

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**EFEITO DO *Hypericum perforatum* EM DIFERENTES
MODELOS DE DESORDENS MOTORAS EM RATOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Elizete de Moraes Reis

Santa Maria, RS, Brasil.

2013

**EFEITO DO *Hypericum perforatum* EM DIFERENTES
MODELOS DE DESORDENS MOTORAS EM RATOS**

Elizete de Moraes Reis

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia
da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como
requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Roselei Fachinetto

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Caroline Wagner

Santa Maria, RS, Brasil.

2013

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Reis, Elizete de Moraes
EFEITO DO *Hypericum perforatum* EM DIFERENTES MODELOS
DE DESORDENS MOTORAS EM RATOS / Elizete de Moraes Reis.-
2013.

55 p. ; 30cm

Orientadora: Roselei Fachinetto
Coorientadora: Caroline Wagner
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-
Graduação em Farmacologia, RS, 2013

1. Flufenazina 2. Reserpina 3. Atividade locomotora
4. MMVs 5. *H. perforatum* I. Fachinetto, Roselei II.
Wagner, Caroline III. Título.

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
Aprova a Dissertação de Mestrado

**EFEITO DO *Hypericum perforatum* EM DIFERENTES MODELOS DE
DESORDENS MOTORAS EM RATOS**

elaborada por
Elizete de Moraes Reis

como requisito parcial para a obtenção de grau de
Mestre em Farmacologia

COMISSÃO EXAMINADORA

Roselei Fachinetto, Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientadora)

Rafael Porto Ineu, Dr. (UFSM)

Romaina Picada Pereira, Dra. (UFSM)

Santa Maria, 26 de Fevereiro de 2013.

AGRADECIMENTOS

À Deus;

À Universidade Federal de Santa Maria, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e a CAPES pela bolsa concedida;

À minha família, em especial aos meus pais Nelson e Fátima Zeneida, pelo amor, carinho e compreensão e principalmente por vocês serem meus maiores exemplos e incentivadores;

Aos meus irmãos, Gabriel e Elis, pelo apoio e carinho.

Ao Francisco pelo incentivo, amor, carinho e compreensão. Obrigado por você ter feito parte dos primeiros passos para que posteriormente eu chegasse ao mestrado;

À minha orientadora, Roselei Fachinetto, pela orientação, compreensão, ensinamentos e principalmente pelo exemplo de coragem, ética e profissionalismo;

Aos meus colegas de laboratório Caroline Leal, Luis Ricardo e Alcindo por me auxiliarem nos meus primeiros experimentos. Obrigada pela paciência e pela amizade.

Aos demais colegas Larissa, Bárbara, Mayara, Catiúscia e Patrícia obrigada pelo companheirismo e pelos momentos de descontração. A vocês minha gratidão e amizade. Aos recém chegados Augusto, Caroline Pilecco e Getulio, vocês também fizeram parte do meu mestrado.

Aos colegas que hoje não fazem mais parte do meu convívio, Fernanda e Jivago. Obrigada pela amizade, por vocês terem feito parte da minha caminhada, tenham a certeza que vocês foram muito importantes para esta conquista.

Às minhas amigas Naiani e Carol, obrigada pela amizade e companheirismo em momentos alegres e difíceis. A vocês minha gratidão e amizade.

“Nas grandes batalhas da vida, o primeiro passo
para a vitória é o desejo de vencer.”

(Mahatma Gandhi)

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

EFEITO DO *Hypericum perforatum* EM DIFERENTES MODELOS DE DESORDENS MOTORAS EM RATOS

AUTOR: Elizete de Moraes Reis
ORIENTADORA: Roselei Fachinetto
CO-ORIENTADORA: Caroline Wagner
LOCAL E DATA DA DEFESA: Santa Maria, 26 de fevereiro de 2013.

As desordens motoras são sintomas de doenças neurodegenerativas bem como podem estar associadas ao tratamento com antipsicóticos. Cita-se como exemplo destas desordens, sintomas da Doença de Parkinson (DP) e a Discinesia Tardia (DT), respectivamente. O desequilíbrio cerebral nos níveis de monoaminas e, conseqüentemente, seu metabolismo tem sido relacionados ao desenvolvimento dos movimentos anormais que aparecem nas desordens motoras, tendo em vista que os circuitos dopaminérgicos estão envolvidos na gênese da DP e da DT. No entanto, ainda não existem tratamentos eficazes e com poucos efeitos colaterais para tais condições. A *Hypericum perforatum* (*H. perforatum*), popularmente conhecido como Erva de São João, consiste numa planta amplamente utilizada como antidepressiva e que possui uma grande quantidade de compostos fenólicos, cujo mecanismo para esta atividade está relacionado à inibição da monoamina oxidase (MAO) e da recaptação de monoaminas cerebrais. Assim, o objetivo do presente estudo foi investigar o efeito do *H. perforatum* em modelos de desordem motora induzida por flufenazina ou reserpina em ratos. Foram quantificados os movimentos de mascar no vazio (MMV) e atividade locomotora (cruzamentos e levantadas observados no teste de campo aberto) em ambos os modelos. No experimento 1, os ratos receberam uma única administração de enantato de flufenazina (25 mg/Kg, i.m.) e ou *H. perforatum* (300 mg/Kg, no lugar da água de beber) durante 7 dias. O tratamento com flufenazina aumentou o número de MMVs e diminuiu a atividade locomotora em ratos após 7 dias de tratamento. No entanto, o tratamento com *H. perforatum* não protegeu das alterações comportamentais causadas pelo tratamento com flufenazina. No experimento 2, os ratos receberam água ou *H. perforatum* (300 mg/Kg, no lugar da água de beber) durante 16 dias. A partir do dia 9 de tratamento os animais receberam uma administração diária de reserpina (0,5 mg/Kg, s.c.) ou veículo durante 3 dias com intervalo de 48 horas. A reserpina aumentou o número MMVs e diminuiu a atividade locomotora em campo aberto. O pré-tratamento com *H. perforatum* não alterou o efeito da reserpina sobre o número de MMVs e levantadas. Porém, o pré-tratamento com *H. perforatum* preveniu o efeito da reserpina sobre número de cruzamentos. Desta forma, podemos concluir que o *H. perforatum* não apresentou efeito benéfico sobre os movimentos orofaciais induzidos por flufenazina ou reserpina em ratos.

Palavras-chave: Flufenazina. Reserpina. Atividade locomotora. MMVs. *H. perforatum*.

ABSTRACT

Dissertation of Master's Degree
Graduate Course in Pharmacology
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

EFFECT OF *Hypericum perforatum* ON DIFFERENT MODELS OF MOVEMENT DISORDERS IN RATS

AUTHOR: Elizete de Moraes Reis

ADVISOR: Roselei Fachinetto

CO-ADVISOR: Caroline Wagner

PLACE AND DATE OF THE DEFENSE: Santa Maria, February 26th 2013

Abnormal movements are clinical symptoms present in neurodegenerative diseases, such as Parkinsonism, as well as Tardive dyskinesia. It is thought that unbalance in monoamine levels with their consequent metabolism could be involved in the etiology of these abnormal movements. However, until this moment there is not efficacious treatment with low side effects for these conditions. In this context, *Hypericum perforatum* (*H. perforatum*), popularly known as St. John's Wort, is a plant largely used as antidepressant and presenting high amount of polyphenol constituents. Its antidepressant mechanism seems to involve the increase of monoamines and monoaminoxidase inhibition. Here, we evaluated the effect of *H. perforatum* on different models of abnormal movements in rats, either using fluphenazine or reserpine. It were quantified the number of vacuous chewing movements (VCMs) and locomotor activity (number of rearings and crossings) in both models. In experiment 1, rats received a single administration of fluphenazine enantate (25 mg/Kg, i.m.) and/or *H. perforatum* (300 mg/Kg, in place of drinking water) during 7 days. Fluphenazine treatment increased VCMs and decreased the locomotor activity after 7 days of treatment. However, *H. perforatum* did not alter either the number of VCMs or the locomotor activity (represented by number of crossing and rearing in the open field test) in rats. In experiment 2, rats received reserpine administration once a day during 3 days (0.5 mg/Kg, s.c.) and/or *H. perforatum* (300 mg/Kg, in place of drinking water) during 16 days. Reserpine treatment increased VCMs and decreased the locomotor activity. *H. perforatum* did not alter the number of VCMs or the number of rearing. However, *H. perforatum* co-treatment could avoid the effect of reserpine on number of crossings. In conclusion, *H. perforatum* did not seem to be efficacious to protect against orofacial movements induced by fluphenazine or reserpine in rats.

Key-words: Fluphenazine. Reserpine. locomotor activity. VCMs. *Hypericum perforatum*

LISTA DE FIGURAS

Introdução

- Figura 1 – Biossíntese de dopamina..... 15
- Figura 2 – Biossíntese e metabolismo da 5-hidroxitriptamina 16
- Figura 3 – Bloqueio do transportador vesicular de monoaminas: mecanismo de ação da reserpina..... 18
- Figura 4 – Bloqueio de receptores D₂: mecanismo de ação de antipsicóticos típicos 22

Manuscrito

- Figure 1:** Cromatografia Líquida de Alta Eficiência do *H. perforatum*..... 43
- Figure 2:** Efeitos do *H. perforatum* sobre movimentos orofaciais induzidos por flufenazina (representado por número de MMVs durante 6 min) em ratos após 7 dias de 43
- Figure 3:** Efeitos do *H. perforatum* sobre movimentos orofaciais induzidos por reserpina (representado por número de MMVs durante 6 min) em ratos 44

LISTA DE TABELAS

- Table 1:** Compostos fenólicos e flavonóides do *H. perforatum*44
- Table 2:** Efeitos da flufenazina e/ou *H. perforatum* sobre teste de campo aberto em ratos. Número de cruzamentos e levantadas durante 5 min depois de 7 dias de tratamento.45
- Table 3:** Efeitos da reserpina e/ou *H. perforatum* sobre teste de campo aberto em ratos. Número de cruzamentos e levantadas durante 5 min45

LISTA DE ABREVIATURAS

a.C.	– Antes de Cristo
AMP	– Monofosfato de adenosina
5-HIAA	– Ácido 5- hidroxindolacético
5-HT	– 5-hidroxitriptamina ou serotonina
DO	– Discinesia orofacial
DOPA	– Diidroxifenilalanina
DP	– Doença de Parkinson
DT	– Discinesia Tardia
GABA	– Ácido gama-aminobutírico
GAD	– Ácido glutâmico descarboxilase
<i>H. perforatum</i>	– <i>Hypericum perforatum</i>
H ₂ O ₂	– Peróxido de hidrogênio
L-DOPA	– L-3,4-dihidroxifenilalanina
MAO	– Monoamina oxidase
MMVs	– Movimentos de mascar no vazio
NMDA	– N-Metil-D-Aspartato
SNC	– Sistema nervoso central
TH	– Tirosina hidroxilase
VMAT-2	– Transportador vesicular de monoaminas

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	12
1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Sistema Dopaminérgico e Serotoninérgico	14
1.2 Esquizofrenia e Antipsicóticos	17
1.3 Discinesia Tardia.....	19
1.4 Doenças de Parkinson e Reserpina.....	20
1.5 <i>Hypericum perforatum</i>	22
2 OBJETIVOS	25
2.1 Objetivo geral	25
2.2 Objetivos específicos	25
3 RESULTADOS	26
3.1 Manuscrito:	27
EFFECT OF <i>Hypericum perforatum</i> ON DIFFERENT MODELS OF MOVEMENT DISORDERS IN RATS.....	27
Abstract.....	29
Introduction.....	29
Material and Methods	30
Results	34
Discussion	35
References.....	37
4 CONCLUSÕES ESPECÍFICAS	46
5 CONCLUSÃO FINAL	47

APRESENTAÇÃO

No item **INTRODUÇÃO** está descrita uma revisão sucinta sobre os temas trabalhados nesta dissertação.

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de um manuscrito que está submetido para publicação na revista **BEHAVIOURAL PHARMACOLOGY**, o qual se encontra no item **RESULTADO**. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas, encontram-se no próprio manuscrito e representam a íntegra deste estudo.

O item **CONCLUSÃO** se encontra no final desta dissertação e apresenta os comentários gerais sobre este trabalho.

As **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** referem-se somente às citações que aparecem no item **INTRODUÇÃO** desta dissertação.

1 INTRODUÇÃO

As desordens motoras são sintomas presentes em doenças neurodegenerativas como a Doença de Parkinson (DP) e podem estar associadas ao tratamento com antipsicóticos, como a Discinesia Tardia (DT) (KANE & SMITH, 1982; ANDREASSEN & JORGENSEN, 2000). A DP atinge cerca de 1-2% da população enquanto as alterações motoras causadas pelo uso de antipsicóticos acomete 20-40% dos pacientes (HUGHES *et al.*, 2000; ANDREASSEN & JORGENSEN, 2000), sendo que em ambos os casos as desordens motoras são progressivas e incapacitantes. Muitas são as hipóteses para explicar a etiologia dessas desordens, entre elas podemos destacar a neurotoxicidade devido ao aumento da dopamina extracelular e seu consequente metabolismo (LOHR, 1991; ANDREASSEN & JORGENSEN, 2000).

Alguns modelos animais têm sido utilizados na tentativa de entender os mecanismos bem como na busca de tratamentos efetivos para as desordens de movimentos. Agentes farmacológicos como a flufenazina e a reserpina são amplamente utilizados nestes estudos (BURGER *et al.*, 2004; FACHINETTO *et al.*, 2007a, 2007b; PEREIRA *et al.*, 2011; BUSANELLO *et al.*, 2012). A reserpina causa a depleção de monoaminas através do bloqueio do transportador vesicular de monoaminas, enquanto a flufenazina age bloqueando receptores dopaminérgicos. Em ambos os modelos ocorre o aumento da dopamina e seu metabolismo pela enzima monoamina oxidase (MAO). Dados da literatura demonstram que compostos naturais são capazes de proteger o desenvolvimento de desordens motoras em diferentes modelos (FACHINETTO *et al.*, 2007b; PEREIRA *et al.*, 2011; BUSANELLO *et al.*, 2011, 2012; PEROZA *et al.*, 2013; RECKZIEGEL *et al.*, 2013).

A transmissão dopaminérgica tem sido amplamente relacionada às desordens motoras, porém dados da literatura tem demonstrado que o sistema serotoninérgico não regula apenas funções emocionais e sim uma série de outras funções, incluindo as motoras (WICHIMAN & DELONG, 2003; OHONO, 2010).

Neste contexto, o *Hypericum perforatum* (*H. perforatum*) é uma planta popularmente utilizada para tratamento de diferentes formas de depressão, sendo mais utilizada em casos leve a moderados. O mecanismo de ação desta planta para sua atividade antidepressiva é atribuído à inibição da enzima MAO e da recaptação de monoaminas, além de apresentar uma gama de compostos antioxidantes como a quercetina, os quais também apresentam atividade antidepressiva (SUZUKI *et al.*, 1984; BUTTERWECK, 2003).

Entretanto, não existe um tratamento efetivo para as desordens motoras e muitos compostos naturais já foram testados para esta finalidade, porém ainda não são encontrados dados da literatura demonstrando o efeito do *H. perforatum* em modelos de desordens motoras. Desta forma, este trabalho visa avaliar o efeito do *H. perforatum* em modelos de desordens motoras induzidos por flufenazina ou reserpina em ratos.

1.1 Sistema Dopaminérgico e Serotoninérgico

A deficiência de monoaminas no sistema nervoso central tem sido a hipótese mais aceita para explicar a etiologia e a patogênese da depressão. Os antidepressivos exercem seus efeitos através dos seguintes mecanismos: (1) bloqueio de proteínas pré-sinápticas transportadoras de monoaminas, as quais removem o neurotransmissor liberado da fenda sináptica; (2) inibição da enzima MAO, responsável pela degradação pré-sináptica das monoaminas e (3) inibição ou excitação de receptores pré ou pós-sinápticos que regulam a liberação de neurotransmissores monoaminérgicos e/ou as taxas de ativação neuronal (NEMEROFF & OWENS, 2002). Estudos têm demonstrado a associação de antidepressivos e antipsicóticos para tratamento dos sintomas negativos da esquizofrenia, além do tratamento de desordens de humor como mania, depressão bipolar e depressão resistente ao tratamento (RUMMEL *et al.*, 2005; SHELTON, 2006; TOHEN & VIETA, 2009). Estes dados demonstram a interação dos sistemas dopaminérgico e serotoninérgicos na depressão e em outras doenças como a esquizofrenia.

O sistema dopaminérgico, no cérebro de mamíferos, está dividido em quatro vias: via mesolímbica, via mesocortical, via tuberoinfundibular e via nigroestriatal (DAHLSTROM & FUXE, 1964). A via nigroestriatal, que contém cerca de 80% da dopamina no cérebro, tem seus corpos celulares na *substantia nigra* e suas projeções para o corpo estriado (ALBIN *et al.*, 1989). Esta via está envolvida no funcionamento normal dos gânglios da base e a degeneração dos neurônios dopaminérgicos nigroestriatais leva aos sintomas motores que caracterizam a DP e a DT por esta ser uma via que exerce controle inibitório sobre outras vias não dopaminérgicas (CROSSMAN, 1990; 2000). O sistema dopaminérgico possui como neurotransmissor a dopamina, cuja síntese inicia-se a partir do aminoácido tirosina e tem como etapa limitante a conversão da tirosina a DOPA pela enzima tirosina hidroxilase (TH). Por sua vez, a DOPA é convertida a dopamina pela enzima DOPA descarboxilase (Figura 1).

Então, a dopamina é transportada do citoplasma onde é sintetizada para vesículas de estocagem especializadas, via transportador vesicular de monoaminas 2 (TVMA-2).

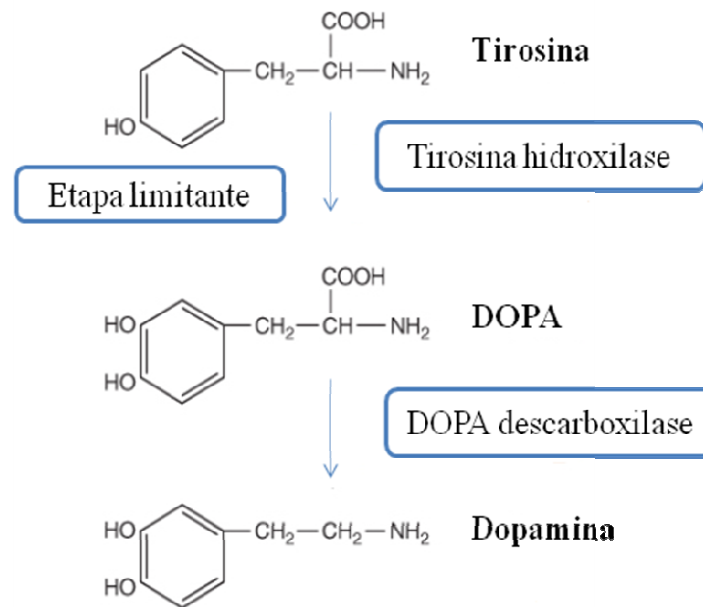


Figura 1 – Biossíntese de dopamina.

Mediante estímulo, a dopamina é liberada na fenda sináptica e interage com receptores localizados a nível pré e pós-sináptico. Esses receptores pertencem à família de receptores acoplados a proteína G e estão divididos em duas classes: D1, a qual compreende os receptores do tipo D1 e D5; e D2, que inclui os receptores D2, D3 e D4 (ANDERSEN *et al.*, 1990).

Os receptores da classe D1 induzem a ativação de proteína G estimulatória (Gs), que consequentemente estimula a produção de AMP cíclico pela adenilato ciclase. Já os receptores da classe D2 estão associados a proteína G inibitória (Gi), e assim induzem a inibição da adenilato ciclase (SOKOLOFF *et al.*, 2006).

Uma vez liberada na fenda a dopamina pode também ser recaptada, através do transportador de dopamina. Após a recaptação, é desaminada pela ação da enzima MAO (MAKER *et al.*, 1981).

O sistema serotoninérgico é composto por diferentes tipos de receptores, enzimas de síntese de serotonina (5-HT) e seu transportador. Os receptores de 5-HT são divididos em dois tipos: metabotrópicos (5-HT1, 5-HT2, 5-HT4, 5-HT5, 5-HT6 e 5-HT7) e uma classe de

receptor ionotrópico (5-HT₃) (HOYER *et al.*, 2002). A biossíntese da serotonina consiste em duas etapas, em que o triptofano da dieta é hidroxilado na posição 5, através da enzima triptofano-hidroxilase, dando origem ao 5-hidroxitriptofano. Esse por sua vez, é descarboxilado sob a ação de 5-hidroxitriptofano descarboxilase, originando a 5-hidroxitriptamina ou serotonina. A principal via metabólica deste neurotransmissor envolve outra enzima encontrada em quantidade abundante e com propriedades sobre vários substratos, a enzima MAO, com formação do ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), principal metabólito serotoninérgico (Figura 2). O 5-HIAA é excretado pela urina e pode ser útil como indicador da produção serotoninérgica no organismo (VALLE *et al.*, 1988; GOODMAN & GILMAN, 2010).

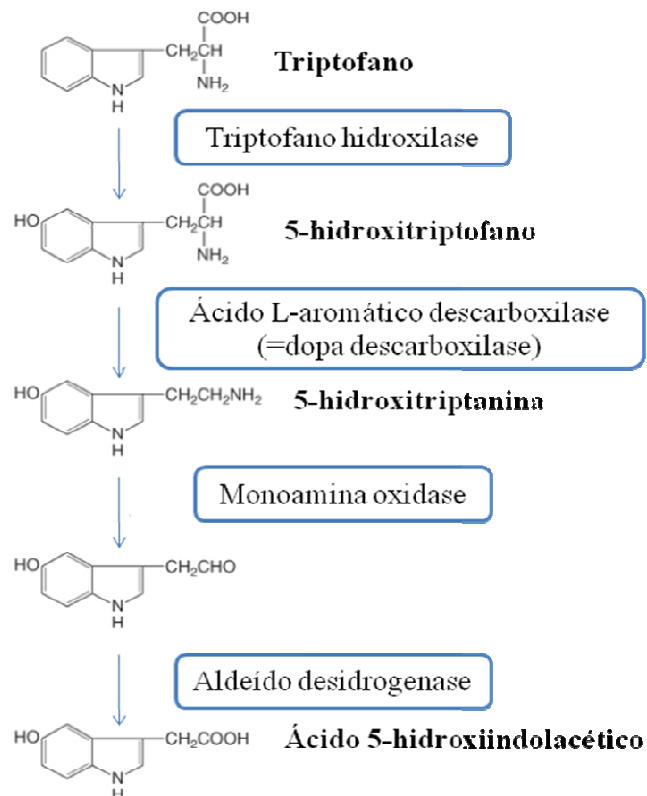


Figura 2 – Biossíntese e metabolismo da 5-hidroxitriptamina.

O sistema serotoninérgico é um dos principais, se não o principal, sistema neurotransmissor do sistema nervoso central (SNC), e tem seus neurônios distribuídos por todo o cérebro, localizados na formação reticular, nos núcleos da *raphe*, que se estendem na linha média, do bulbo ao mesencéfalo. Os axônios rostrais, situados em níveis mais altos nos

núcleos da *raphe*, têm trajeto ascendente, projetando-se para quase todas as estruturas do prosencéfalo até mesmo o córtex cerebral, o hipotálamo e o sistema límbico. Os axônios caudais, situados no bulbo, são projetados para a medula (HAYES & GREENSHAW, 2011).

Dada a complexidade do sistema serotoninérgico, estudos demonstram que este sistema não regula apenas funções psicoemocionais, mas também funções motoras incluindo desordens motoras (ROTH, 1994; MELTZER *et al.*, 2003; OHNO, 2010). A interação dos receptores 5-HT na modulação de desordens motoras é evidenciada através a interação de antipsicóticos atípicos com receptores 5-HT_{2A} e uma menor incidência de DT quando estes fármacos são utilizados (OHNO *et al.*, 2011). Outros estudos demonstram que a associação de antidepressivos inibidores da recaptação de serotonina, como a fluoxetina, potencializa os efeitos motores induzidos por haloperidol (TATARA *et al.*, 2012). O sistema dopaminérgico vem sendo foco de estudos relacionados à fisiopatologia e aos efeitos colaterais decorrentes do tratamento da esquizofrenia.

1.2 Esquizofrenia e Antipsicóticos

A esquizofrenia é uma desordem mental grave, considerada uma das principais causas de incapacidade crônica. Esta desordem acomete cerca de 1% da população mundial e se manifesta geralmente na segunda década de vida (MAHADIK *et al.*, 2001). Pode ser definida como a falta de interação entre o processo de pensamento e da percepção. Os sintomas desta desordem são classificados conforme suas características em sintomas positivos, que incluem delírios e alucinações e sintomas negativos, que são o isolamento social, embotamento afetivo e perda da motivação (LEWIS & LIEBERMAN, 2000; STOTZ-INGENLATH, 2000).

A hiperatividade da neurotransmissão dopaminérgica na via mesolímbica consiste na principal hipótese para explicar a sintomatologia da esquizofrenia, principalmente os sintomas positivos. O antagonismo de receptores D₂ como parte essencial para a atividade de antipsicóticos é um dos fatos que reforça esta hipótese (SNYDER, 1976). Em contrapartida, uma atividade dopaminérgica reduzida na via mesocortical está ligada aos sintomas negativos (CARLSSON, 1988; WEINBERGER, 1987; GUILLIN *et al.*, 2005).

Outros neurotransmissores, como GABA (ácido gama-aminobutírico) e glutamato, podem estar envolvidos na esquizofrenia, considerando que a dopamina pode atuar no

controle da excitabilidade destas vias através da modulação da transmissão glutamatérgica (LARUELLE, *et al.*, 2003; CARLSSON, 2006).

Os fármacos utilizados para o tratamento da esquizofrenia são chamados de antipsicóticos. São exemplo de antipsicóticos clássicos ou típicos, a flufenazina e haloperidol, tendo como mecanismo de ação o bloqueio de receptores dopaminérgicos do subtipo D₂ (Figura 3) (CREESE *et al.*, 1976). Porém estes fármacos, além de bloquear receptores dopaminérgicos nas regiões relacionadas à etiologia da esquizofrenia, induzem de efeitos extrapiramidais como a DT por ação na via nigroestriatal e hiperprolactinemia por ação na via tuberoinfundibular (ELLENBROEK, 1993). A busca por fármacos com menos efeitos colaterais e sem alterações na eficácia clínica fez com que novos antipsicóticos fossem sintetizados, os antipsicóticos atípicos. Porém, estes não apresentaram ação eficaz em relação aos sintomas negativos, além de apresentarem efeitos colaterais como agranulocitose e síndromes metabólicas. Os antipsicóticos atípicos não são livres de efeitos extrapiramidais (HENDERSON, 2000), porém devido ao seu alto custo os fármacos típicos continuam sendo amplamente utilizados na terapêutica de pacientes com esquizofrenia.

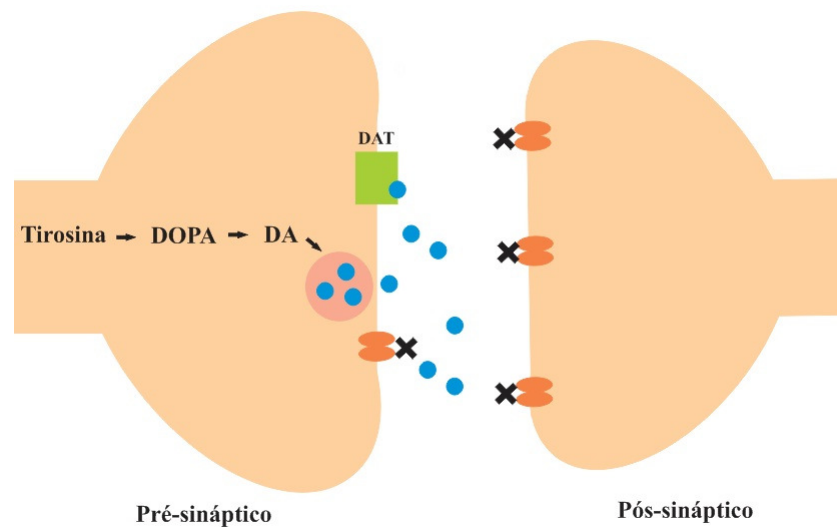


Figura 3 – Bloqueio de receptores D₂: mecanismo de ação de antipsicóticos típicos.

1.3 Discinesia Tardia

A DT caracteriza-se por movimentos involuntários repetidos envolvendo boca, língua, face incluindo mastigação no vazio, protrusão da língua, estalido dos lábios e movimentos de franzir a face e piscar os olhos (KANE, 1995; CASEY, 2000) Cerca de 10-20% dos pacientes que fazem uso crônico de antipsicóticos típicos podem desenvolver DT, sendo que a prevalência aumenta com a idade e chega a 50% em pacientes com mais de 50 anos (KANE & SMITH, 1982). O fato mais preocupante em relação à DT consiste na persistência da síndrome após a retirada dos fármacos, podendo ser irreversível (CASEY, 1985).

Em animais a DT é chamada de discinesia orofacial (DO) e reproduz de maneira semelhante à ocorrência de DT em humanos. O tratamento crônico com antipsicóticos induz movimentos orais espontâneos em ratos. Estes movimentos são chamados movimentos de macas no vazio (MMV) e são caracterizados por um movimento involuntário de abrir a boca com ou sem protrusão de língua. Existe uma grande variabilidade na resposta dos ratos a antipsicóticos, assim como na DT, alguns indivíduos são mais suscetíveis ao desenvolvimento de MMV. Já foi descrito na literatura a permanência e até o aumento dos MMVs após a retirada do tratamento (ANDREASSEN & JORGENSEN, 2000). Outra similaridade é que o número de MMVs pode sofrer alterações com o tempo, podendo piorar em função do aumento da idade e fatores associados ao estresse (KANEDA *et al.*, 1992). O modelo animal mais utilizado para o estudo do desenvolvimento de DO consiste no tratamento de ratos com antipsicóticos típicos, como haloperidol e flufenazina (FACHINETTO *et al.*, 2007a; FACHINETTO *et al.*, 2007b).

Diversos estudos vêm propondo hipóteses para o desenvolvimento da DT, apesar das inconsistências a hipersensibilidade dopaminérgica é uma delas. Segundo esta hipótese o bloqueio crônico de receptores dopaminérgicos resulta em um aumento compensatório do número e sensibilidade dos receptores e em consequência um estado hiperdopaminérgico e manifestações clínicas, como a DT (KLAWANS & RUBIVITS, 1972; BURT *et al.*, 1977; RUBINSTEIN *et al.*, 1990; ANDREASSEN & JORGENSEN, 2000). Outra hipótese para explicar a DT é a neurotoxicidade dos radicais livres produzidos pelo metabolismo de catecolaminas. Segundo esta hipótese, o bloqueio de receptores dopaminérgicos levaria a um aumento na síntese e metabolismo de dopamina, o que pode levar a formação de quinonas de dopamina bem como a formação de peróxido de hidrogênio através da ação da enzima MAO

(LOHR, 1991; ANDREASSEN & JORGENSEN, 2000) que podem ocasionar um aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio.

Desta forma, o tratamento com antipsicóticos tem sido amplamente utilizado em modelos animais para estudo do desenvolvimento de desordens motoras como a DT, além de proporcionar a busca por tratamentos que visem minimizar os efeitos colaterais causados por estes fármacos.

1.4 Doenças de Parkinson e Reserpina

A DP é uma doença neurodegenerativa que acomete cerca de 1-2% da população com mais de 60 anos (HUGHES *et al.*, 2000) sendo que com o aumento da idade este índice aumenta consideravelmente. Esta doença é caracterizada pelos seguintes sintomas: rigidez, bradicinesia, hipocinesia, acinesia, hipomimia, hipofonia, falha na deglutição entre outros. Estes sintomas prejudicam significativamente a qualidade de vida dos pacientes, pois desenvolvem uma postura típica e podem perder os reflexos posturais normais tendo como consequência quedas e dificuldade de locomoção. Anormalidades cognitivas e afetivas são também sintomas apresentados por estes pacientes, o que leva a falta de iniciativa para participar de atividades e atraso de respostas a questionamentos. Quadros de depressão também são comuns, além disso, a demência é mais freqüente em pacientes idosos com DP do que em outras causas de demência (DAUER & PRZEDBORSKI, 2003; GÓMEZ-ESTEBAN *et al.*, 2007).

Os prejuízos motores causados pela DP originam-se de perdas seletivas de neurônios mesencefálicos localizados na substância negra *pars compacta* (JELLINGER, 2007). Estes neurônios projetam-se para os núcleos caudado e putamen (o estriado), onde liberam dopamina. A neurotransmissão dopaminérgica no estriado é o primeiro passo na sinalização de vias que passam, na sequência, através do globo pálido, o núcleo subtalâmico e o tálamo em uma via para o córtex motor (WICHMANN & DELONG, 2003). O parkinsonismo surge quando mais da metade dos terminais nervosos dopaminérgicos no estriado são perdidos. Uma pesquisa pioneira realizada há 50 anos, demonstrou que o parkinsonismo poderia ser revertido temporariamente por intervenções farmacológicas que restauram a neurotransmissão dopaminérgica estriatal (HORNYKIEWICZ, 2002). Esta reversão pode ser realizada por terapia de reposição de dopamina usando tanto a L-DOPA (1-3,4-dihidroxi-fenilalanina) como

agonistas dopaminérgicos. Nos estágios iniciais da DP, o tratamento é altamente efetivo, mas com a progressão da doença, as complicações motoras decorrentes do uso destes fármacos tornam-se muito evidentes (JANKOVIC, 2006; JANKOVIC & STACY, 2007).

Assim como a DP, a discinesia induzida por antipsicóticos, não possui tratamento efetivo e que seja desprovido de inúmeros efeitos colaterais. Outro ponto em comum ente a DP e a discinesia é o envolvimento do sistema dopaminérgico, principalmente da via nigroestriatal.

Alguns modelos animais têm sido propostos para estudar a patofisiologia de desordens motoras que ocorrem em humanos (NEISEWANDER *et al.*, 1991a; 1994; SALAMONE & BASKIN, 1996; BURGER *et al.*, 2004; 2005; CASTRO *et al.*, 2006; FACHINETTO *et al.*, 2005; 2007a; 2007b). Dentre estes está o modelo experimental induzido por reserpina que produz movimentos extrapiramidais considerados relacionados à discinesia orofacial por alguns autores e ao parkinsonismo por outros (NEISEWANDER *et al.*, 1991a; 1994; SALAMONE & BASKIN, 1996; BURGER *et al.*, 2004; 2005; AGUIAR *et al.*, 2009; PEREIRA *et al.*, 2011).

Tem sido proposto que a reserpina induz desordens motoras através do aumento nos níveis de dopamina extracelulares e consequente neurotoxicidade dopaminérgica (NEISEWANDER *et al.*, 1991a; 1994; ANDREASSEN & JORGENSEN, 2000). A reserpina previne o armazenamento da dopamina em vesículas neuronais pré-sinápticas por interferir com o VMAT-2 (Figura 4). Desta forma, ocorre um aumento na formação de metabólitos acídicos e H₂O₂ como consequência do aumento no catabolismo citosólico da dopamina pela MAO. Esta ação da reserpina mimetiza, pelo menos em parte, o *turnover* aumentado da dopamina em terminais dopaminérgicos que tem sido verificados no curso da DP (ABÍLIO *et al.*, 2004; BURGER *et al.*, 2004; NAIDU *et al.*, 2004; BILSKA *et al.*, 2007) e também nas fases iniciais do tratamento com antipsicóticos que leva a DO.

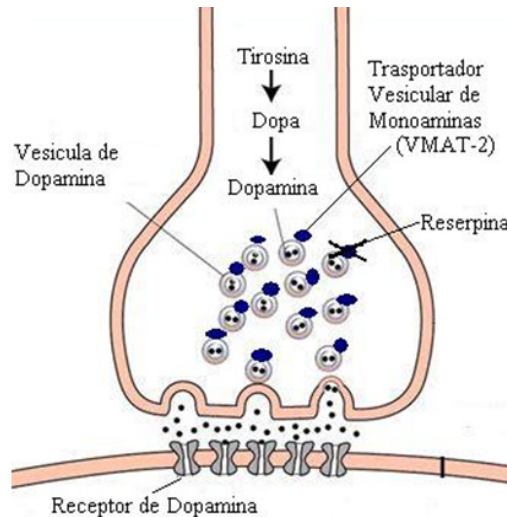


Figura 4 – Bloqueio do transportador vesicular de monoaminas: mecanismo de ação da reserpina.

Embora os mecanismos de indução da DO por antipsicóticos pareça ter semelhanças com os mecanismos de indução da DO por reserpina, dados da literatura mostram que a *Valeriana officinalis*, por exemplo, foi efetiva em reduzir apenas a DO induzida por reserpina e não por haloperidol (FACHINETTO *et al.*, 2007a; PEREIRA *et al.*, 2011). Por outro lado, o resveratrol que é uma fitoalexina encontrada em uvas e outros alimentos, capaz de inibir a MAO *in vitro* (YÁÑZ *et al.*, 2006), diminuiu o número de MMVs em roedores induzidos por reserpina e flufenazina (BUSANELLO *et al.*, 2011; 2012), demonstrando que apesar de existirem diferenças importantes entre estes dois modelos, também existem pontos característicos em comum e que poderiam ser testados como estratégia terapêutica.

1.5 *Hypericum perforatum*

O *H. perforatum* L. conhecido popularmente como erva de São João, pertence ao gênero *Hypericum*, o qual tem mais de 400 espécies em todo mundo. Esta é uma planta nativa da Europa, Ásia ocidental e Norte da África, mas naturalizou-se em muitas partes do mundo. Nos últimos anos o consumo de produtos derivados do *H. perforatum* aumentou consideravelmente, tornando-se um dos fitoterápicos mais consumidos no mundo (WILLS, *et al.*, 2000). Esta planta tem uma gama de aplicações medicinais, incluindo tratamento de

feridas, eczemas, queimaduras, doenças do trato digestivo e distúrbios psicológicos (BUTTERWECK, 2003). Desde o século V a.C., o *H. perforatum* apresenta um histórico de utilização para a cura de feridas. Além disso, muitas espécies foram amplamente utilizadas por tribos indígenas como antipirético e para o tratamento da tosse (SADDIQE *et al.*,2010).

Em 1597, John Gerard, referiu-se a pomada de *H. perforatum* em seu livro “*The Herball or General History of Plants*”, como a melhor e mais preciosa terapia natural para cicatrização disponível. Outros usos populares foram registrados por Hill (1808) para ulcerações dos ureteres, litíase e por Greene (1847) para ulcerações dos rins, antipirético, vermífugo, icterícia, gota e reumatismo. Griffth (1847) mencionou que a planta poderia ser utilizada como óleo ou unguento para ulcerações, tumores e como diurético. King (1876) escreveu sobre o uso da erva de São João em aflições urinárias, diarreia, icterícia, menorragia, histeria, desequilíbrios nervosos e uso tópico em traumas. No século passado, Duke (1985) relatou a utilização do *H. perforatum* na medicina popular para tratamento de carcinoma de ovário, câncer de útero e estômago e tumores linfáticos. Duke cita outras aplicações como na asma brônquica, desintéria, hemorragia, depressão nervosa entre outras (SADDIQE *et al.*,2010).

A Erva de São João manteve-se contemporânea em relação à lista de plantas medicinais mais utilizadas. Nos últimos 30 anos, esta planta tem sido investigada em estudos clínicos e laboratoriais devido a sua infinidade de propriedades farmacológicas já documentadas. Recentemente, tornou-se popular como um tratamento alternativo e efetivo para depressão (KAPUSTA & DUSEK, 2003). Uma grande quantidade de medicamentos contendo extratos de *H. perforatum* é comercializada nos Estados Unidos, Alemanha e outros países da Europa. Alguns efeitos colaterais, como fotossensibilidade, são relacionados ao uso da planta e algumas interações com medicamentos e alimentos são conhecidas (KAPUSTA & DUSEK, 2003).

Uma série de compostos bioativos foram identificados no material bruto de *H. perforatum*, entre eles: naftodianonas, como hipericina e pseudohipericina, floroglucínóis, como hiperforina e adhiperforina, flavonóides, biflavonóides e proantocianidinas. Em menor quantidade também são detectados taninos, xantonas, óleos essenciais e aminoácidos (NAHRSTEDT & BUTTERWECK, 1997).

Muitas atividades farmacológicas são atribuídas a planta entre elas: atividade antifúngica, antiinflamatória e antiviral (SADDIQE *et al.*,2010). Porém a atividade antidepressiva tem sido a mais estudada. Estudos demonstram que esta atividade dos extratos de *Hypericum* seria atribuída a floroglucínóis derivados da hiperforina (CHATTERJEE *et al.*,

1998a; JENSEN *et al.*, 2001; MUELLER *et al.*, 1998, 2001; SINGER *et al.*, 1999; WONNEMANN *et al.*, 2001), naftodiantronas, hipericina e pseudohipericina (BUTTERWECK *et al.*, 1998, 2001a,b) e a vários flavonóides (BUTTERWECK *et al.*, 2000; CALAPAI *et al.*, 1999). Dados da literatura sugerem que o *H. perforatum* exerce ação antidepressiva através da inibição da MAO e da inibição da recaptação de serotonina, noradrenalina e dopamina (SUZUKI *et al.*, 1984; BLADT & WAGNER, 1994; MÜLLER *et al.* 1998; NEARY & BU 1999; BUTTERWECK, 2003), pois é sabido que as monoaminas estão relacionadas à depressão, em especial o sistema dopaminérgico e serotoninérgico (NEMEROFF & OWENS, 2002).

Considerando que o *H. perforatum*, é uma planta medicinal amplamente utilizada para tratar diferentes formas de depressão, e esta planta tem com um de seus mecanismos de ação atribuído a inibição da MAO, torna-se importante a realização de estudos que visem elucidar a influência desta planta em modelos de desordens motoras, uma vez que a MAO está diretamente ligada a metabolização de monoaminas e conseqüente neurotoxicidade em modelos animais de desordens motoras induzidas por flufenazina ou reserpina.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi investigar o efeito do *H. perforatum* em diferentes modelos de desordens motoras em ratos.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito do *H. perforatum* sobre movimentos de mascar no vazio induzidos por flufenazina ou reserpina em ratos;
- Verificar o efeito do *H. perforatum* sobre a atividade locomotora em ratos tratados com flufenazina ou reserpina.

3 RESULTADOS

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de um manuscrito, o qual se encontra aqui organizado. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas, encontram-se no próprio manuscrito. O **manuscrito** está disposto na forma em que foi submetido para publicação na revista *Behavioural Pharmacology*.

3.1 Manuscrito:**EFFECT OF *Hypericum perforatum* ON DIFFERENT MODELS OF MOVEMENT DISORDERS IN RATS**

Elizete De Moraes Reis; Jivago Röpke Rodrigues; Alcindo Busanello; Patrícia Reickziegel; Caroline Queiroz Leal; Caroline Wagner; Aline Boligon; Margareth Linde Athayde; Roselei Fachinetto.

SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO

EFFECT OF *Hypericum perforatum* ON DIFFERENT MODELS OF MOVEMENT DISORDERS IN RATS

Running head: *H. perforatum* against movement disorders

^AElizete De Moraes Reis; ^BJivago Röpke; ^AAlcindo Busanello; ^A Patrícia Reckziegel; ^CCaroline Queiroz Leal; ^ACaroline Wagner; ^DAline Boligon; ^DMargareth Linde Athayde; ^{A,C*}Roselei Fachinetto.

^A*Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil.*

^B*Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Minas Gerais, MG, Brazil.*

^C*Curso de Farmácia, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil.*

^D*Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil.*

Corresponding author:

Dr^a. Roselei Fachinetto

Centro de Ciências da Saúde

Departamento de Fisiologia e Farmacologia

97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

Tel: x21-55-3220 8096

Fax: x21-55-3220 8241

e-mail: roseleirf@gmail.com

Abstract

Here, we evaluated the effect of *Hipericum perforatum* (*H. perforatum*), a plant popularly used as antidepressant, on different models of abnormal movements in rats, either using fluphenazine or reserpine. It were quantified the number of vacuous chewing movements (VCMs) and locomotor activity in both models. In experiment 1, rats received a single administration of fluphenazine (25 mg/Kg, i.m.) and/or *H. perforatum* (300 mg/Kg, in place of drinking water) during 7 days. Fluphenazine increased VCMs and decreased the locomotor activity after 7 days of treatment. However, *H. perforatum* did not alter either the number of VCMs or the locomotor activity (represented by number of crossing and rearing in the open field test) in rats. In experiment 2, rats received reserpine once a day during 3 days (0.5 mg/Kg, s.c.) and/or *H. perforatum* (300 mg/Kg, in place of drinking water) during 16 days. Reserpine treatment increased VCMs and decreased the locomotor activity. *H. perforatum* did not alter the number of VCMs or the number of rearing. However, *H. perforatum* co-treatment could avoid the effect of reserpine on number of crossings. In conclusion, *H. perforatum* did not seem to be efficacious to protect against orofacial movements induced by fluphenazine or reserpine in rats.

Keywords: fluphenazine. Reserpine. Locomotor activity. VCMs.

Introduction

Antipsychotics drugs are used in the treatment of severe psychiatric disorders. Its pharmacological action involves the blockage of dopamine D2 receptors (Creese et al., 1976). The primary concern regarding the adverse reactions of antipsychotics is induction of extrapyramidal motor disorders including impaired involuntary movements as tardive dyskinesia (Kane and Smith, 1982; Ohno et al., 2011). Also, neurodegenerative diseases, as Parkinson's disease, are present in a high percentage of the population and cause clinical symptoms including extrapyramidal disorders (Jicha and Salamone, 1991; Bove et al., 2005). Some animal models has been proposed to study the developmental of extrapyramidal symptoms including the utilization of antipsychotics or reserpine (Neisewander et al., 1991, 1994; Salamone and Baskin, 1996; Burger et al., 2003, 2005; Faria et al., 2005; Naidu et al., 2004, 2006; Castro et al., 2006; Fachinetto et al., 2005; 2007a; 2007b). However, neither the

mechanisms responsible for the developmental of this movement syndrome are understood nor efficacious therapies with low side effects were found at this moment. Even the action mechanism of antipsychotics, as fluphenazine, and reserpine are different, both drugs seems to have in common the capacity of promoting an increase in dopamine levels leading to dopaminergic toxicity. It is proposed that high levels of extracellular dopamine could lead to an increase the formation of acidic metabolites and hydrogen peroxide as consequence of accelerated oxidative catabolism of cytosolic dopamine by monoamine oxidase (MAO) which could contribute to dopaminergic toxicity and, consequently, involuntary movements (Abílio et al., 2002; Burger et al., 2003; Naidu et al., 2004; Bilska and Dubiel, 2007).

Hypericum perforatum L. (*H. perforatum*) commonly known as St. John's Wort, is used in the treatment of mild to moderate forms of depression. Clinical studies provide evidence that *H. perforatum* is effective as well as conventional synthetic antidepressants (Brenner et al., 2000; Harrer and Schulz, 1994; Philipp et al., 1999; Schrader, 2000; Volz, 1997; Woelk, 2000). *Hypericum* extract contains numerous compounds with documented biological activity and studies suggest that this herb demonstrated anxiolytic and anti-inflammatory activity (Mascolo et al., 1987; Langosch et al., 2002; Kumar et al., 2001). Literature data suggests that *H. perforatum* acts via MAO inhibition and via inhibition of the neuronal uptake of serotonin, norepinephrine and dopamine (Suzuki et al., 1984; Bladt and Wagner, 1994; Müller et al. 1997; Neary and Bu 1999; Butterweck et al., 2003). However, there are no data in literature investigating if the MAO inhibition property of *H. perforatum* is related to protection against movement disorders induced by antipsychotics or reserpine in animal models.

Thus, the aim of the present study was to evaluate the effect of *H. perforatum* on different models of involuntary movements in rats, either using fluphenazine or reserpine as inducers.

Material and Methods

Animals

Male Wistar rats weighing 200–250 g (about 2 months old) were used. Groups of five animals were kept in cages with free access to food and water in a room with controlled temperature (22–23 °C) and on a 12 h-light/dark cycle with lights on at 7:00 a.m. All experiments were performed in accordance to the guidelines of the Nacional Council of

Control of Animal Experimentation (CONCEA). This protocol was approved by internal ethical commission of UFMS.

Drugs

Reserpine (methyl reserpate 3,4,5-trimethoxybenzoic acid ester) was obtained from Sigma (St Louis, Missouri, USA). Fluphenazine enantate (Flufenan[®]) was obtained from Cristália (São Paulo, BR). *H. perforatum* was commercially acquired from DEG[®].

Chemical, apparatus and general procedures

All chemical were of analytical grade. Methanol, acetic acid, gallic acid, chlorogenic acid and caffeic acid purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Quercetin, rutin and kaempferol were acquired from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). High performance liquid chromatography (HPLC-DAD) was performed with the HPLC system (Shimadzu, Kyoto, Japan), Prominence Auto Sampler (SIL-20A), equipped with Shimadzu LC-20AT reciprocating pumps connected to the degasser DGU 20A5 with integrator CBM 20A, UV-VIS detector DAD (diode) SPD-M20A and Software LC solution 1.22 SP1.

Extract preparation

Aqueous extract of *H. perforatum* was prepared by infusion (90°C for 30 min), the power was weighed considering the body weight of animals and daily consumption. After that, the infusion was filtered using filter paper and cooled to room temperature. The extract was always protected from the light. An aliquot was used to analyses by HPLC and total phenolic compounds determination.

Quantification of phenolics and flavonoids compounds by HPLC-DAD

Reverse phase chromatographic analyses were carried out under gradient conditions using C₁₈ column (4.6 mm x 250 mm) packed with 5 µm diameter particles; the mobile phase was water containing 2% acetic acid (A) and methanol (B), and the composition gradient was: 5% of B until 2 min and changed to obtain 25%, 40%, 50%, 60%, 70% and 100% B at 10, 20, 30, 40, 50 and 60 min, respectively. The flow rate was 0.8 ml/min, injection volume 40 µl and the wavelength were 254 nm for gallic acid, 325 nm for caffeic and chlorogenic acids, and 365nm for quercetin, rutin and kaempferol. All the samples and mobile phase were filtered through 0.45 µm membrane filter (Millipore) and then degassed by ultrasonic bath prior to use. Stock solutions of standards references were prepared in the HPLC mobile phase at a

concentration range of 0.031 – 0.250 mg/ml for kaempferol, quercetin and rutin; and 0.006 – 0.250 mg/ml for gallic, chlorogenic and caffeic acids. The chromatography peaks were confirmed by comparing its retention time with those of reference standards and by DAD spectra (200 to 500 nm). Calibration curve for gallic acid: $Y = 52579x + 1132.5$ ($r = 0.9976$); chlorogenic acid: $Y = 53256x + 1094.8$ ($r = 0.9998$); caffeic acid: $Y = 86562x + 1108.3$ ($r = 0.9987$); rutin: $Y = 60996x - 1521.7$ ($r = 0.9996$); quercetin: $Y = 55734x - 1491.2$ ($r = 0.9996$) and kaempferol: $Y = 57923x - 1853.9$ ($r = 0.9978$). All chromatography operations were carried out at ambient temperature and in triplicate.

Experimental design

Experiment 1: Effects of aqueous extract of *H. perforatum* on movement disorder induced by fluphenazine in rats

Thirty adult male rats were divided into four groups:

- 1) Control group received vehicle (soy oil, that was fluphenazine vehicle, i.m., 1 ml/Kg) and water *ad libitum*;
- 2) *H. perforatum* group received vehicle and *H. perforatum* (300 mg/Kg in place of drinking water);
- 3) Fluphenazine group received fluphenazine enantate (25mg/Kg, i.m.) and water *ad libitum*;
- 4) Fluphenazine plus *H. perforatum* group received fluphenazine enantate (25mg/Kg, i.m.) and *H. perforatum* (300mg/Kg in place of drinking water).

Fluphenazine enantate, a slow-releasing preparation of fluphenazine, was administered intramuscularly (i.m.) only at first day of the experiment, as previously published (Fachinetto et al., 2007a; Busanello et al., 2012). And *H. perforatum* extract was administered during 7 days and the treatment started at same day of fluphenazine. The fresh extract of *H. perforatum* and its vehicle were placed daily before the beginning of the dark cycle. The consumption was daily quantified and it was not observed a reduction in liquid intake among the groups (data not shown). Behavioral parameters of orofacial movements (VCMs) – before the treatments and after 7 days of treatments - and spontaneous locomotor activity (crossing and rearing in the open field) - after 7 days of treatments - were evaluated.

Experiment 2: Effects of aqueous extract of *H. perforatum* on the development of movement disorders induced by reserpine in rats

Firstly, 22 adult male rats were divided into two groups: control group (n=11) received water and *H. perforatum* group (n=11) received *H. perforatum* (300mg/Kg) in place the drinking water for two weeks. In day 9th, each group was subdivided into 2 groups as follow:

- Control group was subdivided into: 1) vehicle group, which received a daily administration of 0.2% acetic acid, subcutaneously (s.c.), during 3 days and water *ad libitum* and 2) reserpine group, which received a daily administration of 0.5% reserpine, s.c., during 3 days and water *ad libitum*.
- *H. perforatum* group was subdivided into: 1) *H. perforatum* group, which received a daily administration of 0.2% acetic acid, s.c., during 3 days and *H. perforatum ad libitum* and 2) reserpine plus *H. perforatum* group, which received a daily administration of 0.5% reserpine, subcutaneously (s.c.), during 3 days and *H. perforatum ad libitum* (Beijamini and Andreatini, 2003).

After the last injection of reserpine or vehicle (24 hours), it was evaluated behavioral parameters of orofacial movements (VCMs) and spontaneous locomotor activity (crossing and rearing in the open field).

Behavior testing

Quantification of VCMs

To quantify the frequency of VCMs, rats were placed individually in cages (20x20x19cm) containing one mirror under the floor. VCMs are defined as single mouth openings in the vertical plane not directed towards physical material. If VCMs occurred during a period of grooming they were not taken into account. The behavioral parameters of OD were measured continuously for 6 min after a period of 6 min adaptation (Pereira et al., 2011; Busanello et al., 2012).

Open field test

To analyze possible changes in spontaneous locomotor and exploratory activity caused by the treatments, the animals were placed individually in the center of a circular open field arena divided into nine parts (Broadhurst, 1960). The number of rearing and the number of line crossings were measured over 5 min.

Statistical analysis

VCM and open field test (rearing and crossings) data were analyzed by one-way analysis of variance, followed by Tukey's multiple range tests when appropriate.

Results

HPLC analysis

HPLC analysis of *H. perforatum* extract showed the presence of the gallic acid (0.16%; peak 1), chlorogenic acid (2.92%; peak 2) and caffeic acid (0.74%; peak 3), along with flavonoids: rutin (7.61%; peak 4), isoquercitrin (5.43 %; peak 5), quercitrin (2.79%; peak 6), quercetin (4.83%; peak 7) and kaempferol (0.95%; peak 8) (Figure 1 and Table 1). The HPLC analysis revealed that flavonoids and phenolics are the major components of the extract; these results are similar to other studies previously performed for the species (Brolis *et al.*, 1998; Cirak *et al.*, 2007).

Effects of *H. perforatum* aqueous extract on fluphenazine and reserpine-induced movement disorders

Fluphenazine caused a significant increase on VCMs after 7 days of treatment ($p < 0.05$). However, *H. perforatum* was not able to reduce the intensity of VCMs in rats. *H. perforatum* did not cause any effect on VCMs when administered alone (Figure 2).

Similar results were observed when VCMs were induced by reserpine. Reserpine treatment caused a significant increase on VCMs compared with the control group ($p < 0.05$); co-treatment with *H. perforatum* was not able to prevent this effect. *H. perforatum* did not cause any effect on VCM when administered alone (Figure 3).

The effects of *H. perforatum* aqueous extract on changes in spontaneous locomotor activity caused by fluphenazine and reserpine

Fluphenazine caused a marked decreased the locomotor activity, represented by the number of crossings and rearings in the open field test ($p < 0.05$). Co-treatment with *H. perforatum* did not alter these effects. *H. perforatum* alone did not change locomotor activity in rats (Table 2).

Reserpine treatment also decreased the locomotor activity, represented by the number of crossings and rearings in the open field test ($p < 0.05$). *H. perforatum* co-treatment did not alter the number of rearings. However, *H. perforatum* co-treatment could avoid the effect of reserpine on number of crossings ($p < 0.05$). *H. perforatum* alone decreased the number of rearings without alterations in the number of crossings (Table 3).

Discussion

Movement disorders affect a high percentage (1-2%) of the population around the world (Van Den Eeden et al., 2003). The most serious problem is the lack of an effective treatment for these conditions without significant side effects. Several studies suggests that antidepressant, as selegiline, have promising results in experimental animals with orofacial dyskinesia (Sachdev et al., 1999). By the other hand, other studies demonstrated antidepressant could potentiate the motor side effects induced by antipsychotics (Tatara et al., 2012). In this view, the present study aimed to investigate the effect of *H. perforatum*, a plant with antidepressant properties with low side effects, on movement disorders induced by different agents.

A model of movement disorder uses antipsychotic drugs as fluphenazine. Some hypotheses have been purposed to explain the development of movement disorders, including overproduction of free radicals, imbalance of dopaminergic system (Cadet et al., 1986, Lohr, 1991; Andreassen and Jorgensen, 2000). Antipsychotics act blocking dopamine receptors, mainly D2 receptors (Creese et al., 1976). It is described in the literature this blockage could generate a secondary increase in dopamine turnover and metabolism of monoamines. The increase in monoamine metabolism through MAO can produce hydrogen peroxide that may interact with transition metals that are present at high levels in basal ganglia, producing free radicals (Coyle and Puttfarcken, 1993; Lohr et al., 2003). Considering literature data proposing that *H. perforatum* is able to inhibit MAO, the first aim of the present study was to investigate the effects of an aqueous extract of *H. perforatum* on VCMs fluphenazine in rats. Our results show that fluphenazine caused an increase on VCMs after 7 days of treatment. However, *H. perforatum* was not able to reduce the intensity of VCMs in rats. It is known that dopaminergic pathways blockage by antagonist or depletion of monoamines causes a suppression of locomotor activity (Salamone et al., 2008). Thus, we also investigated the effect of aqueous extract of *H. perforatum* against the reduction spontaneous locomotor

activity in the rats in the open field test. Fluphenazine caused a decrease on spontaneous locomotor activity and *H. perforatum*, at least at tested dose, did not cause any effect.

Another model to investigate the efficacious of pharmacological agents against movement disorder is using reserpine as neurotoxic agent (Busanello et al., 2011; Pereira et al., 2011; Reckziegel et al., 2013). There are some studies showing that some plants and other compounds can be effective in models using reserpine (Burger et al., 2004; Pereira et al., 2011) to induce movement but not with antipsychotic (Fachinetto et al., 2007a; Fachinetto et al., 2007b) agents. These evidences reinforce the idea that both models besides their similarities in symptoms have important molecular differences. Reserpine is a monoamine-depleting that exerts effect through blockage of vesicular monoamine transporter in the central nervous system, leading to an increase in monoamine turnover, mainly in basal ganglia, which have been related to movement disorders (Abílio et al., 2002; Burger et al., 2003; Naidu et al., 2004; Bilska and Dubiel, 2007). Second aim of this study was evaluated if aqueous extract *H. perforatum* could protect the developmental of movement disorders induced by reserpine. Reserpine caused a significant increase on VCMs and the co-treatment with *H. perforatum* was not able to prevent this effect. Literature data shows that resveratrol, a phytoalexin related to MAO inhibition, reduced significantly the VCMs induced by reserpine (Busanello et al., 2011). It has also been showed, *H. perforatum* extracts and hipericin are able to inhibit metabolizing enzymes MAO A and MAOB and catechol-o-methyltransferase (COMT) (Suzuki et al., 1984; Bladt and Wagner, 1994). An elegant study conducted by Butterweck et al. suggested that some flavonoids present in the extract also can exert MAO inhibitory activity (Butterweck, 2003). HPLC analyses from aqueous extract of *H. perforatum* have components with beneficial effects on developmental of motor disorders, as quercetin and gallic acid (Naidu et al., 2003; Reckziegel et al., 2013). However, the concentration of possible active compounds are lower than those present in other extracts used previously by other authors (Pereira et al., 2011; Peroza et al., 2013; Reckziegel et al., 2013). Thus, it is reasonable to assume that the extract aqueous of *H. perforatum* was not able to reach *in vivo* the necessary concentrations to inhibit the MAO. It may be due to the lowest amount of flavonoids when compared with another extracts (Butterweck et al., 2003).

Another effect associated with reserpine administration in rodents is a decrease in locomotor activity (Neisewander et al., 1991, 1994). Corroborating with literature, we also observed a decrease in the number of crossings and rearings. The co-treatment with *H. perforatum* appears to change this effect only concerning the number of crossings. It is known that mainly in the *nucleus accumbens* dopamine depletion caused by reserpine results from a

suppression of locomotion (Salamone et al., 1998). By the other hand, VCM development are associated with basal ganglia, mainly the nigrostriatal pathway (Andreassen and Jorgensen, 2000). *H. perforatum* could be acting specifically in *nucleus accumbens* to protect against the effects of reserpine on number of crossings. It is reasonable to think that since *H. perforatum* is popularly used to treat depression, a psychiatric illness, whose pathophysiology is related to *nucleus accumbens* (Berton and Nestler, 2006).

In conclusion, our study suggests that *H. perforatum* did not protect against movement disorders induced by fluphenazine or reserpine. It can be proposed that the effectiveness of treatment in both models is linked with low concentration of the active compounds present in used extract. It is important to highlight that the presence of antioxidant compounds is not the unique condition to ameliorate movement disorders reinforcing that oxidative stress is not the only mechanism involved in development of these conditions.

Acknowledgments

This work was supported by the PRONEM#11/2029-1 and PRONEX/FAPERGS. M.E.B and M.L.A. receive a fellowship from CNPq. E.M.R, J.R., A.B. receive a fellowship from CAPES. P.R. receives a fellowship from FAPERGS.

References

- Abílio VC, Silva RH, Carvalho RC, Grassl C, Calzavara MB, Registro S, et al (2002). Important role of striatal catalase in aging- and reserpine-induced oral dyskinesia. *Neuropharmacolog* **47**:263–72.
- Andreassen OA, Jorgensen HA (2000). Neurotoxicity associated with neuroleptic- induced oral dyskinesias in rats. Implications for tardive dyskinesia? *Prog Neurobiol* **61**:525–41.
- Bejamini V, Andreatini R (2003). Effects of *Hypericum perforatum* and paroxetine on rat performance in the elevated T-maze. *Pharmacol Res* **48**:199-207.
- Berton O, Nestler EJ (2006). New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. *Nat Rev Neurosci* **7**:137-51.
- Bilska A, Dubiel M (2007). Alpha-lipoic acid differently affects the reserpine induced oxidative stress in the striatum and prefrontal cortex of rat brain. *Neuroscience* **146**:1758–71.

- Bladt S, Wagner H (1994). Inhibition of MAO by fractions and constituents of hypericum extract. *J Geriatr Psychiatry Neurol* **7**:57–9.
- Bove J, Prou D, Perier C, Przedborski S (2005). Toxin-induced models of Parkinson's disease. *NeuroRx* **2**:484–494.
- Brenner R, Azbel V, Madhusoodanan S, Pawlowska, M (2000). Comparison of an extract of Hypericum (LI 160) and sertraline in the treatment of depression: a double-blind, randomized pilot study. *Clin Ther* **22**: 411–9.
- Broadhurst PL. Experiments in psychogenetics (1960). In: Eysenk HJ, editor. *Experiments in personality*. London: Routledge&Kegan Paul. pp76.
- Brolis M, Gabetta B, Fuzzati N, Pace R, Panzeri F, Peterlongo F (1998). Identification by high-performance liquid chromatography–diode array detection–mass spectrometry and quantification by highperformance liquid chromatography–UV absorbance detection of active constituents of *Hypericum perforatum*. *J Chromatogr A* **825**: 9-16.
- Burger ME, Audrei A, Callegari L, Athayde FR, Nogueira CW, Zeni G, Rocha JB (2003). Ebselen attenuates reserpine-induced orofacial dyskinesia and oxidative stress in rat striatum. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **27**:135–40.
- Burger ME, Fachineto R, Alves A, Callegari L, Rocha JBT (2005). Acute reserpine and subchronic haloperidol treatments change synaptosomal brain glutamate uptake and elicit orofacial dyskinesia in rats. *Brain Res* **1031**:202–10.
- Burger M, Fachineto R, Calegari L, Paixão MW, Braga AL, Rocha JB (2004). Effects of age on reserpine-induced orofacial dyskinesia and possible protection of diphenyldiselenide. *Brain Res Bull* **64**:339-45.
- Busanello A, Barbosa NB, Peroza LR, Farias LE, Burger ME, Barreto KP, Fachineto R (2011). Resveratrol protects against a model of vacuous chewing movements induced by reserpine in mice. *Behav Pharmacol* **22**:71-5.
- Busanello A, Peroza LR, Wagner C, Sudati JH, Pereira RP, Prestes Ade S, Rocha JB, Fachineto R, Barbosa NB (2012). Resveratrol reduces vacuous chewing movements induced by acute treatment with fluphenazine. *Pharmacol Biochem Beha* **101**:307-10.
- Butterweck, V (2003). Mechanism of action of St. John's Wort in depression. What is known? *CNS Drugs* **17**: 539–562.
- Butterweck V, Christoffel V, Nahrstedt A, Petereit F, Spengler B, Winterhoff H (2003). Step by step removal of hyperforin and hypericin: activity profile of different Hypericum preparations in behavioral models. *Life Sci* **73**:627-39.

- Cadet JL, Lohr JB, Jeste DV. Free radical and tardive dyskinesia (1986). *Trends Neurosci* **9**:107–8.
- Castro JPMV, Frussa-Filho R, Fukushiro DF, Silva RH, Medrano WA, Ribeiro R de A, Abílio VC (2006). Effects of baclofen on reserpine-induced vacuous chewing movements in mice. *Brain Res Bull* **68**:436–41.
- Cirak C, Radusienė J, Karabük BS, Janulis V, Ivanauskas L (2007). Variation of bioactive compounds in *Hypericum perforatum* growing in turkey during its phenological cycle. *J Integr Plant Biol* **49**: 615–20.
- Coyle JT, Puttfarcken P (1993). Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* **262**:689–95.
- Creese I, Burt D, Snyder SH (1976). Dopamine receptor binding predicts clinical and pharmacological potencies of antischizophrenic drugs. *Science* **192**: 481–3.
- Fachinetto R, Burger MB, Wagner C, Wondracek DC, Brito VB, Nogueira CW, et al (2005). High fat diet increases the incidence of orofacial dyskinesia and oxidative stress in specific brain regions of rats. *Pharmacol Biochem Behav* **81**:585–592.
- Fachinetto R, Villarinho JG, Wagner C, Pereira RP, Puntel RL, Paixão MW, et al (2007a). Diphenyldiselenide decreases the prevalence of vacuous chewing movements induced by fluphenazine in rats. *Psychopharmacology* **194**:423–32.
- Fachinetto R, Villarinho JG, Wagner C, Pereira RP, Ávila DS, Burger ME, et al (2007b). *Valeriana officinalis* does not alter the orofacial dyskinesia induced by haloperidol in rats: role of dopamine transporter. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **31**:1478–86.
- Faria RR, Abílio VC, Grassl C, Chinen CC, Ribeiro LT, Castro JPMV, et al (2005). Beneficial effects of vitamin C and vitamin E on reserpine-induced oral dyskinesia in rats: critical role of striatal catalase activity. *Neuropharmacology* **48**:993–1001.
- Harrer G, Schulz V (1994). Clinical investigation of the antidepressant effectiveness of *Hypericum*. *J Geriatr Psychiatry Neurol* **7**:S6–8.
- Jicha GA, Salamone JD (1991). Vacuous jaw movements and feeding deficits in rats with ventrolateral striatal dopamine depletion: possible relation to Parkinsonian symptoms. *J Neurosci* **11**:3822–29.
- Kane JM, Smith JM (1982). Tardive dyskinesia: prevalence and risk factors, 1959 to 1979. *Arch Gen Psychiatry* **39**:473–81.

- Kumar V, Singh PN, Bhattacharya SK (2001). Anti-stress activity of Indian *Hypericum perforatum* L. *Indian J Exp Biol* **39**: 344–9.
- Langosch JM, Zhou XY, Heinen M, Kupferschmid S, Chatterjee SS, Noldner M, Walden J (2002). St John's wort (*Hypericum perforatum*) modulates evoked potentials in guinea pig hippocampal slices via AMPA and GABA receptors. *Eur Neuropsychopharmacol* **12**:209-16.
- Lohr JB (1991). Oxygen radicals and neuropsychiatric illness: some speculations. *Arch Gen Psychiatry* **48**:1097–106.
- Lohr JB, Kuczenski R, Niculescu AB (2003). Oxidative mechanisms and Tardive dyskinesia. *CNS Drugs* **17**:47–62.
- Mascalò N, Autore G, Capasso F, Menghini A, Fasulo MP (1987). Biological screening of Italian medicinal plants for anti-inflammatory activity. *Phytotherapy Research* **1**: 28–31.
- Muller WE, Rolli M, Schafer C, Hafner U (1997). Effects of hypericum extract (LI 160) in biochemical models of antidepressant activity. *Pharmacopsychiatry* **30**:102-7.
- Naidu PS, Singh A, Kulkarni SK (2003). Reversal of haloperidol-induced orofacial dyskinesia by quercetin, a bioflavonoid. *Psychopharmacology* **167**:418–23.
- Naidu PS, Singh A, Kulkarni SK (2004). Reversal of reserpine-induced orofacial dyskinesia and cognitive dysfunction by quercetin. *Pharmacology* **70**:59–67.
- Naidu PS, Singh A, Kulkarni SK (2006). Effect of *Withania somnifera* root extract on reserpine-induced orofacial dyskinesia and cognitive dysfunction. *Phytother Res* **20**:140–6.
- Neisewander JL, Lucki I, Mcgonigle P (1991). Neurochemical changes associated with the persistence of spontaneous oral dyskinesia in rats following chronic reserpine treatment. *Brain Res* **558**:27–35.
- Neisewander JL, Castañeda E, Davis DA (1994). Dose-dependent differences in the development of reserpine-induced oral dyskinesia in rats: support for a model of tardive dyskinesia. *Psychopharmacology* **116**:79–84.
- Neary JT, Bu Y (1999). *Hypericum* LI 160 inhibits uptake of serotonin and norepinephrine in astrocytes. *Brain Res* **816**:858-63.
- Ohno Y, Imaki J, Mae Y, Takahashi T, Tatara A (2011). Serotonergic modulation of extrapyramidal motor disorders in mice and rats: role of striatal 5-HT₃ and 5-HT₆ receptors. *Neuropharmacology* **60**:201–8.

Pereira RP, Fachinetto R, Prestes AS, Wagner C, Sudati JH, Boligon AA, Athayde ML, Morsch VM, Rocha JBT (2011). Valeriana officinalis ameliorates vacuous chewing movements induced by reserpine in rats. *J Neural Transm* **118**:1547–57.

Peroza LR, Busanello A, Leal CQ, Röpke J, Boligon AA, Meinerz D, Libardoni M, Athayde ML, Fachinetto R (2013). Bauhinia forficata prevents vacuous chewing movements induced by haloperidol in rats and has antioxidant potential in vitro *Neurochem Res* DOI: **10.1007/s11064-013-0981-8**.

Philipp M, Kohnen R, Hiller K (1999). Hypericum extract versus imipramine or placebo in patients with moderate depression: randomized multi centre study of treatment for eight weeks. *Br. Med. J* **319**:1534–8.

Reckziegel P, Peroza LR, Schaffer LF, Ferrari MC, de Freitas CM, Bürger ME, Fachinetto R (2013). Gallic acid decreases vacuous chewing movements induced by reserpine in rats. *Pharmacol Biochem Behav* DOI: [org/10.1016/j.pbb.2013.01.001](https://doi.org/10.1016/j.pbb.2013.01.001)

Salamone JD, Baskin P (1996). Vacuous jaw movements induced by acute reserpine and low-dose apomorphine: possible mode of Parkinsonian tremor. *Pharmacol Biochem Behav* **53**:179–83.

Salamone JD, Ishiwari K, Betz AJ, Farrar AM, Mingote SM, Font L et al (2008) Dopamine/adenosine interactions related to locomotion and tremor in animal models: possible relevance to parkinsonism. *Parkinsonism Relat Disord* **14**:130–4.

Salamone JD, Mayorga AJ, Trevitt JT, Cousins MS, Conlan A, Nawab A (1998). Tremulous jaw movements in rats: a model of Parkinsonian tremor. *Progress Neurobiol* **56**:591–611.

Sachdev P, Saharov T, Cathcart S (1999). The preventative role of antioxidants (selegiline and vitamin E) in a rat model of tardive dyskinesia. *Biol Psychiatry* **46**:1672–81.

Schrader E (2000). Equivalence of St John's wort extract (Ze 117) and fluoxetine: a randomized, controlled study in mild/moderate depression. *Int. Clin Psychopharmacol* **5**: 61–8.

Suzuki O, Katsumata Y, Oya M, Bladt S, Wagner H (1984). Inhibition of monoamine oxidase by *Hypericin*. *Planta Med* **50**:272–4.

Tatara A, Shimizu S, Shin N, Sato M, Sugiuchi T, Imaki J, Ohno Y (2012). Modulation of antipsychotic-induced extrapyramidal side effects by medications for mood disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **38**:252–9.

Van Den Eeden SK, Tanner CM, Bernstein AL, Fross RD, Leimpeter A, Bloch DA, Nelson LM (2003). Incidence of Parkinson's disease: variation by age, gender, and race/ethnicity. *Am J Epidemiol* **157**:1015-22.

Volz HP (1997). Controlled clinical trials of Hypericum extracts in depressed patients: An overview. *Pharmacopsychiatry* **30**: 72–6.

Woelk, H (2000). Comparison of St John's wort and imipramine for treating depression: randomised controlled trial. *BMJ* **321**:536–9.

Legends for figures

Figure 1: Representative high performance liquid chromatography profile of *H. perforatum*. Gallic acid (peak 1; t_R = 11.89 min), chlorogenic acid (peak 2; t_R = 21.63 min), caffeic acid (peak 3; t_R = 28.07 min), rutin (peak 4; t_R = 36.65 min), isoquercitrin (peak 5; t_R = 30.15 min), quercitrin (peak 6; t_R = 41.95 min), quercetin (peak 7; t_R = 48.40 min) and kaempferol (peak 8; t_R = 55.39 min).

Figure 2: Effects of *H. perforatum* on fluphenazine-induced orofacial movements (represented by number of VCMs during 6 min) in rats after 7 days of treatment. Values are presented as means \pm S.E.M. (Control, n=5; *H. perforatum*, n=5; fluphenazine, n=10; fluphenazine + *H. perforatum*, n=10. *different from control; # different from *H. perforatum* group.

Figure 3: Effects of *H. perforatum* on reserpine-induced orofacial movements (represented by number of VCMs during 6 min) in rats. Values are presented as means \pm S.E.M. (Control, n=6; *H. perforatum*, n=6; reserpine, n=5; reserpine + *H. perforatum*, n=5. *different from control; # different from *H. perforatum* group.

Figure 1

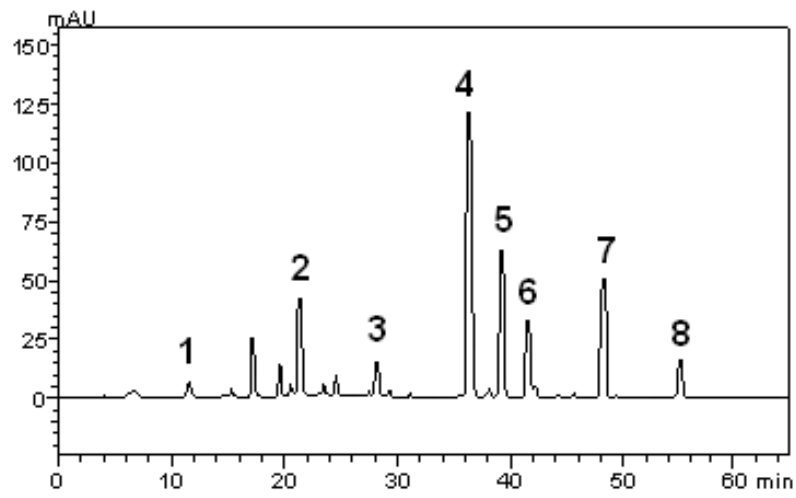


Figure 2

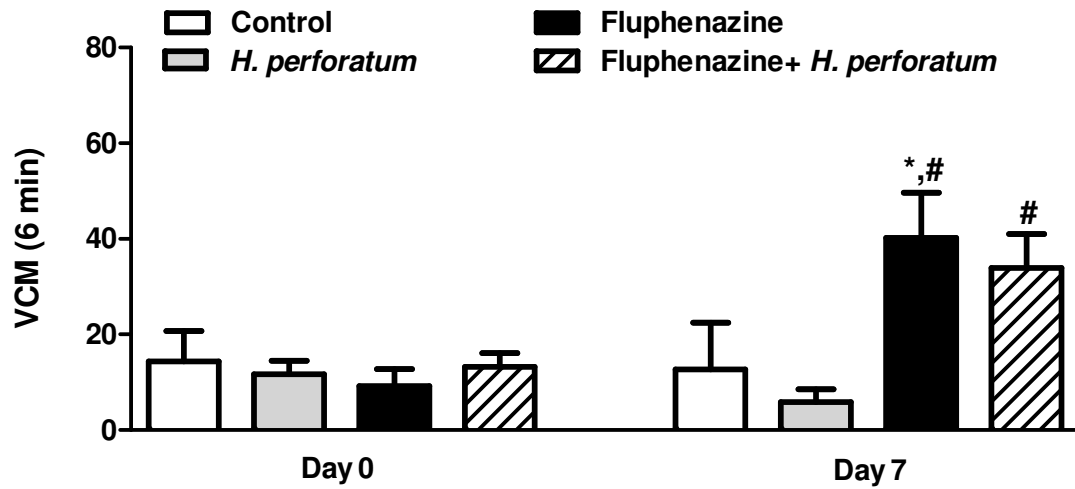
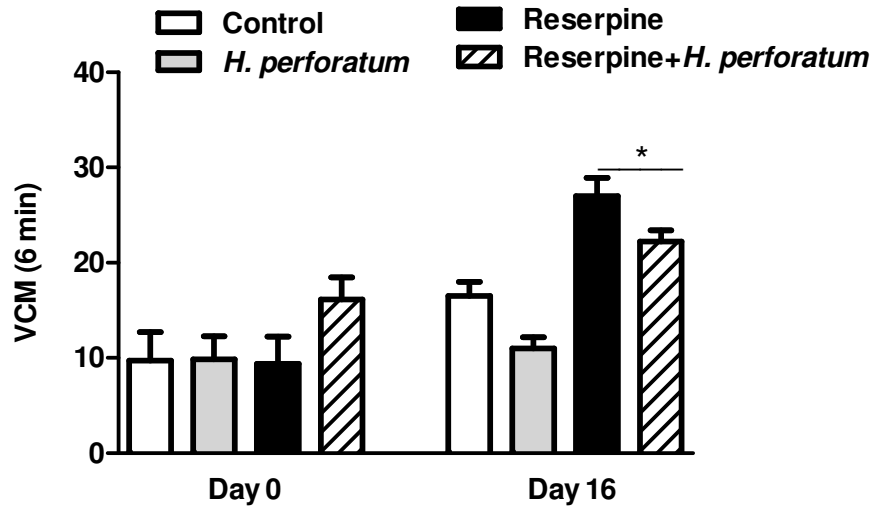


Figure 3

Table 1: Phenolics and flavonoids composition of *H. perforatum*

Compounds	<i>H. perforatum</i>	
	mg/g	Percent
Gallic acid	1.6 ± 0.11 a	0.16
Chlorogenic acid	29.2 ± 0.17 b	2.92
Caffeic acid	7.4 ± 0.09 c	0.74
Rutin	76.1 ± 0.03 d	7.61
Isoquercitrin*	54.3 ± 0.09 e	5.43
Quercitrin*	27.9 ± 0.33 b	2.79
Quercetin	48.3 ± 0.15 f	4.83
Kaempferol	9.5 ± 0.02 g	0.95

Results are expressed as mean ± standard deviations (SD) of three determinations.

Averages followed by different letters differ by Tukey test at $p < 0.05$.

* Quantified as quercetin

Table 2: Effects of fluphenazine and/or *H. perforatum* on open field test in rats. Number of crossings and rearings during 5 min after 7 days of treatment.

Groups	Crossings (7th day)	Rearings (7th day)
Control	123.4±26.3	12.20±3.72
<i>H. perforatum</i>	99.6±30.39	17.20±4.77
Fluphenazine	23.20±8.38* #	3.10±0.86* #
Fluphenazine + <i>H. perforatum</i>	21.40±10.59* #	2.50±0.74* #

Data were expressed as means±S.E.M; control, n=5; *H. perforatum*, n=5; fluphenazine, n=10; fluphenazine + *H. perforatum*, n=10. *Significant difference from control group; #Significant difference from *H. perforatum* group.

Table 3: Effects of reserpine and/or *H. perforatum* on the open field test in rats. Number of crossings and rearing during 5 min.

Groups	Crossings	Rearings
Control	70.75±7.43	20.53±1.87
<i>H. perforatum</i>	63.83±4.09	7.66±2.43*
Reserpine	36.00±5.38*	7.75±1.43*
Reserpine + <i>H. perforatum</i>	53.00±6.65	10.20±3.21*

Data were expressed as means±S.E.M; control, n=6; *H. perforatum*, n=6; reserpine, n=5; reserpine + *H. perforatum*, n=5. *Significant difference from control group.

4 CONCLUSÕES ESPECÍFICAS

- O tratamento com flufenazina ou reserpina causou um aumento no número de MMVs, porém tratamento com *H. perforatum* não reduziu a intensidade destes movimentos;

- Os animais tratados com flufenazina ou reserpina apresentaram uma diminuição na atividade locomotora, representada por número de cruzamentos e levantadas, o tratamento com *H. perforatum* não alterou este efeito no modelo induzido por flufenazina. No entanto, o *H. perforatum* mostrou-se capaz de prevenir o efeito da reserpina sobre o número de cruzamentos no modelo induzido por reserpina.

5 CONCLUSÃO FINAL

Este estudo mostrou que o *H. perforatum* não foi capaz de proteger as desordens motoras induzidas por flufenazina ou reserpina. Sugere-se que a ineficácia do tratamento seja atribuída a baixa quantidade de componentes bioativos presentes no extrato utilizado. A prevenção da diminuição da atividade locomotora, representada pelo número de cruzamentos, induzida por reserpina indica que o *H. perforatum* atua em vias específicas para o controle do movimento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABÍLIO VC, SILVA RH, CARVALHO RC, GRASSL C, CALZAVARA MB, REGISTRO S, D'ALMEIDA V, RIBEIRO RA, FRUSSA-FILHO R. Important role of striatal catalase in aging- and reserpine-induced oral dyskinesia. *Neuropharmacology*, 47: 263-272, 2004.
- AGUIAR AS JR, ARAÚJO AL, DA-CUNHA TR, SPECK AE, IGNÁCIO ZM, DE-MELLO N, PREDIGER RD. Physical exercise improves motor and short-term social memory deficits in reserpinized rats. *Brain Res Bull*, 14;79(6):452-7, 2009.
- ALBIN RL, YOUNG AB, PENNEY JB. The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci*, 12(10):366-75, 1989.
- ANDERSEN, P.H. et al. Dopamine receptor subtypes: beyond the D1/D2 classification. *Trends Pharmacol Sci*, 11:231–236, 1990.
- ANDREASSEN OA, JORGENSEN HA. Neurotoxicity associated with neuroleptic-induced oral dyskinesias in rats. Implications for tardive dyskinesia? *Prog Neurobiol*, 61: 525-541, 2000.
- BILSKA A, DUBIEL M, SOKOŁOWSKA-JEZEWICZ M, LORENC-KOCI E, WŁODEK L. Alpha-lipoic acid differently affects the reserpine-induced oxidative stress in the striatum and prefrontal cortex of rat brain. *Neurosci*, 8;146(4):1758-71, 2007.
- BLADT S, WAGNER H. Inhibition of MAO by fractions and constituents of hypericum extract. *J Geriatr Psychiatry Neurol*, 7:57–9, 1994.
- BURGER ME, FACHINETTO R, ALVES A, CALEGARI L, ROCHA JBT. Acute reserpine and subchronic haloperidol treatments change synaptosomal brain glutamate uptake and elicit orofacial dyskinesia in rats. *Brain Res*, 1031: 202-210, 2005.
- BURGER ME, FACHINETTO R, CALEGARI L, PAIXÃO MW, BRAGA, AL, ROCHA JBT. Effects on age on orofacial dyskinesia reserpine-induced and possible protection of diphenyl-diselenide. *Brain Res Bull*, 64: 339-345, 2004.
- BURT D, et al. Antischizophrenic drugs: chronic treatment elevates dopamine receptor binding in brain. *Sci*, 196:326–7, 1977.
- BUSANELLO A, BARBOSA NB, PEROZA LR, FARIAS LE, BURGER ME, BARRETO KP, FACHINETTO R. Resveratrol protects against a model of vacuous chewing movements induced by reserpine in mice. *Behav Pharmacol*, 22:71-5, 2011.

- BUSANELLO A, PEROZA LR, WAGNER C, SUDATI JH, PEREIRA RP, PRESTES ADE S, ROCHA JB, FACHINETTO R, BARBOSA NB. Resveratrol reduces vacuous chewing movements induced by acute treatment with fluphenazine. *Pharmacol Biochem Behav*, 101:307-10, 2012.
- BUTTERWECK V, JÜRGENLIEMK G, NAHRSTEDT A, WINTERHOFF H. Flavonoids from *Hypericum perforatum* show antidepressant activity in the forced swimming test. *Planta Med*, 66:3–6, 2000.
- BUTTERWECK V, KORTE B, WINTERHOFF H. Pharmacological and endocrine effects of *Hypericum perforatum* and hypericin after repeated treatment. *Pharmacopsychiatry* 34, S2–S7, 2001a.
- BUTTERWECK V, PETEREIT F, WINTERHOFF H, NAHRSTEDT A. Solubilized hypericin and pseudohypericin from *Hypericum perforatum* exert antidepressant activity in the forced swimming test. *Planta Med*, 64:291–294, 1998.
- BUTTERWECK V, WINTERHOFF H, HERKENHAM M. St. John's wort, hypericin, and imipramine: a comparative analysis of mRNA levels in brain areas involved in HPA axis control following short-term and long-term administration in normal and stressed rats. *Mol. Psychiatry*, 6: 547–564, 2001b.
- BUTTERWECK V. Mechanism of action of St. John's Wort in depression. What is known? *CNS Drugs*, 17: 539–562, 2003.
- CALAPAI G, CRUPI A, FIRENZUOLI F, COSTANTINO G, INFERRERA G, CAMPO G, CAPUTI A. 1999. Effects of *Hypericum perforatum* on levels of 5-hydroxytryptamine, noradrenaline and dopamine in the cortex, diencephalon and brainstem of the rat. *J. Pharm Pharmacol*, 51: 723–728, 1999.
- CARLSSON A. The current status of the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* .1:179–86, 1988.
- CARLSSON A. The neurochemical circuitry of schizophrenia. *Pharmacopsychiatry*, 39: 10–14, 2006.
- CASEY D E. Tardive dyskinesia: pathophysiology and animal models. *J Clin Psychiatry*, 61:5–9, 2000.
- CASEY DE. Tardive dyskinesia: reversible and irreversible. *Psychopharmacology*, 2: 88- 97, 1985.

CASTRO JP, FRUSSA-FILHO R, FUKUSHIRO DF, SILVA RH, MEDRANO WA, RIBEIRO RDE A, ABÍLIO VC. Effects of baclofen on reserpine-induced vacuous chewing movements in mice. *Brain Res Bull*, 15; 68(6):436-41, 2006.

CHATTERJEE S, BHATTACHARYA S, WONNEMANN M, SINGER A, MUELLER WE. Hyperforin as a possible antidepressant component of *Hypericum* extracts. *Life Sci*, 63: 499–510, 1998a.

CREESE I, BURT DH, SNYDER S.H. Dopamine receptor binding predicts clinical and pharmacological potencies of antischizophrenic drugs. *Science*, 192: 481–483, 1976.

CROSSMAN A R. Functional anatomy of movement disorders *JOURNAL Anatomy*; 196(Pt 4): 519–525, 2000.

CROSSMAN AR. A hypothesis on the pathophysiological mechanisms that underlie levodopa- or dopamine agonist-induced dyskinesia in Parkinson's disease: implications for future strategies in treatment. *Mov Disord*, 5(2):100-8, 1990.

DAHLSTROM A, FUXE K. Evidence for the existence of monoaminecontaining neurons in the central nervous system I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brainstem neurons. *Acta Physiol Scand*, Suppl. 232, 62:1–55, 1964.

DAUER, W. E PRZEDBORSKI, S. Parkinson's Disease: mechanisms and models. *Neuron*, 39: 889-909, 2003.

ELLENBROEK BA. Treatment of schizophrenia: a clinical and preclinical evaluation of neuroleptic drugs. *Pharmacol Therap*, 57:1–78, 1993.

FACHINETTO R, VILLARINHO JG, WAGNER C, PEREIRA RP, ÁVILA DS, BURGER ME, et al. Valeriana officinalis does not alter the orofacial dyskinesia induced by haloperidol in rats: role of dopamine transporter. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 31:1478–86, 2007b.

FACHINETTO R, VILLARINHO JG, WAGNER C, PEREIRA RP, PUNTEL RL, PAIXÃO MW, et al . Diphenyl diselenide decreases the prevalence of vacuous chewing movements induced by fluphenazine in rats. *Psychopharmacology* 194:423–32, 2007a.

FACHINETTO, R., BURGER, M.B., WAGNER, C., WONDRACEK, D.C., BRITO, V.B., NOGUEIRA, C.W., FERREIRA, J., ROCHA, J.B.T. High fat diet increases the incidence of orofacial dyskinesia and oxidative stress in specific brain regions of rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 81: 585-592, 2005.

GÓMEZ-ESTEBAN JC, ZARRANZ JJ, LEZCANO E, et al. Influence of motor symptoms upon the quality of life of patients with Parkinson's disease. *Eur Neurol*, 57:161-5, 2007.

GOODMAN & GILMAN: Manual de Farmacologia e Terapêutica/ Laurence L. Brunton ... [et al.]. – Porto Alegre: AMGH, 2010.

GUILLIN O. LARUELLE M. Neurobiology of Dopamine in Schizophrenia. *Cell science Reviews*, 2:79-107, 2005.

HAYES DJ, GREENSHAW AJ. 5-HT receptors and reward-related behaviour: a review. *Neurosci Biobehav Rev*, 35(6):1419-49, 2011.

HENDERSON DC. Diabetes mellitus and other metabolic disturbances induced by atypical and antipsychotic agents. *Curr Diab Rep*, 2: 135-140, 2002.

HORNYKIEWICZ O. Dopamine miracle: from brain homogenate to dopamine replacement. *Mov Disord*, 17:501-8, 2002.

HOYER D, HANNON JP, MARTIN GR. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol Biochem Behav*, 71(4):533-54, 2002.

HUGHES TA, ROSS HF, MUSA S, et al. A 10-year study of the incidence of and factors predicting dementia in Parkinson's disease. *Neurology*, 54:1596 – 602, 2000.

JANKOVIC J, STACY M. Medical management of levodopa-associated motor complications in patients with Parkinson's disease. *CNS Drugs*, 21: 677–692, 2007.

JANKOVIC, J. An update on the treatment of Parkinson's disease. *Mt. Sinai J. Med*, 73: 682–689, 2006.

JELLINGER KA. Morphological substrates of parkinsonism with and without dementia: a retrospective clinico-pathological study. *J Neural Transm, Suppl* 72: 91-104, 2007.

JENSEN AG, HANSEN SH, NIELSEN EO. Adhyperforin as a contributor to the effect of *Hypericum perforatum* L. in biochemical models of antidepressant activity. *Life Sci*, 68: 1593–1605, 2001.

KANE J M. Tardive dyskinesia: epidemiology and clinical presentation. In: BLOOM, FE, KUPFER DJ. (Eds.), *Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress*, vol. 39. Raven Press, New York, pp. 1485-149, 1995.

- KANE JM, SMITH JM. Tardive dyskinesia: prevalence and risk factors, 1959 to 1979. *Arch Gen Psychiatry*, 39:473-481, 1982.
- KANEDA H, SHIRAKAWA O, DALE J, GOODMAN L, BACHUS SE, TAMMINGA CA. Co-administration of progabide inhibits haloperidol-induced oral dyskinesias in rats. *Eur J Pharmacol*, 121: 43-49, 1992.
- KAPUSTA M, DUSEK J. 2003. Therapeutic and toxicological aspects of biological activity of St. John's Wort (*Hypericum perforatum*). *Ceska a Slovenska Farmacie*, 52:20–28, 2003.
- KLAWANS JR HL, RUBOVITS R. An experimental model of tardive dyskinesia. *Journal of Neural Transmission*, 33: 235–46, 1972.
- LARUELLE M, KEGELES LS, ABI-DARGHAM A. Glutamate, dopamine, and schizophrenia: from pathophysiology to treatment. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1003:138– 158, 2003.
- LEWIS, D.A., LIEBERMAN, J.A. Catching Up on Schizophrenia: Review Natural History and Neurobiology. *Neuron*, 28, 325–334, 2000.
- LOHR JB. Oxygen free radicals and neuropsychiatric illness. *Arch Gen Psychiatry*, 48,1097-1106, 1991.
- MAHADIK, P.S., EVANS, D., LAL, H. Oxidative stress and role of antioxidant and ω -3 essential fatty acid supplementation in schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*., 25, 463-493, 2001.
- MAKER HS, WEISS C, SILIDES DJ, COHEN G. Coupling of dopamine oxidation (monoamine oxidase activity) to glutathione oxidation via the generation of hydrogen peroxide in rat brain homogenates. *J Neurochem*, 36:589-593, 1981.
- MELTZER HY, LI Z, KANEDA Y, ICHIKAWA J. 2003. Serotonin receptors: their key role in drugs to treat schizophrenia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* ,27: 1159-1172, 2003.
- MUELLER WE, SINGER A, WONNEMANN M, HAFNER U, ROLLI M, SCHÄFER C. Hyperforin represents the neurotransmitter reuptake inhibiting constituent of *Hypericum* extract. *Pharmacopsychiatry*, 31: 16–21, 1998.
- NAHRSTEDT A, BUTTERWECK V. Biologically active and other chemical constituents of the herb of *Hypericum perforatum* L. *Pharmacopsychiatry*,30:129–134, 1997.

- NAIDU PS, SINGH A, KULKARNI SK. Reversal of reserpine-induced orofacial dyskinesia and cognitive dysfunction by quercetin. *Pharmacology*,70(2):59-7, 2004.
- NEARY JT, BU Y. Hypericum LI 160 inhibits uptake of serotonin and norepinephrine in astrocytes. *Brain Res*, 1999; 816:858-63.
- NEISEWANDER JL, CASTAÑEDA E, DAVIS DA. Dose-dependent differences in the development of reserpine-induced oral dyskinesia in rats: support for a model of tardive dyskinesia. *Psychopharmacology (Berl)*,116(1):79-84, 1994.
- NEISEWANDER JL, LUCKI I, MCGONIGLE P. Behavioral and neurochemical effects of chronic administration of reserpine and SKF-38393 in rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 257(2):850-60, 1991b.
- NEISEWANDER JL, LUCKI I, MCGONIGLE P. Neurochemical changes associated with the persistence of spontaneous oral dyskinesia in rats following chronic reserpine treatment. *Brain Res*, 30;558(1):27-35, 1991a.
- NEMEROFF, C. B.; OWENS, M. J. Treatment of mood disorders. *Nat. Neurosci*, 5 Suppl:1068-1070, 2002.
- OHNO Y, IMAKI J, MAE Y, TAKAHASHI T, TATARA. Serotonergic modulation of extrapyramidal motor disorders in mice and rats: role of striatal 5-HT₃ and 5-HT₆ receptors. *Neuropharmacology*, 60:201–8, 2011.
- OHNO Y. 2010. New insight into the therapeutic role of 5-HT_{1A} receptors in central nervous system disorders. *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry* 10: 148-157, 2010.
- PEREIRA RP, FACHINETTO R, DE SOUZA PRESTES A, WAGNER C, SUDATI JH, BOLIGON AA, ATHAYDE ML, MORSCH VM, ROCHA JB. Valeriana officinalis ameliorates vacuous chewing movements induced by reserpine in rats. *J Neural Transm*,118(11):1547-57, 2011.
- PEROZA LR, BUSANELLO A, LEAL CQ, RÖPKE J, BOLIGON AA, MEINERZ D, LIBARDONI M, ATHAYDE ML, FACHINETTO R. Bauhinia forficata Prevents Vacuous Chewing Movements Induced by Haloperidol in Rats and Has Antioxidant Potential In Vitro. *Neurochem Res*, 2013 DOI 10.1007/s11064-013-0981-8.
- RECKZIEGEL P, PEROZA LR, SCHAFFER LF, FERRARI MC, DE FREITAS CM, BÜRGER ME, FACHINETTO R. Gallic acid decreases vacuous chewing movements induced by reserpine in rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 2013
<http://dx.doi.org/10.1016/j.pbb.2013.01.001>

ROTH BL. Multiple serotonin receptors: clinical and experimental aspects. *Annals of Clinical Psychiatry* 6:67-78, 1994.

RUBINSTEIN M, et al. Adaptative mechanisms of striatal D1 and D2 dopamine receptors in response to a prolonged reserpine treated mice. *J Pharmacol Exp Therapeutics*, 252: 810–6, 1990.

RUMMEL C, KISSLING W, LEUCHT S. Antidepressants as add-on treatment to antipsychotics for people with schizophrenia and pronounced negative symptoms: a systematic review of randomized trials. *Schizophr Res*, 80:85–97, 2005.

SADDIQE Z, NAEEM I, MAIMOONA A. A review of the antibacterial activity of *Hypericum perforatum* L. *J Ethnopharmacol*, 131:511-21, 2010.

SALAMONE J, BASKIN P. Vacuous jaw movements induced by acute reserpine and low-dose apomorphine: possible model of parkinsonian tremor. *Pharmacol Biochem Behav*, 53(1):179-83, 1996.

SHELTON RC. The return of fixed combinations in psychiatry: fluoxetine and olanzapine combination. *Ther Clin Risk Manag*, 2:187–192, 2006.

SINGER A, WONNEMANN M, MUELLER W. Hyperforin, a major antidepressant constituent of St. John's Wort, inhibits serotonin uptake by elevating free intracellular Na⁺. *J Pharmacol Exp Ther*, 290: 1363–1368, 1999.

SNYDER, S.H. The dopamine hypothesis of schizophrenia: focus on the dopamine receptor. *Am J Psychiatry*, 133, 197-202, 1976.

SOKOLOFF, P. et al. The dopamine D3 receptor: a therapeutic target for the treatment of neuropsychiatric disorders. *CNS & Neurological Disorders- Drug Targets*. 5:25-43, 2006.

STOTZ-INGENLATH, G. Epistemological aspects of Eugen Bleuler's conception of schizophrenia in 1911. *Med Health Care Philos*, 3, 153-159, 2000.

SUZUKI O, KATSUMATA Y, OYA M, BLADT S, WAGNER H. Inhibition of monoamine oxidase by hypericin. *Planta Med*, 50:272-4, 1984.

TATARA A, SHIMIZU S, SHIN N, SATO M, SUGIUCHI T, IMAKI J, OHNO Y. Modulation of antipsychotic-induced extrapyramidal side effects by medications for mood disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 38:252-9, 2012.

TOHEN M, VIETA E. Antipsychotic agents in the treatment of bipolar mania. *Bipolar Disord*, 11:45–54, 2009.

VALLE LBS, FILHO RMO, DELUCIA R, et al. *Farmacologia Integrada: Princípios básicos* - v. 1, Rio de Janeiro: Livraria Atheneu, 1988, p. 353-364.

WEINBERGER, D.R. Implications of the normal brain development for the pathogenesis of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry*,44:660-669, 1987.

WICHMANN T, DELONG MR. Functional neuroanatomy of the basal ganglia in Parkinson's disease. *Adv Neurol*, 91: 9-18, 2003.

WILLS RBH, BONE K, MORGAN M. Herbal products: active constituents, models of action and quality control. *Nutr Res Rev* ,13:47–77, 2000.

WONNEMANN M, SINGER A, SIEBERT B, MUELLER WE. Evaluation of synaptosomal uptake inhibition of most relevant constituents of St. John's wort. *Pharmacopsychiatry*, 41: S148–S151, 2001.

YÁÑEZ M, FRAIZ N, CANO E, ORALLO F. Inhibitory effects of cis- and transresveratrol on noradrenaline and 5-hydroxytryptamine uptake and on monoamine oxidase activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 344:688–695, 2006.