

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Estudo da ação do floroglucinol, uliginosina B, sobre mediadores inflamatórios, estresse oxidativo e aminas biogênicas em diferentes estruturas cerebrais de roedores

CAROLINE GUERRA MARANGON

PORTO ALEGRE, 2017.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Estudo da ação do floroglucinol, uliginosina B, sobre mediadores inflamatórios, estresse oxidativo e aminas biogênicas em diferentes estruturas cerebrais de roedores

Tese apresentada por Caroline Guerra
Marangon para obtenção do TÍTULO DE
DOUTOR em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Stela Maris Kuze Rates

Porto Alegre, 2017.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em nível de Doutorado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 02.05.2017 pela Banca Examinadora constituída por:

Profª. Drª. Aline Rigon Zimmer Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profª. Drª. Liz Girardi Muller

Universidade Comunitária Regional de Chapecó

Profª. Drª. Rosane Gomez

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

CIP - Catalogação na Publicação

Marangon, Caroline Guerra
Estudo da ação do floroglucinol, uliginosina B,
sobre mediadores inflamatórios, estresse oxidativo e
aminas biogênicas em diferentes estruturas cerebrais
de roedores / Caroline Guerra Marangon. -- 2017.
145 f.
Orientadora: Stela Maris Kuze Rates.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre,
BR-RS, 2017.

1. Uliginosina B. 2. Hypericum. 3. Antidepressivo.
4. Comportamento de doente e comportamento tipo
deprimido. 5. Inflamação. I. Kuze Rates, Stela Maris,
orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Este estudo foi realizado no Laboratório de Psicofarmacologia Experimental da Faculdade de Farmácia da UFRGS, onde foram executados todos os experimentos comportamentais. O isolamento da uliginosina B foi realizado no Laboratório de Farmacognosia desta instituição sob supervisão da Prof^a. Dr^a. Gilsane Lino von Poser. Os ensaios dos parâmetros do estresse oxidativo foram realizados em parceria com a Prof^a. Dr^a. Carmem Vargas no Laboratório de Análise de Metabólitos no Hospital de Clínicas de Porto Alegre-HCPA. Os ensaios das citocinas inflamatórias foram realizados no Laboratório de Análises Bioquímicas e Citológicas desta instituição sob supervisão da Prof^a. Dr^a. Andréia Buffon. O autor recebeu bolsa de estudos do CAPES.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida e por sempre guiar os meus caminhos!

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Stela Rates por ter me acolhido em seu laboratório, por todo o aprendizado transmitido, carinho e ajuda!

À Prof^a. Dr^a. Gilsane von Poser pelas conversas e apoio, fundamentais para o isolamento da uliginosina B.

À Prof^a. Dr^a. Carmen Vargas, pela colaboração nos experimentos de estresse oxidativo.

À Prof^a. Dr^a. Eliane Dallegrove, por todo o conhecimento transmitido e pela prontidão no auxílio com os experimentos!

À Prof^a. Dr^a. Andréia Buffon por ter cedido seu laboratório para a realização dos experimentos de citocinas.

A todas as Steletes antigas do Laboratório de Psicofarmacologia Experimental por todo aprendizado e ensinamentos com a parte comportamental!

À Eve, por todo conhecimento com a fitoquímica em especial com a ULI, nossa molécula do coração!

A Sati, pela companhia, pelas conversas e pela disposição na ajuda em todos os experimentos comportamentais!

As Steletes babies pela companhia e pelos momentos descontraídos na tensão dos experimentos!

Em especial a Tielle, minha pequena maluquinha, por toda ajuda inicial, companhia e solicitude!

Às minhas bolsistas Marina e em especial a Camilinha, pelo carinho e dedicação com o trabalho!

Aos colegas do Laboratório de Farmacognosia pela amizade e apoio. Em especial aos amigos Maikon e Gari Vidal Ccana-Ccapatinta pela incansável ajuda e ensinamentos na parte fitoquímica. A companhia de vocês tornou os experimentos mais agradáveis!

Ao Cadu, por toda ajuda e empenho nos experimentos de estresse oxidativo!

Ao Léo, pela disposição e auxílio com os cortes cerebrais!

Ao Fernandinho, pela ajuda na cirurgia estereotáxica e nos experimentos de microdiálise!

A Jessica de Matos Nunes, que se tornou uma grande amiga e companheira!

A Maria Lúcia e ao Tony, a energia e a luz de vocês fortalece as pessoas!
Obrigada por tudo!

Aos meus queridos pais e minha irmã, pelo exemplo, pelo apoio e amor incondicionais! Amo muito vocês!

As minhas queridas tias Judite e Teresinha, por cuidarem de mim com o maior carinho. Por sempre estarem presente em todos os momentos da minha vida. Vocês são pessoas muito especiais! Amo vocês!

Ao Douglas, meu amor! Não tenho palavras para retribuir todo teu carinho, cuidado, paciência e acima de tudo pelo companheirismo em toda esta jornada. Você é um presente de Deus na minha vida. Meu porto seguro! Te amo demais!!!

Às minhas tias, Judite e Teresinha, minhas grandes incentivadoras!

A alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento envolvido e não na vitória propriamente dita.

Mahatama Gandhi

RESUMO

O gênero *Hypericum* é rico em floroglucínóis e tem despertado a atenção da comunidade científica e médica, especialmente a espécie europeia *H. perforatum*, por suas propriedades antidepressivas, parcialmente creditadas à hiperforina, um floroglucinol monomérico. A uliginosina B (ULI) é um derivado acilfloroglucinol dimérico descrito em aproximadamente 20 espécies de *Hypericum* nativas da América do Sul. Estudos prévios demonstraram que a ULI apresenta efeitos do tipo antidepressivo e antinociceptivo em roedores e que estes efeitos parecem ser, pelo menos em parte, ligados à sua capacidade de inibir a recaptação neuronal de monominais. Esses dados estão em acordo com a clássica teoria monoaminérgica da depressão. Porém, a depressão é uma doença multifatorial e heterogênea e evidências sugerem que a ativação de vias imuno-inflamatórias e o estresse oxidativo e nitrosativo (O & NS) resultam em alterações comportamentais, neuroquímicas e neuroendócrinas observadas nos distúrbios depressivos. Sendo assim, o objetivo desta tese é aprofundar o estudo da potencial atividade antidepressiva da ULI e seu mecanismo de ação, com foco no sistema monoaminérgico, neuroinflamação e estresse oxidativo. A avaliação do efeito do tratamento agudo da ULI sobre o conteúdo extracelular de dopamina (DA) e seus metabólitos, ácido 3,4-di-hidroxifenilacético (DOPAC), ácido homovanílico (HVA) e 3-metoxitiramina (3-MT), e serotonina (5HT) e seu metabólito ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), no núcleo accumbens de ratos, foi realizada através da técnica de microdialise cerebral em ratos Wistar acordados. Foi também realizada avaliação do efeito da uliginosina B sobre parâmetros comportamental e bioquímicos, relacionados ao estresse oxidativo (conteúdo da glutatona reduzida, sulfidrila, espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico e atividade da catalase), bem como da concentração de citocinas inflamatórias (IL-6, IL-10, MCP-1, IFN- γ , TNF e IL-12p70) no modelo de comportamento de doente (*sickness behavior*) e do comportamento tipo deprimido induzidos por LPS precedido do estresse da natação forçada, em camundongos CF1. A uliginosina B (30 mg/Kg i.p.) não alterou os níveis extracelulares de dopamina e seus metabólitos, nem os níveis intersticiais da serotonina e seu metabólito. Este achado está de acordo com um resultado anterior do

grupo, que falhou em demonstrar o efeito de um extrato rico em floroglucínóis do mesmo tipo que uliginosina B sobre as concentrações intersticiais de dopamina e metabólitos no núcleo accumbens de ratos Wistar. Ainda, podemos inferir que a uliginosina B (15 mg/Kg v.o.), nesta dose e neste modelo, não protegeu os camundongos do *sickness behavior*, no entanto, a uliginosina B apresentou um efeito protetor parcial no comportamento do tipo depressivo induzido por LPS precedido da natação forçada, no teste de suspensão pela cauda. Ainda, os resultados demonstram que a uliginosina B induz um aumento nos níveis da IL-10, glutatona reduzida e de MCP-1 e especula-se que esses dados possam contribuir para o seu efeito antidepressivo possivelmente relacionado com outras vias de sinalização.

Palavras chave: *Hypericum*, uliginosina B, antidepressivo, microdiálise cerebral, comportamento de doente e comportamento tipo deprimido, inflamação, glutatona reduzida, IL-10, MCP-1, dopamina, DOPAC, HVA, 3MT, 5HT, 5HIAA.

ABSTRACT

Hypericum genus is rich in phloroglucinols and it has attracted the attention of the scientific and medical community, especially the European *H. perforatum* species, for its antidepressant properties, partially credited to *hyperforin*, a monomeric phloroglucinol. The uliginosin B (ULI) is a dimeric derivative acylphloroglucinol described in approximately 20 *Hypericum* species native of South America. Previous studies have shown that uliginosin B presents antidepressant-like and antinociceptive in rodents and these effects seem to be at least in part linked to its ability to inhibit neuronal monoamine reuptake. These data are in agreement with the classic monoamine theory of depression. However, depression is a multifactorial and heterogeneous disease. Evidence suggests that activation of immuno-inflammatory pathways and oxidative and nitrosative stress (O & NS) result in behavioral, neurochemical and neuroendocrine abnormalities observed in depressive disorders. Thus, the objective of this work is to deepen the study of potential antidepressant activity uliginosin B and its mechanism of action, focusing on the monoaminergic system, neuroinflammation and oxidative stress. The evaluation of the effect of acute treatment of uliginosin B on the extracellular content of dopamine (DA) and its metabolites, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), homovanilic acid (HVA) and 3-methoxytyramine (3-MT) and Serotonin (5HT) and its metabolite 5-hydroxyindolacetic acid (5-HIAA) in the rat nucleus accumbens was performed by the brain microdialysis technique in awake Wistar rats. It was also carried out assessment of the effect on behavioral and biochemical parameters related to oxidative stress (reduced glutathione content, sulfhydryl, thiobarbituric acid reactive species and catalase activity) as well as the concentration of inflammatory cytokines (IL-6, IL-10, MCP-1, IFN- γ , TNF and IL-12p70) in sickness behavior and depressive-like behavior LPS-induced preceded by swimming, in CF1 mice. The uliginosin B (30 mg/kg i.p.) did not alter the extracellular levels of dopamine and its metabolites, and serotonin and its metabolite. This finding is consistent with a previous result set, failed to demonstrate the effect of an extract rich in phloroglucinols the same type as uliginosin B for interstitial concentrations of dopamine and metabolites in nucleus accumbens of

Wistar rats. Still, we can infer that uliginosin B (15 mg/kg v.o.) at this dose and in this model, did not protect the mice from sickness behavior, however, it showed a partial protective effect against the depressive-like effect of LPS in the tail suspension test. Noteworthy, the results demonstrate that uliginosin B induces an increase in IL-10, reduced glutathione and MCP-1 levels and it is speculated that such data may contribute to its antidepressant effect possibly related to other signaling pathways.

Keywords: *Hypericum*, uliginosin B, antidepressant, brain microdialysis, sickness behavior and depressive-like behavior, inflammation, reduced glutathione, IL-10, MCP- 1, dopamine, DOPAC, HVA, 3MT, 5HT, 5HIAA.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1. Estrutura da uliginosina B.....	21
---	----

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1. Esquema do metabolismo das monoaminas biogênicas.	30
Figura 2. Sonda de microdiálise	33
Figura 3. Esquema das vias relacionadas com a fisiopatologia da depressão.....	36
Figura 4. Esquema das vias de comunicação da periferia ao cérebro: humoral, neural e celular.....	38
Figura 5. Gráfico do Comportamento de doente e comportamento tipo deprimido induzidos por endotoxina em roedores.....	40
Figura 6. Esquema da Via da quinurenina: degradação do triptofano.	43

CAPÍTULO I

Figura 1. Chemical structure of uliginosin B.	62
Figure 2. Standard curves of neurotransmitters and their metabolites.	67
Figure 3. Representative chromatograms.	69
Figure 4. Effect of uliginosin B (30 mg/kg, i.p.), on striatal extracellular levels of dopamine and its metabolites and 5-HIAA measured by microdialysis in awake rats.	70
Figure 5. Effect of uliginosin B on the extracellular levels of dopamine metabolites and 5-HIAA in the nucleus accumbens core of awake rats.....	71
Figure 6. Effect of uliginosin B on the extracellular levels of dopamine metabolites and 5HT and its metabolite in nucleus accumbens shell of awake rats.....	73
Figure 7. Histological sections with the insertion site of the microdialysis probe in the striatum and nucleus accumbens of awake rats.....	74

ABREVIATURAS E SIGLAS

HK- 3-hidroxiquinurena 3-MT- 3-metoxitiramina

HNE- 4-hidroxi-2-nonenal 5HIAA- 5-hidroxiindolacético

5HT- 5-hidroxitriptamina (serotonina) 5HTP 5-hidroxitriptofano

8-iso-PGF₂ α - 8-iso-prostaglandina F₂ α 8-OHdG - 8-hidroxi-2-deoxiguanosina ACTH- hormônio adrenocorticotrófico ANOVA- análise de variância

BCG- Bacille Calmette-Guerin BLA- amígdala basolateral

CAPES- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior CAT- catalase

CEUA- Comissão de Ética no Uso de Animais

CIOMS- Conselho da Organização Internacional de Ciências Médicas (do inglês

Council for International Organizations of Medical Sciences)

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico COMT- Catecol-O-metiltransferase

CPF- córtex pré frontal

CRF- hormônio liberador de corticotrofina Cu- cobre

DA- dopamina

DEX- dexametasona

DNA- ácido desoxirribonucléico DOPAC- ácido 3,4-di-hidroxi-5-hidroxi-2-metilacetofenilacético DRN- núcleo dorsal da rafe

DSM-V- Manual Diagnóstico e Estatístico dos Transtornos Mentais, quinta edição ERK1/2- quinases reguladas por sinais extracelulares

FST- Teste de natação forçada (do inglês *Forced Swimming Test*) GABA- ácido γ aminobutírico

GPX- glutatona peroxidase GR- glicocorticóide

GSH- glutatona reduzida GSSG- glutatona oxidada

HPA- eixo hipotálamo-hipófise-adrenal

HPLC- cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês *High performance liquid chromatography*)

HVA- ácido homovanílico i.p.- intraperitoneal

IDO- indoleamina 2,3-dioxigenase IFN- interferon

IL- interleucina

IL-1ra- antagonista do receptor de IL-1 IMI- imipramina

IRF-1 fator regulador de interferon JNK- quinase c-Jun N-terminal KA- ácido cinurênico

kDa- quilodalton KYN- quinurenina

FCA- fluido cerebrospinal artificial LD- limite de detecção

LPS- lipopolissacarídeo (do inglês *lipopolysaccharide*) MAO- Monoamino oxidase

MAPK- proteínas quinases ativadas por mitógenos MCP-1- proteína quimiotática de monócitos-1 MDA- malondialdeído

MHPG- 3-metoxi-4-hidroxi-fenilglicol Mn- manganês

MRN- núcleo medial da rafe NA- noradrenalina

NAC-núcleo accumbens

NADPH-oxidase- nicotinamida adenina dinucleótido fosfato-oxidase NF- κ B- fator nuclear κ B

NMDA- N-metil-D-aspartato

OMS-organização Mundial da Saúde

p38- proteína quinase ativada por mitógeno

PAMPS- padrões moleculares associado a patógenos

PPGCF- Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas QA- ácido quinolínico

RNA_m- ácido ribonucléico mensageiro RNS- espécies reativas de nitrogênio ROS- espécies reativas de oxigênio

S.E.M- Erro Padrão da Média (do inglês *Standard Error of the Mean*) SERT- transpostador de serotonina

SNC- Sistema Nervoso Central SOD- superóxido dismutase

STAT 1- α - ativador de transcrição 1 α

TBARS- substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico Th1- (T *helper* 1)

TLR4- receptor Toll-like 4

TNF- α - fator de necrose tumoral α (*tumor necrosis fator α*) TrkB- tirosina quinase-B

TSD- teste de supressão da dexametasona

TST- teste de suspensão pela cauda (do inglês *Tail suspension Test*) UFRGS-
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

ULI- uliginosina B v.o- via oral

VMAT- transportador vesicular monoaminérgico específico VTA- área tegmental
ventral

Zn- zinco

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	19
OBJETIVOS.....	23
Objetivo geral.....	24
Objetivos específicos	24
REVISÃO DE LITERATURA	25
Monoaminas e depressão	27
Monoaminas biogênicas.....	29
Microdiálise	32
Quantificação de neurotransmissores	34
Neuroinflamação e a fisiopatologia da depressão.....	35
Citocinas e depressão	36
Citocinas e o Comportamento de doente	38
Possíveis mecanismos ocorridos na depressão induzidos pelas citocinas	40
Efeito das citocinas no metabolismo dos neurotransmissores	40
Efeitos das citocinas na função neuroendócrina	43
Efeitos das citocinas na plasticidade neural.....	44
Citocinas e antidepressivos	46
Estresse oxidativo	49
Evidência do estresse oxidativo na depressão	50
Antidepressivos no estresse oxidativo	55
CAPÍTULO I: Uliginosin B increases extracellular levels of dopamine and HVA in striatum but does not alter the levels of dopamine and its metabolites in the nucleus accumbens of rats.	57
Abstract	59
Introduction.....	60
Materials and Methods.....	61

<i>Uliginosin B Obtention</i>	61
<i>Animals</i>	62
<i>Reagents</i>	63
<i>Surgery</i>	63
<i>Microdialysis in awake rats</i>	64
<i>Measurement of monoamines in the dialysates</i>	64
<i>Determination of microdialysis probes recovery rate</i>	65
<i>Histology</i>	65
<i>Statistical analysis</i>	66
Results.....	66
Discussion.....	74
References.....	80
CAPÍTULO II: Uliginosin B, a Natural Phloroglucinol, Increases Hippocampal GSH, MCP-1 and IL-10 Levels in Mice	87
DISCUSSÃO FINAL E CONCLUSÃO	89
REFERÊNCIAS	97
ANEXOS	119

INTRODUÇÃO

O gênero *Hypericum* é conhecido por apresentar plantas com importantes constituintes e propriedades biológicas (Viana et al., 2006, Viana et al., 2005, Barnes et al., 2001). Sendo extensivamente estudada há cerca de 20 anos, a espécie *Hypericum perforatum*, nativa da Europa, é amplamente utilizada no tratamento da depressão leve à moderada (Schmidt and Butterweck, 2015). A ação antidepressiva de *H. perforatum* tem sido demonstrada em diferentes modelos animais e em estudos clínicos (Kasper et al., 2010). Entre os componentes associados aos efeitos desta espécie podemos citar os derivados do floroglucinol (hiperforina), naftodiantronas (hipericina) e flavonóides (Rocha et al., 1994; Chatterjee et al., 1998a; Butterweck et al., 2000; Kasper et al., 2010).

As espécies do gênero *Hypericum* pertencentes a seções *Brathys* e *Trigynobrathys*, apresentam acilfloroglucinóis diméricos, propostos como marcadores quimiotaxonômicos destas seções (Ccana-Ccapatinta et al., 2015). Nosso grupo tem demonstrado que derivados diméricos de acilfloroglucinol e monômeros de benzopirano isolados de espécies de *Hypericum* nativas do RS apresentam atividade no sistema nervoso central em modelos roedores, notadamente do tipo antidepressiva e antinociceptiva (Viana et al., 2005, 2006; Rates et al., 2010; Stolz et al., 2010; Haas et al., 2010, Stein et al., 2012; Centurião et al., 2012, 2014; Ccana-Ccapatinta et al., 2014; Bridi et al., 2016; Stein et al., 2016; Stolz et al., 2016).

Dentre as espécies nativas do RS, destacou-se *Hypericum polyanthemum*. Extratos lipofílicos dessa espécie e o seu principal constituinte, um derivado de floroglucinol, a uliginosina B (ULI), são objetos de pedidos de depósito de patente por nosso grupo para o uso como antidepressivo e em outras doenças que envolvam disfunções dopaminérgicas (INPI:PI0900614-1; PCT/EP2010/051816). A ULI (figura 1) é um derivado acilfloroglucinol dimérico descrito em aproximadamente 20 espécies de *Hypericum* nativas da América do Sul (Ccana-Ccapatinta et al., 2014).

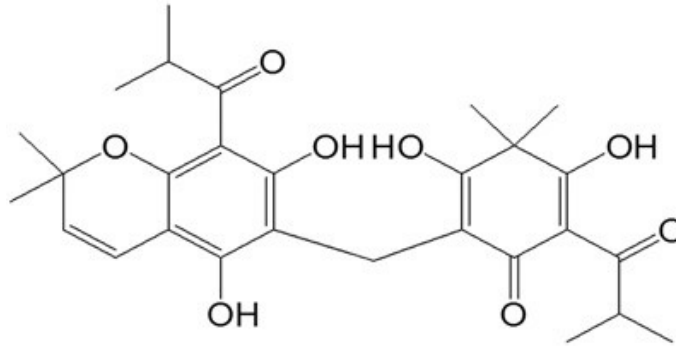


Figura 1. Estrutura da uliginosina B.

Estudos prévios demonstraram que a ULI apresenta efeito antidepressivo, no teste da natação forçada e antinociceptivo, inclusive mostrando efeito sinérgico com a morfina em roedores (Stein et al., 2012, Stolz et al., 2012). Estes efeitos parecem ser, pelo menos em parte, ligados à sua capacidade em inibir a recaptação sinaptossomal das monoaminas (Stein et al., 2012), com consequente ativação dos receptores dopaminérgicos e estimulação indireta do sistema opióide e glutamatérgico (Stolz et al., 2012). No entanto, a ULI não se liga aos transportadores monoaminérgicos locais, indicando que sua ação é de uma forma diferente da maioria dos antidepressivos. A Na⁺K⁺-ATPase é uma enzima que também está implicada no processo de recaptação das monoaminas e recentemente foi reportado que a ULI foi capaz de aumentar a atividade desta enzima provavelmente bloqueando os canais de Na⁺ dependentes de voltagem, interferindo assim na captação destes neurotransmissores (Stein et al., 2016).

Outro estudo demonstrou a participação da ULI na sinalização purinérgica, que é composta por receptores e enzimas distribuídos no Sistema Nervoso Central. A ULI mostrou aumentar a disponibilidade de adenosina, com consequente ativação dos receptores de adenosina (particularmente A1 e A2a), indicando o envolvimento destes no efeito antinociceptivo deste floroglucinol (Stolz et al., 2016). Desta forma, a ULI vem se mostrando como um novo protótipo para o desenvolvimento de drogas com ação analgésica e antidepressiva, em que seu mecanismo de ação ainda não foi completamente elucidado.

Este trabalho será apresentado na forma de 2 capítulos: o primeiro capítulo aborda o efeito da ULI sobre a neurotransmissão monoaminérgica com enfoque na dopamina e seus metabólitos e foi organizado na forma de um manuscrito. O segundo capítulo é constituído por artigo científico já publicado na Revista Brasileira de Farmacognosia e nele consta a avaliação dos efeitos da ULI em um modelo animal de depressão relacionado à neuroinflamação, tendo em vista a análise comportamental e os ensaios neuroquímicos relacionados à quantificação de citocinas inflamatórias e os parâmetros de estresse oxidativo.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Neste contexto, o objetivo geral deste trabalho é aprofundar o estudo da potencial atividade antidepressiva da ULI, através da avaliação do efeito deste floroglucinol sobre a neurotransmissão monoaminérgica e sobre parâmetros comportamentais e neuroquímicos relacionados à neuroinflamação e ao estresse oxidativo:

Objetivos específicos

- Avaliar o efeito do tratamento com a uliginosina B sobre os níveis extracelulares de dopamina (DA) e serotonina (5-HT) e seus metabólitos através da técnica de microdiálise cerebral no núcleo accumbens em ratos acordados;
- Avaliar o efeito da uliginosina B sobre os mediadores inflamatórios e parâmetros de estresse oxidativo em camundongos submetidos ao modelo do comportamento de doente e comportamento tipo depressivo induzido por lipopolissacarídeo (LPS) e natação forçada.

REVISÃO DE LITERATURA

A depressão é a principal causa de incapacidade em todo o mundo e está associada a muitas morbidades, além de apresentar um fator de risco elevado para o desenvolvimento de doença coronariana e doença vascular cerebral (Voinov et al., 2013, Tamminga et al., 2002). Estima-se que, globalmente, 350 milhões de pessoas de todas as idades sofram de depressão (Organização Mundial da Saúde, 2015).

Mesmo após o diagnóstico clínico e acompanhamento médico, muitos pacientes não respondem à terapia farmacológica disponível. Entre os sintomas mais relatados encontram-se os distúrbios do sono, anedonia, anorexia, diminuição da libido e fadiga (Leonard, 2014). Além disso, o prolongado tempo de latência até a obtenção do efeito esperado e o alto índice de efeitos adversos muitas vezes dificultam a aderência ao tratamento (Holtzheimer and Mayberg, 2011, Berton and Nestler, 2006; Trivedi et al., 2006). Por isso, a busca por fármacos alternativos mais efetivos e seguros para o tratamento deste transtorno é ainda uma necessidade (Holtzheimer and Mayberg, 2011).

A patofisiologia da depressão não é completamente compreendida. Acredita-se que ocorram alterações e interações em vários níveis: neurobiológico, neuroendócrino, neurotrófico (ou molecular) e neuroimune (Miller et al., 2009, Pariante and Lightman, 2008, Duman, 2004, Hirschfeld, 2000). A hipótese clássica sugere que os distúrbios depressivos são biologicamente mediados pela disfunção na via monoaminérgica, visto que os antidepressivos convencionais agem bloqueando o sítio específico dos transportadores monoaminérgicos ou inibindo a ação da enzima monoaminoxidase (Tamminga et al., 2002, Hirschfeld, 2000).

Porém, várias evidências atuais apontam para uma maior complexidade da neurobiologia deste distúrbio do humor, indicando novos alvos biológicos, o que demanda novos estudos e, também, possibilita a busca de fármacos com novos mecanismos de ação. Em nível neuroendócrino, a presença constante de estresse, (Sairanen et al., 2006) determina uma desregulação do controle da liberação de cortisol e, conseqüentemente, do funcionamento de eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), o que, por sua vez, resulta na redução dos níveis do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), afetando a neurogênese no hipocampo e no córtex pré-frontal (Sales et al., 2011, Sarris et al., 2009, Tamminga et al., 2002, Duman et al., 1999). Essas

alterações predis põem ao quadro depressivo na presença do estresse crônico. Além disso, níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-6) no soro ou no plasma de pacientes depressivos sugerem o envolvimento do sistema imune neste processo (Dowlati et al., 2010, Dantzer et al., 2008). Além disso, relatos da participação de mecanismos do estresse oxidativo em doenças neuropsiquiátricas, têm surgido na literatura (Sarandol et al., 2007, Rawdin et al., 2013).

Inicialmente, a depressão foi considerada um transtorno do humor primariamente associado ao humor diminuído e secundariamente associada a outros sintomas (Lewis, 1934). Atualmente, as pesquisas consideram a depressão como uma desordem heterogênea com uma dimensão de sintomas “cognitivos” e “somáticos” relacionados com a estimulação do sistema imune e questões cardiovasculares (Dannehl et al., 2014). Os critérios atuais utilizados para o diagnóstico e classificação dos estados depressivos se encontram no Manual Diagnóstico e Estatístico dos Transtornos Mentais, em sua quinta edição, lançado em 2013 (DSM-V).

Monoaminas e depressão

Os avanços nas técnicas de imagem facilitaram a visualização dos circuitos neurais límbico-cortical-estriatal-pálido-talâmico, interligados com a fisiopatologia da depressão (Drevets et al., 2008). Apesar de, esta rede neural apresentar áreas histologicamente e imunocitoquimicamente diferentes, estas vias se mostram envolvidas com auto-referência, medo, ansiedade, resposta visceral, bem como a avaliação do estímulo e recompensa (Price and Drevets, 2012). Sendo assim, a conectividade dos neurotransmissores monoaminérgicos (serotonérgicos, noradrenérgicos e dopaminérgicos) faz parte destes circuitos (Hamon and Blier, 2013).

Há evidências do envolvimento do núcleo accumbens e área tegmental ventral (VTA) na regulação do humor com destaque para a depressão. A hipótese de que esta via pudesse mediar o comportamento tipo depressivo foi proposta inicialmente na década de 80, baseada em estudos com antagonistas dos receptores de dopamina (Wise, 1982).

Alguns trabalhos mostram que o estresse em modelos animais de depressão, ativa os neurônios dopaminérgicos da VTA e assim estimula a transmissão dopaminérgica para os seus alvos límbicos como o núcleo accumbens (Di Chiara et al., 1999, West et al., 2003, Pallis and Spyraiki, 2001, Yadid et al., 2001). Há relatos de que a terapia com antidepressivos também pode influenciar a atividade dopaminérgica na região da VTA e os seus alvos (Cyr et al., 2001, Renard et al., 2001). Entretanto, esta questão não é um consenso entre os pesquisadores em razão de ter sido dado um enfoque maior nas vias serotoninérgicas e noradrenérgicas e outros circuitos vinculados ao hipocampo e córtex cerebral na neuroquímica deste distúrbio (Nestler and Carlezon, 2005).

Esta observação tem sido evidenciada indiretamente. Por exemplo, foram encontradas reduzidas concentrações do metabólito da dopamina, ácido homovanilínico (HVA), no fluído cerebrospinal de pacientes deprimidos; agonista do receptor de dopamina (pramipexole) mostrou efeitos antidepressivos em estudos controlados por placebo (Chantal, 2009). Além disso, outros estudos relataram que a atividade do núcleo accumbens está reduzida na depressão e que isto é resultado da “ausência” da função da recompensa refletida no sintoma de anedonia, muito comum em pacientes depressivos e da reduzida função psicomotora (Nestler and Carlezon, 2005, Russo and Nestler, 2013, Mizaki et al., 2016).

De fato, poucos estudos investigaram a correlação neural da anedonia na depressão (Chantal, 2009), alguns pesquisadores acreditam que é necessária a associação de estudos de imagem do núcleo accumbens de pacientes com a depressão aliado a exame neuropatológico do tecido cerebral *post mortem* (Russo and Nestler, 2013). No entanto, a avaliação da concentração dos níveis intersticiais dos neurotransmissores monoaminérgicos, através da microdiálise cerebral, se apresenta como uma relevante técnica na investigação da função fisiológica e patológica dos sistemas neuronais bem como do efeito farmacológico de drogas relacionadas a estes sistemas (Mitala et al., 2008).

Monoaminas biogênicas

As monoaminas biogênicas, tais como a dopamina (DA), a 5-hidroxitriptamina (5-HT) e a noradrenalina (NE), constituem um grupo de neurotransmissores, amplamente distribuídos nos SNC e periférico (Allen et al., 2017). Elas desempenham um papel relevante na regulação das funções comportamentais, imunológicas e fisiológicas nos vertebrados e são importantes nas investigações de doenças neurológicas como a depressão, esquizofrenia e doença de Parkinson (Allen et al., 2017, Schou-Pedersen et al., 2016).

A origem dos neurotransmissores pode ser tanto neuronal (monoaminas) quanto extraneuronal (neurotransmissor glutamato). Os neurotransmissores monoaminérgicos são armazenados em vesículas no nervo terminal por um transportador vesicular monoaminérgico (VMAT) específico. Quando o potencial de ação atinge o nervo do terminal monoaminérgico, ocorre a abertura de canais de cálcio ativados por voltagem dependente, resultando na liberação da monoamina na fenda sináptica por exocitose, como também podem ser liberados ao longo do axônio (por varicosidades) e / ou através da somata e dendritos (Elhwuegi, 2004; Anderzhanova e Wotjak, 2013). Assim, as monoaminas liberadas agem sobre receptores específicos localizados em membranas pós-sinápticas ou pré-sinápticas (Elhwuegi, 2004).

Em condições fisiológicas normais, a DA captada no interior da célula pré-sináptica ao entrar no citosol pode ser reciclada em vesículas para ser utilizada em posterior neurotransmissão ou pode ser deaminada e carboxilada a ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) pela enzima monoamino oxidase (MAO) intracelular. O DOPAC formado no citosol do neuronônio é liberado para o meio extracelular onde é convertido no ácido homovanílico (HVA) pela enzima catecol-O-metiltransferase (COMT). A DA que não foi recaptada é metabolizada a 3-metoxitiramina (3MT) através de metilação seqüencial pela COMT e pela MAO existente nas células gliais (Cooper et al., 2006).

Já a NE é metabolizada a 3-metoxi-4-hidroxi-fenilglicol (MHPG) pelas enzimas MAO, aldeído desidrogenase (AD) e COMT e a 5-HT gera o metabolito ácido 5-hidroxi- 3-indolacético (5-HIAA) através da ação da enzima MAO-A. Assim, as aminas

biogênicas são metabolizadas pela enzima MAO já as catecolaminas são metabolizadas pela COMT, figura 2 (Kurian et al., 2011).

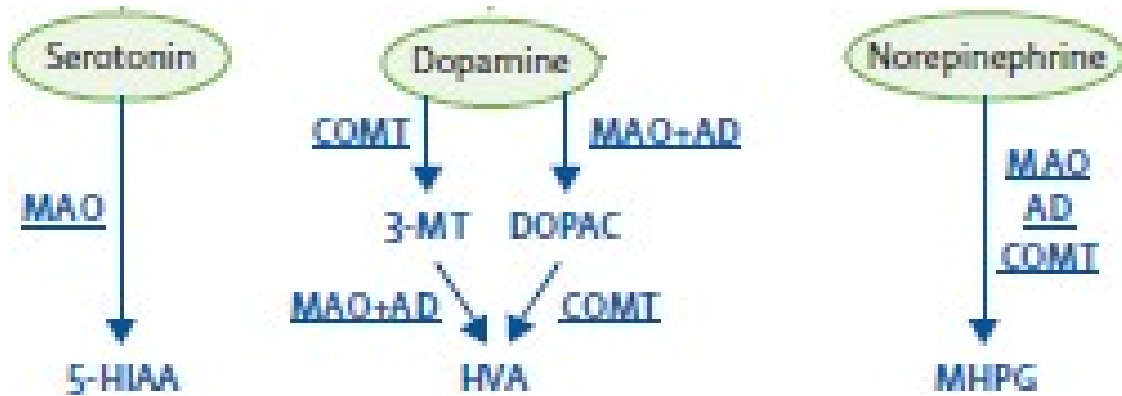


Figura 1. Esquema do metabolismo das monoaminas biogênicas. MAO= monoamine oxidase. AD= aldehyde dehydrogenase. 3-MT= 3-methoxytyramine. DOPAC= 3,4- dihydroxyphenylacetic acid. 5-HIAA= 5-hydroxyindoleacetic acid. HVA= homovanillic acid. MHPG= 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol. Adaptado de Kurian et al., 2011.

As monoaminas DA, 5-HT e a NE não dão origem a potenciais sinápticos excitatórios e inibitórios, diferentemente de outros neurotransmissores, mas agem sobre receptores acoplados à proteína G, dando origem a segundos mensageiros pela ativação de enzimas. Com exceção de um subtipo de receptore de 5HT que está conectado ao canal iônico regulado por ligante. Além disso, cada monoamina pode ser recaptada por um transportador específico no neurônio pré sináptico ou nas células gliais: DAT é o transportador de DA, NET é o transportador de NE e SERT, o transportador de 5-HT (Stahl et al., 2008).

Dessa forma, a concentração extracelular dos neurotransmissores, como as monoaminas, vai depender do estado de autorreceptores, dos transportadores específicos e das enzimas responsáveis por seu metabolismo. Outros fatores menos particulares também influenciam no conteúdo extracelular dos neurotransmissores como: transporte de substâncias passivas por difusão, perda de líquido cefalorraquidiano (LCR) e sangue, decaimento oxidativo e nível do metabolismo energético (Anderzhanova e Wotjak, 2013).

Os neurotransmissores monoaminérgicos e seus respectivos metabólitos podem ser quantificados nos tecidos cerebrais e em amostras biológicas tais como sangue, saliva e urina (Bidel et al., 2016). Existem várias técnicas para monitorar as

alterações químicas no compartimento extracelular do cérebro, como push-pull, voltametria *in vivo*, voltametria cíclica rápida, microdiálise e preparações com homogenatos e fatias cerebrais (Anderzhanova e Wotjak, 2013).

A mais antiga foi a técnica de perfusão push pull desenvolvida por Gaddum (Gaddum, 1961) e Myers (Myers, 1972) e que posteriormente deu origem a microdiálise. Esta técnica necessita de duas diferentes cânulas inseridas no cérebro do animal. Em uma delas é infundido o líquido cerebral artificial (mimetiza o líquido cerebrospinal) e na outra a amostra é coletada. Neste sistema, a grande desvantagem, é que o tecido cerebral fica em contato direto com o meio de perfusão, podendo gerar perda da resolução temporal e uma lesão tecidual (Kraus and Philippu, 2015).

A voltametria *in vivo* consiste na detecção da atividade eletroquímica por meio da implantação de eletrodos de carbono na região do cérebro de interesse. A maioria dos neurotransmissores podem ser oxidados ou reduzidos na superfície destes eletrodos através da aplicação de um potencial elétrico. Porém, para alguns compostos, a diferença entre os potenciais de oxidação pode ser mínima, reduzindo a especificidade da análise (Anderzhanova e Wotjak, 2013).

Já a voltametria cíclica rápida fornece uma maior seletividade, sensibilidade e uma resolução química e temporal. É uma técnica eletroquímica que apresenta um microeletrodo de fibra de carbono com um diâmetro de 7 μm que pode ser inserido na região cerebral. Além disso, é considerada uma poderosa técnica para medir alterações rápidas nos níveis dos neurotransmissores e seus metabólitos, como da DA, durante uma estimulação elétrica (Nguyen and Venton, 2014). No entanto, esta técnica não deve ser utilizada na mensuração da concentração basal dos analitos em condição fisiológica. (Anderzhanova e Wotjak, 2013). Atualmente, a voltametria cíclica rápida é utilizada para detectar várias moléculas biológicas tais como dopamina, noradrenalina, serotonina e histamina (Nguyen and Venton, 2014).

A quantificação do conteúdo de neurotransmissores pode ser realizada utilizando homogenatos ou fatias cerebrais. Esta metodologia fornece dados sobre a quantidade total de cada neurotransmissor e seus metabólitos. No entanto, com este tipo de análise não é possível realizar estudos dinâmicos do metabolismo dos

neurotransmissores, uma vez que a análise do tecido fornece dados neuroquímicos num ponto isolado de tempo (Croushore and Sweedler, 2013).

Uma das técnicas mais frequentemente utilizadas em modelo animal é a microdiálise. A microdiálise cerebral surgiu na década de setenta e tem sido utilizada para monitorar alterações dinâmicas nas concentrações extracelulares de diversos sistemas neurotransmissores (dopaminérgicos, colinérgico e glutamatérgico) bem como avaliar as substâncias endógenas (hormônios) ou exógenas nos fluídos corporais (Chefer et al., 2009). Neste contexto, a microdiálise, por já estar implementada em nosso laboratório, é a técnica de escolha para a coleta das monoaminas e será melhor abordada neste trabalho.

Microdiálise

Desde a sua introdução até o presente a microdiálise cerebral é uma técnica bem estabelecida e extensivamente usada na fisiologia experimental, com enfoque nos estudos de farmacocinética, neuroquímica, neurotoxicológica e neurofarmacológica (Anderzhanova et al., 2013). Esta técnica pode ser aplicada em qualquer tecido, em humanos ou animais, que se possa inserir uma sonda de microdiálise que é composta por uma membrana semipermeável (Ungerstedt and Hallström, 1987, Plock and Kloft, 2005).

A técnica da microdiálise foi primeiramente aplicada no tecido cerebral, onde Ungerstedt e Pycock (1974) investigaram a neurotransmissão de dopamina (DA) no cérebro de rato (Ungerstedt and Pycock, 1984). Dessa forma, o estudo dos neurotransmissores e suas concentrações extracelulares através desta técnica tem sido relevante na tentativa de melhor conhecer seus mecanismos de liberação e regulação frente a diversos estímulos (Fillenz, 2005).

Em geral, o experimento é realizado através da implantação de uma sonda, constantemente perfundida por uma solução conhecida e que se assemelhe ao líquido intersticial do tecido a ser analisado, permitindo assim a difusão de moléculas do meio intersticial para o fluido perfundido, devido ao gradiente de concentração gerado (Lee et al., 2013). Dessa forma, o princípio da técnica é baseado na difusão passiva e o

líquido resultante desta perfusão é analisado quimicamente e corresponde a composição do fluído extracelular (La Peña et al., 2000). A microdiálise é uma técnica analítica que permite a coleta e posterior análise de qualquer molécula que possa ser difundida pelos poros da sonda de diálise (Chefer et al., 2009).

A sonda de microdiálise normalmente é constituída por dois capilares, um referente à entrada do líquido de perfusão (inlet) e outro referente à saída deste líquido (outlet) bem como uma membrana semipermeável localizada na extremidade terminal, figura 3 (Plock and Kloft, 2005). Os capilares são feitos com materiais do tipo sílica fundida, teflon ou polietiléster cetona. As membranas diferem em relação ao material usado e o tamanho do poro. Entre as substâncias comuns utilizadas como materiais de membrana encontram-se o acetato de celulose, éter policarbonato, polietersulfona ou cuprofano (Nandi et al., 2009).

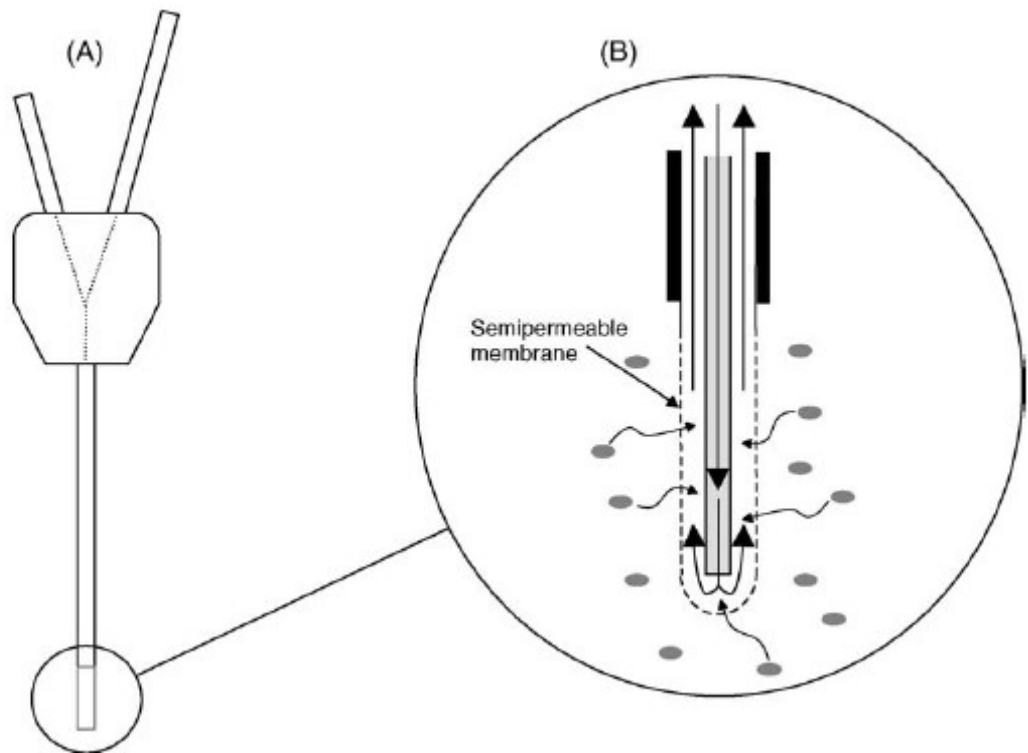


Figura 2. (A) Sonda de microdiálise, (B) Esquema do transporte de moléculas que ocorre na membrana semipermeável da sonda de microdiálise (Plock and Kloft, 2005).

O tamanho de poro (cut off) varia entre 6 e 100 kDa e deve ser escolhido conforme a molécula que se deseja estudar. Membranas convencionais são construídas com tamanho de poro de 20 kDa e permitem a análise de moléculas menores como glicose e glutamato (Höcht et al., 2007).

As sondas podem ser inseridas no cérebro vertical ou transcerebralmente e podem ser encontradas sondas do tipo concêntricas (I-shaped), tipo loop ou U-shaped e as sondas transcerebrais. As sondas do tipo concêntricas (I-shaped), inseridas verticalmente, são normalmente as mais empregadas em estudos neuroquímicos (Höcht et al., 2007).

Geralmente utilizam-se membranas de sondas que variam de 1-4mm em estudos com animais, dependendo do local do cérebro onde será inserida a sonda. Em experimentos de microdiálise cerebral geralmente se trabalha com uma faixa de fluxo que varia de 0,5-3 uL/min e o intervalo de tempo de coleta entre as amostras é de 1-20min (Nandi et al., 2009).

As vantagens e desvantagens da técnica têm sido revisadas em vários trabalhos (Westerink et al., 1987; Benveniste, 1989; Westerink and Justice, 1991; Khan and Shuaib, 2001; Plock and Kloft, 2005). Entre algumas das vantagens da microdiálise é que esta técnica permite a implantação de uma ou mais sondas para analisar o analito em sítios específicos; mantém os fluidos biológicos; permite a coleta de diversas amostras em um período de tempo; os animais permanecem acordados durante o experimento; ainda o dialisado fica livre de proteínas, facilitando a etapa de análise. Entre as limitações, estão o risco de trauma e dano tecidual, alterações na barreira hematoencefálica; contaminação bacteriana, o tamanho da partícula do analito deve ser compatível com o poro da sonda e a necessidade de validar um método analítico.

Quantificação de neurotransmissores

Entre os primeiros métodos relatados para quantificar as monoaminas biogênicas e seus metabólitos podemos citar os ensaios radioenzimáticos e imunológicos. Devido aos avanços nesta área, também foram aprimorados os métodos cromatográficos de separação das monoaminas como a cromatografia líquida de alta

performance (HPLC) e a eletroforese capilar. Estes métodos analíticos podem ainda ser acoplados a uma variedade de detectores como ultravioleta (UV), fluorescência, eletroquímica (ECD) e espectrometria de massa (MS) (Bicker et al., 2013; Bidet et al., 2015).

Dentre estes métodos, a HPLC acoplada ao detector eletroquímico é considerada o método de escolha para as análises das monoaminas biogênicas e seus metabólitos, devido à sua maior sensibilidade e seletividade em comparação aos outros métodos analíticos. Além disso, a maioria das monoaminas biogênicas pode ser oxidada, as catecolaminas, por exemplo, geram espécies quinonas (Tsunoda, 2006). A dopamina e a noradrenalina são oxidadas nos grupos de anel hidroxil com a liberação de dois elétrons. Os detectores eletroquímicos medem a corrente associada à oxidação ou redução dos solutos na amostra de análise. As técnicas eletroquímicas envolvem a aplicação de um potencial elétrico promovendo a oxidação ou redução do composto próxima à superfície do eletrodo, seguido da medida da corrente produzida. Existem dois tipos de detectores eletroquímicos: amperométricos e os coulométricos. No amperométrico, a substância flui sobre o eletrodo e apenas uma porção da espécie eletroativa sofre o processo de oxidação ou redução, no coulométrico praticamente grande parte das espécies eletroativas sofrem o processo de oxidação ou redução, dessa forma, se adquirindo uma maior sensibilidade (Bicker et al., 2013).

Neuroinflamação e a fisiopatologia da depressão

Há uma rica literatura mostrando o envolvimento das citocinas bem como dos fatores inflamatórios e do estresse oxidativo na fisiopatologia das doenças neuropsiquiátricas como a depressão (Schiepers et al., 2004; Miller et al., 2009; Capuron and Miller, 2011). A síntese de citocinas ocorre ativada pelo estresse gerado externo ou internamente aliado à ativação do sistema nervoso simpático/catecolaminas. Assim, estas moléculas apresentam um papel central ao interagir com as vias relacionadas com a depleção de neurotransmissores (hipótese monoaminérgica), com a via neuroendócrina, plasticidade neural e a neurogênese,

resultando num complexo sistema interligado que origina a depressão, figura 4 (Jeon and Kim, 2016).

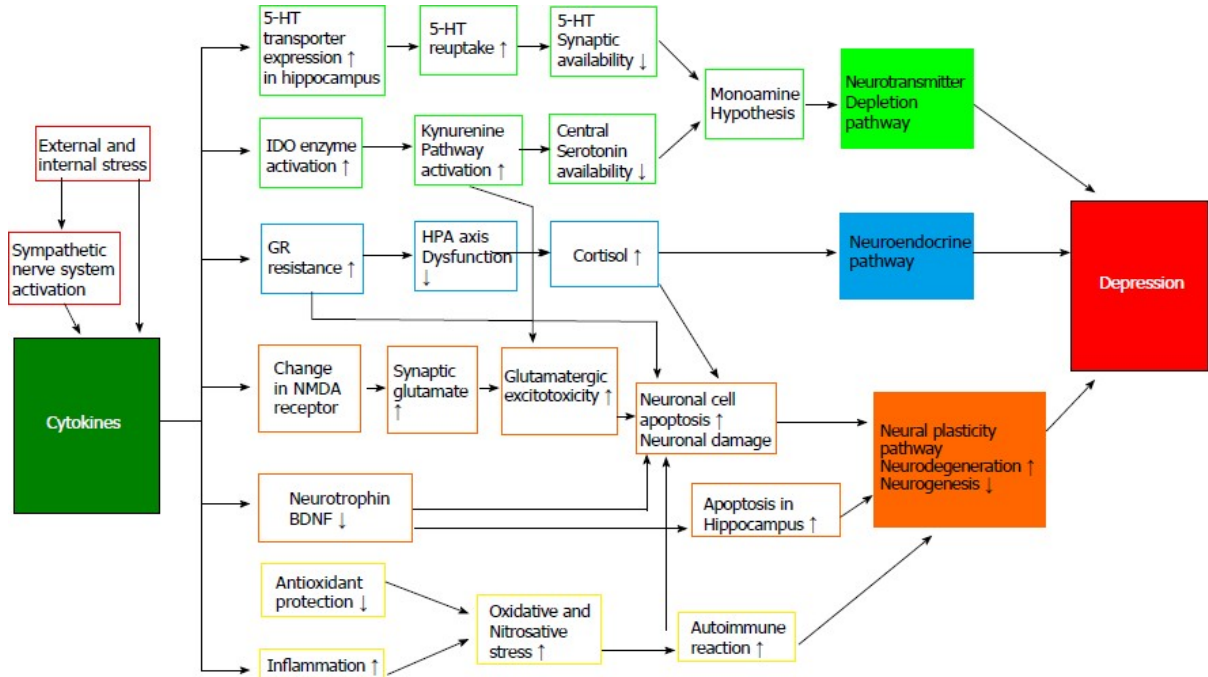


Figura 3. Esquema das vias relacionadas com a fisiopatologia da depressão. 5-HT: Serotonin; BDNF: Brain derived neurotrophic factor; GR: Glucocorticoid receptor; HPA: Hypothalamic-pituitary-adrenal; IDO: Indoleamine-2,3-dioxygenase; NMDA: N- methyl-Daspartate. Jeon and Kim, 2016.

Citocinas e depressão

As citocinas são proteínas (8–60 kDa) mensageiras que modulam e coordenam diferentes tipos celulares, inclusive as células do sistema imune (O’Brien et al., 2004). A hipótese do possível papel destas moléculas mensageiras na neurobiologia da depressão começou a ser evidenciada a partir da observação em estudos clínicos e experimentais (Dantzer e Capuron 2002; Dunn et al., 2005).

O SNC é constituído por uma sinalização imune elaborada, que varia conforme a idade e região cerebral (Galea et al., 2007). Células imunes fagocíticas (macrófagos), situados no plexo coróide e nas meninges cerebrais, bem como, células da micróglia e astrócitos, células do sistema imunológico residentes no SNC, apresentam um importante papel no controle da resposta imune inata (Dantzer, et al., 2008). Toda essa rede celular (células gliais e não neuronal) não somente produzem e liberam citocinas

e mediadores, mas expressam receptores de citocinas, amplificando toda essa resposta inflamatória central (Raison et al., 2006, Dantzer, et al., 2008).

A quantidade de citocina periférica produzida depende do estado de ativação imune. No processo inflamatório estão presentes as citocinas pró inflamatórias, incluindo, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) bem como, em menor quantidade as citocinas anti-inflamatórias IL-4, IL-10 e IL-13 (Schiepers et al., 2004).

A comunicação entre o cérebro e o sistema imune periférico pelas citocinas pró-inflamatórias ocorre por diferentes importantes vias: humoral, neural e a celular (Schiepers et al., 2004; Miller et al., 2009; Capuron and Miller, 2011). A via Humoral compreende a produção de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos e monócitos ativados que se difundem pelos órgãos circunventriculares e plexo coróide. No parênquima cerebral, também ocorre a liberação de segundos mensageiros tais como as prostaglandinas e óxido nítrico pela ativação das células endotélias. Na via Neural a produção das citocinas pró-inflamatórias por células fagocíticas ativadas estimula as fibras do neurônio aferente primário, no nervo vago, que transmite os sinais das citocinas para o núcleo do trato solitário e para o hipotálamo (Dantzer, 2008, Capuron and Miller, 2011). Na via Celular, descoberta mais recentemente, as citocinas pró-inflamatórias como TNF- α estimulam a produção da proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) pela micróglia a fim de recrutar monócitos para o cérebro (D'Mello et al., 2009, Capuron e Miller, 2011). Estas vias agem simultaneamente e dependem do local específico de ativação do sistema imune e da quantidade de citocinas circulantes no sangue (Schiepers et al., 2005). Em nível molecular, o fator de transcrição nuclear κ B (NF- κ B) nos macrófagos tem o relevante papel na expressão dos mediadores inflamatórios ativado por várias vias de transdução de sinais celulares, figura 5 (Nadjar et al., 2005).

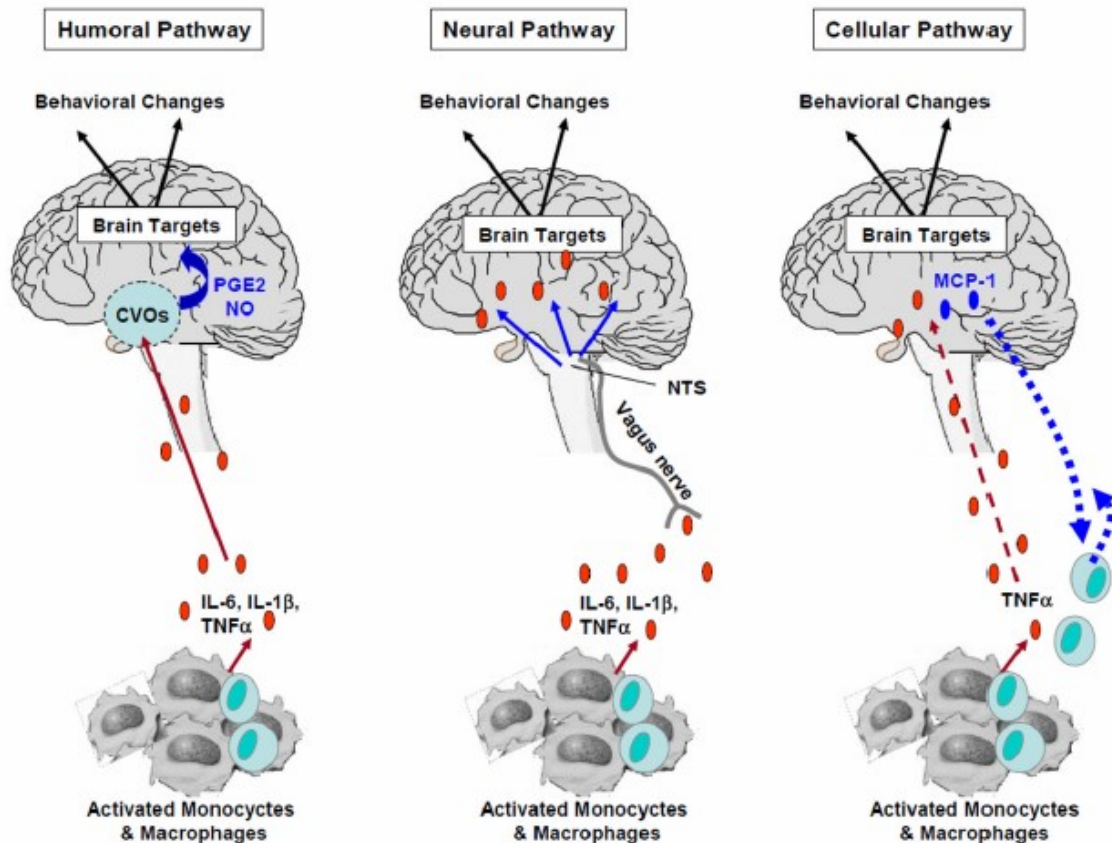


Figura 4. Esquema das vias de comunicação da periferia ao cérebro: humoral, neural e celular. CVOs: órgãos circunventriculares, PGE2: prostaglandinas, NO: óxido nítrico, NTS: núcleo do trato solitário, MCP-1: proteína quimiotática de monócitos. Adaptado de Capuron et al., 2011.

Citocinas e o Comportamento de doente

A produção de citocinas pró-inflamatórias no cérebro pode ser estimulada pela administração sistêmica de citocinas, pela exposição a estressores psicológicos, bem como a exposição ao lipopolissacarídeo (LPS) ou agentes infecciosos tais como *Salmonella typhi* e Bacille Calmette-Guerin (BCG) (Dantzer et al., 2008; Capuron and Miller, 2011).

O lipopolissacarídeo (LPS) é uma endotoxina derivada da membrana celular de bactérias gram-negativas. É considerado um importante indutor do sistema imune. A administração desta endotoxina, tanto central quanto periférica, é frequentemente utilizada em estudos que associam a depressão à neuroinflamação em modelos animais (Biesmans et al., 2013) e induz a expressão de IL-1 β , outros mRNAs de citocinas pró-inflamatórias e proteínas no cérebro (Dantzer et al., 2008). A indução da produção de

citocinas pró inflamatórias a partir dos macrófagos ocorre através da ligação do LPS a receptores específicos, conhecidos como Toll-like 4 (TLR4). Esses receptores são expressos em células mononucleares do sangue periférico, micróglia, astrócitos e neurônios. Em geral, TLR4 identificam padrões moleculares associado a patógenos (PAMPS) e induzem uma resposta imune inata através da ativação de NF- κ B e proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) (Tonelli et al., 2008).

Alguns estudos mostram que após a administração do LPS em animais o comportamento de doente se instala e normalmente atinge picos de 2-6 h pós tratamento e que 24 h pós administração do LPS os animais apresentam o comportamento do tipo deprimido, figura 6 (Frenois et al., 2007; Dantzer et al., 2008; O'connor et al., 2009).

O comportamento de doente é caracterizado principalmente por letargia, anedonia, anorexia, prejuízo cognitivo, sintomas estes similares aos ocorridos na depressão (Dantzer et al., 1999). No modelo animal, o comportamento do tipo deprimido é avaliado pela diminuição do consumo de sacarose, representado na condição de anedonia e aumento da imobilidade (ou desespero comportamental) observado no teste da natação forçada ou no teste de suspensão pela cauda sem que ocorra alteração da atividade locomotora (Dantzer et al., 2008; Capuron and Miller, 2011).

No entanto, outros estudos pré clínicos observaram o comportamento tipo deprimido no período anterior às 24 h (Yirmiya, 1996; Zhu et al., 2010) e outros relataram ainda sinais do comportamento de doente no período de 24h pós administração do LPS (Godbout et al., 2005; Godbout et al., 2008).

Neste contexto, é importante salientar que os estudos com animais que utilizam o LPS como indutor do sistema imune para obtenção do comportamento do tipo deprimido frequentemente apresentam diferenças em relação à dose e o sorotipo de LPS utilizados, período, via de administração e principalmente em relação ao desenho experimental elaborado, muitas vezes dificultando o entendimento de alterações tempo- dose dependente nas análises comportamentais e no processo neuroinflamatório.

Segundo Dantzer et al., (2008) o modelo animal utilizado com o propósito de elucidar o papel das citocinas na fisiopatologia da depressão deve ter a capacidade de mostrar especificadamente o comportamento do tipo deprimido em animais estimulado pelo sistema imune (validade de face) e que estas alterações comportamentais são revertidas com tratamento antidepressivo efetivo na clínica (validade preditiva).

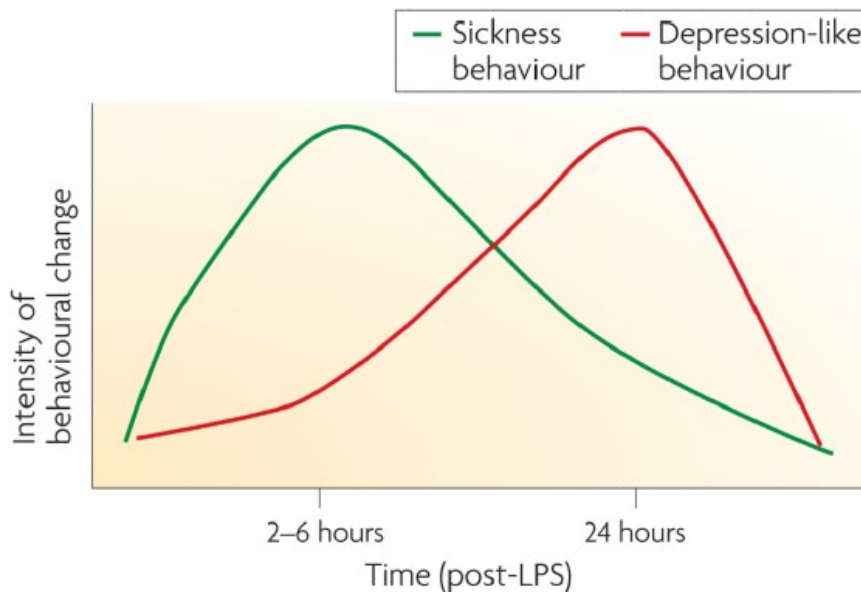


Figura 5. Comportamento de doente e comportamento tipo deprimido em camundongos induzidos por endotoxina em roedores. Adaptado de Dantzer et al., (2008).

Possíveis mecanismos ocorridos na depressão induzidos pelas citocinas

Há evidências que as citocinas contribuam para o desenvolvimento da depressão através da interação com importantes vias de sinalização relacionadas ao metabolismo neurotransmissor, função neuroendócrina e plasticidade neural (Raison et al., 2006, Dantzer et al., 2008).

Efeito das citocinas no metabolismo dos neurotransmissores

As citocinas interferon- γ (IFN- γ) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α) podem ativar a enzima Indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO) por meio da estimulação de

algumas vias de comunicação celular, tais como transdutor de sinal e ativador de transcrição 1a (STAT 1-a), fator regulador de interferon (IRF)-1, NF-kB e p38, uma proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) (Capuron et al., 2011, Miller et al., 2009).

AIDO está presente em células endoteliais cerebrais, macrófagos perivascularres, astrócitos e microglia (Liu et al., 2015). Esta enzima é responsável pela degradação do triptofano em quinurenina (KYN). Reduzidas concentrações de triptofano podem influenciar a neurotransmissão serotoninérgica, visto que este aminoácido essencial é precursor da síntese de serotonina (Dantzer et al., 2008).

KYN é degradado em 3-hidroxiquinurenina (3-HK) e ácido quinolínico (QA) ou ácido cinurênico (KA) por duas vias catabólicas distintas. 3-HK gera espécies reativas de oxigênio (ROS) que está envolvido na rota do estresse oxidativo, QA é um agonista do receptor de N-metil-D-aspartato (NMDA) e KA é um antagonista do receptor NMDA, que parece exercer atividade neuroprotetora. Desta forma, é conhecida a importância do papel glutamatérgico (receptor NMDA) na depressão (Sanacora et al., 2004) e um desequilíbrio nos metabólitos da via da KYN pode contribuir para a etiogênese da depressão associada à inflamação, figura 7 (Dantzer et al., 2008).

A atividade enzimática da IDO é aumentada em estados de ativação aguda ou crônica do sistema imune, como por exemplo, através do tratamento dos pacientes com imunoterapia ou mesmo em condição de doenças crônicas como aterosclerose e doença cardíaca coronária. Em modelo experimental com camundongos, a ativação do receptor TLR4 por LPS ou inoculação do BCG induz um aumento nos níveis da citocina INF γ e consequentemente ativação da IDO, eventos esses relacionados com o desenvolvimento do comportamento tipo depressivo (Lestage et al., 2002, Moreau et al., 2005). O bloqueio da IDO, através da inibição da expressão de citocinas com o anti-inflamatório minociclina (derivado de tetraciclina) ou até mesmo pela inibição da referida enzima com o 1-metiltryptofano (1-MT) (inibidor competitivo da IDO), impediu o desenvolvimento do comportamento tipo depressivo induzido por LPS (O'Connor et al., 2009). Além disso, Liu e colaboradores (2015) mostraram que o tratamento com minociclina, infliximab (anticorpo monoclonal contra TNF α) ou 1-

MT também impediram o desenvolvimento do comportamento tipo deprimido em camundongos expostos ao estresse crônico moderado imprevisível.

Ainda, pode-se observar que o fator disponibilidade de triptofano e a estimulação da IDO não necessariamente induzem o comportamento tipo depressivo através da deficiência de serotonina. Um aumento na produção de ácido quinolínico (agonista glutamatérgico) através da aumentada atividade da IDO, na via quinurenina, influencia tanto a neurotransmissão glutamatérgica quanto a neurotransmissão serotoninérgica. Um estudo mostrou que o comportamento tipo depressivo induzido por LPS em camundongos foi mediado pela ativação do receptor NMDA, provavelmente como consequência da formação de ácido quinolínico e que o tratamento com cetamina (inibidor do receptor NMDA) foi efetivo em inibir o desenvolvimento deste déficit comportamental (Walker et al., 2013). Desta forma, pode-se inferir que o desenvolvimento da depressão pode estar interligado com a aumentada atividade da IDO e seus metabólitos resultado da alteração da neurotransmissão serotoninérgica e glutamatérgica (Miller and Schwars, 2007).

Além disso, as citocinas e suas vias de sinalização podem afetar a síntese, recaptação e liberação das monoaminas cerebrais e estes efeitos nas células podem ocorrer por meio das vias de sinalização de proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK). Como exemplo, p38 e quinases reguladas por sinais extracelulares (ERK1/2), são responsáveis pela regulação de importantes atividades celulares, como proliferação, expressão gênica e apoptose e podem aumentar a atividade de transportadores de membrana para a serotonina, dopamina e noradrenalina. Zhu et al., (2006) mostrou que as citocinas IL-1 e TNF- α podem aumentar a expressão e atividade neuronal do transportador de serotonina (SERT) e assim aumentar a recaptação deste neurotransmissor em sinaptossomas de cérebro de rato através da via de sinalização p38 MAPK. Foi demonstrado também que a ativação da via p38 em células mononucleares de sangue periférico foi associada a concentrações reduzidas do metabólito de serotonina, 5- ácido hidroxindoleacético (5-HIAA no fluido cerebrospinal de macacas *rhesus* juvenil, que foram matematicamente abusadas e tiveram elevada rejeição na infância, (exposição ao estresse) (Sanchez et al., 2007). Assim, estes dados sugerem que as citocinas auxiliadas por outras vias de sinalização

celular (MAPK) podem influenciar no metabolismo das monoaminas cerebrais contribuindo para uma reduzida disponibilidade destas amins biogênicas na fenda sináptica.

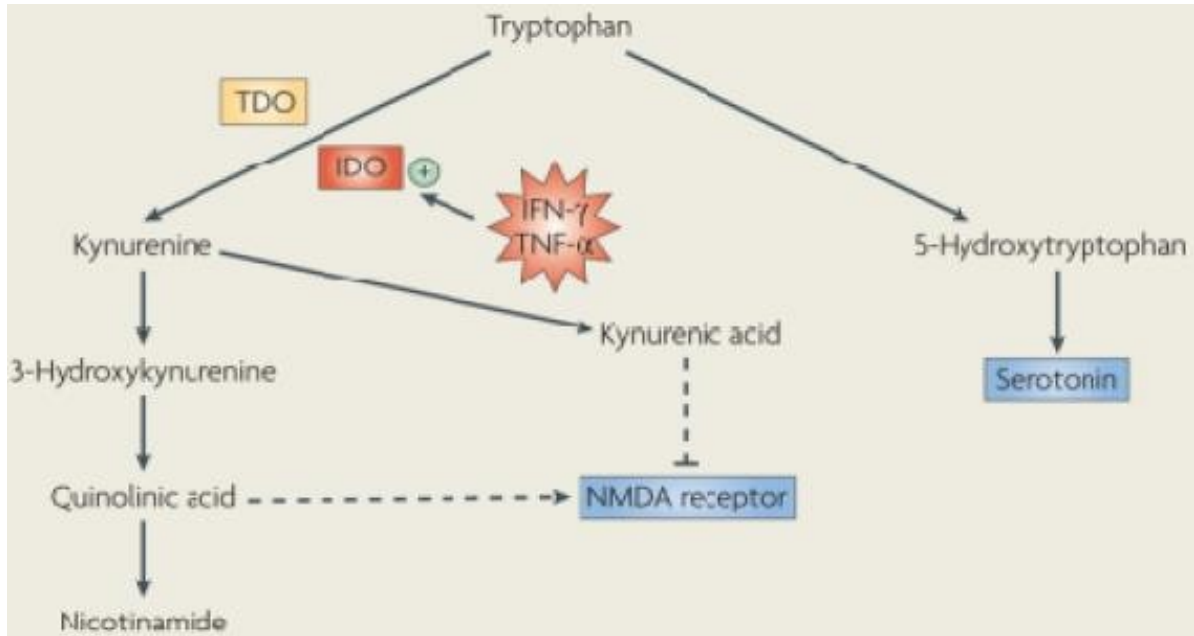


Figura 6. Via da quinurenina: Degradação do triptofano. TDO: triptofano dioxigenase. IDO: indoleamina 2,3 dioxigenase NMDA receptor: receptor N-metil-D-aspartato. Adaptado de Dantzer et al., 2008.

Efeitos das citocinas na função neuroendócrina

A ativação das citocinas pode exercer profundos efeitos estimulatórios nos hormônios do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), consistente com a patofisiologia da depressão (Doczy et al., 2009). Estes efeitos são mediados por uma rede de sinalização de citocinas e de seus receptores localizados nos tecidos do eixo HPA (Silverman et al., 2005).

Foi relatado que as citocinas, quando administradas de forma aguda, estimularam a expressão e liberação do hormônio liberador de corticotrofina (CRF), do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), bem como do hormônio cortisol, todos encontrados elevados em pacientes diagnosticados com depressão (Pariante and Miller, 2001). No entanto, outros estudos demonstraram que a administração crônica de citocinas (IFN α) ou a ativação imune crônica em pacientes ou em experimentos com animais não foi associada a alteração da resposta aos hormônios no eixo HPA (Wichers et al., 2007, Capuron et al., 2003b).

As citocinas parecem exercer seus efeitos na regulação do *feedback* negativo do eixo HPA (Pace and Miller, 2009). Um mecanismo pelo qual estas proteínas podem modular a função do eixo HPA é exercendo efeitos inibitórios no receptor para glicocorticóide (GR). Desta forma, por meio de outras moléculas de sinalização inflamatória tais como, NF-kB, p38 MAPK e STAT5, as citocinas podem reduzir a função do GR, impedindo a translocação do mesmo do citoplasma para o núcleo ou através de interações proteína-proteína nuclear inibindo assim a ligação do GR-DNA. Ainda, as citocinas podem influenciar na expressão do GR, promovendo uma diminuição do GR α , que representa a forma ativa e aumentando o GR β , que representa a forma inerte do GR (Pace et al., 2007).

A resistência dos glicocorticóides manifestada por elevada concentração de cortisol, foi observada em estudos completados por testes da função neuroendócrina, que avaliaram a supressão de ACTH e de corticosteróides pelo glicocorticóide sintético dexametasona (DEX), como o teste de supressão da dexametasona (TSD) e o teste de estimulação do CRH (teste DEX/CRH), mais sensível para detectar a desregulação do eixo HPA. Através destes testes observou-se uma elevada concentração de cortisol, descrita em pacientes com depressão bem como uma diminuída inibição mediada por glicocorticóide das respostas imune *in vitro* (Pariante and Miller, 2001).

Assim, as citocinas, interagindo com importantes vias de sinalização celular, exibem a capacidade de modular a função do eixo HPA, que resulta na alteração da secreção dos glicocorticóides bem como da função dos GR, efeitos relevantes implicados no desenvolvimento da depressão (Capuron and Miller, 2011).

Efeitos das citocinas na plasticidade neural

Em condições fisiológicas, as citocinas como IL-1 e TNF- α tem a capacidade de providenciar suporte trófico aos neurônios, favorecendo a neurogênese e contribuindo para a função cognitiva (Bernadino et al., 2008, Goshen et al., 2007). No entanto, a excessiva produção de citocinas, mobilizadas através da ativação do sistema imune inato periférico por meio do estresse agudo ou crônico leva a uma redução na

neurogênese em áreas cerebrais vinculadas ao comportamento e cognição (Calabrese et al., 2014).

Os efeitos das citocinas e mediadores neuroinflamatórios induzidos pela inflamação podem também afetar elementos das células gliais através do aumento da liberação de glutamato, diminuição dos seus transportadores e consequente diminuição da sua recaptação (Tilleux and Hermans, 2007). Mecanismo este manifestado pela excitotoxicidade celular e diminuída produção de fatores tróficos como o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (Haydon and Carmignoto, 2006). Ainda, astrócitos e células da microglia, induzidos por IL-1 e TNF α , podem liberar espécies reativas de oxigênio (ROS) que em combinação com ácido quinolínico pode induzir o estresse oxidativo, prejudicando neurônios e oligodendrócitos (Ida et al., 2008, Buntinx et al., 2004).

Foram detectadas, por ressonância magnética, alterações estruturais e volumétricas no cérebro de pacientes depressivos em regiões como o hipocampo, amígdala, cortex prefrontal, cíngulo anterior e gânglio basal. Acredita-se que a perda seletiva e persistente do volume hipocampal não seja unicamente devido a morte neuronal, mas influenciada pela redução na neurogênese (Campbell and MacQueen, 2006, Sapolsky, 2004). A administração periférica de LPS, em um modelo animal de neuroinflamação, promoveu o aumento de IL-1 e TNF- α no hipocampo e causou prejuízo cognitivo e diminuição na neurogênese associado a redução da expressão do BDNF, importante proteína envolvida com a neuroplasticidade, e do seu receptor, tirosina quinase-B (TrkB) (Wu et al., 2007). Em contrapartida, outros estudos têm mostrado que as alterações comportamentais, efeitos na cognição e na neurogênese, ações mediadas pelas citocinas no Sistema Nervoso Central (SNC), podem ser bloqueadas pela administração do antagonista do receptor de IL-1 (IL-1ra) ou através do transplante de células secretoras de precursores neurais do IL-1ra ou de experimentos com camundongos *knockout* para a IL-1 (Koo and Duman, 2008, Goshen et al., 2008, Ben Menachem-Zidon et al., 2008).

Neste processo, há evidência *in vitro*, que os efeitos neurogênicos a partir da IL-1 ocorrem via ativação da via de sinalização NF-kB (Koo and Duman, 2008). Outro importante estudo *in vivo*, mostrou que elevados níveis de IL-1 e seus efeitos no

cérebro estão relacionados com a ativação adrenocortical e consequente liberação de glicocorticóide (Goshen et al., 2008).

Citocinas e antidepressivos

Alguns estudos têm relatado que os antidepressivos produzem efeitos imunomodulatórios direcionados principalmente a respostas inflamatórias com a imunidade celular mediada por monócitos e linfócitos T (Maes, 2011). Ensaio *in vitro* mostraram que alguns antidepressivos apresentaram efeitos antiinflamatórios, como por exemplo, a paroxetina e a sertralina, inibidores seletivos da recaptção de serotonina (SSRIs), inibiram a ativação microglial induzida por interferon- γ (IFN γ) em uma linhagem microglial murina (Horikawa et al., 2010). Liu et al., (2011), mostraram que a fluoxetina, outro SSRI, inibiu o aumento de TNF α , IL-6 e NO induzidos por LPS na micróglia e os efeitos anti-inflamatórios deste antidepressivo foram mediados pela inibição da fosforilação de p38 MAPK e da ativação de NF κ B.

Outras evidências pré-clínicas mostraram que os antidepressivos tricíclicos (TCA), SSRIs, inibidores da monoamino oxidase A, inibidores seletivos da recaptção de noradrenalina (SNRIs) e antidepressivos atípicos suprimiram a produção de IFN- γ e aumentaram os níveis de IL-10 (Maes et al., 1999, Kubera et al., 2001, Kenis and Maes, 2002, Diamond et al., 2006). IFN- γ , é uma citocina pró-inflamatória produzida por linfócito Th1ativado e envolvida com os episódios depressivos. A IL-10, produzida por linfócito Th2 e monócitos, tem ação anti-inflamatória e imunossupressora exercida por meio da supressão de IFN- γ e outras citocinas pró-inflamatórias. Logo, a razão entre IFN- γ e IL-10 produzida por imunócitos é relevante na determinação da capacidade de ativação ou inibição das funções monocíticas e linfocíticas provavelmente exercida pelo tratamento antidepressivo (Maes et al., 2010, Kubera et al., 2001).

Alguns trabalhos avaliaram os efeitos dos antidepressivos mediados via ação direta nas células imunes. Seidel et al. (1995), mostrou que os antidepressivos reduziram a produção estimulada de interferon gama (IFN γ) que inicialmente era elevada em 6 semanas de tratamento. Os antidepressivos tricíclicos tais como,

imipramina, clomipramina e citalopram também inibiram a liberação de $\text{IFN}\gamma$ e IL-2 em linfócitos T humanos (Xia et al., 1996).

Na década de 90, grande parte dos estudos com modelo animal de neuroinflamação, concluíram que o (pré) tratamento crônico com TCAs (imipramina e desipramina) reduziu a produção das citocinas $\text{TNF}\alpha$ e IL- 1β e aumentaram os níveis de IL-10 (Kenis e Maes, 2002). Como exemplo, Yirmiya et al., (1996) mostraram que o tratamento crônico, mas não o agudo, com imipramina atenuou a ativação inflamatória e o comportamento do tipo depressivo induzido por LPS em ratos. Além disso, não se tinha muito conhecimento dos efeitos dos SSRI em relação às citocinas nos distúrbios depressivos. Atualmente, outros estudos têm mostrado que os SSRIs são mais efetivos que as outras classes de antidepressivos clássicos na redução dos mediadores pró inflamatórios nos casos de depressão (Vogelzang et al., 2012, Ohgi et al., 2013). Ohgi et al., (2013) reportaram que o pré tratamento com os SSRIs e os SNRIs reduziu os níveis séricos da citocina pró-inflamatória $\text{TNF}\alpha$ e aumentou os níveis da IL-10 em camundongos induzidos por LPS. No entanto, foi observado que o efeito antiinflamatório dos SNRIs foi menos potente que o dos SSRIs.

Alguns estudos clínicos mostraram que os antidepressivos reduziram a função imune e a secreção de citocinas. Por exemplo, os níveis elevados de IL-6, durante a depressão aguda, foram normalizados em oito semanas de tratamento com fluoxetina (inibidor seletivo da recaptação de serotonina) (Sluzewska et al. 1995). Maes et al., (1997), também encontrou elevada contagem de leucócitos e neutrófilos em pacientes com depressão que foi reduzida com tratamento antidepressivo, bem como, mostrou em outro trabalho que os antidepressivos suprimiram os níveis plasmáticos elevados de proteínas de fase aguda, incluindo haptoglobina, fibrinogênio e alfa-antitripsina (Maes et al., 1997).

Por outro lado, Kubera et al. (2004) relatou que os tratamentos com imipramina, venlafaxina (inibidor da recaptação de serotonina e noradrenalina- SNRI), 5-hidroxitriptofano (5HTP) (precursor de serotonina) e a combinação de 5HTP e fluoxetina aumentaram a liberação de IL-6 pela estimulação das células mononucleares de sangue periférico em pacientes com episódio depressivo. Recentemente, uma meta- análise mostrou que, em geral, o tratamento antidepressivo

reduziu os níveis de IL-1 β e, possivelmente, os níveis de IL-6, mas não houve efeito sob os níveis séricos de TNF α dos pacientes. Dentre as classes de antidepressivos analisadas neste estudo: SSRIs; SNRIs e TCA, a análise estratificada sugeriu um possível efeito dos SSRIs nos níveis de IL-6 e TNF α (Hannestad et al., 2011).

Outros pesquisadores também analisaram a eficácia clínica de antidepressivos combinado a agentes anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) no tratamento da depressão. A cascata do ácido araquidônico tem um relevante papel na resposta inflamatória (Guo et al., 2009). O ácido araquidônico pode ser oxidado através da via da enzima cicloxigenase (COX) em prostaglandina G₂ (PGG₂) que por sua vez é convertido em prostaglandina H₂ (PGH₂), resultando em prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos. Há duas isoenzimas da COX: COX-1 que é constitutiva dos tecidos e a COX-2 cuja expressão é induzível por mediadores ou indutores pró-inflamatórios tais como a IL-1 e o LPS em macrófagos (Herschman, 1996).

Há evidência que o ácido acetilsalicílico, inibidor da COX-1, também apresenta interação com os sistemas neuronais serotoninérgicos e catecolaminérgicos centrais. Dados pré clínicos de um modelo animal de depressão mostraram um potencial efeito acelerador do ácido acetilsalicílico em combinação com a fluoxetina (Brunello et al., 2006). Baseado nestes achados, este grupo mostrou que, em um estudo clínico piloto o tratamento adjuvante de ácido acetilsalicílico com fluoxetina aumentou as taxas de remissão em pacientes que não respondiam à monoterapia com fluoxetina (Mendlewicz et al., 2006).

A COX-2 está envolvida nos processos patológicos e doenças neurodegenerativas. Alguns estudos têm encontrado a expressão desta enzima aumentada nos distúrbios do humor como a depressão (Galecki et al., 2012). Entre os inibidores da COX-2 mais utilizados nos estudos clínicos e pré clínicos vinculados com esta patologia, destacam-se o rofecoxibe e principalmente o celecoxibe (Müller and Schwarz, 2008, Akhondzadeh et al., 2009).

O tratamento crônico com celecoxibe reverteu o comportamento do tipo depressivo induzido pelo estresse crônico imprevisível através da redução da COX-2 no cérebro de rato (Guo et al., 2009). Muller et al. (2006), mostraram num estudo clínico que o tratamento com celecoxibe propiciou significantes efeitos positivos na

ação terapêutica da reboxetina (inibidor da recaptação de noradrenalina) nos sintomas depressivos. Outro estudo clínico reportou que o tratamento com fluoxetina + celecoxibe mostrou uma significativa superioridade em relação à terapia com fluoxetina isolada no que concerne aos sintomas da depressão (Akhondzadeh et al., 2009).

Há vários mecanismos de ação sugeridos para os efeitos antidepressivos dos inibidores da COX-2, particularmente: capacidade de reduzir os níveis das citocinas pró- inflamatórias, tais como IL-1 β e TNF- α , previnem a desregulação do eixo HPA e conseqüentemente do aumento do hormônio cortisol e apresentam envolvimento com o sistema serotoninérgico através de mecanismos imunológicos no SNC (Müller and Schwarz, 2008).

Dessa forma, muitos autores acreditam que a terapia adjuvante dos antidepressivos aliado principalmente aos inibidores de COX2, pode beneficiar os pacientes em relação a redução dos sintomas e na diminuição da remissão do tratamento, no entanto, mais estudos devem ser realizados a fim de avaliar alguns preocupantes e incômodos efeitos adversos dos antiinflamatórios como problemas cardiovasculares e estomacais (Akhondzadeh et al., 2009).

Estresse oxidativo

A formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), bem como das espécies reativas de nitrogênio (RNS) é resultado de processos fisiológicos que ocorrem durante o metabolismo aeróbico (Dringen, 2000; Valko et al., 2007; Michel et al., 2012). Elevada concentração de ROS está implicada na ocorrência de doenças cardiovasculares, autoimunes, câncer e na fisiopatogênese de distúrbios neuropsiquiátricos, incluindo a depressão (Khanzode et al., 2007).

Existe um sistema antioxidante sincronizado expresso na periferia e no cérebro com a função de remover estes ROS e RNS ou de impedir sua transformação em produtos mais tóxicos para as células (Galecki et al., 2009). Como exemplo de antioxidantes não enzimáticos, em sua maioria exógenos, encontramos o ácido ascórbico (vitamina C), tocoferol (vitamina E), glutatona reduzida (GSH),

carotenóides e flavonóides. Importantes antioxidantes enzimáticos como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPX) estão envolvidos com reações de neutralização de peróxidos e superóxidos (Floyed et al., 2002; Valko et al., 2007; Ng et al., 2008).

O estresse oxidativo é caracterizado pela produção aumentada de ROS e RNS, uma deficitária defesa antioxidante ou falha do reparo oxidativo. Esse desequilíbrio oxidativo pode tornar-se prejudicial aos lipídeos, proteínas, ácidos nucléicos e outras estruturas celulares que eventualmente resultam em morte e apoptose celular (Valko et al., 2007; Maes et al., 2011).

Há uma crescente evidência de trabalhos que mostram a relação dos mecanismos de sinalização celular do estresse oxidativo através de marcadores oxidativos com a depressão. Estudos relataram níveis plasmáticos elevados de peróxidos e xantina oxidase, uma importante enzima pró oxidante (Herken et al., 2007); níveis elevados de produtos da peroxidação lipídica (Mazereeuw et al., 2015, Bilici et al., 2001; Khanzode et al., 2003; Ozcan et al., 2004; Sarandol et al., 2007b; Gałeckki et al., 2009a,b), níveis plasmáticos elevados e/ou de urina de 8- F2 iso-prostaglandina, um produto bioativo de radicais livres catalisado pela peroxidação de ácido araquidônico (Dimopoulos et al., 2008) ou de 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina [8-OHdG], abundante no DNA e mutagênico (Forlenza and Miller, 2006; Maes et al., 2009a). Bem como uma diminuição no sistema antioxidante da vitamina E (Maes et al., 2000b; Owen et al., 2005; Tsuboi et al., 2006); coenzima Q10 (Maes et al., 2009b); glutathione reduzida (GSH) (Kodydkova et al., 2009) e GPX (Kodydkova et al., 2009; Ozcan et al., 2004). Em contrapartida resultados controversos foram relatados em relação aos níveis das enzimas antioxidantes como da superóxido dismutase (SOD).

Evidência do estresse oxidativo na depressão

O cérebro é particularmente considerado um órgão vulnerável ao perigo oxidativo, pois apresenta um grande consumo de oxigênio e, portanto, gera radicais livres como produto. É formado por uma rica constituição lipídica, catecolaminas e monoaminas, considerados substratos alvo para oxidação. Aliado a uma modesta

defesa antioxidante e a presença de metais redox-ativos como o ferro e o cobre (Sarandol et al., 2007; Valko et al., 2007, Ng et al., 2008).

Várias estruturas cerebrais são afetadas pela exposição ao estresse crônico tais como o hipotálamo, córtex frontal e hipocampo (McEwen, 2005; Pacak and Palkovits, 2001). Alguns estudos relacionam a perda do volume hipocampal com a depressão e com as vias do estresse oxidativo, resultando em morte neuronal (Lee et al., 2002; Sapolsky, 2000; Eren and Kati, 2004).

O hipocampo tem um papel essencial no aprendizado, memória e regulação neuroendócrina. O hipocampo é um dos órgãos cerebrais mais vulnerável à perda celular e passível de alterações neuronais devido ao estresse, hipóxia-isquemia e hipoglicemia. A maioria das sinapses no hipocampo é mediada pelo neurotransmissor excitatório glutamato. Durante o processo de aprendizado, ocorre a liberação de glutamato pelos terminais pré-sinápticos causando a ativação de NMDA, e conseqüentemente, mobilização de cálcio citosólico. O influxo de cálcio ocorre no neurônio diretamente pelos canais iônicos quimicamente acionados, através dos canais de cálcio dependente de voltagem bem como pela liberação de organelas intracelulares (Lee et al., 2002).

O funcionamento deste processo é vital para funções cognitivas no cérebro. Porém, insultos neurológicos (citados anteriormente como estresse), promovem um excesso de glutamato na sinapse e geram um acúmulo de cálcio intracelular, desencadeando um aumento na produção de ROS pelas mitocôndrias, resultando na degradação do citoesqueleto e morte celular por apoptose (Lee et al., 2002; Sapolsky, 2000). Assim, esse excesso de glutamato pode estimular a produção intracelular de radicais superóxido, através da prolongada estimulação dos neurônios (Galecki et al., 2009).

Outro mecanismo considerado fonte de ROS na depressão é o aumentado metabolismo das monoaminas. As monoaminas agem como antioxidantes endógenos, ou seja, são importantes “*scavengers*” dos radicais hidroxila e superóxido, além disso, inibem a peroxidação lipídica e agem como quelante do íon ferro (Khanzode et al., 2003.).

Dessa forma, o excesso de glutamato na fenda sináptica e a ausência das monoaminas levam a uma superprodução de ROS e conseqüentemente destruição da integridade neuronal, induzido pelo dano ao DNA ou pela peroxidação lipídica da membrana celular. A peroxidação lipídica é o processo em que as ROS atacam os ácidos graxos polinsaturados dos fosfolípidos da membrana celular, desintegrando-a e permitindo a entrada dessas espécies nas estruturas intracelulares (Michel et al., 2012; Galecki et al., 2009). Alterações na fluidez da membrana podem influenciar na função das aminas biogênicas e dos receptores catecolinérgicos (Luca et al., 2009; Eren et al., 2007).

Neste contexto, tem sido relatado que os produtos gerados a partir da peroxidação lipídica são reconhecidos pela imunidade inata e assim dessa forma promovem respostas inflamatórias (Bakunina et al., 2015; Grases et al., 2014). Estes produtos são epítopos específicos da oxidação conhecidos como 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE) e o malondialdeído (MDA), moléculas altamente citotóxicas e mutagênicas (Bakunina et al., 2015). Estas moléculas são consideradas marcadores indiretos do estresse oxidativo em humanos e elevados níveis plasmáticos têm sido relatados em pacientes com distúrbio depressivo (Bakunina et al., 2015; Sarandol et al., 2007b; Khanzode et al., 2003; Bilici et al., 2001).

Outros achados corroboram com a presença aumentada dos produtos da peroxidação lipídica na depressão. O produto bioativo, 8-iso-prostaglandina F₂α (8-iso-PGF₂α), é produzido durante a peroxidação do ácido araquidônico. Um estudo relatou que pacientes idosos com depressão mostraram níveis plasmáticos mais elevados de 8-iso-PGF₂α em relação aos controles saudáveis (Dimopoulos et al. 2008). Além disso, níveis plasmáticos elevados deste composto foram significativamente relacionados com a severidade da depressão (Michel et al., 2012; Maes et al., 2011).

Em condições fisiológicas ROS e RNS atacam o núcleo e o DNA mitocondrial, causando lesões mutagênicas no DNA. Uma destas lesões é o composto final da hidroxilação da guanina, 8-hidroxideoxiguanosina [8-OHdG]. As lesões no DNA são removidas por vias de reparo da base de excisão. Entretanto, alguns mecanismos oxidativos podem influenciar neste processo como as vias mediadas pelo NO-tirosina, nitrotirosina e MDA, inibindo assim a atividade das vias de reparo da base de

excisão e podendo potencializar a mutagênese e perigo ao DNA. Estudos mostraram que 8-OHdG urinário é amplamente usado como biomarcador de estresse oxidativo (Valavanidis et al., 2009). Pacientes depressivos apresentaram níveis significativamente mais elevados de 8-OHdG em leucócitos periféricos do que os pacientes controle (Irie et al., 2005). Níveis aumentados de 8-OHdG foram encontrados em pacientes com episódios depressivos recorrentes (Forlenza and Miller, 2006). Maes et al. (2009b) mostrou que a excreção urinária do biomarcador 8-OHdG foi significativamente maior em pacientes diagnosticados depressivos com fadiga crônica quanto comparado aos controles.

No que concernem as enzimas, há evidências que a expressão, atividade e concentração das enzimas antioxidantes no sangue, fluido e diferentes regiões cerebrais de pacientes com depressão podem apresentar-se com níveis alterados (Michel et al., 2012).

A superóxido dismutase (SOD), existe em várias isoformas associada a cofatores como cobre e zinco (Cu/Zn-SOD) ou manganês (Mn-SOD). Esta enzima catalisa a dismutação do superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio. A Cu/Zn-SOD está localizada principalmente em células da glia e a Mn-SOD em neurónios e eritrócitos (Michel et al., 2012).

A SOD é uma enzima biologicamente importante que protege a célula das reações perigosas do ânion superóxido (Maes et al., 2011). Outra importante função da SOD é impedir a oxidação de cadeia das monoaminas cerebrais e seus metabólitos, através de radicais livres, possibilitando que estas moléculas exerçam seu papel antioxidante (Khanzode et al., 2003). Estudos clínicos em depressão mostraram resultados controversos desta enzima (Maes et al., 2011).

Selek et al., (2008) e Herken et al. (2007) reportaram diminuídos níveis da SOD em pacientes deprimidos. Em contrapartida, Khanzode et al., (2003) e Sarandol et al. (2007), encontraram uma atividade da enzima significativamente elevada em pacientes com episódios depressivos. Durante o período de fase aguda da depressão pacientes apresentaram níveis significativamente mais elevados da SOD e da CAT em relação aos pacientes controles (Galecki et al., 2009).

A catalase é uma enzima intracelular que catalisa a reação de peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. A CAT está envolvida nos processos de sinalização na proliferação celular, apoptose, metabolismo de carboidrato e ativação plaquetária. Os poucos estudos que avaliaram a atividade desta enzima antioxidante na depressão observaram seus níveis elevados (Maes et al., 2011). Gałeczki et al., (2009a) encontraram níveis elevados da atividade da catalase durante episódios agudos da doença em comparação com voluntários saudáveis. Szuster-Ciesielska et al., (2008) também detectou aumento da atividade sérica da enzima em pacientes com depressão.

A glutathione peroxidase catalisa a redução de hidroperóxidos orgânicos e inorgânicos (H_2O_2) pela glutathione reduzida para formar glutathione oxidada (GSSG) e água (ou alcoóis). A molécula de GPx é um tetrâmero, geralmente atua associada ao átomo de selênio, mas pode exercer sua ação independente do mesmo. A família GPx compreende diferentes isoformas (Maes et al., 2011). Entre elas, a GPx1 está localizada principalmente nas células gliais e é considerado que a atividade desta enzima é dez vezes maior nas células neuronais (Gandhi et al., 2012). A literatura mostra alguns resultados controversos da atividade da GPx na depressão. Ozcan et al. (2004) reportou que a atividade da enzima foi reduzida em pacientes acometidos por este distúrbio do humor comparados aos pacientes controle. Kodydkova et al. (2009) mostrou em seu estudo que mulheres depressivas apresentaram uma menor atividade da GPx. Maes et al. (2010b) demonstrou que a atividade da GPx foi significativamente menor nos pacientes depressivos quando comparados aos controles. Correlações negativas foram encontradas entre a ação da enzima e a severidade da depressão. Isto se deve, pois uma menor atividade da enzima reflete num prejuízo na defesa antioxidante e conseqüentemente num dano as membranas de ácido graxo e proteínas funcionais e perigo neurotóxico. Em contrapartida, Srivastava et al. (2002) não encontrou diferença significativa na ação da enzima em células mononucleares.

A glutathione reduzida é um antioxidante não enzimático que tem sido mensurado em pacientes depressivos (Maes et al., 2011). A formação da GSH ocorre no fígado a partir de três aminoácidos: glicina, glutamina e cisteína. É o principal antioxidante encontrado no Sistema Nervoso Central, presente em concentrações milimolares no cérebro (Gandhi et al., 2012; Gibson et al., 2012). Entre suas

importantes funções, podemos considerá-la como: um potente antioxidante que protege as células dos radicais livres, recicla as vitaminas C e E, é usada como fonte de energia para a linfoproliferação e é considerada um purificador natural do organismo (Maes et al., 2011). Kaodyková et al. (2009) encontrou diminuída concentração de GSH sanguínea em mulheres depressivas. Em 1934, foi documentada a redução da concentração de GSH sanguínea em doenças neuropsiquiátricas (Maes et al., 2011).

Antidepressivos no estresse oxidativo

Há resultados controversos em relação ao papel oxidativo dos antidepressivos na depressão. Alguns poucos estudos que avaliaram alguns principais marcadores do estresse oxidativo como enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GPx) e a peroxidação lipídica em pacientes diagnosticados com depressão em comparação aos controles saudáveis evidenciaram efeito antioxidante de medicamentos como fluoxetina, citalopram, inibidores seletivos da recaptação de serotonina e sertralina (Bilici et al., 2001; Herken et al., 2007; Khanzode et al., 2003).

Em estudos pré clínicos, Réus et al., (2010) demonstrou que o tratamento agudo e crônico com imipramina reduziu a peroxidação lipídica no cérebro de ratos. Outro estudo relatou que o tratamento com imipramina e venlafaxina foi efetivo no aumento a atividade das enzimas SOD, CAT e GR e na redução dos níveis de MDA e eventos de oxidação de proteínas (Zafir et al., 2009).

Entretanto, outros estudos não apresentaram resultados satisfatórios na normalização dos parâmetros oxidativos com o tratamento antidepressivo. Galecki et al., (2009), não encontrou diferença significativa nos pacientes depressivos em relação aos marcadores de estresse oxidativo após três meses de tratamento com fluoxetina. Outro estudo comparativamente maior relatou que em 6 semanas de tratamento com antidepressivos não houve alteração dos sistemas antioxidantes, independentemente da resposta ou do estado de remissão dos pacientes (Sarandol et al., 2007b).

Outros modelos experimentais de estresse oxidativo induzido pela administração de LPS e tiocetamida mostraram que o pre-tratamento com fluoxetina,

sertralina reduziu enquanto que o pre-tratamento com imipramina aumentou os níveis de MDA no cérebro de roedores (Omar et al. 2011, Abdel-Salam et al. 2013).

No entanto, o lítio considerado um importante estabilizador de humor, mostrou exercer efeitos protetores em relação aos níveis de ROS em um modelo experimental de mania com roedores (Frey et al., 2006) e suprimiu os níveis das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e da enzima catalase em pacientes bipolares não medicados comparados aos controles (Machado-Vieira et al., 2007). Outro estudo realizado com pacientes com episódios depressivos também reforçou os efeitos antioxidantes do lítio na prevenção da progressão da doença (de Sousa et al., 2014). Desta forma, o lítio pode tornar-se um importante adjuvante no tratamento contra os mecanismos do estresse oxidativo presentes nos episódios depressivos.

CAPÍTULO I

Uligosin B increases extracellular levels of dopamine and HVA in striatum but does not alter the levels of dopamine and its metabolites in the nucleus accumbens of rats.

**Marangon, C.G.^{1*}, Stolz, E.D.^{1*}; Antônio, C.B.¹; Rojas, C.S.³, Martins, L.A.M.²;
von Poser, G.L.¹; Rates, S.M. K.^{1#}**

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

²Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

³Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

*These authors have contributed equally for the study.

#Correspondence: Dr. Stela Maris Kuze Rates stela.rates@ufrgs.br

Abstract

The uliginosin B (ULI) is a dimeric phloroglucinol present in *Hypericum polyanthemum*, an endemic specie of southern Brazil. It was shown in studies from our group that ULI possesses antinociceptive and antidepressant-like effects in rodents. The effects of ULI seem to be consequence of the increase in the levels of monoamines (dopamine (DA), serotonin (5-HT) and noradrenaline (NE)) in the synaptic cleft once it inhibits their neuronal reuptake. However, it does not bind to monoamine sites on neuronal carriers, unlike classical antidepressants. In this study, we investigated the effects of acute treatment with ULI on interstitial levels of dopamine (DA) and its metabolites - 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), homovanillic acid (HVA) and 3-methoxythyramine (3-MT) as well as of serotonin (5HT), and its metabolite, 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA), in the striatum and nucleus accumbens core and shell, through cerebral microdialysis technique in awake rats. ULI treatment increased the overall concentration of DA and HVA ($P < 0.001$), but did not alter DOPAC and 5HIAA the levels in the striatum. ULI did not affect serotonin levels, 5-HIAA and DA metabolites in the nucleus accumbens core and shell. 3-MT and DA were below quantification limit. The striatum receives mainly dopaminergic projections of substantia nigra and HVA is the main extracellular metabolite of dopamine. Therefore, the current results corroborate with previous data of our group showing that the ULI increases dopaminergic neurotransmission and suggests a brain region-specific action.

Keywords: *Hypericum*, uliginosin B, antidepressant, brain microdialysis, dopamine, DOPAC, HVA, 3MT, 5HT, 5HIAA, striatum.

Introduction

Cerebral microdialysis is a versatile technique for monitoring substances in cerebral extracellular fluid *in vivo* and *in situ* (Westerink, 1995, Chefer et al., 2009), which is widely used to quantify neurotransmitters, metabolites or neuromodulators in a defined and limited brain region of the Central Nervous System (Darvesh et al., 2011). This technique has been used in the study of the neurochemical bases of psychiatric diseases and to investigate the mechanism of action of drugs (Chefer et al., 2009), including phytotherapies (Yoshitake et al., 2004, Kumar and Bhattacharya, 2001, Rommelspacher et al., 2001, Di Matteo et al., 2000, Su et al., 2014).

Hypericum perforatum is a vegetal specie used to manufacture phytotherapies effective in alleviating depression symptoms. Rommelspacher et al. (2001) demonstrated that an extract of *H. Perforatum* and a fraction enriched in hyperforin, a monomeric acylphloroglucinol supposed to be one of the main active principles of *H. perforatum* increased the extracellular levels of dopamine and serotonin in the nucleus accumbens of mice, measured by microdialysis *in vivo*. Another study showed that an extract of *H. Perforatum* increased the extracellular levels of dopamine and its metabolite 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) in hypothalamus, striatum and pre-frontal cortex of rats (Kumar and Bhattacharya, 2001).

Our group investigates, since the 90's, the pharmacological effects of species of *Hypericum* native to South America *H. caprifoliatum* and *H. polyanthemum*, as well as a phloroglucinol derivative isolated from *H. polyanthemum*, uliginosin B (ULI) (Figure 1), have shown antidepressant-like and antinociceptive effects in rodents (Viana et al., 2003; Viana et al., 2005; Viana et al., 2006; Stein et al., 2012, 2016; Stolz et al., 2014). Experiments *in vivo* demonstrated that the activation of monoaminergic neurotransmission, especially dopaminergic, seem to be important to the effects above reported (Viana et al., 2005; Stein et al., 2012; Stolz et al., 2014). Furthermore, ULI (Stein et al., 2012) and a phloroglucinol enriched fraction obtained from *H. caprifoliatum* (Viana et al., 2005) inhibited uptake of monoamines, mainly dopamine in striatal synaptosomal preparations. However, a lipophilic extract of *H.*

caprifolatum showed only a tendency to increase the extracellular levels of dopamine, DOPAC and homovanillic acid (HVA) measured by microdialysis in the nucleus accumbens of rats (Munari, 2006; Viana et al., 2006). As far as we know there are no microdialysis studies on ULI effects on monoaminergic neurotransmission. ULI has a dimeric structure consisting of phloroglucinol and *filicinic acid* moieties that differs from hyperforin (Nör et al., 2004).

The regulation of functional levels of dopamine has been studied extensively in the rat striatum. The corpus striatum is composed by the caudate nucleus, putamen and ventral striatum (Garris and Wightman, 1994). Many studies have used striatal structure to assess drug pharmacology or as a comparative structure with other brain structures to measure basal and stimulus evoked overflow of dopamine, since that the striatum receives mainly dopaminergic projections of substantia nigra (Garris and Wightman, 1994; Cass and Gerhardt, 1995; Mazei et al., 2002; Jedema et al., 2014).

Another important structure for dopaminergic neurotransmission is the nucleus accumbens. The neurons located in this nucleus accumbens are part of the dopaminergic pathway, known as mesolimbic, involved with the mechanism of reward and anhedonia (Floresco, 2015). Researchers believe that the nucleus accumbens functions as an interface between the emotional (mesolimbic) function and the motor function (mesostriatal) (Mogenson et al., 1988). Studies in humans and animals have evaluated the role of the reward brain region in depression and antidepressant therapy (Nestler and Carlezon, 2006, Mizaki et al., 2016).

In this context, the objective of this study was to evaluate the effect of acute treatment with uliginosin B on the extracellular content of monoamines and metabolites on striatum and nucleus accumbens by using microdialysis in awake rats.

Materials and Methods

Uliginosin B Obtention

ULI (Figure 1) was obtained according to Stolz et al., (2012) from *n*-hexane extract of the aerial parts of *Hypericum polyanthemum* Klotzsch ex Reichardt (Hypericaceae). The plant was harvested in Caçapava do Sul, Brazil (voucher specimen ICN 175915), and the collection was authorized by the Conselho de Gestão do Patrimônio Genético and Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (number 003/2008, Protocol 02000.001717/2008-60).

The purity (94%) of uliginosin B was determined through HPLC analysis coupled to an ultraviolet detector (Nunes et al., 2009, Ccana-Ccapatinta et al., 2015) and its structure was characterized by ^1H and ^{13}C NMR spectra (Parker et al., 1968). It was stored at -20°C , protected from light and moisture until use. Immediately before biological testing, it was suspended in saline containing 2% polysorbate 80.

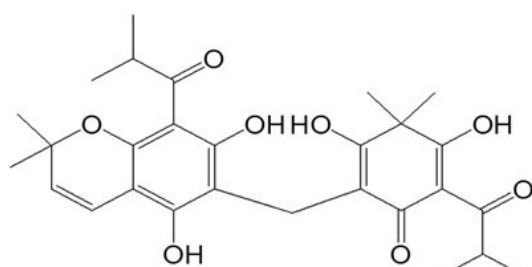


Figura 1. Chemical structure of uliginosin B.

Animals

Male Wistar rats with approximately 60-80 days (250-350 g) were from Centro de Reprodução e Experimentação de Animal de Laboratório (CREAL), Rio Grande do Sul, Brazil. Before the experiments, the animals were adapted for at least 05 days at the Biotereum of Faculty of Pharmacy - UFRGS. The animals were kept in plastic boxes of 25x40x18 cm with a maximum of four rats in each box and after the surgical procedure (described below) were housed in individual boxes for 48 h (post-surgical recovery period). The animals were kept under a light/dark cycle of 12 h, with a constant temperature ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) under an exhaust system (Alesco® ventilated shelves) and monitored humidity with free access to water and food. Experiments were approved by Animal Care Local Ethical Committee (CEUA-UFRGS; protocols n°18518 and 26494)

and performed according to Brazilian law (Brasil, 2008; Ministério Da Ciência e Concea, 2013a; b) which follow the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals (Bankowski, 1985).

Reagents

N-adrenaline (NA), dopamine (DA), serotonin (5-HT), 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), 3-methoxytyramine (3-MT), homovanilic acid (HVA), and 5-hydroxyindoleacetic acid were obtained from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Ketamine hydrochloride (Dopalen®) and xylazine hydrochloride (Anasedan®) produced by Agibrands do Brazil LTDA (São Paulo, SP, Brazil). Methanol (CH₄O) HPLC grade and magnesium chloride (MgCl₂) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Potassium chloride (KCl), calcium chloride (CaCl₂), ethylenediamine tetra acetic acid (EDTA) and monopotassium phosphate (KH₂PO₄) were purchased from Fisher Scientific (New Jersey, USA). Sodium chloride (NaCl) and heptanesulfonic acid (C₇H₁₅NaO₃S) were purchased from Dynamics Química Contemporânea LTDA (Diadema, SP, Brazil) and Acros Organics (New Jersey, USA), respectively.

Surgery

The surgery was performed as described by Munari (2006), with minor modifications. On the day of the experiment, the animals were anesthetized (i.p.) with a mixture of ketamine 0.1 g/mL (0.75 mL/kg) + xylazine 0.2 g/mL (0.5 mL/kg). When necessary, an additional dose of anesthetic was given (1/3 anesthetic dose) during surgery. Surgery for implantation of the probe guide was performed according to Cooley and Vanderwolf (1990), using stereotactic (ASI Instruments, USA). The guides were implanted in the striatum (anteriority: -0,3; laterality: +3,2; depth: -4,5), nucleus accumbens core (anteriority: +2,2; laterality: + 1,4; depth: -7,0) and nucleus accumbens shell (anteriority: +2,7, laterality: +1,4, depth: -6,4) according to Paxinos and Watson

(1998). Animals were housed for 48 h (recovery period) in individual boxes with water and food *ad libitum*. No signs of suffering or infection were observed.

Microdialysis in awake rats

Microdialysis was performed as described by Munari (2006). Microdialysis probes (CMA/11, 2 mm, 6kDa cut-off) were inserted through the guide cannula in the brain structures. The probes were continuously perfused with artificial cerebrospinal fluid (FCA) (145 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.2 mM CaCl₂ and 1 mM MgCl₂; pH 7.4), flow 1 µL/min for 1 h for the stabilization period. Immediately after that, samples of 20 µL were collected each 20 min, during one 60 minutes, for determination of the basal levels of neurotransmitters and metabolites. In sequence, the rats were treated with uliginosin B (30 mg/kg, i.p.) or vehicle (1 mL/kg, i.p.) and the dialysates (20 µL) were collected at 20 min intervals for 4 h. All samples were collected in eppendorf tubes prepared with 10 µL of preservation solution (0.1% cysteine and 0.1 N perchloric acid). After the collection, the samples were stored in a freezer at -80° C until analysis. The locations of the microdialysis probes were verified histologically at the end of the study, by using the cresyl-violet staining method (Devoto et al., 2005).

Measurement of monoamines in the dialysates

The analytical method was previously validated in our laboratory (Munari, 2006; Antonio, 2015; Stolz, 2015), according to ANVISA recommendations for quantification of samples in biological matrix (Brasil, 2012). Concentrations of monoamines in the dialysates were analysed by means of High Performance Liquid Chromatography (HPLC) with electrochemical detection according to Hubbard e colaboradores (2010) and Munari (2006). The monoamines were separated by reverse phase liquid chromatography (MD 150×2, 3 µm, 120 Å, ThermoScientific). The mobile phase, which was pumped at a flow rate of 0.2 ml/min consisted of 1 KH₂PO₄ 64,5 mM, EDTA 1 mM, metanol 2,10 M and C₇H₁₅NaO₃S 0,8 mM and pH adjusted to 3,4. Analytes were detected at an oxidation potential of +0,8 V versus the reference electrode. The carousel containing the samples and oven were maintained at 4 and

30° C, respectively. The injection volumes were 5-10 µL and the run time 35 min. The program Labsolutions LCsolution (Shimadzu, Japan) was used for the acquisition and integration of the peaks.

Determination of microdialysis probes recovery rate

The probes recovery rate was determined in vitro through perfusion system with FCA (with no analyte) at a flow rate of 1µL/min at 37°C. The probe was immersed in a standard solution tube containing all analytes investigated at the concentration of 100 pg/µL. This system was perfused for 1h for stabilization, after which, four samples (20µL/sample) were collected at 20 min intervals and analyzed under the same conditions as the dialysates obtained from animals treated with uliginosin B or vehicle.

The recovery rate (RT) of each microdialysis probe was calculated as a percentage, using the formula:

$$TR (\%) = (C_{dial}/C_{perf}) * 100$$

C_{dial} is the collected

dialysate concentration,

C_{perf} is the concentration of the standard perfused solution (100 pg/µL).

The procedure was performed only for probes inserted in the striatuma after using in three animals. Recovery data were not considered in the calculation for quantification of samples. This procedure was performed only to certify the efficiency of probes.

Histology

At the end of the experiment, the animal was sacrificed by the guillotine decapitation method to remove the brain, which was frozen (-80°C) and subsequently sectioned (30 µm sections) in a cryostat (-20°C). The sections were collected on

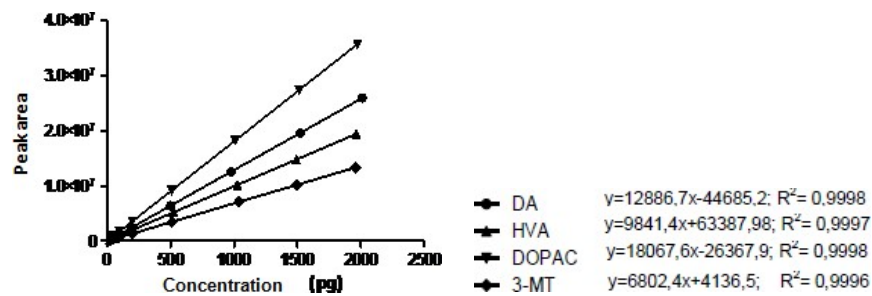
gelatincoated slides and stained according to the cresol-violet histological technique (Munari,2006). The insertion site of the microdialysis probe guide was verified according to Atlas of Brain Anatomy of Rats (Paxinos and Watson, 1998). The choose of rats foranalyzing was aleatory.

Statistical analysis

Initially the concentration of each dialysate was determined from the equations of the lines. Three basal values were averaged to obtain the baseline mean for each animal and adjusted to 100%. All other values were calculated as percent change at each time point relative to basal value mean. The analysis of data was performed by GraphPad Prism software version 4.02 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Data were analyzed by determining the area underthe curve (AUC) for each treatment using a two-tailed t test. Results were expressed as mean (%) \pm standard error of the mean (S.E.M.).The significance level was set at $P<0.05$.

Results

The analytical method was previously validated in our laboratory (Munari, 2006; Antonio, 2015; Stolz, 2015), according to ANVISA recommendations for quantificationof samples in biological matrix (BRASIL, 2012). Representative in vitro standard curves and HPLC chromatograms are depicted in the figure 2 and 3, respectively.



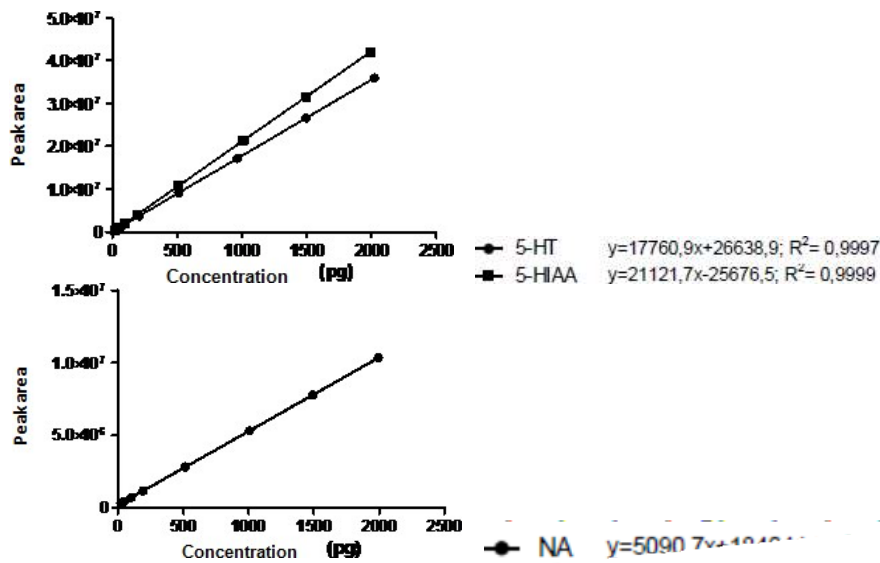
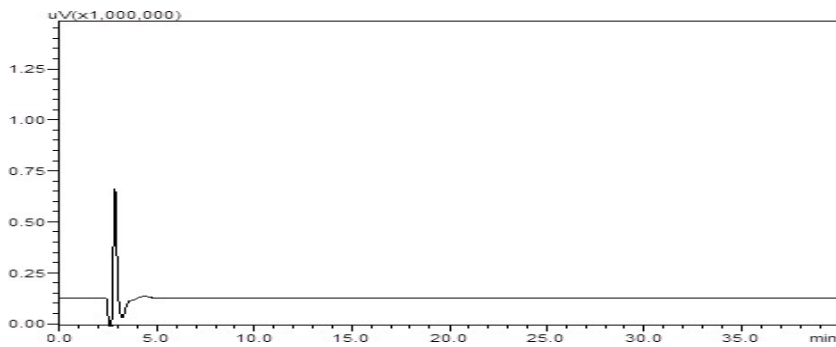
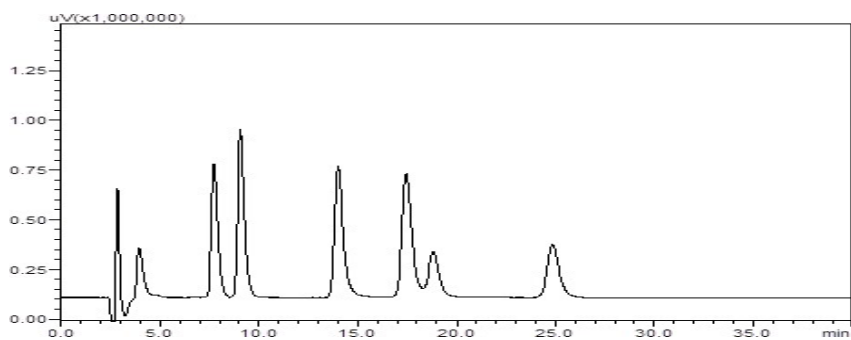


Figure 2. Standard curves of dopamine (DA), 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), 3-methoxytyramine (3-MT), homovanillic acid (HVA), serotonin (5- HT),5-hydroxyindolacetic acid (5-HIAA) and norepinephrine (NA). The monoamines were separated by high performance liquid chromatography (C-18: MD 150×2, 3 μm, 120 Å, mobile phase: KH₂PO₄ 64,5 mM, EDTA 1 mM, metanol 2,10 M and C₇H₁₅NaO₃S 0,8 mM -pH 3,4; electrochemical detection: oxidation potential of +0,8 V versus the reference electrode). The carousel containing the samples and oven were maintained at 4 and 30° C. The acquisition and integration of the peaks was performed by using the program Labsolutions LC solution (Shimadzu, Japan).

A



B



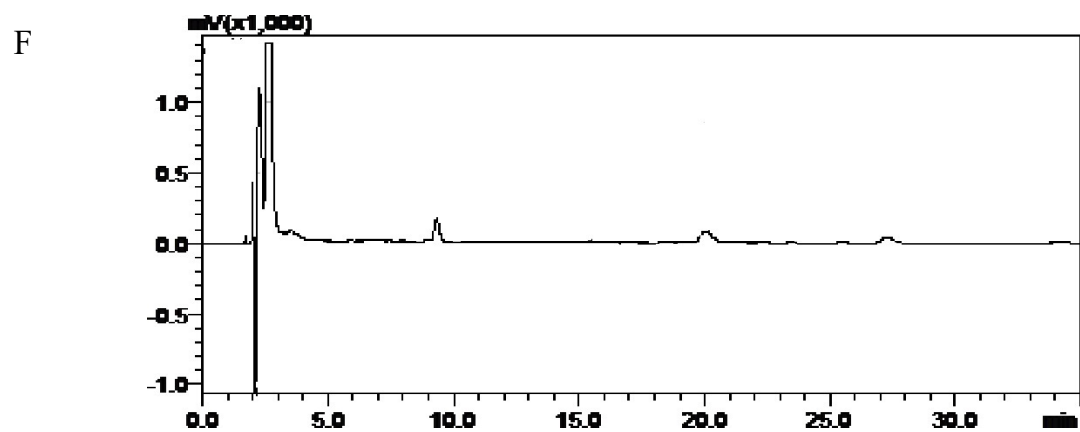
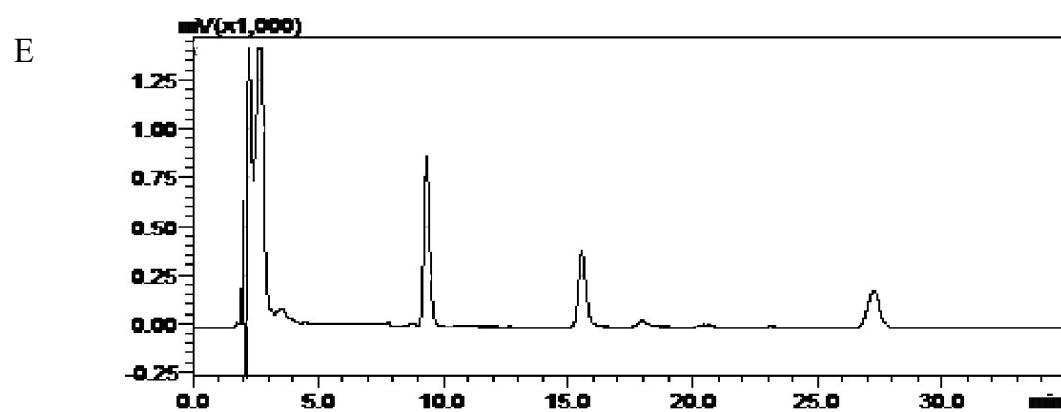
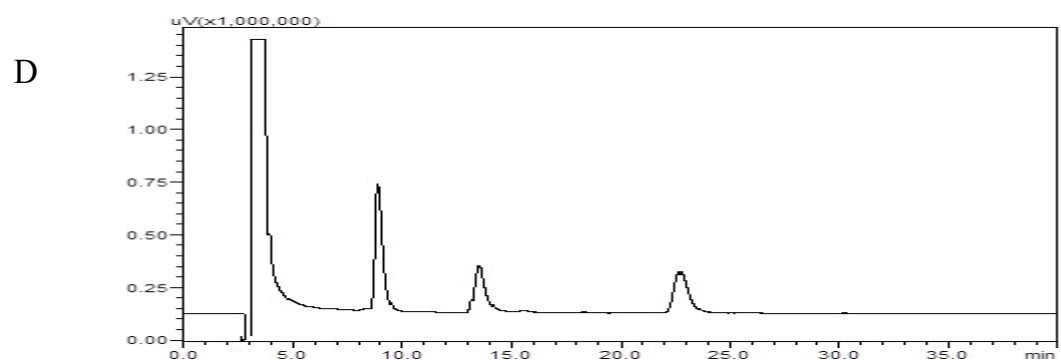
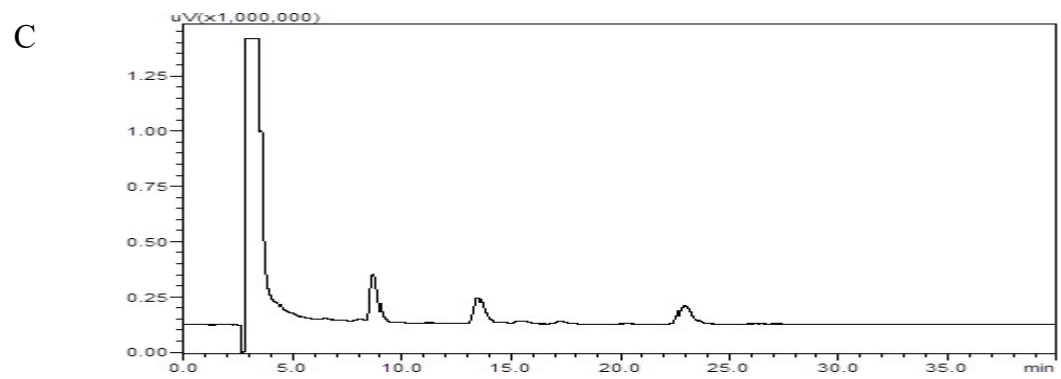
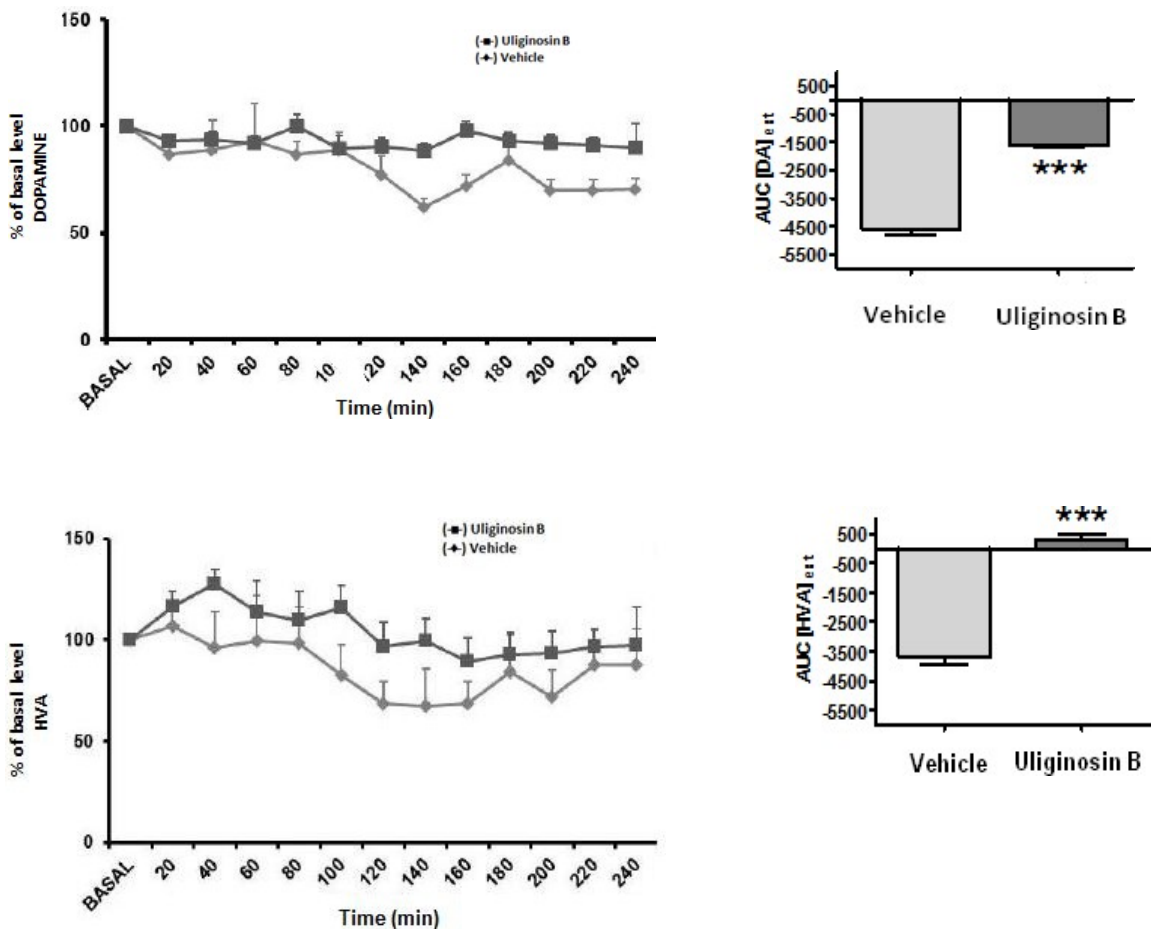


Figure 3. Representative chromatograms obtained by HPLC-DE. FCA(A); quality control with all analytes at 100 pg/ μ L, respectively (B). Dialysate of vehicle treated animal at 40min infusion time (C); dialysate of animal treated with uliginosin B (30 mg/kg, i.p.) at 40min infusion time in striatum (D), in nucleus accumbens core (E) and shell (F). Analytes: norepinephrine (NA) peak at 4 min, dopamine (DA) at 7-8 min, 3,4- dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) at 9-10 min, 5-hydroxyindolacetic acid (5- HIAA at 14-15,5 min, serotonin (5-HT) at 19-20 min, 3-methoxythyramine (3-MT) at 19min and homovanillic acid (HVA) at 25-27 min.

The visual analysis of the concentration (expressed as % from basal values) x time of brain dialysates collection and the statistical analysis of AUCs differences (Student T test) revealed that ULI (30 mg/kg, i.p.) increased the rat striatal extracellular levels of dopamine (DA, $P < 0.001$) and homovanillic acid (HVA, $P < 0.001$) but did not alter the 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC, $P = 0.917$) and 5-hydroxyindolacetic acid (5-HIAAc, $P = 0.1487$) levels (Figure 3). The concentration of 3-methoxythyramine (3-MT) was below the quantification limit of 2 pg/ μ L (11.96 nM).



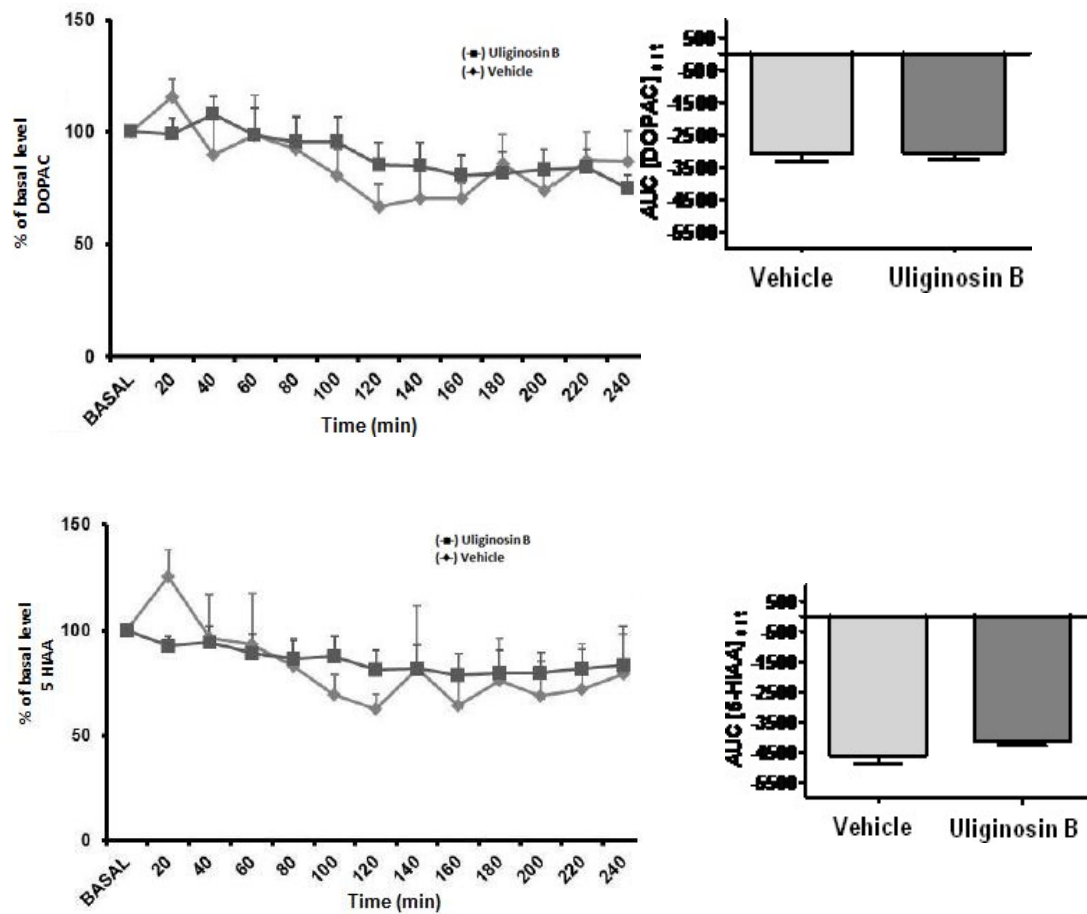


Figure 4. Effect of uliginosin B (30 mg/kg, i.p.), on striatal extracellular levels of dopamine and its metabolites and 5-HIAA measured by microdialysis in awake rats. (n=5-6 / group). Values expressed as percentage of effect in relation to basal measures and as area under the curve \pm S.E.M.: *** $P < 0.001$ differences with respect to the vehicle (Student T Test).

In contrast, treatment with ULI did not alter the extracellular levels of DOPAC; ($P=0,4866$), HVA; ($P= 0,5664$) and 5HIAA; ($P =0,9775$) in the nucleus accumbens neither in the core region (Figure 4) nor in the shell region (Figure 5): DOPAC; ($P=0,4146$), HVA; ($P=0,9132$), 5HT; ($P=0,1909$) and 5HIAA; ($P= 0,4045$).

Dopamine levels were below the quantification limit of 2.53pg/ μ L.

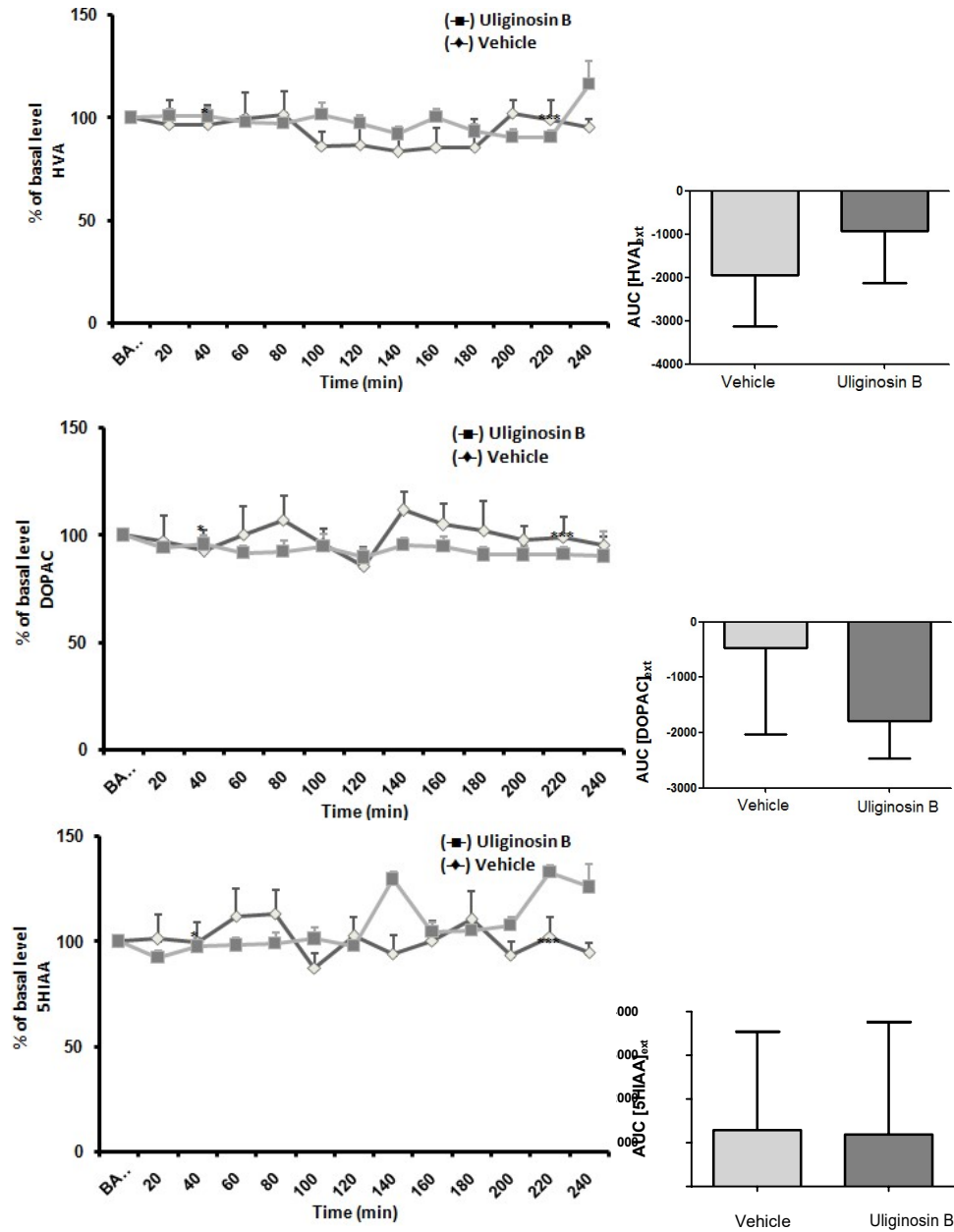
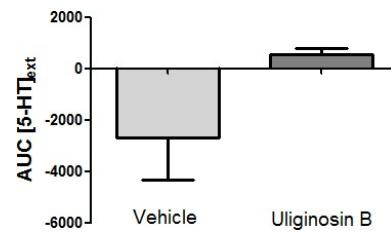
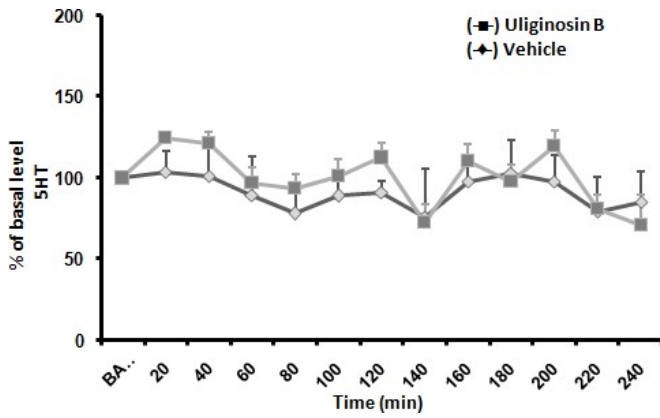
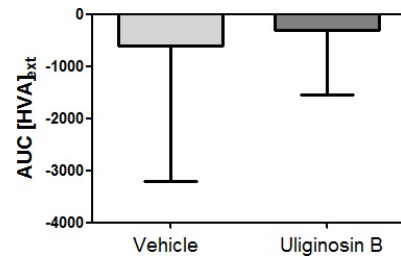
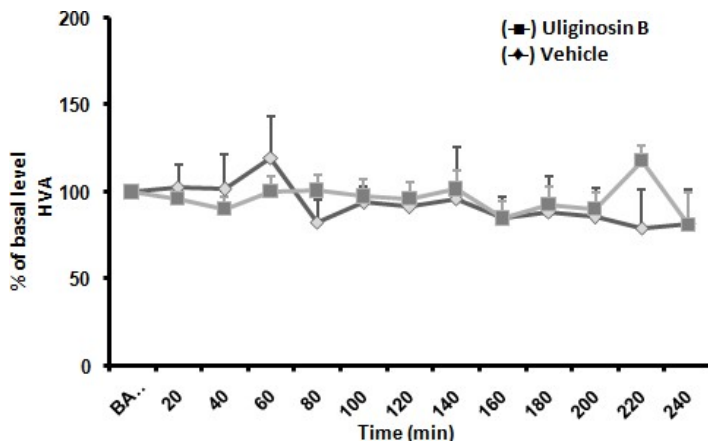
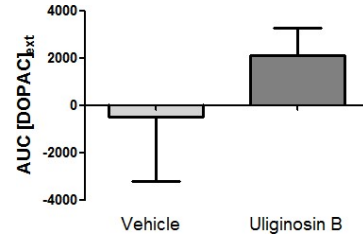
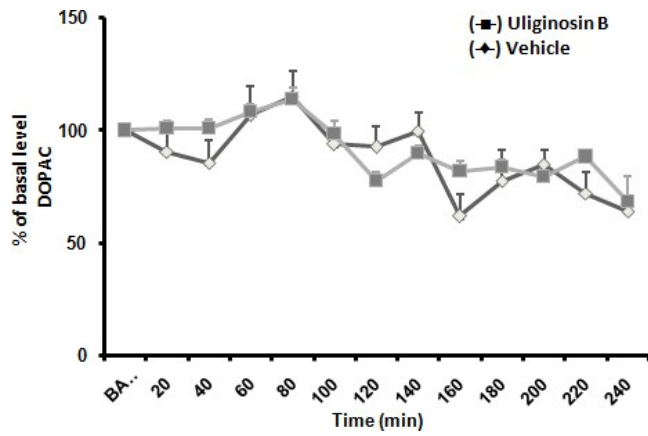


Figure 5. Effect of treatment with uliginosin B (30 mg/kg, i.p.) on the extracellular levels dopamine metabolites and 5-HIAA in nucleus accumbens core from rats awake submitted to the technique of cerebral microdialysis (n= 5-6/group). Values expressed as percentage of effect in relation to basal measures and as area under the curve \pm S.E.M.: *** P < 0.001 differences with respect to the vehicle (Student T Test).



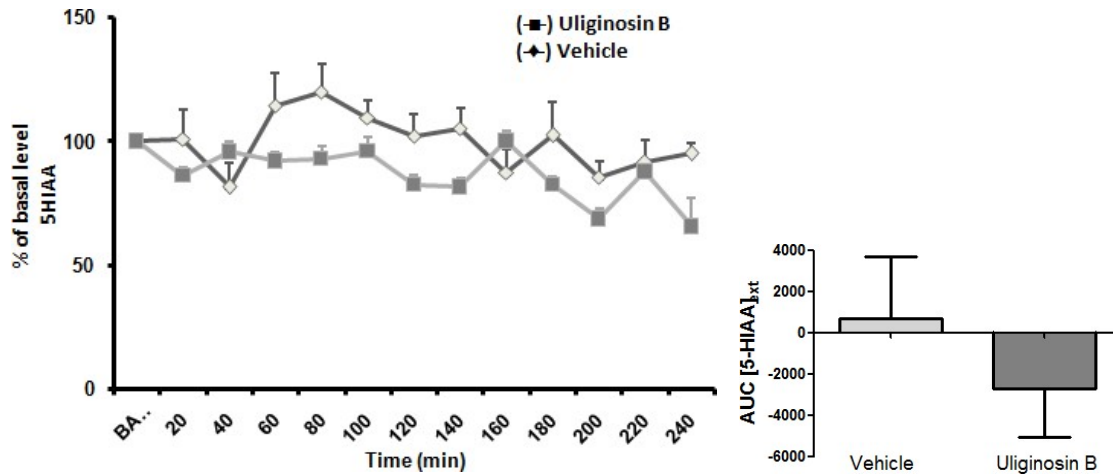


Figure 6. Effect of treatment with uliginosin B (30 mg/kg, i.p.), on the extracellular levels dopamine metabolites and 5HT and its metabolite in nucleus accumben shell fromrats awake submitted to the technique of cerebral microdialysis (n= 3-5/group). Values expressed as percentage of effect in relation to basal measures and as area under the curve \pm S.E.M.: *** P <0.001 differences with respect to the vehicle (Student T Test).

Recovery rate of microdialysis probes was performed in vitro for probes inserted in the striatum after using in three animals, and values are depicted in the table 1. Recovery data were not considered in the calculation for quantification of samples. This procedure was performed only to certify the efficiency of probes.

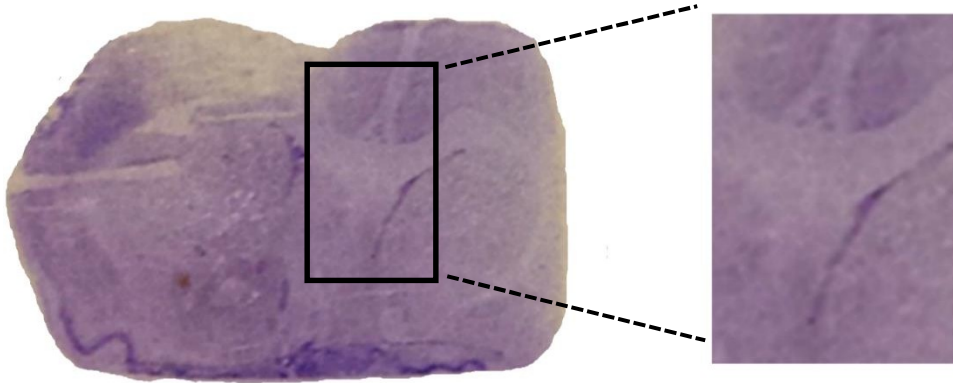
Table 1. Recovery rate (%) of microdialysis probes

Analyte Probe	DA	DOPAC	HVA	3-MT	5-HIAA
I	2,4 \pm 0,2	2,6 \pm 0,2	21,4 \pm 0,4	19,2 \pm 1,6	15,8 \pm 0,3
II	12,5 \pm 1,0	10,8 \pm 1,0	15,4 \pm 1,5	16,4 \pm 2,6	15,1 \pm 1,4
III	6,4 \pm 0,9	6,5 \pm 1,5	15,4 \pm 1,3	13,0 \pm 0,4	10,9 \pm 0,6
IV	4,2 \pm 0,3	4,3 \pm 0,4	9,9 \pm 0,8	12,2 \pm 2,8	9,0 \pm 0,1
V	9,9 \pm 0,9	9,8 \pm 1,0	20,5 \pm 0,8	21,9 \pm 1,3	18,1 \pm 0,7

Values expressed as mean of four dialyses \pm standard deviation. Dialysed collected during 20 min, flow 1 μ L/min.

The figure 7 shows representative histological sections (30 μ m) of rat brain, showing the scar in the striatum and nucleus accumbens 1, where the probe was implanted, ensuring that the microdialysis was performed at the site of interest.

A



B

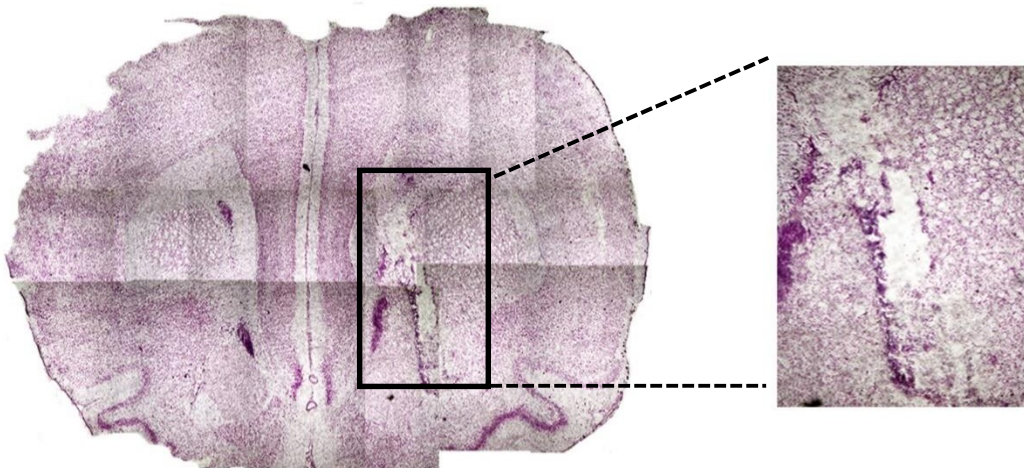


Figure 7. Cryostat section (30 μm) (cresyl-violet staining) showing the insertion site of the microdialysis probe in the striatum (A) and nucleus accumbens core (B) Detail of the same cut, showing the scar left by the probe guide

Discussion

The results from this study showed that acute treatment with the phloroglocinol derivative, ULI, increased the extracellular levels of dopamine (DA, $P < 0.001$) and homovanillic acid (HVA, $P < 0.001$), but did not alter the levels of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC, $P = 0.917$) and 5-hydroxyindolacetic acid (5-HIAA, $P = 0.1487$) in rat striatum. In contrast, ULI did not alter the extracellular levels of any neurotransmitter and metabolites analyzed in nucleus accumbens core and

shell. The 3MT levels could not be determined in striatum and nucleus accumbens core, and the dopamine levels were not determined in nucleus accumbens core and shell because their sample concentrations were below the quantification limit (2.53 pg/ μ L) achieved by our analytical method.

These results agree with previous studies by our group (Munari, 2006; Viana et al., 2005 and 2006; Stein et al., 2012) and suggest that striatum is more important than nucleus accumbens for the dimeric ULI and structural similar analogues' action on dopaminergic neurotransmission. In contrast, several studies on extracts of *H. perforatum* and hyperforin have been shown significant increases of varying magnitudes in the levels of dopamine in several brain structures such as the nucleus accumbens, striatum and pre-frontal cortex (Di Matteo et al., 2000; Rommelspacher et al., 2001; Yoshitake et al., 2001).

Results from the current study are in line with Viana and co-workers (2006) and Munari (2006), who demonstrated that a dimeric phloroglucinol enriched fraction obtained from *H. caprifoliatum* was not able to alter the extracellular levels of dopamine and metabolites in the accumbens of rats. Viana and co-workers (2005) demonstrated that this enriched in dimeric acylphloroglucinol derivatives structurally related to ULI increased the spontaneous release of [³H] striatal dopamine in approximately 12%. Therefore, the current observed changes in the extracellular levels of dopamine and HVA induced by the administration of ULI in the striatum may be related to an increase in dopamine release or to inhibition of the striatal reuptake of this monoamine, previously reported for ULI by Stein and co-workers (2012). However, the impossibility of quantifying 3-MT levels limits the conclusions about the effect of this phloroglucinol on dopamine release. The literature infers that changes in 3-MT levels are associated with dopamine release (Wood and Altar, 1988) while intraneuronal dopamine metabolites, DOPAC and HVA, are considered as indices of dopamine rate of use and turnover (Karoum et al. 1992; Karoum et al., 1994).

Dopamine reuptake inhibition led to a reduction in the levels of intraneuronal dopamine and, consequently, a reduction in the formation of DOPAC by the enzyme monoamine oxidase (MAO) located in the cytosol. The HVA metabolite originates predominantly from DOPAC, but it is also formed from the extraneuronal dopamine (Cooper et al., 1996). Dopamine that has not been recaptured is metabolized to 3-MT through the sequential methylation by catechol-*O*-methyl transferase (COMT) and MAO in glial cells and result in HVA (Cooper et al., 1996).

There is evidence of regional differences in basal dopamine metabolism within the nucleus accumbens which has two subdivisions known as shell and core. They have distinct input-output projections with opposite and eventually different functions (Broget al., 1993, Biesdorf et al., 2015). Some studies point out that the core region is highly dopaminergic, whereas the shell region contains moderate levels of dopamine in conjunction with a significant noradrenergic projection (Heidbreder and Feldon 1998, McKittrick and Abercrombie, 2007). However, some works have found no significant difference in extracellular levels of dopamine in subregions shell and core (Kalivas and Duffy 1995; Pontieri et al. 1995; Sokolowski et al. 1998; Cadoni et al. 2000), other researchers have found dopamine level to be higher in shell than the core (Barrot et al. 2000). Unfortunately, we could not compare the levels of dopamine in the two structures because under our experimental conditions the levels of this monoamine in the nucleus accumbens were below of the limit of quantification. It may be related to low concentrations of dopamine itself and to putative low concentrations of ULI into nucleus accumbens. The ULI tested dose was chosen based on previous studies demonstrating its antidepressant-like efficacy (Stein et al., 2012). Therefore, the evaluation of higher doses of ULI, the building of a dose-response curve, as well as testing different regimens of treatment, would be an interesting perspective.

Some studies that investigated the mechanism of action of synthetic antidepressants in the Central Nervous System (CNS) through cerebral microdialysis found differences in the release of neurotransmitters according to the cerebral

structure and type of treatment adopted (Nomikos et al., 1989, Nomikos et al., 1992, Ichikawa e Meltzer, 1995, Fukuyama et al., 2013, Kamińska et al., 2013). It has been reported that the chronic and not acute bupropion treatment (antidepressant that inhibits dopamine uptake) increased interstitial dopamine levels in the nucleus accumbens but not in the striatum of awake freely moving rats. This effect structurally specific reflects a selective potentiation of the action of this atypical antidepressant on extracellular dopamine levels in the nucleus accumbens (Nomikos et al., 1989, Nomikos et al., 1992). Amineptine, which is considered an antidepressant with a predominant effect on the dopaminergic system, could increase the basal levels of dopamine in the striatum, nucleus accumbens and pre-frontal cortex (Garattini et al., 1997).

Other study evaluated the effect of different antidepressants such as fluoxetine, a selective serotonin reuptake inhibitor and the tricyclic antidepressants clomipramine and imipramine, on the extracellular levels of dopamine in the striatum and nucleus accumbens. The systemic administration of fluoxetine led to significant decrease in extracellular DA levels in the nucleus accumbens and the striatum, whereas systemic administration of clomipramine and imipramine increased extracellular DA levels only in the striatum (Ichikawa and Meltzer, 1995). In addition, chronic treatment with imipramine increased whereas chronic treatment with fluoxetine decreased basal extracellular DA levels in the nucleus accumbens. Only the administration of chronic imipramine could potentiate amphetamine-induced increase in interstitial DA levels in the nucleus accumbens (Ichikawa et al., 1998).

In general, it has been reported that the antidepressants affect dopamine release in several brain structures and some authors believe that the chronic antidepressant treatments can induce the potentiation of dopaminergic neurotransmission and that it is correlated to the therapeutic effect of these drugs (D'Aquila et al., 2000). Other authors believe that the unconformity between the different classes of classic antidepressants represents the ability to modify the brain dopaminergic activity in a region-specific manner, suggesting that the increase in extracellular DA levels may be

mediated by an effect on serotonergic neurons (Ichikawa and Meltzer, 1995, Ichikawa et al., 1998).

Interactions of mesolimbic serotonergic and dopaminergic neurons (Meltzer and Huang, 2008, Deurwaerdère and Giovanni, 2015) have been documented. Cell bodies and terminal regions of main dopaminergic pathways (nigrostriatal, mesolimbic and mesocortical pathways) are innervated by 5-HT neurons that through its receptors modulate the function of dopamine neurons, “partly impulse dependently partly impulse independently” (Rommespacher et al., 2001; Alex and Pehek, 2007). For example, the stimulation of 5HT₃ receptors results in a release of dopamine in the nucleus accumbens without to interfere in the neurotransmitter serotonin (Campbell et al., 1995). Studies found that the inhibition of the 5HT₂ receptors stimulated the release of dopamine in the nucleus accumbens shell (Markus et al., 1996) thus logically activation inhibits the release of dopamine. Therefore, the activation of the 5-HT_{1A} and 5-HT₃ receptors in the nucleus accumbens is important combined with the inhibitory effect of 5-HT_{2C} receptors to stimulate the local dopamine release (Dremencov et al., 2004).

Serotonergic innervation in the CNS originates from cell bodies located in the nuclei of the midbrain, known as the dorsal nucleus of the raphe (DRN) and the medial nucleus of the raphe (MRN) and innervate cortical and striatal dopaminergic neurons (Hale and Lowry, 2011). However, treatment with ULI did not alter the extracellular levels of the serotonin metabolite, 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA), neither in the striatum nor in the nucleus accumbens core and shell. In fact, we observed peaks of serotonin in the nucleus accumbens shell only, where rats treated with ULI present apparent higher levels of serotonin in relation to the basal determination although without statistical significance. These data do not match with those presented by Stein et al. (2012), who suggested that the ULI increases availability of serotonin in the synaptic cleft. This divergence of results can be due several reasons, the most relevant seeing to be the encephalic structure and the

experimental model studied, since Stein and co-workers (2012) performed the experiment *in vitro* using the frontal cortex synaptosomal preparations.

Therefore, the effects of ULI on monoaminergic neurotransmission and monoamines extracellular availability may be linked to its interaction with specific brain structures. Accordingly, a study by our group have shown that the ULI increased Na^+K^+ -ATPase activity, which is involved in the neuronal monomaminergic transporter driving, in mice cerebral cortex but not in hippocampus (Stein et al., 2016).

Summarizing, the results of current study showed that treatment with uliginosin B increased the extracellular availability of dopamine and its metabolite, HVA, in the striatum of rats without altering the extracellular levels of DOPAC and 5-HIAA. On the other hand, the acute treatment with uliginosin B did not alter the extracellular levels of dopamine and its metabolites, as well as serotonin and its metabolite, in the nucleus accumbens core and shell of Wistar rats. These data suggest that the effects of ULI on monoaminergic neurotransmission and monoamines extracellular availability may be linked to its interaction with specific brain structures and neuronal pathways, being the striatum more important than nucleus accumbens for the action of uliginosin B. These finding point to a usefulness of this dimeric phloroglucinol in dopaminergic basal ganglia disorders as Parkinson disease, which deserve further studies.

References

- ALEX, K.D.; PEHEK; E.A. Pharmacologic mechanisms of serotonergic regulation of dopamine neurotransmission. **PharmacolTher**, v. 113(2), p. 296-320, 2007. Review.
- ANTÔNIO, C.B. **Avaliação do derivado N-fenilpiperazínico LASSBio579 em modelos animais preditivos de sintomas positivos e cognitivos da esquizofrenia e seu potencial mecanismo de ação.** Tese de doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2015.
- BANKOWSKI, Z., 1985. CIOMS. Council for International Organizations of Medical Sciences International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals.
- BARROT, M., MARINELLI, M., ABROUS, D. N., ROUGE'-PONT, F., LE MOAL, M.; PIAZZA, P. V. The dopaminergic hyper-responsiveness of the shell of the nucleus accumbens is hormone-dependent. **Eur. J. Neurosci**, v. 12, p. 973–979, 2000.
- BIESDORF, C.; WANG, A.L.; TOPIC, B.; PETRI, D.; MILANI, H.; HUSTON, J.P.;
- DE SOUZA SILVA, M.A. Dopamine in the nucleus accumbens core, but not shell, increases during signaled food reward and decreases during delayed extinction. **NeurobiolLearn Mem**, v. 123, p. 125-39, 2015.
- BRASIL. 2008. Ministério Público. Lei no. 11.794, de 8 de outubro de 2008. Published in DOU 9.10.2008.
- BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Resolução n. 27.** D.O.U.: 17 de maio de 2012 .
- BROG, J.S.; SALYAPONGSE, A.; DEUTCH, A.Y.; ZAHM, D.S. The patterns of afferent innervation of the core and shell in the "accumbens" part of the rat ventral striatum: immunohistochemical detection of retrogradely transported fluoro-gold. **J Comp Neurol**, v. 338, p. 255-78, 1993.
- BROWN, P., MOLLIVER, M.E. Dual serotonin $_5$ -HT. projections to the nucleus accumbens core and shell: relation of the 5-HT transporter to amphetamine-induced neurotoxicity. **J. Neurosci**, v. 20, p. 1952–1963, 2000.
- CADONI, C., SOLINAS, M.; DI CHIARA, G. Psychostimulant sensitization: differential changes in accumbal shell and core dopamine. **Eur. J. Pharmacol**, v. 388, p. 130–140, 2000.
- CAMPBELL, A.D.; MCBRIDE, W.J. Serotonin-3 receptor and ethanol-stimulated dopamine release in the nucleus accumbens. **PharmacolBiochemBehav**, v. 51, n. 4, p. 835-42, 1995.
- CASS, W.A.; GERHARDT, G.A. In vivo assessment of dopamine uptake in rat medial prefrontal cortex: comparison with dorsal striatum and nucleus accumbens. **J Neurochem**, v. 65, n.1, p. 201-7, 1995.

CCANA-CCAPATINTA, G.V., DE BARROS, F.M.C., BRIDI, H., VON POSER, G.L. Dimeric acylphloroglucinols in *Hypericum* species from sections *BrathysandTrigynobrathys*. **Phytochemistry**, v. 14, p. 25–50, 2015. Reviews.

CHEFER, V.I.; THOMPSON, A.C.; ZAPATA, A.; SHIPPENBERG, T.S. Overview of brain microdialysis. **CurrProtocNeurosci**, Chapter 7: Unit7.1, 2009.

COOLEY, R. K.; VANDERWOLF, C. H. **Stereotaxic surgery in the rat: a photographic series**. Canada: A. J. Kirby CO, 1990. 102.

COOPER, J.R.; BLOOM, F.E.; ROTH, R.H. The biochemical basis of neuropharmacology. 7ed. New York: Oxford University Press, 1996.

D'AQUILA, P.S.; COLLU, M.; GESSA, G.L.; SERRA, G. The role of dopamine in the mechanism of action of antidepressant drugs. **Eur J Pharmacol**, v. 405(1-3), p. 365-73, 2000. Review.

DARVESH, A.S.; CARROLL, R.T.; GELDENHUYS, W.J.; GUDELSKY, G.A.; KLEIN, J.; MESHUL, C.K.; VAN DER SCHYF, C.J. In vivo brain microdialysis: advances in neuropsychopharmacology and drug discovery. **Expert Opin Drug Discov**, v. 6, n. 2, p.109-127, 2011.

DE DEURWAERDÈRE, P.; DI GIOVANNI, G. Serotonergic modulation of the activity of mesencephalic dopaminergic systems: Therapeutic implications. **ProgNeurobiol**, v. 151, p. 175-236, 2017. Review.

DEVOTO, P., FLORE, G., SABA, P., FÀ, M., GESSA, GL. Co-release of noradrenaline and dopamine in the cerebral cortex elicited by single train and repeated train stimulation of the locus coeruleus. **BMC Neurosci**. v. 6:31, p. 1-11. 2005.

DI MATTEO, V.; DI GIOVANNI, G.; DI MASCIO, M.; ESPOSITO, E. Effect of acute administration of *Hypericum perforatum*-CO₂ extract on dopamine and serotonin release in the rat central nervous system. **Pharmacopsychiatry**, v. 33, 14-8, 2000.

DREMENCOV, E.; GISPAN-HERMAN, I.; ROSENSTEIN, M.; MENDELMAN, A.; OVERSTREET, D.H.; ZOHAR, J.; YADID, G. The serotonin-dopamine interaction is critical for fast-onset action of antidepressant treatment: in vivo studies in an animal model of depression. **ProgNeuropsychopharmacolBiol Psychiatry**, v. 28(1), p. 141-7, 2004.

FLORESCO, S.B. The nucleus accumbens: an interface between cognition, emotion, and action. **AnnuRevPsychol**, v. 66, p. 25-52, 2015. Review.

FUKUYAMA, K.; TANAHASHI, S.; HAMAGUCHI, T.; NAKAGAWA, M.; SHIROYAMA, T.; MOTOMURA, E.; OKADA, M. Differential mechanisms underlie the regulation of serotonergic transmission in the dorsal and median raphe nuclei by mirtazapine: a dual probe microdialysis study. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 229, n 4, p. 617-26, 2013.

GARATTINI, S. Pharmacology of amineptine, an antidepressant agent acting on the dopaminergic system: a review. **IntClinPsychopharmacol**, 12 Suppl 3: S15-9, 1997. Review.

GARRIS, P.A.; WIGHTMAN, R.M. Different kinetics govern dopaminergic transmission in the amygdala, prefrontal cortex, and striatum: an in vivo voltammetric study. **J Neurosci**, v.14, n.1, p. 442-50, 1994.

HALE, M.W.; LOWRY, C.A. Functional topography of midbrain and pontine serotonergic systems: implications for synaptic regulation of serotonergic circuits. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 213, n. (2-3), p. 243-64, 2011. Review.

HEIDBREDEDER, C.; FELDON, J. Amphetamine-induced neurochemical and locomotor responses are expressed differentially across the anteroposterior axis of the core and shell subterritories of the nucleus accumbens. **Synapse**, v. 29, p. 310–322, 1998.

HEIDBREDEDER, C.A.; BAUMANN, M.H. Autoregulation of dopamine synthesis in subregions of the rat nucleus accumbens. **Eur J Pharmacol**, v. 411, p. 107-113, 2001

HUBBARD, K.E.; WELLS, A, OWENS, T.S.; TAGEN, M, FRAGA, C.H.; STEWART, C.F. Determination of dopamine, serotonin, and their metabolites in pediatric cerebrospinal fluid by isocratic high performance liquid chromatography coupled with electrochemical detection. **Biomed Chromatogr**, v. 24, n.6, p. 626-31, 2010.

ICHIKAWA, J.; MELTZER, H.Y. Effect of antidepressants on striatal and accumbens extracellular dopamine levels. **Eur J Pharmacol**, v. 281, n. 3, p. 255-61, 1995.

ICHIKAWA, J.; KUROKI, T.; MELTZER, H.Y. Differential effects of chronic imipramine and fluoxetine on basal and amphetamine-induced extracellular dopamine levels in rat nucleus accumbens. **Eur J Pharmacol**, v. 350(2-3), p. 159-64, 1998.

JEDEMA, H.P.; NARENDHAN, R, BRADBERRY, C.W. Amphetamine-induced release of dopamine in primate prefrontal cortex and striatum: striking differences in magnitude and time course. **J Neurochem**, v.130, n. 4, p.490-7, 2014.

KALIVAS, P. W.; DUFFY, P. Selective activation of dopamine transmission in the shell of the nucleus accumbens by stress. **Brain Res**, v. 675, p. 325–328, 1995.

KAMIŃSKA, K.; GOŁEMBIOWSKA, K.; ROGÓŻ, Z. Effect of risperidone on the fluoxetine-induced changes in extracellular dopamine, serotonin and noradrenaline in the rat frontal cortex. **Pharmacol Rep**, v. 65, n. 5, p. 1144-51, 2013.

KAROUM, F.; CHRAPUSTA, S.J.; EGAN, M.F. 3-Methoxytyramine is the major metabolite of released dopamine in the rat frontal cortex: reassessment of the effects of antipsychotics on the dynamics of dopamine release and metabolism in frontal cortex, nucleus accumbens and striatum by a simple two pool model. **J Neurochem**, v. 63. p. 972–978, 1994.

KAROUM, F.; EGAN, M.F. Dopamine release and metabolism in the rat frontal cortex, nucleus accumbens, and striatum: a comparison of acute clozapine and haloperidol. **Br J Pharmacol**, v.105(3), p. 703-7, 1992.

KUMAR, V.; SINGH, P.N.; BHATTACHARYA, S.K. Neurochemical studies on Indian *Hypericum perforatum* L. **Indian J Exp Biol**, v. 39, n. 4, p. 334-8, 2001.

MARCUS, M.M.; NOMIKOS, G.G.; SVENSSON, T.H. Differential actions of typical and atypical antipsychotic drugs on dopamine release in the core and shell of the nucleus accumbens. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 6, n. 1, p. 29-38, 1996.

MAZEI, M.S.; PLUTO, C.P.; KIRKBRIDE, B.; PEHEK, E.A. Effects of catecholamine uptake blockers in the caudate-putamen and subregions of the medial prefrontal cortex of the rat. **Brain Res**, v. 936, p. 58-67, 2002.

MCKITTRICK, C.R.; ABERCROMBIE, E.D. Catecholamine mapping within nucleus accumbens: differences in basal and amphetamine-stimulated efflux of norepinephrine and dopamine in shell and core. **J Neurochem**, v. 100, n.5, p. 1247-56, 2007.

MELTZER, H.Y., HUANG, M. In vivo actions of atypical antipsychotic drug on serotonergic and dopaminergic systems. **Prog. Brain Res**, v. 172, p. 177–197, 2008.

Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, and CONCEA, “Diretrizes da prática de eutanásia do CONCEA,” Portaria no. 596, de 25 de junho de 2013, Brasília, Brazil, 2013a.

Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, and CONCEA, “Diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos—DBCA,” Portaria no. 465, de 23 de maio de 2013, Brasília, Brazil, 2013b.

MISAKI, M.; SUZUKI, H.; SAVITZ, J.; DREVETS, W.C.; BODURKA, J. Individual Variations in Nucleus Accumbens Responses Associated with Major Depressive Disorder Symptoms. **Sci Rep**, 6:21227, p. 1-12, 2016.

MOGENSEN, G.J.; YANG, C.R.; YIM, C.Y. Influence of dopamine on limbic inputs to the nucleus accumbens. **Ann N Y Acad Sci**, v. 537, p. 86-100, 1988. Review.

MUNARI, L. **Avaliação do efeito de um extrato lipofílico de *Hypericum caprifoliatum* Cham. & Schldl sobre os níveis de dopamina e seus metabólitos através de microdialise cerebral em ratos conscientes.** 2006. 145 (MSc). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre.

NESTLER, E.J.; CARLEZON WA, JR. The mesolimbic dopamine reward circuit in depression. **Biol Psychiatry**, v. 59, n.12, p. 1151-9, 2006. Review.

NOMIKOS, G.G.; DAMSMA, G.; WENKSTERN, D.; FIBIGER, H.C. Acute effects of bupropion on extracellular dopamine concentrations in rat striatum and nucleus

accumbens studied by in vivo microdialysis. **Neuropsychopharmacology**, v. 2(4), p. 273-9, 1989.

NOMIKOS, G.G.; DAMSMA, G.; WENKSTERN, D.; FIBIGER, H.C. Effects of chronic bupropion on interstitial concentrations of dopamine in rat nucleus accumbens and striatum. **Neuropsychopharmacology**, v. 7, n.1, p. 7-14, 1992.

NÖR, C.; ALBRING, D.; FERRAZ, A.B.F.; SCHRIPSEMA, J.; PIRES, V.; SONNET P.; GUILLAUME, D.; VON POSER, G.L. Phloroglucinol derivatives from four *Hypericum* species belonging to the Trigynobrathys section. **Biochem Syst Ecol**, v. 32, p. 517–9, 2004.

NUNES, J.M.; PINHATTI, A.V.; VON POSER, G.L.; RECH, S.B. Promotive effects of long term fertilization on grown of tissue culture-derived *Hypericum polyanthemum* plants during acclimatization. **Industrial Crops and Products**, v. 30, p. 329-332, 2009a.

PARKER, W. L.; JOHNSON, F. The structure determination of antibiotic compounds from *Hypericum uliginosum*. I. **Journal of the American Chemical Society**, v. 90, n. 17, p. 4716–4723, 1968.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. New York: Academic Press, 1998. 456.

PONTIERI, F. E., TANDA, G.; DI CHIARA, G. Intravenous cocaine, morphine, and amphetamine preferentially increase extracellular dopamine in the “shell” as compared with the “core” of the rat nucleus accumbens. **Proc. Natl Acad. Sci**, v. 92, p. 12304–12308, 1995.

ROMMESPACHER, H.; SIEMANOWITZ, B.; MANNEL, M. Acute and chronic actions of a dry methanolic extract of *Hypericum perforatum* and a hyperforin-rich extract on dopaminergic and serotonergic neurons in rat nucleus accumbens. **Pharmacopsychiatry**, v.34, p.119-126, 2001.

SOKOLOWSKI, J. D., CONLAN, A. N.; SALAMONE, J. D. A microdialysis study of nucleus accumbens core and shell dopamine during operant responding in the rat. **Neuroscience**, v. 86, p. 1001–1009, 1998.

STEIN, A.C.; VIANA, A.F.; MÜLLER, L.G.; NUNES, J.M.; STOLZ, E.D.; DO REGO, J.C.; COSTENTIN, J.; VON POSER, G.L.; RATES S.M. Uliginosin B, a phloroglucinol derivative from *Hypericum polyanthemum*: a promising new molecular pattern for the development of antidepressant drugs. **Behav Brain Res**, v. 228 (1), p. 66-73, 2012.

STOLZ, E.D.; HASSE, D.R.; VON POSER, G.L.; RATES, S.M. Uliginosin B, a natural phloroglucinol derivative, presents a multimediated antinociceptive effect in mice. **J Pharm Pharmacol**, v. 66, n. 12, p. 1774-85, 2014.

STOLZ, E.D.; VIANA, A.F.; HASSE, D.R.; VON POSER, G.L.; DO REGO, J.C.; RATES, S.M. Uliginosin B presents antinociceptive effect mediated by dopaminergic

and opioid systems in mice. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 39, n.1, p. 80-7, 2012.

STOLZ, EVELINE. Estudo do mecanismo de ação antinociceptiva de uliginosina B. Tese de doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2015.

SU, G.Y.; YANG, J.Y.; WANG, F.; XIONG, Z.L.; HOU, Y.; ZHANG, K.; SONG, C.; MA, J.; SONG, S.J.; TENG, H.F.; WU, C.F. Xiao chai hu tang prevents depressive-like behaviour in Rodents by enhancing the serotonergic system. **J Pharm Pharmacol**, v. 66, n. 6, p. 823- 34, 2014.

VIANA, A.; DO REGO, J.C.; VON POSER, G.; FERRAZ, A.; HECKLER, A.P., COSTENTIN, J.; RATES, S.M. The antidepressant-like effect of *Hypericum caprifoliatum* Cham & Schlecht (Guttiferae) on forced swimming test results from an inhibition of neuronal monoamine uptake. **Neuropharmacology**, v. 49, n. 7, p. 1042-52, 2005.

VIANA, A.F.; HECKLER, A.P.; FENNER, R.; RATES, S.M. Antinociceptive activity of *Hypericum caprifoliatum* and *Hypericum polyanthemum* (Guttiferae). **Braz J Med Biol Res**, v. 36, n. 5, p. 631-4, 2003.

VIANA, A.F.; DO REGO, J. C., MUNARI, L.; DOURMAP, N.; HECKLER, A.P.; COSTA, T.D.; VON POSER, G.L.; COSTENTIN, J.; RATES, S.M. *Hypericum caprifoliatum* (Guttiferae) Cham. & Schldl.: a species native to South Brazil with antidepressant-like activity. **Fundam Clin Pharmacol**, v. 20, n. 6, p. 507-14, 2006. Review.

WESTERINK BH. Brain microdialysis and its application for the study of animal behaviour. **Behav Brain Res.**, v. 70, n. 2, p, 103-24, 1995. Review.

WOOD, P. L.; ALTAR, C. A. Dopamine release in vivo from nigrostriatal, mesolimbic, and mesocortical neurons: utility of 3-methoxytyramine measurements. **Pharmacol Rev**, v. 40, n. 3, p. 163-87, 1988.

YOSHITAKE, T.; IZUKA, R.; YOSHITAKE, S.; WEIKPOP, P.; MULLER, W.E.; OGREN, S.O.; KEHR, J. *Hypericum perforatum* L (St John's Wort) preferentially increases extracellular dopamine levels in the rat prefrontal cortex. **British Journal of Pharmacology**, v. 142, p.414-418, 2004.

CAPÍTULO II

Uliginosin B, a Natural Phloroglucinol, Increases Hippocampal GSH, MCP-1 and IL-10 Levels in Mice

O Capítulo 2 é constituído por artigo científico publicado, conforme referência abaixo, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 94 – 119.

Marangon, C.G., Rojas, C.S., Michelsen, M.Z. et al. Uliginosin B, a Natural Phloroglucinol, Increases Hippocampal GSH, MCP-1 and IL-10 Levels in Mice. *Rev. Bras. Farmacogn.* (2023). <https://doi.org/10.1007/s43450-023-00459-7>.

Este capítulo foi publicado na *Revista Brasileira de Farmacognosia* (2023), sob doi, <https://doi.org/10.1007/s43450-023-00459-7>. Em suma, o objetivo deste estudo foi investigar o efeito da uliginosina B, um floroglucinol dimérico, nos marcadores inflamatórios (IL-6, IL-10, MCP-1, IFN- γ , TNF e IL-12p70) e do estresse oxidativo (conteúdo da glutathiona reduzida, sulfidrilas, espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico e atividade da catalase) no modelo de comportamento de doente (sickness behavior) e do comportamento tipo deprimido induzidos por LPS precedido do estresse da natação forçada em camundongos CF1. Os resultados demonstram que a uliginosina B não protegeu os camundongos do sickness behavior, no entanto, este floroglucinol dimérico apresentou um efeito protetor parcial no comportamento do tipo depressivo induzido por LPS precedido da natação forçada, no teste de suspensão pela cauda. Ainda, os dados mostram que a uliginosina B induz um aumento nos níveis da IL-10, glutathiona reduzida e de MCP-1. Dessa forma, este estudo sugere que as vias imunoinflamatórias e antioxidantes podem desempenhar um papel no efeito antidepressivo da uliginosina B.

DISCUSSÃO FINAL E CONCLUSÃO

A depressão atualmente se apresenta como uma patofisiologia multifatorial envolvendo vias de sinalização interrelacionadas que afetam os sistemas de neurotransmissores (dopamina, serotonina e noradrenalina), imune (citocinas), endócrino (eixo HPA), oxidativo e genético (Najjar et al., 2013). Em vista disso, novas estratégias de tratamento se fazem necessárias na busca de tratamentos mais eficazes e seguros.

O gênero *Hypericum* é rico em floroglucínóis e tem despertado a atenção da comunidade científica e médica, especialmente a espécie européia *H. perforatum*, por suas propriedades antidepressivas, parcialmente creditadas à hiperforina, um floroglucinol monomérico (Schmidt and Butterweck, 2015). As espécies de *Hypericum*, nativas do Estado do RS, apresentam um padrão molecular promissor para o desenvolvimento de protótipos neuroativos, principalmente com atividade no Sistema Nervoso Central, conforme demonstrado em vários trabalhos do grupo (Viana, 2002; 2007; Viana et al., 2003; 2005; 2006; von Poser, Rech e Rates, 2006; Haas et al., 2010; Rates et al., 2010; Haas et al., 2011; Stolz, 2011; Centurião, 2012; Sakamoto, 2012; Stein, 2012; Stein et al., 2012; Stolz et al., 2012; Ccana-Ccapatinta, 2014; Ccana- Ccapatinta et al., 2014; Centurião et al., 2012; 2014). Dentre as espécies nativas, destacou-se o *Hypericum polyanthemum* e o seu principal constituinte, um derivado de acilfloroglucinol, a uliginosina B.

Os dados descritos para a ULI, até o presente, apontam seu efeito do tipo antidepressivo e antinociceptivo em roedores (Stein et al., 2012; Stolz et al., 2012). A ação antidepressiva envolve a ativação de receptores monoaminérgicos (Stein et al., 2012), enquanto o efeito antinociceptivo envolve a estimulação dopaminérgica da família D2 e indireta do sistema opióide (Stolz et al., 2012). No entanto, a ULI não se liga aos sítios monoaminérgicos em transportadores neuronais, nem mesmo nos receptores opióides e dopaminérgicos e não estimula a proteína G acoplada a estes receptores. Portanto, seu mecanismo de ação se mostra um tanto diferente e peculiar em relação à maioria dos antidepressivos clássicos.

O envolvimento da ULI na neurotransmissão monoaminérgica foi avaliado em um estudo *in vitro* que relatou que este floroglucinol inibiu a captação sinaptosomal de monoaminas no estriado (dopamina), córtex pré-frontal (serotonina) e hipotálamo

(noradrenalina) de ratos (Stein et al., 2012). Outro estudo prévio foi realizado visando investigar o efeito dos pré-tratamentos com inibidor da síntese de serotonina (*p*CPA) e antagonistas de receptores noradrenérgicos $\alpha 1$ (prazosina) e $\alpha 2$ (ioimbina) na atividade motora e antinociceptiva de camundongos. O efeito atáxico induzido por ULI foi prevenido parcialmente quando a síntese de serotonina foi inibida, enquanto que o antagonismo noradrenérgico não alterou o efeito deste floroglucinol (Stolz et al., 2012). Entretanto, a coadministração da ULI com clonidina, um agonista $\alpha 2$ -noradrenérgico, frequentemente utilizado como adjuvante na clínica para tratamento da dor evidenciou uma interação aditiva demonstrado pela análise isobolar, sugerindo que ambas as substâncias atuam em vias semelhantes e, provavelmente, envolvem a neurotransmissão noradrenérgica.

Outro estudo também avaliou o mecanismo de ação da ULI nos sistemas glutamatérgico (receptores NMDA) e purinérgico (receptores de adenosina e hidrólise do ATP, ADP e AMP), vias conhecidas por influenciar a disponibilidade de monoaminas. Os resultados indicam que o pré-tratamento com o antagonista NMDA (MK-801) impediu a ULI de aumentar a disponibilidade das monoaminas na fenda sináptica (Stolz et al., 2014) e que a ativação dos receptores A1 e A2A e a modulação da atividade da enzima ecto-5' nucleotidase contribuem para o efeito antinociceptivo da ULI (Stolz et al., 2016).

Desta forma, o enfoque deste trabalho visou aprofundar a investigação sobre o mecanismo de ação antidepressiva da ULI em relação à neurotransmissão monoaminérgica *in vivo* bem como a influência deste floroglucinol em processos subjacentes à neurobiologia da depressão como a inflamação e o estresse oxidativo.

Em estudos com modelos animais, a administração sistêmica de LPS, em doses que não cause sepsis, induz a expressão de citocinas pró-inflamatórias e consequentemente o comportamento de doente seguido do comportamento do tipo depressivo (Frenois et al., 2007, Ge et al., 2015). Este modelo clássico tem sido modificado de formas variadas, através da inclusão de agentes inflamatórios como interferon- α (Fischer et al., 2015), doses repetidas de LPS que induzem inflamação crônica (Kubera et al., 2013; Adzic et al., 2015) ou através da associação do LPS com

exposição ao estresse crônico moderado (Elgarf et al., 2014) visando estudar a depressão associada a neuroinflamação.

Nosso grupo adotou o modelo de Viana e colaboradores (2010), que introduziu a natação forçada como um estímulo estressor associado à administração de LPS em camundongos CF1, que são mais resistentes ao desafio imune. Com este modelo experimental e na dose de 15 mg/kg (v.o.), a ULI não foi capaz de reverter os sintomas do comportamento de doente, no entanto, protegeu os camundongos do comportamento tipo deprimido observado no teste de suspensão pela cauda. Na verdade, o efeito antidepressivo da ULI, bem como da IMI, observado no estudo atual pode ser considerado parcial, porque, embora o grupo de veículo pré-tratado com LPS tenha mostrado uma imobilidade significativamente maior do que o grupo tratado e pré-tratado com o veículo, não houve diferenças significativas entre as drogas pré-tratadas com veículo e com LPS. Ainda, este resultado pode estar relacionado com o tempo decorrido entre a administração do medicamento até a avaliação no TST, em que as drogas foram administradas 19 horas antes dos animais serem submetidos ao TST.

Assim, IMI e ULI não foram capazes de reverter os sintomas do comportamento de doente e induziram um aumento nos níveis hipocâmpais da IL-6, IL-10 e MCP-1 em 6 h após o desafio imune. Em relação a estes mediadores inflamatórios, a maioria dos estudos tem encontrado níveis séricos elevados da IL-6 na condição da depressão. A partir disso, podemos sugerir que neste estudo o aumento da citocina pró-inflamatória IL-6 foi dominante e mais relevante para provocar os déficits comportamentais observados induzidos pelo estresse da natação forçada aliado a administração de LPS nos camundongos CF1.

A IL-6 é uma citocina multifuncional produzida por imunócitos e outras células residentes no SNC tais como astrócitos, micróglia e neurônios (Sebire et al., 1993). Essa molécula endógena é conhecida por desempenhar um papel fundamental nos processos inflamatórios, em contrapartida, também está envolvida em uma série de efeitos anti-inflamatórios, como por exemplo, a indução da síntese de corticosteróides (Woloski et al., 1985).

A IL-6 é reconhecida por estimular o eixo HPA, resultando no aumento dos níveis de triptofano e no metabolismo de serotonina (Wang et al., 1998). Os níveis elevados da IL-6 em pacientes deprimidos é bem documentado na literatura sendo sugerido como marcador do estado biológico da depressão (O'Brien et al., 2004, Yoshimura et al., 2013). No entanto, estudos adicionais são necessários na tentativa de esclarecer melhor o seu papel no eixo HPA e a sua participação na sinalização da neurobiologia da depressão.

Nesta via de sinalização de moléculas do sistema imune envolvidas com a depressão, há evidências que a quimiocina MCP-1, possa agir como um agente neuromodulatório (Mélik-Parsadaniantz and Rostène, 2008; Madrigal et al., 2010). Mélik-Parsadaniantz and Rostène (2008), reportaram a coexistência de MCP-1 com importantes neurotransmissores como dopamina e acetilcolina. Ainda há poucos trabalhos que mostram sua relação com o cenário clínico deste distúrbio do humor (Lehto et al., 2010, Grassi-Oliveira et al., 2012). No entanto, alguns autores sugerem que a produção constitutiva de MCP-1 esteja vinculada a ações neuroprotetoras e a sua ausência no desenvolvimento de processos neurotóxicos (Madrigal et al., 2010).

A IL-10 vem ganhando destaque na literatura por seus efeitos no Sistema Nervoso Central em relação ao quadro depressivo. Entre eles podemos citar o envolvimento desta molécula na modulação do eixo HPA, visando a homeostase, através da inibição da produção de esteróides (Voorhee et al., 2013). Visto que a expressão reduzida desta citocina antiinflamatória poderá resultar na hiperatividade do eixo HPA e resistência aos glicocorticóides observada em pacientes depressivos. A IL-10 também tem a função de promover a redução da expressão das citocinas proinflamatórias, no processo inflamatório, além de indiretamente suprimir a expressão da IDO e assim restaurar os níveis de serotonina (Voorhee et al., 2013). Camundongos transgênicos que foram superexpressados com esta citocina antiinflamatória apresentaram redução no tempo de imobilidade no teste de natação forçada no comportamento tipo depressivo (Mesquita et al., 2008),

Com todos estes atributos, há autores que sugerem que a IL-10, bem como seu análogo sintético ou até mesmo moléculas que induzam seu aumento endógeno

possam ser considerados potenciais agentes terapêuticos no tratamento a depressão (Dhabhar et al., 2009; Roque et al., 2009).

Neste contexto, ensaios clínicos sugerem que os medicamentos antidepressivos interagem com as vias de sinalização imune inflamatória, mas os dados são inconsistentes e o mecanismo ainda não é compreendido (McNamara and Lotrich, 2012, Hannestad et al., 2011, Yirmiya et al., 2015). De maneira geral, experimentos pré clínicos têm mostrado que o tratamento com diferentes classes de antidepressivos reduzem a produção de citocinas pró inflamatórias induzidas por LPS, tais como TNF α e IL-6, protegem dos sintomas do comportamento de doente, bem como atenuam o desenvolvimento do comportamento tipo deprimido em roedores (Yirmiya, 1996, Yirmiya et al., 2001, Hashioka et al., 2007). Por outro lado, as doses e a forma de tratamento (agudo ou crônico) também podem influenciar na resposta a terapia (Yirmiya, 1996, Shen et al., 1999, Castanon et al., 2001).

Considerando todos estes achados da literatura citados acima e os resultados do presente estudo, podemos sugerir que o efeito antidepressivo da ULI poderia estar, pelo menos em parte, relacionado com a sua capacidade de aumentar IL-10 e MCP-1, mas que não pode ser demonstrado pelo uso de natação forçada (5 min) + LPS (450 μ g/kg, i.p.) para induzir comportamento de doente e o comportamento tipo depressivo em camundongos CF1, uma vez que neste cenário o aumento da IL-6 parece ser dominante e mais relevante para provocar os déficits comportamentais observados (Voorhees et al., 2013).

Interessantemente, alguns estudos têm mostrado que várias substâncias que apresentam efeitos neuroprotetores podem produzir efeitos antidepressivos em modelos animais preditivo de ação antidepressiva (Lauterbach et al., 2010). Acredita-se que o papel neuroprotetor destes agentes antioxidantes possa ser relevante na modulação das vias de sinalização na depressão (Shieh et al., 2008, Kutiyawalla et al., 2011). Nossos dados mostraram que a ULI induz um aumento de GSH e podemos inferir que este efeito também pode contribuir para o seu efeito antidepressivo.

A glutatona tem um importante papel protetor contra as espécies oxidativas no SNC (Gibson et al., 2012). Estudos têm mostrado níveis significativamente reduzidos de GSH no fluido cerebrospinal de pacientes com desordens psiquiátricas. Gawryluk

et al., 2011, encontraram níveis reduzidos de GSH no córtex pré frontal de pacientes com depressão *post mortem*, sugerindo que pacientes acometidos com este distúrbio do humor podem ser mais susceptíveis ao estresse oxidativo.

Nossos resultados mostraram que a IMI e a ULI induziram um aumento significativo nos níveis hipocâmpais de GSH apenas em animais não submetidos ao desafio imune, mas com um perfil temporal diferente. A IMI aumentou os níveis de GSH em 24 horas após o desafio imune, enquanto que a ULI foi ativa em 6 horas após o desafio imune. Este achado poderia estar relacionado a diferenças farmacocinéticas, mas é uma condição pouco provável. A meia-vida da IMI é de aproximadamente 50-70 min, no cérebro e plasma de camundongos e é rapidamente metabolizada ao seu metabólito ativo desmetilimipramina (DM1). Evidências mostram que após a administração de IMI (i.p.), o seu metabólito ativo, (DM1) é metabolizado aproximadamente à mesma taxa que a IMI em camundongos diferentemente do ocorrido em ratos e humanos nos quais o DM1 se acumula nos tecidos (Dingell et al., 1964). Não temos dados sobre a farmacocinética da ULI, mas sabemos que o efeito de uma única administração de ULI não tem efeito duradouro sobre o teste de suspensão pela cauda e na atividade da $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{-ATPase}$ em camundongos (Stein et al., 2016). Assim, estes diferentes perfis temporais de efeito podem indicar que ULI e IMI atuam por vias de sinalização distintas.

O efeito de ULI e IMI na atividade de GSH pode estar, pelo menos em parte, associado com a ação inibitória destas substâncias na recaptação neuronal de dopamina e norepinefrina (Stein et al., 2016). Visto que o metabolismo das monoaminas gera espécies reativas de oxigênio pelo aldeído DOPAL (3,4-dihidroxifenilacetaldeído), a depleção de GSH pode acarretar sérias conseqüências funcionais celulares. Embora a liberação das vesículas de armazenamento seja o processo preponderante, a inibição da recaptação com certeza reduz o conteúdo de dopamina citoplasmática disponível para a metabolização e o conseqüente estresse oxidativo (Marchitti et al., 2007).

Postula-se a depressão, em seu conceito clássico, como uma deficiência dos neurotransmissores principalmente, serotonina e noradrenalina. Acredita-se que o aumento extracelular destes dois neurotransmissores está relacionado com o efeito do

tratamento de antidepressivo. No entanto, evidências sugerem que a dopamina também está implicada na patogênese da depressão (Kapur e Mann, 1992; Papakostas, 2006) e vários medicamentos que estimulam a dopamina também mostram efeitos antidepressivos (Papakostas, 2006). A literatura mostra que estruturas cerebrais como córtex pré-frontal medial, núcleo accumbens e a região do estriado, apresentam projeções dopaminérgicas (Björklund and Dunnett, 2007) e, portanto, também estão relacionadas com a depressão (Konarski et al, 2008; Nestler e Carlezon, 2006).

Em relação às monoaminas biogênicas, o tratamento agudo com a ULI (30 mg/Kg) aumentou os níveis extracelulares de dopamina e ácido homovanílico (HVA), mas não alterou os níveis do ácido 3,4-di-hidroxifenilacético (DOPAC) e ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA) no estriado de ratos. O tratamento com a ULI não mostrou alteração nos níveis extracelulares de dopamina e seus metabólitos bem como de serotonina e seu metabólito no núcleo accumbens de ratos acordados. Esses resultados corroboram com estudos anteriores de nosso grupo (Munari, 2006, Viana et al., 2005 e 2006, Stein et al., 2012) e sugerem que os efeitos da ULI sobre a neurotransmissão monoaminérgica e a disponibilidade extracelular de monoaminas podem estar ligados à sua interação com estruturas cerebrais e vias neuronais específicas, sendo o estriado mais importante do que o núcleo accumbens para a ação desta molécula. Estes achados apontam para uma utilidade deste floroglucinol dimérico nos distúrbios dos gânglios basais dopaminérgicos como a doença de Parkinson.

A partir dos dados discutidos nesta tese e dos resultados obtidos com a ULI até o momento, podemos concluir que, não foi possível identificar um sítio de ação específico para este floroglucinol, que, no entanto, demonstra um perfil dependente da ativação de múltiplos circuitos de sinalização tais como monoaminérgico, glutamatérgico, opióide, adenosinérgico, balanço iônico, sistema imune e antioxidante com destaque para o aumento das moléculas endógenas IL-10 e glutathiona reduzida. Circuitos estes que apresentam importância diferenciada de acordo com o estímulo recebido pelo animal. Este perfil reforça a importância de estudos com a ULI visando um novo padrão molecular, promissor no desenvolvimento de novos fármacos “multialvo” com ação antidepressiva e/ou analgésica.

REFERÊNCIAS

ABDEL SALAM, OM.; MOHAMMED, NA.; SLEEM, AA.; FARRAG, AR. The effect of antidepressant drugs on thioacetamide-induced oxidative stress. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, v. 17, n. 6, p. 735-44, 2013.

ANDERZHANOVA, E.; WOTJAK, CT. Brain microdialysis and its applications in experimental neurochemistry. **Cell Tissue Res**. v. 354, n.1, p. 27-39, 2013. Review.

AKHONDZADEH, S.; JAFARI, S.; RAISI, F.; NASEHI, AA.; GHOREISHI, A.; SALEHI, B.; MOHEBBI-RASA, S.; RAZNAHAN, M.; KAMALIPOUR, A. Clinical trial of adjunctive celecoxib treatment in patients with major depression: a double blind and placebo-controlled trial. **Depress Anxiety**, v. 26, n. 7, p. 607-11, 2009.

ALLEN, SA.; REDNOUR, S.; SHEPARD, S.; POND, BB. A simple and sensitive high-performance liquid chromatography-electrochemical detection assay for the quantitative determination of monoamines and respective metabolites in six discrete brain regions of mice. **Biomed Chromatogr**. 2017.

BAKUNINA, N.; PARIANTE, CM.; ZUNSZAIN, PA. Immune mechanisms linked to depression via oxidative stress and neuroprogression. **Immunology**, v. 144, p. 365- 73, 2015.

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

BEN MENACHEM-ZIDON, O; GOSHEN, I.; KREISEL, T.; BEM MENAHEM, Y.; REINHARTZ, E.; BEN HUR, T.; YIRMIYA, R. Intrahippocampal transplantation of transgenic neural precursor cells overexpressing interleukin-1 receptor antagonist blocks chronic isolation-induced impairment in memory and neurogenesis. **Neuropsychopharmacology**, v. 33, n. 9, p. 2251-62, 2008.

BENVENISTE, H. Brain microdialysis. **J Neurochem.**, v. 52, n. 6, p.1667-79, 1989. Review.

BERNARDINO, L.; AGASSE, F.; SILVA, B.; FERREIRA, R.; GRADE, S.; MALVA, JO. Tumor necrosis factor-alpha modulates survival, proliferation, and neuronal differentiation in neonatal subventricular zone cell cultures. **Stem Cells**, v. 26, n. 9, p. 2361-71, 2008.

BERTON, O.; NESTLER EJ. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. **Nat Rev Neurosci.**, v. 7, n. 2, p.137-51, 2006. Review.

BICKER, J.; FORTUNA, A.; ALVES, G.; FALCÃO, A. Liquid chromatographic methods for the quantification of catecholamines and their metabolites in several biological samples--a review. **Anal Chim Acta**. v. 768, p. 12-34, 2013.

BIDEL, F.; CORVAISIER, S.; JOZET-ALVES, C.; POTTIER, I.; DAUPHIN, F.; NAUD, N.; BELLANGER, C. An HPLC-ECD method for monoamines and metabolites quantification in cuttlefish (cephalopod) brain tissue. **Biomed Chromatogr.** v, 30, n. 8, p. 1175-83, 2016.

BIESMANS, S.; MEERT, TF.; BOUWKNECHT, JÁ.; ACTON, PD.; DAVOODI, N.; DE HAES, P.; KUIJLAARS, J.; LANGLOIS, X.; MATTHEWS, LJ.; VER DONCK, L.; HELLINGS, N.; NUYDENS, R. Systemic immune activation leads to neuroinflammation and sickness behavior in mice. **Mediators Inflamm.** v. 2013:271359, p. 1-14, 2013.

BILICI, M.; EFE, H.; KÖROĞLU, MA.; UYDU, HÁ.; BEKAROĞLU, M.; DEĞER, O. Antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in major depression: alterations by antidepressant treatments. **J Affect Disord**, v. 64, n. 1, p. 43-51, 2001.

BJÖRKLUND, A.; DUNNETT, S.B. Dopamine neuron systems in the brain: an update. **Trends Neurosci.**, v. 30, p. 194–202, 2007.

BRIDI, H.; CCANA-CCAPATINTA, GV.; STOLZ, ED.; MEIRELLES, GC.; BORDIGNON, AS.; RATES, SM.; VON POSER, GL. Dimeric acylphloroglucinols from *Hypericum austrobrasiliense* exhibiting antinociceptive activity in mice. **Phytochemistry**, v. 122, p. 178-83, 2016.

BRUNELLO, N.; ALBONI, S.; BENATTI, C.; CAPONE, G.; TASCEDDA, F.; BLOM, JMC.; MENDLEWICZ, J. New combinations therapies from animal to human. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 15 (Suppl 3), p. S348, 2006.

BUNTINX, M.; MOREELS, M.; VANDENABEELE, F.; LAMBRICHTS, I.; RAUS, J.; STEELS, P.; STINISSEN, P.; AMELOOT, M. Cytokine-induced cell death in human oligodendroglial cell lines: I. Synergistic effects of IFN-gamma and TNF-alpha on apoptosis. **J Neurosci Res**, v. 76, n. 6, p. 834-45, 2004.

BUTTERWECK, V.; JÜRGENLIEMK, G.; NAHRSTEDT, A.; WINTERHOFF, H. Flavonoids from *Hypericum perforatum* show antidepressant activity in the forced swimming test. **Planta Med.** v. 66, n.1, p. 3-6, 2000.

CALABRESE, F.; ROSSETTI, AC.; RACAGNI, G.; GASS, P.; RIVA, MA, MOLTENI, R. Brain-derived neurotrophic factor: a bridge between inflammation and neuroplasticity. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 8, n. 430, p. 1-7, 2014.

CAMPBELL, S.; MACQUEEN, G. An update on regional brain volume differences associated with mood disorders. **Curr Opin Psychiatry**, v. 19, 25–33, 2006.

CAPURON, L.; DANTZER, R. Cytokines and depression: the need for a new CAPURON, L.; MILLER, AH. Immune system to brain signaling:

neuropsychopharmacological implications. **Pharmacol Ther**, v. 130, n. 2, p. 226-38, 2011. Review.

CCANA-CCAPATINTA, G.; de BARROS, F.M.C.; BRIDI, H.; VON POSER, G.L. Dimeric acylphloroglucinols in *Hypericum* species from sections *Brathys* and *Trigynobrathys*. **Phytochemistry**. Reviews. 14, 25–50, 2015.

CCANA-CCAPATINTA, G.V.; STOLZ, E.D.; DA COSTA, P.F.; RATES, S.M.; VON POSER, G.L. Acylphloroglucinol derivatives from *Hypericum andinum*: antidepressant like activity of andinin A. **J Nat Prod**, v. 77, n. 10, p. 2321-5, 2014.

CENTURIÃO, F. B. **Avaliação do efeito de derivados floroglucínóis presentes em *Hypericum caprifoliatum* sobre parâmetros glutamatérgicos e parâmetros relacionados à homeostasia dos íons sódio em roedores**. 2012. 143 (PhD). Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

CENTURIÃO, F.B.; BRAGA, A.; MACHADO, F.R.; TAGLIARI, B.; MÜLLER, L.G.; KOLLING, J.; POSER, G.V.; WYSE, A.T.; RATES, S.M. Study of antidepressant-like activity of an enriched phloroglucinol fraction obtained from *Hypericum caprifoliatum*. **Pharm Biol**. v. 52, n.1, p. 105-10, 2014.

CHATTERJEE, S.S.; NÖLDNER, M.; KOCH, E.; ERDELMEIER, C. Antidepressant activity of hypericum perforatum and hyperforin: the neglected possibility. **Pharmacopsychiatry**. v.31 Suppl 1:7-15, 1998.

COOPER, J.R.; BLOOM, F.E.; ROTH, R.H. **The biochemical basis of neuropharmacology**. 7.ed. New York: Oxford University Press, 1996.

CROUSHORE, C.A.; SWEEDLER, J.V. Microfluidic systems for studying neurotransmitters and neurotransmission. **Lab Chip**. v, 13, n. 9, p. 1666-76, 2013.

CYR, M, MORISSETTE, M; BARDEN, N; BEAULIEU, S; ROCHFORD J; DI PAOLO, T. Dopaminergic activity in transgenic mice under expressing glucocorticoid receptors: effect of antidepressants. **Neuroscience**., v. 102, n. 1, p. 151-8, 2001.

D'MELLO, C.; LE, T.; SWAIN, M.G. Cerebral microglia recruit monocytes into the brain in response to tumor necrosis factor alpha signaling during peripheral organ inflammation. **J Neurosci**, v. 29, p. 2089–2102, 2009.

DANNEHL, K.; RIEF, W.; SCHWARZ, M.J.; HENNINGS, A.; RIEMER, S.; SELBERDINGER, V.; STAPF, T.; EUTENEUER, F. The predictive value of somatic and cognitive depressive symptoms for cytokine changes in patients with major depression. **Neuropsychiatr Dis Treat**, v. 10, p. 1191-7, 2014.

DANTZER, R.; O'CONNOR, JC.; FREUND, GG.; JOHNSON, RW.; KELLEY, KW. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. **Nat Ver Neurosci.** v. 9, n.1, p. 46-56, 2008. Review.

DANTZER, R.; WOLLMAN, EE.; VITKOVIC, L.; YIRMIYA, R. Cytokines, stress, and depression. Conclusions and perspectives. **Adv Exp Med Biol**, v. 461, p. 317–329, 1999.

DE LA PEÑA, A.; LIU, P.; DERENDORF, H. Microdialysis in peripheral tissues. **Adv Drug Deliv Rev.** v. 15, n.2-3, p. 189-216, 2000. Review.

DE SOUZA, FG.; RODRIGUES, MD.; TUFIK, S.; NOBREGA, JN.; D'ALMEIDA, V. Acute stressor-selective effects on homocysteine metabolism and oxidative stress parameters in female rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 85, n. 2, p. 400-7, 2006.

DIAMOND, M.; KELLY, JP.; CONNOR, TJ. Antidepressants suppress production of the Th1 cytokine interferon-gamma, independent of monoamine transporter blockade. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 16, n.7, p. 481-90, 2006.

DI CHIARA, G.; LODDO, P.; TANDA, G. Reciprocal changes in prefrontal and limbic dopamine responsiveness to aversive and rewarding stimuli after chronic mild stress: implications for the psychobiology of depression. **Biol Psychiatry.**, v. 46, n. 12, p.1624- 33, 1999.

DIMOPOULOS, N.; PIPERI, C.; PSARRA, V.; LEA, RW.; KALOFOUTIS, A. Increased plasma levels of 8- iso-PGF₂α and IL-6 in an elderly population with depression. **Psychiatry Res**, v. 161, n.1, p. 59–66, 2008.

DOCZY, EJ.; SEROOGY, K.; HARRISON, CR.; HERMAN, JP. Hypothalamo-pituitaryadrenocortical axis, glucocorticoids, and neurologic disease. **Immunol Allergy Clin North Am**, v. 29, n. 2, p. 265-84, 2009.

DOWLATI, Y.; HERRMANN, N.; SWARDFAGER, W.; LIU, H.; SHAM, L.; REIM, EK.; LANCTÔT KL. A meta-analysis of cytokines in major depression. **Biol Psychiatry**, v. 67, n. 5, p. 446-57, 2010.

DREVETS, WC.; PRICE, J.; FUREY, ML. Brain and structural and functional abnormalities in mood disorder: implications for neurocircuitry models of depression. **Brain Struct Funct.** v. 213, p. 93-118, 2008.

DRINGEN, R. Metabolism and functions of glutathione in brain. **Prog Neurobiol**, v. 62, n. 6, p. 649-71, 2000. Review.

DUMAN, R.S.; MALBERG, J.; THOME, J. Neural plasticity to stress and antidepressant treatment. **Biological Psychiatry**, v. 46, n.9, p. 1181-1191, 1999.

DUNLOP, BW.; NEMEROFF, CB. The role of dopamine in the pathophysiology of depression. **Arch Gen Psychiatry**. v. 64, n.3, p. 327-37. 2007. Review.

DUNN, AJ.; SWIERGIEL, AH.; DE BEAUREPAIRE, R. Cytokines as mediators of depression: what can we learn from animal studies? **Neurosci Biobehav Ver**, v. 29, p. 891–909, 2005.

EREN, I.; NAZIROĞLU, M.; DEMIRDAŞ, A. Protective effects of lamotrigine, aripiprazole and escitalopram on depression-induced oxidative stress in rat brain. **Neurochem Res**, v. 32, n. 7, p. 1188-95, 2007.

ELHWUEGI, AS. Central monoamines and their role in major depression. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 28, n. 3, p. 435-51, 2004. Review.

FILLENZ, M. In vivo neurochemical monitoring and the study of behaviour. **Neurosci Biobehav Rev**. v. 29, n.6, p. 949-62, 2005. Review.

FLOYD, RA.; HENSLEY, K. Oxidative stress in brain aging. Implications for therapeutics of neurodegenerative diseases. **Neurobiol Aging**, v. 23, n. 5, p. 795-807, 2002. Review.

FORLENZA, M. J; MILLER, G. E. Increased serum levels of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine in clinical depression. **Psychosomatic Medicine**, v. 68, n. 1, p. 1–7, 2006.

FRENOIS, F.; MOREAU, M.; O'CONNOR, J.; LAWSON, M.; MICON, C.; LESTAGE, J.; KELLEY, KW.; DANTZER, R.; CASTANON, N. Lipopolysaccharide induces delayed FosB/DeltaFosB immunostaining within the mouse extended amygdala, hippocampus and hypothalamus, that parallel the expression of depressive-like behavior. **Psychoneuroendocrinology**, v. 32, n. 5, p. 516-31, 2007.

FREY, BN.; VALVASSORI, SS.; RÉUS, GZ.; MARTINS, MR.; PETRONILHO, FC.; BARDINI, K.; DAL-PIZZOL, F.; KAPCZINSKI, F.; QUEVEDO, J. Effects of lithium and valproate on amphetamine-induced oxidative stress generation in an animal model of mania. **J Psychiatry Neurosci**, v. 31, n. 5, p. 326-32, 2006.

GALEA, I.; BECHMANN, I.; PERRY, VH. What is immune privilege (not)? A review of how the brain immune response differs from that in other organs. **Trends Immunol**, v. 28, p. 12–18, 2007.

GAŁECKI, P.; SZEMRAJ, J.; BIEŃKIEWICZ, M.; FLORKOWSKI, A.; GAŁECKA, E. Lipid peroxidation and antioxidant protection in patients during acute depressive episodes and in remission after fluoxetine treatment. **Pharmacol Rep**, v. 61, n. 3, p.436- 47, 2009b.

GALECKI, P.; SZEMRAJ, J.; BIENKIEWICZ, M.; ZBORALSKI, K.; GAŁECKA, E. Oxidative stress parameters after combined fluoxetine and acetylsalicylic acid therapy in depressive patients. **Hum Psychopharmacol**, v. 24, p. 277–86, 2009a.

GALECKI, P.; GAŁECKA, E.; MAES, M.; CHAMIELEC, M.; ORZECZOWSKA, A.; BOBIŁSKA, K.; LEWIŃSKI, A.; SZEMRAJ, J. The expression of genes encoding for COX–2, MPO, iNOS, and sPLA2–IIA in patients with recurrent depressive disorder. **J Affect Disord**. v. 138, n. 3, p. 360–366, 2012.

GANDHI, S.; ABRAMOV, AY. Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration. **Oxid Med Cell Longev**, p. 1-11, 2012. Review.

GIBSON, AS.; KORADE, Ž.; SHELTON, RC. Oxidative stress and glutathione response in tissue cultures from persons with major depression. **J Psychiatr Res**, v. 46, n. 10, p. 1326-32, 2012.

GODBOUT, JP.; CHEN, J.; ABRAHAM, J.; RICHWINE, AF.; BERG, BM.; KELLEY, KW.; JOHNSON, RW. Exaggerated neuroinflammation and sickness behavior in aged mice following activation of the peripheral innate immune system. **FASEB J**, v. 19, n.10, p. 1329-31, 2005.

GODBOUT, JP.; MOREAU, M.; LESTAGE, J.; CHEN, J.; SPARKMAN, NL.; O'CONNOR, J.; CASTANON, N.; KELLEY, KW.; DANTZER, R.; JOHNSON, RW. Aging exacerbates depressive-like behavior in mice in response to activation of the peripheral innate immune system. **Neuropsychopharmacology**, v. 33, n. 10, p. 2341-51, 2008.

GOSHEN, I.; KREISEL, T.; BEN-MENACHEM-ZIDON, O.; LICHT, T.; WEIDENFELD, J.; BEN-HUR, T.; YIRMIYA, R. Brain interleukin-1 mediates chronic stress-induced depression in mice via adrenocortical activation and hippocampal neurogenesis suppression. **Mol Psychiatry**, v. 13, n. 7, p. 717-28.

GRASES, G.; COLOM, MA.; FERNANDEZ, RA.; COSTA-BAUZÁ, A.; GRASES, F. Evidence of higher oxidative status in depression and anxiety. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2014, p. 1-5, 2014.

GUO, JY.; LI, CY.; RUAN, YP.; SUN, M.; QI, XL.; ZHAO, BS.; LUO, F. Chronic treatment with celecoxib reverses chronic unpredictable stress-induced depressive-like behavior via reducing cyclooxygenase-2 expression in rat brain. **Eur J Pharmacol**, v. 612, n.1-3, p. 54-60.

HAAS, JS.; VIANA, AF.; HECKLER, AP.; VON POSER, GL.; RATES SM. The antinociceptive effect of a benzopyran (HP1) isolated from *Hypericum polyanthum* in mice hot-plate test is blocked by naloxone. **Planta Med**. v.76, n.13, p. 1419-23, 2010.

HAMON, M.; BLIER, P. Monoamine neurocircuitry in depression and strategies for new treatments. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 45, p. 54-63, 2013.

HANNESTAD, J.; DELLAGIOIA, N.; BLOCH, M. The effect of antidepressant medication treatment on serum levels of inflammatory cytokines: a meta-analysis. **Neuropsychopharmacology**, v. 36, n.12, p. 2452-9, 2011.

HAYDON, PG.; CARMIGNOTO, G. Astrocyte control of synaptic transmission and neurovascular coupling. **Physiol Ver**, v. 86, p. 1009-1031, 2006.

HERKEN, H.; GUREL, A.; SELEK, S.; ARMUTCU, F.; OZEN, ME.; BULUT, M.; KAP, O.; YUMRU, M.; SAVAS, HÁ.; AKYOL, O. Adenosine deaminase, nitric oxide, superoxide dismutase, and xanthine oxidase in patients with major depression: impact of antidepressant treatment. **Arch Med Res**, v. 38, n.2, p. 247-52, 2007.

HERSCHMAN, HR. Prostaglandin synthase 2. **Biochim Biophys Acta**, v. 1299, n.1, p.125-40, 1996. Review.

HIRSCHFELD, RM. History and evolution of the monoamine hypothesis of depression. **J Clin Psychiatry**, v. 61, Suppl 6, p. 4-6, 2000. Review.

HÖCHT, C.; OPEZZO, JÁ.; TAIRA, CA. Applicability of reverse microdialysis in pharmacological and toxicological studies. **J Pharmacol Toxicol Methods**, v. 55, n.1, p.3-15. 2007. Review.

HOLTZHEIMER, PE; MAYBERG, HS. Stuck in a rut: rethinking depression and its treatment. **Trends Neurosci**, v. 34, n.1, p. 1-9, 2011.

HORIKAWA, H.; KATO, TA.; MIZOGUCHI, Y.; MONJI, A.; SEKI, Y.; OHKURI, T.; GOTOH, L.; YONAHARA, M.; UEDA, T.; HASHIOKA, S.; KANBA, S. Inhibitory effects of SSRIs on IFN- γ induced microglial activation through the regulation of intracellular calcium. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 34, n.7, p. 1306-16, 2010.

IDA, T.; HARA, M.; NAKAMURA, Y.; KOZAKI, S.; TSUNODA, S.; IHARA, H. Cytokine-induced enhancement of calcium dependent glutamate release from astrocytes mediated by nitric oxide. **Neurosci Lett**, v. 432, p. 232-236, 2008.

IRIE, M.; MIYATA, M.; KASAI, H. Depression and possible cancer risk due to oxidative DNA damage. **J Psychiatr Res**, v. 39, n. 6, p.553-60, 2005.

JEON, SW; KIM, YK. Neuroinflammation and cytokine abnormality in major depression: Cause or consequence in that illness? **World J Psychiatry**, v. 6, n. 3, p. 283-93, 2016. Review.

KASPER, S.; CARACI, F.; FORTI, B.; DRAGO, F.; AGUGLIA, E. Efficacy and tolerability of *Hypericum* extract for the treatment of mild to moderate depression. **Eur Neuropsychopharmacol.** v, 20 n.11, p. 747-65, 2010.

KENIS, G.; MAES, M. Effects of antidepressants on the production of cytokines. **Int J Neuropsychopharmacol**, v. 5, n. 4, p. 401–12, 2002.

KHAN, SH.; SHUAIB, A. The technique of intracerebral microdialysis. **Methods**, v.23, p.3–9, 2001.

KHANZODE, SD.; DAKHALE, GN.; KHANZODE, SS.; SAOJI, A.; PALASODKAR, R. Oxidative damage and major depression: the potential antioxidant action of selective serotonin re-uptake inhibitors. **Redox Rep**, v. 8, n.6, p. 365-70, 2003.

KODYDKOVÁ, J.; VÁVROVÁ, L.; ZEMAN, M.; JIRÁK, R.; MACÁSEK, J.; STANKOVÁ, B. et al. Antioxidative enzymes and increased oxidative stress in depressive women. **Clin Biochem**, v. 42, n. 13–14, p.1368–74, 2009.

KONARSKI, J.Z.; MCINTYRE, R.S.; KENNEDY, S.H.; RAFI-TARI, S.; SOCZYNSKA, J.K.; KETTER, T.A. Volumetric neuroimaging investigations in mood disorders: bipolar disorder versus major depressive disorder. **Bipolar Disord.** v.10, p.1–37, 2008.

KOO, JW.; DUMAN, RS. IL-1beta is an essential mediator of the antineurogenic and anhedonic effects of stress. **Proc Natl Acad Sci**, v. 105, n. 2, p. 751-6, 2008.

KRAUS, MM.; PHILIPPU, A. Use of Push-Pull Superfusion Technique for Identifying Neurotransmitters Involved in Brain Functions: Achievements and Perspectives. **Curr Neuropharmacol.** v. 13, n. 6, p. 819-29, 2015. Review.

KUBERA, M.; HOLAN, V.; MATHISON, R.; MAES, M. The effect of repeated amitriptyline and desipramine administration on cytokine release in C57BL/6 mice. **Psychoneuroendocrinology**, v. 25, n. 8, p. 785–97, 2000a.

KUBERA, M.; KENIS, G.; BOSMANS, E.; KAJTA, M.; BASTA-KAIM, A.; SCHARPE, S.; BUDZISZEWSKA, B.; MAES, M. Stimulatory effect of antidepressants on the production of IL-6. **Int Immunopharmacol**, v. 4, n. 2, p. 185–92, 2004.

KUBERA, M.; OBUCHOWICZ, E.; GOEHLER, L.; BRZESZCZ, J.; MAES, M. Animal models of depression: evidence for neuroinflammation, neurodegeneration and disturbance in neurogenesis. **Progr Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry**, 2010.

KURIAN, MA.; GISSEN, P.; SMITH, M.; HEALES S, JR.; CLAYTON, PT. The monoamine neurotransmitter disorders: an expanding range of neurological syndromes. **Lancet Neurol**. v. 10, n. 8, p. 721-33, 2011. Review.

LEE, AL.; OGLE, WO.; SAPOLSKY, RM. Stress and depression: possible links to neuron death in the hippocampus. **Bipolar Disord**, v. 4, n. 2, p. 117-28, 2002. Review.

LEONARD, BE. Impact of inflammation on neurotransmitter changes in major depression: an insight into the action of antidepressants. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 48, p. 261-7, 2014. Review.

LESTAGE, J.; VERRIER, D.; PALIN, K.; DANTZER, R. The enzyme indoleamine 2,3- dioxygenase is induced in the mouse brain in response to peripheral administration of lipopolysaccharide and superantigen. **Brain Behav Immun**, v. 16, n. 5, p. 596-601, 2002.

LIU, D.; WANG, Z.; LIU, S.; WANG, F.; ZHAO, S.; HAO, A. Anti-inflammatory effects of fluoxetine in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated microglial cells. **Neuropharmacology**, v. 61 n.4, p. 592-9, 2011.

LUCCA, G.; COMIM, CM.; VALVASSORI, SS.; RÉUS, GZ.; VUOLO, F.; PETRONILHO, F.; GAVIOLI, EC.; DAL-PIZZOL, F.; QUEVEDO, J. Increased oxidative stress in submitochondrial particles into the brain of rats submitted to the chronic mild stress paradigm. **J Psychiatr Res**, v. 43, n. 9, p. 864-9, 2009.

LUYKX, JJ.; BAKKER, SC.; LENTJES, E.; BOKS, MP.; VAN GELOVEN, N.; EIJKEMANS, MJ.; JANSON, E.; STRENGMAN, E.; DE LEPPER, AM.; WESTENBERG, H.; KLOPPER, KE.; HOORN, HJ.; GELISSEN, HP.; JORDAN, J.; TOLENAAR, NM.; VAN DONGEN, EP.; MICHEL, B.; ABRAMOVIC, L.; HORVATH, S.; KAPPEN, T.; BRUINS, P.; KEIJZERS, P.; BORGDORFF, P.; OPHOFF, RA.; KAHN, RS. Season of sampling and season of birth influence serotonin metabolite levels in human cerebrospinal fluid. **PLoS One**. v. 7, n. 2, e30497, 2012.

MACHADO-VIEIRA, R.; ANDREAZZA, AC.; VIALE, CI.; ZANATTO, V.; CERESER, V JR.; DA SILVA VARGAS, R.; KAPCZINSKI, F.; PORTELA, LV.; SOUZA, DO.; SALVADOR, M.; GENTIL, V. Oxidative stress parameters in unmedicated and treated bipolar subjects during initial manic episode: a possible role for lithium antioxidant effects. **Neurosci Lett**, v. 421, n. 1, p. 33-6, 2007.

MAES, M.; GALECK, I P.; CHANG, YS.; BERK, M. A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro)degenerative processes in that illness. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 35, n. 3, p. 676-92, 2011. Review.

MAES, M.; MIHAYLOVA, I.; KUBERA, M.; UYTTERHOEVEN, M.; VRYDAGS, N.; BOSMANS, E. Increased 8-hydroxy-deoxyguanosine, a marker of oxidative damage to DNA, in major depression and myalgic encephalomyelitis / chronic fatigue syndrome. **Neuro Endocrinol Lett**, v. 30, n.6, p. 715-22, 2009.

MAES, M.; VANDOOOLAEGHE, E.; VAN HUNSEL, F.; BRIL, T.; DEMEDTS, P.; WAUTERS, A.; NEELS, H. Immune disturbances in treatment-resistant depression: Modulation by antidepressive treatment. **Human Psychopharmacol**, v. 12, p. 153–162, 1997.

MAZEREEUW, G.; HERRMANN, N.; ANDREAZZA, AC.; KHAN, MM.; LANCTÔT, KL. A meta-analysis of lipid peroxidation markers in major depression. **Neuropsychiatr Dis Treat**, v. 29, n. 11, p. 2479-91, 2015. Review.

MENDLEWICZ, J.; KRIWIN, P.; OSWALD, P.; SOUERY, D.; ALBONI, S.; BRUNELLO, N. Shortened onset of action of antidepressants in major depression using acetylsalicylic acid augmentation: a pilot open-label study. **Int Clin Psychopharmacol**, v. 21 n.4, p. 227-31, 2006.

MICHEL, TM.; PÜLSCHEN, D.; THOME, J. The role of oxidative stress in depressive disorders. **Curr Pharm Des**, v. 18, n. 36, p. 5890-9, 2012.

MILLER, AH. Mechanisms of cytokine-induced behavioral changes: Psychoneuroimmunology at the translational interface [published online ahead of print September 3]. **Brain Behav Immun**, 2009.

MISAKI, M; SUZUKI, H; SAVITZ, J; DREVETS, WC; BODURKA J. Individual Variations in Nucleus Accumbens Responses Associated with Major Depressive Disorder Symptoms. **Sci Rep.**, v. 16, n. 6, p.21227, 2016.

MITALA, CM.; WANG, Y.; BORLAND, LM.; JUNG, M.; SHAND, S.; WATKINS, S.; WEBER, SG.; MICHAEL, AC. Impact of microdialysis probes on vasculature and dopamine in the rat striatum: a combined fluorescence and voltammetric study. **J Neurosci Methods**. v.174 n.2, p. 177-85, 2008.

MOREAU, M.; LESTAGE, J.; VERRIER, D.; MORMEDE, C.; KELLEY, KW.; DANTZER, R.; CASTANON, N. Bacille Calmette-Guérin inoculation induces chronic activation of peripheral and brain indoleamine 2,3-dioxygenase in mice. **J Infect Dis**, v. 192, n. 3, p. 537-44, 2005.

MÜLLER, N.; SCHWARZ, MJ. The immune-mediated alteration of serotonin and glutamate: towards an integrated view of depression. **Mol Psychiatry**, v. 12, n. 11, p. 988-1000, 2007. Review.

MÜLLER, N.; SCHWARZ, MJ. COX-2 inhibition in schizophrenia and major depression. **Curr Pharm Des**, v. 14, n.14, p. 1452-65, 2008. Review.

NADJAR, A.; BLUTHE, RM.; MAY, MJ.; DANTZER, R.; PARNET, P. Inactivation of the cerebral NF κ B pathway inhibits interleukin-1 β -induced sickness behavior and c-Fos expression in various brain nuclei. **Neuropsychopharmacology**, v. 30, p. 1492–1499, 2005.

NAJJAR, S; PEARLMAN, DM; DEVINSKY, O; NAJJAR, A; ZAGZAG, D. Neurovascular unit dysfunction with blood-brain barrier hyperpermeability contributes to major depressive disorder: a review of clinical and experimental evidence. **J Neuroinflammation**. v, 10:142., 2013. Review.

NANDI, P.; LUNTE, SM. Recent trends in microdialysis sampling integrated with conventional and microanalytical systems for monitoring biological events: a review. **Anal Chim Acta**. v. 651, n.1, p. 1-14, 2009.

NESTLER, EJ.; CARLEZON WA, JR. The mesolimbic dopamine reward circuit in depression. **Biol Psychiatry**., v. 59, n.12, p. 1151-9, 2006. Review.

NG, F.; BERK, M.; DEAN, O.; BUSH, AI. Oxidative stress in psychiatric disorders: evidence base and therapeutic implications. **Int J Neuropsychopharmacol**, v. 11, n. 6, p. 851-76, 2008.

NGUYEN, MD.; VENTON, BJ. Fast-scan Cyclic Voltammetry for the Characterization of Rapid Adenosine Release. **Comput Struct Biotechnol J**. v. 13, p. 47-54, 2014. Review.

O'BRIEN, SM.; SCOTT, LV.; DINAN, TG. Cytokines: abnormalities in major depression and implications for pharmacological treatment. **Hum Psychopharmacol**, v. 19, n. 6, p. 397-403, 2004. Review.

O'CONNOR, JC.; LAWSON, MA.; ANDRÉ, C.; MOREAU, M.; LESTAGE, J.; CASTANON, N.; KELLEY, KW.; DANTZER, R. Lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase activation in mice. **Mol Psychiatry**, v. 14, n. 5, p. 511-22, 2009.

OHGI, Y.; FUTAMURA, T.; KIKUCHI, T.; HASHIMOTO, K. Effects of antidepressants on alternations in serum cytokines and depressive-like behavior in mice after lipopolysaccharide administration. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 103 n.4, p. 853- 9, 2013.

OMAR, ME.; ABDEL-SALAM, SM.; MORSY, Y.; SLEEM, AA. The effect of different antidepressant drugs on oxidative stress after lipopolysaccharide administration in mice. **EXCLI J**, v. 10, p. 290–302, 2011.

OMS- Organização Mundial da Saúde, 2015. Global burden of disease: update 2015. Disponível em: http://www.who.int/topics/global_burden_of_disease/en/. Acesso em mar. 2016.

OWEN, AJ.; BATTERHAM, MJ.; PROBST, YC.; GRENYER, BF.; TAPSELL, LC. Low plasma vitamin E levels in major depression: diet or disease? **Eur J Clin Nutr**, v. 59, n. 2, p. 304–6, 2005.

OZCAN, ME.; GULEC, M.; OZEROL, E.; POLAT, R.; AKYOL, O. Antioxidant enzyme activities and oxidative stress in affective disorders. **International Clinical Psychopharmacology**, v. 19, p. 89–95, 2004.

PACE, TW.; HU, F.; MILLER, AH. Cytokine-effects on glucocorticoid receptor function: Relevance to glucocorticoid resistance and the pathophysiology and treatment of major depression. **Brain Behav Immun**, v. 21, p. 9–19, 2007.

PACE, TW.; MILLER, AH. Cytokines and glucocorticoid receptor signaling. Relevance to major depression. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1179, p. 86–105, 2009.

PALLIS E; THERMOS K; SPYRAKI, C. Chronic desipramine treatment selectively potentiates somatostatin-induced dopamine release in the nucleus accumbens. **Eur J Neurosci.**, v. 14, p. 763–767, 2001.

PARIANTE, C.M.; LIGHTMAN, S.L. The HPA axis in major depression: classical theories and new developments. **Trends Neurosci.**, v. 31, p. 464–468, 2008.

PARIANTE, CM.; MILLER, AH. Glucocorticoid receptors in major depression: relevance to pathophysiology and treatment. **Biol Psychiatry**, v. 49, n. 5, p. 391-404, 2001. Review.

PLOCK, N.; KLOFT, C. Microdialysis--theoretical background and recent implementation in applied life-sciences. **Eur J Pharm Sci.**, v. 25, n. 1, p. 1-24, 2005. Review.

PRICE, JL.; DREVETS, WC. Neural circuits underlying the pathophysiology of mood disorders. **Trends Cogn Sci.**v.16, p. 61–71, 2012.

RAISON, CL.; CAPURON, L.; MILLER, AH: Cytokines sing the blues: Inflammation and the pathogenesis of major depression. **Trend Immunol**, v. 27, p. 24–31, 2006.

RAMOS, S. Cancer chemoprevention and chemotherapy: dietary polyphenols and signalling pathways. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 52, n. 5, p. 507–526, 2008.

RATES, S.M.K.; VON POSER, G.L.; VIANA, A.F.; COSTENTIN, J.; DO REGO, J.C. **Plant extract, useful to treat mood disorders, depression, and/or nervous system disorders, comprises compound belonging to the class of phloroglucinols and/or benzopyrans, where the plant extract is obtained from *Hypericum polyanthemum*.** 2010. Patent Number: WO2010092162-A1.

RAWDIN, BJ.; MELLON, SH.; DHABHAR, FS.; EPEL, ES.; PUTERMAN, E.; SU, Y.; BURKE, HM.; REUS, VI.; ROSSER, R.; HAMILTON, SP.; NELSON, JC.; WOLKOWITZ, OM. Dysregulated relationship of inflammation and oxidative stress in major depression. **Brain Behav Immun.** v. 31, p. 143-52, 2013.

RENARD, CE; FIOCCO, AJ; CLENET, F; HASCOET, M; BOURIN, M. Is dopamine implicated in the antidepressant-like effects of selective serotonin reuptake inhibitors in the mouse forced swimming test? **Psychopharmacology (Berl).**, v. 159, n.1, p. 42-50, 2001.

RÉUS, GZ.; STRINGARI, RB.; DE SOUZA, B.; PETRONILHO, F.; DAL-PIZZOL, F.; HALLAK, JE.; ZUARDI, AW.; CRIPPA, JÁ.; QUEVEDO, J. Harmine and imipramine promote antioxidant activities in prefrontal cortex and hippocampus. **Oxid Med Cell Longev**, v. 3, n. 5, p. 325-31, 2010.

ROCHA, L.; MARSTON, A.; KAPLAN, MA.; STOECKLI-EVANS, H.; THULL, U.; TESTA, B.; HOSTETTMANN, K. An antifungal gamma-pyrone and xanthenes with monoamine oxidase inhibitory activity from *Hypericum brasiliense*. **Phytochemistry.** v. 36, n.6, p.1381-5, 1994.

RUSSO, SJ.; NESTLER, EJ. The Brain Reward Circuitry in Mood Disorders. **Nature reviews Neuroscience.** v. 14, n. 9, p. 1-34, 2013.

SAIRANEN, M.; O'LEARY, OF.; KNUUTTILA, JE.; CASTRÉN, E. Chronic antidepressant treatment selectively increases expression of plasticity-related proteins in the hippocampus and medial prefrontal cortex of the rat. **Neuroscience.**, v. 5-144, n.1, p. 368-74, 2006.

SALES, AJ.; BIOJONE, C.; TERCETI, MS.; GUIMARÃES, FS.; GOMES, MV.; JOCA, SR. Antidepressant-like effect induced by systemic and intra-hippocampal administration of DNA methylation inhibitors. **Br J Pharmacol.** , v. 164, n.6, p.1711-21, 2011.

SANACORA, G.; GUEORGUIEVA, R.; EPPERSON, CN.; WU, YT.; APPEL, M.; ROTHMAN, DL.; KRYSTAL, JH.; MASON, GF. Subtype-specific alterations of gamma aminobutyric acid and glutamate in patients with major depression. **Arch Gen Psychiatry**, v. 61, n. 7, p. 705-13, 2004.

SANCHEZ, MM.; ALAGBE, O.; FELGER, JC.; ZHANG, J.; GRAFF, AE.; GRAND, AP.; MAESTRIPIERI, D.; MILLER, AH. Activated p38 MAPK is associated with decreased CSF 5-HIAA and increased maternal rejection during infancy in rhesus monkeys. **Mol Psychiatry**, v. 12, n. 10, p. 895-7, 2007.

SAPOLSKY RM. The possibility of neurotoxicity in the hippocampus in major depression: a primer on neuron death. **Biol Psychiatry**, v. 48, n. 8, p. 755-65, 2000.

SARANDOL, A.; SARANDOL, E.; EKER, SS.; ERDINC, S.; VATANSEVER, E.; KIRLI, S. Major depressive disorder is accompanied with oxidative stress: short-term antidepressant treatment does not alter oxidative-antioxidative systems. **Human Psychopharmacology**, v. 22, p. 67–73, 2007b.

SARRIS, J.; KAVANAGH, DJ. Kava and St. John's Wort: current evidence for use in mood and anxiety disorders. **J Altern Complement Med.**, v.15, n.8, p.827-36, 2009. Review.

SCHIEPERS, OJ., WICHERS, MC., MAES, M. Cytokines and major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, v. 29, n. 2, p. 201-17. Review. Erratum in: **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**. v. 29, n. 4, p. 637-8, 2005.

SCHMIDT, M.; BUTTERWECK, V. The mechanisms of action of St. John's wort: na update. **Wien Med Wochenschr.** v. 165 n.11-12, p. 229-35, 2015. Review.

SCHOU-PEDERSEN, AM.; HANSEN, SN.; TVEDEN-NYBORG, P.; LYKKESFELDT, J. Simultaneous quantification of monoamine neurotransmitters and their biogenic metabolites intracellularly and extracellularly in primary neuronal cell cultures and in sub-regions of guinea pig brain. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.** v. 1028, p. 222-30, 2016.

SEIDEL, A.; AROLT, V.; HUNSTIGER, M.; RINK, L.; BEHNISCH, A.; KIRCHNER, H. Cytokine production and serum proteins in depression. **Scand J Immunol**, v. 41, n. 6, p. 534–8, 1995.

SILVERMAN, MN.; PEARCE, BD.; BIRON, CA.; MILLER, AH. Immune modulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis during viral infection. **Viral Immunol**, v.18, n. 1, p. 41-78, 2005. Review.

SLUZEWSKA, A.; RYBAKOWSKI, J.; BOSMANS, E.; SOBIESKA, M.; BERGHMANS, R.; MAES, M.; WIKTOROWICZ, K. Indicators of immune activation in major depression. **Psychiatry Res**, v. 64, p. 161–167, 1996.

SRIVASTAVA, N.; BARTH WAL, MK.; DALAL, PK.; AGARWAL, AK.; NAG, D.; SETH, PK, et al. A study on nitric oxide, beta-adrenergic receptors and antioxidant status in the polymorphonuclear leukocytes from the patients of depression. **J Affect Disord**, v. 72, n. 1, p. 45–52, 2002.

STHAL, S. M. **Stahl's Essential Psychopharmacology: Neuroscientific Basis and Practical Applications**. New York: Cambridge University Press, 2008. ISBN 9780511447990.

STEIN, A.; MÜLLER, LG.; FERREIRA, AGK.; BRAGA, ANDRESSA.; BETTI, AH.; CENTURIÃO, FB.; SCHERER, EB.; KOLLING, J.; VON POSER, GL.; WYSE, ATS.; RATES, SM. Uliginosin B, a natural phloroglucinol derivative with

antidepressant-like activity, increases Na⁺,K⁺-ATPase activity in mice cerebral cortex. **Rev. Bras. Farmacogn.** v.26, n.5, p. 611-618, 2016.

STEIN, AC.; VIANA, AF.; MÜLLER, LG.; NUNES, JM.; STOLZ, ED.; DO REGO, JC.; COSTENTIN, J.; VON POSER, GL.; RATES SM. Uliginosin B, a phloroglucinol derivative from *Hypericum polyanthemum*: a promising new molecular pattern for the development of antidepressant drugs. **Behav Brain Res.**, v. 228, n.1, p. 66-73, 2012.

STOLZ, ED.; VIANA, AF.; HASSE, DR.; VON POSER, GL; DO REGO, JC.; RATES, S.M. Uliginosin B presents antinociceptive effect mediated by dopaminergic and opioid systems in mice. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.** v. 39, n.1, p. 80-7, 2012.

STOLZ, ED.; DA COSTA, PF.; MEDEIROS, LF.; SOUZA, A.; BATTASTINI, AMO; VON POSER, GL.; BONAN, C.; TORRES, ILS.; RATES, SM. Uliginosin B, a Possible New Analgesic Drug, Acts by Modulating the Adenosinergic System. **Evidence- Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016, p.1-8, 2016.

SZUSTER-CIESIELSKA, A.; SŁOTWIŃSKA, M.; STACHURA, A.; MARMUROWSKA-MICHAŁLOWSKA, H.; DUBAS-SLEMP, H.; BOJARSKA-JUNAK, A. et al. Accelerated apoptosis of blood leukocytes and oxidative stress in blood of patients with major depression. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 32, n. 3, p. 686–94, 2008.

TAMMINGA, C.A.; NEMEROFF, C.B.; BLAKELY, R.D.; BRADY, L.; CARTER, C.S.; DAVIS, K.L.; DINGLEDINE, R.; GORMAN, J.M.; GRIGORIADIS, D.E.; HENDERSON, D.C.; INNIS, R.B.; KILLEN, J.; LAUGHREN, T.P.; MCDONALD, W.M.; MURPHY, G.M.; PAUL, S.M.; RUDORFER, M.V.; SAUSVILLE, E.; SCHATZBERG, A.F.; SCOLNICK, E.M; SUPPE, T. Developing novel treatments for mood disorders: accelerating discovery. **Biological Psychiatry**, v. 52, p. 589-609, 2002.

TILLEUX, S.; HERMANS, E. Neuroinflammation and regulation of glial glutamate uptake in neurological disorders. **J Neurosci Res**, v. 85, p. 2059– 2070, 2007.

TONELLI, L.H.; HOLMES, A.; POSTOLACHE, TT. Intranasal immune challenge induces sex-dependent depressive-like behavior and cytokine expression in the brain. **Neuropsychopharmacology**, v. 33, n. 5, p. 1038–1048, 2008.

TRIVEDI, MH et al. Evaluation of outcomes with citalopram for depression using measurement-based care in STAR*D: implications for clinical practice. **Am J Psychiatry**, v.163, n.1, p. 28-40, 2006.

TSUBOI, H.; TATSUMI, A.; YAMAMOTO, K.; KOBAYASHI, F.; SHIMOI, K.; KINAE, N. Possible connections among job stress, depressive symptoms, lipid modulation and antioxidants. **J Affect Disord**, v. 91, n. 1, p. 63–70, 2006.

TSUNODA, M. Recent advances in methods for the analysis of catecholamines and their metabolites. **Anal Bioanal Chem.** v. 386, n. 3, p. 506-14, 2006. Review.

UNGERSTEDT, U., PYCOCK, C. Functional correlates of dopamine neurotransmission. **Bull. Schweiz. Akad. Med. Wiss.** v. 30, p. 44–55, 1984.

UNGERSTEDT, U.; HALLSTRÖM, A. In vivo microdialysis--a new approach to the analysis of neurotransmitters in the brain. **Life Sci.**, v. 41, n. 7, p. 861-4, 1987.

VALAVANIDIS, A.; VLACHOGIANNI, T.; FIOTAKIS, C. 8-hydroxy-2' deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. **J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Ver**, v. 27, n. 2, p. 120-39, 2009.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, MT.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 39, n.1, p. 44-84, 2007. Review.

VIANA, A. F. et al. *Hypericum caprifoliatum* (Guttiferae) Cham. & Schltld.: a species native to South Brazil with antidepressant-like activity. **Fundam Clin Pharmacol**, v. 20, n. 6, p. 507-14, 2006. ISSN 0767-3981.

VIANA, A.; DO REGO, JC.; VON POSER, G.; FERRAZ, A.; HECKLER, AP.; COSTENTIN, J.; KUZE, RATES SM. The antidepressant-like effect of *Hypericum caprifoliatum* Cham & Schlecht (Guttiferae) on forced swimming test results from an inhibition of neuronal monoamine uptake. **Neuropharmacology**, v. 49, n.7, p. 1042-52, 2005.

VOGELZANGS, N.; DUIVIS, HE.; BEEKMAN, AT.; KLUFT, C.; NEUTEBOOM, J.; HOOGENDIJK, W.; SMIT, JH.; DE JONGE, P.; PENNINX, BW. Association of depressive disorders, depression characteristics and antidepressant medication with inflammation. **Transl Psychiatry**, v. 2:e79, p. 1-9, 2012.

VOINOV, B.; RICHIE, WD.; BAILEY, RK. Depression and chronic diseases: it is time for a synergistic mental health and primary care approach. **Prim Care Companion CNS Disord**, v.15, n.2, 2013.

WALKER, AK.; BUDAC, DP.; BISULCO, S.; LEE, AW.; SMITH, RA.; BEENDERS, B.; KELLEY, KW.; DANTZER, R. NMDA receptor blockade by ketamine abrogates lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior in C57BL/6J mice. **Neuropsychopharmacology.**, v. 38, n.9, p. 1609-16, 2013.

WANG, J.; DUNN, AJ. Mouse interleukin-6 stimulates the HPA axis and increases brain tryptophan and serotonin metabolism. **Neurochem Int.** n.2, p.143-54, 1998.

WEST, AR.; FLORESCO, SB.; CHARARA, A.; ROSENKRANZ, JÁ.; GRACE, AA. Electrophysiological interactions between striatal glutamatergic and dopaminergic systems. **Ann NY Acad Sci.**, v.1003, p. 53–74, 2003.

WESTERINK, BHC; DAMSMA, G; ROLLEMA, H; DE VRIES, JB; HORN, AS. Scope and limitations of in vivo brain dialysis: A comparison of its application to various neurotransmitter systems. **Life Sci**, v.41, p.1763–1776, 1987.

WESTERINK, BH. Brain microdialysis and its application for the study of animal behaviour. **BehavBrain Res.**, v.70, n.2, p. 103-24, 1995. Review.

WESTERINK, BHC.; JUSTICE, JB, JR. Microdialysis compared with other in vivo release models. In: ROBINSON, TE.; JUSTICE, JB., Jr, editors. **Microdialysis in the Neurosciences**. New York: Elsevier Science, 1991. p. 23-43.

WICHERS, MC.; KENIS, G.; KOEK, GH.; ROBAEYS, G.; NICOLSON, NA.; MAES, M. Interferon alpha-induced depressive symptoms are related to changes in the cytokine network but not to cortisol. **J Psychosom Res**, v. 62, p. 207–214, 2007.

WISE, RA. Neuroleptics and operant behavior: The anhedonia hypothesis. **Behav Brain Sci**. v. 5, p. 39–87, 1982.

WOLOSKI, BM; SMITH, EM; MEYER, WJ 3RD; FULLER, GM; BLALOCK, JE. Corticotropin-releasing activity of monokines. **Science**. v.29-230, n.4729, p.1035-7, Nov 1985.

WU, CW.; CHEN, YC.; YU, L.; CHEN, HI.; JEN, CJ.; HUANG, AM.; TSAI, HJ.; CHANG, YT.; KUO, YM. Treadmill exercise counteracts the suppressive effects of peripheral lipopolysaccharide on hippocampal neurogenesis and learning and memory. **J Neurochem**, v. 103, n. 6, p. 2471-81.

XIA, Z.; DEPIERRE, JW.; NÄSSBERGER, L. Tricyclic antidepressants inhibit IL-6, IL-1 beta and TNF-alpha release in human blood monocytes and IL-2 and interferongamma in T cells. **Immunopharmacology**, v. 34, n. 1, p. 27-37, 1996.

YADID, G; OVERSTREET, DH; ZANGER, A. Limbic dopaminergic adaptation to a stressful stimulus in a rat model of depression. **Brain Res.**, v. 896, p. 43– 47, 2001.

YIRMIYA R. Endotoxin produces a depressive-like episode in rats. **Brain Res**, v. 711, n. 1-2, p. 163-74, 1996.

YIRMIYA, R.; POLLAK, Y.; BARAK, O.; AVITSUR, R.; OVADIA, H.; BETTE, M.; WEIHE, E.; WEIDENFELD, J. Effects of antidepressant drugs on the behavioral and physiological responses to lipopolysaccharide (LPS) in rodents. **Neuropsychopharmacology**, v. 24, n. 5, p. 531-44, 2001.

YOSHIMURA, R.; HORI, H.; IKENOUCI-SUGITA, A.; UMENE-NAKANO, W.; KATSUKI, A.; ATAKE, K.; NAKAMURA, J. Plasma levels of interleukin-6 and selective serotonin reuptake inhibitor response in patients with major depressive disorder. **Hum Psychopharmacol.** v.28, n.5, p.466-70, 2013.

ZAFIR, A.; ARA, A.; BANU, N. In vivo antioxidant status: a putative target of antidepressant action. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 33, n. 2, p. 220-8, 2009.

ZHU, CB.; LINDLER, KM.; OWENS, AW, DAWS, LC.; BLAKELY, RD, HEWLETT, WA. Interleukin-1 receptor activation by systemic lipopolysaccharide induces behavioral despair linked to MAPK regulation of CNS serotonin transporters. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, n. 13, p. 2510–2520, 2010.

ANEXOS



U F R G S
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

Comissão De Ética No Uso De Animais



CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 18518

Título: ESTUDO DO EFEITO DE HYPERICUM POLYANTHEMUM SOBRE A NEUROTRANSMISSÃO MONOAMINÉRGICA

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

GILSANE LINO VON POSER - coordenador desde 01/10/2008
STELA MARIS KUZE RATES - coordenador desde 01/10/2008
Alice Fialho Viana - pesquisador de 10/06/2010 até 31/07/2012
Caroline Guerra Marangon - pesquisador desde 01/04/2013

Equipe Externa:

Jean Claude do Rego - pesquisador desde 01/10/2008

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo, em reunião realizada em 19/07/2010 - NA SALA DE REUNIÕES, DO 6º ANDAR DO PRÉDIO DA REITORIA, NO CAMPUS CENTRAL DA UFRGS., em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 240 camundongos machos, linhagem CF1 e 144 ratos Wistar machos, de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa.

Porto Alegre, Quarta-Feira, 20 de Agosto de 2014

P/

CRISTIANE MATTE
Vice Coordenador da comissão de ética

José Carlos Frantz
Pró-Reitor de Pesquisa
PROPEQ/UFRGS



UFRGS
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
Comissão De Ética No Uso De Animais



CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 26494

Título: AVALIAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO ANTIDEPRESSIVA DO EXTRATO DO Hypericum polyanthemum E DO SEU DERIVADO FLOROGLUCINOL, ÚLIGINOSINA B

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

STELA MARIS KUZE RATES - coordenador desde 01/04/2013
GILSANE LINO VON POSER - pesquisador desde 01/04/2013
MARIA FLAVIA MARQUES RIBEIRO - pesquisador desde 01/04/2013
ANDREIA BUFFON - pesquisador desde 01/04/2013

Equipe Externa:

Carmem Regla Vargas - pesquisador desde 01/04/2013
Sâmia Joca - pesquisador desde 01/04/2013

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 540 camundongos Swiss machos, de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa.

Porto Alegre, Quinta-Feira, 15 de Maio de 2014

Cristiane Matte

CRISTIANE MATTE
Vice Coordenador da comissão de ética