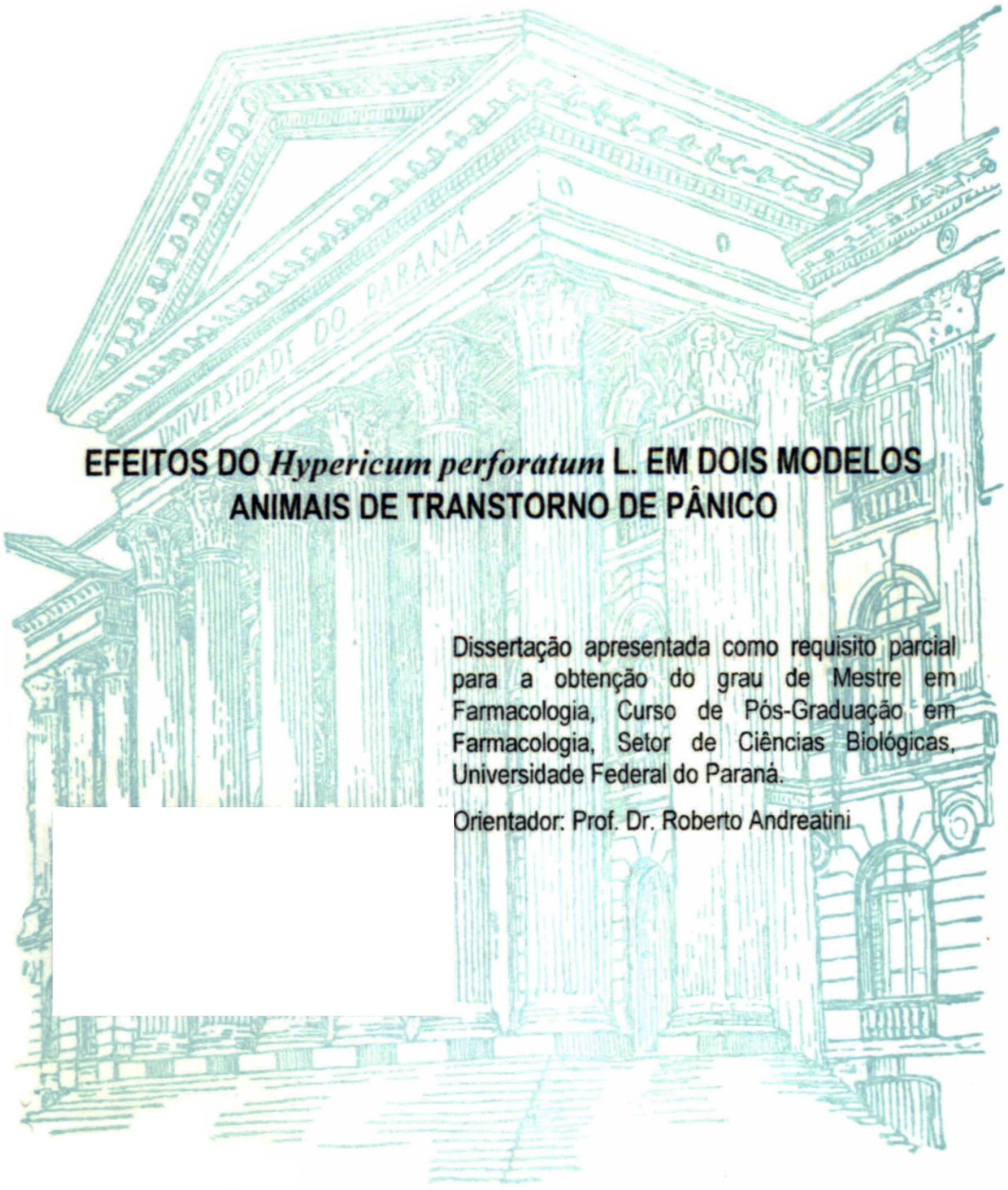
**VANESSA BEIJAMINI**




# EFEITOS DO *Hypericum perforatum* L. EM DOIS MODELOS ANIMAIS DE TRANSTORNO DE PÂNICO

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Farmacologia, Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Andreatini

**CURITIBA**
**2002**

**VANESSA BEIJAMINI**

# EFEITOS DO *Hypericum perforatum* L. EM DOIS MODELOS ANIMAIS DE TRANSTORNO DE PÂNICO

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Farmacologia, Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Andreatini

CURITIBA
2002

Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

# PARECER

A Comissão Examinadora de Dissertação de Mestrado "**EFEITOS DO <u>Hypericum perforatum</u> L. EM DOIS MODELOS ANIMAIS DE TRANSTORNO DE PÂNICOS**", de autoria da Pós-Graduanda **VANESSA BEIJAMINI**, e composta pelos Profesores Dr. Roberto Andreatini (como orientador e Presidente); Dr. José Roberto Leite (UNIFESP/EPM), Drª. Roseli Boerngen de Lacerda (UFPR). Atribui individualmente as seguintes notas: Prof. Dr. Roberto Andreatini, nota dez ( 10 ); Prof. Dr. José Roberto Leite, nota dez ( 10 ); e Profª. Drª. Roseli Boerngen de Lacerda, nota dez ( 10 ). De acordo com o Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, a Pós-Graduanda foi aprovada, coma nota dez ( 10 ). Para a devida publicação o trabalho deve sofrer as modificações sugeridas. Em Curitiba, 25 de Janeiro de 2002.

Dr. Roberto Andreatini

Dr. José Roberto Leite

Drª. Roseli Boerngen de Lacerda

Centro Politécnico - Caixa Postal 19031 - 81531-990 Curitiba, PR
Tel: (41) 361-1693 - Fax: (41) 266-2042 - pgfarm@bio.ufpr.br

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus, por ter iluminado minha jornada e me proporcionado saúde para realizar meu trabalho.

Ao Prof. Dr. Roberto Andreatini, pela orientação nesse trabalho, mas principalmente pelo seu papel como meu mentor desde o início da minha carreira científica, sendo um exemplo de inteligência e integridade.

A todos os professores desse Curso de Pós-Graduação, pelas importantes contribuições para minha formação em Farmacologia, mas especialmente à Prof. Dra. Maria Aparecida B. Frazão, pela dedicação e entusiasmo que transmite.

A todos os professores que participaram de minha vida acadêmica, mas em especial à Prof. Dra. Maria Suely Soares Leonart, pelo incentivo, pelo espírito crítico e pelos inestimáveis conselhos.

A todos os meus colegas de curso, pelo companheirismo e paciência, mas especialmente à Juliana, por todos os bons conselhos, pela imensa ajuda em meus experimentos e nos momentos difíceis e, por suportar meu mau humor inúmeras vezes; ao Edmar, pela amizade e por sempre estar disposto a resolver os problemas; e à Kellen, pela imensa ajuda em um momento crítico da realização desse trabalho.

Aos servidores técnico-administrativos do Departamento, mas especialmente à Lindacir, por sempre cuidar dos meus animais no Biotério do Laboratório de Fisiologia e Farmacologia do SNC.

À minha família, pelo apoio incondicional em todos os momentos, em especial ao Daniel, por estar sempre presente e por relevar meus momentos de nervosismo, ansiedade e histeria.

À minha amiga-irmã Sâmia, pela troca de idéias, pelo incentivo e apoio, pelo carinho e por ter feito com que eu acreditasse em mim.

À Eurofarma, por ter disponibilizado o extrato de *Hypericum perforatum* e a paroxetina, em especial à Ana Paula, por ter facilitado o processo.

À CAPES, pelo suporte financeiro que possibilitou minha dedicação exclusiva a este trabalho.

A Cezar A. Harres, por ter gentilmente construído um Labirinto em T.

## SUMÁRIO


**LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS** ..... VII
**RESUMO** ..... VIII
**ABSTRACT** ..... X
**1 INTRODUÇÃO** ..... 1
**1.1 *Hypericum perforatum*** ..... 1
**1.1.1 Efeito Antidepressivo do *H. perforatum*** ..... 3
**1.1.1.1** Modelos Animais de Depressão ..... 3
**1.1.1.2** Estudos Clínicos ..... 4
**1.1.2 Possíveis Mecanismos de Ação do *H. perforatum*** ..... 6
**1.1.3 Efeitos Ansiolíticos do *H. perforatum*** ..... 11
**1.1.4 Efeitos Adversos, Tóxicos e Interações Medicamentosas do *H. perforatum*** ..... 12
**1.2 TRANSTORNO DE PÂNICO (TP)** ..... 15
**1.2.1 Tratamento Farmacológico do TP** ..... 17
**1.2.1.1** Antidepressivos ..... 17
**1.2.1.2** Benzodiazepínicos ..... 19
**1.2.2 *H. perforatum* no tratamento do TP.** ..... 20
**1.2.3 Modelos animais de TP** ..... 21
**1.2.3.1** Modelos animais de TP baseados no comportamento condicionado/ aprendido ..... 22
**1.2.3.1.1** Teste de supressão de beber condicionado (SBC) ..... 22
**1.2.3.1.2** Vocalizações ultrassônicas condicionadas (VUC) ..... 23
**1.2.3.1.3** Estimulação elétrica (ou química) aversiva da SCPd ..... 24
**1.2.3.2** Modelos animais de TP baseados em comportamentos defensivos incondicionado/inatos ..... 24
**1.2.3.2.1** Inibição do HDM ..... 24
**1.2.3.2.2** Exposição de camundongos ao grito de pássaros ..... 25
**1.2.3.2.3** Labirinto em T Elevado ..... 25
**1.2.3.2.4** Bateria de Testes de Defesa em Camundongos ..... 26
**1.3 DEFINIÇÃO DO PROBLEMA** ..... 29
**2 OBJETIVO GERAL** ..... 30
**2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS** ..... 30
**3 EXPERIMENTO 1 – EFEITO DO EXTRATO DE *H. perforatum* NO TESTE DE NATAÇÃO FORÇADA** ..... 31
**3.1 OBJETIVO** ..... 31
**3.2 MATERIAIS E MÉTODOS** ..... 31
**3.2.1 Animais** ..... 31
**3.2.2 Drogas** ..... 31
**3.2.3 Procedimentos experimentais** ..... 32
**3.2.3.1** Teste de Natação Forçada em Ratos ..... 32
**3.2.3.2** Teste de Natação Forçada em Camundongos ..... 33
**3.2.4 Análise Estatística** ..... 33
**3.3 RESULTADOS** ..... 34
**3.3.1 Teste de Natação Forçada em ratos** ..... 34
**3.3.2 Teste de Natação Forçada em camundongos** ..... 35
**3.4 DISCUSSÃO** ..... 36

**4 EXPERIMENTO 2 – EFEITOS COMPORTAMENTAIS DA PRÉ-EXPOSIÇÃO A UM DOS BRAÇOS ABERTOS DO LABIRINTO EM T ELEVADO 24 h ANTES DO TESTE** ..... **38**
**4.1 OBJETIVO** ..... **38**
**4.2 MATERIAIS E MÉTODOS** ..... **38**
**4.2.1 Animais** ..... **38**
**4.2.2 Grupos Experimentais** ..... **38**
**4.2.3 Procedimento Experimental** ..... **38**
**4.2.3.1** Labirinto em T Elevado ..... **38**
**4.2.4 Análise Estatística** ..... **40**
**4.3 RESULTADOS** ..... **40**
**4.4 DISCUSSÃO** ..... **43**
**5 EXPERIMENTO 3 – EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO SUBAGUDA, SUBCRÔNICA E CRÔNICA DE *H. perforatum* EM RATOS SUBMETIDOS AO LABIRINTO EM T ELEVADO E AO CAMPO ABERTO** ..... **46**
**5.1 OBJETIVO** ..... **46**
**5.2 MATERIAIS E MÉTODOS** ..... **46**
**5.2.1 Animais** ..... **46**
**5.2.2 Drogas** ..... **46**
**5.2.3 Procedimentos Experimentais** ..... **47**
**5.2.3.1** Labirinto em T Elevado ..... **47**
**5.2.3.2** Campo Aberto ..... **47**
**5.2.4 Tratamento** ..... **47**
**5.2.5 Análise Estatística** ..... **48**
**5.3 RESULTADOS** ..... **49**
**5.3.1 Labirinto em T Elevado** ..... **49**
**5.3.1.1** Tratamento subagudo ..... **49**
**5.3.1.2** Tratamento subcrônico ..... **51**
**5.3.1.3** Tratamento crônico ..... **53**
**5.3.2 Campo Aberto** ..... **55**
**5.4 DISCUSSÃO** ..... **57**
**5.4.1 Esquiva Inibitória** ..... **57**
**5.4.2 Fuga** ..... **61**
**6 EXPERIMENTO 4 – VALIDAÇÃO FARMACOLOGICA EM NOSSO LABORATÓRIO DA BATERIA DE TESTES DE DEFESA EM CAMUNDONGOS EMPREGANDO CLONAZEPAM** ..... **65**
**6.1 OBJETIVO** ..... **65**
**6.2 MATERIAIS E MÉTODOS** ..... **65**
**6.2.1 Animais** ..... **65**
**6.2.2 Drogas** ..... **65**
**6.2.3 Procedimento Experimental** ..... **66**
**6.2.3.1** Atividade Locomotora em Camundongos ..... **66**
**6.2.3.2** Bateria de Testes de Defesa em Camundongos ..... **66**
**6.2.4 Tratamento** ..... **69**
**6.2.5 Análise Estatística** ..... **69**
**6.3 RESULTADOS** ..... **70**
**6.3.1 Atividade Locomotora** ..... **70**
**6.3.2 Bateria de Testes de Defesa em Camundongos** ..... **70**
**6.3.1 Pré-Teste (atividade locomotora antes da exposição ao rato) e Pós-Teste (defesa contextual)** ..... **70**

**6.3.2 Teste de Esquiva ao Predador** ... **72**
**6.3.3 Teste de Perseguição e Fuga** ... **73**
**6.3.4 Teste do Beco Inescapável** ... **74**
**6.3.5 Fase de Contato** ... **74**
**6.4 DISCUSSÃO** ... **75**
**7 EXPERIMENTO 5 – EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA, SUBCRÔNICA E CRÔNICA DE *H. perforatum* EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À BATERIA DE TESTES DE DEFESA** ... **78**
**7.1 OBJETIVO** ... **78**
**7.2 MATERIAIS E MÉTODOS** ... **78**
**7.2.1 Animais** ... **78**
**7.2.2 Drogas** ... **78**
**7.2.3 Procedimento Experimental** ... **78**
**7.2.3.1** Bateria de Testes de Defesa em Camundongos ... **78**
**7.2.4 Tratamento** ... **70**
**7.2.5 Análise Estatística** ... **79**
**7.3 RESULTADOS** ... **79**
**7.3.1 Pré-Teste (atividade locomotora antes da exposição ao rato) e Pós-Teste (defesa contextual)** ... **79**
**7.3.2 Teste de Esquiva ao Predador** ... **82**
**7.3.3 Teste de Perseguição e Fuga** ... **84**
**7.3.4 Teste do Beco Inescapável** ... **86**
**7.3.5 Fase de Contato** ... **87**
**7.4 DISCUSSÃO** ... **88**
**7.4.1 Pré-Teste (atividade locomotora antes da exposição ao rato) e Pós-Teste (defesa contextual)** ... **88**
**7.4.2 Efeitos das drogas durante a exposição ao predador** ... **90**
**7.4.2.1** Fuga ... **90**
**7.4.2.2** Avaliação de Risco ... **92**
**7.4.2.3** Ameaça e Ataque Defensivo ... **93**
**8 CONCLUSÕES** ... **94**
**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** ... **96**

# LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

| | | |
|---|---|---|
| **ADT** | - | Antidepressivo Tricíclico |
| **ANOVA** | - | Análise de Variância |
| **BA** | - | Braço Aberto |
| **BAs** | - | Braços Abertos |
| **BDZs** | - | Benzodiazepínicos |
| **BF** | - | Braço Fechado |
| **BTDC** | - | Bateria de Testes de Defesa em Camundongos |
| **CLON 0,3** | - | Clonazepam 0,3 mg/Kg |
| **DA** | - | Dopamina |
| **DSM-IV** | - | Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais |
| **EPM** | - | Erro Padrão da Média |
| **GABA** | - | Ácido γ-amino butírico |
| **$GABA_A$** | - | Receptor subtipo A do Ácido γ-amino butírico |
| **$GABA_B$** | - | Receptor subtipo B do Ácido γ-amino butírico |
| **HDM** | - | Hipotálamo Dorso-Medial |
| **5-HT** | - | Serotonina |
| **$5\text{-}HT_{1A}$** | - | Receptor subtipo 1A da Serotonina |
| **$5\text{-}HT_2$** | - | Receptor subtipo 2 da Serotonina |
| *H. perforatum* | - | *Hypericum perforatum* L. |
| **Hype 150** | - | *Hypericum perforatum* L. 150 mg/Kg |
| **Hype 300** | - | *Hypericum perforatum* L. 300 mg/Kg |
| **Hype 500** | - | *Hypericum perforatum* L. 500 mg/Kg |
| **IMAO** | - | Inibidores da Monoamino Oxidase |
| **Imi 30** | - | Imipramina 30 mg/Kg |
| **i.p.** | - | Via Intraperitoneal |
| **ISRS** | - | Inibidor Seletivo da Recaptação de Serotonina |
| **LCE** | - | Labirinto em Cruz Elevado |
| **LTE** | - | Labirinto em T Elevado |
| **MAO** | - | Monoamino Oxidase |
| **MOR** | - | Movimentos Oculares Rápidos |
| **NA** | - | Noradrenalina |
| **NDR** | - | Núcleo Dorsal da Rafe |
| **NLC** | - | Número de Linhas Cruzadas |
| **NMDA** | - | N-metil-D-aspartato |
| **NTE** | - | Número de Tentativas de Escapar |
| **Paro 5** | - | Paroxetina 5 mg/Kg |
| **Paro 10** | - | Paroxetina 10 mg/Kg |
| **SBC** | - | Teste de Supressão de Beber Condicionado |
| **SCP** | - | Substância Cinzenta Periaquedutal |
| **SCPd** | - | Substância Cinzenta Periaquedutal dorsal |
| **SIR** | - | Semi-interquartil Range |
| **TAG** | - | Transtorno de Ansiedade Generalizada |
| **TI** | - | Tempo de Imobilidade |
| **TOC** | - | Transtorno Obsessivo-Compulsivo |
| **TP** | - | Transtorno de Pânico |
| **v.o.** | - | Via Oral |
| **VUC** | - | Vocalizações Ultrassônicas Condicionadas |

**RESUMO**

Considerando que o *Hypericum perforatum* apresenta efeito antidepressivo em estudos clínicos e pré-clínicos e que os antidepressivos são uma das principais classes de drogas empregadas no tratamento do Transtorno de Pânico, o objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial efeito antipânico do extrato de *Hypericum perforatum* em modelos de Transtorno de Pânico. Dessa forma, foi avaliado o efeito dos tratamentos subagudo (3 vezes em 24 horas), subcrônico (7 dias) e crônico (21 dias) com *Hypericum perforatum* em animais submetidos ao Labirinto em T Elevado e à Bateria de Testes de Defesa em Camundongos. Foram escolhidas doses que exibiram efeito antidepressivo (determinadas pelo Teste de Natação Forçada) e que não alteraram a atividade locomotora dos animais. A paroxetina, um inibidor seletivo da recaptação de serotonina eficaz no Transtorno de Pânico, foi empregada como um controle positivo, possibilitando também a comparação do perfil de efeitos comportamentais nos modelos utilizados. O Labirinto em T Elevado, proposto por Graeff e colaboradores, permite a avaliação de dois tipos de ansiedade (aprendida e inata) em um mesmo animal. A ansiedade aprendida, provavelmente relacionada ao Transtorno de Ansiedade Generalizada, é avaliada por um procedimento similar à esquiva inibitória. A ansiedade inata é avaliada pela fuga dos braços abertos e, possivelmente, estaria relacionada com o Transtorno de Pânico. Além disso, foram realizadas algumas modificações no protocolo originalmente desenvolvido para esse modelo. A Bateria de Testes de Defesa em Camundongos foi desenvolvida a partir da avaliação etológica do comportamento dos animais em resposta a um predador. Neste modelo, camundongos são expostos a um predador (rato anestesiado ou morto) em uma pista oval, sendo realizadas 3 situações distintas: fuga à aproximação do rato (feita manualmente pelo experimentador), avaliação de risco ao predador e comportamento de defesa/ataque ao contato com o predador. Ambos, o extrato de *Hypericum perforatum* e a paroxetina, apresentaram efeito antipânico na tarefa de fuga do Labirinto em T Elevado, após tratamento subcrônico (7 dias), em doses que não alteraram a atividade locomotora no Campo Aberto. A maior dose do extrato induziu um efeito ansiolítico na tarefa de esquiva inibitória do Labirinto em T Elevado. Na Bateria de Testes de Defesa em Camundongos, ambas as drogas, após tratamento crônico, também apresentaram um perfil semelhante ao de drogas panicolíticas, reduzindo significantemente as reações de fuga ao predador. Esses

resultados, como um todo, sugerem que o *Hypericum perforatum* pode exercer um efeito antipânico. A paroxetina ainda reduziu alguns comportamentos de avaliação de risco e, tanto ela quanto o extrato de *Hypericum perforatum*, diminuíram parcialmente os comportamentos defensivos exibidos no contato com o rato, apontando um potencial efeito ansiolítico. Entretanto, mais estudos são necessários para apoiar essa hipótese. O extrato de *Hypericum perforatum* apresentou um perfil semelhante ao da paroxetina, uma droga clinicamente eficaz no tratamento do Transtorno de Pânico e potencialmente eficaz no Transtorno de Ansiedade Generalizada, o que indica a possibilidade desses efeitos do extrato serem mediados pelo sistema serotoninérgico. Entretanto, o mecanismo de ação do *H. perforatum* ainda não foi completamente elucidado. Além disso, em relação ao Labirinto em T Elevado, os resultados proporcionaram dados adicionais para a validação farmacológica (paroxetina) da fuga como um modelo animal de pânico e sugerem que método modificado para medir esse parâmetro pode ser mais sensível ao efeito antipânico de drogas do que o método tradicional.

**ABSTRACT**

Considering that *Hypericum perforatum* (LI-160) exhibits antidepressive effect and that antidepressive drugs are the mainly treatment to Panic Disorder, the aim of the present study was to evaluate the effect of extract in animal models of Panic Disorder. Thus, it was evaluated the effect of subacute (3 times in 24 h), subchronic (7 days) and chronic (21 days) *Hypericum perforatum* administration in animals submitted to the Elevated T-maze and to the Mouse Defense Battery Test. The dose chosen exhibited antidepressive-like effect (determined in the forced swimming test) but did not change locomotor activity. Paroxetine, an anxiolytic and antipanic drug, was used as a positive control. The Elevated T-maze is proposed to separate 2 types of fear in the same animal: conditioned anxiety, represented by inhibitory avoidance behaviour and related to generalized anxiety disorder; and unconditioned fear, represented by one-way escape, related to panic disorder. Furthermore, The Mouse Defense Test Battery was designed to assess defensive reactions of mice confronted with a natural threat (a rat) and situations associated with this threat. The results showed that subchronic treatment with *H. perforatum* 300 mg/Kg exerts an anxiolytic-like effect in the inhibitory avoidance task on Elevated T-maze at doses that exhibited an anti-immobility effect in the forced swimming test and did not change locomotor activity. Moreover, these treatments induced an antipanic effect in the one-way escape on the Elevated T-maze. On the Mouse Defense Test Battery, after chronic administration, both drugs (paroxetine 5 mg/Kg and *Hypericum perforatum* 300 mg/Kg) reduced escape reactions to the predator, suggesting that *Hypericum perforatum* extract could exert an antipanic effect. At while, these results suggests a potential antipanic effect of *Hypericum perforatum* (LI-160). Furthermore, the Elevated T-maze results have given additional data (paroxetine) for the pharmacological validation of one-way escape as a model of panic anxiety and suggest that the modified method to record this parameter can be more sensitive to antipanic effect of drugs than to the traditional method.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 *Hypericum perforatum* L.

O *Hypericum perforatum* L. (*H. perforatum*), popularmente conhecido como Erva ou Flor de São João, tem sido utilizado na medicina popular durante séculos no tratamento de infecções bacterianas e virais, em condições respiratórias, feridas, úlceras pépticas, inflamações (SCHWARZ; CUPP, 2000; NATHAN, 1999; BLUMENTHAL *et al.*, 1998), assim como no tratamento de quadros depressivos (TESKE; TRENTIN, 1995). Na Alemanha, o *H. perforatum* é liberado para emprego em quadros depressivos, ansiosos e transtornos do sono, sendo aquele uso tão difundido que, em 1993 foram prescritas mais de 2,7 milhões de receitas contendo extratos de *H. perforatum* (LINDE *et al*, 1996). Em 1994, as receitas de *H. perforatum* totalizaram 25% do total das prescrições de antidepressivos na Alemanha (DE SMET; NOLEN, 1996). Em 1998, estima-se que a comercialização do extrato tenha alcançado $200 milhões nos EUA e $6 bilhões na Europa (McINTYRE, 2000).

O *H. perforatum* (Fig.1), pertencente à família das *Hypericaceae*, é um arbusto perene que cresce em lugares secos, sendo encontrado na Europa, Ásia, Austrália e em algumas regiões da América e, estando aclimatado ao Brasil (HEINZE; ONTIVEROS, 1998). A planta é pequena e o caule é ereto, com ramificações na parte superior. As folhas são ovaladas, elípticas ou ovaladas-alongadas (BOMBARDELLI; MORAZZONI, 1995). As flores são numerosas, hermafroditas e amarelo-alaranjadas, com suas pétalas salpicadas de pontos negros. A planta pode atingir entre 40 e 100 cm (HEINZE; ONTIVEROS, 1998).

A palavra *Hypericum* é derivada das palavras gregas *hyper* (acima) e *eikon* (imagem), porque os anciãos gregos e romanos costumavam colocar ramos de *H. perforatum* em cima de imagens ou estátuas em suas casas, acreditando que a planta possuía poderes místicos para protegê-los dos maus espíritos. As folhas do *H. perforatum* apresentam glândulas excretórias translúcidas que, observadas contra a luz, parecem pequeníssimas perfurações, de onde decorre seu nome em latim (*perforatum*). Já o nome popular aparentemente é relativo ao fato do arbusto florescer próximo do dia de São João, dia 24 de junho (MILLER, 1998).

**Fig. 1** – *H. perforatum*

A planta é colhida pouco antes ou durante seu florescimento. O extrato é obtido de suas partes aéreas, contendo pelo menos 18 constituintes ou grupos de compostos. Os constituintes freqüentemente variam em suas concentrações individuais na planta, por razões que incluem variações genéticas, condições de crescimento, tempo de colheita, preparação e processamento do material e exposição à luz (WAGNER; BLADT, 1994; NAHRSTEDT; BUTTERWECK, 1997; HEINZE; ONTIVEROS, 1998). Eles podem ser agrupados em:

- 0,05-0,3 % de hipericinas (hipericina, pseudohipericina, protohipericina e protopseudohipericina), pertencentes ao grupo das naftodiantronas; o conteúdo de hipericina é utilizado para padronização das preparações disponíveis;
- 2 a 4% de flavonóides (hiperósido ou hiperina, quercetina, rutina, quercitrina, isoquercitrina, luteolina, campferol, amentoflavona, I3, II8-biapigenina e miricetina);
- 0,1 a 1% de óleos essenciais (p.ex. monoterpenos);
- 6,5 a 15 % de taninos e proantocianidinas (catequina, epicatequina e derivados);
- 2 a 5% de floroglucinóis (hiperforina e adhiperforina);
- 0,01 % de aminoácidos (p.ex. ácido gama amino butírico, cisteína, glutamina, lisina);
- outros constituintes: ácido gálico, ácido cafeico, kielcorina e manigferina;

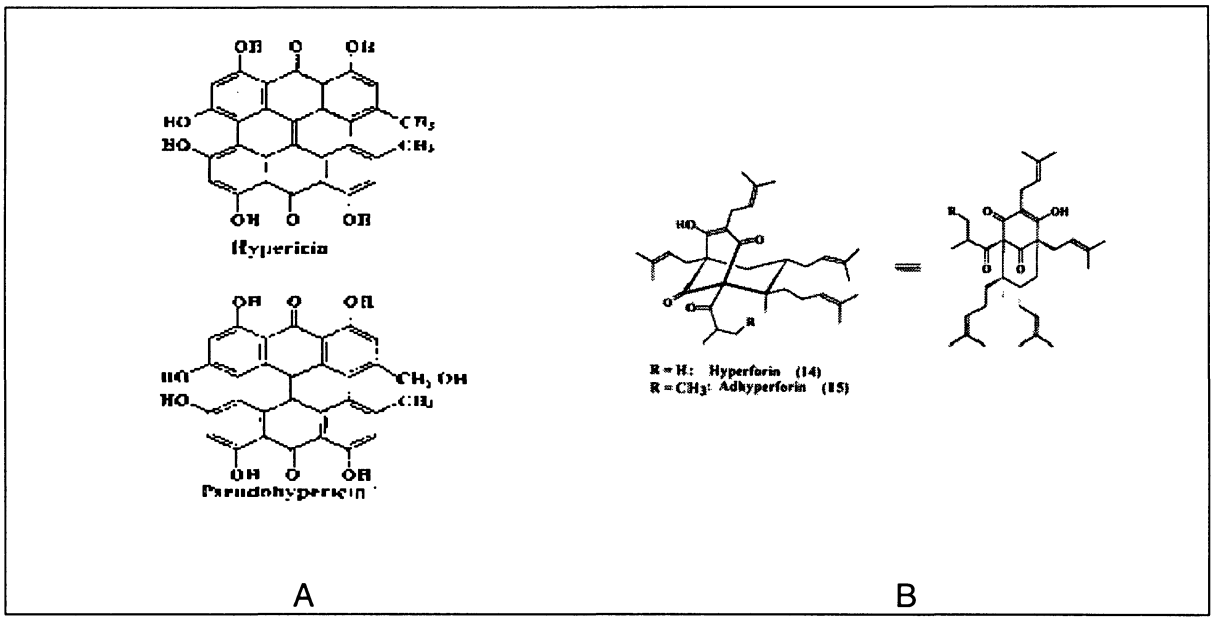



**Fig. 2** – Estrutura química da Hipericina e Pseudohipericina (A) e Hiperforina e Adhiperforina (B)

### 1.1.1 Efeito Antidepressivo do *H. perforatum*

Embora por muito tempo negligenciado pelas pesquisas, o crescente interesse pelo efeito antidepressivo do *H. perforatum* pode ser constatado pelos inúmeros artigos de revisão ou meta-análise publicados recentemente (ERNST, 1995; LINDE *et al.*, 1996; COTT; FUGH-BERMAN, 1998; ERNST *et al.*, 1998a; HEINZE; ONTIVEROS, 1998; HIPPIUS, 1998; WHEATLEY, 1998; JOSEY; TACKETT, 1999; LINDE; MULROW, 1999; HANNAH *et al.*, 1999; LINDE; MULROW *et al.*, 2001; DI CARLO *et al.*, 2001; GREESON *et al.*, 2001; BARNES *et al.*, 2000). O potencial efeito antidepressivo do *H. perforatum* tem sido confirmado tanto em pesquisas pré-clínicas com modelos animais de depressão (ÖZTERTÜK *et al.*, 1996; BUTTERWECK *et al.*, 1997; GAMBARANA *et al.*, 1998), como em estudos clínicos controlados com pacientes deprimidos (p.ex. LAAKMANN *et al.*, 1998; VORBACH *et al.*, 1997). Entretanto, recentemente, Shelton e colaboradores (2001) obtiveram resultados negativos em relação à eficácia do extrato no tratamento de depressão maior em um estudo controlado por placebo.

#### 1.1.1.1 Modelos Animais de Depressão

No teste de natação forçada em camundongos o extrato de *H. perforatum* apresentou efeito tipo antidepressivo (redução do tempo de imobilidade - TI)

semelhante à desipramina, trimepramina e bupropion (ÖZTERTÜK *et al.*, 1996; BUTTERWECK *et al.*, 1997). Em um modelo análogo, o teste de suspensão pela cauda em camundongos, o extrato de *H. perforatum* reduziu o TI (BUTTERWECK *et al.*, 1997). Na tentativa de identificação do composto farmacologicamente ativo nos modelos de depressão, Butterweck *et al.* (1997) observaram que 2 frações do extrato de *H. perforatum*, uma rica em flavonóides e outra em naftodiantronas (hipericinas e pseudohipericina), apresentaram efeito anti-imobilidade. Posteriormente, este mesmo grupo (BUTTERWECK *et al.*, 1998a, 1998b) observou que a combinação de hipericina e pseudohipericina apresenta um efeito antidepressivo no teste de natação forçada. Entretanto, em suspensão aquosa nenhuma destas isoladamente mostra-se ativa no teste, necessitando a adição da procianidina (composto sem ação antidepressiva) para se obter uma solução aquosa ativa. Nesta linha, Chatterjee *et al.* (1998a) observaram que tanto o extrato alcoólico como o extrato por $CO_2$ (este último sem hipericinas e rico em hiperforina) apresentam efeito tipo antidepressivo tanto no teste de natação forçada como no modelo do desamparo aprendido.

O *H. perforatum*, de modo análogo às drogas antidepressivas (imipramina e fluoxetina), também reverteu o desamparo aprendido e a anedonia induzida por estresse crônico em ratos (GAMBARANA *et al.*, 1998). Gambarana e colaboradores (1999) também observaram que o extrato de *H. perforatum,* administrado agudamente em ratos, protegeu os animais das seqüelas do estresse inescapável (modelo semelhante ao desamparo aprendido), bem como reverteu o déficit de fuga mantido por estresse repetido.

#### 1.1.1.2 Estudos Clínicos

Ernst (1995), revisando os artigos considerados metodologicamente aceitáveis (8 artigos comparativos com o placebo e 3 comparativos com antidepressivos), concluiu que o extrato de *H. perforatum* é tão eficaz quanto os antidepressivos heterocíclicos (maprotilina, imipramina e amitriptilina) e mais eficaz que o placebo no tratamento de sintomas depressivos de vários estados depressivos.

Um estudo de meta-análise realizado por LINDE e colaboradores (1996) analisou 23 artigos, excluindo outros 14 pela inadequação dos métodos empregados. Destes 23 artigos, 15 foram comparativos com o placebo, sendo que a análise quantitativa de 13 destes estudos mostra que o efeito do extrato de *H. perforatum* é superior ao placebo. A avaliação dos 6 estudos comparativos com drogas antidepressivas sugere que o *H. perforatum* é tão eficaz quanto os antidepressivos tricíclicos (ADT) na depressão leve e moderada. Entretanto, questões metodológicas importantes (critérios diagnósticos heterogêneos, médicos de especialidades diversas, doses baixas de ADT, etc.) sugerem que estas conclusões devem ser vistas com cautela (DELTITO; BEYER, 1998).

Vorbach e colaboradores (1997) avaliaram a eficácia e tolerabilidade do extrato de *H. perforatum* versus imipramina em pacientes com depressão severa e constataram que o extrato apresentou eficácia e tolerabilidade semelhantes ao ADT, mas recomendaram mais estudos para avaliar a possibilidade de empregar o *H. perforatum* como tratamento alternativo nos episódios de depressão severa.

Em 1999, Kim *et al.* realizaram uma meta-análise de 6 estudos clínicos envolvendo 651 pacientes com transtornos depressivos leves a moderados, que revelou que o *H. perforatum* é 1,5 vezes mais eficaz que o placebo e igualmente eficaz quando comparado com baixas doses de ADT. Entretanto, os autores apontam vários problemas metodológicos nesses estudos, tais como duração inadequada do tratamento.

Recente estudo de meta-análise da "Cochrane Library" (LINDE; MULROW, 2000) avaliou 27 estudos randomizados e duplo-cegos, que compararam preparações do extrato de *H. perforatum* com placebo ou com outros antidepressivos. Os resultados sugeriram que o extrato é superior ao placebo e tão eficaz quanto os ADT no tratamento de depressão leve a moderadamente severa.

Outros estudos recentes indicaram que o extrato de *H. perforatum* apresenta eficácia semelhante à da fluoxetina (HARRER *et al.*, 1999; VOLZ; LAUX, 2000) e à da sertralina (BRENNER *et al.*, 2000).

Uma revisão sistemática de 8 estudos randomizados e duplo-cegos de *Hypericum* versus placebo ou ADT apóiam os resultados previamente descritos (GASTER; HOLROYD, 2000). Entretanto, eles observaram que a taxa de resposta

para os pacientes tratados com o extrato foi 6-18 % menor que aquela de pacientes tratados com ADT.

Kalb *et al.* (2001) realizaram um estudo multicentro, duplo-cego e controlado por placebo para avaliar a eficácia do extrato de *H.* perforatum (WS 5572) em pacientes com depressão leve a moderada (critérios diagnósticos do Manual Diagnóstico e Estatístico dos Transtornos Mentais, 4ª edição - DSM-IV). Os resultados corroboram com os já descritos, ou seja, o extrato foi eficaz e bem tolerado no tratamento desses quadros depressivos.

É interessante notar que a administração do extrato de *H. perforatum* acarretou um aumento da latência para o sono de movimentos oculares rápidos (MOR) no polisonograma de voluntários normais, efeito semelhante ao de drogas antidepressivas, embora não diminua o tempo de MOR (SHARPLEY *et al.*, 1998). Outro ponto de similaridade com os antidepressivos são os relatos de indução de quadros maníacos com uso de *H. perforatum* (JANICAK *et al.*, 1997; SCHNECK, 1998; O'BREASSAIL; ARGOUARCH, 1998).

Diante dos dados da literatura, sugere-se que o *H. perforatum* seja eficaz em 60 a 70% dos pacientes com depressão leve e moderada, sendo, portanto, semelhante a outras classes de drogas antidepressivas (LINDE *et al.*, 1996; HIPPIUS, 1998; WHEATLEY, 1998).

Entretanto, esses dados são insuficientes para recomendar o uso do extrato para o tratamento de formas mais severas de depressão. Outro importante fato a ser mencionado é a necessidade de realizar estudos de longo prazo, que possibilitem melhor avaliar a eficácia e tolerabilidade do *H. perforatum* (DI CARLO *et al.*, 2001), uma vez que a maioria dos estudos clínicos com *Hypericum perforatum* tem empregado apenas 4 a 8 semanas de tratamento. Além disso, recentemente um grupo norte-americano realizou um estudo randomizado, duplo-cego e controlado por placebo, no qual observou que o extrato de *H. perforatum* foi ineficaz no tratamento de pacientes com depressão maior (SHELTON *et al.*, 2001).

### 1.1.2 Possíveis Mecanismos de Ação do *H. perforatum*

Inicialmente, foi descrito que a hipericina, um dos constituintes do extrato de *H. perforatum*, inibiu a atividade da monoamino oxidase A (MAO-A) e da monoamino oxidase B (MAO-B) em mitocôndrias do cérebro de ratos em um estudo *in* vitro

(SUZUKI *et al.*, 1984). Thiede e Walper (1994) também observaram 27 % de inibição da atividade da MAO e 35 % da atividade da catecol-O-metiltransferase (COMT) por altas concentrações do extrato. Já Cott (1997) observou uma inibição superior a 50 % tanto na atividade da MAO-A quanto da MAO-B, supondo-se, então, que o efeito antidepressivo do *H. perforatum* fosse decorrente dessa inibição.

Entretanto, essa suposição não foi confirmada por estudos posteriores (NATHAN, 1999; MULLER *et al.*, 1998; YU, 2000), uma vez que a fraca inibição ocorreu somente em concentrações muito mais altas que aquelas alcançadas clinicamente. O tratamento agudo e crônico com o extrato também não alterou a atividade da MAO cerebral em camundongos (YU, 2000) e o extrato sem hipericina manteve seu efeito antidepressivo (CHATTERJEE *et al.*, 1998b). Mais ainda, tendo em vista sua ampla utilização clínica e a ausência de relatos de interação com simpatomiméticos (p.ex. tiramina na chamada "reação de queijo"), mesmo que este efeito inibidor da monoamino oxidase (IMAO) ocorra, ele não parece ser clinicamente significante.

Outro mecanismo de ação proposto é a inibição da recaptação de monoaminas (dopamina - DA, noradrenalina - NA e serotonina - 5-HT), efeito detectado em doses até 100 vezes menores que as necessárias para o efeito IMAO (PEROVIC; MULLER, 1995; MÜLLER *et al.*, 1997; MULLER *et al.*, 1998; NEARY; BU, 1999; ROLLI *et al.*, 1995). Outro estudo recente demonstrou a inibição da recaptação sinaptossomal de 5-HT no cérebro de ratos, mas falhou em revelar efeito no transporte da monoamina ou alterações significativas nos seus níveis após tratamento com *H. perforatum* (GOBBI *et al.*, 2000)

Entretanto, em estudos *in vivo*, observou-se que o extrato aumenta os níveis de várias monoaminas no cérebro de ratos. Nesse sentido, o extrato LI-160 mostrou induzir aumento no conteúdo de 5-HT no córtex e os níveis de NA e DA no diencéfalo de ratos (CALAPAI *et al.*, 1999). Outros pesquisadores descreveram que o *H. perforatum* está associado com aumento dos níveis de 5-HT no hipotálamo e hipocampo de ratos (YU, 2000) e liberação de DA no núcleo accumbens e estriado (DI MATTEO *et al.*, 2000).

O extrato de *H. perforatum* pode afetar a liberação de neurotransmissores em sinapses centrais através da modulação da cinética de ativação de canais de $Ca^{+}$

ativados por voltagem alta, tipo P, em neurônios cerebelares (FISUNOV *et al.*, 2000).

Pesquisas em mamíferos não-humanos também tem revelado que a administração crônica do extrato promove alterações adaptativas na função de receptores freqüentemente observadas durante a farmacoterapia com antidepressivos convencionais: "down-regulation" de β-adrenoceptores sem alteração na afinidade pelo receptor (MULLER *et al.,* 1997). Por outro lado, ao contrário dos antidepressivos convencionais (KRISHNAN, 1998; LEONARD, 1992), o *H. perforatum* promove "up-regulation" de receptores 5-$HT_{1A}$ pós-sinápticos sem alteração na afinidade (MULLER *et al.,* 1997; TEUFEL-MAYER; GLEITZ, 1999) e "up-regulation" de receptores 5-$HT_2$ (MULLER *et al.*, 1997). Esses últimos resultados são semelhantes ao induzido pela eletroconvulsoterapia (tratamento antidepressivo) e, sugerem que a melhora da função serotoninérgica pode, em parte, aumentar a expressão desse subtipo de receptores (MULLER *et* al, 1997; NATHAN, 1999).

O extrato de *H. perforatum* induz um padrão eletroencefalográfico semelhante ao dos Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina (ISRS) (DIMPFEL *et al.*, 1998). Em adição, outra investigação revelou que essa planta aumenta significantemente a latência para o sono MOR, fenômeno demonstrado com outros antidepressivos clinicamente empregados (SHARPLEY *et al.*, 1998). Esses resultados reforçam as semelhanças entre os efeitos do extrato de *H.* perforatum e dos antidepressivos convencionais.

A abordagem comportamental para delineamento do mecanismo de ação antidepressiva do *H.* perforatum tem revelado resultados interessantes. Em relação ao sistema dopaminérgico, Gambarana *et al.* (1998) observaram que os efeitos antidepressivos do *H. perforatum* em modelos animais eram bloqueados pela administração de SCH 23390, um antagonista dos receptores dopaminérgicos $D_1$. Butterweck *et al.* (1997, 1998b) observaram que o efeito anti-imobilidade do extrato de *H. perforatum,* da hipericina e pseudohipericina no teste de natação forçada foi bloqueado pela administração de sulpiride ou haloperidol, antagonistas de receptores dopaminérgicos $D_2$. Mais ainda, estes autores também detectaram que no teste de suspensão pela cauda, a D,L,-butirolactona (que reduz a freqüência de disparos dos neurônios dopaminérgicos) e a α-metilparatirosina (inibidor da síntese de catecolaminas) bloquearam o efeito anti-imobilidade do extrato de *H. perforatum.*

Na medida da temperatura corporal o extrato de *H. perforatum* também exibiu efeitos sugestivos de uma ação predominantemente dopaminérgica, provocando um aumento da temperatura corporal, que foi bloqueado pelo sulpiride e intensificado pela apomorfina (BUTTERWECK *et al.*, 1997).

Ainda, o extrato de *H. perforatum* mostrou-se inativo na potenciação da hipertermia induzida pelo Hormônio de Liberação de Tireotrofinas, o que parece ser sugestivo de uma ausência de efeitos mediados pelo sistema α-adrenérgico (BUTTERWECK *et al.*, 1997).

Existem algumas indicações de que o *H. perforatum* possa modular certas vias neuroendócrinas. Thiele *et al.* (1994) mostraram que o extrato inibe a expressão de interleucina-6 (IL-6), uma citocina que pode estimular a liberação de cortisol. Sabe-se que o nível de cortisol endógeno elevado está correlacionado com a depressão maior (FELIG *et al.*, 1995), havendo evidências que apontam que os ISRS podem atenuar a produção de cortisol via antagonismo do fator de liberação de corticotrofina (VALENTINO; CURTIS, 1991). Dessa forma, a possível inibição da expressão de IL-6 pelo extrato pode também estar envolvida com seu efeito antidepressivo através da atenuação da produção de cortisol (GREESON *et al.*, 2001). Os estudos de Calapai *et al.* (2001) também sugerem que a IL-6 pode ser necessária para a ação antidepressiva do *H. peforatum* e que, provavelmente, esse efeito é mediado pela ativação do sistema serotoninérgico. Contrariando essa proposta, outro estudo verificou que a administração aguda de extrato em voluntários normais induz um aumento de cortisol salivar e do hormônio do crescimento plasmático, enquanto diminui a prolactina plasmática (FRANKLIN; COWEN, 2001). Em animais, o tratamento agudo com o *H. perforatum* LI-160, hiperforina e hipericina também aumentou os níveis de corticosterona plasmática, efeito que foi atenuado pela administração de ketanserina (antagonista 5-$HT_2$), mas não pela administração de WAY-100635 (antagonista 5-$HT_{1A}$), sugerindo que o aumento da concentração do hormônio poderia estar sendo mediado pela ativação de receptores 5-$HT_2$.

Nesses últimos anos, vários estudos têm sido realizados com o objetivo de determinar os constituintes ativos do extrato de *H. perforatum.* Embora atualmente as hipericinas sejam utilizadas na padronização dos extratos, existem fortes evidências de que o efeito antidepressivo não seja decorrente apenas desta classe

de compostos. Por exemplo, vários estudos sugerem que a hipericina não é capaz de inibir a recaptação de monoaminas (MULLER et *al,* 1998; ROLLI *et al.*, 1995) e não apresenta afinidade pelos receptores monoaminérgicos, colinérgicos, adrenérgicos, adenosinérgicos e BDZs (RAFFA, 1998). No estudo de Öztertuk *et al.* (1996) o *Hypericum calycinum*, que não possui hipericinas, também apresentou efeito tipo antidepressivo no teste de natação forçada.

Nessa linha, Chatterjee *et al.* (1998b) observaram que a potência dos dois extratos utilizados, alcoólico e por $CO_2$ (rico em hiperforina), em modelos animais apresenta uma correlação positiva com as respectivas concentrações de hiperforina. Estes autores observaram, ainda que a hiperforina, *in vitro,* apresenta efeito inibitório da recaptação de 5-HT, NA, DA, ácido γ-amino-butírico (GABA) e glutamato, não apresentando, entretanto, efeito IMAO.

Outros estudos também observaram os efeitos inibitórios da hiperforina na recaptação de monoaminas (MÜLLER *et al.*, 1998). Kaehler e colaboradores (1999) mostraram através da técnica de perfusão "push-pull", que a hiperforina, *in vivo,* aumentou os níveis extracelulares das monoaminas e do glutamato, corroborando com os resultados citados anteriormente. Entretanto, a hiperforina não alterou a concentração extracelular de GABA, contrariando os resultados dos estudos *in vitro.*

Em relação ao efeito de inibição da recaptação sinaptossomal de monoaminas, Singer e colaboradores (1999) constataram que a hiperforina inibe a recaptação sinaptossomal de forma não competitiva, possivelmente por elevar a concentração intracelular livre de $Na^+$. Os transportadores de neurotransmissores operam por um co-transporte de $Na^+$. Condições que diminuem o gradiente desse cátion na membrana neuronal, seja por reduzir a concentração extracelular, seja por aumentar a concentração intracelular, inibem os transportadores dos neurotransmissores (DI CARLO *et al.*, 2001). Alguns autores têm sugerido que o aumento da concentração intracelular de $Na^+$ nos neurônios, induzido pela hiperforina, seja decorrente da ativação do trocador $Na^+$-$H^+$, que levaria a um aumento da captação neuronal de $Na^+$ ou, seja decorrente do bloqueio de canais de $Na^+$ sensíveis a amilorida, o que reduziria a expulsão de $Na^+$ (SINGER *et al.*, 1999; WONNEMAN *et al.*, 2000). Essa atividade da hiperforina explica, pelo menos em parte, seu perfil não-seletivo de ação nos sistemas transportadores de vários neurotransmissores (LESTER *et al.*, 1994).

A hiperforina também é capaz de induzir alterações eletroencefalográficas em ratos e humanos semelhantes àquelas induzidas por ISRS (DIMPFEL *et al.*, 1998; SHELLENBERG *et al.*, 1998). Mais ainda, a hiperforina inibe as respostas mediadas por receptores GABA, *N*-metil-D-aspartato (NMDA) e AMPA em neurônios piramidais hipocampais isolados de ratos (CHATTERJEE *et al.*, 1999).

Por fim, um estudo multicentro, randomizado e duplo-cego comparou 2 diferentes extratos de *H. perforatum* (com conteúdos diferentes de hiperforina) com placebo em pacientes com depressão leve a moderada segundo o DSM-IV (LAAKMANN *et al.*, 1998). Eles observaram que somente o extrato com maior conteúdo de hiperforina (5 %) apresentou efeito antidepressivo superior ao efeito do placebo, mostrando que esse efeito depende do conteúdo de hiperforina.

Em conjunto estes dados sugerem que, embora as hipericinas possam contribuir para o efeito antidepressivo do *H. perforatum* (ver os estudos de Butterweck *et al.*, 1997 e 1998b descritos acima), elas não são essenciais para este efeito. Além disto, estes dados sugerem também que vários constituintes do *H. perforatum* podem apresentar efeito antidepressivo, embora a elevada concentração da hiperforina possa indicar ser esta substância o principal princípio ativo antidepressivo (CHATTERJEE *et al.*, 1998b).

Também deve ser mencionado que o emprego de ampla variedade de preparações de *H. perforatum* (diferentes concentrações dos constituintes farmacológicos) nos diferentes estudos clínicos prejudica as comparações (DI CARLO *et al.*, 2001). Em relação a isso, a atual padronização através do conteúdo de hipericinas apresenta uma correlação pobre com a potência clínica do extrato, uma vez que já foi constatado que o efeito antidepressivo do *H. perforatum* depende, principalmente, do seu conteúdo de hiperforina (LAAKMANN *et al.*, 1998).

### 1.1.3 Efeitos ansiolíticos do *H. perforatum*

Vandenbogaerde *et al.* (2000) observaram que o extrato total de *H. perforatum* apresentou um efeito ansiolítico no modelo animal de ansiedade de transição claro-escuro, efeito que foi bloqueado pela injeção concomitante de flumazenil, um antagonista BDZ, sugerindo que o efeito ansiolítico do extrato possa estar envolvendo sua ação sobre o sistema GABAérgico.

Kumar *et al.* (2000) também observaram efeito ansiolítico do extrato etanólico de *H. perforatum* indiano em vários modelos animais de ansiedade, tais como o campo aberto, LCE, labirinto em zero elevado e teste de interação social. Entretanto, esse efeito foi observado somente após administração repetida por 3 dias.

O resultado da administração aguda de hiperforina pura (o principal representante dos acilfloroglucinois presente no extrato de *H. perforatum*) em baixas doses também demonstrou efeito ansiolítico no LCE (CHATTERJEE *et al.*, 1998b). Por outro lado, outro estudo mostrou que o tratamento com um extrato de *H. perforatum* 5 mg/Kg sem hiperforina aumentou o tempo gasto nos braços abertos do LCE em ratos, o que indica um efeito tipo-ansiolítico (COLETA *et al.*, 2001).

Ainda, Flausino Jr. *et al.* (2001) mostraram um efeito tipo-ansiolítico da dose de 125 mg/Kg do extrato LI-160, após tratamento agudo, na tarefa de esquiva inibitória do Labirinto em T Elevado (LTE) e, após tratamento crônico, efeito tipo-ansiolítico da dose 250 mg/Kg, no teste de transição claro-escuro.

Nosso grupo também demonstrou que o tratamento agudo com extrato de *H. perforatum* reduziu o comportamento de "enterrar objetos não condicionado" de camundongos, efeito semelhante ao dos BDZs clássicos, ou seja, apresentou efeito tipo-ansiolítico nesse modelo (SKALISZ *et al.*, 2001).

Stivenson *et al.* (1998), em um estudo clínico aberto sobre os efeitos do *H. perforatum* em pacientes com diagnóstico de fadiga, encontraram uma redução da ansiedade e da depressão (avaliada pela Escala Hospitalar de Depressão e Ansiedade). Outro estudo clínico aberto avaliou o efeito do tratamento, por 12 semanas, com extrato de *H. perforatum* em pacientes com diagnóstico de Transtorno Obsessivo-Compulsivo (TOC), segundo o DSM-IV, evidenciando significante melhora na escala utilizada (TAYLOR; KOBACH, 2000).

### 1.1.4 Efeitos Adversos, Tóxicos e Interações Medicamentosas do *H. perforatum*

Nos estudos clínicos, os efeitos adversos induzidos por *Hypericum perforatum* foram pouco freqüentes, geralmente com incidência e gravidade menores do que os ADT e similares ao placebo (LINDE *et al.*, 1996; DE SMET; NOLEN, 1996; ERNST

*et al.*, 1998b). Woelk *et al.* (1994), em estudo aberto com um grande número de pacientes (3.250), observaram que apenas 2,4% dos pacientes (74) relataram efeitos adversos, principalmente gastrintestinais (0,6% - leve náusea, diminuição do apetite e desconforto gástrico), reações alérgicas (0,5%), fadiga (0,4%) tontura (0,2%), ansiedade (0,3%) e outros efeitos menos freqüentes.

Estes dados são corroborados pelos estudos controlados revistos por Linde *et al.* (1996). Estes autores observaram que nos estudos comparativos com placebo, houve uma incidência de efeitos adversos semelhante nos grupos tratados com *H. perforatum* e com placebo (4,1 % vs 4,8% respectivamente). Por outro lado, nos estudos comparativos entre antidepressivos e *H. perforatum*, observou-se uma maior incidência de efeitos adversos nos grupos tratados com antidepressivos clássicos (19,8% vs 35,9% respectivamente).

Outra recente meta-análise relatou que em estudos comparando os efeitos adversos do extrato com os dos antidepressivos, a proporção de pacientes que mencionaram efeitos colaterais foi 26,3 e 44,7 %, respectivamente (LINDE; MULROW, 2001).

Os efeitos tóxicos do *H. perforatum* têm sido associados às naftodiantronas (hipericinas) e à quercetina. A fototoxicidade é o efeito mais freqüentemente citado, sendo inicialmente observado em animais (vacas, bezerros, cavalos, etc.) após a ingestão de grandes quantidades (cerca de 3g/kg) de *H. perforatum.* Posteriormente, este efeito foi estudado em voluntários normais, tratados com extrato de *H. perforatum* e, submetidos à exposição a raios ultravioleta. Observou-se um aumento do eritema em voluntários sensíveis à luz. Entretanto, os voluntários apresentavam níveis plasmáticos de hipericina e pseudo-hipericina (propostos como responsáveis por este efeito) 2 vezes superiores aos observados no uso clínico como antidepressivo. Mais ainda, a fotossensibilização é geralmente leve e transitória, desaparecendo poucos dias após a suspensão do tratamento (BROCKMOLLER, 1997). Em outro estudo clínico, pacientes HIV positivo tratados com hipericina 0,05 mg/Kg por 28 dias desenvolveram sintomas leves de fototoxicidade após exposição à luz (PITISUTTITHUM *et al.*, 1996). Recentemente, também foi descrito o caso de uma paciente tratada com *H. perforatum* que desenvolveu um quadro de neuropatia tóxica subaguda (hiperestesia dolorosa) desencadeada pela exposição ao sol (BOVE, 1998).

Evidências experimentais têm sugerido que a solução de hipericina pode reagir com luz visível e ultravioleta para produzir determinadas espécies de radicais livres, e que eles seriam responsáveis pelo dano de proteínas dos olhos (SCHEY *et al.*, 2000).

Nos estudos de toxicologia pré-clínica, não foram observadas lesões significativas, sendo encontrados apenas efeitos inespecíficos, tais como perda de peso e alterações hepáticas decorrentes do excesso de atividade hepática devido às altas doses administradas.

Também não se detectou potencial teratogênico ou mutagênico (COTT; FUGH-BERMAN, 1998). Em outro estudo pré-clínico, Rayburn *et al.* (2001) avaliaram os efeitos da administração pré-natal de *H. perforatum* no crescimento e amadurecimento físico de filhotes de camundongos. Eles observaram que não houve alterações dessas características a longo prazo.

Ernst (1999) observou que nos casos de co-administração de drogas como teofilina, ciclosporina, varfarina e contraceptivos orais com *H. perforatum*, ocorreu uma redução da concentração plasmática dessas drogas. O extrato também reduziu significantemente a concentração plasmática de digoxina (JOHNE *et al.*, 1999). Nesse sentido, outros pesquisadores recentemente reportaram que o extrato de *H. perforatum* promove indução da isoenzima CYP3A4 em voluntários normais após um período de 14 dias de tratamento (900 mg/dia; ROBY *et al.*, 2000). A indução de enzimas hepáticas pelo *H. perforatum* pode reduzir os níveis sangüíneos e, conseqüentemente, os efeitos terapêuticos de mais de 73 drogas metabolizadas por esse sistema. Em fevereiro de 2000, a Agência de Avaliação da Medicina Européia publicou uma recomendação de que pacientes que fazem uso de indinavir (e presumivelmente de outros antivirais) para tratamento contra infecção por HIV-1 não devem consumir produtos com *Hypericum* (BIFFIGNANDI; BILIA, 2000), uma vez que isso pode acarretar diminuição da concentração plasmática do antiviral.

Por outro lado, Obach (2000) e Biffignandi e Bilia (2000) relataram que alguns constituintes do extrato podem inibir enzimas humanas da família do citocromo P450 em estudos *in vitro*. Desse modo, é necessária uma maior investigação de possíveis interações medicamentosas com *H. perforatum*, especialmente nos casos de co-administração de drogas cujo metabolismo é catalisado por essas enzimas, uma vez

que a inibição enzimática pode ocasionar um aumento da concentração plasmática de drogas metabolizadas por esse sistema.

Podem também ocorrer interações farmacodinâmicas devido às ações do extrato sobre os sistemas neurotransmissores no cérebro. Um exemplo disso é a síndrome serotoninérgica (alterações mentais, tremor, cefaléia, mialgia, distúrbios gastrintestinais) descrita quando o extrato é administrado concomitantemente com inibidores da recaptação de 5-HT, como paroxetina e sertralina (LANTZ *et al.*, 1999).

De um modo geral, comparativamente aos antidepressivos empregados atualmente, o extrato de *H. perforatum* apresenta baixa incidência de efeitos colaterais e poucos relatos de intoxicações (LINDE *et al.*, 1996; DE SMET; NOLEN, 1996; WHEATLEY, 1998), o que constitui uma vantagem em seu emprego como alternativa clínica. Estes podem ser os motivos da alta taxa de aderência dos pacientes observada no tratamento com *H. perforatum* (HIPPIUS, 1998).

## 1.2 TRANSTORNO DE PÂNICO (TP)

O TP faz parte dos transtornos de ansiedade, que, segundo a classificação do DSM-IV (1994), compreendem TP sem agorafobia, TP com agorafobia, Agorafobia sem História de TP, Transtorno de Ansiedade Generalizada (TAG), Fobia específica, Fobia Social, TOC, Transtorno de Estresse Pós-Traumático, Transtorno de Estresse Agudo, Transtorno de Ansiedade devido à condição médica geral, Transtorno de Ansiedade Induzido por Substância e Transtorno de Ansiedade sem outra especificação.

O TP é um distúrbio crônico caracterizado por ataques de pânico inesperados e recorrentes, acerca dos quais o indivíduo se sente persistentemente preocupado (DSM-IV, 1994). O ataque de pânico, por sua vez, é um período distinto de intenso temor ou desconforto, no qual 4 ou mais dos seguintes sintomas desenvolvem-se abruptamente e alcançam um pico em aproximadamente 10 minutos: palpitação ou ritmo cardíaco acelerado, sudorese, tremores ou abalos, sensação de falta de ar ou sufocamento, sensação de asfixia, dor ou desconforto torácico, náusea ou desconforto abdominal, sensação de tontura, instabilidade ou despersonalidade, medo de perder o controle ou enlouquecer, medo de morrer, parestesias (anestesia ou sensação de formigamento), calafrios ou ondas de calor (DSM-IV, 1994).

Dentre os principais critérios diagnósticos para o TP sem agorafobia, estão:

- Pelo menos 2 ataques de pânico recorrentes e inesperados;
- Pelo menos um dos ataques foi seguido por 1 mês (ou mais) de uma (ou mais) das seguintes características: preocupação persistente acerca de ataques adicionais; preocupação acerca das implicações do ataque ou suas conseqüências; uma alteração comportamental significativa relacionada aos ataques;
- Ausência de agorafobia.

Os principais critérios para o diagnóstico do TP com agorafobia compreendem os mesmos acima descritos, incluindo a presença de agorafobia. A agorafobia corresponde à ansiedade ou evitação de lugares ou situações das quais fugir possa ser difícil (ou embaraçoso) ou nas quais ajuda possa não estar disponível no caso do indivíduo apresentar um ataque de pânico ou sintomas tipo-pânico (DSM-IV, 1994).

A freqüência e severidade dos ataques de pânico variam amplamente. Alguns indivíduos têm ataques moderadamente freqüentes (p. ex. um por semana) que ocorrem regularmente por meses. Outros relatam pequenos períodos de ataques freqüentes (p. ex. diariamente durante uma semana), separados por semanas ou meses sem nenhum ataque (DSM-IV, 1994).

Em geral, o TP está associado com significante angústia e os indivíduos que sofrem desse transtorno apresentam grande incapacidade social e ocupacional (MARKOITZ *et al.*, 1989; HOLLIFIELD *et al.*, 1997).

Além disso, a presença de comorbidade é um fator que influencia tanto na escolha do tratamento a ser empregado, quanto no prognóstico da doença. Depressão é a condição associada mais freqüente e significante em pacientes com TP (WESTENBERG, 1996). Aproximadamente 50 a 70 % dos pacientes com TP também sofrem de depressão (JOHNSON *et al.*, 1990; VOLRATH; ANGST, 1989). Entretanto, uma variedade de outras condições psiquiátricas podem estar associadas com TP, como por exemplo agorafobia (60 % dos pacientes com TP), outros transtornos de ansiedade (20 %) e abuso de drogas e álcool (15 %) (KLERMAN, 1992).

Segundo o DSM-IV (1994), a prevalência do TP (com ou sem agorafobia) durante o período de vida está entre 1,5 e 3,5 %.

Clinicamente, diferencia-se o TP do TAG, que envolve ansiedade persistente e não-associada a nenhum objeto ou situação particular, ou seja, a intensidade e a duração ou freqüência da ansiedade ou preocupação são claramente desproporcionais à real probabilidade ou impacto do evento temido (DSM-IV, 1994).

### 1.2.1 Tratamento Farmacológico do TP

Uma série de medicamentos têm sido utilizados com sucesso no tratamento de TP (ANDREATINI; GALDURÓZ, 1995; JANICAK *et al.*, 1997):

- ADT, IMAOs, ISRS, etc.;
- BDZ, particularmente os de alta potência, como alprazolam e clonazepam.

#### 1.2.1.1 Antidepressivos

Desde os estudos iniciais de Klein e colaboradores (p.ex. KLEIN, 1962; KLEIN, 1964), que descreveram pela primeira vez o uso do ADT imipramina no tratamento do TP, a principal abordagem farmacológica para essa condição psiquiátrica tem sido feita com os antidepressivos, particularmente com os ADT, sendo a droga de referência a imipramina.

Posteriormente, foram introduzidos os ISRS e, em escala menor, os IMAOs. Entretanto, a lenta latência para aparecimento dos efeitos antipânico, 4 a 8 semanas de tratamento, continuou sendo um grande desafio, sugerindo que alterações adaptativas semelhantes àquelas que ocorrem no tratamento da depressão podem ser responsáveis por esse efeito (BLIER; MONTIGNY, 1999).

Outra limitação do tratamento com ADT e ISRS consiste na exacerbação dos sintomas durante os primeiros dias de tratamento em aproximadamente 20 % dos pacientes, geralmente aumentando o número de ataques de pânico (BLIER; MONTIGNY, 1999).

Ainda, outro aspecto a ser considerado é a co-morbidade entre TP e depressão. Aproximadamente 50-75% dos pacientes com TP apresentam ao menos 1 episódio de depressão maior durante a vida, sendo que 31% dos pacientes com TP desenvolvem episódios depressivos após o início do TP (depressão secundária). Além disto, pacientes com depressão secundária teriam um pior prognóstico. Nesta

situação, o tratamento inicial mais apropriado de pacientes seria com antidepressivos ou, como alternativa, com o alprazolam, que apresenta efeito antidepressivo moderado.

*Antidepressivos Tricíclicos:* Entre os ADT, imipramina e clomipramina têm sido extensivamente estudados no tratamento do TP. Entretanto, existem algumas evidências de que a clomipramina seria a droga de 1ª escolha, uma vez que a dose eficaz desta é significativamente menor do que a dose eficaz de imipramina, o que estaria associado a uma menor probabilidade de efeitos colaterais e, conseqüentemente, maior aderência ao tratamento (MODIGH *et al*, 1992; GENTIL, 1994). Evidências sobre a eficácia dos outros ADT são escassas, mas, aparentemente, nortriptilina, amitriptilina e desipramina parecem ser eficazes, enquanto o bupropion, o trazodone, a amoxapina e a maprotilina não são (DEN BOER; WESTENBERG, 1988; WESTENBERG; DEN BOER, 1993; CORDÁS, 1994). A principal diferença farmacológica entre maprotilina e outras drogas, como imipramina e clomipramina, é que a primeira não inibe a recaptação de 5-HT, o que levou Westenberg e Den Bôer (1993) a sugerirem que a eficácia dos ADT provavelmente depende de alterações no sistema serotoninérgico. Entre as desvantagens do uso dessa classe de drogas, estão seus efeitos colaterais comumente observados: ganho de peso, boca seca, visão turva, retenção urinária, obstipação, efeitos cardiovasculares (taquicardia, hipotensão postural, distúrbio de condução, etc.), sudorese excessiva e disfunção sexual. Deve-se estar atento às contra-indicações dos ADT, tais como glaucoma de ângulo agudo, hipertrofia prostática e certos distúrbios cardíacos (JANICAK *et al.,* 1997; OLIVEIRA, 1994). Cabe ressaltar que o prolapso de válvula mitral, achado comum em pacientes com TP, não é contra-indicação ao uso de ADT. Outro aspecto importante que pode acarretar suspensão do tratamento é a piora inicial do quadro observada em aproximadamente 30% dos casos.

*Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina:* Esta classe de antidepressivos (p.ex. fluoxetina, sertralina, etc.) tem se mostrado muito útil no tratamento do TP, particularmente devido à baixa incidência de efeitos colaterais. Boyer (1995), através da técnica de meta-análise, concluiu que os ISRS (fluvoxamina, paroxetina, zimelidina e clomipramina) são mais eficazes que o alprazolam e a imipramina no

TP. A eficácia clínica da fluoxetina e da sertralina também foi comprovada (MICHELSON *et al.*, 1998; LONDBORG *et al.*, 1998). Um importante efeito colateral desta classe de antidepressivos é o aumento da ansiedade que pode ser observado no início do tratamento, o que é particularmente problemático em pacientes com TP. Por outro lado, apresentam pouco ou nenhum efeito sobre os receptores colinérgicos, histaminérgicos e adrenérgicos, sendo melhor tolerados que os ADT (GOLDBERG, 1995). Outros efeitos adversos que podem ser observados são: anorexia, diarréia, cefaléia, insônia (ou sonolência), sudorese, tremores, etc (JANICAK *et al.*, 1997; OLIVEIRA; MOREIRA, 1994).

*Inibidores da Monoamino Oxidase:* Embora sejam medicamentos pouco utilizados, tanto os IMAOs irreversíveis quanto os reversíveis têm-se mostrado eficazes no tratamento do TP. Entre os IMAOs irreversíveis, apenas a fenelzina (não disponível comercialmente no Brasil) foi estudada de modo controlado (TESAR; ROSENBAUM, 1993; BALLENGER, 1993), embora a tranilcipromina seja descrita por muitos especialistas como uma medicação eficaz na clínica (VERSIANI *et al.*, 1985; JANICAK *et al.*, 1997). Já entre os inibidores reversíveis e seletivos da MAO-A, tanto a moclobemida como o brofaromina se mostraram eficazes (BAKISH *et al.*, 1993; BULLER, 1995; TILLER *et al.*, 1997). Os IMAOs apresentam características clínicas (retardo para início da ação) e efeitos colaterais (anticolinérgicos, disfunção sexual, hipotensão postural, ganho de peso) semelhantes aos ADT (JANICAK *et al.*, 1997; OLIVEIRA; MOREIRA, 1994). Entretanto, um problema adicional dos IMAOs irreversíveis são os cuidados necessários com as possíveis interações com alimentos contendo tiramina (presente, por exemplo, em queijos e vinhos) e com drogas simpaticomiméticas, que podem resultar em crises hipertensivas (WESTENBERG, 1996) e cuja dieta é difícil de ser seguida pelo paciente, particularmente nos tratamentos a longo prazo e após a remissão dos sintomas. Diante destes aspectos, os IMAOs têm sido considerados apenas como uma opção aos ADT e ISRS.

### 1.2.1.2 Benzodiazepínicos

No início da década de 80, considerava-se que o TP fosse refratário ao tratamento com BDZs até que se demonstrou que tanto o alprazolam, como o

clonazepam, são eficazes no controle da sintomatologia do pânico (p.ex. BALLENGER *et al.*, 1988; TESAR *et al.*, 1991). Mais além, parece que mesmo outros BZDs, embora em doses mais elevadas que as normalmente empregadas no TAG (p.ex diazepam 40 mg/dia) apresentariam efeito antipânico (DUNNER *et al.*, 1986).

A principal vantagem dessa classe de drogas, em relação aos antidepressivos, é a rápida latência de ação, isto é, o tratamento proporciona uma rápida melhora dos sintomas (TESAR, 1990).

Os principais problemas com o uso dos BDZ são: (1) o risco de síndrome de abstinência e maior taxa de recidiva quando da suspensão do tratamento; (2) os efeitos sedativos e miorrelaxantes iniciais; (3) efeitos cognitivos, particularmente amnésicos, que podem permanecer mesmo após 15 semanas de suspensão do uso de BDZ; e (4) o risco de levarem à dependência (ZOHAR; WESTENBERG, 2000).

Sugere-se utilizar o clonazepam devido à sua meia-vida mais longa, conseqüentemente com menor necessidade de administrações diárias e menor risco de síndrome de abstinência (ANDREATINI; GALDURÓZ, 1995). Além disto, caso o paciente em uso de alprazolam apresente efeitos rebote interdose ou matinais, pode-se fazer a troca gradual pelo clonazepam (HERMAN *et al.*, 1987). Uma preocupação que poderia advir do uso dos BDZ seria a possibilidade de tolerância ao efeito antipânico, o que não foi confirmado nos estudos à longo prazo (LEPOLA *et al.*, 1993; POLLACK *et al.*, 1993).

### 1.2.2 *H. perforatum* no tratamento do TP

Em vista da semelhança dos efeitos farmacológicos (inibição de recaptação de monoaminas), comportamentais (tipo antidepressivo em modelos animais de depressão) e clínicos (antidepressivo) do *H. perforatum* com os medicamentos mais utilizados no tratamento do TP (antidepressivos), o *H. perforatum* apresenta-se como um fitoterápico potencialmente útil no tratamento desta patologia. O *H. perforatum* parece também exercer atividade sobre o sistema GABAérgico, inibindo a recaptação de GABA (CHATTERJEE *et al.*, 1998a) e ligando-se a receptores $GABA_A$ e $GABA_B$ (COTT, 1997; SIMMEN *et al.*, 1999), abrindo a possibilidade também de atuar no TP através do sistema GABAérgico.

Em relação a estudos clínicos, existe apenas um relato de caso uma paciente com possível diagnóstico de TP que mencionou uma diminuição do número de ataques de pânico após utilização desse fitoterápico (YAGER *et al.*, 1999).

Uma possível vantagem do *H. perforatum* seria o baixo número de relatos de efeitos adversos (LINDE *et al.*, 1996; DE SMET; NOLEN, 1996; LAAKMANN *et al.*, 1998), um aspecto importante na aderência ao tratamento dos pacientes com TP. Nos estudos com drogas antidepressivas, nota-se uma alta taxa de abandono durante o tratamento, provavelmente relacionado com os efeitos adversos e/ou piora inicial observada com estes fármacos (JANICAK *et al.*, 1997; BAKISH *et al.*, 1993; SHEEHAN; HARNET-SHEEHAN, 1996). Mais ainda, os efeitos adversos dos medicamentos empregados para tratamento do TP têm sido apontados como o principal fator de refratariedade ao tratamento (COWLEY *et al.*, 1997).

### 1.2.3 Modelos Animais de TP

Em geral, existe uma grande dificuldade em desenvolver modelos experimentais para estudar as diversas condições psiquiátricas, haja vista que a maioria dos sintomas são subjetivos e necessitam da verbalização pelo paciente. Por outro lado, cresce a necessidade de empregar os modelos animais no estudo de novas drogas e para auxiliar na compreensão dos processos neurofisiopatológicos envolvidos nesses distúrbios.

Muitos modelos animais de psicopatologias emocionais envolvem a exposição do animal a estímulos internos ou externos, os quais acredita-se serem capazes de induzir estados emocionais relevantes em humanos (GRIEBEL *et al.*, 1996c).

Modelos animais de ansiedade úteis devem: (1) reproduzir características comportamentais e patológicas da síndrome de ansiedade; (2) permitir a investigação de mecanismos neurobiológicos que não são facilmente estudados no homem; e (3) permitir a avaliação confiável de agentes ansiolíticos, assim como identificar efeitos ansiogênicos de drogas e toxinas (ANDREATINI *et al.*, 2001).

Até recentemente, os modelos animais de ansiedade eram validados farmacologicamente utilizando-se BDZs clássicos, que são drogas úteis no tratamento do TAG. Além disso, a maioria desses modelos (como o LCE) considerava a ansiedade como um fenômeno único. Atualmente, têm crescido o número de propostas de novos modelos de ansiedade que discriminem os

diferentes quadros de ansiedade encontrados na clínica. Nessa linha, alguns autores têm proposto modelos animais de TP. Entre esses modelos, é possível citar o LTE (GRAEFF *et al.*, 1993), a Bateria de Testes de Defesa em Camundongos (BTDC) (GRIEBEL *et al.*, 1995b; BLANCHARD *et al.*, 1997), a Estimulação Elétrica (ou química) Aversiva da Substância Cinzenta Periaquedutal Dorsal (SCPd) (JENCK *et al.*, 1995) e a Inibição do Hipotálamo Dorso-Medial (HDM) (SHEKHAR, 1994).

Dentre os modelos existentes, pode-se realizar uma classificação de acordo com o tipo de comportamento defensivo observado, ou seja, modelos baseados no comportamento condicionado/aprendido e modelos baseados no comportamento incondicionado/inato. De maneira geral, cada modelo apresenta vantagens e limitações e a escolha do modelo a ser empregado em um determinado estudo pré-clínico dependerá da avaliação do pesquisador em relação a seus interesses específicos.

#### 1.2.3.1 Modelos animais de TP baseados no comportamento condicionado/aprendido

##### 1.2.3.1.1 Teste de supressão de beber condicionado (SBC)

Fontana e Comissaris (1988) e Fontana *et al.* (1989) propuseram que uma versão modificada dos testes de conflito condicionados de Geller-Seifter e de Vogel poderia servir como um modelo animal de pânico, uma vez que o tratamento crônico com imipramina, desipramina, amitriptilina e fenelzina aumentou o nº de choques aceitos pelo animal, sugerindo um efeito tipo-antipânico, enquanto que o tratamento agudo não induziu nenhuma alteração. Entretanto, poucas drogas têm sido testadas nesse modelo e o teste não apresenta sensibilidade bidirecional. Além disso, não se sabe se o SBC é sensível especificamente para detectar agentes panicolíticos, ou se detecta também drogas não-panicolíticas, como os ansiolíticos empregados no tratamento do TAG (GRIEBEL *et al.*, 1996c).

1.2.3.1.2 Vocalizações ultrassônicas condicionadas (VUC)

Molewijk *et al.* (1995) propôs que esse modelo animal, no qual o rato emite vocalizações ultrassônicas ao ser introduzido em um local onde previamente recebeu choques inescapáveis, poderia ser um modelo animal para avaliar drogas com efeito antipânico. Entretanto, ocorreram algumas discrepâncias entre os resultados pré-clínicos e aqueles observados na clínica. Por exemplo, agonistas parciais e totais dos receptores 5-$HT_{1A}$ (flesinoxan, buspirona e ipsapirona) reduziram a emissão de vocalizações, efeito interpretado como tipo-panicolítico. Por outro lado, resultados clínicos com buspirona e flesinoxan não revelaram uma redução na freqüência de ataques de pânico (WESTENBERG *et al.*, 1992). Outro resultado contraditório observado é a redução das emissões ultrassônicas pela ioimbina, uma droga promotora de pânico, mostrando claramente as limitações do modelo para investigação de agentes antipânico (GRIEBEL *et al.*, 1996c).

1.2.3.1.3 Estimulação elétrica (ou química) aversiva da SCPd

Segundo o DSM-IV (1994), os ataques de pânico são geralmente acompanhados por uma urgência em fugir e os pacientes com TP freqüentemente relatam um desejo urgente de fugir de onde o ataque está ocorrendo. Nesse sentido, em 1972, Sano e colaboradores relataram que a estimulação elétrica do sistema de luta/fuga SCP-hipotalâmico em humanos elicia sintomas e alterações autonômicas muito semelhantes àquelas observadas durante um ataque de pânico. Ainda, Deakin e Graeff (1991), Deakin *et al.* (1991) e Graeff (1990) sugeriram que os ataques de pânico poderiam ocorrer devido a uma ativação espontânea desse sistema. A partir dessas observações, então, Graeff (1990) desenvolveu um procedimento de ativação da SCPd do rato que leva a manifestações comportamentais de defesa (fugas, pulos) identificadas como tipo-pânico. Jenck e colaboradores (1995) modificaram esse modelo por modular as reações tipo-pânico induzidas pela estimulação da SCPd através de um comportamento de auto-interrupção operante. Resumidamente, sob estimulação aversiva da SCPd, os animais rapidamente adquirem e mantêm respostas de auto-interrupção operante (leve pressão na barra), que permite a interrupção da estimulação aversiva. Drogas

que agudamente melhoram (alprazolam, clonazepam) ou precipitam (ioimbina, cafeína, flesinoxan) ataques de pânico, reduziram ou aumentaram, respectivamente, a aversão induzida pela estimulação da SCPd (JENCK *et al.*, 1995; JENCK *et al.*, 1999). Contudo, esse modelo também revelou efeitos paradoxais das drogas testadas. Por exemplo, o mCPP (droga que pode induzir pânico) apresentou um efeito antiaversivo no modelo (JENCK *et al.*, 1989). Efeitos semelhantes foram encontrados com injeções agudas de fluoxetina (JENCK *et al.*, 1998) e fluvoxamina (JENCK *et al.*, 1990), que podem potencializar sintomas de pânico em pacientes com TP no início do tratamento (DEN BOER; WESTENBERG, 1990; SARAN; HALARIS, 1989). Nesse sentido, o trazodone (antagonista 5-$HT_{2A,2C}$) aumentou o limiar da estimulação aversiva da SCP (JENCK *et al.*, 1989), mas falhou em melhorar/diminuir ataques de pânico em humanos (CHARMEY *et al.*, 1987).

#### 1.2.3.2 Modelos animais de TP baseados em comportamentos defensivos incondicionados/inatos

##### 1.2.3.2.1 Inibição do HDM

A inibição da atividade GABAérgica no HDM induzida por infusão crônica de antagonistas do receptor GABA, como bicuculina ou picrotoxina, tem mostrado resultados em reações comportamentais e fisiológicas (p. ex., aumento das freqüências cardíaca e respiratória) em ratos, que lembram o ataque de pânico humano (SHEKHAR; DIMICCO, 1987; SHEKHAR, 1993; SHEKHAR, 1994). Em relação à validação farmacológica do modelo, o tratamento crônico com imipramina e com clonazepam bloqueou totalmente o efeito da infusão de bicuculina (SHEKHAR, 1994). Esse teste também permite uma avaliação bidirecional, já que o lactato de sódio, a ioimbina e a d-fenfluramina potencializaram as ações comportamentais e fisiológicas induzidas pela infusão de bicuculina no HDM (KEIM; SHEKHAR, 1999). Mas, resultados de um outro estudo mostram que o bloqueio e a estimulação dos receptores GABAérgicos no HDM também produzem, respectivamente, efeitos ansiogênicos e ansiolíticos no LCE, um modelo animal de ansiedade que não discrimina diferentes tipos de ansiedade (RODGERS, 1997), o

que coloca em dúvida a seletividade do modelo de inibição do HDM em detectar somente drogas panicogênicas e panicolíticas.

1.2.3.2.2 Exposição de camundongos ao grito de pássaros

Hendrie e Neill (1991) propuseram um procedimento no qual camundongos são expostos aos gritos de certas espécies de pássaros (conhecidamente predadores de roedores) e manifestam comportamentos de defesa/fuga amplamente orientados e identificados como tipo-pânico. Eles mostraram que o tratamento crônico com imipramina e alprazolam reduz significantemente essas respostas, sugerindo efeito antipânico. A validade preditiva do modelo é limitada, entretanto, considerando que altas doses de clordiazepóxido e diazepam e tratamento agudo com imipramina não alteraram os comportamentos (GRIEBEL *et al.*, 1996c).

1.2.3.2.3 Labirinto em T Elevado

O LTE, proposto por Graeff e colaboradores (GRAEFF *et al.*, 1993; VIANA *e al*, 1994; ZANGROSSI; GRAEFF, 1997) é um modelo derivado do LCE. Neste sentido, ele guarda muitas vantagens do modelo original (simplicidade, rapidez e facilidade de execução), acrescido da possibilidade de avaliação de dois tipos de ansiedade (aprendida e inata) em um mesmo animal. Utiliza-se um LCE com a entrada de um dos braços fechados obstruída, transformando-o, portanto, em um LTE com dois braços abertos (BAs) e um braço fechado. Dois tipos de medo/ansiedade são avaliados: um aprendido e outro inato. A ansiedade aprendida é avaliada por um procedimento similar à esquiva inibitória, em que o parâmetro é a latência para o animal deixar o braço fechado em 3 tentativas sucessivas. Este comportamento estaria relacionado ao TAG, sendo sensível ao diazepam e ipsapirona (GRAEFF *et al.*, 1993; VIANA *et al.*, 1994). A ansiedade inata é avaliada pela fuga de um dos braços abertos e, possivelmente, estaria relacionada com o TP. O tempo de fuga aumenta em resposta à d-fenfluramina (GRAEFF *et al.*, 1996), uma droga com possível efeito antipânico (SOLYOM, 1994; HETEM, 1996), mas não ao diazepam ou a ipsapirona (GRAEFF *et al.*, 1993; VIANA *et al.*, 1994).

Recentemente, Teixeira e colaboradores (2000) demonstraram que a exposição por 30 minutos a um dos BAs 24 horas antes do teste não altera a esquiva inibitória, mas diminui a latência para a fuga. Eles também constataram que o tratamento crônico com imipramina, uma droga antipânico eficaz, aumenta o tempo de fuga, reforçando a hipótese de que esse comportamento está relacionado ao TP.

Entretanto, a clomipramina, outra droga eficaz no TP, não alterou o comportamento de fuga dos animais no LTE (GRAEFF *et al.*, 1998), sugerindo que estudos adicionais são necessários para confirmar essa hipótese.

1.2.3.2.4 Bateria de Testes de Defesa em Camundongos

A BTDC (GRIEBEL *et al.*, 1995b; BLANCHARD *et al.*, 1997) foi desenvolvida a partir da avaliação etológica do comportamento dos animais em resposta a um predador. Neste modelo, camundongos são expostos a um predador (rato anestesiado ou morto) em uma pista oval. Após uma avaliação inicial sem o predador (pré-teste), os camundongos são expostos ao rato em 3 situações distintas: fuga à aproximação do rato (feita manualmente pelo experimentador), avaliação de risco ao predador e comportamento de defesa/ataque ao contato com o predador. Finalmente, é feita uma nova avaliação do comportamento do camundongo no aparato sem a presença do rato (defesa contextual). Camundongos submetidos a BTDC apresentam um padrão de resposta comportamental semelhante quando tratados com drogas antipânico como o alprazolam (GRIEBEL *et al.*, 1995c), a imipramina (GRIEBEL *et al.*, 1995a), a fluoxetina (GRIEBEL *et al.*, 1995a), a fenelzina (GRIEBEL *et al.,* 1998a) e a moclobemida (GRIEBEL *et al.*, 1997). Esta resposta é caracterizada por uma diminuição dos comportamentos de fuga. Nestes estudos observou-se que, semelhante ao observado na clínica, apenas o tratamento crônico com drogas antipânico é capaz de reduzir o comportamento de fuga na BTDC. Já as drogas ansiolíticas, como os BDZs de um modo geral e as azaspironas, alteram o componente de avaliação de risco, mas não interferem nos comportamentos de fuga (GRIEBEL *et al.*, 1995b; GRIEBEL *et al.*, 1995d). Mais ainda, de modo análogo à piora inicial observada no início do tratamento de pacientes com TP, o tratamento agudo com imipramina e fluoxetina acarretou um

aumento dos comportamentos de fuga (GRIEBEL *et al.*, 1995a). Nesta linha, a ioimbina e o flumazemil (GRIEBEL *et al.*, 1995b), drogas que provocam ataques de pânico em pacientes suscetíveis, também induzem um aumento dos comportamentos de fuga. Estudo empregando análise fatorial nos componentes da BTDC (GRIEBEL *et al.*, 1996b) reforça a sugestão dos estudos farmacológicos de que haveria dois tipos de ansiedade no modelo: uma relacionada com o TAG (avaliação de risco) e outra com o TP (comportamentos de fuga). Como um todo, estes dados sugerem que os comportamentos de fuga da BTDC são um modelo válido para avaliação de drogas antipânico (BLANCHARD *et al*, 1997).

A tabela 1 (próxima página) resume os efeitos de várias drogas em modelos animais de pânico discutidos anteriormente.

De maneira geral, o modelo que melhor atende os critérios de validade preditiva (correlação entre os resultados pré-clínicos e clínicos) e de face (analogia ou similaridade fenomenológica entre o modelo e o transtorno) é a BTDC. Esse modelo experimental proporciona, ainda, informações específicas e detalhadas do efeito de drogas sobre os comportamentos defensivos, permitindo avaliar 2 tipos de ansiedade em um mesmo animal; também possibilita a observação de efeitos bilaterais e; implica em menor tempo e esforço para realização quando comparado com modelos de conflito que exigem condicionamento prévio.

O LTE apresenta um protocolo de fácil execução e também permite avaliar 2 tipos de ansiedade em um mesmo animal, embora ainda sejam necessários mais estudos com o objetivo de confirmar a relação entre o comportamento de fuga dos BAs e o TP.

Portanto, diante deste quadro, pode-se considerar que atualmente é possível estudar o potencial clínico de medicamentos para o TP em modelos animais. Considerando-se, ainda, as condições laboratoriais para execução dos protocolos, optou-se por empregar o LTE e a BTDC na avaliação dos efeitos do extrato de *H. perforatum*.

Tabela 1 - Efeitos de uma variedade de drogas psicoativas em modelos animais de pânico

| | Modelos de Pânico baseados na fuga | | | | Modelos de Pânico baseados no aprendizado | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | BTDC | Estimulação SCPd | LTE | Inibição HDM | VUC | SBC |
| **Tratamentos antipânico clinicamente eficazes** | | | | | | |
| Alprazolam | + | + | | | + | + |
| Clobazam | + | | | | | |
| Clonazepam | + | + | + | + | | |
| Clorazepato | + | + | | + | | |
| Diazepam | + | | 0 | | 0/+ | |
| Desipramina (c) | | | | | | + |
| Fluoxetina (c) | + | + | + | | | |
| Imipramina (c) | + | | + | + | | + |
| Moclobemida (c) | + | | | | | + |
| Fenelzina (c) | + | | | | | + |
| **Drogas que induzem pânico** | | | | | | |
| Cafeína | | -- | 0 | | | |
| $CCK_4$ | 0 | | | | -- | |
| Cocaína | -- | | | | | |
| *d*-fenfluramina | | | + | -- | + | |
| Flumazenil | -- | | | | 0 | |
| Flesinoxam | | -- | | | + | |
| Clomipramina (a) | | | 0 | | + | |
| Fluoxetina (a) | -- | + | | | + | |
| Fluvoxamina (a) | | + | | | + | |
| Imipramina (a) | -- | 0 | + | | + | 0 |
| MCPP | | + | + | | + | |
| Ioimbina | -- | -- | 0 | -- | --/+ | |
| **Tratamentos antipânico clinicamente ineficazes** | | | | | | |
| Amitriptilina | | | | | | + |
| Desipramina (a) | | | | | 0 | 0 |
| Maprotilina | | | | | 0 | |
| Moclobemida (a) | 0 | | 0 | | | |
| Paroxetina (a) | | | | | + | |
| Fenelzina (a) | 0 | | | | | 0 |
| Buspirona | 0 | | 0 | | + | |
| Ipsapirona | | | 0 | | + | |
| Mianserina | 0 | | | | | 0 |
| Ritanserina | | | 0 | | + | |
| CI-988 | | 0 | | | | 0 |
| L-365,260 | + | | | | 0 | 0 |
| Clordiazepóxido | 0 | | | | 0 | 0 |
| Citalopram | | | | | + | |
| Ondansetron | | | | | 0 | |
| Haloperidol | | + | 0 | | + | |

FONTE: BLANCHARD *et al.*, 2001.

Notas: +, efeito tipo-ansiolítico; 0, inativo; --, efeito tipo-ansiogênico; (a), agudo; (c), crônico; BTDC, Bateria de Testes de Defesa em Camundongos; SCPd, Substância Cinzenta Periaquedutal dorsal; HDM, Hipotálamo Dorsomedial; LTE, Labirinto em T Elevado; VUC, Vocalizações Ultrassônicas Condicionadas; SBC, Supressão de Beber Condicionado

## 1.3 DEFINIÇÃO DO PROBLEMA

O *H. perforatum,* utilizado na medicina popular no tratamento de quadros depressivos, tem apresentado efeito antidepressivo tanto em pesquisas pré-clínicas com modelos animais de depressão (p.ex. redução do TI no teste de natação forçada e reversão do desamparo aprendido e da anedonia induzida por estresse, de modo análogo às drogas antidepressivas) como em estudos clínicos controlados com pacientes deprimidos. Sugere-se que o *H. perforatum* seja eficaz em 60 a 70 % dos pacientes com depressão leve a moderada, com a vantagem de apresentar baixa incidência de efeitos colaterais e ausência de relatos em intoxicações ou interações medicamentosas.

A principal abordagem farmacológica do TP tem sido o uso de antidepressivos, seguidos pelos BDZs. Entretanto, um dos problemas que mais aflige os pacientes que precisam fazer tratamento com essas drogas são seus importantes efeitos colaterais.

Durante muito tempo, os modelos animais de ansiedade não fizeram distinção entre os diferentes transtornos de ansiedade. Atualmente, vários autores têm desenvolvido modelos animais que se propõem a diferenciar comportamentos defensivos relacionados ao TAG e outros possivelmente relacionados ao TP, possibilitando avaliar o potencial efeito de drogas ansiolíticas e panicolíticas em estudos pré-clínicos. Exemplos desses modelos são o LTE, que avalia a ansiedade aprendida e inata, e a BTDC, que consiste na avaliação etológica dos comportamentos de defesa de camundongos frente ao predador natural (rato).

Portanto, tendo em vista o efeito antidepressivo do *H. perforatum*, existe a possibilidade do mesmo apresentar alguma atividade antipânico. Para confirmar ou não essa hipótese, os efeitos dos tratamentos agudo, subcrônico e crônico com extrato de *H. perforatum* foram estudados em animais submetidos ao LTE e a BTDC, 2 modelos animais de TP.

# 2 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do presente estudo foi avaliar o potencial efeito do extrato de *H. perforatum* em modelos animais de TP.

## 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar as doses de *H. perforatum* a serem utilizadas nos demais experimentos empregando o Teste de Natação Forçada (PORSOLT *et al.*, 1977; BORSINI; MELI, 1988) em ratos e camundongos.
- Avaliar o efeito da administração subaguda, subcrônica e crônica de extrato de *H. perforatum* nas tarefas de esquiva inibitória e de fuga no LTE.
- Avaliar o efeito desses tratamentos na atividade locomotora de animais submetidos ao campo aberto imediatamente após o teste no LTE.
- Validar farmacologicamente, em nosso laboratório, a BTDC empregando o clonazepam.
- Avaliar o efeito dos tratamentos agudo, subcrônico e crônico com *H. perforatum* no comportamento de camundongos submetidos à BTDC.

A imipramina foi utilizada como controle ativo no teste de natação forçada e a paroxetina foi empregada para comparação do perfil de efeitos comportamentais nos demais modelos utilizados, uma vez que é uma drogas antipânico eficaz na clínica (JANICAK *et al.*, 1997).

# 3 EXPERIMENTO 1 – EFEITO DO EXTRATO DE *H. perforatum* NO TESTE DE NATAÇÃO FORÇADA

## 3.1 OBJETIVO

O objetivo desse experimento foi determinar as doses de extrato de *H. perforatum* a serem empregadas nos demais modelos, empregando o teste de natação forçada, pois ele apresenta uma boa correlação entre as doses efetivas no mesmo e a potência clínica (potência relativa) dos antidepressivos (WILLNER, 1984).

## 3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.2.1 Animais

Os animais utilizados foram fornecidos pelo Biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, mantidos sob condições controladas de temperatura (22 ± 1°C), ciclo claro-escuro de 12 h (luzes ligadas às 7:00 e desligadas às 19:00h), com água e ração à vontade.

- Ratos Wistar machos de 90 dias de idade, pesando entre 250-300 g, acondicionados 5 por caixa;
- Camundongos Swiss machos de 90 dias de idade, pesando entre 25-30 g, acondicionados 5 por caixa.

### 3.2.2 Drogas

As drogas foram administradas por via oral (v.o.), em volume constante (ratos: 2,0 ml/Kg de peso; camundongos: 10,0 ml/ kg de peso).

- Imipramina (Sigma, St Louis, USA) 30 mg/kg. Foi preparada uma solução de cloridrato de imipramina em água deionizada, posteriormente levada ao ultra-som por 5 minutos;
- *H. perforatum* extrato padronizado (LI-160, Eurofarma, São Paulo, Brasil) 150,0; 300,0 e 500,0 mg/Kg. O extrato seco de *H. perforatum* padronizado, contendo 0,33 % de hipericinas e 3 % de hiperforina (quantificado usando Cromatografia Líquida de Alta Performance – HPLC e detecção por

fluorescência pelo Laboratório Indena – 06/2000), foi suspenso em água deionizada e propilenoglicol (propilenoglicol a 10%), posteriormente levado ao ultra-som por 15 minutos;

- Controle: o grupo controle recebeu o veículo da suspensão de *H. perforatum*, isto é, propilenoglicol a 10 %.

### 3.2.3 Procedimentos Experimentais

#### 3.2.3.1 Teste de Natação Forçada em Ratos

Foi empregado o procedimento descrito por Porsolt *et al.* (1977) e Borsini e Meli (1988), adaptado para nosso laboratório (BEIJAMINI *et al.*, 1998), constituído por duas sessões de natação separadas por um período de 24 horas. Na primeira sessão, denominada treino, os animais foram colocados em um aquário de vidro (20x20x50 cm) com água (15 cm de altura, 24 ± 1 °C) por 15 minutos (Fig. 3). Na segunda sessão, chamada teste, os animais foram submetidos ao mesmo procedimento por 5 min, sendo registrado o tempo de imobilidade (TI) em segundos. O TI correspondeu ao período no qual os animais adquiriram uma postura de imobilidade, realizando movimentos mínimos para manter a cabeça fora da água. Os animais foram tratados imediatamente após o treino, 6 horas depois e 1 hora antes do teste. Os tratamentos antidepressivos reduzem o TI na 2ª sessão (BORSINI; MELI, 1988).

**Fig. 3** – Teste de Natação Forçada em ratos.

3.2.3.2 Teste de Natação Forçada em Camundongos

Foi empregado o procedimento descrito por Porsolt et al. (1977) e Borsini e Meli (1988), adaptado para nosso laboratório (ANDREATINI; BACELLAR, 1999). Resumidamente, camundongos foram submetidos a uma única sessão com duração de 6 minutos na qual foram "forçados" a nadar em um cilindro de vidro (16 cm de diâmetro x 20 cm de altura) com água (24 ± 1 °C) a 8 cm de altura. Os 2 primeiros minutos da sessão serviram como um "aprendizado" para que o animal adquirisse a postura de imobilidade, sendo registrado o TI nos últimos 4 minutos. Os animais foram julgados imóveis quando pararam de nadar e permaneceram flutuando com movimentos mínimos, suficientes para manter a cabeça pouco acima do nível da água. Foi realizada uma única administração das drogas 1 h antes do teste. Os tratamentos antidepressivos reduzem o TI no teste (BORSINI; MELI, 1988).

Em ambos os testes, a água foi trocada a cada animal testado para evitar que alguma substância liberada pelo animal precedente alterasse o comportamento do animal testado a seguir (ABEL; BILITZKE, 1990).

### 3.2.4 Análise Estatística

Os resultados foram analisados através de uma análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo Teste de Newman-Keuls para comparações múltiplas quando apropriado. O nível de significância considerado foi $p<0,05$. Os dados estão sendo representados como média ± erro padrão da média (EPM). O programa STATISTICA 5.0 (Statsoft, 1993) foi empregado para efetuar as análises.

## 3.3 RESULTADOS

### 3.3.1 Teste de Natação Forçada em ratos

A ANOVA de uma via mostrou que houve diferença estatística para o TI entre os grupos ($F(50,4)=8,53$; $p<0,001$). Posteriormente, foi empregado o teste de Newman Keuls para múltiplas comparações, que evidenciou que o tratamento com as 3 doses de extrato e com a dose de imipramina (controle positivo) reduziu significantemente o TI dos animais, quando comparado com o TI do grupo controle ($p\leq0,05$), ou seja, o extrato de *H. perforatum* apresentou efeito antidepressivo nesse modelo (Fig. 4). Ainda, o TI dos animais tratados com extrato 150 e 300 mg/Kg diferiu do TI dos animais que receberam imipramina.

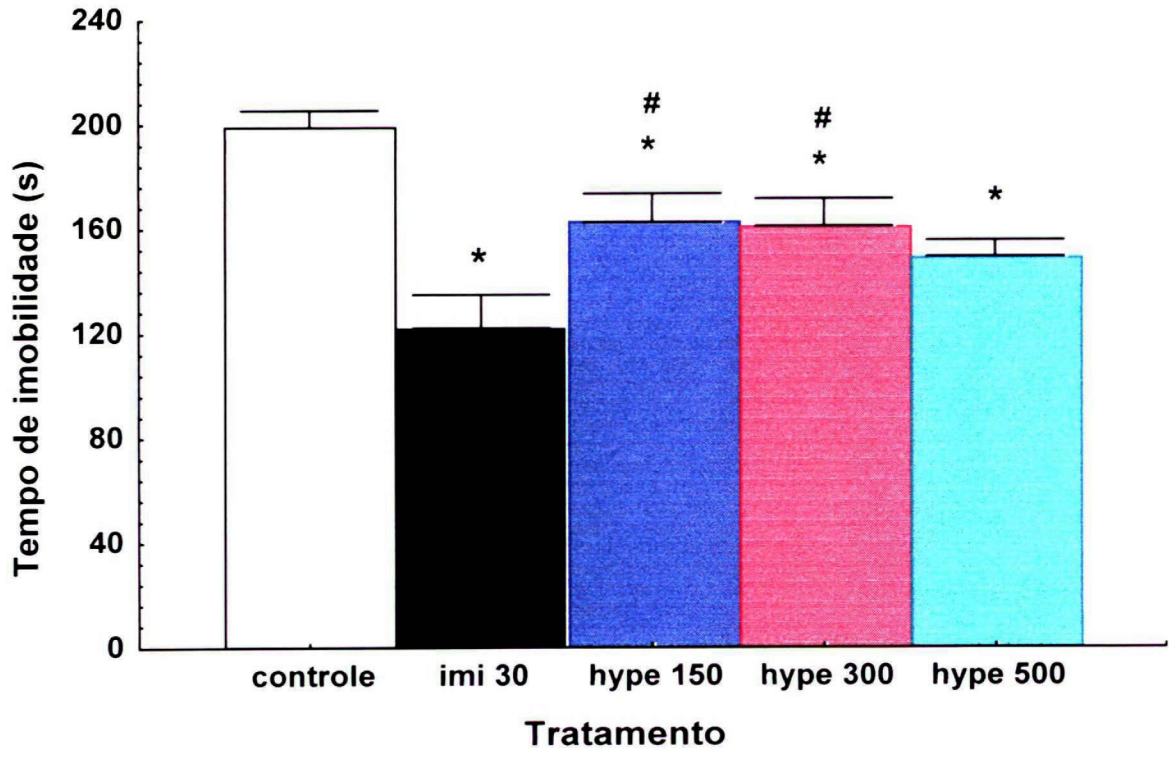



**Fig. 4 -** Efeito do tratamento agudo (3 adm., 24, 18 e 1 h antes do teste), v.o., com veículo (controle, *n* =14), com extrato de *H. perforatum* 150 mg/Kg (hype 150, *n*=11), 300 mg/Kg (hype 300, *n*=12) e 500 mg/Kg (hype 500, *n* =9) e com imipramina 30 mg/Kg (imi 30, *n*=9) no TI (s) de **ratos** submetidos ao Teste de Natação Forçada. Dados representam média ± EPM. * $p< 0,05$ quando comparado com grupo controle (veículo); # $p\leq0,05$ quando comparado com imi 30.

### 3.3.2 Teste de Natação Forçada em camundongos

A ANOVA de uma via mostrou diferença estatisticamente significante entre os grupos ($F(59,4)=10,24$; $p<0,001$). A análise *a posteriori*, utilizando o teste de Newman-Keuls para múltiplas comparações, evidenciou que os tratamentos com extrato (150, 300 e 500 mg/Kg) e imipramina reduziram significantemente o TI dos animais ($p<0,05$), quando comparado com o grupo controle. Entretanto, não houve diferença estatística entre os grupos tratados (Fig. 5).

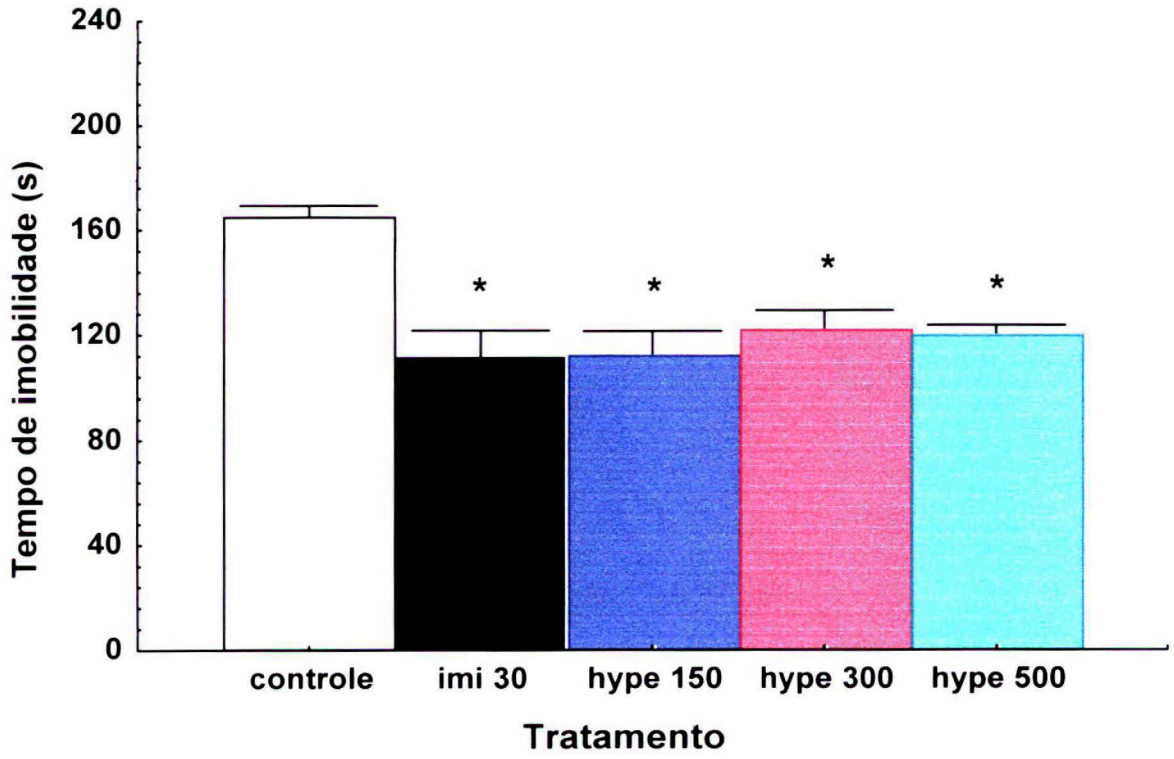



**Fig. 5** - Efeito do tratamento agudo (1 adm. 1 h antes do teste), v.o., com veículo (controle, *n* =15), com de extrato de *H. perforatum* 150 mg/Kg (hype 150, *n*=10), 300 mg/Kg (hype 300, *n* =14) e 500 mg/Kg (hype 500, *n* =15) e com imipramina 30 mg/Kg (imi 30, *n*=10) no TI (s) de **camundongos** submetidos ao Teste de Natação Forçada. Dados representam média ± EPM. * $p< 0,05$ quando comparado com grupo controle.

## 3.4 DISCUSSÃO

Em ratos, as administrações do extrato de *H. perforatum,* nas doses de 150, 300 e 500 mg/Kg, entre o treino e o teste, foram capazes de reduzir significantemente o TI no teste de natação forçada, sugerindo um efeito tipo-antidepressivo. Imipramina 30 mg/Kg, empregada como controle positivo, também reduziu significantemente o TI, apresentando, entretanto, um efeito de maior magnitude do que o *H. perforatum* nas doses utilizadas.

Em camundongos, o *H. perforatum* reduziu o TI no teste de natação forçada quando comparado com o grupo controle. Imipramina foi novamente empregada como controle positivo, exibindo o efeito esperado, que não diferiu daquele induzido pelo *H. perforatum.*

Tanto em ratos quanto em camundongos, a redução do TI induzida pelo *H. perforatum* não se apresentou como uma curva dose-dependente. Assim, as doses de extrato escolhidas para serem empregadas nos estudos posteriores foram as de 150 e 300 mg/Kg.

Os resultados corroboram com aqueles observados por Butterweck e colaboradores (1997), que avaliaram o efeito do extrato total de *H. perforatum* no teste de natação forçada em camundongos seguindo protocolo semelhante ao empregado no presente estudo, ou seja, 3 administrações por v.o. entre o treino e o teste. Eles obtiveram uma curva em U invertido, na qual doses acima de 1500 ou abaixo de 60 mg/Kg não apresentaram efeito.

Em um estudo posterior, que buscou detectar o constituinte ativo do extrato, foi avaliado o efeito de 2 diferentes frações do extrato, etanólica e por extração supercrítica por $CO_2$ (rica em hiperforina) em vários modelos animais, incluindo o teste de natação forçada em ratos (CHATTERJEE *et al*, 1998b). Observou-se que as frações não reduziram significantemente o TI dos ratos após administração aguda por v.o.. Entretanto, após administração repetida por 3 dias, as 2 frações do extrato induziram efeito tipo-antidepressivo.

A mesma avaliação foi realizada em camundongos (BHATTACHARYA *et al.* 1998). Novamente, o efeito antidepressivo da fração etanólica e da fração por extração supercrítica por $CO_2$ foi observado no teste de natação forçada após administração (v.o.) por 3 dias consecutivos. Por outro lado, os resultados obtidos

no presente estudo apontam que uma única administração do extrato total é suficiente para reduzir o TI em camundongos submetidos ao teste de natação forçada.

# 4 EXPERIMENTO 2 – EFEITOS COMPORTAMENTAIS DA PRÉ-EXPOSIÇÃO A UM DOS BRAÇOS ABERTOS DO LABIRINTO EM T ELEVADO 24 h ANTES DO TESTE

## 4.1 OBJETIVO

O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos comportamentais induzidos pela pré-exposição a um dos BAs do LTE, durante 30 minutos, 24 h antes do teste em animais provenientes do nosso Biotério, uma vez que Teixeira e colaboradores (2000) observaram que essa modificação reduziu o comportamento exploratório dos animais e, conseqüentemente, a latência de fuga dos BAs.

## 4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.2.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos, como descrito no item 3.2.1 do experimento 1.

### 4.2.2 Grupos Experimentais

- Animais sem pré-exposição, ou seja, ingênuos;
- Animais com pré-exposição (confinados) a um dos BAs do LTE durante 30 minutos, 24 horas antes do teste

### 4.2.3 Procedimento Experimental

4.2.3.1 Labirinto em T Elevado

Este modelo, derivado do LCE, foi desenvolvido por Graeff e colaboradores (GRAEFF *et al.*, 1993; VIANA *et al.*, 1994; ZANGROSSI; GRAEFF, 1997) para avaliar em um mesmo procedimento, dois tipos de ansiedade: medo condicionado/aprendido, relacionado ao TAG e medo incondicionado/inato, possivelmente relacionado ao TP. Utilizou-se um LCE (PELLOW *et al.*, 1985) com

um dos braços fechados bloqueado. Deste modo, o LTE era constituído de 3 braços de iguais dimensões (50x10 cm), sendo um deles cercado por uma parede de 40 cm de altura (braço fechado - BF), perpendicular aos outros 2 cercados apenas por uma aresta de 0,5 cm (BAs). O aparelho foi elevado 50 cm do solo (Fig. 6). Inicialmente, os animais foram pré-expostos ou não a um dos BAs do LTE por 30 minutos e, 24 horas depois, testados de acordo com o procedimento descrito a seguir.

*Esquiva inibitória:* os animais foram colocados no BF e 2 diferentes medidas foram realizadas em 3 tentativas sucessivas, com intervalos de 30 s: latência tradicional (medida de acordo com GRAEFF *et al.*, 1993) - tempo para os animais deixarem o BF e; latência modificada - tempo para entrarem em um dos BAs. A primeira tentativa foi denominada Basal e serviu como um aprendizado da Esquiva Inibitória, no qual o animal conheceu o aparelho e, conseqüentemente, os BAs, que são aversivos pela ausência de paredes laterais (TREIT *et al.*, 1993). As 2 outras tentativas foram chamadas Esquiva Inibitória 1 e 2, respectivamente.

*Fuga:* trinta segundos após a Esquiva Inibitória 2, os animais foram colocados na extremidade de um dos BAs e 2 diferentes medidas foram realizadas em duas tentativas sucessivas, com intervalos de 30 s: latência tradicional (medida de acordo com GRAEFF *et al.*, 1993) - tempo para os animais deixarem os BAs (Fuga 1A e 2A) e; latência modificada - tempo para entrarem no BF (Fuga 1B e 2B). Foi estipulado um tempo de permanência máxima no labirinto em cada tentativa, tanto na esquiva inibitória quanto na fuga, que correspondeu a 300 s.

Durante os intervalos dos procedimentos de esquiva inibitória e fuga, o animal que estava sendo testado era mantido em uma caixa individual, semelhante àquela na qual permanecia antes do experimento. A limpeza do LTE foi realizada após cada animal testado empregando papel toalha e álcool a 10%. Foram considerados somente os animais que deixaram o BF na primeira tentativa (Esquiva Basal), cuja latência máxima foi 300 s.

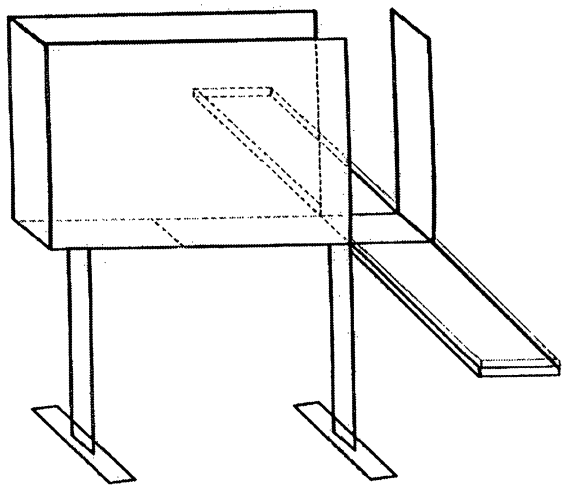


**Fig. 6** – Representação Esquemática do LTE, adaptada de ZANGROSSI e GRAEFF (1997).

### 4.2.4 Análise Estatística

Para avaliar o comportamento nas diferentes esquivas (medidas repetidas) do LTE para o mesmo grupo foi empregada uma ANOVA de Friedman seguida de teste de Wilcoxon quando apropriado. Para realizar comparações entre os grupos em uma determinada esquiva do LTE, foi utilizado o teste U de Mann-Whitney. O comportamento de fuga do LTE foi analisado através do teste U de Mann-Whitney. Os dados estão sendo representados como mediana ± semi-interquartil range (SIR). O nível de significância considerado foi $p<0,05$. O programa STATISTICA 5.0 (Statsoft, 1993) foi empregado para efetuar as análises.

## 4.3 RESULTADOS

Os dados do método modificado para medir a latência na esquiva inibitória não foram descritos e representados, uma vez que em experimentos prévios, o tratamento com diazepam e clonazepam não prejudicou a esquiva inibitória avaliada por esse método (dados não publicados).

Em relação à esquiva inibitória "tradicional", observou-se que não ocorreram diferenças estatisticamente significantes entre animais ingênuos e pré-expostos para as esquivas Basal ($U=39,5$; $p=0,275$), Esquiva 1 ($U=45,0$; $p=0,481$) e Esquiva 2 ($U=38,0$; $p=0,231$). Entretanto, realizando a comparação entre as esquivas (medidas repetidas) para um mesmo grupo, através de uma ANOVA de Friedman, verificou-se os animais não pré-expostos apresentaram aumento da latência para deixar o BF ao

longo das medidas sucessivas ($\chi^2$r=18,0; p<0,001), uma vez que ambientes abertos são naturalmente aversivos para os mesmos. Ainda, o teste de Wilcoxon para múltiplas comparações mostrou que houve diferença estatisticamente significante para este grupo entre Basal e Esquiva 1 (T=8,5; p=0,029), entre Basal e Esquiva 2 (T=0,0; p<0,010) e entre as Esquiva 1 e 2 (T=0,0; p<0,010). Já no grupo pré-exposto, apesar dos animais adquirirem o comportamento de esquiva inibitória ($\chi^2$r=13,027; p<0,010), quando realizada a comparação entre a Basal e a Esquiva 1 (T=9,0; p=0,059), entre a Basal e a Esquiva 2 (T=0,0; p<0,010) e entre a Esquiva 1 e 2 (T=3,0; p=0,062)], observou-se que essa aquisição foi parcial, ou seja, a pré-exposição prejudicou o aumento da latência em parte das tentativas, sugerindo que o confinamento a um dos BAs prejudica o desenvolvimento do comportamento de esquiva inibitória.

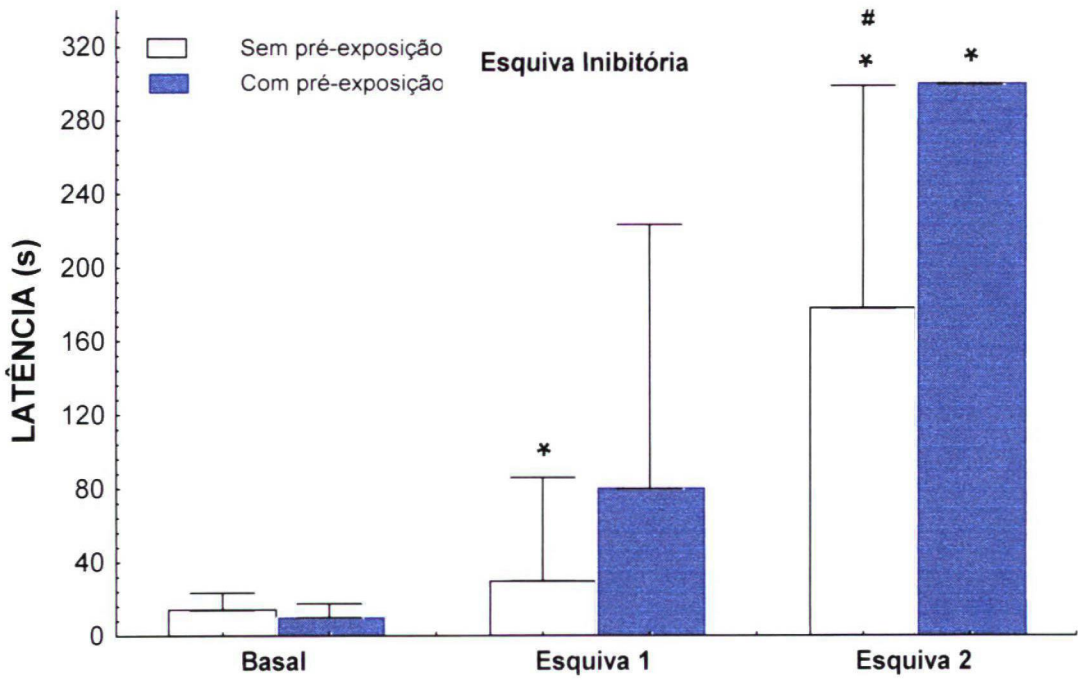



**Fig. 7 -** Latência na Esquiva Inibitória de ratos submetidos ao LTE. Animais ingênuos (grupo sem pré-exposição, *n*=11) e animais pré-expostos a um dos BAs do LTE, durante 30 minutos, 24 horas antes do teste (grupo com pré-exposição, *n*=10). Dados representam mediana ± SIR. * p≤0,05 quando comparado com a basal do mesmo grupo; # p≤0,05 quando comparado com a esquiva 1 do mesmo grupo.

Em relação ao comportamento de fuga (Fig. 8), observou-se que a pré-exposição reduziu a latência para o animal deixar o BA, corroborando com os dados de Teixeira e colaboradores. O teste U de Mann-Whitney evidenciou uma diferença estatisticamente significante entre animais ingênuos e pré-expostos na Fuga 1A (U=24,5; p=0,031) e mostrou um valor próximo do nível de significância na Fuga 1B (U=30,5; p=0,084), o que não ocorreu na Fuga 2A (U=47,5; p=0,597) e 2B (U=52,5; p=0,860).

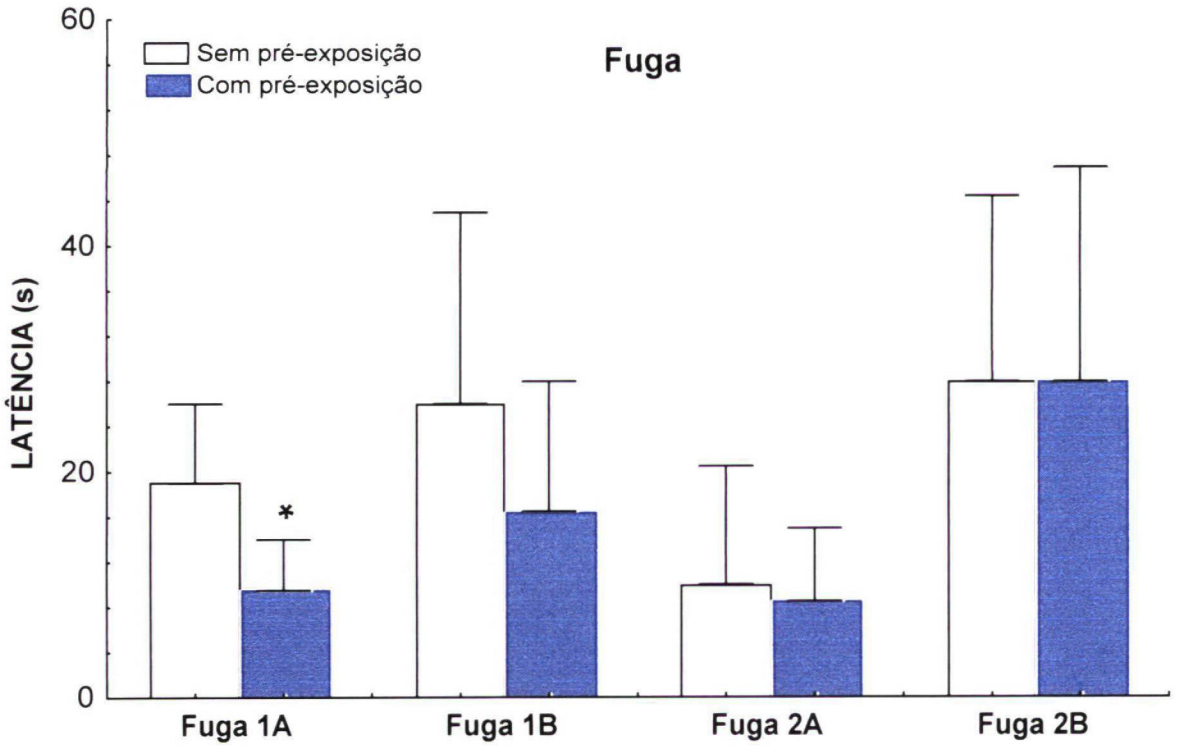



**Fig. 8 -** Latência na fuga de ratos submetidos ao LTE. Animais ingênuos (grupo sem pré-exposição, *n*=11) e animais pré-expostos a um dos BAs do LTE, durante 30 minutos, 24 horas antes do teste (grupo com pré-exposição, *n*=10). (A) latência tradicional - medida de acordo com Graeff e colaboradores (tempo para deixar o braço aberto - BA); (B) latência modificada - medida quando o animal entra no BF. Dados representam mediana $\pm$ SIR. * p<0,05 quando comparado com o grupo sem pré-exposição.

## 4.4 DISCUSSÃO

Zangrossi e Graeff (1997) realizaram alguns estudos objetivando validar comportamentalmente o LTE. Eles observaram que os BAs possivelmente são o principal estímulo aversivo que induz o desenvolvimento da esquiva inibitória e que animais submetidos a 5 tentativas consecutivas de fuga não sofrem habituação, sugerindo que ocorra a persistência do estímulo aversivo. Entretanto, observações anteriores de que a latência de fuga não difere da latência da esquiva basal apontaram a possibilidade de influência da atividade exploratória nesses comportamentos (GRAEFF *et al.*, 1996; VIANA *et al.*, 1994). A partir disso, Teixeira e colaboradores (2000) propuseram uma modificação no protocolo do LTE. Eles confinaram um grupo de animais ao BF e outro a um dos BAs, durante 30 minutos e, 24 horas depois, observaram as conseqüências comportamentais dessas intervenções no LTE. Eles verificaram que somente a pré-exposição a um dos BAs do LTE diminuiu a latência na tarefa de fuga, possivelmente por levar a uma habituação da atividade exploratória, sem haver, contudo, habituação ao estímulo aversivo (BAs). Em relação à esquiva inibitória, embora os dois tipos de confinamento tenham induzido um aumento na latência, esse aumento não foi estatisticamente significante.

Na seqüência, esses pesquisadores avaliaram o efeito da imipramina em ratos pré-expostos e submetidos ao LTE. O tratamento agudo com esse ADT levou a um aumento da latência das esquivas, sugerindo um efeito ansiogênico, e a um aumento da latência de fuga, sugerindo um efeito panicolítico. Após administração repetida por 21 dias, a droga induziu um efeito ansiolítico na tarefa de esquiva e o aumento da latência de fuga persistiu, sugerindo um possível efeito antipânico.

Seguindo essa linha de raciocínio, no presente estudo, a investigação da influência da pré-exposição na realização das tarefas no LTE pelos nossos animais, comparando com animais ingênuos, mostrou que os animais pré-expostos apresentaram um menor tempo de fuga, corroborando com os resultados acima descritos.

Também foi observado que a pré-exposição modificou o comportamento dos animais na tarefa esquiva, impedindo o aumento da latência da Esquiva 2 em

relação a Esquiva 1 e, conseqüentemente, prejudicando o desenvolvimento da esquiva inibitória.

Como a validação farmacológica e comportamental do LTE foi realizada sem expor os animais previamente a um dos BAs, o emprego desse procedimento deve ser feito com cautela. Reavaliar o efeito das principais drogas com o objetivo de observar em que grau essa modificação possa estar alterando o comportamento dos animais e, conseqüentemente, dessas drogas é uma importante medida a ser tomada.

Com relação a isso, nosso grupo realizou algumas investigações, constatando que o efeito ansiolítico do diazepam na tarefa de esquiva inibitória foi influenciado pela pré-exposição. Enquanto a droga prejudicou completamente a aquisição da esquiva inibitória em animais não pré-expostos, esse efeito foi apenas parcial em animais confinados. Uma possível explicação para essa alteração seria a ocorrência de fenômeno semelhante à "one trial tolerance", observada no LCE (BAZZI *et al.*, 2001).

Contrapondo-se a esses resultados, o efeito antipânico do clonazepam (aumento da latência de fuga) foi observado em animais submetidos previamente a um dos BAs e, posteriormente, testados no LTE, sugerindo que essa modificação do protocolo possa facilitar a detecção de um possível efeito panicolítico da droga (BAZZI *et al.*, 2001). Poltronieri e colaboradores (2001) apresentaram resultados que reforçam essa hipótese. Eles mostraram que o tratamento crônico com fluoxetina aumenta a latência de fuga de animais pré-expostos a um dos BAs e testados no LTE, apontando um possível efeito panicolítico.

Esses resultados, como um todo, apóiam a idéia de que a exposição prévia a um dos BAs torna a fuga uma medida mais sensível. Considerando que nosso principal objetivo é avaliar o efeito antipânico do *H. perforatum,* optou-se por realizá-la nos demais estudos, mesmo ocorrendo uma interferência negativa no comportamento de esquiva.

Outra modificação do protocolo foi o método de medir a latência de fuga dos BAs. Inicialmente, foi observado que ao serem colocados na extremidade de um dos BAs, animais tratados com clonazepam (droga com efeito antipânico) muitas vezes passavam pelo centro do labirinto e exploravam o outro BA, ou seja, exploravam

durante um tempo maior esse ambiente, de forma que a latência para o animal chegar ao centro do aparelho não coincidia com a latência para entrar no BF.

Além disso, em um estudo anterior (BEIJAMINI *et al.*, 2000), no qual foi avaliado o efeito do tratamento agudo com valproato de sódio 300 e 400 mg/kg em camundongos submetidos ao LTE, somente a medida modificada (Fuga B) foi capaz de detectar o efeito antipânico da maior dose de valproato, indicando que essa medida seria mais sensível. Esse efeito vai de encontro aos resultados de outros trabalhos pré-clínicos (KECK *et al.*, 1993; DALVI; RODGERS, 1996; BARROS *et al.*, 1992; CORBETT *et al.*, 1991; LAL *et al.*, 1980) e clínicos preliminares (KECK *et al.*, 1993; BACTZ, 1998; WOODMAN; NOYES, 1994) que sugerem que o valproato apresenta propriedades antipânico.

Apesar da necessidade de melhor investigar essa alteração do protocolo, optou-se pelo seu uso nos experimentos seguintes, uma vez que é possível se obter as duas medidas, a tradicional (melhor estudada) e a modificada no mesmo procedimento. Entretanto, deve-se lembrar que a realização da medida modificada pode estar interferindo no comportamento dos animais na segunda tentativa de fuga (Fuga 2A).

# 5 EXPERIMENTO 3 – EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO SUBAGUDA, SUBCRÔNICA E CRÔNICA DE *H. perforatum* EM RATOS SUBMETIDOS AO LABIRINTO EM T ELEVADO E AO CAMPO ABERTO

## 5.1 OBJETIVO

O objetivo deste experimento foi avaliar o efeito da administração subaguda (3 administrações entre a pré-exposição e o teste), subcrônica (7 dias) e crônica (21 dias) de extrato de *H. perforatum* e da paroxetina em ratos pré-expostos a um dos BAs do labirinto (30 min, 24 h antes do teste) e submetidos às tarefas de Esquiva Inibitória e de Fuga no LTE e, imediatamente após, ao Campo Aberto.

## 5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.2.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos, como descrito no item 3.2.1 do experimento 1.

### 5.2.2 Drogas

As drogas foram administradas por v.o., em volume constante de 2 ml/Kg de peso.

- *Hypericum perforatum* extrato padronizado contendo 0,33 % de hipericina e 3,0 % de hiperforina (LI-160, Eurofarma, São Paulo, Brasil) 150,0; 300,0 mg/Kg, preparado como descrito no experimento 1;
- Paroxetina (Eurofarma, São Paulo, Brasil) 5,0-10,0 mg/kg. Foi preparada uma solução de cloridrato de paroxetina em água deionizada, posteriormente levada ao ultra-som por 5 minutos;
- Controle: idem ao item 3.2.2 do experimento 1.

### 5.2.3 Procedimento Experimental

5.2.3.1 Labirinto em T Elevado

Idem ao item 4.2.3.1 do experimento 2, sendo que optou-se pela realização da pré-exposição de todos os animais a um dos BAs do labirinto, durante 30 minutos, 24 horas antes do teste no modelo.

5.2.3.2 Campo Aberto

Este modelo foi empregado para avaliar a atividade locomotora dos ratos tratados com *H. perforatum* ou paroxetina. O Campo Aberto consiste em uma arena de metal circular (1 m de diâmetro) pintada de branco, dividida com linhas pretas em 12 unidades periféricas (20 X 20 cm) e 6 centrais (20 x 20 cm). Sob a arena existem 2 lâmpadas emitindo luz brilhante. Os ratos foram colocados individualmente no centro do Campo Aberto, imediatamente após terem sido testados no LTE, e seu comportamento foi avaliado por 5 minutos. Os parâmetros mensurados foram a locomoção periférica e central (n° de unidades cruzadas), n° de "rearing" (levantar), TI e tempo de "grooming" em segundos e n° de bolos fecais (BERNARDI; PALERMO NETO, 1980). Foi realizada a limpeza do aparelho com papel toalha e álcool a 10 %, após cada animal testado, com o objetivo de evitar que o odor e as secreções de um rato interferissem no comportamento de outro.

### 5.2.4 Tratamento

- Subagudo: nesse experimento, seguiu-se o protocolo de tratamento empregado no teste de natação forçada em ratos, que consistia em 3 administrações entre o treino e o teste. Nesse sentido, os animais receberam 3 administrações, por v.o., entre a pré-exposição a um dos BAs e o teste no LTE, ou seja, aproximadamente 24, 18 e 1 h antes do teste. Os animais foram subdivididos nos seguintes grupos experimentais: controle (recebeu o veículo da suspensão do extrato); extrato de *H. perforatum* 150 e 300 mg/Kg e; paroxetina 5 e 10 mg/Kg;

- Subcrônico: Nesse experimento, os animais foram tratados por v.o. durante 7 dias, uma vez ao dia, sendo realizada a pré-exposição no 6.° dia e a última administração 1 h antes do teste no LTE. Os grupos experimentais foram: controle; extrato de *H. perforatum* 150 e 300 mg/Kg e; paroxetina 5 mg/Kg.
- Crônico: Nesse experimento, os animais foram tratados por v.o. durante 21 dias, uma vez ao dia, sendo realizada a pré-exposição no 20.° dia e a última administração 1 h antes do teste no LTE. Os grupos experimentais foram os mesmos empregados no experimento subcrônico.

### 5.2.5 Análise Estatística

Para avaliar o comportamento de esquiva do LTE foi empregada análise não-paramétrica. Foram realizadas comparações entre as diferentes esquivas (medida repetida) para um determinado grupo de animais utilizando uma ANOVA de Friedmann seguida de teste de Wilcoxon quando apropriado. Para analisar o comportamento de fuga do LTE, e comportamentos do Campo Aberto, tais como o tempo de "grooming", o n° de "rearing" e o n° de bolos fecais foi utilizada ANOVA de Kruskall-Wallis seguida de teste U de Mann-Whitney para comparações múltiplas quando apropriado. A locomoção periférica e central e o TI (medidas do Campo Aberto) foram analisados através de estatística paramétrica: ANOVA de uma via seguida do teste de Newman-Keuls para múltiplas comparações quando apropriado. O nível de significância considerado foi $p<0,05$. Os dados estão sendo representados como média ± EPM ou como mediana ± SIR. O programa STATISTICA 5.0 (Statsoft, 1993) foi empregado para efetuar as análises.

## 5.3 RESULTADOS

Os dados do método modificado para medir a latência na esquiva inibitória não foram descritos e representados, uma vez que em experimentos prévios, o tratamento com diazepam e clonazepam não prejudicou a esquiva inibitória avaliada por esse método.

### 5.3.1 Labirinto em T Elevado

5.3.1.1 Tratamento subagudo

Inicialmente, foi realizada uma ANOVA Kruskal-Wallis para comparar a latência da Basal entre os grupos. Alguns autores (Graeff *et al.*, 1993; Teixeira *et al.*, 2000) tem sugerido que essa latência inicial seria um índice de atividade locomotora dos animais. Foi observado que não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos [H9(58,4)=6,861, p=0,143].

Uma ANOVA de Friedman mostrou que o grupo controle desenvolveu Esquiva Inibitória ($\chi^2$r=18,654; p<0,001). Houve diferença estatisticamente significante entre a Basal e a Esquiva 1 (T=18,5; p=0,033), Basal e Esquiva 2 (T=0,0; p<0,001) e Esquiva 1 e 2 (T=2,0; p<0,01). Um perfil similar foi encontrado para os animais tratados com hype 150 ($\chi^2$r=15,826; p<0,001), hype 300 ($\chi^2$r=14,114; p<0,001), paro 5 ($\chi^2$r=16,051; p<0,001) e paro 10 ($\chi^2$r=18,864; p<0,001), sugerindo que o aprendizado da esquiva inibitória ocorreu. O teste de Wilcoxon mostrou que o hype 150 induziu diferença estatisticamente significante entre a Basal e a Esquiva 1 (T=1,5; p=0,005), Basal e Esquiva 2 (T=1,0; p<0,002) e Esquiva 1 e 2 (T=1,0; p=0,011). A paro 10 também induziu diferença estatisticamente significante entre a Basal e a Esquiva 1 (T=0,0; p=0,005), Basal e Esquiva 2 (T=0,0; p<0,006) e Esquiva 1 e 2 (T=0,0; p=0,018). Contudo, essa análise a *posteriori* revelou que o hype 300 prejudicou a Esquiva 2 (T=1,5; p=0,059; quando comparado com a Esquiva 1), mas não impediu o aumento da latência entre Basal e Esquiva 1 (T=2,0; p<0,01) e entre Basal e Esquiva 2 (T=0,0; p<0,01). Já a paro 5 não impediu o aumento da latência entre a Basal e a Esquiva 2 (T=0,0; p<0,01) e

entre Esquiva 1 e 2 (T=0,0; p<0,01), mas prejudicou a Esquiva 1 (T=10,0; p=0,074; quando comparado com a Basal).

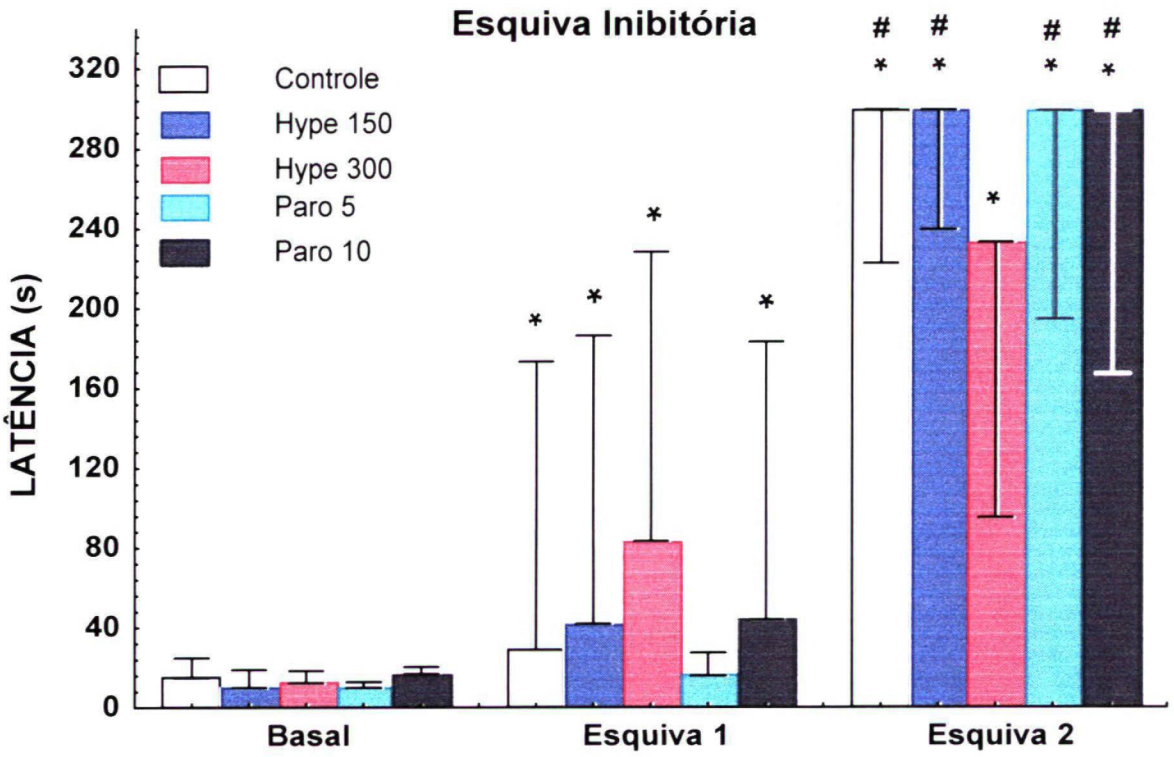



**Fig. 9 -** Latência na Esquiva Inibitória de ratos tratados subagudamente (3 adm. entre pré-exposição e teste) por v.o., e submetidos ao LTE. Animais pré-expostos, tratados com veículo (controle, *n*=15), com extrato de *H. perforatum* 150 mg/Kg (hype 150, *n*=13), 300 mg/Kg (hype 300, *n*=10), com paroxetina 5 mg/Kg (paro 5, *n*=10) e 10 mg/Kg (paro 10, *n*=10). Dados representam mediana ± SIR. * p≤0,05 quando comparado com a basal do mesmo grupo; # p≤0,05 quando comparado com a esquiva 1 do mesmo grupo.

A ANOVA não paramétrica (Kruskal-Wallis ANOVA) revelou que os tratamentos não alteraram a latência da Fuga 1A [H(4,58)=2,675; p=0,613], da Fuga 1B [H(4,58)=3,471; p=0,482], da Fuga 2A [H(4,58)=4,28; p=0,368] e da Fuga 2B [H(4,58)=4,622; p=0,328].

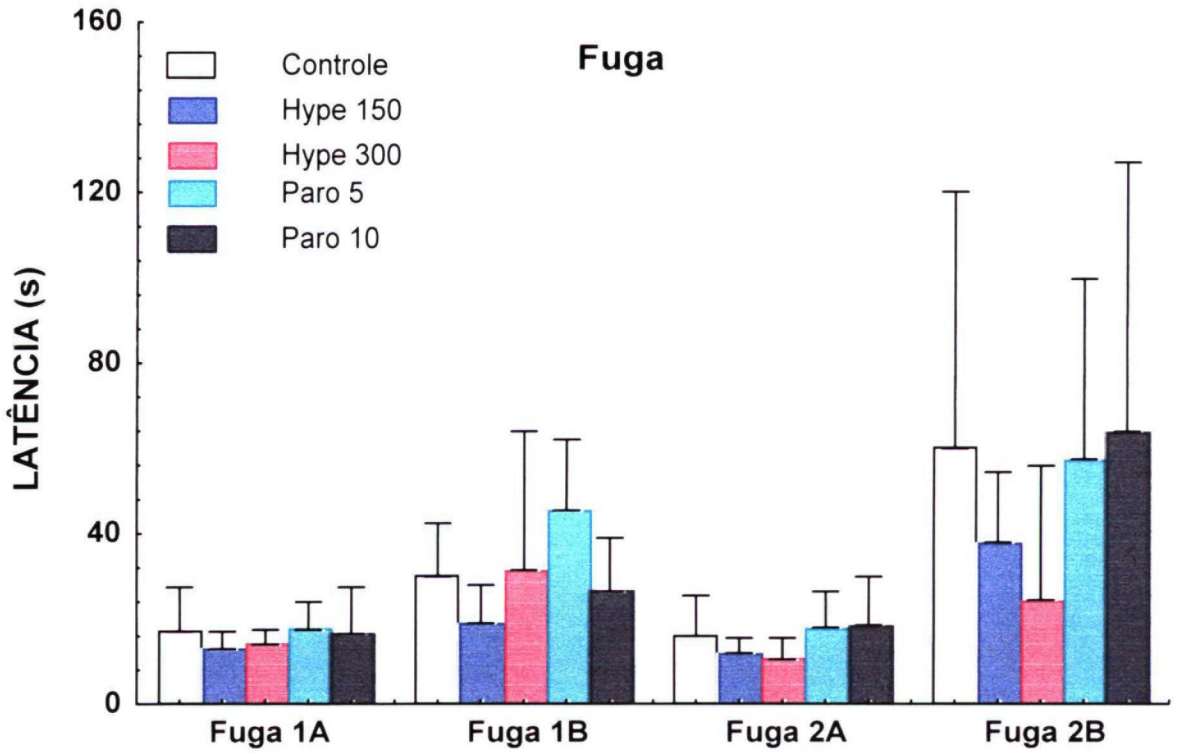



**Fig. 10 -** Latência na Fuga de ratos tratados subagudamente (3 adm. entre pré-exposição e teste) por v.o., e submetidos ao LTE. Animais pré-expostos, tratados com veículo (controle, *n*=15), com extrato de *H. perforatum* 150 mg/Kg (hype 150, *n*=13), 300 mg/Kg (hype 300, *n*=10), com paroxetina 5 mg/Kg (paro 5, *n*=10) e 10 mg/Kg (paro 10, *n*=10). (A) latência tradicional - medida de acordo com Graeff e colaboradores (tempo para deixar o BA); (B) latência modificada - medida quando o animal entra no BF. Dados representam mediana ± SIR.

### 5.3.1.2 Tratamento subcrônico

Nesse experimento, no qual os animais foram tratados durante 7 dias, por v.o., com veículo, com extrato de *H. perforatum* 150 e 300 mg/Kg e com paroxetina 5 mg/Kg, não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos em relação à latência Basal [H(48,3)=2,494; p=0,476].

A ANOVA de Friedman mostrou que houve um aumento da latência ao longo das tentativas de esquiva para o grupo controle ($\chi^2$r=18,558; p<0,001), hype 150 ($\chi^2$r=9,702; p<0,01) e paro 5 ($\chi^2$r=15,826; p<0,001). Uma análise a *posteriori* evidenciou diferenças estatisticamente significantes entre as esquivas, ou seja, esses tratamentos não afetaram a aquisição do comportamento: grupo controle – entre Basal e Esquiva 1 (T=1,0; p=0,003), Basal e Esquiva 2 (T=0,0; p=0,002) e entre as Esquivas 1 e 2 (T=1,0; p=0,027); hype 150 - entre Basal e Esquiva 1

(T=14,0; p=0,049), Basal e Esquiva 2 (T=1,0; p=0,003) e entre as Esquivas 1 e 2 (T=4,0; p=0,016) e; paro 5 - entre Basal e Esquiva 1 (T=6,5; p=0,010), Basal e Esquiva 2 (T=1,0; p=0,003) e entre as Esquivas 1 e 2 (T=0,0; p=0,005).

Por outro lado, a maior dose de extrato (hype 300) prejudicou a Esquiva Inibitória ($\chi^2$r=4,666; p<0,096), sugerindo um efeito ansiolítico.

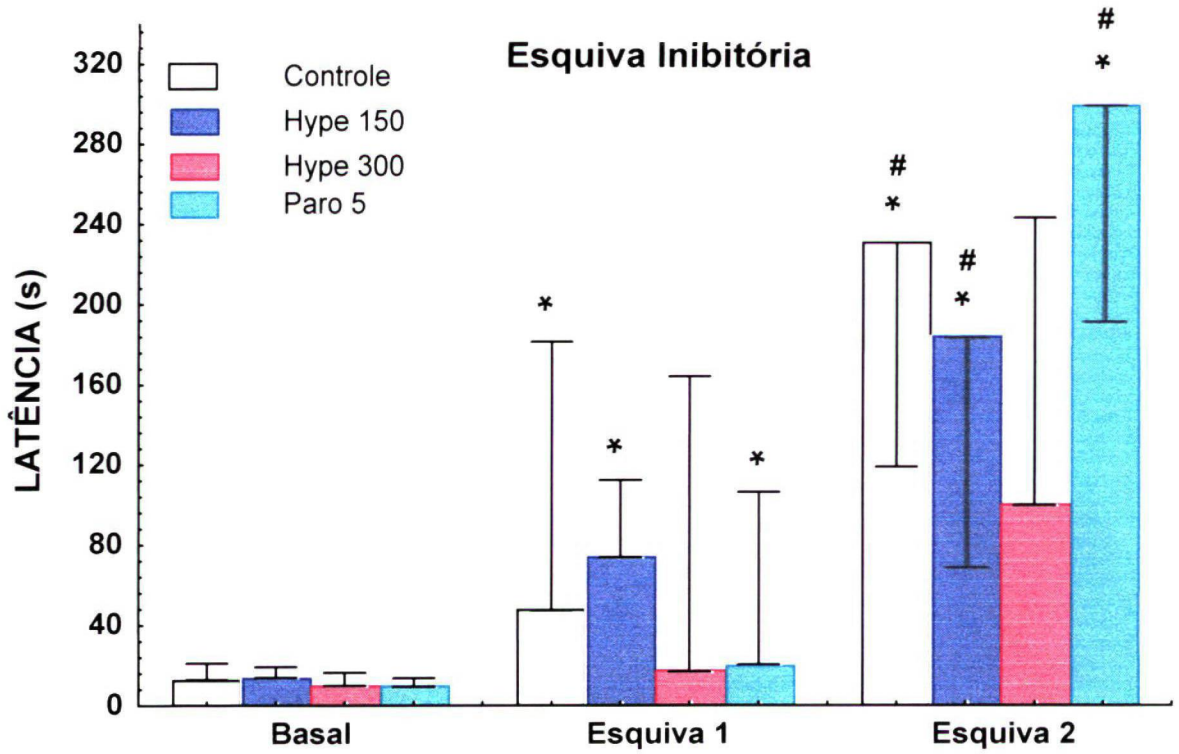



**Fig. 11** - Latência na Esquiva Inibitória de ratos tratados subcronicamente (durante 7 dias), por v.o., e submetidos ao LTE. Animais pré-expostos, tratados com veículo (controle, *n*=12), com extrato de *H. perforatum* 150 mg/Kg (hype 150, *n*=13), 300 mg/Kg (hype 300, *n*=11) e com paroxetina 5 mg/Kg (paro 5, *n*=12). Dados representam mediana ± SIR. * p≤0,05 quando comparado com a Basal do mesmo grupo; # p≤0,05 quando comparado com a Esquiva 1 do mesmo grupo.

Já a latência de fuga foi alterada tanto pela paroxetina (controle ativo), como pela dose de 300 mg/Kg do extrato. Na Fuga 1A, a ANOVA de Kruskal-Wallis revelou que houve diferença entre os grupos (H=9,30; p=0,025). Posteriormente, o teste U de Mann-Whitney mostrou que o tratamento com paroxetina 5 mg/Kg aumentou significantemente a latência da Fuga 1A quando comparado com o grupo controle (U=24,5; p=0,006). Na Fuga 1B, também houve diferença entre os grupos (H=14,58; p=0,002) e a análise *a posteriori* constatou que, tanto os animais tratados com extrato de *H. perforatum* 300 mg/Kg (U=31,5; p=0,011), quanto aqueles tratados com paroxetina 5 mg/Kg (U=13,00; p<0,001) apresentaram latências de

fuga superiores à latência do grupo controle. Na Fuga 2A, não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos (H=4,38; p=0,222). Por último, na Fuga 2B, houve alteração no comportamento dos animais tratados (H=12,35; p=0,006), sendo que a paroxetina 5 mg/Kg aumentou a latência de fuga quando comparado com o grupo controle (U=17,00; p=0,001). Juntos, esses resultados sugerem um efeito panicolítico da paroxetina e, possivelmente, do hype 300.

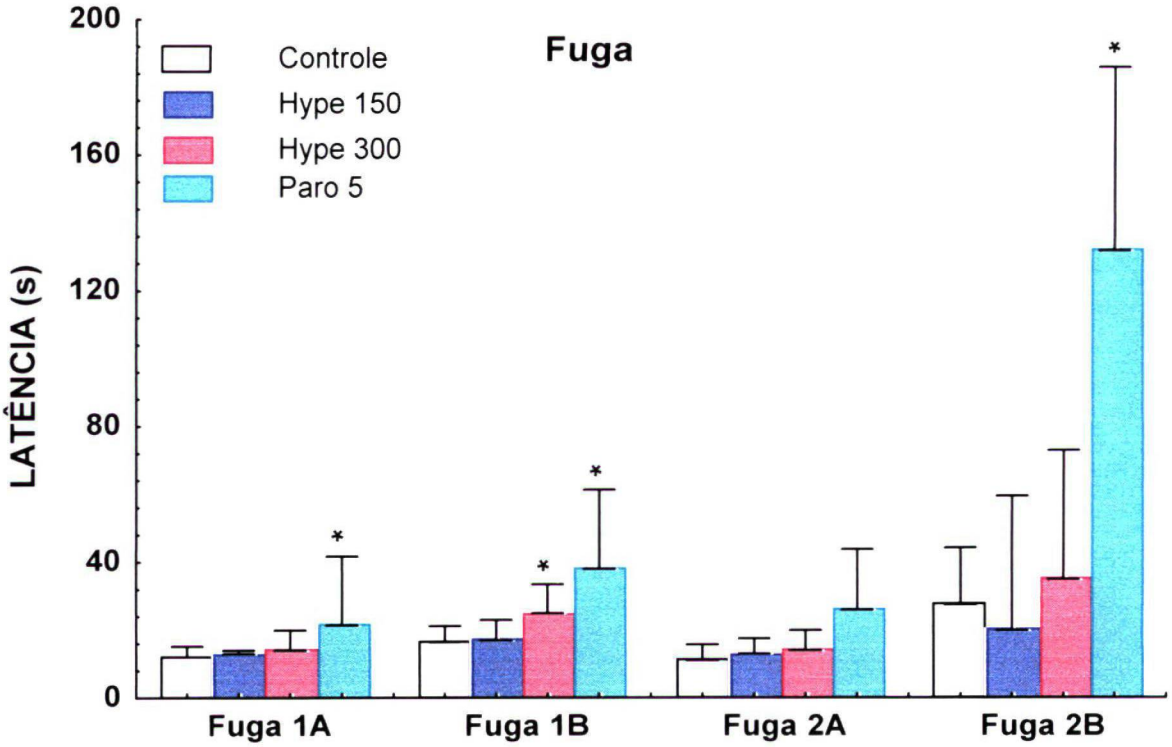



**Fig. 12** - Latência na fuga de ratos tratados subcronicamente (durante 7 dias) por v.o., e submetidos ao LTE. Animais pré-expostos, tratados com veículo (ontrole, *n*=12), com extrato de *H. perforatum* 150 mg/Kg (hype 150, *n*=13), 300 mg/Kg (hype 300, *n*=11) e com paroxetina 5 mg/Kg (paro 5, *n*=12). (A) latência tradicional - medida de acordo com Graeff e colaboradores (tempo para deixar o BA); (B) latência modificada - medida quando o animal entra no BF. Dados representam mediana ± SIR. * p<0,05 quando comparado com o grupo controle.

### 5.3.1.3 Tratamento crônico

Nesse estudo, também não ocorreu diferença estatisticamente significante entre os grupos para a latência Basal [H(46,3)=0,957; p=0,811]. O grupo controle adquiriu Esquiva Inibitória ($\chi^2$r=24,153; p<0,001). Houve diferença estatisticamente significante entre a Basal e a Esquiva 1 (T=0,0; p=0,002), Basal e Esquiva 2 (T=0,0;

p<0,001) e entre as Esquivas 1 e 2 (T=3,0; p=0,004). Os grupos tratados apresentaram comportamento semelhante ao controle: hype 150 ($\chi^2$r=17,589; p<0,001), diferença entre Basal e Esquiva 1 (T=2,0; p=0,015), Basal e Esquiva 2 (T=0,0; p=0,003) e entre Esquivas 1 e 2 (T=0,0; p=0,011); hype 300 ($\chi^2$r=15,260; p<0,001), diferença entre Basal e Esquiva 1 (T=0,0; p=0,003), Basal e Esquiva 2 (T=1,0; p=0,003) e entre as Esquivas 1 e 2 (T=8,0; p=0,026); e paro 5 ($\chi^2$r=14,062; p<0,001), diferença entre Basal e Esquiva 1 (T=3,0; p=0,035), Basal e Esquiva 2 (T=0,0; p=0,007) e entre as Esquivas 1 e 2 (T=0,0; p=0,027). Dessa maneira, o possível efeito ansiolítico do hype 300 após tratamento subcrônico (7 dias) desaparece com o tratamento crônico.

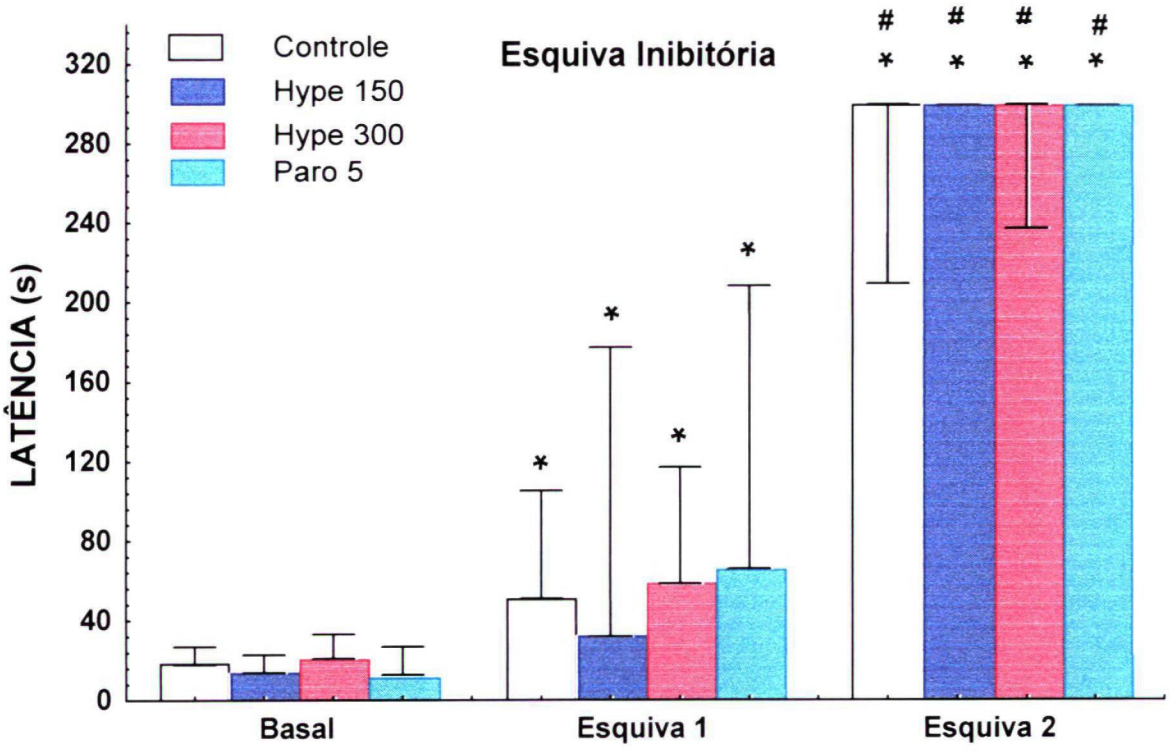



**Fig. 13** - Latência na Esquiva Inibitória de ratos tratados cronicamente (durante 21 dias), por v.o., e submetidos ao LTE. Animais pré-expostos, tratados com veículo (controle, *n*=14), com extrato de *H. perforatum* 150 mg/Kg (hype 150, *n*=11), 300 mg/Kg (hype 300, *n*=12) e com paroxetina 5 mg/Kg (paro 5, *n*=9). Dados representam mediana ± SIR. * p≤0,05 quando comparado com a Basal do mesmo grupo; # p≤0,05 quando comparado com a Esquiva 1 do mesmo grupo.

O tratamento crônico também não alterou o comportamento da Fuga 1A [H(3,46)=2,863; p=0,413], da Fuga 1B [H(3,46)=4,539; p=0,208], da Fuga 2A [H(3,46)=1,982; p=0,576] e da Fuga 2B [H(3,46)=1,489; p=06843], ou seja, o

aumento da latência de fuga induzido pela paro 5 e do hype 300 após 7 dias de tratamento desaparece depois de 21 dias de administração.

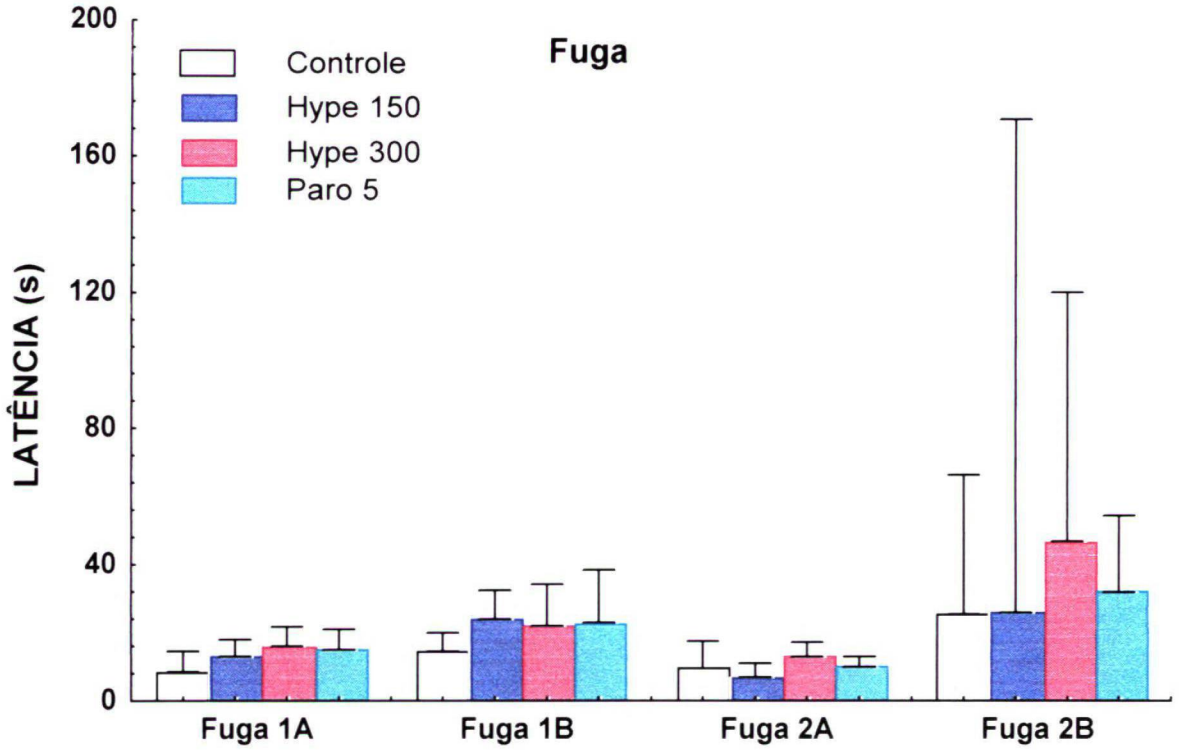



Fig. 14 - Latência na Fuga de ratos tratados cronicamente ( 21 dias) por v.o., e submetidos ao LTE. Animais pré-expostos, tratados com veículo (controle, *n*=14), com extrato de *H. perforatum* 150 mg/Kg (hype 150, *n*=11), 300 mg/Kg (hype 300, *n*=12) e com paroxetina 5 mg/Kg (paro 5, *n*=9). (A) latência tradicional - medida de acordo com Graeff e colaboradores (tempo para deixar o BA); (B) latência modificada - medida quando o animal entra no BF. Dados representam mediana ± SIR.

### 5.3.2 Campo Aberto

Como já descrito anteriormente, todos os animais submetidos ao teste no LTE, após tratamento subagudo, subcrônico e crônico, foram em seguida colocados no Campo Aberto para avaliação de sua atividade locomotora. Na tabela 2, pode-se observar o efeito desses tratamentos sobre o comportamento dos animais nesse aparelho.

Em relação ao tratamento subagudo, não houve diferenças entre os grupos experimentais para os seguintes parâmetros analisados: atividade locomotora periférica [F(4,53)=0,631; p=0,642] e central [F(4,53)=0,417; p=0,795], TI [F(4,53)=1,750; p=0,153], "grooming" [H(4,58)=1,510; p=0,825] e NBF [H(4,58)=1,978; p=0,739]. Somente o comportamento de "rearing" foi afetado

[H(4,58)=15,019; p=0,004]. A análise *a posteriori* mostrou uma diferença estatisticamente significante entre hype 150 e o grupo controle (U=49, p=0.025).

O tratamento subcrônico não induziu alterações estatisticamente significantes entre os grupos experimentais para os seguintes comportamentos: atividade locomotora periférica [F(3,44)=0,912; p=0,442] e central [F(3,44)=2,61; p=0,063], TI [F(3,44)=1119; p=0,351], "rearing" [H(3,48)=4,540; p=0,208] e NBF [H(4,58)=4,12; p=0,248]. Apenas o tempo de "grooming" [H(3,48)=8,01; p=0,045] foi alterado pelo tratamento. O teste U de Mann-Whitney revelou que o tempo de "grooming" dos animais que receberam extrato 150 mg/Kg (U=22,00; p=0,004) e dos que receberam paroxetina 5 mg/Kg (U=27,00; p=0,016) foi significantemente menor quando comparado com o tempo dos animais tratados com extrato 300 mg/Kg, mas não diferiu do tempo do grupo controle.

E, por fim, nenhuma alteração foi observada no comportamento dos animais submetidos ao tratamento crônico: atividade locomotora periférica [F(3,42)=0,239; p=0,868] e central [F(3,42)=0,824; p=0,488], TI [F(3,42)=0,142; p=0,933], "grooming" [H(3,46)=2,395; p=0,494], "rearing" [H(3,46)=1,261; p=0,738] e NBF [H(3,46)=1,254; p=0,740].

**Tabela 2 -** Comportamento de ratos tratados subagudamente, subcronicamente e cronicamente, por v.o., com veículo (controle), com extrato de *H. perforatum* 150 mg/Kg (hype 150), 300 mg/Kg (hype 300), com paroxetina 5 mg/Kg (paro 5) e 10 mg/Kg (paro 10) e submetidos ao **Campo Aberto**.

| | Parâmetros do Campo Aberto | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Tratamento** | **Atividade Locomotora[a]** | | **Rearing[b]** | **Grooming[b]** | **Tempo imobilidade[a]** | **N°Bolos Fecais[b]** |
| **subagudo** | Central | Periférica | | | | |
| Controle | 10,14 ± 2,66 | 65,20 ± 5,74 | 11,00 ± 7,50 | 10,00 ± 13,50 | 67,00 ± 14,52 | 0,00 ± 0,50 |
| Hype 150 | 11,00 ± 2,32 | 70,15 ± 3,55 | 24,00 ± 3,00 * | 12,00 ± 4,00 | 51,69 ± 12,52 | 1,00 ± 1,00 |
| Hype 300 | 12,90 ± 3,24 | 79,50 ± 12,01 | 21,00 ± 8,50 | 12,50 ± 16,00 | 47,90 ± 15,85 | 0,50 ± 0,50 |
| Paro 5 | 10,60 ± 2,97 | 66,60 ± 9,27 | 12,00 ± 4,50 | 11,50 ±10,00 | 62,50 ± 18,58 | 1,00 ± 0,50 |
| Paro 10 | 7,70 ± 1,98 | 61,20 ± 11,50 | 7,00 ± 1,50 | 9,00 ± 8,00 | 108,60 ± 25,98 | 0,00 ± 0,50 |
| **7 dias** | | | | | | |
| Controle | 6,58 ± 1,10 | 65,00 ± 5,10 | 14,50 ± 4,25 | 12,00 ± 17,00 | 84,25 ± 16,94 | 0,50 ± 0,50 |
| Hype 150 | 10,00 ± 1,53 | 67,07 ± 7,03 | 11,00 ± 7,50 | 11,00 ± 3,50# | 74,54 ± 13,52 | 1,00 ± 0,50 |
| Hype 300 | 13,54 ± 1,90 | 78,45 ± 4,77 | 26,00 ± 8,50 | 25,00 ± 11,50 | 47,18 ± 10,35 | 0,00 ± 0,00 |
| Paro 5 | 10,08 ± 2,20 | 78,83 ± 11,41 | 15,00 ± 6,00 | 15,00 ± 7,00# | 78,50 ± 17,85 | 0,00 ± 0,50 |
| **21 dias** | | | | | | |
| Controle | 11,20 ± 3,70 | 60,64 ± 7,89 | 17,5 ± 12,50 | 11,50 ± 7,00 | 54,00 ± 14,61 | 1,00 ± 0,50 |
| Hype 150 | 12,00 ± 2,90 | 59,27 ± 5,74 | 23,0 ± 8,50 | 16,00 ± 16,50 | 52,63 ± 16,21 | 1,00 ± 0,50 |
| Hype 300 | 6,20 ± 1,24 | 65,41 ± 5,55 | 21,5 ± 5,75 | 13,50 ± 7,25 | 43,50 ± 11,50 | 1,00 ± 0,50 |
| Paro 5 | 9,44 ± 2,30 | 66,11 ± 6,70 | 15,0 ± 7,50 | 16,00 ± 6,00 | 21,33 ± 11,24 | 1,00 ± 0,50 |

Notas: [a] Dados representam média ± EPM. [b] Dados representam mediana ± SIR. * p<0,05 quando comparado com o controle. # p<0,05 quando comparado com hype 300.

## 5.4 DISCUSSÃO

### 5.4.1 Esquiva Inibitória

Em relação aos resultados da tarefa de esquiva inibitória no LTE, tanto o extrato de *H. perforatum* 300 mg/kg, quanto a paroxetina 5 mg/Kg, após tratamento subagudo, impediram o aumento da latência da Esquiva 2 e da Esquiva 1, respectivamente, apresentando um efeito tipo ansiolítico parcial (prejuízo do aumento da latência de esquiva apenas em 1 ou 2 das 3 tentativas)

Após administração repetida por 7 dias (tratamento subcrônico), apenas o extrato na dose de 300 mg/Kg alterou o comportamento na tarefa, prejudicando a aquisição da esquiva inibitória, ou seja, apresentou efeito ansiolítico. Já o efeito ansiolítico parcial da paroxetina desapareceu com o tratamento subcrônico. O mesmo ocorreu após tratamento crônico, isto é, a paroxetina não alterou o comportamento dos animais na esquiva. Contrariando as predições, o efeito ansiolítico do *H. perforatum* também deixou de ser detectado depois de administração repetida por 21 dias. Novamente, a paroxetina não induziu nenhuma alteração.

Nenhuma dose do extrato ou de paroxetina, nos diferentes tempos de tratamento, alterou a atividade locomotora e os outros comportamentos avaliados nos animais submetidos ao campo aberto, o que afasta a possibilidade dos resultados do LTE serem decorrentes de uma alteração da atividade locomotora dos animais.

Uma hipótese que merece maior investigação é o quanto a pré-exposição dos animais a um dos BAs altera o comportamento desses animais na tarefa de esquiva. Como discutido anteriormente, essa modificação interfere no comportamento dos animais (experimento 3) e com o efeito ansiolítico do diazepam (BAZZI *et al.*, 2001). Poltronieri e colaboradores (2001) também obtiveram efeito inesperado da fluoxetina após tratamento crônico em animais pré-expostos e submetidos ao teste no LTE, ou seja, observaram efeito ansiogênico da droga, contrariando a predição de que a maioria dos antidepressivos induzem efeito ansiolítico após tratamento repetido.

Em relação à paroxetina, estes dados contrariam os estudos clínicos em que a paroxetina apresenta efeito ansiolítico em pacientes com TAG após tratamento

repetido (ROCCA *et al.*, 1997; ALLGULANDER *et al.*, 1998). Alguns estudos pré-clínicos da paroxetina em modelos animais de ansiedade, assim como nossos resultados, contrariam esses trabalhos clínicos, uma vez que também obtiveram efeito ansiolítico da paroxetina após uma única administração. Por exemplo, no teste das 4 placas (four-plate test), um modelo animal de ansiedade no qual o comportamento exploratório do camundongo é suprimido por estímulo aversivo, a paroxetina apresentou efeito ansiolítico nas doses de 4, 8 e 16 mg/Kg (i.p.) após tratamento agudo, não alterando a atividade locomotora (HASCOET *et al.*, 2000a). Dando seqüência a esse estudo, Hascoet e colaboradores (2000b) investigaram o efeito da administração prévia de buspirona, um agonista parcial dos receptores 5-$HT_{1A}$, e do seu principal metabólito, o 1-(2-pirimidinil)-piperazina ou 1-PP (age como antagonista $\alpha$2-adrenoceptor e acumula-se no cérebro) sobre a atividade da paroxetina no teste das 4 placas. O tratamento prévio com buspirona potencializou o efeito da maior dose de paroxetina e, com 1-PP, reduziu o efeito ansiolítico da mesma, sugerindo um envolvimento dos receptores 5-$HT_{1A}$ nessa ação da droga.

Por outro lado, outros estudos pré-clínicos corroboram com as observações clínicas. Lightowler *et al.* (1994) investigaram o efeito dos tratamentos agudo e crônico (v.o.) com paroxetina em ratos no teste de interação social. Uma simples administração de paroxetina nas doses de 0.3, 1.0, 3.0 e 10.0 mg/Kg não alterou o comportamento dos animais no teste. Já a administração repetida por 21 dias aumentou significantemente o tempo gasto com interação social (efeito ansiolítico), em uma dose que não alterou a atividade locomotora dos animais. Ainda, a administração concomitante de WAY 100635, um antagonista 5-$HT_{1A}$, e de paroxetina durante 7 dias, reduziu o tempo de latência para o aparecimento do efeito ansiolítico do ISRS, uma vez que isoladas, nenhuma das 2 drogas aumentou o tempo de interação social após esse período de tratamento (DUXON *et al.*, 2000). No LCE, altas doses de paroxetina, agudamente, induziram efeito ansiogênico (CHOPIN e BRILEY, 1987), enquanto a administração repetida induziu efeito ansiolítico (CADOGAN *et al.*, 1992).

Existem, também, relatos clínicos a respeito de um possível efeito ansiogênico dos ISRS nos primeiros dias de tratamento do TP (LIEBOWITZ, 1989; POHL, 1988), embora não existam relatos desse efeito para a paroxetina.

Estudos dos efeitos da fluoxetina, outro ISRS, após tratamento agudo e crônico em modelos animais de ansiedade também têm levado a um perfil inconsistente, incluindo desde efeitos ansiolíticos até efeitos ansiogênicos ou nenhum efeito (GRIEBEL *et al.*, 1995a). Como já citado anteriormente, Poltronieri e colaboradores (2001) mostraram um efeito ansiogênico da fluoxetina na esquiva inibitória do LTE após tratamento repetido por 21 dias. Por outro lado, o tratamento agudo com imipramina induziu efeito ansiogênico nesse modelo, enquanto a administração por 21 dias consecutivos provocou uma diminuição da latência da Esquiva 2, sugerindo um efeito tipo-ansiolítico parcial.

No que diz respeito aos efeitos do *H.perforatum*, os resultados do experimento subagudo são apoiados pelos de Skalisz e colaboradores (2001), nos quais o extrato, após administração aguda, apresentou efeito ansiolítico no modelo de "enterrar objetos não condicionado" em camundongos. Entretanto, essa comparação deve ser realizada com ressalvas, uma vez que os experimentos foram realizados em espécies diferentes e com protocolos de tratamento diferenciados. Ainda, Flausino Jr. e colaboradores (2001) também mostraram um efeito ansiolítico da dose de 125 mg/Kg do extrato, após tratamento agudo, na tarefa de Esquiva Inibitória do LTE em ratos e, após tratamento crônico, efeito ansiolítico da dose 250 mg/Kg apenas no teste de transição claro-escuro.

Um outro estudo avaliou o efeito agudo do extrato total de *H. perforatum* no teste claro-escuro (VANDERBOGAERDE *et al.*, 2000). A dose de 1852 mg/Kg aumentou significantemente a latência para entrar no compartimento escuro, enquanto as doses de 926 e 2778 mg/Kg não apresentaram efeito. Somente a maior dose aumentou a atividade locomotora dos animais, quando comparado com a atividade do grupo controle. O efeito ansiolítico do extrato no teste claro-escuro foi bloqueado pelo pré-tratamento com flumazenil, um antagonista dos receptores BDZs. Esses resultados, em conjunto, sugerem que o efeito ansiolítico do extrato possa ocorrer como uma curva dose–resposta em forma de U invertido.

Kumar *et al.* (2000) também observaram efeito ansiolítico do extrato etanólico de *H. perforatum* indiano em vários modelos animais de ansiedade, tais como o campo aberto, LCE, labirinto em zero elevado e teste de interação social. Entretanto, esse efeito foi observado somente após administração repetida por 3 dias.

Chatterjee *et al.* (1998b) observaram efeito ansiolítico da hiperforina (principal constituinte ativo do extrato) em ratos submetidos ao LCE, um modelo animal de ansiedade, após uma única administração. Entretanto, as doses necessárias para induzir esse efeito foram razoavelmente menores que aquelas com atividade antidepressiva e o efeito não se apresentou de modo dose-dependente. Por outro lado, um estudo mostrou que um extrato de *H. perforatum* 5 mg/Kg sem hiperforina aumentou a porcentagem de tempo gasto nos BAs do LCE, o que indica um efeito tipo-ansiolítico (COLETA *et al.*, 2001), indicando que outros compostos do *H. perforatum* também podem apresentar efeito ansiolítico.

O efeito das frações etanólica e por extração supercrítica em $CO_2$ do extrato de *H. perforatum* também foi avaliado em camundongos submetidos ao LCE, após administração repetida por 3 dias (BHATTACHARYA *et al.*, 1998). Altas doses da fração $CO_2$ do extrato aumentaram significantemente o n° de entradas e o tempo gasto nos BAs, enquanto altas doses da fração etanólica reduziram o n° de entradas nos BAs e aumentaram o n° de entradas e o tempo gasto nos braços fechados. Com isso, constatou-se que as frações do extrato têm perfis de atividade diferentes. Vandenbogaerde *et al.* (2000) também relataram efeitos opostos de 2 constituintes do extrato de *H. perforatum*, hipericina e pseudo-hipericina. Enquanto a hipericina reduziu a corrente de $Cl^-$ evocada por GABA, a pseudo-hipericina aumentou a corrente. Por outro lado, os 2 constituintes reduziram a corrente ativada por NMDA. Esses dados sugerem que o efeito ansiolítico do extrato possa estar relacionado, pelo menos em parte, com a atividade facilitatória da pseudohipericina na corrente de $Cl^-$ evocada por GABA e com a influência inibitória na neurotransmissão glutamatérgica (VANDENBOGAERDE *et al.*, 2000).

A variabilidade desses resultados, como um todo, possa talvez ser explicada pelo fato de que cada modelo emprega estímulos aversivos diferentes, que podem estar implicados com diferentes tipos de ansiedade ou medo e com ativação de áreas cerebrais distintas. Desse modo, somente alguns deles seriam modulados pelos ISRS (GRIEBEL *et al.*, 1995b). É relevante recordar que, de um modo geral, a maioria destes modelos foram inicialmente validados através de efeitos dos BDZ sobre o comportamento, o que pode dificultar a interpretação de resultados de drogas não-BDZs.

Até o presente momento, poucos trabalhos clínicos a respeito da utilização do *H. perforatum* no tratamento de transtornos de ansiedade têm sido publicados. Em relação a um possível efeito ansiolítico, Stivenson *et al.* (1998), em um estudo aberto sobre os efeitos do *H. perforatum* em pacientes com diagnóstico de fadiga, encontraram uma redução da ansiedade e da depressão (avaliada pela Escala Hospitalar de Depressão e Ansiedade). Outro estudo aberto avaliou o efeito do tratamento, por 12 semanas, com extrato em pacientes com diagnóstico de TOC, segundo o DSM-IV, evidenciando significante melhora na escala utilizada (TAYLOR; KOBACH, 2000). É interessante notar que alguns autores têm sugerido que o teste de "enterrar objetos não condicionado" esteja relacionado com o TOC (LONDEI *et al.,* 1998; GYERTYAN, 1995; ICHIMARU *et al.*, 1995; NJUNG'E & HANDLEY, 1991) e que o *H. perforatum* reduziu esse comportamento (SKALISZ *et al.*, 2001).

### 5.4.2 Fuga

A administração subaguda de paroxetina e do extrato de *H. perforatum* não aumentou a latência de fuga dos BAs no LTE. Porém, com o tratamento subcrônico (7 dias), a paroxetina foi eficaz em aumentar a latência das Fugas 1A, 1B e 2A, sugerindo um efeito antipânico, enquanto o extrato 300 mg/Kg induziu um aumento apenas na latência da Fuga 1B, sugerindo um efeito antipânico parcial (aumento da latência em apenas uma das tentativas de fuga). Esse efeito do *H. perforatum* 300 mg/Kg somente na Fuga 1B reforça a hipótese de que a medida modificada pode ser mais sensível e de que a tarefa de fuga no LTE possa ser útil no estudo de drogas com possível efeito antipânico. Nenhuma dose do extrato ou de paroxetina alterou a atividade locomotora e os outros comportamentos avaliados nos animais submetidos ao campo aberto, afastando a possibilidade desses resultados serem decorrentes de um efeito sedativo das drogas.

Por outro lado, após 21 dias consecutivos de tratamento, o possível efeito tipo-antipânico de ambas as drogas não foi observado, ou seja, elas não foram capazes de aumentar significantemente a latência de fuga do LTE. Esse efeito ainda não está bem compreendido. Levanta-se a possibilidade de ter ocorrido tolerância a esse efeito das drogas seguindo a administração crônica. Entretanto, como a fluoxetina, um antidepressivo com o mesmo mecanismo de ação da paroxetina e

com características clínicas semelhantes, apresentou efeito antipânico na tarefa de fuga do LTE após tratamento crônico seguindo o mesmo protocolo (POLTRONIERI *et al.*, 2001), essa hipótese parece pouco provável. Nesse sentido ainda, esses últimos resultados corroboram com aqueles obtidos por Flausino *et al.* (2001), que não observaram efeito panicolítico do extrato de *H. perforatum* tanto após tratamento agudo, quanto após tratamento crônico (21 dias). Uma investigação que pode ser realizada com o objetivo de descartar a hipótese de tolerância ao extrato é tratar os animais cronicamente e avaliar seu comportamento no teste de natação forçada, verificando, portanto, se o efeito antidepressivo se mantém. Por outro lado, o efeito ansiolítico e antipânico do *H. perforatum* na BTDC em camundongos após administração crônica (ver experimento 5) contradiz essa hipótese de tolerância. Uma hipótese conciliatória é que estes efeitos seriam decorrentes de diferentes princípios ativos do extrato, sendo que enquanto o efeito induzido por um dos princípios ativos apresentaria tolerância, o outro efeito, decorrente da ação de outro princípio ativo, não apresentaria esse fenômeno. Ou, ainda, considerando os resultados observados por Bhattacharya *et al.* (1998), nos quais o tratamento com extrato etanólico induziu um efeito ansiogênico e o tratamento com extrato por $CO_2$ induziu efeito ansiolítico, no LCE, após administração repetida por 3 dias, sugerindo efeitos opostos de diferentes constituintes, o efeito de um princípio ativo poderia contrapor-se ao efeito de outro, anulando o efeito antipânico observado após 7 dias de tratamento.

Outro fator que poderia ter contribuído para esses efeitos inesperados seria a manipulação repetida desses animais, que alteraria o comportamento no LTE, de modo análogo ao que ocorre com o efeito ansiolítico da corticosterona no LCE (ANDREATINI; LEITE, 1994). Entretanto, esta hipótese é enfraquecida pelos resultados de Poltronieri *et al.* (2001) e de Teixeira *et al.* (2000), que observaram um aumento da latência de fuga dos BAs após tratamento crônico com fluoxetina e imipramina, respectivamente (ver Tabela 1).

Em relação a outros modelos animais de pânico, os resultados do tratamento de 7 dias com o extrato e paroxetina estão parcialmente de acordo com os estudos de Griebel *et al.* (1995a), que observaram que somente o tratamento crônico com fluoxetina e imipramina reduziu dramaticamente as respostas de fuga e o

comportamento de ataque defensivo em animais submetidos a BTDC, ou seja, essas drogas apresentaram efeito antipânico somente após administração repetida.

Clinicamente, vários estudos sobre a eficácia e tolerabilidade da paroxetina no tratamento de pacientes com TP relataram o efeito antipânico desse ISRS somente após administração crônica (KUMAR, 1997a; KUMAR, 1997b; DUNBAR *et al.*, 1995a; DUNBAR *et al.*, 1995b; JUDGE; DUNBAR, 1995; JUDGE *et al.*, 1996; LECRUBIER *et al.*, 1997a; LECRUBIER *et al.*, 1997b; GUNASEKARA *et al*, 1998; PERNA *et al.*, 2001). Da mesma maneira, outros antidepressivos, como a clomipramina e a fluoxetina, só exibem eficácia contra o TP após tratamento crônico (KAHN, 1987; GORMAN *et al.*, 1987; SCHNEIER *et al.*, 1990). Em relação ao *H. perforatum*, apenas um relato de caso menciona um possível efeito antipânico do extrato (YAGER *et al.*, 1999).

Existe uma série de estudos clínicos, neuroanatômicos e farmacológicos que sugerem que o sistema serotoninérgico tem importante papel na modulação de comportamentos relacionados com transtornos psiquiátricos, como o TP. Uma das hipóteses levantadas para explicar os efeitos dos ISRS seria a de que após uma simples injeção de um ISRS, haveria um aumento da quantidade de 5-HT disponível (FULLER, 1993, 1994; RUTTER; AUERBACH, 1993), que levaria, por sua vez, a uma estimulação do sistema serotoninérgico e, conseqüentemente, a um aumento dos níveis de ansiedade. Por outro lado, a administração repetida diminuiria a responsividade dos receptores 5-HT (BURNET *et al.*, 1994), levando à melhora do estado de ansiedade (VAN PRAAG, 1988).

Outra hipótese para explicar os efeitos dos ISRS em diferentes transtornos psiquiátricos que tem se difundido é à proposta por Deakin e Graeff (1991), na qual diferentes vias serotoninérgicas modulariam de maneira distinta determinados comportamentos, de maneira que diferentes estruturas cerebrais poderiam estar relacionadas com condições psiquiátricas distintas. Sendo assim, uma via serotoninérgica partindo do Núcleo Dorsal da Rafe (NDR) com projeções para a SCPd facilitaria reações de luta/fuga em resposta a um perigo proximal (medo inato) e, possivelmente, estaria relacionada ao TP. Uma outra via, partindo do NDR com projeções para a Amígdala facilitaria comportamentos defensivos decorrentes de ameaças potenciais ou distais (ansiedade antecipatória), podendo estar relacionada

com o TAG. Nessa proposta, o efeito antipânico dos ISRS estaria sendo mediado pelo aumento da neurotransmissão serotoninérgica na SCPd.

O *H. perforatum* inibe a recaptação de monoaminas de modo não-competitivo (PEROVIC; MULLER, 1985; MÜLLER *et al.*, 1997; NEARY; BU, 1999, SINGER *et al.*, 1999) e sua administração repetida induz, de modo semelhante a outras drogas antidepressivas, alterações adaptativas nos receptores β-adrenérgicos no córtex frontal (MÜLLER *et al.*, 1997). Mais ainda, o extrato de *H. perforatum* induz um padrão eletroencefalográfico semelhante aos ISRS (DIMPFEL *et al.*, 1998). Por outro lado, Teufel-Mayer e Gleitz (1997) observaram que a administração de *H. perforatum* acarretou um aumento no número (mas não na afinidade) de receptores 5-$HT_{1A}$ e 5-$HT_2$. Dessa forma, é possível que os efeitos ansiolítico e panicolítico induzidos pelo extrato possam ser mediados por alterações no sistema serotoninérgico.

Em conjunto, esses resultados podem explicar, em parte, as semelhanças entre *H. perforatum* e a paroxetina no perfil de atividade no LTE. Entretanto, deve-se chamar atenção para o fato de que o *H. perforatum* é um fitoterápico que apresenta inúmeros constituintes ativos, possivelmente modulando vários sistemas neurotransmissores, de forma que seus efeitos podem ser bastante complexos.

Nesse sentido, alguns estudos observaram que a hiperforina, *in vitro,* também apresenta efeito inibitório da recaptação do GABA e glutamato, possivelmente por ativar canais de $Na^+$ sensíveis à amilorida e/ou trocadores de $Na^+/H^+$ (CHATTERJEE *et al.*, 1998b; WONNEMANN *et al.*, 2000). Outros estudos *in vitro* também demonstraram um aumento da liberação de glutamato pela administração de *H. perforatum* (KAEHLER *et al.*, 1999) ou de hiperforina (CHATTERJEE *et al.*, 2001). Além disso, tem sido descrito que o extrato, assim como a hipericina, apresentam moderada afinidade por receptores $GABA_A$ e $GABA_B$ e receptores NMDA (COTT, 1997; WONNEMANN *et al.*, 1997).

# 6 EXPERIMENTO 4 – VALIDAÇÃO FARMACOLÓGICA EM NOSSO LABORATÓRIO DA BATERIA DE TESTES DE DEFESA EM CAMUNDONGOS EMPREGANDO CLONAZEPAM

## 6.1 OBJETIVO

O objetivo deste experimento foi validar farmacologicamente a BTDC em nosso laboratório, empregando, para tanto, o clonazepam. Esse BDZ de alta potência é utilizado clinicamente no tratamento de TAG e TP. Experimentalmente, seu efeito no comportamento de camundongos submetidos a BTDC já foi avaliado e as predições confirmadas, isto é, a droga é capaz de alterar tanto comportamentos relacionados ao TAG, quanto àqueles possivelmente relacionados ao TP (Griebel *et al.*, 1996c).

## 6.2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 6.2.1 Animais

- Camundongos Swiss machos provenientes do Biotério do Instituto Tecnológico do Paraná (TECPAR), pesando de 35-45 g, acondicionados 20 por caixa e mantidos sob condições controladas de temperatura (22 ± 2°C), ciclo claro-escuro de 12 h (ligadas às 7:00 e desligadas às 19:00h), com água e ração à vontade.
- Ratos Wistar machos, como descrito no experimento 1.

### 6.2.2 Drogas

Foram administradas por via i.p., em volume constante de 10 ml/Kg de peso para camundongos e 1,0 ml/Kg de peso para ratos.

- Clonazepam (Rivotril© gotas 2,5 mg/ml) 0,3 mg/kg. Foi preparada uma solução de clonazepam em água deionizada.
- Controle: o grupo controle recebeu apenas salina 0,9 %.
- Tiopental (Cristália, São Paulo, Brasil) 25 mg/Kg, solução em água destilada.

### 6.2.3 Procedimento Experimental

#### 6.2.3.1 Atividade Locomotora em Camundongos

A atividade locomotora foi avaliada utilizando-se caixas de movimentação espontânea automatizadas (40x25x20 cm). Estas caixas possuem 3 células fotoelétricas em suas paredes, sendo registrado o número de interrupções das mesmas durante 15 min.

Os animais foram tratados i.p. com veículo, clonazepam 0,5 mg/Kg ou 1,0 mg/Kg e 30 min depois, submetidos ao teste de atividade locomotora.

#### 6.2.3.2 Bateria de Testes de Defesa em Camundongos

Este modelo consiste na avaliação etológica do comportamento de defesa de camundongos confrontados com um predador natural, o rato (GRIEBEL *et al.*, 1995b; BLANCHARD *et al.*, 1997). A BTDC é realizada em uma arena oval, de madeira pintada de preto, com comprimento total de 4,8 m, 40 cm de largura e circundada por uma parede de 30 cm de altura. A arena é composta de 2 segmentos de 2 m, com extremidades em semicírculo de 40 cm de raio e com uma parede medial (2,0 x 0,3 x 0,06 m). O aparato é subdividido em unidades de 20 cm por linhas brancas e elevado 70 cm do chão, para facilitar a movimentação do experimentador e minimizar o contato visual do mesmo com o camundongo. Uma série de comportamentos foi avaliada em resposta à confrontação com um rato (profundamente anestesiado ou morto): fuga, esquiva, reações defensivas de ameaça/ataque e atividades de avaliação de risco.

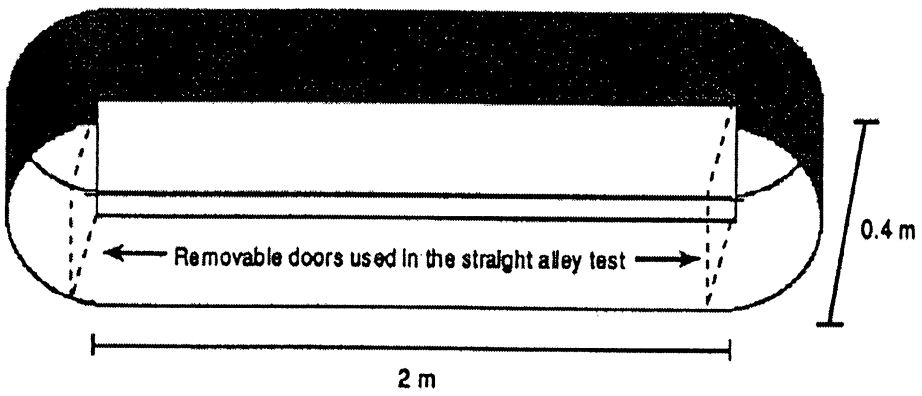



**Fig. 15** – Representação esquemática da arena oval utilizada na BTDC, adaptada de GRIEBEL *et al.* (1995c)

O protocolo da BTDC pode ser dividido em 3 fases, descritas a seguir:

- Pré-Teste: o camundongo foi colocado no centro da arena, sendo avaliada a atividade locomotora do animal, antes da exposição ao predador, através do nº de linhas cruzadas. Também foram medidos o nº de "rearing" (nº de vezes que o animal levanta-se na parede), nº de "climbing" (nº de vezes que o animal escala a parede) e nº de "jumping" (nº de vezes que o animal pula na tentativa de escapar ). Essas 3 últimas medidas foram agrupadas para formar o índice de tentativas de escapar. O pré-teste teve duração de 3 min.
- Reações ao predador: subdivididas em 4 sub-fases:

  *Teste de Esquiva ao predador:* um rato anestesiado na mão do experimentador foi introduzido na pista e aproximado do camundongo em uma velocidade de aproximadamente 0,5 m/s. A aproximação terminou quando ocorreu o contato do predador com o camundongo ou quando o camundongo fugiu do rato. A distância de esquiva (cm) entre o rato e o camundongo, no ponto de fuga, e o nº de esquivas foram medidas. Esse procedimento foi repetido 5 vezes, com intervalos aproximados de 15 s.

  *Teste de perseguição e fuga:* 15 s após o Teste de Esquiva ao Predador, o camundongo foi perseguido pelo experimentador conduzindo o rato na velocidade de mais ou menos 2 m/s, sendo medidos os seguintes parâmetros: tempo total para perseguir o camundongo por 18 metros; nº de paradas (pausas em movimentação); nº de orientações (camundongo pára e orienta sua cabeça na direção do rato); nº de reversões (o camundongo pára

e, então, corre na direção oposta). Posteriormente, alguns parâmetros foram calculados: velocidade total de fuga em (m/s) e, velocidade máxima de fuga (quando o camundongo está correndo ininterruptamente por pelo menos 1 m; média de 3 corridas; m/s).

*Teste do Beco Inescapável:* 30 s após o teste de perseguição e fuga, a arena foi convertida em um beco sem saída pelo fechamento de 2 portas opostas, consistindo em uma região restrita de 1 x 0,2 m. Foram realizadas 3 aproximações (15 s cada) de 0,4 m nessa condição inescapável para o camundongo, com intervalos de 10 s. Os parâmetros mensurados foram o TI (em segundos), a menor distância entre o camundongo e o predador (em cm) e nº de aproximações/retiradas (o camundongo deve se aproximar por mais de 20 cm para frente da porta fechada e então retornar).

*Fase de contato:* 10 s após o teste anterior, o experimentador colocou o predador em contato com o camundongo por 3 vezes, com duração e intervalos de 10 segundos cada. Os parâmetros medidos foram nº de mordidas, nº de vocalizações, nº de ataques (pulos) e nº de posturas verticais.

- Pós-Teste: também chamado de Defesa Contextual, uma vez que nessa fase foram avaliados a atividade locomotora e o comportamento do camundongo na arena após a experiência com o predador. Nesse teste, o predador e as portas foram removidos. As medidas foram as mesmas do pré-teste: nº de linhas cruzadas, nº de "rearing" (nº de vezes que o animal levanta-se na parede), nº de "climbing" (nº de vezes que o animal escala a parede) e nº de "jumping" (nº de vezes que o animal pula na tentativa de escapar ). As 3 últimas medidas foram agrupadas para formar o índice de tentativas de escapar. Esse teste também teve duração de 3 min.

As respostas de fuga (distância de esquiva, número de esquivas e velocidade total de fuga) são os parâmetros sensíveis às drogas antipânico (GRIEBEL *et al.*, 1995a; BLANCHARD *et al.*, 1997). Os outros comportamentos estão relacionados ao TAG e são sensíveis às drogas ansiolíticas, como o diazepam (BLANCHARD *et al.*, 1997). Todos os experimentos foram filmados e gravados em vídeo para posterior análise. Foi realizada a limpeza da arena com papel toalha e álcool a 10 %

após cada animal testado, com o objetivo de evitar que secreções do animal anterior e o odor e pêlos do predador interferissem no comportamento do animal seguinte.

### 6.2.4 Tratamento

O clonazepam 0,3 mg/Kg (CLON 0,3) foi administrado uma única vez, por via i.p., 30 min antes do teste. A dose de clonazepam foi escolhida em virtude do estudo citado anteriormente e da avaliação de que doses de 0,5 e 1,0 mg/kg não alteraram a atividade locomotora de camundongos no teste de atividade locomotora espontânea em comparação com animais tratados com veículo.

O rato foi profundamente anestesiado 15 min antes de ser utilizado.

### 6.2.5 Análise Estatística

A atividade locomotora total (n° de interrupções das células fotoelétricas) foi analisada através de ANOVA de uma via seguida de teste de Newman-Keuls quando apropriado. O n° de linhas cruzadas, no Pré e Pós-Teste, foi analisado pelo teste t de Student para medidas independentes e, a comparação entre Pré e Pós-Teste para um mesmo grupo foi realizada através do teste t de Student para medidas repetidas. O n° de tentativas de escapar foi analisado através de análise não-paramétrica. O teste U de Mann-Whitney foi empregado para comparar os 2 grupos no pré e no pós-teste. O teste de Wilcoxon foi utilizado para comparar o Pré e o Pós-Teste para um mesmo grupo. As velocidades total e máxima de fuga e o TI foram analisados através do teste t de Student para medidas independentes. Os outros comportamentos foram avaliados através de teste U de Mann-Whitney. O nível de significância considerado foi $p<0,05$. Os dados foram representados como média ± EPM ou como mediana ± SIR. O programa STATISTICA 5.0 (Statsoft, 1993) foi empregado para efetuar as análises.

## 6.3 RESULTADOS

### 6.3.1 Atividade Locomotora

Não ocorreu diferença estatisticamente significante entre os grupos para a atividade locomotora total [F(36,2)=2,460; p=0,100].

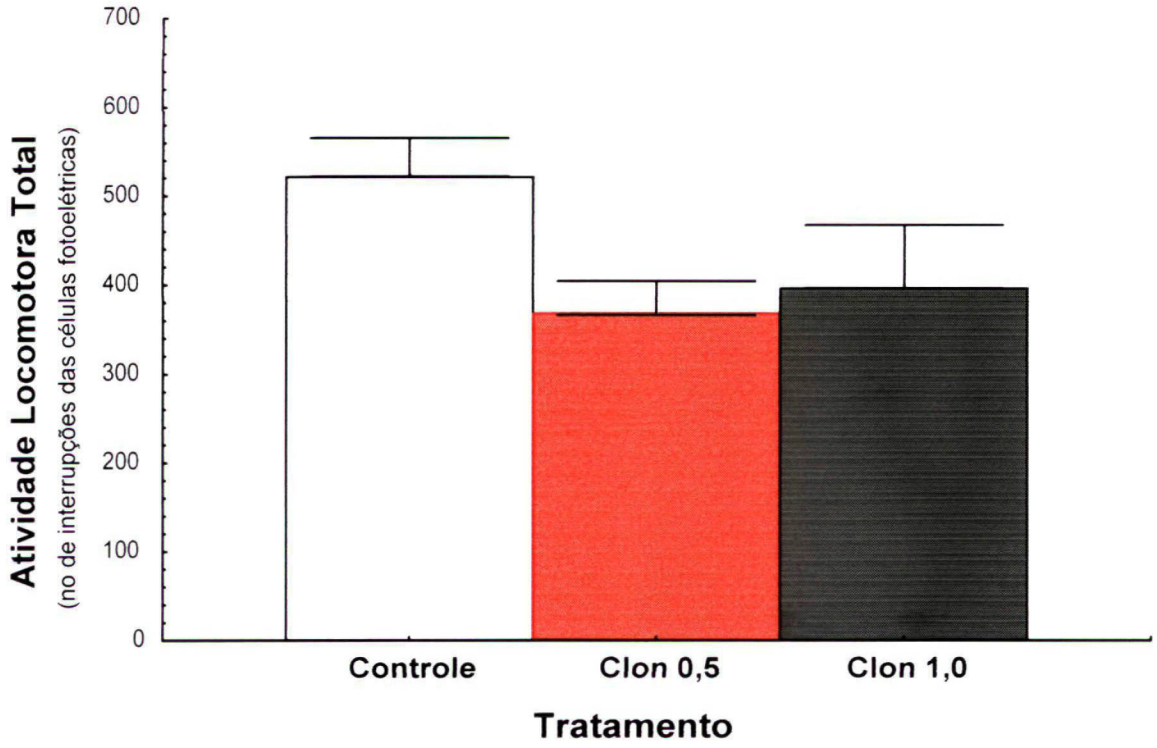



**Fig. 16** - Efeito do clonazepam 0,5 mg/kg (Clon 0,5; *n*=13), 1,0 mg/Kg (Clon 1,0; n= 13) e do veículo (controle; *n*=13) na Atividade Locomotora Total (n° de interrupções das células fotoelétricas) em camundongos submetidos ao teste em caixas de movimentação espontânea automatizadas. Dados representam média ± EPM.

### 6.3.2 Bateria de Testes de Defesa em Camundongos

6.3.2.1 Pré-Teste (atividade locomotora antes da exposição ao rato) e Pós-Teste (defesa contextual)

Não houve diferença estatisticamente significante entre o grupo controle e o grupo tratado agudamente com CLON 0,3 para o número de linhas cruzadas (NLC) no Pré-Teste (teste t de Student: t=0,140; p=0,889) e no pós-teste (t=1,669; p=0,106), sugerindo que os tratamentos não alteraram a atividade locomotora dos

animais. Também não se observou diferença estatisticamente significante entre o Pré e o Pós-Teste para o grupo controle (teste t de Student para medidas repetidas: t=1,613; p=0,129). Por outro lado, o tratamento com CLON 0,3 alterou o comportamento dos animais expostos ao rato, diminuindo significantemente o NCL no Pós-Teste quando comparado com o pré-teste (t=13,097; p=0,007).

Em relação ao número de tentativas de escapar (NTE), observou-se uma diferença estatisticamente significante entre os grupos tanto no Pré (U=8,5; p<0,001), quanto no Pós-Teste (T=11,5; p<0,001). Como esperado, a exposição ao predador aumentou significantemente o NTE do grupo controle na defesa contextual (T=20,0; p=0,023), o que não ocorreu com o grupo CLON 0,3 (T=23,5; p=0,068).

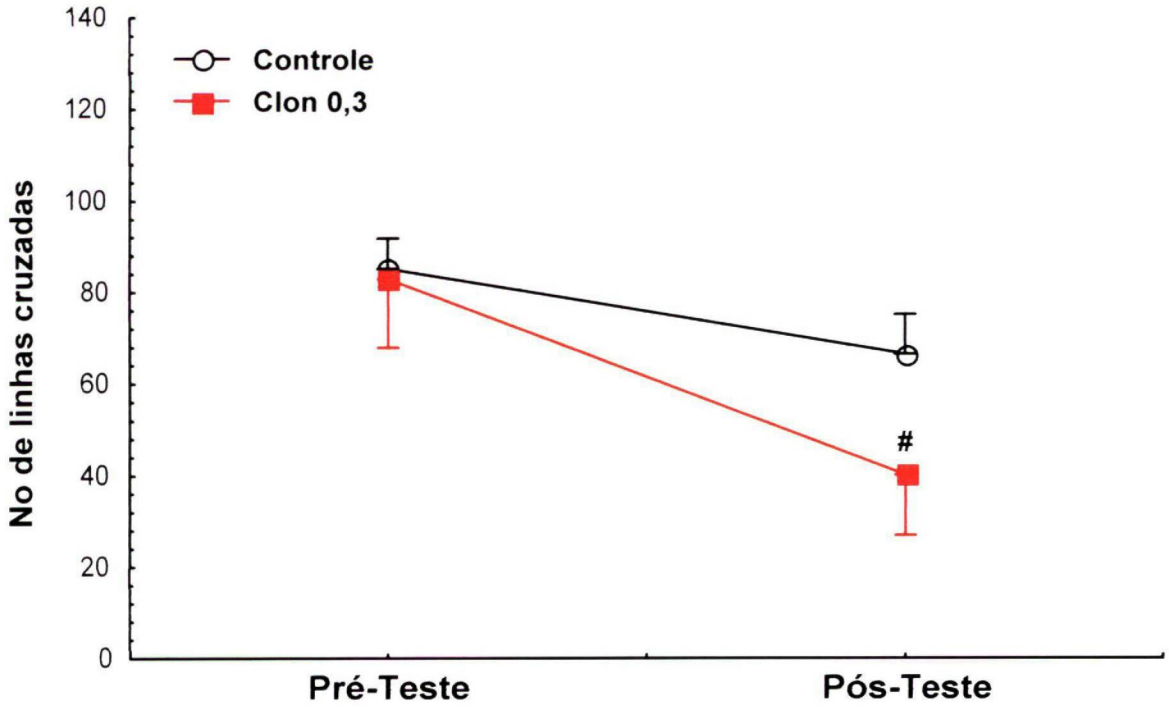



**Fig. 17** - Efeito do clonazepam 0,3 mg/kg (Clo 0,3; *n*=15) e do veículo (controle; *n*=15) no Número de Linhas Cruzadas na BTDC. Pré-Teste: antes da exposição ao rato; Pós-Teste: após exposição ao rato. Dados representam média ± EPM. # p<0,05 quando comparado com Pré-Teste.

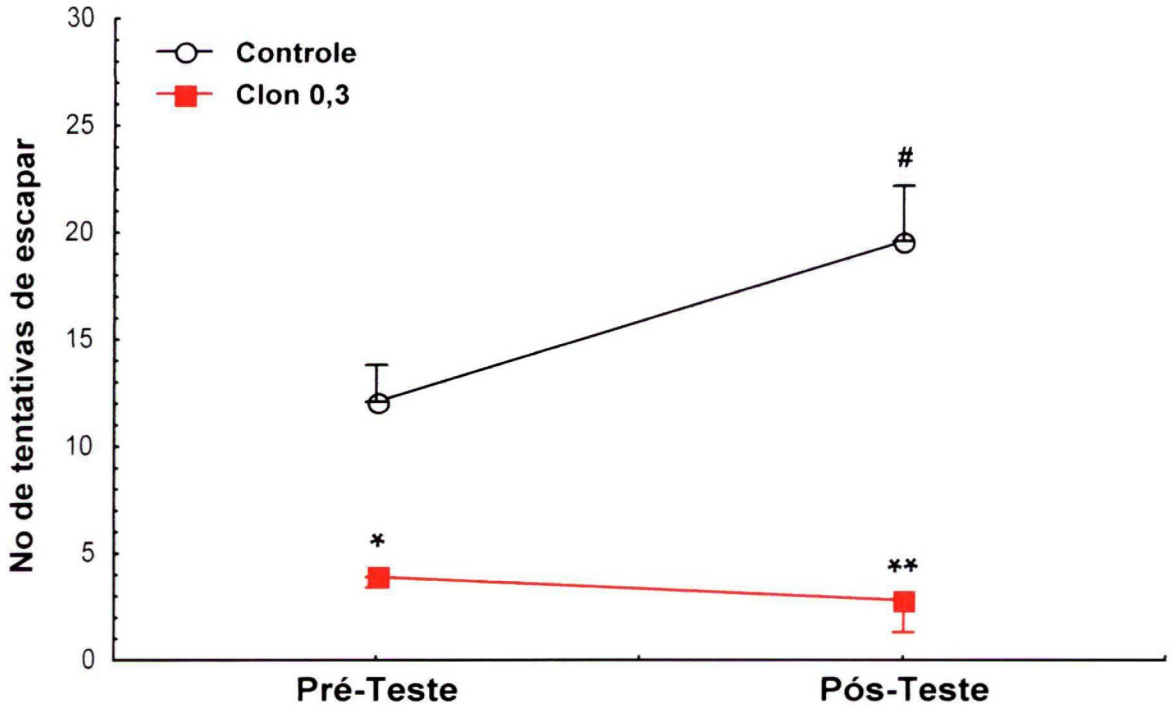



**Fig. 18** - Efeito do clonazepam 0,3 mg/kg (clon 0,3, *n*=15) e do veículo (controle; *n*=15) no Número de Tentativas de Escapar na BTDC. Pré-Teste: antes da exposição ao rato; Pós-Teste: após exposição ao rato. Dados representam média ± EPM. * p<0,05 quando comparado com salina no pré-teste; ** p<0,05 quando comparado com salina no Pós-Teste; # p<0,05 quando comparado com Pré-Teste.

### 6.3.2.2 Teste de Esquiva ao Predador

O tratamento agudo com CLON 0,3 diminuiu significantemente o n° de esquivas (teste U de Mann-Whitney: U=40,0; p=0,002), bem como a distância de esquiva (teste t de Student: t=2,854; p<0,008) quando comparado com o controle.

**Tabela 3** – Efeito do clonazepam 0,3 mg/kg (*n*=15) e do veículo (controle; *n*=15) nos Comportamentos do Teste de Esquiva ao Predador da BTDC.

| **Parâmetros Teste Esquiva ao Predador** | **Controle** | **Clonazepam 0,3 mg/Kg** |
|---|---|---|
| n° esquivas [a] | 1,0 ± 1,0 | 0,0 ± 0,0 * |
| distância esquivas (cm) [b] | 4,0 ± 11,5 | 0,0 ± 0,0 * |

Nota: [a] Dados representam mediana ± SIR; [b] Dados representam média ± EPM;
* p<0,05 quando comparado com o controle.

### 6.3.2.3 Teste de Perseguição e Fuga

Não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos para a velocidade total de fuga (t=1,725; p=0,095). Entretanto, o tratamento com CLON 0,3 diminuiu significantemente a velocidade máxima de fuga (t=5,025; p<0,001). Também foram alterados pela administração do BDZ o nº de paradas (teste U de Mann-Whitney: U=8,5; p<0,001), nº de orientações (U=5,5; p<0,001) e nº de reversões (U=34,5; p<0,01).

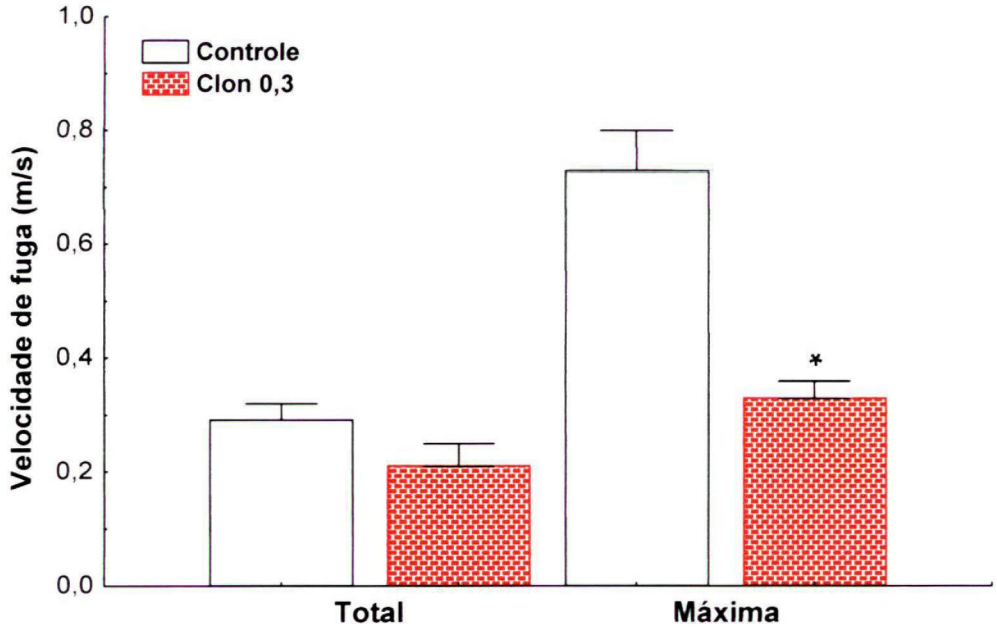



**Fig. 19** - Efeito do clonazepam 0,3 mg/kg (clon 0,3, *n*=15) e do veículo (controle; *n*=15) nas Velocidades de Fuga Total e Máxima na BTDC. Dados representam média ± EPM. * p<0,05 quando comparado com o controle.

**Tabela 4** – Efeito do clonazepam 0,3 mg/kg (*n*=15) e do veículo (controle; *n*=15) nos Comportamentos do Teste de Perseguição e Fuga da BTDC.

| Parâmetros Teste Perseguição/Fuga | Controle | Clonazepam 0,3 mg/Kg |
|---|---|---|
| nº paradas | 14,0 ± 3,5 | 4,0 ± 1,5 * |
| nº orientações | 8,0 ± 2,0 | 2,0 ± 2,0 * |
| nº reversões | 6,0 ± 3,0 | 2,0 ± 1,0 * |

Nota: Dados representam mediana ± SIR; * p<0,05 quando comparado com o controle.

### 6.3.2.4 Teste do Beco Inescapável

O grupo CLON 0,3 apresentou um tempo de imobilidade significantemente maior que o do grupo controle (teste t de Student: t=3,353; p=0,002). Contrastando com esse resultado, não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos para o nº de aproximações/retiradas (U=72,0; p<0,09) e para a menor distância entre o camundongo e o rato (U=82,0; p=0,206).

**Tabela 5** – Efeito do clonazepam 0,3 mg/kg (*n*=15) e do veículo (controle; *n*=15) nos Comportamentos do Teste do Beco Inescapável da BTDC.

| Parâmetros Teste Beco Inescapável | Controle | Clonazepam 0,3 mg/Kg |
|---|---|---|
| tempo de imobilidade (s) [a] | 21,0 ± 4,3 | 37,4 ± 2,3 * |
| nº aproximações/retiradas[b] | 0,0 ± 1,0 | 0,0 ± 0,0 |
| menor distância rato/camundongo [b] | 40,0 ± 30,0 | 40,0 ± 0,0 |

Nota: [a] Dados representam média ± EPM; [b] Dados representam mediana ± SIR; * p<0,05 quando comparado com o controle.

### 6.3.2.5 Fase de Contato

Os 4 comportamentos de defesa induzidos pelo contato com o predador foram significantemente reduzidos pelo tratamento com CLON 0,3: nº de mordidas (teste U de Mann-Whitney: U=30,0; p<0,001), nº de vocalizações (U=45; p=0,005), nº de ataques (U=60,0; p=0,029) e nº de posturas verticais (U=32,0; p<0,001).

**Tabela 6** – Efeito do clonazepam 0,3 mg/kg (*n*=15) e do veículo (controle; *n*=15) nos Comportamentos da Fase de Contato da BTDC.

| Parâmetros da Fase de Contato | Controle | Clonazepam 0,3 mg/Kg |
|---|---|---|
| nº mordidas | 1,0 ± 1,5 | 0,0 ± 0,0 * |
| nº vocalizações | 3,0 ± 4,0 | 0,0 ± 0,0 * |
| nº ataques | 0,0 ± 3,0 | 0,0 ± 0,0 * |
| nº posturas verticais | 9,0 ± 7,0 | 1,0 ± 1,5 * |

Nota: Dados representam mediana ± SIR; * p<0,05 quando comparado com o controle.

## 6.4 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos com animais controle nesse experimento proporcionaram um perfil comportamental em resposta aos estímulos predatórios e contextuais similar àquele observado em estudos anteriores com a BTDC (p. ex. GRIEBEL *et al.*, 1995a, GRIEBEL *et al.*, 1996a). Sendo assim, na situação de Defesa Contextual (pós-teste), o NTE foi potencializado pela experiência prévia de confrontação com o predador (rato) quando comparado com o Pré-Teste. No Teste de Esquiva ao Predador o grupo controle exibiu respostas de esquiva ao predador, assim como no Teste de Perseguição/Fuga, freqüentemente apresentou comportamentos de avaliação de risco (paradas, orientações e reversões). Já no Teste do Beco Inescapável, os camundongos praticamente não fizeram aproximações/retiradas, mantendo uma distância grande do predador e permanecendo imóveis a maior parte do tempo, ou seja, ocorreu uma inibição dos comportamentos de avaliação de risco na situação inescapável com estímulo aversivo proximal. Ainda, na Fase de Contato os animais apresentaram comportamentos defensivos de ameaça/ataque, embora tenham ocorrido algumas diferenças quantitativas em relação aos resultados geralmente obtidos por Griebel e colaboradores (1996a).

Durante os estudos etológicos realizados por Blanchard *et al.* (1993), foi desenvolvido um sistema chamado "Visible Burrow System", um habitat semi-natural composto por tocas e ambientes abertos, com acesso à água e comida, no qual os comportamentos defensivos de ratos e camundongos expostos a um predador natural (gato) foram caracterizados. Os comportamentos defensivos tendem a ser bastante similares através das espécies de mamíferos em termos de seus antecedentes (BLANCHARD *et al.*, 1997). Entretanto, algumas diferenças foram observadas entre ratos e camundongos. Na situação de exposição ao gato, os ratos fogem para as tocas, entram em "freezing" e emitem vocalizações ultra-sônicas, ou seja, ocorre uma supressão dos comportamentos de avaliação de risco nas primeiras horas que sucedem a exposição. Já os camundongos não apresentam essa supressão e também não emitem vocalizações, além de apresentarem menor diminuição dos comportamentos normais (beber, comer, interação social) (BLANCHARD *et al.*, 1997). Uma possível explicação dada pelos pesquisadores

sugere que essas diferenças podem estar relacionadas com diferenciação no processo de domesticação das 2 espécies. Os camundongos são menores, representando menor risco de provocarem ferimentos aos manipuladores, além de permitirem fácil manipulação pela cauda, ou seja, os comportamentos defensivos/agressivos dos camundongos são preservados, enquanto os dos ratos sofrem uma diminuição devido a uma seleção artificial realizada pelos manipuladores. Essa teoria é uma das maneiras de explicar a grande variabilidade comportamental observada em camundongos, o que não ocorre em ratos.

Diferenças comportamentais também ocorreram quando se realizou a comparação entre camundongos selvagens (4ª geração em laboratório) e camundongos de laboratório (combinação de 6 diferentes cepas) (BLANCHARD *et al.*, 1998; GRIEBEL *et al.*, 1997). Na BTDC, camundongos selvagens mostraram reações de fuga imediatas e intensas, enquanto em camundongos de laboratório a freqüência e intensidade desse comportamento estavam reduzidas. Outra importante diferença ocorreu no Teste do Beco Inescapável, no qual camundongos selvagens apresentaram grande período em "freezing" e pulos na parede. Já os camundongos de laboratório ficaram menos tempo em "freezing" e apresentaram mais comportamentos de avaliação de risco. Esses dados reforçam a importância do processo de domesticação nos comportamentos defensivos. Mas, como as diferenças são basicamente quantitativas, os camundongos de laboratório têm sido empregados na avaliação do efeito de drogas (BLANCHARD *et al.*, 1998).

A ocorrência de considerável variabilidade comportamental inter e intra-espécies pode ser uma explicação para as diferenças observadas entre o grupo controle do presente estudo e os grupos controles de diversos estudos realizados por outros grupos. Por exemplo, os animais do presente estudo exibiram menor nº de "jumping" e "climbing", bem como realizaram menor nº de aproximações/retiradas no Teste do Beco Inescapável. Mas, de maneira geral, pode-se dizer que os animais responderam ao estímulo ameaçador, possibilitando a realização da validação farmacológica do modelo em nosso laboratório.

O clonazepam foi a droga de escolha para realizar a validação da BTDC em nosso laboratório, por ser clinicamente eficaz tanto no tratamento do TAG quanto no tratamento do TP, alterando, portanto, na BTDC, comportamentos defensivos

relacionados a ambas as classes de drogas, ansiolíticas e panicolíticas (GRIEBEL *et al.*, 1996a).

Resumidamente, o tratamento com CLON 0,3 reduziu o NTE, o nº de paradas, o nº de orientações, o nº de reversões, o nº de mordidas, o nº de vocalizações, nº de ataques e o nº de posturas verticais (parâmetros relacionados ao TAG) e, o nº e a distância de esquiva (parâmetros relacionados ao TP. Ainda, aumentou o tempo de imobilidade e diminuiu a velocidade máxima de fuga. Esses resultados são semelhantes aos obtidos por Griebel *et al.* (1996a). Contudo, os comportamentos do Teste do Beco Inescapável não foram descritos por esses pesquisadores, de modo que não existem parâmetros de comparação.

O aumento do tempo de imobilidade e a diminuição da velocidade máxima de fuga poderiam ser decorrentes de um efeito sedativo do clonazepam. Contrariando essa hipótese, o nº de linhas cruzadas (no pré-teste), medida que se propõe a avaliar a atividade locomotora, não foi alterada quando comparado com o grupo controle. Além disso, antes de avaliar os efeitos desse BDZ na BTDC, foi constatado que essa droga, nas doses de 0,5-1,0 mg/Kg, não prejudicou a atividade locomotora em camundongos submetidos ao teste em caixas de locomoção espontânea automatizadas.

Como um todo, os resultados acima descritos mostraram que o clonazepam, uma droga eficaz no TAG e no TP, reduziu os comportamentos relacionados ao TAG e ao TP, replicando os dados de Griebel *et al.*, (1996a). Isso sugere que a validação farmacológica do modelo em nosso laboratório foi efetiva, permitindo a posterior avaliação do efeito da administração aguda, subcrônica e crônica do extrato de *H. perforatum.*

# 7 EXPERIMENTO 5 – EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA, SUBCRÔNICA E CRÔNICA DE *H. perforatum* EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À BATERIA DE TESTES DE DEFESA EM CAMUNDONGOS

## 7.1 OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito dos tratamentos agudo, subcrônico e crônico do extrato de *H. perforatum* sobre o comportamento de camundongos submetidos a BTDC.

## 7.2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 7.2.1 Animais

Idem ao item 6.2.1 do experimento 4.

### 7.2.2 Drogas

- Extrato de *H. perforatum* e Paroxetina – Idem ao item 5.2.2 do experimento 3.
- Controle: o grupo controle recebeu o veículo do extrato.
- Tiopental (Cristália, São Paulo, Brasil) 25 mg/Kg, solução em água destilada.

### 7.2.3 Procedimento Experimental

7.2.3.1 Bateria de Testes de Defesa em Camundongos

Idem ao item 6.2.3.2 do experimento 4.

### 7.2.4 Tratamento

- Agudo: Nesse estudo, os animais receberam 1 única administração, por v.o., 1 h antes do teste na BTDC. Os animais foram subdivididos nos seguintes grupos experimentais: controle (recebeu o veículo da suspensão do extrato); extrato de *H. perforatum* 150 e 300 mg/Kg e; paroxetina 5 mg/Kg.

- Subcrônico: Nesse estudo, os animais foram tratados, por v.o., durante 7 dias, uma vez ao dia, sendo a última administração 1 h antes do teste na BTDC. Os grupos experimentais foram os mesmos do experimento agudo.
- Crônico: Nesse estudo, os animais foram tratados, por v.o., durante 21 dias, uma vez ao dia, sendo a última administração 1 h antes do teste na BTDC. Os grupos experimentais foram os mesmos do experimento agudo.

### 7.2.5 Análise Estatística

O NLC, no Pré e Pós-Teste, foi analisado através de ANOVA de 2 vias seguida do teste de Newman-Keuls quando apropriado. O NTE foi analisado através de análise não-paramétrica: ANOVA de Kruskall-Wallis seguida de teste U de Mann-Whitney para comparações múltiplas quando apropriado. O teste de Wilcoxon foi utilizado para comparar o Pré e o Pós-Teste para um mesmo grupo. As velocidades total e máxima de fuga e o TI foram analisados através de ANOVA de uma via seguida do teste de Newman-Keuls quando apropriado. Os outros comportamentos foram avaliados através de ANOVA de Kruskall-Wallis seguida de teste U de Mann-Whitney para comparações múltiplas quando apropriado. O nível de significância considerado foi $p<0,05$. Os dados foram representados como média ± EPM ou como mediana ± SIR. O programa STATISTICA 5.0 (Statsoft, 1993) foi empregado para efetuar as análises.

## 7.3 RESULTADOS

### 7.3.1 Pré-teste (atividade locomotora antes da exposição ao rato) e Pós-Teste (defesa contextual)

Uma ANOVA de 2 vias revelou que não houve diferença estatisticamente significante no NLC dos animais tratados agudamente com veículo, extrato ou paroxetina e submetidos a BTDC para o fator tratamento [$F(3,55)=0,794$; $p>0,1$], para a medida repetida [$F(1,55)=0,045$; $p>0,1$] e para a interação desses 2 fatores [$F(3,55)=0,443$; $p>0,1$]. O mesmo ocorreu após tratamento subcrônico: fator tratamento [$F(3,55)=0,989$; $p>0,1$], medida repetida [$F(1,55)=0,186$; $p>0,1$] e

interação desses 2 fatores [F(3,55)=0,937; p>0,1]. A análise dos resultados do tratamento crônico também não detectou diferenças estatisticamente significantes para o fator tratamento [F(3,55)=2,271; p=0,088], para a medida repetida [F(1,55)=0,026; p>0,1] e para a interação desses 2 fatores [F(3,55)=0,415; p>0,1].

Juntos, esses resultados sugerem que os 3 tipos de tratamento, com as diferentes drogas, não comprometeram a atividade locomotora dos animais.

A respeito do NTE, o tratamento agudo não foi capaz de alterar esse comportamento no Pré [H(3,59)=1,793; p>0,1] e Pós-Teste [H(3,59)=1,931; p>0,1]. A potencialização do NTE após contato com o predador ocorreu em todos os grupos: salina (T=3,0;n p<0,01), hype 150 (T=1,0; p<0,001), hype 300 (T=9,5; p<0,01) e paro 5 (T=5,0; p<0,01). Após administração repetida durante 7 dias, não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos para essa medida no Pré-Teste [H(3,59)=4,008; p>0,1], mas houve no Pós-Teste [H(3,59)=9,565; p=0,022]. A análise através do teste U de Mann-Whitney mostrou que o tratamento com hype 150 aumentou o NTE quando comparado com o grupo controle (U=60,5; p=0,031). Como após o tratamento agudo, o tratamento subcrônico não impediu a potencialização do NTE após contato com o predador, que ocorreu em todos os grupos: salina (T=22,0;n p=0,03), hype 150 (T=3,5; p<0,01), hype 300 (T=1,0; p<0,01) e paro 5 (T=19,5; p=0,02). O tratamento crônico (21 dias) não induziu alteração no comportamento de tentar escapar no Pré-Teste [H(3,66)=5,616; p>0,1] e no Pós-Teste [H(3,66)=6,578; p=0,086]. Ainda, o tratamento crônico não impediu a potencialização do NTE após contato com o predador, que ocorreu em todos os grupos: salina (T=0,0;n p<0,01), hype 150 (T=1,0; p<0,001), hype 300 (T=1,0; p<0,01) e paro 5 (T=0,0; p<0,01).

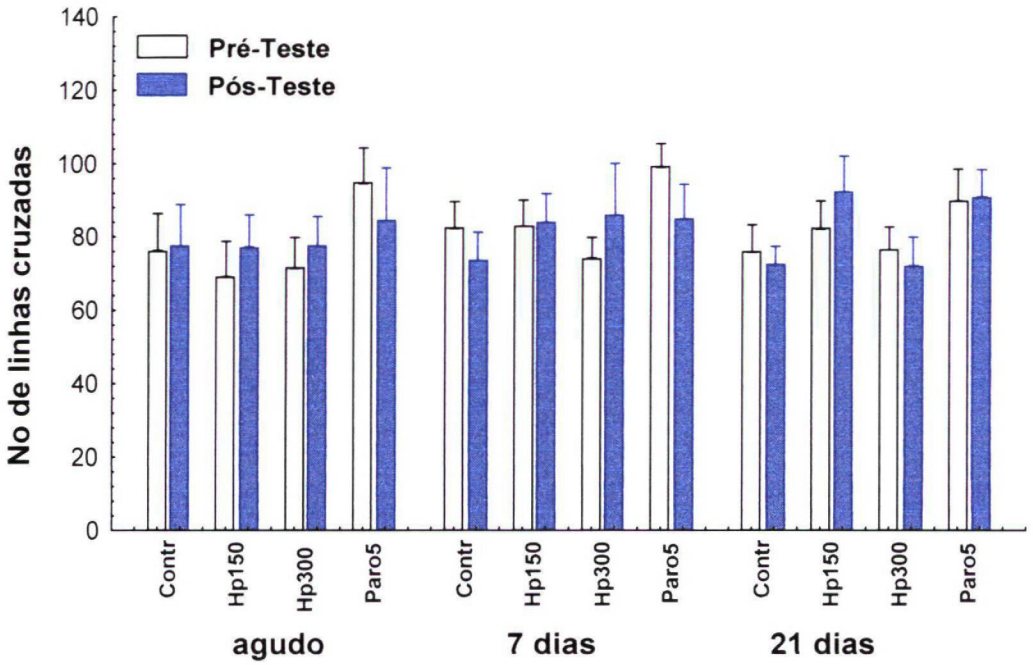



**Fig. 20** - Efeito do tratamento agudo, subcrônico (7 dias) e crônico (21 dias), v.o., com veículo (contr), H. perforatum 150 mg/Kg (hype 150), 300 mg/Kg (hype 300) paroxetina 5 mg/Kg (paro 5) no Número de Linhas Cruzadas na BTDC. Pré-Teste: antes da exposição ao rato; Pós-Teste: após exposição ao rato. Dados representam média ± EPM.

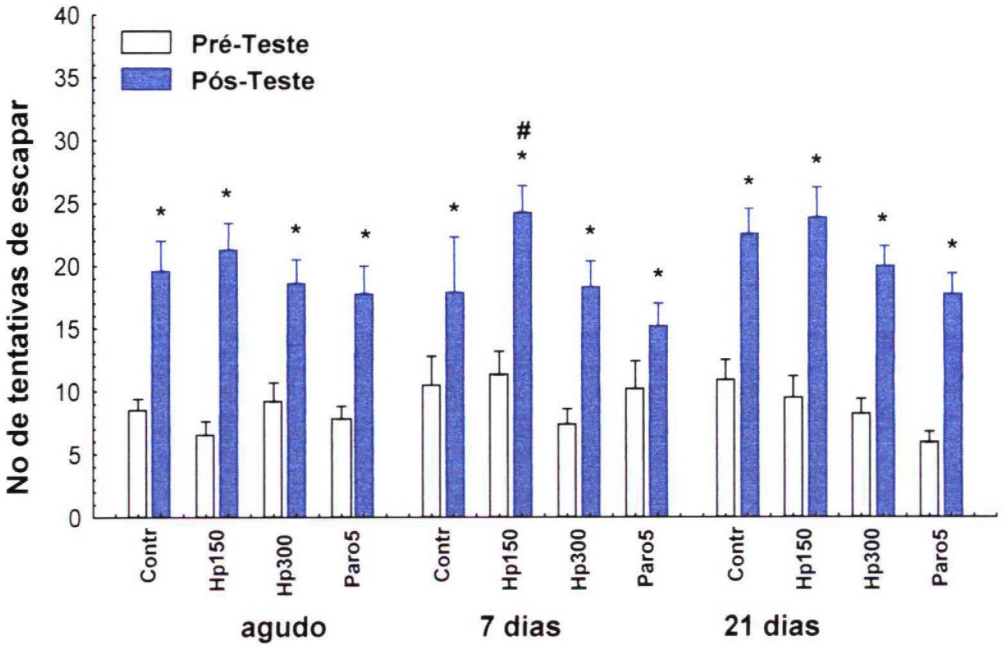



**Fig. 21** - Efeito do tratamento agudo, subcrônico (7 dias) e crônico (21 dias), v.o., com veículo (contr), H. perforatum 150 mg/Kg (hype 150), 300 mg/Kg (hype 300) paroxetina 5 mg/Kg (paro 5) no Número de Tentativas de Escapar na BTDC. Pré-Teste: antes da exposição ao rato; Pós-Teste: após exposição ao rato. Dados representam média ± EPM. * $p<0,05$ em relação ao Pré-Teste para o mesmo grupo; # $p<0,05$ em relação ao respectivo controle.

### 7.3.2 Teste de Esquiva ao Predador

Nesse teste, o tratamento agudo não induziu nenhuma alteração estatisticamente significante para as 2 variáveis analisadas: nº de esquivas [H(3,59)=1,123; p>0,1] e distância de esquiva [F(3,55)=0,123; p>0,1].

Os animais tratados durante 7 dias também apresentaram comportamento semelhante ao grupo controle para a distância de esquiva [F(3,55)=0,250; p>0,1]. Já para nº de esquivas, a análise não-paramétrica mostrou que o valor de p ficou relativamente próximo do nível de significância [H(3,59)=7,016; p=0,071].

Esse resultado foi confirmado no estudo crônico, de maneira que o nº de esquivas apresentou uma diferença estatisticamente significante [H(3,66)=15,210; p=0,001]. A análise *a posteriori* mostrou que os grupos hype 300 (U=38,0; p<0,001) e paro 5 (U=64,5; p=0,016) foram significantemente diferentes do controle. A ANOVA de uma via também revelou uma diferença estatisticamente significante para a distância de esquivas [F(3,62)=3,026; p=0,036]. O teste de Newman-Keuls para múltiplas comparações evidenciou um valor de p muito próximo do nível de significância para o hype 300 em relação ao controle (p=0,055) e para a paro 5 e m relação ao controle (p=0,051). Como um todo, esses resultados sugerem a possibilidade de um efeito antipânico da maior dose de *H. perforatum* e da paroxetina.

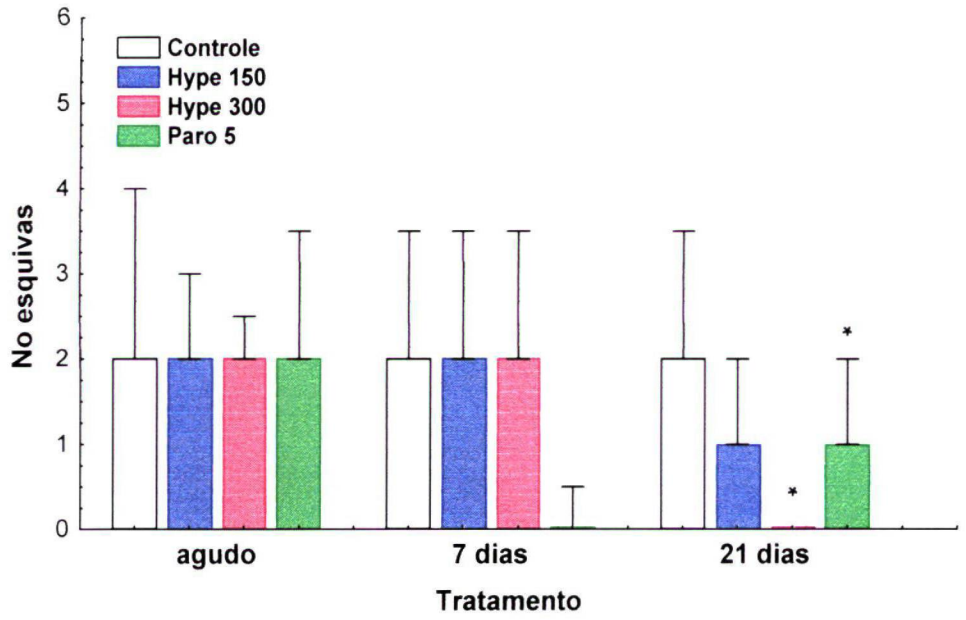



**Fig. 22** – Efeito do tratamento agudo, subcrônico (7 dias) e crônico (21 dias), v.o., com veículo (controle), H. perforatum 150 mg/Kg (hype 150), 300 mg/Kg (hype 300) paroxetina 5 mg/Kg (paro 5) no Número de Esquivas na BTDC. Dados representam mediana ± SIR. * $p<0,05$ quando comparado com o controle.

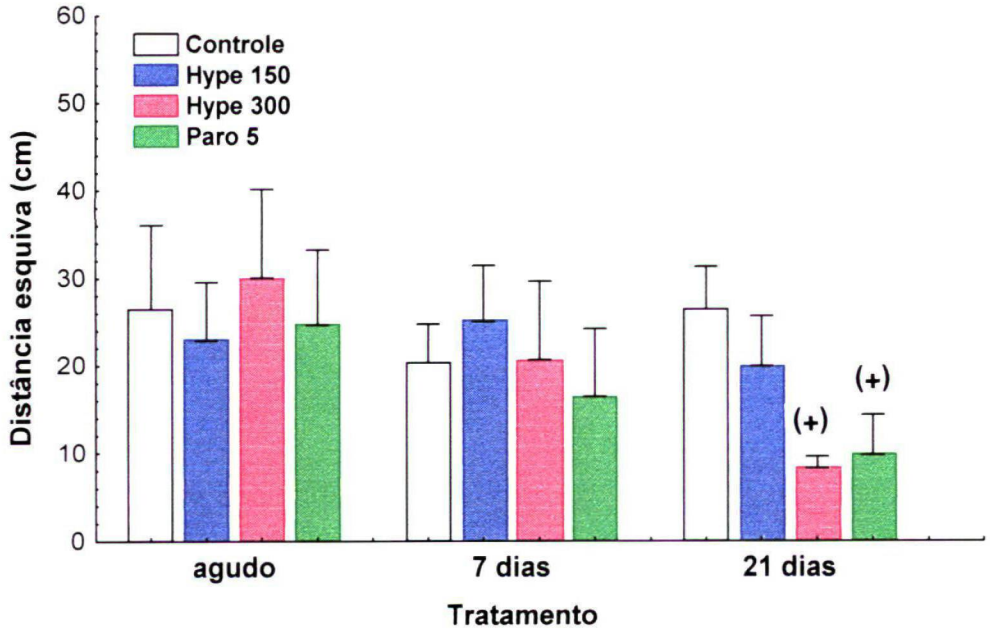



**Fig. 23** - Efeito do tratamento agudo, subcrônico (7 dias) e crônico (21 dias), v.o., com veículo (controle), H. perforatum 150 mg/Kg (hype 150), 300 mg/Kg (hype 300) paroxetina 5 mg/Kg (paro 5) na Distância de Esquiva (cm) na BTDC. Dados representam média ± EPM. (+) $p<0,06$ quando comparado com o controle.

### 7.3.3 Teste de Perseguição e Fuga

Nesse teste, uma única administração não foi capaz de alterar as velocidades de fuga total [F(3,55)=0,018; p>0,1] e máxima [F(3,55)=0,054; p>0,1], assim como os comportamentos de avaliação de risco, tais como o nº de paradas [H(3,59)=1,089; p>0,1], nº de orientações [H(3,59)=0,075; p>0,1] e nº de reversões [H(3,59)=1,111; p>0,1].

O tratamento subcrônico também não alterou os comportamentos citados acima: velocidade total de fuga [F(3,55)=1,319; p>0,1], velocidade máxima de fuga [F(3,55)=0,063; p>0,1], nº de paradas [H(3,59)=0,215; p>0,1], nº de orientações [H(3,59)=1,859; p>0,1] e nº de reversões [H(3,59)=4,130; p>0,1].

Como no teste anterior, somente o tratamento crônico foi capaz de alterar alguns dos comportamentos. A ANOVA de uma via apontou uma diferença estatisticamente significante entre os grupos para a velocidade total de fuga [F(3,62)=3,363; p=0,024] e para a velocidade máxima de fuga [F(3,62)=3,981; p=0,011]. A análise *post hoc* mostrou uma redução da velocidade total de fuga no grupo tratado com hype 300 (p=0,030) e com paro 5 (p=0,045) em relação ao controle. Similarmente, houve diferença significante para a velocidade máxima de fuga entre os grupo hype 300 e controle (p=0,033) e entre paro 5 e controle (p=0,020), o que corrobora com os resultados do teste de esquiva ao predador, sugerindo um possível efeito tipo panicolítico dessas drogas. Por outro lado, os comportamentos de avaliação de risco observados nesse teste não sofreram qualquer modificação depois do tratamento por 21 dias: nº de paradas [H(3,59)=1,958; p>0,01], nº de orientações [H(3,59)=2,798; p>0,1] e nº de reversões [H(3,59)=1,895; p>0,1].

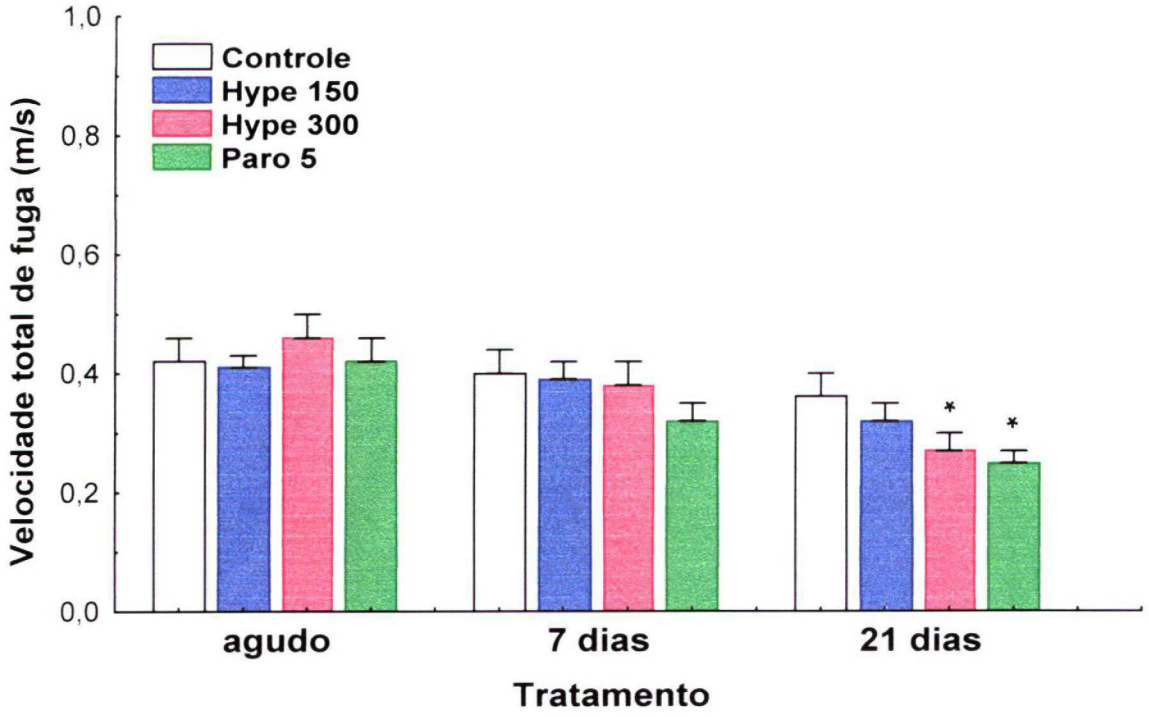



**Fig. 24** - Efeito do tratamento agudo, subcrônico (7 dias) e crônico (21 dias), v.o., com veículo (controle), H. perforatum 150 mg/Kg (hype 150), 300 mg/Kg (hype 300) paroxetina 5 mg/Kg (paro 5) na Velocidade Total de Fuga na BTDC. Dados representam média ± EPM. * $p<0,05$ quando comparado com o controle.

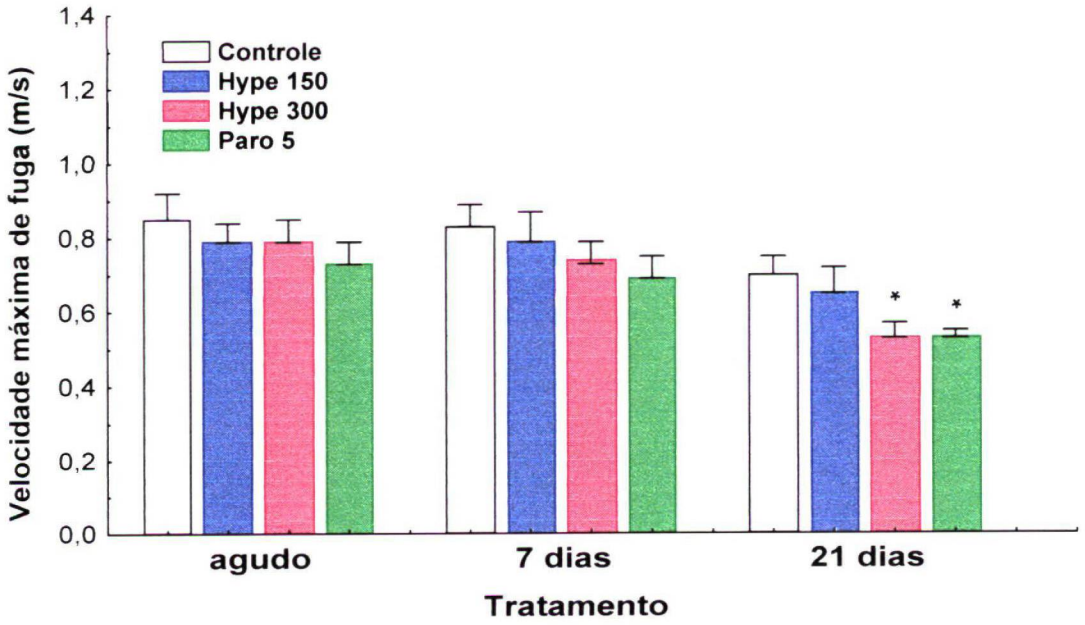



**Fig. 25** - Efeito do tratamento agudo, subcrônico (7 dias) e crônico (21 dias), v.o., com veículo (controle), H. perforatum 150 mg/Kg (hype 150), 300 mg/Kg (hype 300) paroxetina 5 mg/Kg (paro 5) na Velocidade Máxima de Fuga na BTDC. Dados representam média ± EPM. * $p<0,05$ quando comparado com o controle.

**Tabela 7** - Efeito do tratamento agudo, subcrônico (7 dias) e crônico (21 dias), v.o., com veículo (controle), H. perforatum 150 mg/Kg (hype 150), 300 mg/Kg (hype 300) paroxetina 5 mg/Kg (paro 5) nos Parâmetros do Teste de Perseguição e Fuga na BTDC.

| | Parâmetros do Teste de Perseguição/Fuga | | |
|---|---|---|---|
| **Tratamento** | **N° Paradas** | **N° Orientações** | **N° Reversões** |
| **agudo** | | | |
| Controle (n=15) | 11,0 ± 15,5 | 5,0 ± 10,5 | 3,0 ± 10,5 |
| Hype 150 (n=15) | 12,0 ± 16,0 | 5,0 ± 10,0 | 5,0 ± 10,0 |
| Hype 300 (n=15) | 11,0 ± 13,0 | 6,0 ± 8,5 | 4,0 ± 7,5 |
| Paro 5 (n=14) | 10,5 ± 13,0 | 5,0 ± 6,0 | 4,5 ± 8,0 |
| **7dias** | | | |
| Controle (n=150 | 15,0 ± 17,5 | 10,0 ± 14,5 | 4,0 ± 8,5 |
| Hype 150 (n=15) | 15,0 ± 18,0 | 8 ± 11,5 | 1,0 ± 5,5 |
| Hype 300 (n=14) | 14,5 ± 16,5 | 8,0 ± 10,0 | 3,0 ± 4,5 |
| Paro 5 (n=15) | 14,0 ± 18,5 | 10,0 ± 11,5 | 2,0 ± 5,0 |
| **21 dias** | | | |
| Controle (n=16) | 12,5 ± 14,5 | 9,0 ± 11,25 | 1,0 ± 1,0 |
| Hype 150 (n=17) | 15,0 ± 16,5 | 11,0 ± 13,0 | 1,0 ± 1,0 |
| Hype 300 (n=17) | 15,0 ± 18,0 | 12,0 ± 15,5 | 1,0 ± 1,5 |
| Paro 5 (n=16) | 15,5 ± 19,5 | 11,0 ± 15,0 | 2,0 ± 3,0 |

Nota: Dados representam mediana ± SIR.

### 7.3.4 Teste do Beco Inescapável

Mais uma vez, os comportamentos não foram afetados pelo tratamento agudo, ou seja, não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos para o TI [F(3,55)=0,029; p>0,1], para a menor distância rato/camundongo [H(3,59)=0,950; p>0,1] e n° de aproximações/retiradas [H(3,59)=0,301; p>0,1].

O tratamento durante 7 dias induziu uma diferença entre os grupos para o TI [F(3,55)=3,214; p=0,029]. O teste de Newman-Keuls mostrou que o TI do grupo hype 300 foi significantemente maior que o do grupo paro 5 (p=0,040). Ainda, não houve diferença entre os grupos para a menor distância entre rato/camundongo [H(3,59)=7,535; p=0,056] e para o n° de aproximações/retiradas [H(3,59)=5,592; p>0,1].

Após tratamento crônico, não houve diferença entre os grupos para o TI [F(3,62)=1,417; p>0,1] e, em relação à menor distância rato/camundongo, novamente o valor de p manteve-se em um valor limítrofe para a significância [H(3,66)=7,229; p=0,065]. Contudo, a ANOVA de Kruskal-Wallis mostrou que houve diferença estatisticamente significante para o n° de aproximações/retiradas [H(3,66)=9,380; p=0,024]. A análise *a posteriori* apontou que o grupo paro 5

apresentou maior n° de aproximações/retiradas quando comparado com o grupo controle (U=74,0; p=0,041).

**Tabela 8** - Efeito do tratamento agudo, subcrônico (7 dias) e crônico (21 dias), v.o., com veículo (controle), H. perforatum 150 mg/Kg (hype 150), 300 mg/Kg (hype 300) paroxetina 5 mg/Kg (paro 5) nos Parâmetros do Teste do Beco Inescapável na BTDC.

| | Parâmetros do Teste do Beco Inescapável | | |
|---|---|---|---|
| **Tratamento** | **Tempo Imobilidade [a]** | **Menor Distância Rato/Camundongo [b]** | **N° Aproximações/ Retiradas [b]** |
| **agudo** | | | |
| Controle (n=15) | 27,3 ± 3,2 | 40,0 ± 45,0 | 0,0 ± 0,0 |
| Hype 150 (n=15) | 27,6 ± 3,5 | 40,0 ± 50,0 | 0,0 ± 0,0 |
| Hype 300 (n=15) | 28,2 ± 3,1 | 40,0 ± 60,0 | 0,0 ± 0,0 |
| Paro 5 (n=14) | 26,9 ± 2,3 | 40,0 ± 45,0 | 0,0 ± 0,0 |
| **7dias** | | | |
| Controle (n=150) | 26,7 ± 3,0 | 40,0 ± 60,0 | 0,0 ± 0,5 |
| Hype 150 (n=15) | 19,8 ± 3,8 | 40,0 ± 60,0 | 0,0 ± 0,5 |
| Hype 300 (n=14) | 29,8 ± 1,8 | 40,0 ± 0,0 | 0,0 ± 0,0 |
| Paro 5 (n=15) | 17,3 ± 3,7 | 20,0 ± 40,0 | 0,0 ± 0,5 |
| **21 dias** | | | |
| Controle (n=16) | 24,6 ± 2,7 | 40,0 ± 55,0 | 0,0 ± 0,0 |
| Hype 150 (n=17) | 19,4 ± 3,7 | 25,0 ± 45,0 | 0,0 ± 0,0 |
| Hype 300 (n=17) | 20,6 ± 3,2 | 40,0 ± 55,0 | 0,0 ± 0,0 |
| Paro 5 (n=16) | 15,0 ± 3,3 | 0,0 ± 13,75 | 1,0 ± 2,0 * |

Nota: [a] Dados representam média ± EPM; [b] Dados representam mediana ± SIR;
* p<0,05 quando comparado com o grupo controle.

### 7.3.5 Fase de Contato

De maneira semelhante ao que aconteceu com os outros parâmetros mensurados, o tratamento agudo com extrato ou paroxetina não alterou os comportamentos desse teste. A ANOVA de Kruskal-Wallis mostrou que não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos para o n° de mordidas [H(3,59)=2,292; p>0,1], para o n° de vocalizações [H(3,59)=5,354; p>0,1], para o n° de ataques [H(3,59)=1,127; p>0,1] e n° de posturas verticais [H(3,59)=1,671; p>0,1].

O tratamento subcrônico não induziu diferenças estatisticamente significantes entre os grupos para o n° de vocalizações [H(3,59)=0,490; p>0,1], o n° de ataques [H(3,59)=3,036; p>0,1] e o n° de posturas verticais [H(3,59)=1,751; p>0,1]. Em relação ao n° de mordidas, a análise apontou um valor de p limítrofe para o nível de significância [H(3,59)=7,466; p=0,058].

Por último, a ANOVA de Kruskal-Wallis mostrou que não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos após tratamento crônico para o n° de

mordidas [H(3,66)=2,039; p>0,1] e para o nº de vocalizações [H(3,66)=3,300; p>0,1], mas houve para o nº de ataques [H(3,66)=7,956; p=0,046] e para o nº de posturas verticais [H(3,66)=13,334; p=0,004]. O teste U de Mann-Whitney apontou apenas um valor de p próximo ao nível de significância, em relação ao do nº de ataques, entre o grupo paro 5 e o controle (U=78,5; p=0,062). Além disso, o nº de posturas verticais foi significantemente reduzido pelo tratamento com hype 300 (U=47,4; p=0,001) e com paro 5 (U=34,0; p<0,001) quando comparado com o controle, sugerindo um efeito tipo-ansiolítico parcial.

**Tabela 9** - Efeito do tratamento agudo, subcrônico (7 dias) e crônico (21 dias), v.o., com veículo (controle), H. perforatum 150 mg/Kg (hype 150), 300 mg/Kg (hype 300) paroxetina 5 mg/Kg (paro 5) nos Parâmetros da Fase de Contato na BTDC.

| | Parâmetros da Fase de Contato | | | |
|---|---|---|---|---|
| **Tratamento** | **Nº Mordidas** | **Nº Vocalizações** | **Nº Ataques** | **Nº Posturas Verticais** |
| **agudo** | | | | |
| Controle (n=15) | 0,0 ± 1,0 | 4,0 ± 9,0 | 1,0 ± 5,0 | 8,0 ± 10,5 |
| Hype 150 (n=15) | 0,0 ± 0,5 | 2,0 ± 5,5 | 0,0 ± 1,0 | 9,0 ± 13,5 |
| Hype 300 (n=15) | 0,0 ± 0,5 | 0,0 ± 3,5 | 0,0 ± 5,5 | 8,0 ± 12,5 |
| Paro 5 (n=14) | 0,0 ± 0,5 | 0,5 ± 3,0 | 0,5 ± 3,0 | 5,0 ± 9,5 |
| **7dias** | | | | |
| Controle (n=150 | 0,0 ± 0,5 | 11,0 ± 17,5 | 2,0 ± 4,0 | 14,0 ± 17,5 |
| Hype 150 (n=15) | 0,0 ± 0,0 | 5,0 ± 22,0 | 0,0 ± 3,5 | 12,0 ± 20,5 |
| Hype 300 (n=14) | 0,0 ± 0,0 | 11,0 ± 20,5 | 0,0 ± 1,5 | 9,0 ± 13,0 |
| Paro 5 (n=15) | 0,0 ± 0,0 | 2,0 ± 11,5 | 0,0 ± 0,5 | 7,0 ± 13,5 |
| **21 dias** | | | | |
| Controle (n=16) | 0,0 ± 0,0 | 5,0 ± 14,5 | 0,0 ± 0,5 | 24,0 ± 29,25 |
| Hype 150 (n=17) | 0,0 ± 0,0 | 7,0 ± 22,0 | 0,0 ± 0,0 | 8,0 ± 19,0 |
| Hype 300 (n=17) | 0,0 ± 0,0 | 1,0 ± 8,5 | 0,0 ± 0,0 | 10,0 ± 14,5 * |
| Paro 5 (n=16) | 0,0 ± 0,0 | 0,5 ± 4,75 | 0,0 ± 0,0 | 7,0 ± 13,0 * |

Nota: Dados representam mediana ± SIR. * p<0,05 quando comparado com o grupo controle

## 7.4 DISCUSSÃO

### 7.4.1 Pré-Teste (atividade locomotora antes da exposição ao rato) e Pós-Teste (Defesa Contextual)

Os diferentes períodos de tratamento (agudo, subcrônico e crônico) com *H. perforatum* (diferentes doses) e paroxetina não alteraram o nº de linhas cruzadas tanto no Pré-Teste quanto na Defesa Contextual, sugerindo que as drogas não induziram efeitos sedativos/miorrelaxantes ou estimulantes que pudessem interferir com os demais efeitos. Entretanto, essa hipótese só pode ser totalmente afastada a partir da realização de testes específicos para detectar tais efeitos, como a caixa de locomoção espontânea automatizada e o rota-rod. Agudamente, foram avaliados os efeitos da maior dose de extrato e da paroxetina na caixa de locomoção espontânea automatizada. Nenhuma alteração foi observada (dados não publicados).

Como no experimento anterior, a exposição ao predador aumentou o nº de tentativas de escapar na Defesa Contextual em comparação com a experiência prévia (Pré-Teste) na ausência do rato. Entretanto, os diferentes tratamentos com *H. perforatum* e paroxetina não impediram esse aumento e também não foram capazes de reduzir esse comportamento em comparação com o grupo controle.

Estudos anteriores têm demonstrado que BDZs clássicos, como clordiazepóxido e diazepam, bem como novos ansiolíticos, como a gepirona, impedem a potencialização do nº de tentativas de escapar após a remoção do predador, enquanto a droga panicolítica alprazolam, administrado aguda ou cronicamente, falha em conter essa potencialização (GRIEBEL *et al.*, 1994; 1995c). Por outro lado, o clonazepam, droga comprovadamente eficaz no tratamento de ambos, TAG e TP, também é capaz de evitar a potencialização, reforçando a hipótese de que essa medida é sensível especificamente a drogas ansiolíticas. Entretanto, deve-se lembrar que o alprazolam, além de ser eficaz no tratamento do TP, também apresenta eficácia contra o TAG (HOEHN-SARIC *et al.*, 1988; JANICAK *et al.*, 1997; MILLET *et al.*, 1998).

Ainda, Griebel e colaboradores (1995a) mostraram que os tratamentos agudo e crônico com fluoxetina e crônico com imipramina não conseguiram impedir a potencialização das tentativas de escapar, mas reduziram significantemente sua

freqüência quando comparado com o grupo controle, indicando um efeito ansiolítico parcial sobre as respostas defensivas contextuais. Esses últimos resultados estão de acordo com estudos clínicos que descreveram um efeito parcial dos inibidores da recaptação de 5-HT no tratamento do TAG (NUTT; GLUE, 1991; MURPHY *et al.*, 1993). Contrariando esses estudos clínicos, outros estudos observaram que a imipramina apresenta efeito semelhante ao dos BDZs no tratamento do TAG (ANDREATINI *et al.*, 2001; RICKELS *et al.*, 1993; HOEHN-SARIC *et al.*, 1988).

A paroxetina apresentou efeito ansiolítico em estudos clínicos com pacientes com TAG após tratamento repetido (ROCCA *et al.*, 1997; ALLGULANDER *et al.*, 1998). Contrariando as predições, esse ISRS (tratamento agudo, subcrônico e crônico), além de não conter a potencialização do nº de tentativas de escapar, também falhou em reduzir sua freqüência quando comparado com o controle na Defesa Contextual. O extrato de *H. perforatum*, em ambas as doses nos diferentes tratamentos, apresentou um perfil similar, isto é, não apresentou efeito ansiolítico nesses parâmetros.

### 7.4.2 Efeitos das drogas durante a exposição ao predador

#### 7.4.2.1 Fuga

O tratamento agudo com o extrato de *H. perforatum* e paroxetina não alterou o nº e a distância de esquivas e a velocidade total de fuga. Esses resultados diferem daqueles obtidos com o tratamento agudo com imipramina e fluoxetina, que facilitou as reações de fuga ao predador na BTDC. Estudos clínicos descreveram que no início do tratamento com inibidores da recaptação de 5-HT, pode ocorrer um aumento da freqüência e severidade de ataques de pânico em pacientes com TP (VAN PRAAG, 1988; WESTENBERG; DEN BOER, 1988; KAHN; MOORE, 1993). Portanto, os efeitos ansiogênicos da imipramina e fluoxetina seguido do tratamento agudo estão de acordo com esses estudos clínicos.

Por outro lado, deve-se ressaltar o fato de que apenas uma parcela dos pacientes relata efeitos ansiogênicos no início do tratamento do TP com antidepressivos, e que, na maior parte dos casos, esse efeito indesejado pode ser evitado com baixas doses iniciais dessas drogas. Além disso, estudos clínicos sobre

a eficácia e tolerabilidade da paroxetina no TP não têm descrito um aumento da ansiedade no início do tratamento (LECRUBIER *et al.*, 1997a; LECRUBIER *et al.*, 1997b; GUNASEKARA *et al.*, 1998), de forma que os efeitos do tratamento agudo com paroxetina sobre os comportamentos de fuga na BTDC e no LTE (experimento 3) estão de acordo com os efeitos clínicos da droga.

Após tratamento crônico (21 dias) com paroxetina e com a maior dose do extrato, ocorreu diminuição estatisticamente significante para a distância e o nº de esquivas e a velocidade total de fuga, sugerindo um efeito antipânico.

Vários experimentos e estudos clínicos anteriores apóiam e reforçam a hipótese de que esses comportamentos são especificamente sensíveis a drogas panicogênicas e panicolíticas. Nesse sentido, Griebel e colaboradores (1995a) demonstraram que apenas o tratamento crônico (21 dias) com imipramina ou fluoxetina, reduz as reações de fuga ao predador na BTDC. Os BDZ de alta potência, clinicamente eficazes no tratamento do TP, alprazolam (tratamento crônico) e clonazepam (tratamento agudo) induzem reduções similares (GRIEBEL *et al.*, 1995c,1996a). Ao contrário, BDZ clássicos, como diazepam e clordiazepóxido, e representantes de novas classes de ansiolíticos, como gepirona, utilizados no tratamento do TAG e ineficazes no TP, não alteram os comportamentos de fuga em doses que não prejudicam a atividade locomotora (GRIEBEL *et al.*, 1995d; 1996a). Mais ainda, a ioimbina, um antagonista $\alpha_2$-adrenérgico que induz pânico (CHARNEY, 1984) e, o flumazenil, um antagonista BDZ que provoca ataques de pânico em voluntários normais (LAVIE, 1987) e aumenta a freqüência de ataques de pânico em pacientes com TP (NUTT *et al.*, 1990), potencializam as reações de fuga frente ao predador na BTDC (BLANCHARD *et al.*, 1993; GRIEBEL *et al.*, 1995b). A esses resultados, soma-se a sugestão de que sintomas de pânico são devido a uma ativação patológica espontânea de mecanismos neurais relacionados com reações de fuga (GRAEFF, 1990; DEAKIN; GRAEFF, 1991; DEAKIN *et al.*, 1991).

Em relação a outros modelos animais de pânico, os efeitos do tratamento crônico com *H. perforatum* e paroxetina nas reações de fuga na BTDC corroboram com os obtidos na tarefa de fuga do LTE após 7 dias de tratamento. Também estão de acordo com os efeitos clínicos da paroxetina no TP (LECRUBIER *et al.*, 1997a; LECRUBIER *et al.*, 1997b; GUNASEKARA *et al.*, 1998; PERNA *et al.*, 2001).

A maior dose do extrato e a paroxetina, após tratamento crônico, diminuíram também a velocidade máxima de fuga na BTDC. Griebel *et al.* (1995c) propuseram que essa medida, em conjunto com o nº de linhas cruzadas no Pré-Teste, seriam um índice da atividade locomotora dos animais. Como nº de linhas cruzadas não foi alterado por esses tratamentos, a possibilidade de prejuízo motor está parcialmente afastada.

7.4.2.2 Avaliação de Risco

A avaliação de risco é considerada um comportamento defensivo principal, pois facilita a aquisição de informações que levam a intensificação (estímulo ameaçador presente) ou a uma diminuição de comportamentos defensivos (estímulo ameaçador ausente). Existem, contudo, algumas diferenças nos comportamentos de avaliação de risco entre ratos e camundongos (citadas no experimento anterior) que levam a diferenças no efeito de drogas ansiolíticas (BLANCHARD *et al.*, 1997). Em ratos, drogas ansiolíticas aumentam a avaliação de risco que ocorre em um contexto no qual ocorre "freezing" e esse comportamento está suprimido (Teste do Beco Inescapável) e diminuem a avaliação de risco em situações menos ameaçadoras nas quais esse comportamento é um componente basal (Teste de Perseguição/Fuga). Em camundongos Swiss-Webster, ocorre uma falha na supressão da avaliação de risco em situações altamente ameaçadoras, de maneira que é possível predizer que drogas ansiolíticas diminuem esse comportamento tanto no Teste de Perseguição/Fuga quanto no Teste do Beco Inescapável (BLANCHARD *et al.*, 1997). Também foram observados diferentes padrões de efeitos das drogas ansiolíticas na avaliação de risco. Ansiolíticos BDZs reduzem preferencialmente comportamentos de avaliação de risco no Teste de Perseguição/Fuga. Já os ansiolíticos agonistas 5-$HT_{1A}$ diminuem principalmente os comportamentos do Teste do Beco Inescapável. Em conjunto, esses dados sugerem que ocorrem diferentes modulações neurofisiológicas, havendo diferenças entre a ansiedade sensível aos BDZs e aquela sensível aos agonistas 5-$HT_{1A}$ (BLANCHARD *et al.*, 1997).

Os resultados do presente estudo mostram que os diferentes períodos de tratamento com o extrato e com a paroxetina falharam em alterar os comportamentos de avaliação de risco do Teste de Perseguição/Fuga. Esses efeitos diferem dos efeitos da imipramina e fluoxetina, que após tratamento crônico,

reduziram ambos, o nº de paradas e o nº de orientações (GRIEBEL *et al.*, 1995a). Nesse caso, levanta-se a hipótese de um efeito falso negativo da paroxetina no teste, haja vista seu mecanismo de ação e perfil clínico semelhantes ao da fluoxetina.

Por outro lado, no Teste do Beco Inescapável, enquanto o *H. perforatum* não apresentou nenhum efeito, a administração de paroxetina por 21 dias aumentou significantemente o nº de aproximações/retiradas e também diminuiu a distância rato/camundongo, embora essa última diferença não tenha sido estatisticamente significante. Recentemente, o grupo de pesquisadores que trabalha com a BTDC está utilizando camundongos Swiss (outra cepa) e não camundongos Swiss-Websters em alguns experimentos (GRIEBEL *et al.*, 1999a, 1999b). Eles observaram que essa cepa de camundongos comporta-se de maneira semelhante aos ratos em relação aos comportamentos de avaliação de risco, observando que o diazepam aumenta o nº de aproximações/retiradas (Teste do Beco Inescapável), efeito interpretado como tipo-ansiolítico. Em outro estudo com camundongos Swiss, eles observaram que a fenelzina, um IMAO não seletivo que apresenta potencial efeito antipânico (ASHAK RAJ; SHEEHAN, 1995), também aumentou o nº de aproximações/retiradas, apresentando um efeito tipo-ansiolítico parcial (GRIEBEL *et al.*, 1998b) na BTDC. Dessa forma, pode-se interpretar o efeito da paroxetina sobre o nº de aproximações/retiradas de camundongos Swiss como ansiolítico parcial.

7.4.2.3 Ameaça e Ataque Defensivo

Quando o contato com o predador foi forçado, os tratamentos agudo e subcrônico com *H. perforatum* e paroxetina não induziram alteração alguma. Por contraste, o tratamento crônico com ambas as drogas reduziu significantemente o nº de posturas verticais, mas não os outros comportamentos de ameaça e ataque defensivo. Um perfil diferente foi observado com outras drogas antipânico: o tratamento agudo com imipramina e fluoxetina potencializou os ataques defensivos, enquanto o tratamento crônico reduziu o nº de mordidas (GRIEBEL *et al.*, 1995a). Estudos anteriores com ansiolíticos tradicionais e atípicos sugerem que a diminuição desses comportamentos é sensível a essas classes de drogas. Dessa forma, a maior dose do extrato de *H. perforatum* e a paroxetina apresentaram um efeito tipo-ansiolítico parcial nesse teste.

# 8 CONCLUSÕES

A tabela 10 resume os resultados desse estudo.

**Tabela 10** – Resumo dos resultados dos efeitos do *H. perforatum,* da Paroxetina e do Clonazepam no LTE, na BTDC e no Campo Aberto.

| Medidas relacionadas ao TAG | Modelo Animal[a] | Tratamento[b, c] | Hypericum 300 mg/Kg | Paroxetina 5 mg/Kg | Clonazepam agudo [b] |
|---|---|---|---|---|---|
| Esquiva inibitória | LTE | 7 dias | + | 0 | + |
| N° Tentativas de Escapar | BTDC | 21 dias | 0 | 0 | + |
| Atividades de Avaliação de Risco (p. ex. paradas, orientações, aproximações/ retiradas) | BTDC | 21 dias | 0 | +/- | + |
| Tempo de Imobilidade | BTDC | 21 dias | 0 | 0 | - |
| Comportamentos de Ameaça/Ataque defensivo (mordidas, vocalizações, ataques e posturas verticais) | BTDC | 21 dias | +/- | +/- | + |
| **Medidas relacionadas ao TP** | | | | | |
| Fuga | LTE | 7 dias | + | + | + |
| N° de Esquivas | BTDC | 21 dias | + | + | + |
| Distância de Esquiva | BTDC | 21 dias | + | + | + |
| Velocidade Total de Fuga | BTDC | 21 dias | + | + | - |
| **Medidas relacionadas à atividade locomotora** | | | | | |
| N° de Linhas Cruzadas | BTDC | 21 dias | 0 | 0 | 0 |
| Atividade Lomotora Central e Periférica | Campo Aberto | 7 dias | 0 | 0 | |

Notas: + Droga apresentou efeito; +/- Droga apresentou efeito parcial; [0] Droga não apresentou efeito; - Droga prejudicou o comportamento; [a] LTE = ratos, BTDC = camundongos [b] Os resultados do tratamento com H. perforatum 150 mg/Kg e paroxetina 10 mg/Kg não estão representados porque essas doses não apresentaram efeito. [c] O tratamento de 21 dias de animais submetidos ao LTE não induziu nenhum efeito. [c] Os resultados do clonazepam no LTE foram realizados por BAZZI *et al.* (2001).

Tanto o extrato de *H. perforatum* como a paroxetina apresentaram efeito antipânico na tarefa de fuga do LTE, após tratamento subcrônico (7 dias), em doses que não alteraram a atividade locomotora no Campo Aberto. Esses resultados corroboram parcialmente com aqueles encontrados na BTDC, onde ambas as drogas apresentaram um perfil semelhante ao de drogas panicolíticas, reduzindo significantemente as reações de fuga ao predador.

A dose de 300 mg/Kg do extrato e a paroxetina reduziram parcialmente a esquiva inibitória do LTE após tratamento subagudo e somente o extrato apresentou o mesmo efeito após 7 dias de administração, sugerindo um efeito ansiolítico. A paroxetina ainda reduziu alguns comportamentos de avaliação de risco e, tanto esse ISRS quanto o extrato de *H. perforatum*, diminuíram parcialmente os comportamentos defensivos exibidos no contato com o rato.

Como um todo, os dados sugerem um efeito antipânico após tratamento repetido com *H. perforatum* e paroxetina. Ainda, apontam um potencial efeito ansiolítico, embora mais estudos sejam necessários para apoiar essa hipótese.

O extrato de *H. perforatum* apresentou um perfil semelhante ao da paroxetina, uma droga clinicamente eficaz no tratamento do TP e potencialmente eficaz no TAG, o que indica a possibilidade desses efeitos do extrato serem mediados pelo sistema serotoninérgico. Entretanto, o mecanismo de ação do *H. perforatum* ainda não foi completamente elucidado. Existem inúmeras possibilidades e vários constituintes ativos já foram detectados, de forma que se torna necessário a realização de novos estudos para delinear qual o mecanismo de ação responsável pelos seus efeitos antipânico e ansiolítico.

Outro tópico que necessita de estudos adicionais é a ausência de efeito do extrato de *H. perforatum* e da paroxetina após 21 dias de tratamento no LTE.

Além disso, os resultados do LTE proporcionam dados adicionais para a validação farmacológica (paroxetina) da fuga como um modelo animal de pânico e apontam para o fato de que o método modificado para medir esse parâmetro pode ser mais sensível ao efeito antipânico de drogas do que o método tradicional.

Outra contribuição do presente estudo é a efetiva validação farmacológica da BTDC em nosso laboratório, que permitirá seu posterior emprego no estudo de outras drogas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEL, E. L.; BILITZKE, J. A possible alarm substance in the forced swimming test. *Physiology and Behavior,* v. 48, n. 2, p. 233-239, 1990.

ALLGULANDER, C. *et al.* Changes on the temperament and character inventory after paroxetine treatment in volunteers with generalized anxiety disorder. *Psychopharmacoly Bulletin,* v. 34, p. 165-166, 1998.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. Fourth edition. Washington: American Psychiatric Association, 1994.

ANDREATINI, R.; GALDURÓZ, J.C.F. Transtorno de pânico: uma proposta para o tratamento farmacológico. *Temas,* v. 49, p. 72-82, 1995.

ANDREATINI, R.; LEITE, J.R. Evidence against the involvement of acth crf release or corticosteroid receptors in the anxiolytic effect of corticosterona. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research,* v. 27, n. 5, p. 1237-1241, 1994.

ANDREATINI, R.; BACELAR, L.F.S. The relation between anxiety and depression in animal models: a study using the forced swimming test and elevated plus-maze. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research,* v. 32, n. 9, p. 1121-1126, 1999.

ANDREATINI, R.; BOERNGEN-LACERDA, R.; ZORZETTO FILHO, D. Tratamento farmacológico do transtorno de ansiedade generalizada: perspectivas futuras. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, v. 23, n. 4, p. 233-242, 2001.

ASHOK RAJ, B.; SHEEHAN, D.V. Somatic treatment strategies in panic disorder. In: Asnis, G.M.; Van Praag, H.M. (Ed.). *Panic disorder: Clinical, Biological and Treatment Aspects.* New York: Wiley, 1995. p. 279-313.

BACTZ, M.; BOWEN, R.C. Efficacy of divalproex sodium in patients with panic disorder and mood instability who have not responded to conventional therapy. *Canadian Journal of Psychiatry*, v. 43, n. 1, p. 73-77, 1998.

BAKISH, D. *et al.* Reversible monoamino oxidase-A inhibitors in panic disorder. *Clinical Neuropharmacology,* v. 16, n.2, p. S77-S82, 1993.

BALLENGER, J.C. *et al.* Alprazolam in panic disorder and agoraphobia: results from a multicenter trial. I. Efficacy in short-term treatment. *Archives of General Psychiatry,* v. 45, p. 413-22, 1988.

BALLENGER, J.C. Panic disorder: efficacy of current treatments. *Psychopharmacology Bulletin*, v. 29, p. 477-486, 1993.

BARNES, J. *et al.* Herbal medicines. A guide of health-care professionals. CD-ROM Complementary and Alternative medicine micromedex series, 2000.

BARROS, H.M.T. *et al.* Effect of sodium valproate in the open-field behavior of rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 25, p. 281-287, 1992.

BAZZI, M.; BEIJAMINI, V.; ANDREATINI, R. Efeitos do diazepam e do clonazepam no Labirinto em T Elevado. In: XVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2001, Caxambu. *Anais da XVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental.* Caxambu: Federação das Sociedades de Biologia Experimental, 2001. p. 369.

BEIJAMINI, V. *et al.* The effect of oxcarbazepine on behavioural despair and learned helplessness. *European Journal of Pharmacology,* v. 347, p. 23-27, 1998.

BEIJAMINI, V. *et al.* The elevated T maze for mice: the effect of diazepam, clomipramine and sodium valproate. In: Latinamerican congress of pharmacology, XVI, 2000, Águas de Lindóia. *Anais do XVI Latinamerican congress of pharmacology.* Águas de Lindóia: Associação Latinoamericana de Farmacologia, 2000. p. 104.

BENNETT, J.A. *et al.* A risk benefit assessment of pharmacological treatments for panic disorder. *Drug Safety*, v. 18, n. 6, p. 419-430, 1998.

BENJAMIN, J. *et al.* Double-blind, placebo-controlled, crossover trial of inositol treatment for Panic disorder. *American Journal of Psychiatry*, v. 152, n. 7, p. 1084-6, 1995.

BERNARDI, M.M.; PALERMO NETO, J. Atividade geral: conceitos e medidas. *Psicologia,* v.6, n. 1, p. 43-55, 1980.

BHATTACHARYA, S.K., CHAKRABARTI, A.; CHATTERJEE, S.S. Activity profiles of two hyperforin-containing hypericum extracts in behavioral models. *Pharmacopsychiatry,* v. 31, supl., p. 22-29, 1998.

BIFFIGNANDI, P.M.; BILIA, A.R. The growing knowledge of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L) drug interactions and their clinical significance. *Current Therapeutic Research,* v. 61, n. 7, 2000.

BLANCHARD, R.J. *et al.* Yoimbine potentiates active defensive responses to threatening stimuli in swiss-webster mice. *Pharmacology and Biochemistry Behavior,* v. 44, p. 673-681, 1993.

BLANCHARD, R.J. *et al.* Differentiation of anxiolytic and panicolytic drugs by effects on rat and mouse defense test batteries. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v. 21, n. 6, p. 783-9, 1997.

BLANCHARD, R.J. *et al.* Defensive behaviors in wild and laboratory (swiss) mice: the mouse defense test battery. *Physiology and Behavior*, v. 65, n. 2, p. 201-209, 1998.

BLANCHARD, C.; GRIEBEL, G.; BLANCHARD, R.J.. Mouse defensive behaviors: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v. 25, p. 205-218, 2001.

BLIER, P.; DE MONTIGNY, C. Serotonin and drug-induced therapeutic responses in major depression, obsessive-compulsive and panic disorders. *Neuropsychopharmacology,* v. 21, n. 2S, p. 91S-98S, 1999.

BLUMENTHAL, M. *et al.* The complete German Commission E monographs: therapeutic guide to herbal medicines. Boston: American Botanical Council, 1998.

BOMBARDELLI, E.; MORAZZONI, P. *Hypericum perforatum. Fitoterapia*, v. 66, p. 43-68, 1995.

BORSINI, F.; MELI, A. Is the forced swimming test a suitable model for revealing antidepressant activity ? *Psychopharmacology*, v. 94, p. 147-160, 1988.

BOVE, G.M. Acute neuropathy after exposure to sun in a patient treated with St Jonh's wort. *Lancet*, v. 352, p. 1121-1122, 1998.

BOYER, W. Serotonin uptake inhibitors are superior to imipramine and alprazolam in alleviating panic attacks: a meta-analysis. *International Clinical Psychopharmacolpgy*, v. 10, p. 45-49,1995.

BRENNER, R. *et al.* Comparison of an extract of hypericum (LI-160) and sertraline in the treatment of depression: a double-blind, randomized pilot study. *Clinical Therapeutics*, v. 22, p. 411-419, 2000.

BROCKMOLLER J. Hypericin and pseudohypericin: pharmacokinetics and effects on photosensitivity in humans. *Pharmacopsychiatry,* v. 30, p. 94-101, 1997.

BULLER, Reversible inhibitors of monoamine oxidase A in anxiety disorders. *Clinical Neuropharmacology,* v. 18, supl. 2, p. S38-S44, 1995.

BURNET, P.W.J. *et al.* The effect of chronic imipramine administration on the densities of 5-$HT_{1A}$ and 5-$HT_2$ receptors and the abundances of 5-HT receptors and transporter mRNA in the cortex, hippocampus and dorsal raphe of three strains of rat. *Brain Research,* v. 638, p. 311-324, 1994.

BUTTERWECK, V. *et al.* Effects of total extract and fractions of *Hypericum perforatum* in animal assays for antidepressant activity. *Pharmacopsychiatry*, v. 30, p. 117-124, 1997.

BUTTERWECK, V. *et al.* Solubilized hypericin and pseudohypericin from *Hypericum perforatum* exert antidepressant activity in the forced swimming test. *Planta Medica,* v. 64, p. 291-294, 1998a.

BUTTERWECK, V. *et al.* Effects of total extract and fractions of *Hypericum perforatum* in animal assays for antidepressant activity. Pharmacopsychiatry, v. 30, p. 117-124, 1998b.

CADOGAN, A.K. *et al.* Repeated paroxetine administration in the rat produces a decreased [$^3$H]-ketanserin binding and an anxiolytic profile in the elevated x-maze. *British Journal of Pharmacology,* v. 107, p. 108, 1992.

CALAPAI, G. *et al.* Effects of Hypericum perforatum on levels of 5-hydroxitryptamine, noradrenaline and dopamine in the cortex, diencephalon and brainstem of the rat. *Journal of Pharmacy and Pharmacology,* v. 51, p. 573-728, 1999.

CALAPAI, G. *et al.* Interleukina-6 involvement in antidepressant actino of Hypericum perforatum. *Pharmacopsychiatry*, v.34, supl. 1, p. S8-S10, 2001.

CHARNEY, D.S.; HENINGER, G.R.; BREIER, A. Noradrenergic function in panic anxiety. Effects of yohimbine in healthy subjects and patients with agoraphobia and panic disorder. *Archives of General Psychiatry*, v. 41, p. 751-763, 1984.

CHARNEY, D.S. *et al.* Serotonin function in anxiety. II. Effects of the serotonina agonist mCPP in panic disorder patients and healthy subjects. *Psychopharmacology*, v. 92, p. 14-24, 1987.

CHATTERJEE, S.S. *et al.* Hyperforin as a possible antidepressant component of hypericum extracts. *Life Science,* v. 63, n. 6, p. 499-510, 1998a.

CHATTERJEE, S.S. *et al.* Antidepressant activity of *Hypericum perforatum* and Hyperforin: the neglected possibility. *Pharmacopsychiatry,* v. 31 supl., p. 7-15, 1998b.

CHATTERJEE, S.S. *et al.* Hyperforin attenuate various ionic conductance mechanisms in the isolated hippocampal neurons of rat. *Life Science*, v. 65, p. 2395-2405, 1999.

CHATTERJEE, S.S.; BIBER, A.; WEIBEZAHN, C. Stimulation of glutamate, aspartate and gamma-aminobutyric acid release from synaptosomes by hyperforin. *Pharmacopsychiatry*, v. 34, supl. 1, p. S11-S19, 2001.

CHOPIN, P.; BRILEY, M. The elevated plus-maze test: a new behavioural test of anxiety. *Pre-clinical Strategies Psychopharmacology,* p. 5, 1987. Resumo.

COLETA, M. *et al.* Comparative evaluation of Melissa officinalis L., Tilia europaea, Passiflora edulis Sims. and Hypericum perforatum L. in the elevated plus maze anxiety test. *Pharmacopsychiatry,* v. 34, supl. 1, p. S20-S21, 2001.

CORBETT, R. *et al.* GABAmimetic agents display anxiolytic-like effects in the social Interaction and elevated plus-maze procedures. *Psychopharmacology*, v. 104, n. 3, p. 312-316, 1991.

CORDÁS, R.T. *et al.* Tratamento farmacológico dos transtornos ansiosos. In: GENTIL, V.; LOTUFO-NETO, F. (Ed.). *Pânico, Fobias e Obsessões*. São Paulo: Edusp, 1994. p. 138-152.

COTT, J.M. In vitro receptor binding and enzime inhibition by *Hypericum perforatum* extract. *Pharmacopsychiatry,* v. 30, p. 108-112, 1997.

COTT, J.M.; FUGH-BERMAN, A. Is St. Jonh's wort (Hypericum perforatum) an effective antidepressant? *Journal of Nervous and Mental Disease*, v. 186, n. 8, p. 500-501, 1998.

COWLEY D.S.; HÁ, E.H.; ROY-BYRNE, P.P. Determinants of pharmacological treatment failure in panic disorder. *Journal of Clinical Psychiatry,* v. 58, n. 12, p. 555-561, 1997.

DALVI, A; RODGERS, R.J. GABAergic influences on plus-maze behaviour in mice. *Psychopharmacology,* v. 128, n. 4, p. 380-397, 1996.

DE SMET, P.A.G.M.; NOLEN, W.A. St John's wort as an antidepressant. *British Medical Journal,* v. 313, p. 241-242, 1996.

DEN BOER, J.A.; WESTENBERG, H.G. Effect of a serotonin and noradrenaline uptake inhibitor in panic disorder; a double-blind comparative study with fluvoxamine and maprotiline. *International Clinical Psychopharmacology,* v. 3, n. 1, p. 59-74, 1988.

DEN BOER, J.A.; WESTENBERG, H.G.M. Serotonin function in panic disorder: a double-blind placebo controlled study with fluvoxamine and ritanserin. *Psychopharmacology*, v. 102, p. 85-94, 1990.

DEAKIN, J.F.W. *et al.* 5-HT receptor mechanisms in human anxiety. In: BRILEY, M.; FILE, S.E. (Ed.). *New Concepts in Anxiety.* New York: CRC Press, 1991. p. 74-93.

DEAKIN, J.F.W.; GRAEFF, F.G.. 5-HTand mechanisms of defense. *Journal of Psychopharmacology*, v.5, p. 305-315, 1991.

DELTITO, J.; BEYER, D. The scientific, quasi-scientific and popular literature on the use of St. John's wort in the treatment of depression. *Journal of Affective Disorders,* v. 51, p. 345-351, 1998.

DI CARLO, G. *et al.* St. John's wort: prozac from the plant kingdom. *TRENDS in Pharmacological Science,* v. 22, n. 6, p. 292-297, 2001.

DI MATTEO, V. *et al.* Effect of acute administration of Hypericum perforatum-$CO_2$ extract on dopamine and serotonina release in the rat central nervous system. *Pharmacopsychiatry*, v. 33, p. 14-18, 2000.

DIMPFEL, W.; SCHOBER, F.; MANNEL, M. Effects of methanolic extract and a hyperforin-enriched $CO_2$ extract of St Jonh's wort (Hypericum perforatum) on intracerebral field potentials in the freely moving rat (tele-stereo-EEG). *Pharmacopsychiatry,* v. 31, p. 30-35, 1998.

DUNNER, D.L. *et al.* Effect of alprazolam and diazepam on anxiety and panic disorder: a controlled study. *Journal of Clinical Psychopharmacology,* v. 47, p. 458-460, 1986.

DUNBAR, G. *et al.* A fixed dose study of paroxetine (10 mg, 20 mg, 40 mg) and placebo in the treatment of panic disorder. *European Neuropsychopharmacology,* v. 5, n. 3, p. 361, 1995a.

DUNBAR, G.; JUDGE, R. *et al.* Long-term evaluation of paroxetine, clomipramine and placebo in panic disorder. *European Neuropsychopharmacology,* v. 5, n. 3, p. 361, 1995b.

DUXON, M.S.; STARR, K.R.; UPTON, N. Latency to paroxetine-induced anxiolysis in the rat is reduced by co-administration of the 5-$HT_{1A}$ receptor antagonist WAY100635. *British Journal of Pharmacology.,* v. 130, p. 1713-1719, 2000.

ERNST, E. St Jonh's wort, an antidepressant? A systematic, criteria-base review. *Phytomedicine* , v. 2, p. 67-71, 1995.

ERNST, E.; RAND, J.I.; STENVISON, C. Complementary therapies for depression – an overview. *Archives of General Psychiatry,* v. 55, n. 11, p. 1026-1032, 1998a.

ERNST, E. *et al.* Adverse profile of the herbal antidepressant St John's wort (Hypericum perforatum L). *European Journal of Clinical Pharmacology*, v. 54, n. 8, p. 589-594, 1998b.

ERNST, E. Second thoughts about safety of St John's wort. *Lancet,* v. 354, p. 2014-2015, 1999.

FELIG, P.; BAXTER, J.D.; FROHMAN, L.A. (ed.*). Endocrinology and metabolism.* 3. ed. New York: McGraw-Hill, 1995.

FISUNOV, A. *et al.* Hyperforin modulates gating of P-type $Ca^{2+}$ current in cerebellar Purkinjie neurons. *Pflugers Archives of European Journal of Physiology,* v.440, p. 427-434, 2000.

FLAUSINO JR., O. *et al.* Effects of *Hypericum. perforatum* L. (LI-160) on anxiety related responses in rats. In: XVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2001, Caxambu. *Anais da XVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental.* Caxambu: Federação das Sociedades de Biologia Experimental; 2001. p.439.

FONTANA, D.J.; COMISSARIS, R.L. Effects of acute and chronic imimpramine administration on conflict behavior in the rat: a potential "animal model" for the study of panic disorder? *Psychopharmacology,* v. 7, p. 118-119, 1988.

FONTANA, D.J. *et al.* Effects of acute and chronic anti-panic drug administration on conflict behavior in the rat. *Psychopharmacology*, v. 98, p. 157-162, 1989.

FRANKLIN, M.; COWEN, P.J. Researching the antidepressant actions of Hypericum perforatum (St. John's wort) in animals and man. *Pharmacopsychiatry,* v. 34, supl. 1, p. S29-S37, 2001.

FULLER, R.W. Microdialysis studies with 5-HT reuptake inhibitors. *Trends in Pharmacological Science,* v. 14, p. 397, 1993.

FULLER, R.W. Uptake inhibitors increase extracellular serotonin concentration measured by brain microdialysis. *Life Science,* v. 55, p. 163-167, 1994.

GAMBARANA, C. *et al.* Possible antidepressant activity of Hypericum perforatum. *Journal of Neurochemistry,* v. 71, supl., p. S23, 1998.

GAMBARANA, C. *et al.* Efficacy of an *H. perforatum* (St. John's wort) extract in preventing and reverting a condition of escape deficit in rats. *Neuropsychopharmacology,* v. 21, n. 2, p. 247-257, 1999.

GASTER, B.; HOLROYD, J. St. John's wort for depression: a systematic review. *Archives of International Medicine*, v. 160, p. 152-156, 2000.

GOBBI, M. *et al.* Hypericum perforatum L. Extract does not inhibit 5-HT transporter in rat brain cortex. *Naunyn-Shmiedeberg's Archives of Pharmacology,* v. 360, p. 262-269, 2000.

GOLDBERG, R.J. Diagnostic dilemmas presented by patients with anxiety and depression. *American Journal of Medicine,* v. 98, p. 278-284, 1995.

GORMAN, J.M. *et al.* An open trial of fluoxetine in the treatment of panic attacks. *Journal of Clinical Psychopharmacology,* v. 7, p. 329-332, 1987.

GRAEFF, F.G. Brain defense system and anxiety. In: BURROWS, G.D.; ROTH, M.; NOYES, R. Jr. (Ed.). *Handbook of anxiety*, v. 3. The neurobiology of anxiety. Amsterdam: Elsevier, 1990. p. 307-343.

GRAEFF, F.G. Neurotransmitters in the dorsal periaqueductal grey and animal models of panic disorder. In: BRILEY, M.; FILE, S.E. (Ed.). *New concepts in anxiety.* New York: CRC Press, 1991. p. 288-307.

GRAEFF, F.G.; VIANA, M.B.; TOMAZ, C. The elevated T maze, a new experimental model of anxiety and memory: effect of diazepam. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research,* v. 26, p. 67-70, 1993.

GRAEFF, F.G.; VIANA, M.B.; MORA, P.O. Opposed regulation by dorsal raphe nucleus 5-HT pathways of two types of fear in the elevated T maze. *Pharmacology Biochemistry and Behavior,* v. *53*, n. 1, p. 171-177, 1996.

GRAEFF, F.G. *et al.* The elevated T-maze as an experimental model of anxiety. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v. 23, p. 237-246, 1998.

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

GRIEBEL, G. *et al.* Attenuation of antipredator defensive behavior in Swiss-Webster mice following acute and chronic treatmente with chlordiazepoxide and alprazolam. *Soc. Neuroscience,* p. 811,1994. Resumo.

GRIEBEL, G. *et al.* Differential modulation of antipredator defensive behavior in Swiss-Webster mice following acute and chronic treatment with imipramine and fluoxetine. *Psychopharmacology,* v. 120, p. 57-66, 1995a.

GRIEBEL, G. *et al.* A model of 'antipredator' defense in Swiss-Webster mice: effects of benzodiazepine receptor ligands with different intrinsic activities. *Behavioural Pharmacology,* v. 6, p. 732-745, 1995b.

GRIEBEL, G. *et al.* Further evidence that the mouse defense test battery is useful for screening anxiolytic and panicolytic drugs: effects of acute and chronic treatment with alprazolam. *Neuropharmacology,* v. 34, n. 12, p. 1625-33, 1995c.

GRIEBEL, G. *et al.* 5-$HT_{1A}$ agonists modulates mouse antipredator defensive behavior differently from the 5-$HT_{2A}$ antagonist pirenperone. *Pharmacology Biochemistry and Behavior,* v. 51,n. 2/3, p. 235-44, 1995d.

GRIEBEL, G.; SANGER, D.J.; PERRAULT, G. The mouse defense test battery: evaluation of the effects of non-selective and BZ-1 ($\omega$1) selective, benzodiazepine receptor ligands. *Behavioral Pharmacology,* v. 7, p. 560-572, 1996a.

GRIEBEL, G.; BLANCHARD, D.C.; BLANCHARD, R.J. Evidence that the behaviors in the mouse defense test battery relate to different emotional states: a factor analytic study. *Physiology and Behavior,* v. 60, n. 5, p. 1255-60, 1996b.

GRIEBEL, G.; BLANCHARD, D.C.; BLANCHARD, R.J. Predator-elicited flight responses in Swiss-Webster mice: an experimental model of panic attacks. *Progress in Neuro-Psypharmacology & Behavioral Psychiatry,* v. 20, p. 185-205, 1996c.

GRIEBEL, G.; PERRAULT, G.; SANGER, D.J. Behavioral profiles of the reversible monoamine-oxidase-A inhibitors beflaxotane and moclobemide in na experimental model for screening anxiolytic and anti-panic drugs. *Psychopharmacology,* v. 131, n. 2, p. 180-6, 1997.

GRIEBEL, G. *et al.* Behavioral effects of phelnezine in an experimental model for screening anxiolytic and anti-panic drugs: correlation with changes in monoamine-oxidase activity and monoamine levels. *Neuropharmacology,* v. 27, p. 927-35, 1998a.

GRIEBEL, G. *et al.* Benzodiazepine and serotonerg modulation of antipredator and conspecific defense. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews,* v. 22, n. 5, p. 597-612, 1998b.

GRIEBEL, G. *et al.*. Behavioural profiles in the mouse defense test battery suggest anxiolytic potential of 5-$HT_{1A}$ receptor antagonists. *Psychopharmacology*, v. 144, p. 121-130, 1999a

GRIEBEL, G. *et al.* Differences in anxiolytic-like profile of two novel nonenzodiazepine BZ (ω) receptor agonists on defensive behaviors of mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior,* v. 62, n. 4, p. 689-694,1999b.

GUNASEKARA, N. S.; NOBLE, S.; BENFIELD, P. Paroxetine: an update of its pharmacology and therapeutic use in depression and review of its use in other disorders. *Drugs,* v. 55, n. 1, p. 85-120, 1998.

GYERTYAN, I. Analysis of the marble burying response – marbles serve to measure digging rather than evoke burying. *Behavioral Pharmacology,* v. 6, n. 1, p. 24-31, 1995.

HENDRIE, C.A.; NEILL, J.C. An animal model of panic disorder. *Journal of Psychopharmacology*, v. 6, p. 125, 1991.

HANNAH, L. *et al.* St. John's wort for depression: a meta-analysis of well-defined clinical trials. *The Journal of Nervous and Mental Disease,* v. 187, n. 9, p. 532-538, 1999.

HARRER, G. *et al.* Comparison of equivalence between the St. John's wort extract LoHyp-57 and fluoxetina. *Arzneimittelforschung*, v. 49, p. 289-296, 1999.

HASCOET, M. *et al.* Anxiolytic-like effects of antidepressants after acute administration in a four-plate test in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior,* v. 65, n. 2, p. 339-344, 2000a.

HASCOET, M.; BOURIN, M.; DHONNCHADHA, B.A.N. The influence of buspirone, and its metabolite 1-PP, on the activity of paroxetine in the mouse light/dark paradigm and four plates test. *Pharmacology Biochemistry and Behavior,* v. 67, p. 44-53, 2000b.

HEINZE, G.; ONTIVEROS, M. La fitofarmacologia como tratamiento alterno en psiquiatria. *Salud Mental,* v. 21, n. 6, p. 33-42, 1998.

HENDRIÉ, C.A.; NEILL, J.C. An animal model of panic disorder. *Journal of Psychopharmacology,* v. 6, p. 125, 1991.

HERMAN, JB.; ROSENBAUM, J.F.; BROTMAN, A.W. The alprazolam to clonazepam switch for the treatment of panic disorder. *Journal of Clinical Psychopharmacology,* v. *7,* p. 175-8, 1987.

HETEM, L.A. Addition of d-fenfluramine to benzodiazepines produces a marked improvement in refractory panic disorder- a case report. *Journal of Clinical Psychopharmacology,* v. 16, n. 1, p. 77-8, 1996.

HIPPIUS, H. St John's wort (Hypericum perforatum) – a herbal antidepressant. *Current Medical Research and Opinion,* v. 14, n 3, p. 171-184, 1998.

HOEHN-SARIC, R.; McLEOD, D.R.; ZIMMERLI, W.D. Differential effects of alprazolam and imipramina in generalized anxiety disorder: somatic versus psychic symptoms. *Journal of Clinical Psychiatry*, v. 49, p.293-301, 1988.

HOLLIFIELD, M. *et al.* Panic disorder and quality of life: variables predictive of functional impairment. *American Journal of Psychiatry,* v. 154, p. 766-772, 1997.

ICHIMARU, Y.; EGAWA, T.; SAWA, A. 5-HT1A-receptor subtyp mediates the effect of fluvoxamine, a slective serotonin reuptake inhibitor, on marble-burying behavior in mice. *Japanese Journal of Pharmacology,* v. 68, n. 1, p. 65-70, 1995.

JANICAK, P.G. *et al. Principles and Pratice of Psychopharmacotherapy.* 2. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1997.

JENCK, F.; BROEKKAMP, C.L.; VAN DELFT, A.M. Effects of serotonina receptor antagonists on PAG stimulation induced aversion: different contributions of 5-$HT_1$, 5-$HT_2$ and 5-$HT_3$ receptors. *Psychopharmacology*, v. 97, p. 489-495, 1989.

JENCK, F. *et al.* 5-HT-sub(1C) receptors in the serotoninergic control of periaqueductal gray induced aversión in rats. *Psychopharmacology,* v. 100, p. 372-376, 1990.

JENCK, F. *et al.* Dorsal periaqueductal gray-induced aversion as a simulation of panic anxiety: elements of face and predictive validity. *Psychiatry Research,* v. 57, p. 181-191, 1995.

JENCK, F. *et al.* Antiaversive effects of 5-HT(2C) receptor agonist and fluoxetine in a model of panic-like anxiety in rats. *European Neuropharmacology,* v. 8, p. 161-170, 1998.

JENCK, F.; MARTIN, J.R.; MOREAU, J.L. The 5-HT1A receptor agonist flesinoan increases aversion in a model of panic-like anxiety in rats. *Journal of Psychopharmacology,* v. 13, p. 166-170, 1999.

JOHNE, A. *et al.* Pharmacokinetic interaction of digoxin with an herbal extract from St John's wort (*Hypericum perforatum*). *Clinical and Pharmacological Therapeutics*, v. 66, p.338-345, 1999.

JOHNSON, J.; WEISMAN, M.M.; KLERMAN, G.L.. Panic disorder, comorbidity and suicide attempts. *Archives of General Psychiatry,* v. 47, p. 805-808, 1990.

JOSEY, E.S.; TACKETT R.L. St. John's wort: a new alternative for depression?. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics,* v. 37, n. 3, p. 111-119, 1999.

JUDGE, R.; DUNBAR, G. Paroxetine, clomipramine and placebo in the treatment of panic disorder. *European Neuropsychopharmacology,* v. 5, n. 3, p. 361, 1995.

JUDGE, R. *et al.* Paroxetine long-term safety and efficacy in panic disorder and prevention of relapse: a double blind study. *European Neuropsychopharmacology,* v. 6, p. SI-26, 1996.

KAEHLER, S.T. *et al.* Hyperforim enhances the extracellular concentrations of cathecholamines, serotonin and glutamate in the rat locus coeruleous. *Neuroscience Letters,* v. 262, n. 3, p. 199-202, 1999.

KAHN, R.S. *et al.* Effect of a serotonin precursor and uptake inhibitor in anxiety disorders, a double blind comparison of 5-hydroxitryptophan, clomipramine and placebo. *International Clinical Psychopharmacology,* v. 2, p. 33-45, 1987.

KAHN, R.S.; MOORE, C. Serotonin in the pathogenesis of anxiety. In: HOEHN-SARIX, R.; McLEOD, D.R. (Ed.). *Biology of anxiety disorders.* Washington: American Psychiatric Press, 1993. p. 61-102.

KALB, R.; TRAUTMANN-SPONSEL, R.D.; KIESER, M. Efficacy and tolerability of Hypericum perforatum WS 5572 versus placebo in mildly to moderately depressed patients – A randomized double-blind multicenter clinical trial. *Pharmacopsychiatry,* v. 34, n. 3, p. 96-103, 2001.

KECK, P.E. Jr, *et al.* Valproate treatment of panic disorder and lactate-induced panic attacks. *Biological Psychiatry,* v. 33, n. 7, p. 542-6,1993.

KEIM, S.R.; SHEKHAR, A. NE and 5-HT receptors involved in elicing paniclike responses following iv infusions of yohimbine and fenfluramine. *Soc. Neuroscience Abstracts*, v.25, p. 2139, 1999.

KIM, H.L.; STRELTZER, J.; GOEBERT, D. St. John's for depression: a meta-analysis of well-defined clinical trials. *Journal of Nervous Mental Disease*, v. 187, p. 532-538, 1999.

KLEIN, D.F.; FINK, M. Psychiatric reaction patterns to imipramine. *American Journal of Psychiatry,* v. 119, p. 432-8, 1962.

KLEIN, D.F. Delination of two drug-responsive anxiety syndromes. *Psychopharmacologia,* v. 5, p. 397-408, 1964.

KLERMAN, G.L. Treatment of panic disorder. *Journal of Clinical Psychiatry*, v. 53, supl. 3, p. 14-19, 1992.

KRISHNAN, K.R.R. Monoamine oxidase inhibitors. In: SCHATZBERB, A.F.; NEMEROFF, C.B. (Ed.). *The American psychiatric press textbook of psychopharmacology*, 2 ed. Washington: American Psychiatric Press, 1998. p. 239-249.

KUMAR, R. Paroxetine: a review of clinical experience. *European Neuropsychopharmacology,* v. 7, s. 2, p. S182-183, 1997a.

KUMAR, R. Efficacy and tolerability of paroxetine in the long-term management of panic. *European Neuropsychopharmacology,* v. 7, s. 2, p. S183, 1997b.

KUMAR, V. *et al.* Anxiolytic activity of Indian Hypericum perforatum Linn: an experimental study. *Indian Journal of Experimental Biology*, v. 38, n. 1, p. 36-41, 2000.

LAAKMANN, G. *et al.* St. John's Wort in mild to moderate depression: the relevance of Hyperforin for the clinical efficacy. *Pharmacopsychiatry,* v. 31, supl., p. 54-59, 1998.

LAL, H. *et al.* Evidence tha GABA mechanisms mediate the anxiolytic action of Benzodiazepines: a study with valproic acid. *Neuropharmacology,* v. 19, p. 785-789, 1980.

LANTZ, M.S. *et al.* St John's wort and antidepressant drug interactions in the elderly. *Journal of Geriatric Psychiatry Neurology,* v. 12, p. 7-10, 1999.

LAVIE, P. Ro 15-1788 decreases hypnotic effects of sleep deprivation. *Life Science,* v 41, p. 227-233, 1987.

LECRUBIER, Y. *et al.* A comparison of paroxetine, clomipramine and placebo in the treatment of panic disorder. *Acta Psychiatrica Scandinavica,* v. 95, p. 145-152, 1997a.

LECRUBIER, Y. *et al.* Long-term evaluation of paroxetine, clomipramine and placebo in panic disorder. *Acta Psychiatrica Scandinavica,* v. 95, p. 153-160, 1997b.

LEONARD, B.E. Pharmacological differences of serotonin reuptake inhibitors and possible clinical relevance. *Drugs*, v. 43, supl. 2, p. 3-10, 1992.

LEPOLA, U.M.; RIMÓN, R.H.; RIEKKINEN, P.J. Three-year follow-up of patients with panic disorder after short-term treatment with alprazolam and imipramine. *International Clinical Psychopharmacology,* v. 8, p. 115-8, 1993.

LESTER, H.A. *et al.* Permeation properties of neurotransmitter transporters. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology,* v. 34, p. 219-249, 1994.

LIEBOWITZ, M.R.. Antidepressants in panic disorders. *British Journal of Psychiatry,* v. 155, p. 46-52, 1989.

LIGHTOWLER, S. *et al.* Anxiolytic-like effect of paroxetine in a rat social interaction test. *Pharmacology Biochemistry and Behavior.,* v. 49, n. 2, p. 281-285, 1994.

LINDE, K. *et al.* St John's wort for depression - an overview and meta-analysis of randomized clinical trials. *British Medical Journal,* v. 313, p. 253-8, 1996.

LINDE, K.; MULROW, C.D. St John's wort for depression (Cochrane Review). In: ___. *The Cochrane Library,* n. 3. Oxford: Update Software, 2000.

LINDE, K.; MULROW, C.D. St John's wort for depression (Cochrane Review). In: ___. *The Cochrane Library*, n. 1. Oxford: Update Software, 2001.

LONDBORG, PD. *et al.* Sertraline in the treatment of panic disorder. A multi-site, double-blind, placebo-controlled, fixed-dose investigation. *British Journal Psychiatry*, v. 173, p. 54-60, 1998.

LONDEI, T.; VALENTINI, A.M.V.; LEONE, V.G. Investigative burying by laboratory mice may involve non-functional, compulsive, behaviour. *Behavioral Brain Research*, v. 94, n. 2, p. 249-54, 1998.

MARKOWITZ, J.S. *et al.* Quality of life in panic disorder. Archives of *General Psychiatry,* v. 46, p. 984-992, 1989.

McINTYRE, M. The benefits, adverse events, drug interactions and safety of St. John's wort (Hypericum perforatum): the implications with regard to the regulation of herbal medicines. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, v. 6, p. 115-124, 2000.

MICHELSON, D. *et al.* Outcome assessment and clinical improvement in panic disorder: evidence from a randomized controlled trial of fluoxetina and placebo. The fluoxetina panic disorders study group. *American Journal of Psychiatry*, v. 155, p. 1570-1577, 1998.

MILLER, A.L. St. John's wort (Hypericum perforatum): clinical effects on depression and other conditions. *Alternative Medical Reviews,* v. 3, p.18-26, 1998.

MILLET, B.; BAYLE, F.J.; OLIÉ, J.P. Prospects of anxiolytic therapy: a reflection from different viewpoints. *DDT,* v. 3, n. 10, p. 471-479, 1998.

MODIGH, K.; WESTBERG, P.; ERIKSSON, E. Superiority of clomipramine over imipramine in the treatment of panic disorder: a placebo-controlled trial. *Journal of Clinical Psychopharmacology,* v. 12, n. 4, p. 251-61, 1992.

MOLEWIJK, H.E. *et al.* Conditioned ultrasonic distress vocalizations in adult male rats as a behavioral paradigm for screening anti-panic drug. *Psychopharmacology*, v. 117, p. 32-40, 1995.

MULLER, W.E.; ROLLI, M.; HAFNER U. The effects of Hypericum extract (LI 160) in biochemical models of antidepressant activity. *Pharmacopsychiatry,* v. 30, p. 102-107, 1997.

MULLER, W.E. *et al.* Hyperforin represents the neurotransmitter reuptake inhibiting constituent of Hypericum extract. *Pharmacopsychiatry,* v. 31, supl.1, p. 16-21, 1998.

MURPHY, D.L. *et al.* Anxiolytic effects of drugs acting on 5-HT receptor subtypes. In: VANHOUTTE, P.M.; SAENA, P.R.; PAOLETTI, R.; BRUNELLO, N.; JACKSON, A.S. (Ed.). Serotonin – from cell biology to pharmacology and therapeutics. Boston: Kluwer Academic Publishers, 1993. p. 223-230.

NAHRSTEDT, A.; BUTTERWECK, V. Biologically active and other chemical constituents of the herb of Hypericum perforatum L. *Pharmacopsychiatry,* v. 30, supl., p. 129-134, 1997.

NATHAN, P.J. The experimental and clinical pharmacology of St. John's wort (Hypericum perforatum L.). *Molecular Psychiatry,* v. 4, p. 333-338, 1999.

NEARY, J.T.; BU, Y.R. Hypericum LI 160 inhibits uptake of serotonin and norepinephrine innastrocytes. *Brain Research,* v. 816, n. 2, p. 358-363, 1999.

NJUNG'E, K.; HANDLEY, S.L. Effects of 5-HT uptake inhibitors, agonists and antagonists on the burying of harmless objects by mice; a putative test for anxiolytic agents. *British Journal of Pharmacology*, v. 104, p. 105-12, 1991.

NUTT, D.J. *et al.* Flumazenil provocation of panic attacks: evidence for altered benzodiazepine receptor sensitivity in panic disorder. *Archives of General Psychiatry,* v. 47, p. 917-925, 1990.

NUTT, D.J.; GLUE, P. Imipramine in panic disorder: I. Clinical response and pharmacological changes. *Journal of Psychopharmacology,* v. 5, p. 56-64, 1991.

OBACH, R.S. Inhibition of human cytochrome p450 enzymes by constituents of St. John's wort, an herbal preparation used in the treatment of depression. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics,* v. 294, p. 88-95, 2000.

O'BRESAIL, A.M.; ARGOUARCH, S. Hypomania and St John's wort. *Canadian Journal of Psychiatry*, v. 43, n. 7, p. 746-747, 1998.

OLIVEIRA, I.R.; MOREIRA, E.C. Antidepressivos. In: OLIVEIRA, I.R. (Ed.). *Manual de Psicofarmacologia Clínica.* Rio de Janeiro: Medsi, 1994. p. 102-147.

ÖZTERTÜRK, Y. *et al.* Effects of *Hypericum perforatum* L. and *Hypericum calycinum* L. extracts on the central nervous system in mice. *Phytomedicine* III v. 2, p. 139-146, 1996.

PELLOW, S. *et al.* Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods,* v.14, p. 149-167, 1985.

PERNA, G. *et al.* A comparison of citalopram and paroxetine in the treatment of panic disorder: a randomized, single-blind study. *Pharmacopsychiatry*, v. 34, p. 85-90, 2001.

PEROVIC, S. MULLER, W.E. Pharmacological profile of hypericum extract. Effect on serotonin uptake by postsynaptic receptors. *Arzneimittel-Forschung,* v. 45, n. 11, p. 1145-8, 1985.

PITISUTTITHUM, P. *et al.* Conference on AIDS, v. 11, n. 1, p. 285, 1996.

POHL, R. *et al.* The jitteriness syndrome in panic disorder patients treated with antidepressants. *Journal of Clinical Psychiatry,* v. 49, p. 100-104, 1988.

POLLACK, M.H. *et al.* Long-term outcome after acute treatment with alprazolam or clonazepam for panic disorder. *Journal of Clinical Psychopharmacology,* v. 13, p. 257-63, 1993.

POLTRONIERI, S.C.; VIANA, M. de B.; ZANGROSSI Jr, H. Efeitos do tratamento agudo e crônico com fluoxetina sobre o comportamento de ratos expostos ao Labirinto em T Elevado. In: XVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2001, Caxambu. *Anais da XVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental.* Caxambu: Federação das Sociedades de Biologia Experimental, 2001. p. 265.

PORSOLT, R.D.; BERTIN, A.; JALFRE, M.. Behavioural despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie,* v. 229, p. 327-336, 1977.

RAFFA, R.B. Screen of receptor and uptake site activity of hypericin component of St. John's wort reveals sigma receptor binding. *Life Science*, v. 62, p. 265-270, 1998.

RAYBURN, W.F. *et al.* Effect of prenatally administered Hypericum (St John's wort) on growth and physical maturation of mouse offspring. *American Journal of Obstetry and Gynecology,* p. 191-195, 2001.

RICKELS, K. *et al.* Antidepressant for treatment of anxiety disorder: a placebo controlled comparison of imipramina, trazodone, and diazepam. *Archives of General Psychiatry*, v. 50, p. 884-895, 1993.

ROCCA, P. *et al.* Paroxetine efficacy in the treatment of generalized anxiety disorder. *Acta Psychiatrica Scandinavica,* v. 95, p. 444-50, 1997.

ROBY, C.A. *et al.* St John's wort: effect on CYP3A4 activity. *Clinical and Pharmacological Therapeutics*, v. 67, p. 451-457, 2000.

RODGERS, R.J. Animal models of 'anxiety': where next? *Behavioral Pharmacology*, v. 8, n. 6-7, p. 477-496, 1997.

ROLLI, M.; SCHAFER, C.; MULLER, W.E. Effect of Hypericum perforatum extract (LI-160) on neurotransmitter receptor binding and synaptosomal uptake systems. *Pharmacopsychiatry*, v. 28, p. 207, 1995.

ROSENBERG, R. Drug treatment of panic disorder. *Pharmacology and Toxicology*, v. 72, p. 344-53, 1993.

RUTTER, J.J.; AUERBACH, S.B. Acute uptake inhibition increases extracellular serotonin the rat forebrain. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics,* v. 265, p. 1319-1324, 1993.

SANO, K.; SEKINO, H.; MAYANAGI, Y. Results of stimulation and destruction of posterior hippocampus in cases with violent, aggressive and restless behaviors. In: HITCHCOCH, E.; LAITINEN, L.; VAEMET, K. (Ed.). *Psychosurgery.* Springfield: Thomas , 1972. p. 57.

SARAN, A.; HALARIS, A. Panic attack precipitated by fluoxetina. *Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neuroscience*, v. 1, p. 219-220, 1989.

SCHEY, K.L. *et al.* Photooxidation of lens alpha-crystalin by hipericin. *Photochemestry and Photobiology*, v. 16, p. 125-128, 2000.

SCHNECK, C. St. John's wort and hypomania. *Journal of Clinical Psychiatry,* v. 59, n. 12, p. 689, 1998.

SCHNEIER, F.R. *et al.* Fluoxetine in panic disorder. *Journal of Clinical Psychopharmacology,* v. 10, p. 119-121, 1990.

SCHWARZ, J.T.; CUTT, M.J. St John's wort. In: CUPP, M.J. (Ed.). *Toxicology and Clinical Pharmacology of Herbal Products.* Totowa Humana Press, 2000. p.67-78.

SHARPLEY, A.L. *et al.* Antidepressant-like effect of *Hypericum perforatum* (St John's wort) on the sleep polysomnogram. *Psychopharmacology,* v. 139, p. 286-287, 1998.

SHEEHAN, D.V.; HARNET-SHEEHAN, K.. The role of SSRIs in the panic disorder. *Journal of Clinical Psychiatry,* v. 10, supl., p. 51-58, 1996.

SHEKHAR, A.; DIMICCO, J.A. Defense reaction elicited by injection of GABA antagonists and synthesis inhibitors into the posterior hypothalamus in rats. *Neuropharmacology,* v. 26, p. 407-417, 1987.

SHEKHAR, A. GABAa receptors in the region of the dorsomedial hypothalamus of rats regulate anxiety in the elevated plus-maze test I: behavioral measures. *Brain Research,* v. 627, p. 9-16, 1993.

SHEKHAR, A. Effects of treatment with imipramine and clonazepam on an animal model of panic disorder. *Biological Psychiatry,* v. 36, p. 748-758, 1994.

SHELLENBER, R. *et al.* Pharmacodynamic effects of two different *Hypericum* extracts in healthy volunteers measured by quantitative EEG. *Pharmacopsychiatry*, v. 31, p. 44-53, 1998.

SHELTON, R.C. *et al.* Effectiveness of St John's wort in major depression: a randomized controlled trial. *Journal of American Medical Association*, v. 285, n. 15, p. 19781986, 2001.

SIMMEN, U. *et al.* Extracts and constituents of Hypericum perforatum inhibit the binding of various ligands to recombinant receptors expressed with the Semliki forest virus system. *Journal of Receptor Signal Transduction Research,* v. 19, n. 1/4, p. 59-74, 1999.

SINGER, A.; WONNEMANN M.; MULLER, W.E. Hyperforin, a major antidepressant constituent of St. John's wort, inhibits serotonin uptake by elevating free intracellular $Na^{1+}$. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics,* v. 290, p. 1363-1368, 1999.

SKALISZ, L.L; BEIJAMINI, V.; ANDREATINI, R. Efeito do extrato de *Hypericum perforatum* e da paroxetina no teste de "enterrar objetos não condicionado" (marble burying behavior). In: XVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2001, Caxambu. *Anais da XVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental.* Caxambu: Federação das Sociedades de Biologia Experimental, 2001 . p. 369.

SOLYOM, L. Controlling panic attacks with fenfluramine. *American Journal of Psychiatry,* v. 151, n. 4, p. 621-2 1994.

STIVENSON, C,; DIXON, M.; ERNST, E. *Hypericum* for fatigue – a pilot study. *Phytomedicine,* v. 5, n. 6, p. 443-447, 1998.

SUZUKI, O. *et al.* Inhibition of monoamine oxidase by hypericin. *Planta Medica,* v. 50, p. 272-274, 1984.

TAYLOR, L.; KOBACH, K. An open-label trial of St. John's wort (Hypericum perforatum) in obsessive-compulsive disorder. *Journal of Clinical Psychiatry,* v. 61, n.8, p.575-578, 2000.

TEIXEIRA, R.C.; JR. ZANGROSSI, H.; GRAEFF, F.G. Behavioral effects of acute and chronic imipramine in the elevated T-maze model o anxiety. *Pharmacology Biochemistry and Behavior,* v. 65, n. 4, p. 571-76, 2000.

TESAR, G.E. High-potency benzodiazepines for short-term management of panic disorder. *Journal of Clinical Psychiatry*, v. 51, supl., p. 4-10, 1990.

TESAR, G.E. *et al.* Double-blind, placebo-controlled comparison of clonazepam and alprazolam for panic disorder. *Journal of Clinical Psychopharmacology,* v. *52,* p. 66-76, 1991.

TESAR, G.E.; ROSENBAUM, J.F. Recognition and management of panic disorder. *Advances in Internal Medicine*, v. 38, p. 123-149, 1993.

TESKE, M.; TRENTIN, A.M.M. *Herbarium: Compêndio de Fitoterapia*, 2. ed.. Curitiba: Herbarium, 1995. p. 180-1.

TEUFEL-MAYER, R.; GLEITZ, J. Effects of long-term administration of Hypericum extracts on the affinity and density of the central serotonergic 5-$HT_{1A}$ and 5-$HT_2$ receptors. *Pharmacopsychiatry,* v. 30, p. 113-116, 1997.

THIEDE, H.M.; WALPER, A. Inhibition of MAO and COMT by hypericum extracts and hypericin. *Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology,* v. 7, supl. 1, p. S54-6, 1994.

THIELE, B.; BRINK, I.; PLOCH, M. Modulation of cytokine expression by Hypericum extract. *Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology,* v. 7, p. S54-S56, 1994.

TILLER, J.W.; BOUWER, C.; BEHNKE, K. Moclobemide for anxiety disorders: a focus on moclobemide for panic disorder. *International Clinical Psychopharmacology,* v. 12, supl. 6, p. S27-30, 1997.

TREIT, D.; MENARD, J.; ROYAN, C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus maze. *Pharmacology Biochemistry and Behavior,* v. 44, p. 463-469, 1993.

VALENTINO, R.J.; CURTIS, A.L. Pharmacology of locus coeruleus spontaneous and sensory evoked activity. *Progress Brain Research,* v. 88, p. 249-256, 1991.

VANDENBOGARDE, A. *et al.* Evidence that total extract of *Hypericum perforatum* affects exploratory behavior and exerts anxiolytic effects in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior,* v. 65, n. 4, p.627-33, 2000.

VAN PRAAG, H.M. Serotonin disturbances in psychiatric disorders: functional versus nosological interpretation. *Advances in Biological Psychiatry,* v. 17, p. 52-57, 1988.

VERSIANI, M.; GENTILE, V.; PARPOCKI, J. Data about 508 cases of panic disorder and responses to treatment with alprazolam, clomipramina, imipramina and tranylcypromine. In: SHAGASS, C.; JOSIASSEN, R.C.; BRIDGER, W.H. (Ed.). *Biological psychiatry: proceedings from the 15th world congress of biological psychiatry.* Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1985.

VIANA, M.B; TOMAZ, C.; GRAEFF, F.G. The elevated T-maze: a new animal model of anxiety and memory. *Pharmacology Biochemistry and Behavior,* v. 49, n. 3, p. 549-554, 1994.

VOLRATH, M.; ANGST, J. Outcome of panic and depression in a seven-year follow-up: results of the Zurich study. *Acta Psychiatrica Scandinavica,* v. 80, p. 591-596, 1989.

VOLZ, H.P.; LAUX, P. Potential treatment of subthreshold and mil depression: a comparison of St. john's wort extracts and fluoxetina. *Comprehensive Psychiatry,* v. 41, supl. 1, p. 133-137, 2000.

VORBACH, E.U.; ARNOLDT, K.H.; HUBNER, W.D. Efficacy and tolerability of St. John's wort extrat LI 160 versus imipramine in patients with severe depressive episodes according to ICD-10. *Pharmacopsychiatric.*, v. 30, supl., p 81-85, 1997.

WAGNER, H.; BLADT, S. Pharmaceutical quality of hypericum extracts. *Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology,* v. 7, supl. 1, p. S65-8, 1994.

WESTENBERG, H.G.M. *et al.* Flesinoxan, a selective 5-$HT_{1A}$ agonist, in the treatment of panic disorder. *Clinical Neuropharmacology*, v. 15, supl., p. 60, 1992.

WESTENBERG, H.G.M.; DEN BOER, J.A.. New findings in the treatment of panic disorder. *Pharmacopsychiatry*, v. 26, p. 30-33, 1993.

WESTENBERG, H.G.M. Development in the drug treatment of panic disorder: what is the place of the selective serotonin reuptake inhibitors? *Journal of Affective Disorders,* v. 40, p. 85-93, 1996.

WHEATLEY, D. Hypericum extract: potential in the treatment of depression. *CNS Drugs* v. 9, n. 6, p. 431-440, 1998.

WILLNER, P. The validity of animal models of depression. *Psychopharmacology,* v. 83, p. 1-16, 1984.

WOELK, H.; BURKARD; GRÜNWALD, J. Benefits and risks of the *Hypericum perforatum* extract LI 160: drug monitoring study with 3250 patients. *Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology,* v. 7, supl. 1, p. 34-38, 1994.

WONNEMAN, M.; SCHAFER, C.; MULLER, W.E. Effects of Hypericum extracts on glutaminergic and GABAergic receptor systems. *Pharmacopsychiatry*, v. 30, supl. 2, p. 237-240, 1997.

WONNEMAN, M. *et al.* Inhibition of synaptosomal uptake of $^{3}$H-L-glutamate and $^{3}$H-GABA by hyperforin, a major constituent of St. John's wort: the role of amiloride sensitive sodium conductive pathways. *Neuropsychopharmacology*, v. 23, p. 188-196, 2000.

WOODMAN, C.L.; NOYES R. Panic Disorder: Treatment with valproate. *Journal of Clinical Psychiatry,* v. 55, n. 4, p. 134-136, 1994.

YU, P.H. Effect of the Hypericum perforatum extract on serotonin turnover in the mouse brain. *Pharmacopsychiatry,* v. 33, p. 60-65, 2000.

YAGER, J. *et al.* use of alternative remedies by psychiatric patients: illustrative vignettes and a discussion of the issues. *American Journal of Psychiatry*, v. 156, n. 9p, p. 1432-1438, 1999.

ZANGROSSI, H. GRAEFF, F.G. Behavioral validation of the elevated T-maze, a new animal model of anxiety. *Brain Research Bulletin,* v. 44, n. 1, p. 1-5, 1997.

ZOHAR, J.; WESTENBERG, H.G.M. Anxiety disorders: a review of tricyclic antidepressant and selective serotonina reuptake inhibitors. *Acta Psychiatrica Scandinavica,* v. 101, supl. 403, p. 39-49, 2000.