estudo, pacientes deprimidos tratados com placebo e dois diferentes extratos de Hp, administrados durante 42 dias, apresentaram redução na pontuação da escala de Depressão Hamilton, escala que é utilizada para avaliar a gravidade da depressão (LAAKMANN et al., 1998). Entretanto, estudos realizados em ratos, com a aplicação de

testes do nado forçado e da suspensão da cauda, demonstraram que o extrato de Hp possui efeito antidepressivo dose-dependente (BACH-ROJECKY et al., 2004).

Além da atividade antidepressiva, o extrato de Hp apresenta outras atividades farmacológicas, tais como: antiviral e antitumoral (MISKOVSKY, 2002) e antibacteriana contra bactérias Gram positivas (SADDIQE et al., 2010).

Trabalhos recentes relataram os efeitos benéficos do uso preventivo do Hp no tratamento de desordens causadas pelo estresse na memória (TROFIMIUK;HOLOWNIA; BRASZKO, 2011_a), sugerindo que este fitoterápico possa prevenir a deterioração da memória induzida pelo estresse em ratos (TROFIMIUK; WALESIUKE; BRASZKO, 2006_b). O efeito positivo da administração a longo prazo do Hp sobre a aprendizagem e a memória espacial em ratos Wistar foi observada com mudanças significativas no teor de serotonina no cérebro (WIDY-TYSZKIEWICZ et al., 2002). Outro estudo realizado em ratos e camundongos sugeriu que o extrato de Hp atua como um antidepressivo com propriedades que reforcem a memória, indicando a hiperforina como responsável pelos efeitos cognitivos (KLUSA et al., 2001).

Os efeitos adversos decorrentes do uso do extrato de Hp incluem sintomas gastrointestinais, tontura, confusão, sedação e mais raramente a fotossensibilização (ERNEST et al., 1998). Além disso, o Hp promove a indução do citocromo CYP3A4 (enzimas responsáveis pela metabolização de diversos fármacos), o que pode ocasionar algumas interações medicamentosas com alguns fármacos como por exemplo: anticoncepcionais, antineoplásicos, antivirais, etc (BURKHART, 2007).

Em relação à utilização do Hp durante o período gestacional, há estudos experimentais em roedores que não encontraram nenhum dano ao desenvolvimento embrionário (NEPOMUCENO et al., 2005) e fetal (BORGES et al., 2005). Além disso, o estudo pós-natal, com ratos Sprague-Dawley expostos ao Hp do período gestacional ao desmame, não demonstraram alterações comportamentais na prole (CADA et al., 2001). Porém, um estudo clínico realizado por Lee e colaboradores (2003), com mães lactantes que utilizaram diferentes extratos de Hp durante o período pós-natal, evidenciou efeitos adversos nos lactentes, como cólica, sonolência e letargia. Em contrapartida, um estudo realizado por Moretti e colaboradores (2009), sobre o uso de Hp em mulheres grávidas, evidenciou o uso seguro durante o período fetal, embora ainda sejam necessários estudos mais aprofundados.

2.4 DESENVOLVIMENTO NEONATAL

A exposição a um agente químico durante o desenvolvimento intrauterino pode ocasionar algum tipo de distúrbio que poderá ser identificado no período peri e pós-natal, o que torna necessário a avaliação dos sinais de desenvolvimento físico e reflexológico, já que estes possuem uma relação com a teratologia comportamental (SILVA, 1991).

A resposta ao agente dependerá do período de desenvolvimento do sistema nervoso no qual ocorreu a exposição. Os períodos críticos compreendem o período da neurogênese, da migração e da diferenciação neuronal.

Além do potencial tóxico do agente, o tempo de exposição a este também determinará o efeito tóxico sobre o desenvolvimento do sistema nervoso (KRINKE, 2000). Em roedores, os períodos críticos ou vulneráveis para o desenvolvimento do sistema nervoso vão desde a vida intrauterina, com o início da formação da placa neural, até o desenvolvimento pós-natal, com a maturação completa da barreira hematoencefálica e dos sistemas colinérgicos e dopaminérgicos (KRINKE, 2000).

Para a avaliação do desenvolvimento somático deve se acompanhar o ganho ponderal dos filhotes e o surgimento dos sinais físicos de desenvolvimento, tais como: desdobramento das orelhas, erupção dos dentes incisivos, abertura dos olhos, descida dos testículos e abertura vaginal. Para a avaliação neuromotora analisa-se a resposta postural, a geotaxia negativa, a esquiva ao abismo, o teste de orientação e a preensão palmar. Dependendo do tipo de tratamento em que os animais forem submetidos, o desenvolvimento somático e neurocomportamental poderá ser acelerado ou retardado (SILVA, 1991).

Trabalho realizado no CBR para estabelecer o padrão do desenvolvimento físico e neuromotor de ratos Wistar da colônia do biotério encontrou os seguintes dados, apresentados na tabela 1 e 2:

TABELA 1: Indicadores do desenvolvimento físico de ratos Wistar da colônia do Centro de Biologia da Reprodução- Universidade Federal de Juiz de Fora, 2004-2005.

Sinais de Desenvolvimento Físico	Dia de Aparecimento do sinal	
	Machos	Fêmeas
Aparecimento de lanugo	3,2±0,4 (60)	3,3±0,5 (60)
Desdobramento de orelha	4,8±0,4 (60)	4,8±0,4 (60)
Aparecimento de pêlos	10,6±0,6 (60)	10,7±0,5 (60)
Abertura dos olhos	16,9±0,4 (60)	16,8±0,5 (60)
Erupção dos incisivos superiores	9,9±0,6 (60)	10,1±0,6 (60)
Erupção dos incisivos inferiores	12,2±0,6 (60)	12,1±0,6 (60)
Abertura vaginal	---	34,4±1,7 (60)
Descida dos testículos	23,0±0,5 (60)	---

Dados expressos em média ±desvio padrão (número de animais)

Fonte: FARIA et al., 2005.

TABELA 2: Indicadores do desenvolvimento neuromotor de ratos Wistar da colônia do Centro de Biologia da Reprodução- Universidade Federal de Juiz de Fora, 2004-2005.

Sinais de Desenvolvimento Reflexológico	Dia de Aparecimento do sinal	
	Machos	Fêmeas
Preensão Palmar	2,0±0,1 (60)	2,0±0,0 (60)
Resposta postural	3,3±0,6 (60)	3,2±0,5 (60)
Esquiva ao abismo	8,3±0,8 (60)	8,2±0,9 (60)
Teste de orientação	9,8±1,2 (60)	9,9±1,3 (60)
Geotaxia negativa	9,4±0,8 (60)	9,1±0,8(60)

Dados expressos em média ±desvio padrão (número de animais)

Fonte: FARIA et al., 2005.

Entretanto, os sinais de desenvolvimento físico e reflexológico podem variar de acordo com a linhagem e sexo do animal, além da variabilidade intrínseca da colônia e dos critérios utilizados pelo pesquisador (SILVA, 1991).

2.5 APRENDIZAGEM E MEMÓRIA

A memória pode ser definida como a capacidade de adquirir, armazenar e evocar informações. A aquisição significa aprendizado ou aprendizagem e existem quatro formas básicas de aprendizagem, a saber: aprendizagem perceptiva, pela qual se aprende a reconhecer um estímulo que já foi apresentado anteriormente; aprendizagem estímulo-resposta: que determina um comportamento específico quando um estímulo particular é apresentado e inclui o condicionamento clássico e o instrumental; aprendizagem motora: na qual se aprende a executar uma nova resposta; e a aprendizagem relacional que está relacionada ao estabelecimento e à recuperação de memórias de eventos e episódios (CARLSON, 2002). O processo pelo qual as informações são armazenadas é denominado de consolidação e a evocação traduz-se no ato de recordar-se ou lembrar-se de algo (IZQUIERDO, 2011).

A memória pode ser classificada quanto a sua natureza e o tempo de retenção. Quanto à sua duração ou retenção, a memória pode ser classificada em memórias de curto prazo (de poucos minutos a até uma ou seis horas) e memórias de longo prazo (as quais persistem por dias, meses ou anos). Quanto a sua natureza, pode ser dividida em explícita (ou declarativa) e implícita (ou não declarativa) (IZQUIERDO, 2002):

- Memória explícita: são adquiridas com intervenção da consciência. É utilizada para a recordação de datas importantes, fatos históricos marcantes, números de telefones e nomes de pessoas.

- Memória implícita: são adquiridas sem a percepção do processo. Normalmente, são memórias de procedimentos ou associativas em sua natureza.

Ocorre perda ou falha de memória quando as sinapses responsáveis pela formação ou evocação de um ou outro tipo de memória encontram-se inibidas ou alteradas. A senilidade geralmente vem acompanhada de perda de memória devido a perda neuronal. Além disso, distúrbios afetivos, como a depressão, também vem acompanhado de algum grau de amnésia. As demências, ao apresentarem perda das funções mentais, também se caracterizam como perda de memória. Entre elas está a doença de Alzheimer, doença de Pick e doença de Creutzfeld-Jacob (IZQUIERDO, 2002).

O estabelecimento da memória envolve mecanismos fisiológicos e bioquímicos que alteram a forma de perceber, pensar, planejar e agir, presumivelmente por alterar os circuitos neurais envolvidos na percepção, desempenho, pensamento e planejamento. A adaptação do indivíduo ao ambiente depende da aquisição, retenção e evocação destas informações para planejar uma ação.

Os processos bioquímicos e metabólicos que ocorrem em distintas estruturas cerebrais durante a formação da memória, incluem alterações na estrutura, na distribuição e no número de sinapses. No processo de consolidação de memória ocorrem eventos moleculares que levam à transcrição e tradução gênicas, resultando na síntese de proteínas sinapse específicas, que são essenciais para as modificações funcionais e estruturais para a transmissão sináptica e a memória (IZQUIERDO et al., 2009).

Os principais neurotransmissores envolvidos com os processos de memória são: glutamato, GABA, dopamina, noradrenalina, serotonina e a acetilcolina. Os eventos bioquímicos relacionados com a formação da memória podem ser regulados por meio de mecanismos hormonais e neuro-humorais relacionados ao estresse, à ansiedade e ao controle do humor, modulando sinapses gabaérgicas, noradrenérgicas, dopaminérgicas e serotoninérgicas (DALMAZ; NETTO, 2004). O glutamato é capaz de promover uma excitação repetida das células hipocâmpais através da estimulação de receptores glutamatérgicos, que culminará na transcrição de fatores de DNA e proteínas importantes para a transmissão sináptica e a memória (IZQUIERDO, 2011). O GABA, um neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central, está associado às emoções e memória. Drogas que facilitam a transmissão do GABA (GABA agonistas) produzem um efeito ansiolítico, tranquilizante, enquanto drogas que bloqueiam a transmissão gabaérgica (GABA antagonistas) induzem ansiedade, aumento da atividade locomotora e, convulsões. As funções mnemônicas requerem certo nível de ansiedade ou estresse para seu correto desempenho, mas falham se esse nível for muito alto (CASTELLANO, 1990). A dopamina é capaz de exercer um efeito modulador sobre a memória no hipocampo, sendo o sistema dopaminérgico importante no processamento mnemônico, pois a ativação dos receptores D1/D5 durante a codificação da memória é necessária para a formação de um traço de memória persistente no hipocampo. (O'CARROLL et al., 2006). A dopamina, noradrenalina e serotonina são importantes na fase inicial da consolidação de memória de longa duração, sendo a liberação de noradrenalina no hipocampo essencial para a formação das memórias emocionais (IZQUIERDO, 2011).

A alteração na homeostasia destes neurotransmissores ou o aparecimento precoce no desenvolvimento do SNC de mamíferos promove modificações no desenvolvimento neural e anomalias que podem persistir na idade adulta. Modelos experimentais com drogas que agem sobre o sistema dopaminérgico e gabaérgico demonstraram alterações específicas e robustas em áreas ricas em dopamina do córtex cerebral e nos dendritos gabaérgicos (LEVITTA et al., 1997). Durante o período de desenvolvimento do SNC a expressão inadequada de

receptores específicos de 5-HT pode estar envolvidos na origem de transtornos de ansiedade, autismo e dependência de drogas (GASPAR; CASES; MAROTEAUX, 2003).

A exposição intrauterina a agentes que atuam no SNC, como o Hp, que possui como mecanismo de ação a inibição da recaptação dos neurotransmissores 5-HT, dopamina e noradrenalina, pode expor o feto em desenvolvimento a alterações neurais que serão identificadas tardiamente. Além disso, o Hp possui entre seus constituintes ativos, a hiperforina, que tem apresentado ação nootrópica, ao promover melhora na capacidade de memorização e de consolidação no teste de esquiva passiva em camundongos (KLUSA et al.,2001).

O processo de aprendizagem e memória em estudos experimentais com animais é medido através de mudanças no comportamento do animal, decorrentes de uma experiência prévia. Os testes utilizados para avaliação da memória em modelos animais incluem, dentre outros, a esquiva inibitória, o condicionamento clássico de medo a um estímulo discreto e ao contexto, o teste de reconhecimento de objetos, as tarefas de discriminação simultânea e de corridas pareadas no labirinto em T, e as tarefas com plataforma visível e oculta no labirinto aquático (ALMEIDA, 2006).

3HIPÓTESE

O extrato seco de *Hypericum perforatum* altera o desenvolvimento neonatal e o processo de memória nos filhotes de ratas Wistar tratadas durante a gestação.

4 OBJETIVOS

4.1 GERAL

Avaliar a atividade do extrato seco de *Hypericum perforatum* sobre o desenvolvimento neonatal e o processo de memória nos filhotes de ratas Wistar tratadas durante a gestação.

4.2 ESPECÍFICOS

- Acompanhar o desenvolvimento físico e identificar o aparecimento dos reflexos neuromotores da prole.
- Avaliar a memória de longa duração dos filhotes na vida adulta.
- Identificar possíveis efeitos tóxicos maternos.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 ANIMAIS

Para a realização deste estudo foram utilizados ratos Wistar (machos e fêmeas) filhotes de ratas que receberam tratamento durante a gestação com o extrato de Hp. Estes animais foram obtidos da colônia do biotério do Centro de Biologia da Reprodução (CBR) - Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF).

5.1.1 Diagnóstico de prenhez

Ratas nulíparas (n=40), com idade compreendida entre 60 a 90 dias de vida e faixa de peso corporal entre 160 a 180g, foram acasaladas com machos reprodutores da colônia na proporção de 2:1. Na manhã seguinte ao acasalamento, foi realizado o diagnóstico de prenhez ao observar a presença de espermatozoides no esfregaço vaginal (dia 1 pós-inseminação). Em seguida, as ratas foram separadas em gaiolas individuais e organizadas nos grupos experimentais para início do tratamento.

5.1.2 Alojamento dos animais

Os animais foram alojados em gaiolas de polipropileno (49 X 34 X 16 cm), forradas com maravalha não esterilizada, providas de cocho para ração do tipo peletizada (Nuvilab®) Quimtia S.A. Colombo PR e mamadeira com água filtrada. As gaiolas foram colocadas em armários com fluxo de ar contínuo e localizadas em salas com temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), umidade de 40 a 60%, e ciclo de luminosidade claro/escuro de 12h. Cada gaiola conteve no máximo cinco animais do mesmo sexo.

5.2 EXTRATO DE *Hypericum perforatum* L.

Para o tratamento das ratas gestantes, foi utilizado o extrato seco de *Hypericum perforatum*, manipulado pela farmácia de manipulação e drogaria MBPharma LTDA. O extrato tinha como padrão 0,3% de hipericina.

5.3 DESENHO EXPERIMENTAL

As ratas Wistar prenhes foram distribuídas aleatoriamente em um grupo controle, que recebeu água filtrada, e três grupos tratados (n = 10 ratas/grupo) com o extrato de Hp, nas doses de 36 mg/kg/dia; 72 mg/kg/dia e 144 mg/kg/dia, durante a gestação, por gavagem. O Hp possui ação antidepressiva no sistema nervoso central nas doses que variam de 30 a 100 mg/kg/dia, que baseado na área de superfície corporal, compara-se a dose clínica utilizada em humanos (GREGORETTI et al.; 2001) A primeira dose de tratamento utilizada foi de 36 mg/kg/dia e a segunda dose o dobro da primeira, e a terceira correspondeu a quatro vezes a primeira dose, segundo preconizado para estudos toxicológicos (OECD, 1999).

Após o parto, foram escolhidos, aleatoriamente, de todos os grupos, machos e fêmeas de cada ninhada, para a formação de quatro grupos de dez machos e dez fêmeas. Estes grupos foram submetidos aos testes de desenvolvimento neonatal e aos testes de memória na fase adulta.

5.4 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE MATERNA

A identificação de possíveis efeitos tóxicos maternos foi realizada através da avaliação semanal do consumo de ração e do peso corporal, da piloereção, deambulação, estereotipia, cromodaciorreia, diarreia (observados diariamente), e ocorrência de mortes das gestantes (OECD, 1999).

5.5 AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO NEONATAL

5.5.1 Desenvolvimento físico

Para a avaliação do desenvolvimento físico dos animais, foi realizado o acompanhamento do peso corporal nos dias 4, 10, 15, 20 e 25 após o parto. Também foi observado o dia de abertura dos olhos, do desdobramento das orelhas, do aparecimento de lanugo e de pelos, da erupção dos incisivos superiores e inferiores, da abertura vaginal e da descida dos testículos (BAILEY et al., 2009; OECD, 1999).

5.5.2 Desenvolvimento reflexológico

Para avaliação do desenvolvimento reflexológico, foram realizados os seguintes testes: teste de preensão palmar, resposta postural, esquiva ao abismo, orientação e geotaxia negativa, com duração de 15 segundos cada teste, seguindo o preconizado por SILVA (1991). Todos os testes foram realizados apenas uma vez por dia até o dia em que os filhotes apresentarem a resposta esperada.

✓ Teste de preensão palmar

Neste teste, foi utilizado um clipe para testar a capacidade de preensão palmar dos animais. O objeto foi colocado próximo à pata dianteira do animal e foi observado se ocorreu movimento de preensão, sendo este resultado considerado positivo para tal característica, representado na figura 3.



Figura 3: Teste de preensão palmar. Fonte: Arquivo pessoal.

✓ Teste de resposta postural:

O teste de resposta postural avaliou se o filhote colocado sobre uma mesa em decúbito dorsal seria capaz de retornar à posição de decúbito ventral, representado na figura 4.



Figura 4: Teste de resposta postural (Resposta positiva). Fonte: Arquivo pessoal.

✓ Esquiva ao abismo:

Neste teste, as patas dianteiras do filhote foram colocadas sobre a borda de uma mesa e foi observado se houve o deslocamento das patas em direção oposta a esta borda, representado na figura 5.



Figura 5: Teste de esquiva ao abismo (Resposta positiva). Fonte: Arquivo pessoal.



Figura 6: Teste de esquia ao abismo (Resposta negativa). Fonte: Arquivo pessoal.

✓ Teste de orientação:

Para avaliar a orientação do animal, o filhote foi suspenso pela cauda de tal maneira que sua cabeça estivesse próxima a uma mesa, permitindo que suas vibrissas tocassem a superfície. O movimento de levantar a cabeça e as patas dianteiras foi considerado como resposta positiva. O teste está representado na figura 7.



Figura 7: Teste de orientação. Fonte: Arquivo pessoal.

✓ Geotaxia negativa:

O filhote foi colocado sobre uma rampa inclinada a 45° , com a cabeça voltada para baixo, representado pela figura 8. Foi observado se o animal conseguiu dar uma volta de 180° , deslocando o corpo completamente para a parte superior da rampa, sendo este movimento considerado positivo para o teste.



Figura 8: Teste de geotaxia negativa. Fonte: Arquivo pessoal.

5.6 TESTES COMPORTAMENTAIS DE APRENDIZADO E MEMÓRIA:

5.6.1 Teste de reconhecimento de objetos

Este teste é baseado na tendência de ratos e camundongos interagirem mais com objetos novos do que com objetos familiarizados, o que possibilita o estudo da memória destes animais (ENNACEUR; DELACOUR, 1988).

O teste foi realizado em uma arena de material derivado da madeira, conhecida como MDF-Medium Density Fiberboard, com base retangular de 60 x 40 cm, piso coberto com antiderrapante, cercada por paredes com 30 cm de altura. Os objetos utilizados foram quatro cilindros de plástico com medidas de 3 cm de diâmetro e 5 cm de altura, sendo três brancos e um preto, representados nas figuras 9,10 e 11.

Etapas:

A) O animal foi colocado na arena para reconhecimento do ambiente durante cinco minutos (1º dia-habituação) e após 24h, foi realizada a primeira fase do teste.



Figura 9: Caixa de reconhecimento de objetos.

B) Primeira fase (também denominada de sessão de treino): o animal foi colocado na arena na presença dos dois cilindros brancos durante cinco minutos, permitindo que o animal explore os cilindros brancos, representado na figura 10 (2^o dia-Treino). Após 24h, foi realizada a segunda fase do teste.



Figura10: Objeto branco-familiar

C) Segunda fase: o animal foi colocado durante cinco minutos na arena, na presença de um cilindro branco (igual ao utilizado no dia anterior) e um objeto novo, o cilindro preto, representado pela figura 11 (3^o dia).



Figura 11: Objeto preto-novo

Nesta fase, foi cronometrado o tempo em que o animal explora os cilindros branco e preto, e o reconhecimento foi diferenciado pelo ato do animal passar mais tempo explorando o objeto novo, ou seja, o cilindro preto. O reconhecimento foi considerado positivo quando o animal cheirou ou tocou o cilindro com o focinho ou as patas. Para a análise dos resultados, foi utilizado o índice de reconhecimento, que é calculado pela fórmula:

$$IR = \frac{TB}{(TA + TB)}$$

TA= tempo gasto para explorar o objeto que já é conhecido do animal

TB=tempo gasto para explorar o novo objeto.

Após cada etapa, os cilindros e a arena foram limpos com álcool 70%.

5.6.2 Teste de esquiva inibitória

O teste de esquiva inibitória é utilizado para avaliação da memória em animais de experimentação. Consiste basicamente em uma sessão de treino, no qual o animal é punido com choque nas patas após exibir determinado comportamento, como, por exemplo, descer de uma plataforma, e em uma sessão de teste ou retenção, na qual o tempo de latência que o animal leva para exibir o mesmo comportamento é registrado e utilizado como uma medida de aprendizagem (QUILLFELDT, 2006). Animais normais aprendem a inibir o comportamento no qual ele foi punido e, portanto, apresenta uma latência muito maior no teste de retenção, quando comparada com a apresentada na sessão de treino (ALMEIDA, 2006; QUILLFELDT, 2006). Este teste foi realizado numa caixa de esquiva passiva para ratos (modelo EP104R) stepdown, da INSIGHT®, representado na figura 12.



Figura 12: Caixa de esquiva passiva. Fonte: Disponível em

<<http://insightltda.com.br/produto.php?id=1520#pag>>

Etapas:

Sessão treino: o animal foi colocado no equipamento, sobre uma plataforma. Após sua descida da plataforma e posicionamento das quatro patas sobre a grade, o choque de intensidade 0,5mA durante 2s foi acionado. Em seguida, o animal foi retirado da esquiua.

Sessão teste: o animal foi colocado de volta ao equipamento sobre a plataforma. Foi realizado o registro do tempo de latência que o animal demorou a descer da plataforma, e, conseqüentemente, ser submetido ao choque. Foi determinado um período de 3 minutos para a latência máxima.

5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise estatística, foi utilizado para dados paramétricos o *one-way analysis of variance* (ANOVA), seguida de teste Dunnett, e para os dados não paramétricos, o teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Mann-Whitney ou Qui quadrado. O nível de significância dos testes foi de $\alpha=0,05$.

5.8 APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS:

Este trabalho foi aprovado pela comissão de ética no uso de animais da UFJF, certificado pelo protocolo n° 101/2012 – CEUA, vide em anexo A (p.78).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados foram apresentados em resumos e artigos científicos, conforme expresso abaixo:

6.1 RESUMO APRESENTADO NO CONGRESSO SBCAL-2014.

Apresentação de trabalho, na forma de pôster, no 13^o Congresso Internacional da Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório – SBCAL-2014, vide em apêndice A (p.51).

**AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO REFLEXOLÓGICO DE FILHOTES
MACHOS DE RATAS WISTAR EXPOSTAS AO EXTRATO DE *HYPERICUM
perforatum* L. DURANTE A GESTAÇÃO.**

Rita de Cássia da Silveira e Sá, José Reinaldo P. V. A. Teixeira, Lorena Ribeiro Silva, Leandro Véspoli Campo, Vera Maria Peters, Marta de Oliveira Guerra.

6.2 RESUMO APRESENTADO NO SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFJF

Apresentação de trabalho, na forma de pôster, no 20^o Seminário de Iniciação Científica da Universidade Federal de Juiz de Fora, 2014, vide em apêndice B (p.53). Este trabalho recebeu Menção Honrosa, vide em anexo B (p.78).

**AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO NEONATAL DE FILHOTES DE
RATAS WISTAR EXPOSTAS AO EXTRATO DE *HYPERICUM perforatum* L.
DURANTE A GESTAÇÃO.**

José Reinaldo Paranaíba Vilela Alves Teixeira (Probic/Fapemig 2013/2014), Lorena Ribeiro Silva, Rita de Cássia da Silveira e Sá, Vera Maria Peters (Orientadora), Martha de Oliveira Guerra.

6.3 ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA NEUROBIOLOGIA:

Artigo Original

VALIDAÇÃO DO EFEITO ANTIDEPRESSIVO DO EXTRATO DE *HYPERICUM PERFORATUM*

VALIDATION OF THE ANTIDEPRESSANT EFFECT OF THE *Hypericum perforatum* EXTRACT

Vinícius de Almeida Vieira^{1,2}, Leandro Vespoli Campos¹, Lorena RibeiroSilva¹, Martha de Oliveira Guerra¹, Vera Maria Peters¹, Rita de Cássia da Silveira e Sá^{1,3}

RESUMO

A depressão é uma doença comum e prevalente que pode exigir tratamento farmacológico. O *Hypericum perforatum* é um antidepressivo eficaz e seguro no tratamento da depressão leve a moderada e, em estudos experimentais, é utilizado o teste do nado forçado como modelo para avaliação de efeito antidepressivo. Considerando o uso do extrato de *H. perforatum*, para fins de pesquisas, no Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora, este trabalho avaliou o efeito antidepressivo do extrato (doses de 36, 72 e 144 mg/kg) utilizando o referido teste. O extrato apresentou efeito antidepressivo significativo, comprovando seu efeito encontrado na literatura.

PALAVRAS-CHAVE: *Hypericum perforatum*, depressão, gravidez, ratos Wistar.

ABSTRACT

Depression is a common and prevalent illness that can demand pharmacological treatment. *Hypericum perforatum* (HP) is an efficient and safe antidepressant used in the treatment of mild to moderate depression, and, in experimental studies, the forced swimming test is used as a model to evaluate its antidepressant effects. Considering the use of the *H. perforatum* extract, for research purposes, in the Centro de Biologia da Reprodução of the Federal University of Juiz De Fora, MG, Brazil, this study evaluated the antidepressant effect of the HP extract (36, 72 and 144 mg/kg doses) using the aforementioned test. The extract presented a significant antidepressant effect, as it was described in the literature.

KEY WORDS: *Hypericum perforatum*, depression, pregnancy, Wistar rats.

¹ Centro de Biologia da Reprodução - Universidade Federal de Juiz de Fora.

² Aluno do Programa de Pós-graduação em Saúde - Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora.

³ Departamento de Fisiologia e Patologia - Universidade Federal da Paraíba.

Autor para correspondência:

Vinícius de Almeida Vieira (viniciusav@hotmail.com)

rua Nair Furtado de Souza, 210/302, bairro Jardim Laranjeiras, Juiz de Fora, Minas Gerais, CEP 36016-190. Telefone (32) 32188481 / (32) 38517092

6.4 ARTIGO SUBMETIDO À REVISTA REPRODUCTIVE TOXICOLOGY

Elsevier Editorial System(tm) for Reproductive Toxicology
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Effect of Hypericum perforatum prenatal exposure on neonatal development and memory of offspring of Wistar rats treated during pregnancy.

Article Type: Full Length Article

Keywords: Hypericum perforatum; pregnancy; neonatal development; memory.

Corresponding Author: Mrs. Lorena Ribeiro Silva, Expert

Corresponding Author's Institution: Universidade Federal de Juiz de Fora

First Author: Lorena Ribeiro Silva, Expert

Order of Authors: Lorena Ribeiro Silva, Expert; José Reinaldo Teixeira; Leandro Campos; Vinícius Vieira; Martha Guerra; Rita Sá; Vera Peters

Manuscript Region of Origin: BRAZIL

Abstract: Hypericum perforatum L. (Hp) extract is used for treating depression and there are few studies about its safe use during pregnancy. This study aimed to investigate the effects of Hp on neonatal development and memory of offspring of Wistar rats treated during gestation. The rats were divided into: a control group (filtered water), and three treatment groups (Hp doses of 36 mg/kg/day; 72 mg/kg/day and 144 mg/kg/day). Newborn rats, monitored during neonatal period, showed physical and reflexologic development signs between the second and the thirty-seventh day of postnatal life, with no significant difference among the groups. The results related to memory, deriving from the inhibitory avoidance test and the objects recognition test, did not present significant alterations either. Hence, Hp did not interfere in the neonatal development or in the memory of rats exposed to this extract during intrauterine life. CEUA/UFJF, nº 101/2012.

- Email de confirmação da revista:

Submission Confirmation for Effect of Hypericum perforatum prenatal exposure on neonatal development and memory of offspring of Wistar rats treated during pregnancy 1



Reproductive Toxicology (rtx@louisville.edu) Adicionar aos contatos 11/02/2015
Para: lorena-ribeiro@hotmail.com

Re: Effect of Hypericum perforatum prenatal exposure on neonatal development and memory of offspring of Wistar rats treated during pregnancy

Dear Mrs. Silva,

Your submission entitled "Effect of Hypericum perforatum prenatal exposure on neonatal development and memory of offspring of Wistar rats treated during pregnancy" has been received by Reproductive Toxicology.

You will be able to check on the progress of your manuscript by logging on to Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/rtx/>.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your manuscript to Reproductive Toxicology.

Warmest Regards,

Reproductive Toxicology

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente trabalho foi observado que as doses utilizadas do extrato de Hp (36 mg/kg/dia, 72 mg/kg/dia e 144 mg/kg/dia) em ratas Wistar prenhes não alterou o desenvolvimento neonatal dos filhotes. Os dias de aparecimento dos sinais físico e reflexológico ocorreram entre o segundo e o trigésimo sétimo dia de vida pós-natal, não apresentando diferença significativa entre os grupos experimentais. Entretanto, em relação ao sinal físico (aparecimento de pelos) houve um atraso em todos os grupos tratados com Hp em relação ao grupo controle dos filhotes fêmeas, porém este atraso não prejudicou o desenvolvimento normal destes animais.

O aprendizado e a memória da prole também não apresentou alteração nos testes comportamentais realizados na vida adulta.

Portanto, o extrato de Hp pode ser uma boa alternativa para o tratamento da depressão durante a gestação, uma vez que não apresentou prejuízo a prole que foi exposta durante a vida intrauterina.

Porém como há poucos trabalhos que avaliam a sua segurança durante o período gestacional, torna-se necessário mais estudos que investiguem a farmacocinética e a farmacodinâmica do Hp durante este período e o seu efeito a longo prazo para garantir a sua segurança.

8 CONCLUSÃO

O extrato de Hp, nas doses utilizadas neste estudo, não apresentou alteração com significância estatística, no desenvolvimento neonatal e nos parâmetros comportamentais referentes ao aprendizado e a memória da prole de ratas expostas durante a gestação. Porém, algumas alterações são importantes e devem ser levadas em consideração, sendo necessário cautela durante seu uso.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, R.V.; SILVA, A.F.; MOREIRA, F.N.; SANTOS, H.P.S.; DANTAS, H.F.; ALMEIDA, I.F.; LOBO, L.P. B; NASCIMENTO, M.A. A atuação dos neurotransmissores na depressão. Acesso em: 9 de dezembro de 2014. Disponível em <<file:///C:/Users/LORENA/Downloads/atuacao%20dos%20neurotransmissores.pdf>>

ALMEIDA, R. N. **Psicofarmacologia Fundamentos Práticos**. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2006.

ALVES, A.C.S.; MORAES, D.C; FREITAS, G.B.L.; ALMEIDA, D.J. Aspectos botânicos, químicos, farmacológicos e terapêuticos do *Hypericum perforatum* L. **Revista brasileira de plantas medicinais**, Campinas, v.16, n.3, p.593-606, 2014.

BACH-ROJECKY, L.; KALODERA, Z.; SAMARZIJA, I. The antidepressant activity of *Hypericum perforatum* L. measured by two experimental methods in mice. **Acta pharmacologica**, v.54, n.2, p.157-162, 2004.

BAILEY, G.P.; WISE, D. L.; BUSCHMANN, J.; HURTT, M.; FISHER, E.J. Pre- and postnatal developmental toxicity study design for pharmaceuticals. **Birth defects research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology**, v. 86, n.6, p. 437–445, 2009.

BAPTISTA, M. N.; BAPTISTA, A. S. D; TORRES, E. C. R. Associação entre suporte social, depressão e ansiedade em gestantes. **Revista de psicologia da vetor editora**, v. 7, n. 1, p. 39-48, 2006.

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

BILIA, A. R.; GALLORI, S.; VINCIERI, F.F. St. John's wort and depression: Efficacy safety and tolerability - an update. **Life sciences**, v.70, p. 3077–3096, 2002.

BONGIORNO, P.; LOGIUDICE, P. Hypericum for Depression. **Natural medicine journal**, v.12, n.2, December, 2010.

BORELLA, A.; BINDRA, M.; WHITAKER-AZMITIA, P.M. Role of the 5-HT_{1A} receptor in development of the neonatal rat brain: preliminary behavioral studies. **Neuropharmacology**, v. 36, p. 445-50, Apr-May, 1997.

BORGES, L. V.; CARMO, J. C.; PETERS, V. M.; LAS CASAS, L.; GUERRA, M. O. A toxicidade do *Hypericum perforatum* administrado a ratas prenhes. **Revista da associação médica brasileira**, v.51, n.4, p. 206-8, 2005.

BOURON, A.; LORRAIN, E. Effets cellulaires et moléculaires de l'hyperforine, um antidepressor vegetal : revue de la littérature. Cellular and molecular effects of the antidepressant hyperforin on brain cells: Review of the literature. **L'Encéphale**, v.590, p-1-6, 2013.

BURKHART, K. *Hypericum perforatum* L (St. John's wort), Clusiaceae and related species. Acesso em: 5 de setembro de 2013. Disponível em: <http://www.aaronsworld.com>

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Envelhecimento e saúde da pessoa idosa**. Cadernos da Atenção Básica n.19. Brasília: Ministério da Saúde, 36p, 2006.

CABRERA-VERA, T.M.; BATTAGLIA, G. Prenatal exposure to fluoxetine (Prozac) produces site-specific and age-dependent alterations in brain serotonin transporters in rat progeny: evidence from autoradiographic studies. **The journal of pharmacology and experimental therapeutics**, n.286, p.1474 -1481, 1998.

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. **Nutritional neuroscience**, v.4, p.135-41, 2001.

CALAPAI, G.; CRUP, I. A.; FIRENZUOLI, F.; CONSTANTINO, G.; INFERRERA, G.; CAMPO, G.M. Effects of *Hypericum perforatum* on levels of 5-hydroxytryptamine, noradrenaline and dopamine in the cortex, diencephalon and brainstem of the rat. **Journal of pharmacy and pharmacology**, v.51, p.723-728, 1999.

CAMACHO, R.S.; CANTINELLI, F.S.; RIBEIRO, C.S.; CANTILINO, A.; GONSALES, B.K.; BRAGUITTONI, E. Transtornos psiquiátricos na gestação e no puerpério: classificação, diagnóstico e tratamento. **Revista psiquiatria clínica**, v.33, n.2, p.92-102, 2006.

CAMPAGNE, D.M. The obstetrician and depression during pregnancy. **European journal of obstetrics & gynecology and reproductive biology**, v.116, n.2, p.125-30, 2004.

CARLSON, N.R. Fisiologia do Comportamento. Editora Manole, São Paulo, 1º edição, 2002. Cap.14: A aprendizagem e a memória: Mecanismos básicos, p. 424-465.

- CARVALHO, A. C. A et al. O uso de drogas psicotrópicas na gestação. **FEMINA**, v.39, n.6, p.331-338, 2009.
- CASTELLANO, C. et al. GABAergic modulation of memory. In: SQUIRE, L.; LINDENLAUB, E., eds. *Biology of memory*. s.l, Schattauer Verlag, p.361-78, 1990.
- CHIOVATTO, R.D.; FUKUDA, E.Y.; FEDER, D.; NASSIS, C. Z. Fluoxetina ou *Hypericum perforatum* no tratamento de pacientes portadores de transtorno depressivo maior leve a moderado? Uma revisão. **Arquivos brasileiros de ciências da saúde**, v.36, n. 3, p. 168-75, Set/Dez, 2011.
- CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et biophysica acta**, v.1830, n.6, p.3670-3695, 2013.
- DALMAZ, C.; NETTO, C.A. A MEMÓRIA. **Ciência e Cultura**, vol.56, n.1, São Paulo Jan./Mar, 2004.
- ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. A new one- trial test for neurobiological studies of memory in rats.1 Behavioral data. **Behavioural brain research**, v.31, n.1, p.47-59, 1988.
- ERDELMEIER, C. A. J.; KOCH, E.; HOERR, R. *Hypericum perforatum* - St. John's Wort chemical, pharmacological and clinical aspects. **Studies in natural products chemistry**, v.22, p. 643-716, 2000.
- ERNST, E.; RAND, J.I.; BARNES, J.; STEVINSON, C. Adverse effects profile of the herbal antidepressant St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.). **European journal clinical pharmacology**, v.54, p. 589-594, 1998.
- FARIA, D.E.P.; RIBEIRO, L.C.; REIS, J.E.P.; PETERS, V.M.; GUERRA, M.O. Desenvolvimento físico, neuromotor e sensitivo de crias de ratas Wistar do Biotério do Centro de Biologia da Reprodução- Universidade Federal de Juiz de Fora. **Boletim do centro de biologia da reprodução**, UFJF, v.24, p.55-63, 2005.
- FLECK, M.P.; BERLIM, M.T.; LAFER, B.; SOUGEY, E.B.; PORTO, J.A. BRASIL, M.A.; JURUENA, M.J.; LUIS ALBERTO HETEM, L.A. Revisão das diretrizes da Associação Médica Brasileira para o tratamento da depressão. **Revista brasileira de psiquiatria**, v.31, S. I, p. S7-17, 2009.
- FORCELLI, P.A., HEINRICHS, S.C. Teratogenic effects of maternal antidepressant exposure on neural substrates of drug-seeking behavior in offspring. **Addiction biology**, n.13, p. 52-62, 2007.

GASPAR, P.; CASES, O.; MAROTEAUX, L. 2003. The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics. **Nat. Rev. Neurosci.**, v.4, p. 1002– 1012, 2003.

GUPTA, R.K.; MÖLLER, J.H. St. John's Wort an option for the primary care treatment of depressive patients? **European archives of psychiatry and clinical neuroscience**, n.253 .p.140–148, 2003.

GREGORETTI, B.; STEBEL, M.; CANDUSSIO, L.; CRIVELLATO, E.; BARTOLI, F.; DECORTIA, G.; Toxicity of *Hypericum perforatum* (St. John's wort) administered during pregnancy and lactation in rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 200, p. 201–205, 2004.

HYMAN, S.E. Mental illness: genetically complex disorders of neural circuitry and neural communication. **Neuron**, n.28, p.321-323, 2000.

HOYERA, D.; HANNONA, J. P.; MARTIN, G. R. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. **Pharmacology biochemistry and behavior**, v. 71, n. 4, April, p. 533–554, 2002.

IZQUIERDO, I. Memória. Porto Alegre: Artmed, 2002.

IZQUIERDO, I.; BEVILAQUA, L.; ROSSATO, J.; BONNINI, J.; MEDINA, J.; CAMMAROTA, M. Different molecular cascades in different sites of the brain are in charge of memory consolidation. **Trends in Neurosci**, v. 29, p. 496-505, 2009.

JAYANTHI, L.D.; RAMAMOORTHY, S. Regulation of Monoamine Transporters: Influence of Psychostimulants and Therapeutic Antidepressants. **The american association of pharmaceutical scientists**, v. 7, n.3, 2005.

KESSLER, R. Epidemiology of women and depression. **Journal of affective disorders**, v.74, n.1, p. 5-13, 2003.

KLUSA, V.; GERMANE, S.; NÖLDNER, M.; CHATTERJEE, S.S. Hypericum extract and hyperforin: memory-enhancing properties in rodents. **Pharmacopsychiatry**, v.34, Suppl 1: S61-9, 2001.

KRINKE, G. J. The Laboratory Rat. Academic Press, cap.12. Developmental Neurotoxicity, 2000.

LAACKMANN, G.; DIENEL, A.; KIESER, M. Clinical significance of hyperforin for the efficacy of hypericum extracts on depressive disorders of different severities. **Phytomedicine**, n.5, p. 435–442, 1998.

LAWVERE, S.; MAHONEY, M. St John's wort. **American family physician**, v.72, p.2249-54, 2005.

LEE, A.; MINHAS, R., MATSUDA, N., LAM, M.; ITO, S. The safety of St. John's wort (*Hypericum perforatum*) during breast feeding. **Journal Clinical Psychiatry**, v.64, p.966–968, 2003.

LIMA, M.O.P.; TSUNECHIRO, M.A. Repercussões materno-fetais da depressão na gravidez: uma revisão sistemática. **O Mundo da Saúde**, v. 32, n.4, p.530-536, São Paulo, 2008.

LINDE, K.; RAMIREZ, G.; MULROW, C. D.; PAULS, A.; WEIDENHAMMER, W.; MELCHART, D. St John's Wort for depression - an overview and meta-analysis of randomised clinical trials. **British medical journal**, v.313, p. 253-8, 1996.

MARCUS, S.M.; BARRY, K.L.; FLYNN, H.A.; TANDOND, R.; GREDEN, J.F. Treatment guidelines for depression in pregnancy. **International journal of gynecology & obstetrics**, v.72, p.61-70, 2001.

MISKOVSKY, P. Hypericin - a new antiviral and antitumor photosensitizer: mechanism of action and interaction with biological macromolecules. **Current drug targets**, v.3, n.1, p.55-84, 2002.

MORETTI, M. E.; MAXSON, A.; HANNA, F.; KOREN, G. Evaluating the safety of St. John's Wort in human pregnancy. **Reproductive toxicology**, v. 28, p.96–99, 2009.

NADAL-VICENS, M.; CHYUNG, J.H.; TURNER, T.J. Farmacologia da Neurotransmissão Serotoninérgica e Adrenérgica Central. CAP.13, p. 186-202, 2009. Disponível em: <<http://www.ufpi.br/subsiteFiles/lapnex/arquivos/files/Farmacologia%20da%20neurotransmissao%20serotoninergica%20e%20adrenergica%20central.pdf>>

NEPOMUCENO, F.; LAS CASAS, L.; PETERS, V.M.; GUERRA, M.O. Desenvolvimento embrionário em ratas tratadas com *Hypericum perforatum* durante o período de implantação. **Revista brasileira de farmacognosia**, v.15, n. 3, p. 224-228, Jul/Set, 2005.

OBERLANDER, T.F. Fetal Serotonin Signaling: Setting Pathways for Early Childhood Development and Behavior. **Journal of adolescent health**, v.5, p.S9–S16, 2012.

O'CARROLL, C.M.; MARTIN, S.J.; SANDIN, J.; FRENGUELLI, B.; MORRIS, R.G. Dopaminergic modulation of the persistence of one-trial hippocampus-dependent memory. **Learn Mem**, v.13, n.6, p.760-769, 2006.

OECD (1999). Draft proposal for a new guideline 426. OECD Guideline for testing of chemicals. Developmental neurotoxicity study. Disponível em:

<http://www.oecd.org/chemicalsafety/testingofchemicals/37622194.pdf>. Acesso em: 03 de out 2012.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE – OMS. Classificação de Transtornos Mentais e do Comportamento da CID - 10: descrições clínicas e diretrizes diagnósticas. Coord. Organização Mundial da Saúde. Tradução de Dorgival Caetano, Porto Alegre: Artes Médicas, 1993. Disponível em: <<http://www.bases.bireme.br>> Acesso em: 02 ago. 2012.

OMS, 2001. Relatório sobre a saúde no mundo 2001. Saúde Mental: nova concepção, nova esperança. Acesso em 28 de out, 2014. Disponível em: <<http://www.abebe.org.br/wp-content/uploads/oms2001.pdf>>

PEREIRA, P.K.; LOVISI, G.M. Prevalência da depressão gestacional e fatores associados. **Revista de psiquiatria clínica**, v.35, n.4, p.144-153, 2008.

PICCINELLI, M.; WILKINSON, G. Gender differences in depression: Critical Review. **The british journal of psychiatry**, v.177, p. 486-492, 2000.

PORTO, J. A. Conceito e diagnóstico- Depressão. **Revista brasileira de Psiquiatria**, v.21, maio,1999.

QUILLFELDT, J.A. Behavioral Methods to Study Learning and Memory in Rats, v.21, 24may, 2006. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/ppgneuro/artigos/1_QuillfeldtJA_BehavMethodsLearn&Memory2006.pdf> Acesso: 02 de setembro de 2012.

RAHIMI, R.; NIKFAR, S.; ABDOLLAHI, M. Efficacy and tolerability of *Hypericum perforatum* in major depressive disorder in comparison with selective serotonin reuptake inhibitors: A meta-analysis. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, v.33, n.1, p.118-127, 2009.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; MOORE, P.K. **Farmacologia**. Editora Elsevier, Rio de Janeiro, 5^o Edição, 2004.

RYCHLIK, R.; SIEDENTOP, H.; VON DEN DRIESCH, V.; KASPER, S. St. John's wort extract ws 5572 in minor to moderately severe depression. Effectiveness and tolerance of 600 and 1200 mg active ingredient daily. **Fortschr Med. Orig**.v.29, n.3-4, p.119-28, 2001.

SADDIQA, Z.; NAEEM, I.; MAIMOONA, A.A review of the antibacterial activity of *Hypericum perforatum* L. **Journal of ethnopharmacology**, v.131, p.511–521, 2010.

SILVA, V. A. Métodos experimentais utilizados na avaliação de efeitos tóxicos sobre o desenvolvimento. *In*: RABELO GAY, M. N. et. al. **Mutagênese, teratogênese e carcinogênese (métodos e critérios de avaliação)**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Genética, p.219-41, 1991.

TROFIMIUK , E.; HOLOWNIA, A.; BRASZKO, J.J. St. John's wort may relieve negative effects of stress on spatial working memory by changing synaptic plasticity. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v.383, p.415–422, 2011^a.

TROFIMIUK, E.; WALESIUKE, A.; BRASZKO, J.J. St John's Wort (*Hypericum perforatum*) counteracts deleterious effects of the chronic restraint stress on recall in rats. **Acta neurobiologia e experimentalis**, v.66, n.2, p.129-38, 2006^b.

THOMPSON, B.L.; LEVITT, P.; STANWOOD, G. D. Prenatal exposure to drugs: effects on brain development and implications for policy and education. **Nature reviews neuroscience**, v. 10, abril, p.303-312, 2009.

VOLZ, H.P.; LAUX, P. Potential treatment for subthreshold and mild depression: a comparison of St. John's wort extracts and fluoxetine. **Comprehensive psychiatry**, v.41, p.133–137, 2000.

WARD, R.K.; ZAMORSKI, M.A. Benefits and risks of psychiatric medications during pregnancy. **American family physician**, v.66, n.4, p.629-635, 2002.

WIDY-TYSZKIEWICZ, E.; PIECHAL, A.; JONIEC, I.; BLECHARZ-KLIN, K. Long term administration of *Hypericum perforatum* improves spatial learning and memory in the water maze. **Biological & pharmaceutical bulletin** v.10, n.25, p.1289-1294, 2002.

WILLS, R.B.H., BONE, K., MORGAN, M. Herbal products: active constituents, models of action and quality control. **Nutritional research reviews**, n.13, p.47–77, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Prevention of mental disorders: effective interventions and policy options**. Genebra, 2004. Disponível em: http://who.int/mental_health/evidence/en/prevention_of_mental_disorders_sr.pdf

WURTMAN, R.J.; WURTMAN, J.J. Brain serotonin, carbohydrate-craving, obesity and depression. **Advances in experimental medicine and biology**, v.398, p.35-41, 1996.

ZANOLI, PAOLA. Role of Hiperforin in the Pharmacological Activities of St. Jonh'sWort. **CNS Drug Reviews**, v.10, n.3, p.203-218, 2004.

APÊNDICES:**APÊNDICE A**

- Trabalho apresentado, na forma de pôster, no 13^o Congresso Internacional da Sociedade Brasileira de ciência de Animais de Laboratório – SBCAL-2014.

AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO REFLEXOLÓGICO DE FILHOTES MACHOS DE RATAS WISTAR EXPOSTAS AO EXTRATO DE *HYPERICUM perforatum* L. DURANTE A GESTAÇÃO.

Rita de Cássia da Silveira e Sá¹, José Reinaldo P. V. A. Teixeira², Lorena Ribeiro Silva², Leandro Véspoli Campo^{2,3}, Vera Maria Peters², Marta de Oliveira Guerra².

INTRODUÇÃO: O uso dos animais de laboratório, principalmente ratos e camundongos nos estudos de transtornos psiquiátricos, tem sido fundamental para definir os mecanismos neurológicos destes transtornos e garantir a busca de novas terapias. Além disso, permite também avaliar o efeito de determinadas substâncias que são administradas a gestantes e que possivelmente poderiam atingir diretamente a geração futura, seja no desenvolvimento embrionário, pós-natal ou na vida adulta. O extrato de *Hypericum perforatum* (Hp) é muito utilizado para o tratamento de depressão leve a moderada e apresenta-se como uma alternativa vantajosa devido ao fato de ocasionar menos efeitos adversos quando comparado aos medicamentos antidepressivos utilizados na clínica médica. Apesar de sua utilização ser amplamente difundida, há poucos estudos sobre o uso seguro durante a gravidez e de sua interferência nas gerações que são expostas a este extrato durante a vida intrauterina. Logo, buscou-se avaliar o desenvolvimento pós-natal de filhotes machos de ratas Wistar expostas durante a gestação ao extrato de Hp. **OBJETIVO:** Avaliar o desenvolvimento de reflexos neuromotores de filhotes machos de ratas Wistar tratadas com extrato de Hp durante a gestação. **MÉTODOS:** Foram utilizadas 20 ratas prenhes Wistar, obtidas do Centro de Biologia da Reprodução da UFJF, que foram distribuídas aleatoriamente em dois grupos: controle, que recebeu água filtrada, e grupo tratado, que recebeu 144 mg/kg/dia do extrato de Hp. As ratas receberam tratamento durante todo o período gestacional por via intragástrica. Cada grupo foi composto por 10 ratas prenhes. Após o parto foram selecionados aleatoriamente 10 filhotes machos de cada grupo para a avaliação do desenvolvimento reflexológico. Os filhotes foram observados quanto ao dia de aparecimento dos reflexos

neurológicos realizando os seguintes testes: preensão palmar, resposta postural, esquiva ao abismo, teste de orientação e geotaxia negativa. Os dados obtidos foram processados por análise exploratória, comparados entre os grupos (teste “t” de Student). RESULTADOS: O desenvolvimento neuromotor dos filhotes machos de ratas do grupo controle e do grupo tratado 144mg/kg/dia com o extrato de Hp ocorreu entre o segundo e décimo quarto dia de vida pós- natal, não apresentando diferença significativa entre os grupos. CONCLUSÃO: O extrato de *Hypericum perforatum* não alterou o desenvolvimento reflexológico dos filhotes machos das ratas Wistar que receberam o extrato durante a gestação.

CEUA/UFJF: Protocolo n°101/2012 – Suporte Financeiro: FAPEMIG

APÊNDICE B

- Trabalho apresentado, na forma de pôster, no 20º Seminário na Mostra de Iniciação Científica da Universidade Federal de Juiz de Fora. Este trabalho recebeu Menção Honrosa, vide em Anexo B.

AValiação DO DESENVOLVIMENTO NEONATAL DE FILHOTES DE RATAS Wistar EXPOSTAS AO EXTRATO DE *HYPERICUM perforatum* L. DURANTE A GESTAÇÃO.

José Reinaldo Paranaíba Vilela Alves Teixeira (Probic/Fapemig2013/2014), Lorena Ribeiro Silva, Rita de Cássia da Silveira e Sá, Vera Maria Peters (Orientadora), Martha de Oliveira Guerra.

Introdução: A depressão é uma desordem psíquica que acomete as mulheres durante o período gestacional, sendo este caracterizado por oscilações fisiológicas, hormonais e de humor. A maioria dos fármacos antidepressivos atravessa a placenta ou é excretado pelo leite e pode ocasionar malformações congênitas, toxicidade neonatal e sequelas neurocomportamentais. O *Hypericum perforatum* (Hp) é um fitoterápico com ação antidepressiva, devido à ação inibitória de recaptção de neurotransmissores de serotonina, noradrenalina e dopamina, e tem sido cada vez mais utilizado por apresentar menos efeitos colaterais quando comparado aos antidepressivos clássicos. Logo, buscou-se avaliar a exposição intrauterina de Hp sobre o desenvolvimento reflexológico das crias. **Objetivo:** Avaliar o desenvolvimento de reflexos neuromotores de filhotes fêmeas de ratas Wistar tratadas com extrato de Hp durante a gestação. **Métodos:** Foram utilizadas 20 ratas prenhes Wistar, obtidas do CBR da UFJF. Estas foram distribuídas aleatoriamente em dois grupos, um controle, que recebeu água filtrada e um grupo tratado que recebeu 144mg/kg/dia do extrato Hp, durante todo período gestacional, via intragástrica. Após o parto, foram selecionados aleatoriamente 10 filhotes fêmeas de cada grupo para avaliação do desenvolvimento reflexológico. Os testes realizados foram: preensão palmar, resposta postural, esquiva ao abismo, teste de orientação e geotaxia negativa. Os dados foram analisados através do teste “t” de Student com o nível de significância de 0,05. **Resultados:** O desenvolvimento neuromotor dos filhotes fêmeas de ratas do grupo controle e do grupo tratado com o extrato de Hp (144 mg/kg/dia) ocorreu entre o segundo e décimo quarto dia de vida pós-natal. Os valores encontrados, expressos em média e desvio padrão, no grupo controle foram: preensão palmar: 2 ± 0 (10); resposta postural: $2,4 \pm 0,69$ (10); esquiva ao abismo: $7,4 \pm 1,42$ (10); teste de orientação: $12,7 \pm 2,11$ (10) e geotaxia negativa: $7,2 \pm 0,78$

(10), enquanto no grupo tratado, os valores foram: preensão palmar: 2 ± 0 (10); resposta postural: $2,6 \pm 0,96$ (10); esquiva ao abismo: $6,2 \pm 1,54$ (10); teste de orientação: $13,3 \pm 0,82$ (10); geotaxia negativa: $5,9 \pm 1,44$ (10). CEUA/UFJF: Protocolo nº101/2012. Conclusão: O extrato de *Hypericum perforatum* não alterou o desenvolvimento reflexológico dos filhotes fêmeas das ratas Wistar que receberam o extrato durante a gestação.

Suporte Financeiro: FAPEMIG

APENDICE C- Artigo publicado na revista Neurobiologia

Artigo Original

VALIDAÇÃO DO EFEITO ANTIDEPRESSIVO DO
EXTRATO DE *Hypericum perforatum*VALIDATION OF THE ANTIDEPRESSANT EFFECT OF
THE *Hypericum perforatum* EXTRACT

Vinícius de Almeida Vieira^{1,2}, Leandro Vespoli Campos¹, Lorena RibeiraSilva¹, Martha de Oliveira Guerra¹, Vera Maria Peters¹, Rita de Cássia da Silveira e Sá^{1,3}

Resumo

A depressão é uma doença comum e prevalente que pode exigir tratamento farmacológico. O *Hypericum perforatum* é um antidepressivo eficaz e seguro no tratamento da depressão leve a moderada e, em estudos experimentais, é utilizado o teste do nado forçado como modelo para avaliação de efeito antidepressivo. Considerando o uso do extrato de *H. perforatum*, para fins de pesquisas, no Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de fora, este trabalho avaliou o efeito antidepressivo do extrato (doses de 36, 72 e 144 mg/kg) utilizando o referido teste. O extrato apresentou efeito antidepressivo significativo, comprovando seu efeito encontrado na literatura.

Palavras-chave: *Hypericum perforatum*, depressão, gravidez, ratos Wistar.

Abstract

Depression is a common and prevalent illness that can demand pharmacological treatment. *Hypericum perforatum* (HP) is an efficient and safe antidepressant used in the treatment of mild to moderate depression, and, in experimental studies, the forced swimming test is used as a model to evaluate its antidepressant effects. Considering the use of the *H. perforatum* extract, for research purposes, in the Centro de Biologia da Reprodução of the Federal University of Juiz De Fora, MG, Brazil, this study evaluated the antidepressant effect of the HP extract (36, 72 and 144 mg/kg doses) using the aforementioned test. The extract presented a significant antidepressant effect, as it was described in the literature.

Key words: *Hypericum perforatum*, depression, pregnancy, Wistar rats.

1 Centro de Biologia da Reprodução - Universidade Federal de Juiz de Fora.

2 Aluno do Programa de Pós-graduação em Saúde - Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora.

3 Departamento de Fisiologia e Patologia - Universidade Federal da Paraíba.

Autor para correspondência:

Vinícius de Almeida Vieira (viniciusav@hotmail.com)

rua Nair Furtado de Souza, 210/302, bairro Jardim Laranjeiras, Juiz de Fora, Minas Gerais, CEP 36016-190. Telefone (32) 32188481 / (32) 88517092

NEUROBIOLOGIA, 76 (1-2) jan./jun., 2013

1. Introdução

A depressão é o transtorno mental mais comum e um problema de saúde pública, sendo diagnosticada em cerca de 154 milhões de pessoas em todo o mundo em 2001. Estima-se que em 2030 será a doença mundial mais prevalente, superando até mesmo problemas cardiovasculares e oncológicos. A prevalência do transtorno depressivo ainda é maior na mulher (5 a 9%) do que no homem (2 a 3%) e varia conforme a idade, estado e situação socioeconômica¹.

A depressão é uma doença grave, com altos índices de recorrência e cronicidade, trazendo prejuízos profissionais, sociais, físicos e psíquicos, além de altas taxas de morbimortalidade por suicídio ou outras patologias associadas². Apesar da alta prevalência, menos de 25% dos casos diagnosticados recebem tratamento adequado³. O tratamento pode exigir, além de medidas não farmacológicas, o uso de medicação adequada e com efeito antidepressivo comprovado.

O *Hypericum perforatum* (HP) é um fitofármaco de comprovada ação antidepressiva e apresenta menos efeitos adversos quando comparado aos antidepressivos sintéticos, sendo uma maneira eficaz e segura de se tratar a depressão leve a moderada⁴. Os principais efeitos adversos encontrados foram sintomas gastrointestinais, alérgicos e fototoxicidade^{5, 6, 7, 8}.

O HP é considerado um fitocomplexo pelo fato de sua ação antidepressiva estar relacionada a várias substâncias. Há relatos que a hipericina, a hiperforina ou os flavonoides podem ser os principais responsáveis pelo efeito antidepressivo do extrato^{9, 10}, sendo que essas substâncias podem agir isoladamente ou de maneira sinérgica¹¹. Nas apresentações comerciais do extrato são encontradas concentrações diferentes de flavonoides, de hipericina e de hiperforina¹², mas tem sido definido que o extrato padrão do HP deve conter 0,3% de hipericina¹³.

Considerando a utilização de extrato de HP em diferentes trabalhos no Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora, esse trabalho verificou o efeito antidepressivo do extrato utilizado nessa unidade acadêmica, manipulado pela empresa Mb Pharma LTDA, com o objetivo de confirmar sua ação e validar o seu uso.

2. Materiais e Métodos

No desenvolvimento do estudo foram utilizadas ratas Wistar (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769) de 90 dias de idade, provenientes do Biotério do Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora. Os animais foram alojados em gaiolas de polipropileno (40X30X16 cm), contendo cinco animais, em ambiente com temperatura controlada de $23 \pm 2^\circ \text{C}$, e ciclo claro/escuro de 12 horas, com fase clara de 6:00 às 18:00 horas e a fase escura de 18:00 às 6:00 horas. Os animais tiveram livre acesso à água e acesso controlado à dieta a base de ração tipo *pellets* (Purina), com privação dos mesmos 60 minutos antes do início do teste.

Os animais foram distribuídos em quatro grupos de 10 ratas, sendo três tratados e um controle. As ratas pertencentes aos grupos tratados receberam durante sete dias, por via intragástrica e uma vez ao dia, o extrato de HP nas doses de 36 mg/kg (T1), 72 mg/kg (T2) e 144 mg/kg (T3) e as ratas do grupo controle (C) receberam água destilada durante o mesmo período. Foi utilizado o extrato seco padrão de HP, contendo 0,3% de hipericina, preparado pela MB Pharma Manipulações LTDA, lote 10124778.

No primeiro dia após o término do tratamento, os animais foram submetidos ao teste do nado forçado para avaliação da depressão, sendo colocados individualmente para nadar durante cinco minutos em um cilindro de vidro transparente de 50 cm de altura e 20 cm de diâmetro, preenchido com água. A água do recipiente foi sempre trocada entre a avaliação de um animal e de outro. Foram avaliados e registrados os seguintes parâmetros: tempo para os animais pararem de se mover (tempo de latência) e tempo de cessação de fuga (tempo total de imobilidade).

Após o teste, os animais utilizados foram sedados com injeção intraperitoneal com associação de Quetamina (90mg/kg) e Xilazina (10 mg/kg)¹⁴ e eutanasiados após exsanguinação por punção cardíaca.

Para a análise estatística dos resultados, foi utilizado o teste ANOVA, seguido do teste de Dunnett, já que todos apresentaram variância homocedástica. Foi utilizado o programa SPSS versão 13.0 e considerados significativos os valores que apresentarem $p < 0,05$.

O projeto foi avaliado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Juiz de Fora e aprovado através do protocolo número 003/2011.

3. Resultados

No teste do nado forçado, a média do tempo de latência para a imobilidade foi consideravelmente maior nos animais tratados com as doses de 36, 72 e 144 mg/Kg do extrato de HP do que a média do tempo dos animais do grupo controle, enquanto o tempo total de imobilidade foi consideravelmente menor nos animais tratados com essas mesmas doses, quando comparados aos animais controle (TABELA 1).

TABELA 1: Tempo de latência, em segundos, para iniciar a imobilidade e tempo total da imobilidade no teste do nado forçado em ratos dos grupos tratados comparadas com as do grupo controle. Dados expressos em média \pm desvio padrão, n =10. *p<0,05.

	LATÊNCIA	IMOBILIDADE
Controle	69,2 \pm 13,16	172,2 \pm 28,11
36 mg/kg	89,8 \pm 16,17*	134,4 \pm 10,12*
72 mg/kg	91,8 \pm 13,00*	125,6 \pm 16,15*
144 mg/kg	101,5 \pm 18,82*	94,1 \pm 14,83*

4. Discussão

O teste do nado forçado é provavelmente o mais utilizado em estudos pré-clínicos para avaliar o potencial antidepressivo de novos compostos¹⁶. Quando submetido a uma situação de estresse (cilindro de água), o animal inicia intensas tentativas de evasão até reconhecer o insucesso e desistir de escapar, e passa a realizar apenas movimentos necessários para manter a cabeça fora d'água, situação considerada como imobilidade e que representa uma medida de depressão¹⁷.

Um aumento no tempo para se iniciar a imobilidade (tempo de latência) e a diminuição no tempo total de imobilidade significam uma menor taxa de depressão. Sendo assim, os dados encontrados neste trabalho demonstram um menor grau de depressão nos animais tratados e confirmam o efeito antidepressivo do extrato de HP encontrado na literatura. O HP apresentou efeito antidepressivo, nas doses de sete, 35 e 70 mg/kg, em roedores submetidos ao teste do nado forçado, efeito também comprovado em outro modelo de avaliação da depressão, o teste de suspensão da cauda¹⁸. O HP age, principalmente, inibindo a recaptção dos neurotransmissores serotonina, noradrenalina e dopamina. Sendo assim, o aumento da concentração dessas substâncias na fenda sináptica pode justificar o seu seu efeito antidepressivo⁴.

5. Conclusão

Os resultados obtidos mostraram que as doses de 36, 72 e 144 mg/Kg do extrato utilizado tiveram efeito antidepressivo nos animais tratados por sete dias, comprovando a eficácia do extrato manipulado pela empresa Mb Pharma Manipulações LTDA, utilizado nesta unidade acadêmica para fins de pesquisa.

6. Referências

1. World Health Organization. The World Health Report – Mental health: new understanding, new hope. Geneva, 2001.
2. Abas M, Hotopf M., Prince M. Depression and mortality in a high-risk population. 11-Year followup of the Medical Research Council Elderly Hypertension Trial. *Brazilian Journal Psychiatry* 2002; 18: 123-8.
3. Glass R. Awareness about depression: important for all physicians. *Journal of the American Medical Association* 2003; 289 Suppl 23: 3169-70.
4. Bahls SC. Tratamento fitoterápico da depressão. *Brazilian Journal Psychiatry* 2001; 50 Suppl 11/12: 389-96.
5. Woelk H, Burkard G, Grünwald, J. Benefits and risks of the Hypericum extract LI 160: drug monitoring study with 3250 patients. *Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology* 1994; 7: 34- 38.
6. Linde K, Ramirez G, Mulrow CD, Pauls A, Weidenhammer W, Melchart D. St. John's wort for depression – an overview and meta-analysis of randomized clinical trials. *British Medical Journal* 1996; 313: 253-8.
7. Laakmann G, Schüle C, Baghai T, Kieser M. St. John's wort in mild to moderate depression: the relevance of hyperforin for the clinical efficacy. *Pharmacopsychiatry* 1998; 31: 54-9.
8. Brattstrom A. Long-term effects of St. John's wort (*Hypericum perforatum*) treatment: a 1-year safety study in mild to moderate depression. *Phytomedicine* 2009; 16 Suppl 4: 277-8.
9. Butterweck V, Jürgenliemk G, Nahrstedt A, Winterhoff H. Flavonoids from *Hypericum perforatum* show antidepressant activity in the forced swimming test. *Planta medica* 2000; 66 Suppl 1: 3-6.
10. Borrelli F, Izzo A. Herb-drug interactions with St John's wort (*Hypericum perforatum*): an update on clinical observations. *The AAPS journal* 2009; 11 Suppl 4: 710-27.
11. Reichling J, Hostanska K, Saller R. St. John' Wort (*Hypericum perforatum* L.) multicomponent preparations versus single substances. *Forsch Komplementarmed Klass Naturheilkd* 2003; 10: 28-32.

12. Bergonzi MC, Bilia AR, Gallori S, Guerrini D, Vincieri FF. Variability in the content of the constituents of *Hypericum perforatum* L. and some commercial extracts. *Drug development and industrial pharmacy* 2001; 27 Suppl 6: 491-97.
13. Gray GE. A psychiatric perspective on herbal remedies. *Directions in Psychiatry* 1999; 19 Suppl 4: 349-61.
14. WOLFENSOHN, S; LLOYD, M. Handbook of laboratory animal management and welfare. 1. ed. New York: Oxford University Press; 1994.
15. Sokal RR, Rohlf FJ. Biometry. The principles and practice of statistics in biological research. 3. ed. New York: WH Freeman; 1995.
16. Almeida RN. Psicofarmacologia: Fundamentos práticos. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2006.
17. Teixeira-silva F, Queiroga MNG, Varela RWB, Fachine MF. Métodos para avaliar drogas antidepressivas. In: Almeida RN, org. Psicofarmacologia: Fundamentos Práticos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2006.
18. Bach-rojecky L, Kalodjera Z, Samarzija EU. The antidepressant activity of *Hypericum perforatum* L. measured by two experimental methods on mice. *Acta Pharmaceutica* 2004; 54 Suppl 2: 157-62.

ANEXO:**ANEXO A: Protocolo de aprovação da comissão de ética no uso de animais:**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PRO-REITORIA DE PESQUISA
 Comissão de Ética na Experimentação Animal

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 101/2012 – CEEA sobre “AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO NEONATAL E DA MEMÓRIA DE FILHOTES DE RATAS WISTAR EXPOSTAS AO EXTRATO DE HYPERICUM PERFORATUM DURANTE A GESTAÇÃO.”, projeto de pesquisa sob a responsabilidade de VERA MARIA PETERS, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 18/12/12. Para o desenvolvimento da pesquisa foram liberados 440 animais (240 fêmeas e 200 machos) da linhagem Wistar, conforme solicitado.

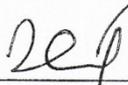
CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 101/2012- CEEA about “AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO NEONATAL E DA MEMÓRIA DE FILHOTES DE RATAS WISTAR EXPOSTAS AO EXTRATO DE HYPERICUM PERFORATUM DURANTE A GESTAÇÃO.” under responsibility of VERA MARIA PETERS - is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF – ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH (CEEA) in 18/12/12. For the development of this research 440 animals (240 female and 200 male) lineage Wistar were released, as requested.

Juiz de Fora, 19 de dezembro de 2012.



 Presidente/CEEA



 Secretário/CEEA

ANEXO B: Certificado do prêmio de menção honrosa no 20º seminário de iniciação científica da UFJF - ano de 2014.

