

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS**

**EFEITO ANTIDEPRESSIVO E ANSIOLÍTICO DO EXTRATO
METANÓLICO DE *Hibiscus tiliaceus* EM MODELO ANIMAL DE DEPRESSÃO
PÓS-PARTO.**

Eduardo Farina de Almeida

Orientador: Profa. Dra. Ionara Rodrigues Siqueira

**Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação
em medicina: Ciências Médicas, como requisito
parcial para a obtenção do título de Mestre em
Medicina –Ciências Médicas.**

Porto Alegre, 12 de 2012.

DEDICATORIA

Dedico a todos que direta ou indiretamente interviram na minha formação como aluno de mestrado e como pessoa!

AGRADECIMENTO

Agradeço a todos meus amigos e conhecidos que me deram apoio incondicional em todas as horas e a meus pais e irmão que sempre me deram suporte e coragem para enfrentar tudo e todas as dificuldades. Todos os amigos que fiz e vou carregar para sempre no laboratório, com os quais aprendi muito e sou muito grato por todo suporte.

Não cruze os braços diante de uma dificuldade, pois o maior homem do mundo morreu de braços abertos!

Bob Marley

RESUMO

Hibiscus tiliaceus L. (Malvaceae) é usado popularmente em desordens do pós-parto. O extrato metanólico de flores de *H. tiliaceus* apresentou atividade antidepressiva-like nos testes de nado forçado e de suspensão da cauda, ambos são amplamente usados como modelos animais preditivos da atividade antidepressiva. Além disso, o extrato demonstrou uma tendência de aumento do tempo gasto nos braços abertos no labirinto em cruz elevado. Considerando que o extrato de *H. tiliaceus*, que contém fitoesteróis como o estigmasterol, o stigmastadienol e o stigmastadienone, pode ser útil no tratamento ou prevenção da depressão pós-parto relacionadas à retirada crônica de altos níveis de hormônios associados à gestação. Nosso objetivo foi avaliar o efeito de extratos de *H. tiliaceus* em modelo animal de depressão pós-parto e ansiedade. Utilizamos ratas Wistar fêmeas submetidas ao modelo de depressão pós-parto induzido por hormônios (estradiol e progesterona), administrados por via subcutânea. Após período gestacional induzido, os animais receberam água, veículo ou extrato de *H. tiliaceus* nas doses de 100 e 400mg/kg, via oral (gavagem). No período pós-parto, as ratas foram submetidas a testes comportamentais de nado forçado, o labirinto em cruz elevado e de preferência claro-escuro como modelos preditivo de depressão e ansiedade. Foi observado um aumento no tempo de imobilidade associado a uma diminuição na tentativa de fuga, no teste do nado forçado, em animais submetidos ao modelo de depressão pós-parto comparado ao grupo controle, sugerindo que este modelo é capaz reproduzir sintomas de depressão pós-parto. Não houve diferença significativa nos testes de ansiedade entre os animais submetidos ao modelo de depressão pós-parto comparado aos controles. A administração de extrato metanólico de *H. tiliaceus* não foi capaz de alterar o comportamento relacionado à depressão e ansiedade em ratas Wistar.

PALAVRAS-CHAVE

Hibiscus Tiliaceus; Estradiol; Progesterona; Pós parto; Gestação; Depressão; Teste Nado Forçado; Teste Labirinto em cruz elevado; Teste Claro Escuro

ABSTRACT

Postpartum affective disorders are rarely modeled. The depressive-like behavior of hormone withdrawal following hormone-simulated "pregnancy" was described in Long-Evans and Sprague Dawley rats. Our aim was to evaluate the validity of hormone withdrawal following hormonesimulated "pregnancy" method in Wistar rats as a model of depression and/or anxiety. Recently, it was demonstrated an antidepressant-like profile of methanol extract of *Hibiscus tiliaceus* L., a plant used in postpartum disorders, in adult male Swiss albino mice, then, we also investigated the antidepressant and anxiolytic-like activities of the methanol extract of *H. tiliaceus* flowers using this animal model of postpartum disorder. Ovariectomized rats received daily injections of the vehicle or hormones (estradiol and progesterone) to simulate the 23-day gestational period in the rat. Days 24-27 were considered the "post-partum" period, where the methanolic extract of *H. tiliaceus* or vehicle were administered by gavage. Rats were submitted to forced swimming, elevated plus-maze test and lightdark box tests. Rats submitted to "post-partum depression model" increased the immobility time in forced swimming. The methanolic extract of *H. tiliaceus* administration did not alter the immobility time in the forced swim test. In the light-dark box test, rats submitted to post-partum depression model showed decreases in number of rearing in dark compartment. In conclusion, our data indicate that Wistar rats may be an adequate model postpartum affective disorders, showing "depressive-like" symptoms in the forced swim test without any anxiogenic effect. Besides, we could suggest that decrease on number of rearing in the dark compartment may indicate the motivational state.

KEYWORDS

Hibiscus Tiliaceus; Estradiol; Progesterone; Post-partum; Pregnancy; Depression;
Forced Swimming Test; Elevated Plus-Maze Test; Light-Dark Box Test.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.....	30
Tabela 2.....	31
Tabela 3.....	32

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	11
Figura 2	25
Figura 3	26
Figura 4	27
Figura 5	28
Figura 6	29

LISTA DE ABREVIATURAS

H. tiliaceus /Hibiscus Tiliaceus

SPSS /procedimentos estatísticos apoiados em sistemas dedicados

CEUA /Comissão de Ética no Uso de Animais

UFRGS /Universidade Federal do Rio Grande do Sul

SUMÁRIO

RESUMO	3
ABSTRACT	4
Lista de Tabelas	6
Lista de Figuras	7
Lista de Abreviaturas	8
1. INTRODUÇÃO	10
2. Revisão da Literatura	15
3.OBJETIVO GERAL	18
3.1OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
4. Referencias Bibliográficas	19
5. Artigo em Inglês	24
5.1 Objective	24
5.2 Methods	24
5.4 Results	29
5.5 Discussion and Conclusion	32
6. Considerações Finais	36

1. INTRODUÇÃO

A Organização Mundial da Saúde estimou que aproximadamente 80% da população da Ásia, África e América Latina dependem da medicina tradicional para atender às suas necessidades de cuidados primários de saúde e grande parte desta medicina tradicional envolve o uso de plantas medicinais (IUCN, 1993).

Segundo Siani e colaboradores (2003), a transformação de plantas medicinais em fitoterápicos exige investimentos, financeiro e de tempo de desenvolvimento, menores em relação aos medicamentos sintéticos. Estima-se que o desenvolvimento de um medicamento fitoterápico, mesmo utilizando critérios científicos exigidos internacionalmente, custe de 2 a 3% do previsto para o desenvolvimento de um medicamento sintético. Surpreendentemente, no Brasil, a importação de fármacos cresceu de US\$ 750 milhões, em 1990, para US\$ 1,8 bilhões em 2000 com um pico de mais de US\$ 2 bilhões em 1998 (Magalhães et al., 2003). Os dados sobre o aumento das importações são impressionantes, por exemplo, para a classe terapêutica analgesia e anestesia com uma taxa de crescimento de cerca 736% entre 1990 e 2000 (Magalhães et al., 2003), assim, o desenvolvimento de fitoterápicos e fitomedicamentos pode ser economicamente representativo.

Recentemente, há um crescente aumento em pesquisas no intuito de demonstrar eficácia e segurança de plantas medicinais e/ou seus derivados como agentes terapêuticos naturais. É importante citar que a exploração científica dos agentes biologicamente ativos a partir de plantas é essencialmente interdisciplinar. As pesquisas com plantas medicinais envolvem investigações da medicina tradicional e popular (etnobotânica); isolamento, purificação e caracterização de princípios ativos (química orgânica: fitoquímica); investigação farmacológica de extratos e dos constituintes

químicos isolados (farmacologia); transformações químicas de princípios ativos (química orgânica sintética); estudo da relação estrutura/atividade e dos mecanismos de ação dos princípios ativos (química medicinal e farmacologia) e finalmente a operação de formulações para a produção de fitoterápicos. A integração destas áreas na pesquisa de plantas medicinais conduz a um caminho promissor e eficaz para descobertas de novos medicamentos.

Algumas características desejáveis das plantas medicinais são sua eficácia, baixo risco de uso, assim como reprodutibilidade e constância de sua qualidade. A tendência observada para a fitoterapia é que esta, assim como no passado, desempenhará um papel cada vez mais importante na assistência à saúde da população. Desta forma, não se pode negar a importância da avaliação dos efeitos terapêuticos de cada um destes fitoterápicos, através de estudo randomizado, duplo-cego e controlado por placebos, envolvendo um número significativo de pessoas. Além do estabelecimento da atividade por meio de testes clínicos, outro aspecto relevante é a padronização desta atividade, de modo assegurar uma quantidade uniforme desta em cada dose (Calixto, 2000).



Figura 1

H. tiliaceus L. (Malvaceae), popularmente conhecida como “algodoeiro-da-praia”(figura 1), é uma planta de clima pantropical, frequentemente encontrada em ecossistemas costeiros, onde há alta salinidade. *H. tiliaceus* é uma planta nativa da costa dos Oceanos Índico e Pacífico; hoje naturalizada pelas regiões tropicais e subtropicais do mundo, inclusive no sul do Brasil. *H. tiliaceus* é usada como planta ornamental e têm alguns usos tradicionais, as flores são usadas no tratamento da bronquite, tosse, abscessos e em desordens pós-parto (Brondegaard, 1973; Holdsworth e Wamoi, 1982; Singh et al., 1984; Whistler, 1985; Kobayashi, 1976; Holdsworth, 1991). Recentemente, foi descrita a presença de vitamina E e vários fitoesteróides, como o estigmasterol, estigmastadienol e estigmastadienone no extrato metanólico de *H. tiliaceus* (Rosa et al., 2006).

Recentemente, avaliamos em animais modelos preditivos, a atividade antidepressiva e ansiolítica do extrato metanólico de *H. tiliaceus* (Siqueira et al., 2010). A atividade antidepressiva foi testada através do teste de nado forçado, e a ansiolítica do labirinto em cruz elevado. O extrato reduziu significativamente o tempo de imobilidade dos animais no teste de nado forçado, sugerindo uma ação antidepressiva. No labirinto em cruz elevado, o extrato apresentou uma tendência em aumentar o tempo gasto nos braços abertos, demonstrando uma possível ação ansiolítica do extrato. Os dados sugerem uma atividade antidepressiva e ansiolítica do extrato metanólico de *H. tiliaceus*. Além de que, pode-se sugerir que o mecanismo de ação dos compostos ativos de *H. tiliaceus* parece ser diferente dos antidepressivos usados em clínica, desde que estes administrados agudamente, em geral, apresentam ação ansiogênica neste modelo animal de ansiedade. Várias espécies de plantas têm sido testadas quanto às suas propriedades antidepressivas e ansiolíticas, por exemplo: *Salvia divinorum* (Braidá et

al., 2009), *Stachys lavandulifolia* (Rabbani, et al.2003), *Erythrina velutina*, *Erythrina mulungu* (Ribeiro, et al. 2006).

O extrato metanólico de *H. tiliaceus* apresentou também atividades antioxidante e neuroprotetora *in vitro*. Fatias hipocâmpais de ratos Wistar expostas à privação de oxigênio e glicose incubadas com este extrato apresentaram significativamente um aumento na viabilidade celular (Siqueira et al., 2012), além de que, apresentou atividade antimutagênica (Rosa et al., 2006).

É importante ressaltar que esta espécie é tradicionalmente usada em distúrbios no pós-parto (Kobayashi, 1976), cujos distúrbios afetivos afetam cerca de 10% das mulheres parturientes (Kumar e Robson, 1984; Nonacs e Cohen, 1998). A depressão pós-parto é um importante problema de saúde pública, afetando tanto a saúde da mãe quanto o desenvolvimento de seu filho. A manifestação deste quadro acontece, na maioria dos casos, a partir das primeiras quatro semanas após o parto, alcançando habitualmente sua intensidade máxima nos seis primeiros meses. Os sintomas mais comuns são desânimo persistente, sentimentos de culpa, alterações do sono, idéias suicidas, temor de machucar o filho, diminuição do apetite e da libido, diminuição do nível de funcionamento mental e presença de idéias obsessivas ou supervalorizadas (Abou-Saleh MT et al., 1997). Tem se despendido pouca atenção sobre a fisiopatologia e a terapêutica apropriada da desordem. Alguns autores têm relatado que distúrbios de ansiedade pós-parto podem ser mais comuns do que as depressivas (Matthey et al., 2003), adicionalmente, há evidências de que o puerpério pode exacerbar ou induzir desordem de pânico (Hertzberg e Wahlbeck, 1999).

Segundo Galea e colaboradores (2001), a depressão pós-parto está envolvida com a retirada dos altos níveis hormonais (estradiol e progesterona) associados à gestação, estes autores demonstraram em modelos animais produzindo a sintomatologia

depressiva prevenida pela administração a longo prazo de altos níveis de estradiol no período pós-parto. Estes autores descreveram um modelo farmacológico de “gestação”, onde os altos níveis hormonais mimetizam o perfil gestacional e a retirada destes hormônios modela o período pós-parto (Galea et al., 2001).

Os fitoesteróides encontrados em *H. tiliaceus* como estigmasterol, podem prevenir ou tratar a depressão/ansiedade pós-parto pela reposição hormonal, similar à observada com a administração com estradiol. Outro possível mecanismo de ação pode estar ligado à quimiotaxonomia, desde que o extrato clorofórmico de raízes de *H. syriacus* contém componentes, cumarinas e cumarinas-lignanós, que inibem a enzima monoaminoxidase (Yun, et al., 2001), um dos mecanismos de ação dos antidepressivos.

Assim, nossa hipótese de trabalho foi que o extrato metanólico de *Hibiscus tiliaceus* poderia reverter as alterações comportamentais induzidas pelo modelo farmacológico de depressão pós-parto em ratas Wistar.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Nossos dados demonstram que o modelo de depressão pós-parto induzido pela redução brusca dos altos níveis hormonais de estradiol e progesterona induziu um perfil comportamental semelhante à depressão em ratas Wistar. Estes resultados corroboram os achados de Galea e colaboradores (2001) de que experimentalmente as alterações dos níveis de progesterona e estradiol mimetizam a depressão pós-parto, uma vez que o modelo de indução da depressão pós-parto apresentou maior tempo de imobilidade, avaliado no teste do nado forçado, comparado com o grupo controle.

Transtorno de ansiedade também é um transtorno de humor que apresenta alta incidência no período pós-parto e pode ser um precursor da depressão por alterar vias fisiológicas ou do estresse (Heron et al., 2004). Entretanto, poucos estudos têm sido descritos abordando modelos de ansiedade e tratamentos para esta patologia no período pós-parto. Contudo mesmo com evidências clínicas do papel da ansiedade na desordem do pós-parto, parâmetros de ansiedade não foram testados previamente neste modelo animal. No presente estudo, não foi observado sintomas de ansiedade induzidos pelo modelo de depressão pós-parto avaliado pelos testes de labirinto em cruz elevado e preferência claro-escuro.

Uma estratégia terapêutica foi estudada por Galea e colegas (2001), estes autores observaram que tratamento com estradiol no período pós-parto foi capaz de reverter os sintomas depressivos em ratas Long-Evans. Neste contexto, estudos clínicos também

tem associado o papel do estradiol em mulheres na depressão pós-parto e demonstraram que administração de estradiol, o qual permitiu uma redução atenuada dos níveis deste hormônio após o parto, foi capaz de prevenir e tratar os sintomas de depressão maior (Sichel et al, 1995; Ahokas et al., 2001; Gregoire, et al., 1996). A utilização da progesterona no tratamento da depressão pós-parto também foi proposta. Dalton e colaboradores (1985) observaram uma significativa redução da incidência de depressão pós-parto em mulheres tratadas com progesterona logo após o parto. Além disso, sintomas relacionados à depressão são considerados baixos durante o período gestacional sugerindo um efeito protetor dos hormônios gonadais, uma vez que neste período observam-se altos níveis dos hormônios progesterona e estradiol. Após o nascimento, os hormônios gonadais diminuem acentuadamente, indicando uma possível associação com um súbito aumento da ocorrência de transtorno de depressão (Stahl, 2001).

É importante ressaltar que o estudo de modelos capazes de reproduzir transtornos de humor no período pós-parto são de grande importância para entender os mecanismos fisiopatológicos e estabelecer estratégias para novos tratamentos devido a sua alta prevalência e incidência e também por representar um problema de saúde pública. No entanto, este modelo sugerido por Galea e colaboradores (2001) é o único modelo animal de depressão pós-parto de nosso conhecimento. Neste contexto, nosso trabalho tem alta relevância, uma vez que contribui para estabelecer este modelo de indução de depressão pós-parto.

Estratégias farmacológicas para o tratamento de desordens de humor no período pós-parto têm sido propostas, entre elas o tratamento com hormônio estradiol tem sido utilizado para evitar a queda brusca dos níveis hormonais após o parto. Conforme mencionado anteriormente, administração de estradiol foi capaz de prevenir e tratar

sintomas de depressão pós-parto. Neste contexto, é interessante destacar que o extrato metanólico de *H.tiliaceus* contém fitoesteróides (Rosa et al., 2006), como o estigmasterol, o qual apresenta atividade biológica semelhante ao do estradiol. No entanto, surpreendentemente, os animais tratados com extrato metanólico de *H.tiliaceus* nas doses testadas não alteraram o comportamento depressivo-like induzido pelo modelo de depressão pós-parto.

O presente estudo não concorda com o estudo prévio com camundongos machos de nosso grupo de pesquisa, onde foi demonstrada uma atividade antidepressiva-like nos testes de nado forçado e suspensão da cauda em camundongos (Vanzella et al., 2012). Contudo, cabe destacar que a divergência pode resultar das diferentes espécies, do gênero e doses do extrato utilizados. Resultados comportamentais distintos entre ratos e camundongos já foram descritos anteriormente, pode-se inferir que ocorra provavelmente devido a complexidade de rotas metabólicas e formas de metabolização de drogas ou xenobióticos (Moyses et al., 2010; Meotti et al., 2003; Nogueira et al., 2002).

Embora o extrato metanólico de *H. tiliaceus* (100 e 400mg/kg) não tenha alterado os parâmetros comportamentais nos testes de depressão e ansiedade, não podemos descartar uma ação antidepressiva, visto que a avaliação do tempo de imobilidade pode representar resultados falso-negativos. Cabe descrever que os inibidores da recaptção de serotonina não alteram o tempo de imobilidade no teste do nado forçado (Steru et al., 1985).

3.OBJETIVO GERAL

Determinar o perfil psicofarmacológico de *H. tiliaceus* em modelo experimental de depressão pós-parto utilizando ratas Wistar.

3.1OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito de extratos de *H. tiliaceus* em teste comportamental de depressão em ratas submetidas a um modelo experimental farmacológico de depressão pós-parto.

- Avaliar o efeito de extratos de *H. tiliaceus* em testes comportamentais de ansiedade em ratas submetidas a um modelo experimental farmacológico de depressão pós-parto.

4. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abel EL, Bilitzke PJ. 1990. A possible alarm substance in the forced swimming test. *Physiol Behav* 48:233-9.
- Abou-Saleh MT, Ghubash R. The prevalence of early postpartum psychiatric morbidity in Dubai: a transcultural perspective. *Acta Psychiatr Scand* 1997;95(5):428-32.
- Adeodato, S., Oliveira, L., e Oliveira, V. 1996. Uma farmácia no fundo do quintal. *Globo Ciência*, 6(64): 44-49.
- Ahokas A, Kaukoranta J, Wahlbeck K, Aito M. Estrogen deficiency in severe postpartum depression: successful treatment with sublingual physiologic 17beta-estradiol: a preliminary study. *J Clin Psychiatry*. 2001;62(5):332-6.
- Asarian L, Geary N. Cyclic estradiol treatment phasically potentiates endogenous cholecystokinin's satiating action in ovariectomized rats. *Peptides* 1999;20:445-50.
- Bloch, M.; Schmidt, P.J.; Danaceau, M.; Murphy, J.; Nieman, L.; Rubinow, D.R. Effects of gonadal steroids in women with a history of postpartum depression. *Am J Psychiatry*, v. 157, p. 924-930, 2000.
- Bloch, M.; Daly, R.C.; Rubinow, D.R. Endocrine factors in the etiology of postpartum depression. *Compr Psychiatry*, v.44, p. 234-246, 2003.
- Brondegaard, V.J., 1973. Contraceptive plant drugs. *Planta Medica* 23, 167-172.
- Calixto J.B. 2000. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 33(2): p.179-189.
- Camacho, R. S.; Cantinelli, F. S.; Ribeiro, C. S. et al. Transtornos psiquiátricos na gestação e no puerpério: classificação, diagnóstico e tratamento. *Revista de Psiquiatria Clínica*, São Paulo, v. 33, n. 2, p. 92-102, 2006.
- Crawley, J.N. Neuropharmacologic Specificity of a Simple Model for the Behavioural Actions of Benzodiazepines. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 15, p. 696 – 699, 1981.
- Crawley, J.N., Goodwin, F.K. Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacology biochemistry behavior*, 13: 167-170, 1980.

- Cruz, E.B.S.; Simões, G.L.; Faisalcury, A. Rastreamento da depressão pós-parto em mulheres atendidas pelo Programa de Saúde da Família. *Rev Bras Ginecol Obstet*, v. 27, p. 181-188, 2005.
- Dalton K. Progesterone prophylaxis used successfully in postnatal depression. *Practitioner*. 1985;229:507-8.
- Daniela Braidá, Valeria Capurro, Alessia Zani, et al. Potential anxiolytic- and antidepressant-like effects of salvinatorin A, the main active ingredient of *Salvia divinorum*, in rodents. *Br J Pharmacol*. 2009 July; 157(5): 844–853.
- Frizzo, G.B.; Piccinini, C.A. Interação mãe-bebê em contexto de depressão materna: aspectos teóricos e empíricos. *Psicol estud*, v. 10, p. 47-55, 2005.
- Galea, L.A., Wide, J.K., Barr, A.M., 2001. Estradiol alleviates depressive-like symptoms in a novel animal model of post-partum depression. *Behavioural Brain Research* 22, 1-9.
- Heron J, O'Connor TG, Evans J, Golding J, Glover V; ALSPAC Study Team. The course of anxiety and depression through pregnancy and the postpartum in a community sample. *J Affect Disord*. 2004;80(1):65–73.
- Hertzberg, T., Wahlbeck, K., 1999. The impact of pregnancy and puerperium on panic disorder: review. *Journal of Psychosomatic Obstetrics and Gynecology* 20, 59-64.
- Holdsworth, D., 1991. Traditional medicinal plants of Rarotonga, Cook Island. Part II. *Journal of Pharmacognosy* 29, 71-79.
- Holdsworth, D., Wamoi, B., 1982. Medicinal plants of the Admiralty Island, Papua New Guinea. Part. I. *Journal of crude drug research* 20, 169 – 181.
- IUCN Guidelines on the conservation of medicinal plants. IUCN, WHO and WWF, Gland, Switzerland. 1993.
- Joca SR, Guimaraes FS. 2006. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase in the rat hippocampus induces antidepressant-like effects. *Psychopharmacology (Berl)* 185:298-305.
- Josefsson, A.; Berg, G.; Nordin, C.; Sydsjo, G. Prevalence of depressive symptoms in late pregnancy and postpartum. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 80, 251-255, 2001.
- Kobayashi, J., 1976. Early Hawaiian uses of medicinal plants in pregnancy and childbirth. *The Journal of tropical pediatrics and environmental child health* 22, 260-262.

- Kumar, R.; Robson, K.M. A prospective study of emotional disorders in childbearing women. *Br J Psychiatry*, v. 144, p. 35-47, 1984.
- Liu, G. et al. Reduced Anxiety and Depression-Like Behaviors in Mice Lacking GABA Transporter Subtype I. *Neuropsychopharmacology* 32: 1531-1539, 2007.
- Lucki I. The forced swimming test as a model for core and component behavioral effects of antidepressant drugs. *Behav Pharmacol* 1997;8:523–32.
- Magalhães, L.C.G.;Safatle, L.P.; Leal, J.C.; Tomioch, F. A.; Silveira, F.G.; Áurea, A.P. Evolução, tendências e características das importações e exportações de farmoquímicos e medicamentos: análise da balança de comércio exterior da indústria farmacêutica brasileira 1990-2000. Texto para Discussão n° 973, Convenio Ministério da Saude/IPEA/ANTEC. Brasília, 2003.
- Matthey, S., Barnett, B., Howie, P., 2003. Diagnosing postpartum depression in mothers and fathers whatever happened to anxiety *Journal of affective disorders* 74, 139-147.
- Nonacs, R., Cohen, L., 1998. Postpartum mood disorders: diagnosis and treatment guidelines. *The Journal of clinical psychiatry* 59, 34–40.
- Ody, P. 1993. *The complete medicinal herbal*. Dorling Kindersley. Nova Iorque. 192p.
- Pellow, S.; Chopin, P.; File, S. E.; Briley, M. Validation of open: closed arm entries in the elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, v14, p. 149-167, 1985.
- Porsolt, R.D., Bertin, A., Jalfre, M., 1977. Behavioural despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Archives internationales de pharmacodynamie et de therapie* 229, 327–336.
- Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M. 1977. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 266:730-2
- Rabbani , M. Sajjadi , S.E. Zarei, H.R. Anxiolytic effects of *Stachys lavandulifolia* Vahl on the elevated plus-maze model of anxiety in mice. *Journal of Ethnopharmacology* 89 (2003) 271–276

- Ribeiro, M.D. Onusic, G.M. Poltronieri, S.C. et al. Effect of *Erythrina velutina* and *Erythrina mulungu* in rats submitted to animal models of anxiety and depression. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* (2006) 39: 263-270.
- Ross LE, Evans SE, Sellers EM, Romach MK. Measurement issues in postpartum depression part 1: anxiety as a feature of postpartum depression. *Arch Women Ment Health*.2003;6(1):51-7.
- Rosa, R.M., Melecchi da Costa, M.I., Halmenschlager, R., Abad, F.C., Simoni, C.R., Caramão, E.B., Henriques, J.A., Saffi, J., de Paula Ramos, A.L., 2006. Antioxidant and antimutagenic properties of *Hibiscus tiliaceus* L. methanolic extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 7324-7330.
- Sichel DA, Cohen LS, Robertson LM, Ruttenger A, Rosenbaum JF. Prophylactic estrogen in recurrent postpartum affective disorder. *Biol Psychiatry*. 1995;38(12):814-8.
- Schwengber, D.D.S.; Piccinini, C.A. O impacto da depressão pós-parto para interação mãe-bebê. *Estud Psicol*, v. 8, p.403-411, 2003.
- Siani AC 2003. Desenvolvimento tecnológico de fitoterápicos – plataforma metodológica. Rio de Janeiro: Scriptorio Comunicação.
- Singh, Y.H., Ikahehifo, T., Panuve, M., Slatter, C., 1984. Folk medicine in Tonga. A study on the use of herbal medicines for obstetric and gynecological conditions and disorders. *Journal of Ethnopharmacology* 12, 305-329.
- Siqueira, I. R., Melecchi, M. I. S., Fochesatto, C., Cimarosti, H., Salbego, C., Caramão, E. B., Netto, C. A. In Vitro Antioxidant and Neuroprotective Activities of *Hibiscus tiliaceus* L. Flowers. *Toxicology in Vitro* 2010. Submetido.
- Siqueira, I. R., Bianchetti, P., Vanzella, C., Sbaraini, S., Vanzin, S. I., et al. Antidepressant-like effects of methanol extract from *Hibiscus tiliaceus* flowers in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, submetido.
- Steru L., Chermat R., Thierry B., and Simon P. (1985) The tail suspension test: A new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology* 85, 367-370.
- Toledo, A. C. O., Hirata, L. L., DA Cruz, M., Buffon, Miguel, O. G. 2003. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. *Revista Lecta*, 21(1/2):7-13.
- Whistler, W.A., 1985. Traditional and herbal medicine in the Cook Islands. *Journal of Ethnopharmacology* 13, 239-280.

Yun, B.S., Lee, I.K., Ryoo, I.J., Yoo, I.D., 2001. Coumarins with monoamine oxidase inhibitory activity and antioxidative coumarino-lignans from *Hibiscus syriacus*. *Journal of natural products* 64, 1238-1240.

Veiga Jr., V. F. E., e Pinto, A. C. 2005. Plantas medicinais: cura segura? *Química Nova*, 28(3):519-528.

VOLAK, J., E STODOLA, J. 1990. PLANTAS MEDICINAIS. ED. INQUÉRITO. 319P.

5. ARTIGO EM INGLÊS

5.1 OBJECTIVE

Determining the psychopharmacological profile of *H. tiliaceus* in an experimental model of postpartum depression using Wistar rats.

5.2 METHODS

Plant material

H. tiliaceus L. flowers were collected in the mangroves of Santa Catarina, Brazil, in December 2008 and January 2009. As it is a seasonal plant, it was not possible to perform another collection during the year. The plant was identified by Dr. B. Irgang (Instituto de Biociências, UFRGS, RS, Brazil). A dried voucher specimen (ICN: 113936) has been deposited in the Herbarium of UFRGS.

Preparation of methanol extract

Fifteen grams of dried and ground flowers were continuously extracted for 48h with methanol in a Soxhlet apparatus (Fig. 2). The extract was filtered and concentrated in a rotary evaporator at 30– 40°C to obtain semi-solid material. The viscous residue thus obtained was transferred to a vacuum desiccator over phosphorus pentoxide for 24h to obtain a completely dry solid mass [25]. The extract was dissolved in distilled water for administration to the animals.

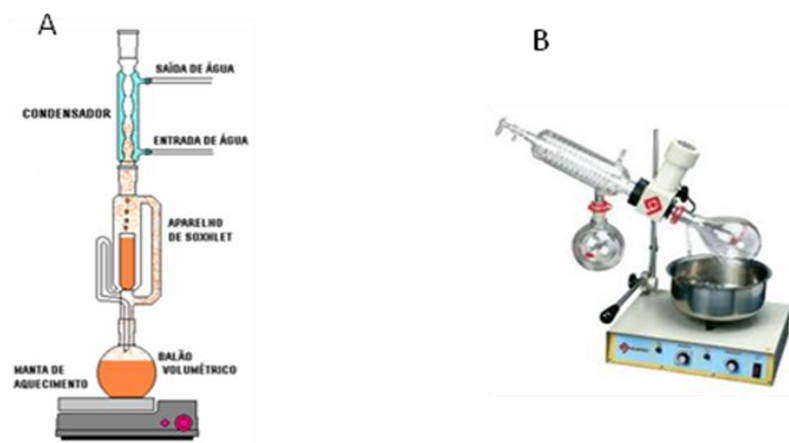


Figura 2

ANIMALS

Females Wistar rats aged 3 months were used. The animals were obtained from our breeding colony (Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório – CREAL/UFRGS) and maintained under controlled light and environmental conditions (12 h light/12 h dark cycle at $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, with food and water ad libitum). All manipulations were carried out between 11:00 and 18:00 hours. The NIH “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” (NIH publication No. 80-23, revised 1996) was followed in all experiments. The Local Ethics Committee (Comissão de Ética no Uso de Animais–CEUA/UFRGS) approved all handling and experimental conditions (nr. 20869).

Treatments

All rats were ovariectomized bilaterally under intraperitoneal anesthesia, ketamine (90mg/kg) and xylazine (10mg/kg), and aseptic techniques [27]. One week after ovariectomies, females were randomly assigned to “pregnant” or control groups. The

“pregnant” group received daily subcutaneous injections of the hormones (estradiol and progesterone), between 08:00 and 10:00 h, to simulate the 23-day gestational period in the rat. In the first 16 days, rats received daily low dose of estradiol (2.5 µg) combined with a high dose of progesterone (4 mg) dissolved in 0.1 ml sesame oil. On days 17–23, rats received a high dose of estradiol (50 µg). Days 24–27 were considered the “post-partum” period. The control groups (“non-pregnant”) received daily subcutaneous injections of the vehicle (0.1 ml sesame oil). The methanolic extract of *H. tiliaceus* (100 or 400mg/kg) or water (vehicle of the extract) were administered by gavage on “post-partum” period (Fig. 3).

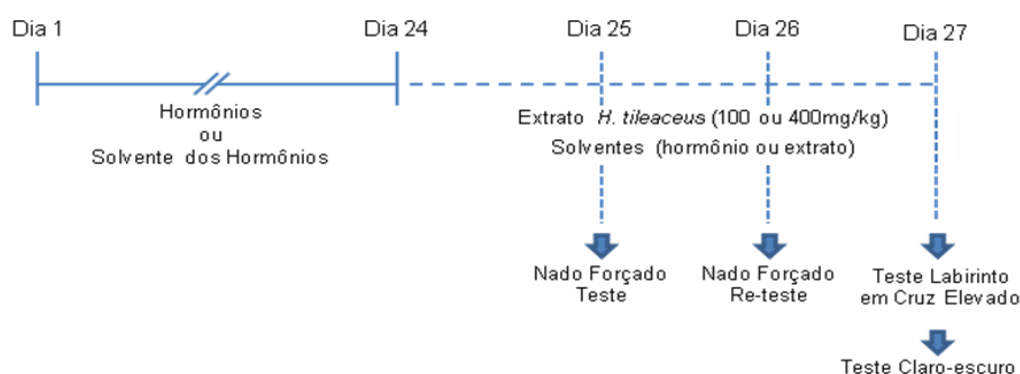


Figura 3

Behavioral tests

All behavioral observations took place in soundproof rooms at the same period of the day (between 13:00 and 17:00h) to reduce the confounding influence of diurnal variation in spontaneous behavior. In all experiments, the animals were observed in a blind manner and always by the same experimenter. After each behavioral session, all apparatus were cleaned with 70% alcohol solution.

Forced Swimming Test

The method used was similar to that described by Porsolt and colleagues (1977). On the 25 and 26 days, rats were individually placed in Plexiglas cylinders (diameter: 30 cm, height: 40 cm), that had previously been filled with water (23–25 °C) to a depth of 25 cm. The procedure consisted of two swimming sessions: first, a 15-minute pre-test, which was followed 24 hours later by a 5-minute test. It was observed the time of immobility and number of fecal boli (Fig. 4) [28, 29]. Each rat was judged to be immobile when remained floating motionless in the water, making only those movements necessary to keep its head above water. The number of fecal boli was recorded in each session. Following the pre-test and the test session, the animals were dried and returned to their cages. The water was changed and the cylinder rinsed with clean water after each rat. A decrease in the duration of immobility during the forced swimming test was taken as a measure of antidepressant-like activity [26, 30] .



Figura 4

Elevated Plus-Maze Test

The apparatus consisted of two opposite open arms (45 cm × 10 cm) without sidewalls and two enclosed arms with sides and end walls (45 cm × 10 cm × 30 cm), extending from a central square (10 cm × 10 cm). The maze was elevated to a 60 cm height above

the floor and placed in a moderately lighted room. Each rat was placed in the central square of the maze facing an open arm, and observed for 5 min. The anxiety-like behaviors were evaluated by time spent in both arms, open and enclosed, total number of unprotected head dipping in open arms, what elicits risk assessment, rearing and grooming [31]. This test was performed on the 27th day (Fig. 5).



Figura 5

Light-Dark Box Test

The apparatus consisted of two acrylic compartments, one dark (15.5 cm x 13.5 cm) and one white (15.5 cm x 17.5 cm). The floor was divided into squares and the compartments were connected by a 7 × 10 cm door in the middle of the wall separating the two compartments (Fig. 6). The lateral walls and floor of the light compartment were white, and a single, 60-W lamp bulb provided illumination from above. The dark compartment was black. On the 27th day, each rat was placed in the middle of the light compartment facing a side away from the door, and then being allowed to explore the environment for 5 min. The anxiety-like behaviors were evaluated by the number of quadrants crossed, duration of time spent in both light and dark compartments, number of full-body transitions between compartments, frequency of stretches from the dark

compartment into the light compartment (when the animals stretch forward with part of the head and retreat to original position) and the latency to enter in the dark compartment, besides the number of rearing, grooming and fecal boli in both compartments [32-34].



Figura 6

Statistical Analysis

The results were expressed as mean (\pm S.E.M.) or median (25th/75th of percentiles) values. Before the statistical the data distribution pattern was evaluated by the test of normality (Kolmogorov-Smirnov). The analysis of variance (two-way ANOVA) or Chi-Square Tests were employed considering data distribution. Differences were considered as significant when $p < 0.05$.

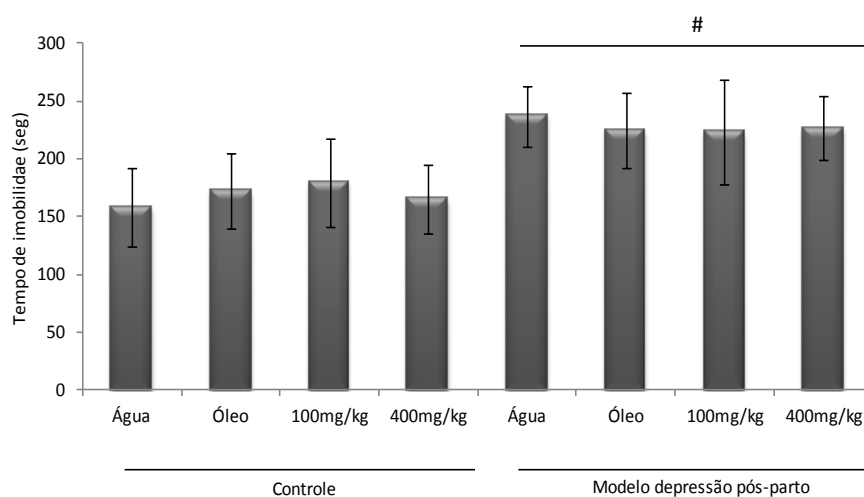
5.4 RESULTS

Forced Swim Test

The time of the immobility in the pretest and test sessions is demonstrated in table 1. Twoway ANOVA showed the effect of the depression factor in the pretest ($F(1,83)=$

67.524; $p < 0.001$;) and in the test session ($F(1,82) = 65.890$; $p < 0.001$;). Rats submitted to post-partum depression model demonstrated an increase on immobility time in both sessions. The methanolic extract of *H. tiliaceus* administration did not alter significantly the immobility time in the Forced Swim Test. The number of fecal boli did not differ significantly among groups.

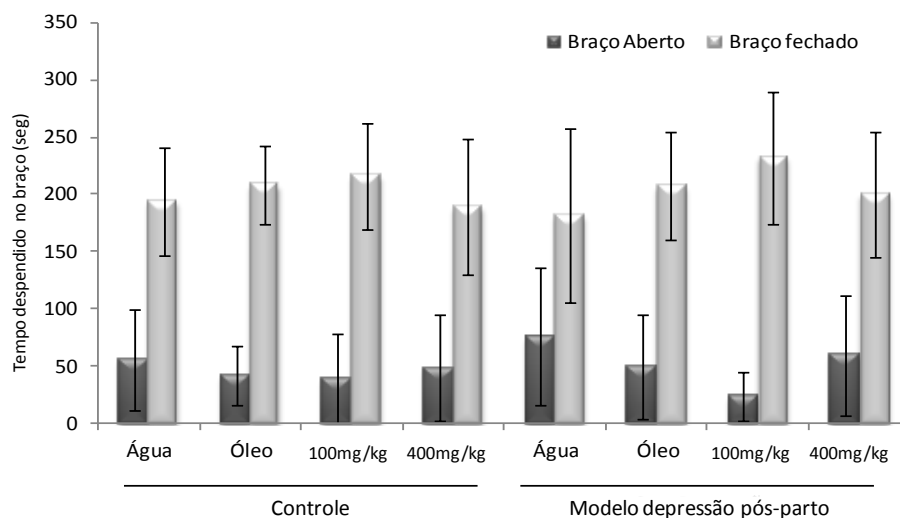
Tabela 1



Elevated Plus-Maze Test

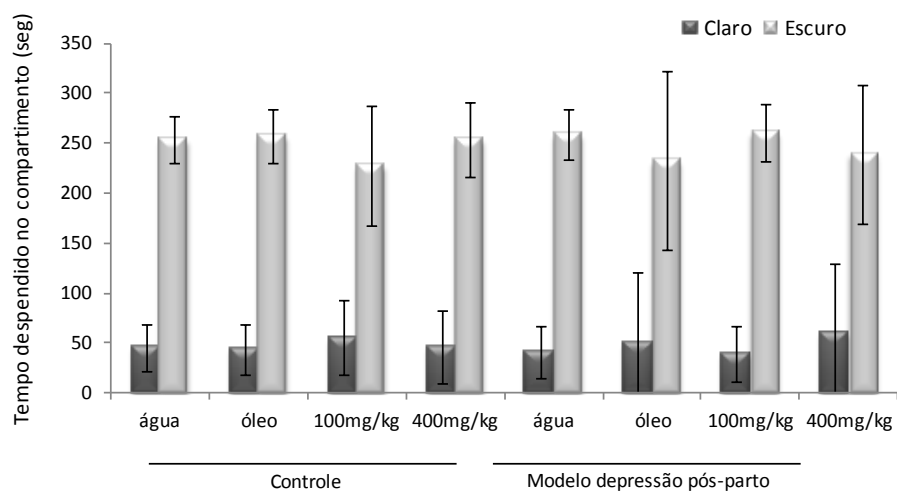
The time spent in open and closed arms, numbers of grooming, rearing and unprotected head dips did not differ significantly between post-partum depression model and control groups (ANOVA two-way) (Table 2). Moreover, the treatment with *H. tiliaceus* methanolic extract had no effect in elevated plus-maze test.

Tabela 2



Light-Dark Box Test

The time spent in light or dark compartments and the total number of attempted entries to the light compartment did not differ significantly among groups. Two-way ANOVA showed significant effect of the depression on number of rearing in dark compartment (Fig. 2; $F(1,79)= 6.029$; $p= 0.016$) (Table 3). Rats submitted to post-partum depression model showed decreases in number of rearing in dark compartment. This pharmacological model did not alter any studied parameters in light compartment. There was no statistical difference among extract of *H. tiliaceus* groups and control groups.

Tabela 3

5.5 DISCUSSION AND CONCLUSION

High doses of pregnancy-associated hormones (estradiol and progesterone) followed by rapid withdrawal is able to simulate postpartum conditions in Wistar rats, specifically a depressed behavior, since “pregnant” rats exhibited an increase in time of the immobility. Studies with this perspective are relevant since there are evidences indicating the differences between rat strains with regard to their behavior in forced swimming test [21]. Our data corroborate the validity of the hormone withdrawal following hormone-simulated “pregnancy” model.

One relevant finding of our work was that the protocol with high doses of pregnancy-associated hormones (estradiol and progesterone) followed by rapid withdrawal described by Galea and colleagues (2001) was unable to induce anxiety-like behavioral profile in elevated plus maze and light-dark box tests [17]. This interpretation was guided by the overall behavioral profile and not regarding the

importance of one single variable, such as the time spent in the open arms in elevated plus maze [35]. We observed some ethological parameters, namely risk assessment, a concept that has emerged from work on antipredator defense in rodents [36]. It was observed unprotected head-dipping (a ‘directed exploration’) in elevated plus maze. The lack of effect on risk assessment associated to conventional analysis, namely time spent in the open or closed arms of the maze, adds credibility to our conclusion that this model was unable to induce an anxiety state.

Interestingly, after 5 days withdrawal, Sprague Dawley rats underwent ovariectomy followed by continuous release pellet implantation (5 mg of estradiol and 50 mg of progesterone) 21- day treatment spent significantly less time in the open arms, indicating an anxiogenic effect.

Obviously this discrepancy can be related to different strain here used, daily administration, exposure to elevated plus maze in different days of withdrawal.

However, in accordance with data obtained with elevated plus maze, we observed that the time spent in light or dark compartments and the total number of attempted entries to the light compartment did not differ significantly between model post-partum depression and control groups, corroborating with the idea that our model has not an anxiogenic effect.

Additionally, our “maternal” depression model increased the number of rearing in the dark compartment, without any effect on the light compartment. This result is interesting, since it has been considered that the response of animals to novelty in an open space model appears more relevant to anxiety than in enclosed space; ambulation and rearing in the light compartment are usually measured in order to assess anxiety-like state of rodents [37]. Then we can suggest that a decrease on number of rearing in the dark compartment may indicate a lack of “maternal” motivation.

In disagreement with results here obtained, previously we have demonstrated that methanol extract of *H. tiliaceus* decreases the duration of immobility in predictive animal models using male mice, namely forced swimming and tail suspension tests [25]. This characteristic behavior, termed immobility, has been considered to reflect behavioral despair similar to that seen in human depression and it is well known that antidepressant drugs are able to reduce the immobility time in rodents [26]. The explanation for this discrepancy remains unclear, however some possibilities should be considered. Firstly, we can suppose that the contradictory results might be related to the fact that different species and sex were studied.

Secondly, it may be associated especially to substrate for physiological adaptation linked to regulation of energy expenditure in “pregnant” rats. Accordingly, when the animals are unable to do efficiently the escape, they can adopt an immobility response, thereby, conserving energy until the possibility of escape can be present [38]. It was described that the first period of swimming induces increases on energy expenditure, carbohydrate and fat oxidations [39]. Taken together we could suppose that decreases on immobility might not be an adaptive behavior in “pregnancy” condition. Future studies are needed to ascertain whether different neurochemical changes can explain the differences in forced swimming behaviour between female rats and male mice.

Although our result refutes the hypothesis that phytosterols, such as stigmasterol, stigmastadienol and stigmastadienone, found in the *H. tiliaceus* methanol extract, might be related to treatment or prevention of postpartum depression associated to withdrawal from chronic high levels of pregnancy-associated hormones, we might suggest that *Hibiscus tiliaceus* would be able in another “maternal” depression model, where should be observed maternal care, such as global time spent, arched-back nursing or licking-grooming behavior.

Thus our data indicate that Wistar rats exhibited behaviors consistent with “depressive-like” symptoms “post-partum” (after their hormone regime was discontinued) and may be an adequate model to evaluate the effects of high doses of pregnancy-associated hormones (estradiol and progesterone) followed by rapid withdrawal, showing “depressive-like” symptoms.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados do presente estudo demonstram que o modelo de depressão pós-parto induzido pela redução brusca dos níveis de estradiol e progesterona é capaz de reproduzir sintomas de depressão, e não de ansiedade, em ratas Wistar. Além disso, a administração do extrato metanólico de *H. tiliaceus* não alterou comportamentos relacionados à depressão e ansiedade. No entanto, mais estudos são necessários para avaliar as atividades antidepressiva e ansiolítica deste extrato em diferentes testes comportamentais e doses utilizadas.