

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

**Avaliação do mecanismo de ação antidepressiva e estudo
da toxicidade oral aguda e de doses repetidas de
Hypericum polyanthemum em camundongos**

Ana Cristina Stein

Porto Alegre, Julho de 2012.

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

**Avaliação do mecanismo de ação antidepressiva e estudo
da toxicidade oral aguda e de doses repetidas de
Hypericum polyanthemum em camundongos**

**Tese apresentada por Ana Cristina
Stein para obtenção do TÍTULO DE
DOUTOR em Ciências Farmacêuticas**

Orientador: Profa. Dr. Stela Maris Kuze Rates
Co-orientador: Profa. Dr. Angela Terezinha de Souza Wyse

Porto Alegre, Julho de 2012

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 18 de julho de 2012, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Alexandre de Barros Falcão Ferraz
Universidade Luterana do Brasil

Profa. Dr. Ana Lúcia Severo Rodriguez
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Dr. Maria Flávia Marques Ribeiro
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Stein, Ana Cristina

Avaliação do mecanismo ação antidepressiva e estudo da toxicidade de *Hypericum polyanthemum* em camundongos. / Ana Cristina Stein. -- 2012.
112 f.

Orientadora: Stela Maris Kuze Rates.

Coorientadora: Angela Terezinha de Souza Wyse.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2012.

1. *Hypericum polyanthemum*. 2. *uliginosina* B. 3. Na⁺, K⁺, -ATPase. 4. atividade antidepressiva. 5. toxicidade. I. Kuze Rates, Stela Maris, orient. II. de Souza Wyse, Angela Terezinha, coorient. III. Título.

Este trabalho foi desenvolvido nos laboratórios: Psicofarmacologia Experimental e no Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da UFRGS e no Laboratório de Neuroproteção de Doenças Metabólicas, Departamento de Bioquímica-ICBS, da UFRGS, com apoio financeiro do Programa da Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas- UFRGS, Acordo CAPES/COFECUB nº 656/09 e CNPq. O autor recebeu bolsa de estudos do CNPq.

**Aos meus pais,
José e Teresinha,
por me fortalecer com
seu amor,
compreensão
e apoio incondicionais**

Luciana Burkt (*in memoriam*),

**A lembrança da tua
amizade e a saudade
serão eternas**

Agradecimentos

A Deus, pela linda e abençoada VIDA que me deu.

À Prof. Stela Rates, minha orientadora e amiga, que me transformou em uma pessoa mais sábia, crítica, independente e que, sobretudo, amadureceu-me cientificamente! Obrigada por tudo!

À Prof. Ângela Wyse, que me aceitou como co-orientanda durante o andamento do trabalho, abriu portas para novos e promissores resultados e fortalecimento de uma amizade.

À Prof. Eliane Dallegrave, pelo apoio e enorme conhecimento transmitido nos experimentos de toxicidade.

A todos os Professores do PPGCF, à Gilsane Von Poser, que me fez tomar gosto pela pesquisa, desde o mestrado e à Alice Viana, que me ensinou a 'amar' o Poly!

Aos colegas, funcionários e alunos da URI-Frederico Westphalen que me acolheram e reforçam, a cada dia que passa, a paixão e o desafio que eu sinto pela docência.

Às amigas e colegas, mais que especiais, do LAB 505 C: minha querida, inspiradora e super amiga Andresa Betti, obrigada pela amizade e transmissão de conhecimentos incessante. Liz Müller, meu anjinho, tua presença, amizade e forma de trabalhar são especiais. Andressa Braga, minha pequena grande amiga, tua solicitude será sempre marcante. Fernanda Centurião, 'meu par' desde o início, obrigada pelo carinho e apoio. Camila Boque, tua sinceridade, inteligência e amizade reforçam a admiração que tenho por ti. Milene Borsoi, conviver contigo é um constante aprendizado e é um tanto divertido! Eveline Stolz e Luisa Salles, obrigada pela amizade e apoio em tantos momentos difíceis. Vivian Herzfeld, a "Vivita" e ao Diego Hasse, obrigada pela ajuda nos experimentos e pelo bom humor contagiante.

À minha amiga, colega, parceira e 'chefe' nos experimentos comportamentais crônicos, Mariana Pranke, foi um aprendizado maravilhoso e um prazer maior ainda ter te conhecido melhor.

Aos colegas de doutorado que se tornaram amigos, Mônica Duarte, Marina Scopel, Eduardo Konrath, Francisco Maikon, Madson Ralide, Jéssica Nunes. A lembrança da boa convivência e amizade ficará para sempre!

À minha amiga Simone Adriana Podkowa, com suas “inovadoras” idéias de modelos animais de depressão, obrigada pelo apoio e amizade incondicional.

À Andréa Kurek Ferreira, ao Adenilton Ferreira e a Francieli Stefanello, amigos mais do que especiais, especialmente à Déia, que sempre me apoiou e me guiou pelo melhor caminho.

Aos meus amigos para sempre e de todas as horas: Luana Schneider (minha ‘bisne’ querida), Fabine Waskiewics, Ana Sperling, Caiçara Miranda, Lara Simone Rusczyk, Jéferson, Laerte Rusczyk, Gelson Iob, Danilo Nascimento, Maurício Lundgren. Alguns, mesmo longe, obrigada pela paciência e amizade verdadeira.

Meus amigos de São Chico, Márcia e Rafaela Andelieri, Leandro, Carmem e Silvério Heitelvan, Regiane e Marcelo Minichelli, Ilca Andelieri, Isaura Müller, Karen Martini, Claudia Andelieri, Vânia Oliveira, Mariangela, Lilian, Daiana e Rodrigo Damin. Tenho vocês sempre em meu coração.

À grande família Stein, todos os meus queridos tios e especialmente meus primos e amigos Débora e Tiago Stein, Mônica Weber, Cris Bastian e a Camilinha, que deixa grande saudade.

Ao Jean Heitelvan, pela forma doce e alegre com a qual me contagia e torna o nosso relacionamento cada dia mais saudável e feliz. Obrigada pelo teu amor e carinho! Te amo!

Ao meu irmão Alexandre Stein e cunhada (e amiga) Rose Antes Stein; meu irmão e parceiro Renan Stein, minha mana Ângela Stein e meu cunhado (e amigo) Eduardo Castelã, obrigada pelo apoio de vocês, que foi sempre fundamental. Amo vocês!

Finalmente, José e Teresinha Stein, meus queridos e amados pais, agradeço infinitamente por tudo que me proporcionaram, incentivaram, e por quem me torno hoje. Meu objetivo de vida é ser o reflexo do amor que vocês tem por mim, em tudo o que eu fizer. Amo muito vocês!

“O amor é o centro da personalidade humana; ele é o dínamo gerador de toda a ação, seja no universo exterior, ou principalmente na vida interna. O verdadeiro amor não exige nada, ele só quer a construção e o bem, seja do próximo ou de si mesmo; quem ama, perdoa, compreende, sabe seus limites, não é inconveniente - o amor revela o equilíbrio, ele é a própria sanidade.”

Norberto R. Keppe

RESUMO

Avaliação do mecanismo de ação antidepressiva e estudo da toxicidade oral aguda e de doses repetidas de *Hypericum polyanthemum* em camundongos. O objetivo deste trabalho foi ampliar o estudo do mecanismo de ação antidepressivo de *Hypericum polyanthemum* (POL) e de seu composto derivado da classe dos floroglucínóis uliginosina B (ULI). Considerando o potencial desta planta para o desenvolvimento de novos fármacos, realizou-se um estudo pré-clínico de toxicidade aguda e doses repetidas de POL em camundongos. A administração via oral (v.o.) do extrato ciclo-hexano de POL (90 mg/kg) foi capaz de reduzir significativamente o tempo de imobilidade de ratos e camundongos no teste de natação forçada (TNF). A administração de ULI (10 mg/kg, v.o.) igualmente reduziu o tempo de imobilidade no TNF e também no teste de suspensão pela cauda (TSC). A administração simultânea (v.o.), das subdoses de POL (45 mg/kg) e ULI (5 mg/kg) foram capazes de potencializar o efeito antidepressivo das subdoses de imipramina (10 mg/kg), bupropiona (3 mg/kg) e fluoxetina (15 mg/kg), no TNF em camundongos. O pré-tratamento de camundongos, pela via intraperitoneal, com SCH 23390 (antagonista de receptor dopaminérgico D₁); sulpirida (antagonista de receptor dopaminérgico D₂); prazosin (antagonista de receptor α_1 -adrenérgico); ioimbina (antagonista de receptor α_2 -adrenérgico) e p-clorofenilalanina metil éster (pCPA- inibidor da síntese de serotonina (5-HT), preveniu o efeito anti-imobilidade de ULI no TNF. *In vitro*, ULI inibiu a recaptção sinaptossomal de dopamina ([³H]-DA), noradrenalina ([³H]-NA) e serotonina ([³H]-5-HT), sem ligação aos transportadores, e isto foi demonstrado através das diferentes concentrações de ULI que não afetaram a ligação de [³H]-mazindol, [³H]-nisoxetina e [³H]-citalopram aos sítios de recaptção de DA, NA e 5-HT, respectivamente. Estes resultados sugerem que ULI tem ação não-seletiva sobre o sistema monoaminérgico, o que pode representar um novo composto com inibição tripla da recaptção; além disso possui mecanismo de ação diferente dos antidepressivos clássicos, inibindo a recaptção das monoaminas sem se ligar aos respectivos sítios específicos dos transportadores. Também realizou-se estudo bioquímico da atividade da Na⁺,K⁺-ATPase em córtex cerebral e hipocampo de camundongos. O tratamento agudo e repetido por via oral (3 dias, 1 x ao dia) aumentou a atividade desta enzima em córtex cerebral de camundongos em

diferentes tempos. ULI não alterou a atividade da Na^+, K^+ -ATPase em hipocampo dos camundongos, e esse resultado corrobora com a hipótese de que ULI pode estar contribuindo para a manutenção da excitabilidade neuronal estimulando esta enzima, e agindo seletivamente no córtex cerebral. Além disso, investigou-se o papel de ULI sobre os canais de sódio dependentes de voltagem (Na^+), através da pré-administração de veratrina (ativador de canal de Na^+). A veratrina bloqueou o efeito antidepressivo de ULI no TNF e este resultado indica a possibilidade de ULI estar bloqueando os canais de Na^+ alterando o gradiente iônico através da estimulação da atividade da Na^+, K^+ -ATPase e, prejudicando ou inibindo a recaptação das monoaminas. Nos experimentos de toxicidade, as mudanças fisiológicas, bioquímicas e histopatológicas mais pronunciadas foram observadas nos camundongos que receberam POL nas doses 5 e/ou 10 vezes maiores que a dose efetiva no TNF em camundongos. Entretanto, POL apresenta constituição química diferente de *H. perforatum*, sugerindo baixo risco desta espécie em relação à fototoxicidade (ausência de hipericina). Através dos dados obtidos neste estudo, acredita-se que POL pode se tornar uma espécie promissora no desenvolvimento de um novo fitoterápico com ação neuroativa. A inibição da recaptação das monoaminas pode estar relacionada a uma alteração do gradiente iônico de Na^+ , através da estimulação da atividade da Na^+, K^+ -ATPase, o que leva a crer que ULI possui um perfil de ação lamotrigina-like. Dessa forma, ULI torna-se um novo e promissor padrão molecular de substância com atividade no sistema nervoso central.

Palavras-chave: *Hypericum polyanthemum*; uliginosina B; neurotransmissão monoaminérgica; atividade antidepressiva; toxicidade; Na^+, K^+ -ATPase, veratrina.

ABSTRACT

Evaluation of the antidepressant mechanism of action and oral toxicity study of *Hypericum polyanthemum* in mice. The aim of this work was to continue studying the antidepressant mechanism of *Hypericum polyanthemum* (POL) and its compound derived from phloroglucinols class uliginosin B (ULI). Considering the potential for development of new drugs with this plant, a preclinical study of toxicity with POL was accomplished, administering acute and repeated-doses in mice. The cyclo-hexane extract administration by oral route (p.o.) of POL (90 mg/kg) was able to significantly reduce the immobility time of rats and mice in the forced swimming test (FST). ULI (10 mg/kg, p.o.) also produced a reduction in immobility time in two models predictive of antidepressant activity in mice, FST and the tail suspension test (TST). Simultaneously administration (p.o) of subeffective doses of POL (45 mg/kg) and ULI (5 mg/kg) were able to potentiate the antidepressant effect of subeffective dose of imipramine (10 mg/kg), bupropion (3 mg/kg) and fluoxetine (15 mg/kg), in the mouse FST. The pretreatment of mice, by i.p. route, with SCH 23390 (dopamine D₁ receptor antagonist); sulpiride (dopamine D₂ receptor antagonist); (α₁ adrenoceptor antagonist); yohimbine (α₂ adrenoceptor antagonist) and p-chlorophenylalanine methyl ester (pCPA- an inhibitor of serotonin (5-HT) synthesis) prevented anti-immobility effect of ULI in FST. *In vitro*, ULI inhibited synaptosomal uptake of dopamine ([³H]-DA), noradrenaline ([³H]-NA) and 5-HT ([³H]-5-HT), without binding with monoaminergic transporters, and this was demonstrated by different concentrations of ULI that did not affect the binding of [³H]-mazindol, [³H]-nisoxetine and [³H]-citalopram to DA, NA and 5-HT uptake sites, respectively. These results suggest that ULI has non-selective action on the monoaminergic system, which may represent a new compound with triple reuptake inhibition; furthermore, ULI has a mechanism of action different from the classical antidepressants by inhibiting monoamine reuptake without bind to respective neurotransmitters. In addition we have performed a biochemical study for activity of Na⁺, K⁺-ATPase in cerebral cortex and hippocampus of mice. Acute and repeated oral treatment (3 days, 1 x per day) increased enzyme activity in cortex at different times. ULI did not alter Na⁺, K⁺-ATPase activity in hippocampus, and this result confirms the hypothesis that ULI can be contributing to the maintenance of neuronal excitability by stimulating this enzyme, and acting selectively in cerebral cortex. Moreover, we investigated the role

of ULI on voltage-gated sodium channels (Na^+), through pre-administration of veratrine (Na^+ channel opener). Veratrine was able to abolish the antidepressant effect of ULI in TNF and this result indicates the possibility that ULI blocks the Na^+ channels by altering the ionic gradient through the stimulation of Na^+ , K^+ -ATPase and impairing or inhibiting the reuptake of monoamines. In toxicity experiments, the more pronounced physiological, biochemical and histopathological changes were observed in mice that received POL at doses 5 and/or 10 fold higher than the effective dose in TNF. However, POL has chemically different from *H. perforatum*, suggesting low risk of this species in relation to phototoxicity (absence of hypericin). Considering all results, we supposed that POL could be a product with potential for the development of new drugs. The monoamine reuptake inhibition can be related to a change on the gradient of Na^+ ion, by stimulation of Na^+ , K^+ -ATPase, which suggests that ULI has a lamotrigine-like profile. Therefore, we suggest that phloroglucinol derivative ULI represents a promising new molecular pattern with central nervous system activity.

Key-words: *Hypericum polyanthemum*; uliginosin B; monoaminergic neurotransmission; antidepressant activity; toxicity; Na^+ , K^+ , -ATPase, veratrine.

SUMÁRIO

PARTE I	21
1. Apresentação	23
2. Objetivos	25
3. Revisão da literatura	27
PARTE II: Resultados Experimentais	35
Capítulo 1: Uliginosin B, a phloroglucinol derivative from <i>Hypericum polyanthemum</i> : A promising new molecular pattern for the development of antidepressant drugs.	37
Capítulo 2: Uliginosin B, a natural phloroglucinol derivative with antidepressant-like activity, affects differently the activity of Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase in cerebral cortex and hippocampus of mice.	41
Capítulo 3: Acute and repeated-doses toxicity study of <i>Hypericum polyanthemum</i> Klotzsch ex Reichardt (Guttiferare) in mice.	47
PARTE III: DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES	51
REFERÊNCIAS	61
ANEXOS	71

PARTE I

APRESENTAÇÃO

OBJETIVOS

REVISÃO

1. APRESENTAÇÃO

A partir de 1998, foi iniciada no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS, uma linha de pesquisa visando à investigação química e farmacológica das espécies de *Hypericum* nativas do Rio Grande do Sul. Desenvolvida pelo laboratório de Psicofarmacologia Experimental, sob a responsabilidade da Profa. Dr. Stela Maris Kuze Rates e pelo laboratório de Farmacognosia, sob responsabilidade da Profa. Dr. Gilsane Lino Von Poser, a ferramenta utilizada foi uma abordagem quimiotaxonômica para a busca de moléculas bioativas em produtos naturais, através dos dados existentes na literatura para a espécie *Hypericum perforatum*.

Em tese de doutorado de Viana (2007), desenvolvida neste Programa de Pós-Graduação, a espécie *H. polyanthemum* mostrou resultados promissores quanto à atividade antidepressiva. No estudo se verificou que o principal derivado floroglucinol desta espécie, identificado como uliginosina B (ULI) é uma das moléculas responsáveis pela atividade antidepressiva. As propriedades neuroativas de *Hypericum polyanthemum*, incluindo a ação antidepressiva de uliginosina B, estão protegidas sob pedido de depósito de patente (Rates et al., 2010).

A maioria dos medicamentos antidepressivos disponíveis atualmente foram desenvolvidos com base nos antidepressivos tricíclicos (ADT) e inibidores da monoaminoxidase (IMAO), suportados na teoria monoaminérgica da depressão (Berton e Nestler, 2006). Novos agentes que atuam no sistema monoaminérgico de maneira mais específica foram desenvolvidos, como os antidepressivos de segunda geração e os atípicos, que apresentam efeitos adversos mais brandos e são mais bem tolerados pelos pacientes, porém não apresentam uma melhora substancial sobre sua eficácia, onde somente 50 % dos pacientes apresentam uma remissão completa dos sintomas desta doença (Berton e Nestler, 2006; Porcelli et al., 2011).

Além da abordagem sobre a teoria monoaminérgica, existem muitas evidências de que a atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase cerebral, bem como alterações nas concentrações de Na^+ relacionados aos canais de sódio dependentes de voltagem, que podem estar envolvidos na etiologia de transtornos mentais, como a depressão maior, depressão unipolar e a depressão bipolar

(Looney e El-Mallach, 1997; Goldstein et al., 2006; Goldstein et al., 2009; Hamid et al., 2009; Bourin et al., 2009).

Considerando a importância do papel da neurotransmissão monoaminérgica sobre os transtornos depressivos, bem como as alterações da Na^+, K^+ -ATPase e o desbalanço iônico de Na^+ , a proposta desta tese foi ampliar o estudo sobre a atividade antidepressiva de *Hypericum polyanthemum* e ULI sobre a neurotransmissão monoaminérgica. Além disso, investigou-se a ação de ULI sobre a enzima Na^+, K^+ -ATPase cerebral e sua influência sobre os canais de sódio dependentes de voltagem. Em vista dos relevantes resultados obtidos para a espécie quanto ao seu potencial de ação neuroativo, também realizou-se um estudo sobre a toxicidade oral aguda e de doses repetidas em camundongos.

Este trabalho gerou, até o momento, duas publicações em revistas internacionais, e um manuscrito em preparação para futura submissão. Dessa forma, a tese está estruturada em 3 capítulos, correspondente aos 3 manuscritos: Capítulo 1 é o artigo publicado na revista *Behavioural Brain Research*, intitulado “Uliginosin B, a phloroglucinol derivative from *Hypericum polyanthemum*: A promising new molecular pattern for the development of antidepressant drugs.” O Capítulo 2 é o manuscrito em preparação: “Uliginosin B, a natural phloroglucinol derivative with antidepressant-like activity, affects differently the activity of Na^+, K^+ -ATPase in cerebral cortex and hippocampus of mice.”. O capítulo 3 é o artigo publicado na revista *Food and Chemical Toxicology*: “Acute and repeated-doses toxicity study of *Hypericum polyanthemum* Klotzsch ex Reichardt (Guttiferaceae) in mice.”

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi aprofundar o estudo do mecanismo de ação antidepressiva do extrato ciclo-hexano de *Hypericum polyanthemum* (POL) e de seu derivado floroglucinol uliginosina B (ULI) e avaliar a toxicidade oral do extrato ciclo-hexano em camundongos.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Ampliar o estudo de POL e ULI no teste da natação forçada, em camundongos, através da avaliação do efeito dos tratamentos com POL e ULI em associação com antidepressivos de diferentes classes; e investigar o envolvimento de ULI sobre a neurotransmissão monoaminérgica utilizando antagonistas de receptores dopaminérgicos, noradrenérgicos e inibidor de síntese de serotonina.
- Investigar o efeito do tratamento com ULI sobre a atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase em córtex cerebral e hipocampo de camundongos.
- Avaliar o efeito de ULI sobre os canais de Na^+ dependentes de voltagem no teste de natação forçada em camundongos
- Avaliar o efeito da toxicidade oral aguda e repetida do extrato ciclo-hexano de *Hypericum polyanthemum* em camundongos.

3. REVISÃO DA LITERATURA

Os transtornos depressivos são os mais prevalentes dentre os transtornos psiquiátricos, causando sofrimento aos pacientes, sobrecarga familiar e alto risco de comportamento suicida (Möller et al., 2012). Juntamente com outros transtornos do humor, têm prevalência mundial de aproximadamente 18%, sendo considerada uma das doenças mentais mais incapacitantes e dispendiosas (Tamminga et al., 2002; Porcceli et al., 2011; Möller et al., 2012). Estudos mostram que um a cada 6 norte-americanos irá sucumbir à depressão clínica em algum período de sua vida (Kessler, 2005). Dados da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2008), relatam que a depressão unipolar é considerada a terceira doença mais incapacitante, em termos de 'anos de vida ajustados para incapacidade' (disability-adjusted life years - DALY's), e prevêem que em 2030 a depressão será a doença mais prevalente e com maior risco de suicídio.

Além dos índices de mortalidade associados à depressão (90% dos pacientes que cometem suicídio sofrem de depressão, WHO, 2008), pacientes depressivos são mais suscetíveis à doença arterial coronária e ao diabetes tipo II (Knol et al., 2006). Estes fatos levaram o governo norte-americano, através do Instituto Nacional de Doenças Mentais (NIMH) a criar, em 2002, um programa para descoberta de novos tratamentos para transtornos do humor (depressão maior e depressão bipolar) (Tamminga et al., 2002).

O cenário terapêutico atual é caracterizado por incompleto conhecimento sobre a fisiopatologia dos transtornos depressivos, bem como ineficácia da terapia farmacológica antidepressiva (Sinyor et al., 2010; Porcceli et al., 2011). Os medicamentos antidepressivos têm aliviado o sofrimento de milhares de pessoas, porém, estes agentes possuem limitações, como a demora da resposta ao tratamento (Rasmussen, 2006). Há uma necessidade de que se descubram tratamentos eficientes para as comorbidades relacionadas a este transtorno afetivo, como insônia, disfunção sexual, dessincronização do ciclo circadiano, cognição prejudicada e dor (Millan, 2009). Até o momento, décadas de pesquisa e investigações clínicas realizadas nesta área apontam para uma maior segurança dos fármacos utilizados para essa patologia, porém sem uma melhora substancial

sobre sua eficácia, o que torna necessária a criação de novos paradigmas e a identificação de novos compostos antidepressivos (Porcelli et al., 2011).

Os produtos naturais tem sido reconhecidos como fontes de grande parte dos ingredientes ativos de medicamentos (Harvey et al., 2006). Aproximadamente 25% dos fármacos prescritos em todo o mundo são derivados de produtos naturais (Wachtel-Galor e Benzie, 2011). Nos últimos anos, o gênero *Hypericum* (Guttiferae) tem despertado interesse dos pesquisadores na busca por novos tratamentos antidepressivos (Kasper et al., 2010). Esse interesse deve-se principalmente ao uso clínico de *Hypericum perforatum*, utilizado na Europa, Estados Unidos e América do Sul para o tratamento de depressão leve a moderada. Os extratos de *H. perforatum* (St. John's wort) possuem componentes com reconhecida atividade antidepressiva, como derivados floroglucinol (hiperforina), naftodiantronas (hipericina) e flavonóides (hiperosídeo), representados na figura 1 (Rocha et al., 1994; Chatterjee et al., 1998a; Butterweck et al., 2000; Kasper et al., 2010). Além disso, relatos sugerem que esses extratos podem ser efetivos no tratamento clínico para dependência de substâncias como álcool e tabaco (Uzbay, 2008; Ruedeberg et al., 2010).

Investigações químicas do gênero *Hypericum* têm levado ao isolamento de várias substâncias, entre as quais quinonas policíclicas, flavonóides, xantonas e derivados de floroglucinol (Von Poser et al., 2006). Entre as últimas substâncias isoladas, algumas são análogas à hiperforina, isolada de *Hypericum perforatum*, enquanto outras possuem uma unidade floroglucinol conjugada com ácido filicínico (Erdelmeier et al., 1998, Nör et al., 2004). A hiperforina tem sido relatada como uma das substâncias responsáveis pela atividade de *H. perforatum*, tanto em estudos pré-clínicos quanto em estudos clínicos (Chatterjee et al., 1998a; 1998b; Müller et al., 2001; 2003; Zanolli, 2004).

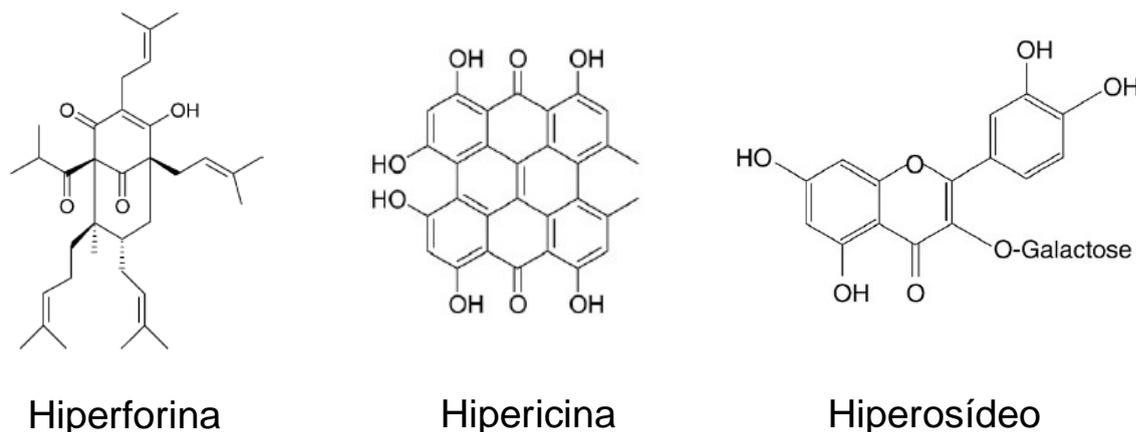


Figura 1. Estrutura dos principais compostos responsáveis pela atividade antidepressiva de *Hypericum perforatum*.

O mecanismo de ação de grande parte dos antidepressivos clássicos é através da inibição da recaptação das monoaminas, pelo bloqueio do sítio específico dos transportadores monoaminérgicos, ou por inibição da enzima monoaminoxidase, responsável pela degradação das monoaminas (Krishnan e Nestler, 2008). Estudos indicam que os extratos de *H. perforatum* atuam de modo diferente dos antidepressivos usuais (Bhattacharya et al., 1998; Chatterjee et al., 1998a; Kumar et al., 2000; Müller, 2003). Os extratos lipofílicos, bem como alguns componentes isolados (por exemplo, hiperforina) inibem a recaptação de noradrenalina (NA), serotonina (5-HT), dopamina (DA), ácido gama-aminobutírico (GABA) e glutamato, através de um mecanismo que não está diretamente relacionado ao bloqueio do sítio de recaptação desses neurotransmissores (Kaehler et al., 1999; Müller et al., 1998, 2001; Gobbi et al., 2001; Jensen et al., 2001). Alguns autores justificam a não seletividade do *H. perforatum* sobre o sistema monoaminérgico, sugerindo que a hiperforina inibe a recaptação vesicular de NA, 5-HT e DA através de alterações na condutividade dos canais de sódio (Singer et al., 1999), interferência na fluidez das membranas neuronais (Eckert; Müller, 2001; Eckert et al., 2004) e alteração sobre o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) (Butterweck et al., 2004; Murck et al., 2004).

O uso de espécies brasileiras de *Hypericum* pela população como antidepressivo não é documentado e estima-se a ocorrência de cerca de 20 espécies brasileiras de *Hypericum* (Von Poser et al., 2006). A partir das folhas e flores de *H. brasiliense* Choisy foram isoladas xantonas e derivados de floroglucinol.

Extratos contendo essas substâncias inibiram a enzima monoamino oxidase (MAO) (Rocha et al., 1994; 1995; 1996), mas não foram ativos no teste de natação forçada (TNF) em ratos (Mendes et al., 2002). Além disso, foi demonstrado que *H. caprifoliatum* e *H. polyanthemum* apresentam efeito antinociceptivo em roedores (Viana et al., 2003). Extratos, frações e substâncias isoladas dessas e de outras espécies também foram avaliados e mostraram atividade antiviral (Schmitt et al., 2001; Fritz et al., 2007), antibacteriana (Dall'Agnol et al., 2003; 2005), antifúngica (Fenner et al., 2005), carrapaticida (Ribeiro et al., 2007), antioxidante (Bernardi et al., 2007) e antiproliferativa (Ferraz et al., 2005a, 2005b).

As espécies do gênero *Hypericum* da região sul do Brasil mais amplamente distribuídas foram submetidas a um *screening* para verificar sua possível atividade antidepressiva: *H. brasiliense* Choisy, *H. caprifoliatum* Cham. & Schltldl, *H. carinatum* Griseb., *H. connatum* Lam., *H. cordatum* (Vell.) N. Robson, *H. myrianthum* Cham. & Schltldl., *H. polyanthemum* Klotzsch ex Reichardt e *H. ternum* A. St. Hil. (Daudt et al., 2000, Gnerre et al., 2001).

Dentre as espécies estudadas, *H. caprifoliatum* mostrou os resultados mais promissores no teste de natação forçada, um modelo animal de detecção de substâncias com possível atividade antidepressiva (Daudt et al., 2000), mas *H. polyanthemum* também apresentou efeito antidepressivo (Gnerre et al., 2001). Os extratos de *H. brasiliense* (Rocha et al., 1994), *H. caprifoliatum*, *H. piriai* e *H. polyanthemum* (Gnerre et al., 2001) apresentaram atividade IMAO *in vitro*. No entanto, os extratos com melhor atividade IMAO não foram ativos no teste de natação forçada. Dessa forma, o efeito na natação forçada não parece ser devido à atividade IMAO (Gnerre et al., 2001).

Viana e colaboradores (2005) aprofundaram o estudo da ação antidepressiva de *H. caprifoliatum* e demonstraram em experimentos *in vivo* que extratos ciclohexano desta espécie apresentam efeito sobre a transmissão dopaminérgica: o efeito anti-imobilidade dos extratos no teste de natação forçada foi prevenido com uma administração prévia de sulpirida ou SCH23390 (antagonistas de receptores dopaminérgicos D2-like e D1-like, respectivamente). Experimentos *in vitro* mostraram que os extratos e seus principais derivados de floriglucinol inibiram a captação e aumentaram a liberação de monoaminas, em particular de DA, em

sinaptossomas de ratos. No entanto, esses derivados de floroglucinol não se ligaram a transportadores monoaminérgicos, sugerindo que a atividade antidepressiva está relacionada a mecanismos diferentes de outras classes de antidepressivos. A partir desses resultados, sugere-se que os derivados de floroglucinol poderiam causar um efeito indireto na função dos transportadores de monoaminas. Além disso, *H. caprifoliatum* induz alteração na resposta do organismo ao estresse, através da medida dos níveis de corticosterona em camundongos submetidos ou não ao estresse da natação forçada, e que essas alterações ocorrem por mecanismos diferentes dos antidepressivos clássicos (Viana et al., 2008).

A espécie *H. polyanthemum* foi estudada por Viana (2007), em uma tese de doutorado desenvolvida nesse Programa de Pós-Graduação e apresentou resultados muito similares à espécie *H. caprifoliatum*. Além de outros resultados obtidos, destacam-se os resultados obtidos com o principal derivado floroglucinol, identificado como uliginosina B (ULI, figura 2). ULI é uma das moléculas responsáveis pela atividade antidepressiva de *H. polyanthemum* (Stein et al., 2012) com maior potência e facilidade de trabalho, sendo este produto mais estável do que o principal floroglucinol de *H. caprifoliatum* (Nör et al., 2004), o qual já possui relatos de síntese (Kraus e Liu et al., 2012). Das partes aéreas de *H. polyanthemum* também foram isolados três novos benzopiranos: 6-isobutiril-5,7-dimetóxi-2,2-dimetil-benzopirano (HP1); 7-hidróxi-6-isobutiril-5-metóxi-2,2-dimetil-benzopirano (HP2) e 5-hidróxi-6-isobutiril-7-metóxi-2,2-dimetil-benzopirano (HP3) (figura 2) (Ferraz et al., 2001). Recentemente, o efeito antinociceptivo do extrato ciclo-hexano de *H. polyanthemum* (POL), bem como dos três benzopiranos isolados desta espécie, foi estudado por Haas e colaboradores (2010a) através do teste da placa aquecida. POL mostrou efeito antinociceptivo de forma dependente da dose e dentre os benzopiranos testados, apenas HP1 foi ativo no teste. O flavonóide hiperosídeo, isolado de *H. caprifoliatum* foi estudado quanto ao possível efeito antinociceptivo e anti-imobilidade em ratos e camundongos. Os resultados encontrados demonstraram que o hiperosídeo foi ativo no teste de natação forçada (TNF) nas duas espécies estudadas, e que este efeito foi mediado pela ativação de receptores dopaminérgicos do tipo D₂-like (Haas et al., 2010b).

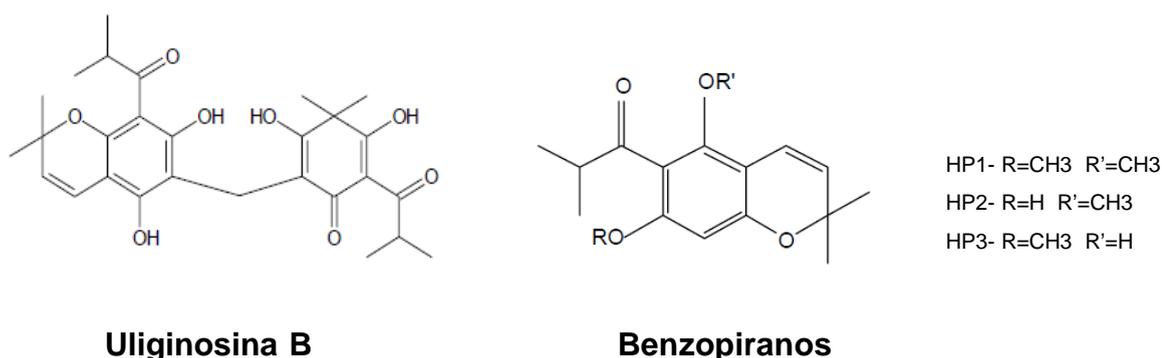


Figura 2. Estrutura dos principais produtos isolados de *Hypericum polyanthemum*.

No mesmo trabalho realizado por Viana, em 2007, o autor investigou o efeito de *H. polyanthemum* sobre o eixo HPA em camundongos. Um dos resultados obtidos foi que o tratamento com *H. polyanthemum*, durante 3 dias consecutivos, foi capaz de reverter os níveis aumentados de corticosterona em córtex cerebral de camundongos, ocasionados pelo teste de natação forçada (agente estressor). Os corticosteróides modulam a síntese da Na^+, K^+ -ATPase, resultando em importantes consequências no papel central da enzima para manter o gradiente transmembrana, captação de nutrientes, volume celular e neurotransmissão. Sabe-se que os transtornos de humor também estão relacionados com os níveis anormais de corticosteroides em alguns pacientes, e o que se tem observado é um aumento da atividade do eixo HPA (hipotálamo-hipófise-adrenal) em pacientes com depressão, o qual é corrigido com a utilização de antidepressivos clássicos (Pariante et al., 2004). Porém, os antidepressivos são capazes de diminuir os níveis basais de corticosterona (Duncan et al., 1998) que são fisiológicos e necessários para o correto funcionamento do organismo.

Existem muitas evidências de que a atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase cerebral pode estar envolvida na etiologia de transtornos mentais, como a depressão (Goldstein et al., 2006) e a depressão bipolar (Looney e El-Mallach, 1997; Goldstein et al., 2009; Hamid et al., 2009). A modulação da Na^+, K^+ -ATPase afeta diretamente a sinalização dos neurotransmissores. A inibição da Na^+, K^+ -ATPase pela ouabaína diminui a recaptção de noradrenalina (Vatta et al., 2004), dopamina e serotonina

(Steffens e Feuerstein, 2004) e aumenta a liberação de acetilcolina (Blasi et al., 1988).

Além da abordagem da Na^+, K^+ -ATPase nos transtornos depressivos, como o transtorno bipolar, também está relacionado a esta doença o papel dos canais de sódio. O transtorno bipolar é um transtorno de humor caracterizado por recorrentes episódios de mania e depressão, tendo como possíveis causas a desregulação no transporte iônico e altas concentrações de Na^+ intracelular (El-Mallakh e Li, 1993; Calabrese et al., 2004). Muitos anticonvulsivantes utilizados no tratamento da depressão bipolar são bloqueadores de canais de Na^+ e existem alguns trabalhos na literatura que relatam o efeito antidepressivo de fármacos anticonvulsivantes quando utilizados em modelos animais de depressão (Codagnone et al., 2007; Prica et al., 2008; Bourin et al., 2009).

Considerando-se as alterações da Na^+, K^+ -ATPase nos transtornos depressivos, e o desbalanço iônico de Na^+ na depressão bipolar, avaliou-se o efeito da administração de ULI sobre a atividade da Na^+, K^+ -ATPase, em estruturas cerebrais de camundongos, e também o efeito de ULI sobre os canais de sódio através da utilização de um ativador de canal de sódio, a veratrina.

Até o momento, existem poucos dados de toxicidade para o gênero *Hypericum*. Em um estudo realizado por Viana e colaboradores (2006), ratos tratados com o extrato éter de petróleo de *H. caprifoliatum* apresentaram sinais de toxicidade quando este extrato foi administrado por via intraperitoneal, porém, quando o extrato éter de petróleo e ciclo-hexano foram administrados por via oral em ratos e camundongos, nenhum sinal de toxicidade foi encontrado. Ferraz e colaboradores (2009) verificaram que os produtos majoritários da espécie *Hypericum polyanthemum*, HP1, HP2 e HP3 não induzem genotoxicidade em camundongos; Haas e colaboradores (2010a) observaram que camundongos tratados com HP1, não tiveram sua performance afetada em aparelho de *rota-rod*, sugerindo a ausência de efeitos neurotóxicos. Até o presente momento, não havia relatos de estudos de toxicidade *in vivo* para o extrato ciclo-hexano de *H. polyanthemum* na literatura e, considerando que *H. polyanthemum* é uma espécie com potencial para o desenvolvimento de novos fármacos, realizou-se um estudo de toxicidade oral aguda e de doses repetidas em camundongos.

PARTE II

RESULTADOS

CAPÍTULO 1

Artigo publicado apresentando na forma de abstract. O conteúdo completo encontra-se publicado na revista *Behavioural Brain Research* 228 (2012) 66 – 73 (JCR 3.393)

Uliginosin B, a phloroglucinol derivative from *Hypericum polyanthemum*: A promising new molecular pattern for the development of antidepressant drugs.

Ana C. Stein,, Alice F. Viana, Liz G. Müller, Jéssica M. Nunes, Eveline D. Stolz, Jean-Claude Do Rego, Jean Costentin, Gilsane L. von Poser, Stela M.K. Rates.

ABSTRACT

In this study we have demonstrated that cyclohexane extract of *Hypericum polyanthemum* (POL) and its main phloroglucinol derivative uliginosin B (ULI) present antidepressant-like activity in rodent forced swimming test (FST). The involvement of monoaminergic neurotransmission on the antidepressant-like activity of ULI was evaluated in vivo and in vitro. POL 90 mg/kg (p.o.) and ULI 10 mg/kg (p.o.) reduced the immobility time in the mice FST without altering locomotion activity in the open-field test. The combination of sub-effective doses of POL (45 mg/kg, p.o.) and ULI (5 mg/kg, p.o.) with sub-effective doses of imipramine (10 mg/kg, p.o.), bupropion (3 mg/kg, p.o.) and fluoxetine (15 mg/kg, p.o.) induced a significant reduction on immobility time in FST. The pretreatment with SCH 23390 (15 g/kg, s.c., dopamine D1 receptor antagonist), sulpiride (50 mg/kg, i.p., dopamine D2 receptor antagonist), prazosin (1 mg/kg, i.p., α 1-adrenoceptor antagonist), yohimbine (1 mg/kg, i.p., α 2-adrenoceptor antagonist) and pCPA (100 mg/kg/day, i.p., p-chlorophenilalanine methyl ester, inhibitor of serotonin synthesis, for four consecutive days) before ULI administration (10 mg/kg, p.o.) significantly prevented the anti-immobility effect in FST. ULI was able to inhibit synaptosomal uptake of dopamine ($IC_{50} = 90 \pm 38$ nM), serotonin ($IC_{50} = 252 \pm 13$ nM) and noradrenaline (280 ± 48 nM), but it did not bind to any of the monoamine transporters. These data firstly demonstrated the antidepressant-like effect of POL and ULI, which depends on the activation of the monoaminergic neurotransmission in a different manner from the most antidepressants.

CAPÍTULO 2

Uliginosin B, a natural phloroglucinol derivative with antidepressant-like activity, affects differently the activity of Na⁺,K⁺-ATPase in cerebral cortex and hippocampus of mice.

Manuscrito a ser submetido para a revista *Planta Medica* (JCR 2.369)

Uliginosin B, a natural phloroglucinol derivative with antidepressant-like activity, affects differently the activity of Na⁺,K⁺-ATPase in cerebral cortex and hippocampus of mice.

Ana C. Stein^a, Andréa G. K. Ferreira^b, Liz G. Müller^a, Andressa Braga^a, Andresa Heeman Betti^a, Fernanda B. Centurião^a, Emilene B. Scherer^b, Janaína Kolling^b, Angela T. S. Wyse^b, Stela M. K. Rates^a

^aPrograma de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

^bLaboratório de Neuroproteção e Doenças Metabólicas, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

Corresponding author: Dra Stela Maris Kuze Rates

Faculdade de Farmácia – UFRGS

Av. Ipiranga, 2752

Porto Alegre – RS

CEP 90610-000

Brazil

E-mail: stela.rates@ufrgs.br

Phone: 55-51-33085455

FAX: 55-51-33085437

Abstract

Uliginosin B is a phloroglucinol isolated from *Hypericum polyanthemum* that presents antidepressant-like effect mediated by monoaminergic neurotransmission in rodents; it inhibits monoamines neuronal reuptake without binding to their neuronal carriers demonstrating that its mode of action differs from classical antidepressants. Studies have described the involvement of Na⁺,K⁺-ATPase brain activity in the depressive disorders and neuronal monoamine transport depends on Na⁺ gradient generated by Na⁺,K⁺-ATPase. Thus, the aim of this study was to evaluate the effect of uliginosin B on the Na⁺,K⁺-ATPase activity in mice brain and verify the influence of veratrine, a Na⁺ channel opener, on the FST. Uliginosin B was isolated from *H. polyanthemum* by chromatographic methods. Mice (n=8 per group) received uliginosin B single (10 mg/kg, p.o.) or repeated doses (10 mg/kg, p.o., once a day, 3 days) or vehicle (NaCl 0.9 % + Tween 80 2%). Brain structures were removed 1 h or 3 h after last administration and Na⁺,K⁺-ATPase activity was determined on inorganic phosphate release. Independent groups of mice were submitted to the same treatments and evaluated in the tail suspension test (TST) and forced swimming test (FST). Single administration of uliginosin B increased Na⁺,K⁺-ATPase activity in cerebral cortex only at 1 h. Repeated administration produced an increase in Na⁺,K⁺-ATPase activity in cerebral cortex at 1 h and 3 h after the last administration; the enzyme activity was not altered in the hippocampus at any time indicating a regional specificity. Single administration of uliginosin B reduced the immobility in TST and FST only at 1 h whereas treatment for 3 days reduced it at both times. Behavioral response are in line with biochemical results suggesting that the effects of ULI are, at least in part, underlaid by its action on Na⁺,K⁺-ATPase. Uliginosin B presents antidepressant-like effect in TST and FST that may be due to increase in cerebral

cortex Na^+, K^+ -ATPase activity. The administration of veratrine was able to prevent the antidepressant-like effect of uliginosin B and it indicates that activity involves the regulation of Na^+ balance. All these data suggest that antidepressant-like activity of uliginosin B involves the regulation of Na^+ balance and point to a lamotrigine-*like* profile effects.

Key-words: uliginosin B, antidepressant-like activity; Na^+, K^+ -ATPase; veratrine; voltage-gated sodium channel

CAPÍTULO 3

Artigo publicado apresentando na forma de abstract. O conteúdo completo encontra-se publicado na revista *Food and Chemical Toxicology* 50 (2012) 2349 – 2355 (JCR 2.602)

Acute and repeated-doses (28 days) toxicity study of *Hypericum polyanthemum* Klotzsch ex Reichardt (Guttiferare) in mice

Andresa Heemann Betti, Ana Cristina Stein, Eliane Dallegrove, Angelica Terezinha Barth Wouters, Tatiane Terumi Negrão Watanabe, Davi Driemeier, Andréia Buffon, Stela Maris Kuze Rates

Hypericum polyanthemum, a South Brazilian species showed antidepressant-like and antinociceptive effects in rodents. Since limited information is available on the toxicity and safety profile of the *Hypericum* genus, we therefore investigated whether *H. polyanthemum* cyclo-hexane extract (POL) treatment could be associated with toxicity in preclinical setting using mice as an experimental model. These toxicity studies were based on the guidelines of the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD-guidelines 423 and 407). Animals received POL single dose (2000 mg/kg, p.o.) or daily for 28-days (90, 450 and 900 mg/kg, p.o.). Acute toxicity study did not detect any clinical signs, changes in behavior or mortality. In repeated dose toxicity study, POL affected the body weight gain and induced biochemical, hematological and liver histological changes at 450 and 900 mg/kg. Mice treated with POL 90 mg/kg did not show any toxicity signs. In conclusion *H. polyanthemum* can be classified as safe (category 5) according to OECD acute toxicity parameters. However, the alterations observed after repeated treatment with high doses suggest that the liver could be the target organ on potential *H. polyanthemum* toxicity and point to the need of further toxicity studies.

PARTE III

DISCUSSÃO GERAL
CONCLUSÕES

A espécie *Hypericum perforatum*, utilizada há mais de 20 anos, é eficaz no tratamento da depressão leve a moderada (Linde, et al., 2009; Klemow et al., 2011) e é um dos componentes de fitoterápicos com maior volume de registro na ANVISA (Silva, 2005), porém, é uma planta exótica, e a importação desta matéria-prima se torna cara para a indústria farmacêutica brasileira. A principal motivação desta tese foi buscar propriedades terapêuticas semelhantes nas espécies nativas do sul do Brasil, possibilitando a criação de matéria-prima alternativa para o desenvolvimento de novos fármacos neuroativos.

A linha de pesquisa com espécies nativas de *Hypericum* conduzida pelas Prof. Dr. Stela Rates e Prof. Dr. Gilsane Von Poser, já demonstrou que espécies de *Hypericum* nativas do sul do Brasil, apresentaram atividade antidepressiva e antinociceptiva em de roedores. Entre os resultados publicados na tese de doutorado de Viana (2007) destaca-se atividade do tipo antidepressiva mediada pelo sistema monoaminérgico dos extratos ciclo-hexano das espécies *H. caprifoliatum* e *H. polyanthemum*. O enfoque do presente trabalho foi aprofundar a investigação sobre o mecanismo de ação antidepressivo da espécie *H. polyanthemum* e de seu principal derivado floroglucinol, uliginosina B, sobre o sistema monoaminérgico, bem como a influência deste floroglucinol sobre a enzima Na^+ , K^+ -ATPase e canal de Na^+ dependente de voltagem.

O extrato ciclo-hexano de *H. polyanthemum* (POL), administrado pela via oral, mostrou efeito do tipo antidepressivo em um modelo animal de depressão, o teste de natação forçada (TNF) nas duas espécies de roedores estudadas (ratos e camundongos). Uliginosina B (ULI) também apresentou efeito do tipo antidepressivo no TNF. O TNF é considerado um modelo animal de validade preditiva para a detecção de substâncias com potencial antidepressivo (Castagné et al., 2009). Porém, este modelo animal apresenta a possibilidade de se obter falsos positivos ou negativos, através do aumento ou diminuição da atividade motora (Borsini e Meli, 1988). No entanto, a redução da imobilidade não foi atribuída a uma atividade motora estimulante, o que é importante pra diferenciar antidepressivos de substâncias estimulantes (Bourin, 1990; Porsolt et al., 1991). O efeito antidepressivo de ULI não pode ser atribuído a um falso positivo ou associado a uma atividade

estimulante, uma vez que ULI não alterou a atividade locomotora dos animais no teste de campo aberto.

As doses subefetivas de POL e ULI potencializaram, no TNF em camundongos, o efeito anti-imobilidade de subdoses de fármacos antidepressivos de diferentes classes: imipramina, um inibidor da recaptação de serotonina e noradrenalina; bupropiona, inibidor da recaptação de dopamina, e fluoxetina, inibidor da recaptação de serotonina. Estes antidepressivos são largamente utilizados para o tratamento da depressão, porém, em muitos casos não são eficazes, apresentam baixa aceitação e uma demora para alcançar os efeitos terapêuticos (Berton e Nestler, 2006). A farmacoterapia combinada pode aumentar a chance de alcançar a remissão e reduzir e/ou minimizar os efeitos residuais da depressão, visto que a grande maioria dos pacientes com transtornos depressivos não atingem a remissão dos sintomas (Fava e Rush, 2006).

A administração simultânea de subdoses de dois ou mais fármacos e/ou fitoterápicos pode representar uma possibilidade de melhora da farmacoterapia convencional, através da diminuição das doses dos antidepressivos descritos e consequentemente, diminuição dos efeitos adversos. A combinação dos efeitos antidepressivos de POL e ULI com os antidepressivos mencionados sugerem que POL e ULI podem representar uma perspectiva de avanço na farmacoterapia convencional, diminuindo as doses dos antidepressivos prescritos e, consequentemente, os efeitos adversos. A terapia medicamentosa combinada é uma das estratégias terapêuticas em casos de resistência ao tratamento da depressão, diminuindo a síndrome de retirada e oferecendo uma resposta clínica mais rápida do que a obtida apenas com a substituição do antidepressivo (Lam et al., 2002). Estudos utilizando *Hypericum perforatum* (St. John's Wort) apresentaram inúmeras vantagens potenciais quando combinados com outros fármacos antidepressivos (Butterweck, 2004; Zanolli, 2004; Sarris et al., 2010). Alguns autores sugerem uma abordagem equilibrada envolvendo baixas doses de *H. perforatum* associadas a doses igualmente menores de antidepressivos para aumentar a resposta, ou, potencialmente, para diminuir o risco de efeitos adversos do antidepressivo sintético através da redução da dose necessária para eficácia (Sarris et al, 2010).

O estudo do mecanismo de ação da ULI no TNF também foi realizado através da administração de antagonistas de receptores dopaminérgicos (D1-*like*, SCH 23390; D2-*like*, sulpirida), α -adrenérgicos (α 1, prazosina; α 2, ioimbina) e de um inibidor da síntese de serotonina (pCPA). Demonstrou-se que o efeito antidepressivo da ULI é dependente dos sistemas dopaminérgico, noradrenérgico e serotoninérgico. Desde a descoberta da imipramina e dos compostos relacionados, a teoria monoaminérgica é a mais conhecida, a qual postula que os sintomas da depressão são causados primariamente pela diminuição de serotonina, noradrenalina e/ou dopamina (Breuer et al., 2008). A segunda geração de antidepressivos, os inibidores seletivos de recaptação de serotonina ou noradrenalina apresentam vantagens quanto à diminuição dos efeitos adversos, porém, não suplantam a eficácia dos antidepressivos tricíclicos (Breuer et al., 2008; Prins et al., 2010). Recentemente, tem-se considerado que a hipofunção da via dopaminérgica mesolímbica pode estar relacionada com a anedonia, um dos principais sintomas de depressão, considerada como uma característica central do transtorno (Shankman et al., 2010), e fármacos que aumentam a atividade dopaminérgica representam grande interesse para o tratamento da depressão.

Nos últimos anos, houve o surgimento de uma nova classe de moléculas antidepressivas, os inibidores triplos de recaptação de monoaminas, que mostraram ser eficazes em modelos animais de depressão (Breuer et al., 2008) e em pacientes deprimidos (Skolnick et al., 2006). Através de uma abordagem sobre a tripla recaptação de monoaminas, a não-seletividade de ULI sobre a neurotransmissão monoaminérgica pode representar uma vantagem para seu mecanismo de ação.

Os ensaios neuroquímicos realizados com ULI demonstraram que essa molécula inibe a recaptação das monoaminas, porém não se liga aos respectivos transportadores desses neurotransmissores. Sabe-se que a maioria dos antidepressivos utilizados na terapêutica possui alta afinidade pelos transportadores monoaminérgicos, bloqueando-os e levando aos efeitos terapêuticos. Da mesma forma, a hiperforina (*H. perforatum*) possui diversos mecanismos de ação, incluindo inibição da recaptação de monoaminas, sem ligação aos transportadores monoaminérgicos (Chatterjee et al., 1998a; Muller et al., 1998; Jensen et al., 200; Zanolli, 2004). Porém, estes transportadores neuroquímicos, além de serem

responsáveis pela captação, também são responsáveis pela regulação e homeostase de sinapse, e seu bloqueio e inativação pode causar efeitos adversos indesejáveis, pois também são alvos de drogas como cocaína e anfetaminas (Jayanthi e Ramamoorthy, 2005; Ramamoorthy et al., 2011). Com este estudo, demonstramos que os resultados obtidos com ULI apontam para um mecanismo de ação diferente dos antidepressivos utilizados na clínica, e que o efeito antidepressivo de ULI é dependente do sistema monoaminérgico, uma vez que teve seu efeito revertido em todos os sistemas testados.

Sabe-se que a recaptção de neurotransmissores pelos transportadores de dopamina, noradrenalina e serotonina requer um gradiente de sódio, o qual é mantido principalmente pela enzima Na^+, K^+ -ATPase. De maneira diferente dos antidepressivos clássicos, ULI inibe a recaptção de monoaminas sem se ligar aos seus respectivos transportadores e, além disso, o tratamento agudo e repetido por via oral (3 dias, 1 x ao dia) aumentou a atividade desta enzima em córtex cerebral de camundongos em diferentes tempos. Diversos autores já demonstraram que a atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase encontra-se diminuída em distúrbios psiquiátricos, como a depressão (Gamaro et al., 2003; Goldstein et al., 2006; 2009). Estudos demonstraram que a isoforma da Na^+, K^+ -ATPase mais abundante em neurônios (Na^+, K^+ -ATPase $\alpha 3$) está diminuída em córtex pré-frontal de pacientes com depressão e depressão bipolar (Tochigi et al., 2008). Em camundongos heterozigotos para essa isoforma, foi relatada uma diminuição da atividade cerebral desta enzima e os animais se mostraram mais vulneráveis a desenvolver comportamento do tipo depressivo em modelo animal crônico de depressão (Kirshenbaum, et al., 2011). ULI não alterou Na^+, K^+ -ATPase em hipocampo dos camundongos, e esse resultado corrobora com a hipótese de que ULI pode estar contribuindo para a manutenção da excitabilidade neuronal através da estimulação da enzima, agindo de forma seletiva no córtex cerebral.

A atividade da Na^+, K^+ -ATPase está de acordo com os dados obtidos nos testes comportamentais. No regime de administração aguda, o aumento da atividade da enzima foi verificado somente uma hora após a administração e o tempo de imobilidade no TNF e no teste de suspensão pela cauda (TSC) só foi menor que o controle no tempo de 1 hora. No tratamento repetido, o aumento da atividade

enzimática permaneceu 1 e 3 horas após a última administração, e os animais submetidos ao TNF apresentaram redução da imobilidade nestes dois tempos. Dessa forma, inferimos que a resposta farmacológica observada não está relacionada a um efeito da administração aguda desta substância.

O efeito do tipo antidepressivo de ULI foi observado em dois modelos animais de depressão: o TNF e o TSC, reduzindo o tempo de imobilidade dos animais de forma significativa em relação ao controle. Estes dois testes são considerados modelos animais de validade preditiva para a detecção de substâncias com potencial antidepressivo (Castagné et al., 2009; Steru et al., 1985). Apesar de a depressão ser definida clinicamente como uma patologia complexa, com sintomas neuroendócrinos e somáticos que não são possíveis de se reproduzir em animais, especialmente em camundongos, apenas comportamentos específicos e relevantes podem ser mensurados em humanos, porém, os modelos animais como TNF e TSC são úteis na triagem da avaliação da potencial atividade antidepressiva de novos compostos (Peti-Demouliere et al., 2005).

Em outro conjunto de experimentos, a administração prévia de veratrina foi capaz de prevenir o efeito anti-imobilidade de ULI no TNF. Diversos autores relatam o bloqueio do efeito antidepressivo de alguns fármacos pela administração da veratrina em modelos animais, principalmente da lamotrigina (Bourin et al., 2005; 2009; Codagnone et al., 2007). Vitezic e colaboradores (2008), induziram convulsões e lesões neurotóxicas em ratos (ác. caínico), com consequente inibição da atividade da Na^+, K^+ -ATPase em córtex pré-frontal e hipocampo, porém o pré-tratamento com lamotrigina restabeleceu os níveis normais da Na^+, K^+ -ATPase nestas regiões cerebrais. A lamotrigina tem ação sobre o influxo de Na^+ , através do bloqueio dos canais de Na^+ , resultando na preservação do balanço iônico celular (Papazisis et al., 2008) o que pode explicar o efeito protetor sobre os níveis da Na^+, K^+ -ATPase.

A lamotrigina é um anticonvulsivante que mostrou inibir a recaptação de serotonina, noradrenalina e dopamina em um estudo realizado em sinaptossomas de ratos e em plaquetas humanas (Southam et al., 1998). Sabe-se que a recaptação de neurotransmissores pelos transportadores de dopamina, noradrenalina e serotonina durante a neurotransmissão requer um gradiente de

sódio (Xhaard et al., 2008). Estes transportadores, também conhecidos como co-transportadores de Na^+ (Neurotransmitters sodium symporters-NSS), fazem o transporte das monoaminas do meio extracelular para o meio intracelular acoplando o Na^+ , contra o gradiente de concentração (Kristensen et al., 2011). Dessa maneira, associando os resultados de que ULI inibe a recaptação de monoaminas de forma não seletiva, sem se ligar aos sítios específicos dos seus transportadores, podemos inferir que ULI pode estar alterando o gradiente de Na^+ , através da estimulação da atividade da Na^+, K^+ -ATPase e, provavelmente, bloqueando canais de Na^+ dependentes de voltagem, prejudicando ou inibindo a recaptação das monoaminas.

Tendo em vista o potencial para o desenvolvimento de novos fármacos, a realização de um estudo exploratório sobre a toxicidade oral aguda e de doses repetidas de *H. polyanthemum* foi importante. Um dos maiores interesses do grupo nesse estudo foi a avaliação da fototoxicidade de *H. perforatum*, devido à presença das naftodiantronas, hipericina e pseudo-hipericina, presentes na espécie (Linde et al., 2009) e estas substâncias estão presentes na cera das glândulas negras localizadas nestas espécies (Von Poser et al., 2006). As espécies nativas do sul do Brasil pertencem às sessões Brathys e Trigynobrathys (Guttiferae), que não possuem glândulas negras, e dessa forma não produzem hipericina e pseudo-hipericina (Von Poser et al., 2006), sugerindo um baixo risco de fototoxicidade na espécie *H. polyanthemum*.

Após 28 dias de tratamento, os animais que mostraram alterações de ganho de massa corporal e bioquímicas mais pronunciadas foram os que receberam tratamento nas doses 5 e 10 vezes superiores à dose efetiva no TNF em camundongos. Em altas doses, as mudanças bioquímicas e histopatológicas indicaram que o fígado pode ser o órgão alvo para a toxicidade de *H. polyanthemum*.

As alterações fisiológicas relacionadas ao peso e ingestão de alimento são indicativos de efeitos adversos de substâncias químicas (Hilaly et al, 2004), porém esses efeitos foram observados também nas maiores doses (450 e 900 mg/kg). Quanto à ingestão alimentar, observou-se uma diminuição ao longo das semanas, o que pode ser atribuído ao comportamento fisiológico normal dos animais, que à medida que vão crescendo, consomem menos ração. Os camundongos tratados na

dose de 90 mg/kg apresentaram uma diminuição da ingestão de ração nas primeiras duas semanas, que pode ser atribuído a um efeito de tolerância e/ou anorexígeno dependente da dose, já que em doses maiores (450 e 900 mg/kg) a ingestão foi prejudicada durante as 4 semanas do experimento.

Assim, sugere-se que o extrato de *H. polyanthemum* apresenta segurança na dose efetiva em ensaios pré-clínicos (Haas et al., 2010; Stein et al., 2012), enquanto que as altas doses possuem riscos toxicológicos. Pesquisas adicionais devem ser feitas para caracterizar e avaliar separadamente os diferentes compostos presentes no extrato, como o nosso composto de interesse, uliginosina B.

Como conclusão deste trabalho, acreditamos que *H. polyanthemum* pode se tornar uma espécie promissora no desenvolvimento de um novo fármaco fitoterápico com ação neuroativa. Seu principal derivado floroglucinol, uliginosina B, representa uma molécula com ação não-seletiva sobre o sistema monoaminérgico, inibindo a recaptção das monoaminas sem se ligar aos respectivos transportadores, o que pode representar um novo composto com inibição tripla da recaptção. Além disso, essa inibição da recaptção pode estar relacionada a uma alteração do gradiente iônico de Na^+ , através da estimulação da atividade da Na^+, K^+ -ATPase, o que leva a crer que ULI possui um perfil de ação lamotrigina-like. Dessa forma, ULI torna-se uma molécula promissora como um novo padrão molecular de substância com atividade no sistema nervoso central.

REFERENCIAS

Bernardi, A.P.M.; López-Alarcón, C.; Aspee, A.; Rech, S.; Von Poser, G.L.; Bridi, R.; Lissi, E. Antioxidant activity of flavonoids isolated from *Hypericum ternum*. Journal of the Chilean Chemical Society, v. 52(4), p.1126-1128, 2007.

Berton, O., Nestler, E.J. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. Nature Reviews Neuroscience v. 7, p. 137- 141, 2006.

Bhattacharya, S.; Chakrabarti, A.; Chatterjee, S. Activity profiles of two hyperforin containing *Hypericum* extracts in behavioral models. Pharmacopsychiatry, v.31, p.22-29, 1998.

Blanco, G.; Mercer, R.; Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. American Physiological Society, v. 275, p. 633 – 650, 1998.

Blasi, J. M.; Ceña, V.; González-García, C.; Marsa, J.; Solsona, C. Ouabain induces acetylcholine release from pure cholinergic synaptosomes independently of extracellular calcium concentration. Neurochemistry Research, v. 13 (11), p. 1035 - 1041, 1988.

Borsini, F.; Meli, A. Is the forced swimming test a suitable model revealing antidepressant activity? Psychopharmacology, v. 94, p. 147 – 160, 1988.

Bourin, M.; Chenu, F.; Hascoët, M. Evidence for the activity of lamotrigine at 5-HT(1A) receptors in the mouse forced swimming test. Journal of Psychiatry and Neuroscience, v. 304, p. 275 – 282, 2005.

Bourin, M.; Chenu, F.; Hascoët, M. The role of sodium channels in the mechanism of action of antidepressants and mood stabilizers. Current Drug Targets, v. 10, p. 1052 – 1060, 2009.

Breuer, M.E.; Chan, J.S.W.; Oosting, R.S.; Groenink, L.; Korte, S.M.; Campbell, U.; Schreiber, R.; Hanania, T.; Snoeren, E.M.S.; Waldinger, M.; Olivier, B. The triple monoaminergic reuptake inhibitor DOV 216'303 has antidepressant effects in the rat olfactory bulbectomy model and lacks sexual side effects. European Neuropsychopharmacology, v. 18, p. 908 – 916. 2008.

Butterweck, V.; Jürgenliemk, G.; Nahrstedt, A.; Winterhoff, H. Flavonoids from *Hypericum perforatum* show antidepressant activity in the forced swimming test. Planta Medica, v.66, p.3-6, 2000.

Butterweck, V.; Hegger, M.; Winterhoff, H. Flavonoids of St. John's Wort reduce HPA axis function in the rat. Planta Medica, v.70, p.1008-1011, 2004.

Calabrese, J.R.; Hirschfeld, R.M.; Frye, M.A.; Reed, M.L. Impact of depressive symptoms compared with manic symptoms in bipolar disorder: results of U.S community-based sample. Journal of Clinical Psychiatry, v. 65, p. 1499 – 1504, 2004.

- Castagné, V.; Porsolt, R.D.; Moser, P.; Use of latency to immobility improves detection of antidepressant-like activity in the behavioral despair test in the mouse. *European Journal of Pharmacology*, v. 616, p. 128 – 133, 2009.
- Chatterjee, S.S.; Nöldner, M.; Koch, E.; Erdelmeier, C. Antidepressant activity of *Hypericum perforatum* and hyperforin, the neglected possibility. *Pharmacopsychiatry*, v.31, p.7-15, 1998a.
- Chatterjee, S.S.; Bhattacharya, S.K.; Wonnemann, M.; Singer, A.; Müller, W.E. Hyperforin as a possible antidepressant component of *Hypericum* extracts. *Life Sciences*, v.63, p.499-510, 1998b.
- Dall'agnol, R.; Ferraz, A.; Bernardi, A.P.; Albring, D.; Nör, C.; Sarmento, L.; Lamb, L.; Hass, M.; Von Poser, G.; Schapoval, E.E.S. Antimicrobial activity of some *Hypericum* species. *Phytomedicine*, v.10, p.511-516, 2003.
- Dall'agnol, R.; Ferraz, A.; Bernardi, A.P.; Albring, D.; Nör, C.; Schapoval, E.E.S.; Von Poser, G. Bioassay-guided isolation of antimicrobial benzopyrans and phloroglucinol derivatives from *Hypericum* species. *Phytoterapy Research*, v.19, n. 4, p.291-293, 2005.
- Daudt, R.; Von Poser, G.L.; Neves, G.; Rates, S.M.K. Screening for the antidepressant activity of some species of *Hypericum* from South Brazil. *Phytoterapy Research*, v.15, p.344-346, 2000.
- 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, p.14-18, 2000.
- Duncan, G. E.; Knapp, D. J.; Carson, S. W.; Breese, G. R. Differential effects of chronic antidepressant treatment on swim stress and fluoxetine induced secretion of corticosterone and progesterone. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 285, p. 579 – 587, 1998.
- Eckert, G.P.; Müller, W. E. Effects of hyperforin on the fluidity of brain membranes. *Pharmacopsychiatry*, v.34 suppl 1, p.22-25, 2001.
- Eckert, G.P.; Keller, J.H.; Jourdan, C.; Karas, M.; Volmer, D.A.; Schubert-Zsilavec, M. E Müller, M.E. Hyperforin modifies neuronal membrane properties *in vivo*. *Neuroscience Letters*, v.367, p.139-143, 2004.
- EI-Mallakh, R.S.; Li, R. Is the Na,K-ATPase the link of between phosphoinositide metabolism and bipolar disorder? *Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neuroscience*, v. 5, p. 361 – 368, 1993.
- Erdelmeier, C.A.J. Hyperforin, possible the major non-nitrogenous secondary metabolite of *Hypericum perforatum* L. *Pharmacopsychiatry*, v.31, suppl 1, p.2-6, 1998.
- Erecinska, M.; Cherian, S.; Silver, I. A. Energy metabolism in mammalian brains during development. *Progress in neurobiology*, v. 73, p. 397 – 445, 2004.

Fava, M.; Rush, A.J. Current status of augmentation and combination treatments for major depressive disorder: a literature review and a proposal for a novel approach to improve practice. *Psychotherapy and psychosomatics*, v. 74, p. 139 – 153, 2006.

Fenner, R.; Sortino, M.; Rates, S.K.; Dall'agnol, R.; Ferraz, A.; Bernardi, A.P.; Albring, D.; Nör, C.; Von Poser, G.L.; Shapoval, E.; Zacchino, S. Antifungal activity of some Brazilian *Hypericum* species. *Phytomedicine*, v.12, p.236-240, 2005.

Ferraz, A.B.F.; Bordignon, S.A.L.; Staats, C.; Schripsema, J.; Von Poser, G.L. Benzopyrans from *Hypericum polyanthemum*. *Phytochemistry*, v.57, p.1227-1230, 2001.

Ferraz, A.B.F.; Grivicich, I.; Von Poser, G.L.; Faria, D.H.; Kayser, G.B.; Schwartzmann, G.; Henriques, A.T.; Da Rocha, A.B. Antitumor activity of three benzopyrans isolated from *Hypericum polyanthemum*. *Fitoterapia*, v.76, n. 2, p.210-215, 2005a.

Ferraz, A.B.F.; Faria, D.H.; Benetti, M.N.; Da Rocha, A.B.; Schwartzmann, G.; Henriques, A.T.; Von Poser, G.L. Screening for antiproliferative activity of six southern Brazilian species of *Hypericum*. *Phytomedicine*, v.12, n. 1-2, p.511-516, 2005b.

Franklin, M.; Reed, A.; Murck, H. Sub-chronic treatment with an extract of *Hypericum perforatum* significantly reduces cortisol and corticosterona in the rat brain. *European Neuropsychopharmacology*, v.14, p.7-10, 2004.

Fritz, D.; Venturi, C.R.; Cargnin, S.; Schripsema, J.; Roehe, P.M.; Montanha, J.A.; Von Poser, G.L. Herpes vírus inhibitory substances from *Hypericum connatum* Lam., a plant used in southern Brazil to treat oral lesions. *Journal of Ethnopharmacology*, v.113, p.517-520, 2007.

Gamarro, G. D.; Streck, E. L.; Matté, C.; Prediger, M. E.; Wyse, A. T. S.; Dalmaz, C. Reduction of hippocampal Na⁺,K⁺-ATPase activity in rats subjected to an experimental model of depression. *Neurochemical Research*, v.28, p. 1339 – 1344, 2003.

Gnerre, C.; Von Poser, G.L.; Ferraz, A.; Viana, A.F.; Testa, B.; Rates, S.M.K. Monoamine oxidase inhibitory activity of some *Hypericum* species native to South Brazil. *Journal of Pharmacy Pharmacology*, v.53, p.1273-1279, 2001.

Gobbi, M.; Moia, M.; Pirona, L.; Morrizoni, P.; Mennini, T. In vitro binding studies with two *Hypericum perforatum* extracts—hyperforin, hypericin and biapigenin—on 5-HT₆, 5-HT₇, GABA(A)/benzodiazepine, sigma, NPY-Y₁/Y₂ receptors and dopamine transporters. *Pharmacopsychiatry*, v.34, p. 45-48, 2001.

Goldstein, I.; Levy, T.; Galili, D.; Ovadia, H.; Yirmiya, R.; Rosem, H.; Lichtstein, D. Involvement of Na⁺, K⁺-ATPase and endogenous *Digitalis*-Like compounds in depressive disorders. *Biological Psychiatry*, v. 60, p. 491 – 499, 2006.

Goldstein, I.; Lerer, E.; Laiba, E.; Mallet, J.; Muyahed, M.; Laurent, C.; Rosen, H.; Ebstein, R, P.; Lichtstein, D. Association between sodium-and-potassium-activated

adenosine triphosphatase α isoforms and bipolar disorders. *Biological Psychiatry*, v. 65, p. 985 – 991, 2009.

Haas, J. S.; Viana, A. F.; Heckler, A. P.; Von Poser, G. L.; Rates, S. M. The antinociceptive effect of a benzopyran (HP1) isolated from *Hypericum polyanthemum* in mice hot-plate test is blocked by naloxone. *Planta Medica*, v. 76, n. 13, p. 1419 – 1423, 2010a.

Haas, J. S.; Stolz, E. D.; Betti, A. H.; Stein, A.C., Schripsema, J.; Von Poser, G. L.; Rates, S. M. K. The anti-immobility effect of hyperoside on the forced swimming test in rats mediated by the D2-like receptors activation. *Planta Medica*, v 77(4), p. 334 – 339, 2011.

Hamid, H.; Gao, Y.; Lei, Z.; Hougland, M. T.; El-Mallakh, R. S. Effect of ouabain in an animal model of mania. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, v. 33, p. 1103 – 1106, 2009.

Hilaly, J.E.; Israili, Z.H.; Lyouss, B. Acute and chronic toxicological studies of Ajuva lva in experimental animals. *Journal of Ethnopharmacology* v. 91, p. 43–50, 2004.

Jayanthi, L.D.; Ramamoorthy, S. Regulation of monoamine transporters: Influence of psychostimulants and therapeutic antidepressants. *The AAPS Journal*, v. 7, n. 3, p. 728 – 738, 2005.

Jensen, A.G.; Hansen, S.H.E; Nielsen, E.O. Adhyperforin as contributor to the effect of *Hypericum perforatum* L. in biochemical models of antidepressant activity. *Life Science*, v.68, p.1593-1605, 2001.

Kasper, S.; Caraci, F.; Forti, B.; Drago, F.; Aguglia, E. Efficacy and tolerability of *Hypericum* extract for the treatment of mild to moderate depression. *European Neuropsychopharmacology*, v. 20, p. 747 – 765, 2010.

Kessler, R.C.; Chiu, W.T.; Demler, O.; Walters, E.E. Prevalence, severity, and comorbidity of 12-month DSM-IV disorders in the national comorbidity survey replication. *Archives of general psychiatry*, v. 62, p. 617-627, 2005.

Kaehler, S.T.; Sinner, C.; Chatterjee, S.S.; Philippu, A. Hyperforin enhances the extracellular concentrations of catecholamines, serotonin and glutamate in the rat locus coeruleus. *Neuroscience Letters*, v. 262, n. 3, p.199-202, 1999.

Kirshenbaum, G.S.; Saltzman, K.; Rose, B.; Petersen, J.; Vilsen, B.; Roder, J.C. Decreased neuronal Na⁺,K⁺-ATPase activity in Atp1a3 heterozygous mice increases susceptibility to depression-like endophenotypes by chronic variable stress. *Genes, Brain and Behavior*, v. 10, p. 542–550, 2011.

Kiewert, C.; Buchholzer, M.L.; Hartmann, J.; Chatterjee, S.S.; Klein, J. Stimulation of hippocampal acetylcholine release by hyperforin, a constituent of St. John's Wort. *Neuroscience Letters*, v. 364, n. 3, p.195-198, 2004.

Klemow, K.M.; Bartlow, A.; Crawford, J.; Kocher, N.; Shah, J.; Ritsick, M. Medical Attributes of St. John's Wort (*Hypericum perforatum*), in: *Herbal Medicine*:

Biomolecular and Clinical Aspects, Chapter 11. 2nd edition. Boca Raton (FL): CRC Press; 2011

Knol, M.J.; Twisk, J.W.R.; Beekman, A.T.F.; Reine, R.J.; Snoek, F.J.; Pouwer, F. Depression as a risk factor for the onset of type 2 diabetes mellitus. A meta-analysis. *Diabetologia* v. 49, p. 837 – 845, 2006.

Kraus, G.A.; Liu, F. Synthesis of uliginosins A and B. *Natural Product Communications* v.7, p.1-2, 2012.

Vaishnav, K.; Nestler, E.J. The molecular neurobiology of depression. *Nature*, v. 455, p. 894-902, 2008.

Kumar, V.; Sing, P.N.; Muruganandam, A.V.; Bhattacharya, S.K. Effect of Indian *Hypericum perforatum* L. on animal models of cognitive dysfunction. *Journal of Ethnopharmacology*, v.72, p.119-128, 2000.

Lam, R.W.; Wan, D.D.; Cohen, N.L.; Kennedy, S.H. Combining antidepressants for treatment resistant depression: a review. *Journal of Clinical Psychiatry* v. 63, p. 685–93, 2002.

Linde, K. St. John's Wort – an Overview. *Forsch Komplementmed*, v. 16, p. 146–155, 2009.

Linde, K.; Berner, M.M.; Kriston, L. St John's wort for major depression. *Cochrane Database Syst Rev*. 2009.

Looney, S.W.; El-Mallakh, R.F. Meta-Analysis of erythrocyte Na,K-ATPase activity in bipolar illness. *Depression and Anxiety*, v. 5, p. 53 – 65, 1997.

Lowry, O.H.; Rosenbrough, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, v.193, p.265-275, 1951.

Mendes, F.R.; Mattei, R.; Carlini, E.L.A. Activity of *Hypericum brasiliense* and *Hypericum cordatum* on the central nervous system in rodents. *Fitoterapia*, v.73, p.462-471, 2002.

Möller, H.J.; Bitter, I.; Bobbes, J.; Fountoulakis, K.; Höschl, k.; Kasper, S. Position statement of the European Psychiatric Association (EPA) on the value of antidepressants in the treatment of unipolar depression. *European Psychiatry*, v. 27, p. 114–128, 2012.

Müller, W.E.; Singer, A.; Wonnemann, W.; Hafner, U.; Rolli, M.; Schafer, C. Hyperforin represents the neurotransmitters reuptake inhibiting constituent of *Hypericum* extract. *Pharmacopsychiatry*, v.31 suppl 1, p.16-21, 1998.

Müller, W.E.; Singer, A.; Wonnemann, M.; Hyperforin – Antidepressant activity by a novel mechanism of action. *pharmacopsychiatry*, v.34 suppl 1, p.S98-S102, 2001.

Müller, W.E.; St John's wort research from mode of action to clinical efficacy. *Pharmacological Research*, v.47, p.101-109, 2003.

- Murck, H.; Uhr, M.; Schaffler, K.; Seibel, K. Effects of *Hypericum* extract (LI160) on the change of auditory evoked potentials by cortisol administration. *Neuropsychobiology*, v.50, p.128-133, 2004.
- Nestler, E.J.; Gould, E.; Manji, H.; Bucan, M.; Duman, R.S.; Gershenfeld, H.K.; Hen, R.; Koester, S.; Lederhendler, I.; Meaney, M.J.; Robbins, T.; Winsky, L.; Zalcman, S. Preclinical Models: Status of Basic Research in Depression. *Biological Psychiatry*, v.52, p.503-528, 2002.
- 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. *Biochemical Systematics and Ecology*, v.32, p.517-519, 2004.
- OMS - Organização Mundial da Saúde, 2008. The global burden of disease: update 2004. Disponível em http://www.who.int/topics/global_burden_of_disease/en/. Acessado em março de 2011.
- Pariante, C.M.; Thomas, S.A.; Lovestone, S. Makofr, A.; Kerwin, R.W. Do antidepressants regulate how cortisol affects the brain? *Psychoneuroendocrinology*, v. 29, p. 423 – 447, 2004.
- Pocelli, S., Drago, A., Fabbri, C., Serretti, A. Mechanisms of antidepressant action: An integrated dopaminergic perspective. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* v. 35, p. 1532–1543, 2011.
- Porsolt, R.D.; Bertin, A.; Jalfre, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Archives Internationales Pharmacodynamie et de Therapies*, v. 229, p. 327–336, 1977.
- Porsolt, R.D.; Anton, G.; Blavet, N.; Jafre, M. Behavioral despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *European Journal of Pharmacology*, v. 47, p. 379-391, 1978.
- Prins, J.; Westphal, K.G.C.; Korte-Bouws, G.A.H.; Quinton, M.S.; Schreiber, R.; Olivier, B.; Korte, S.M.. The potential and limitations of DOV 216,303 as a triple reuptake inhibitor for the treatment of major depression: A microdialysis study in olfactory bulbectomized rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* v. 97, p. 444–452, 2011.
- Ramamoorthy, S.; Shippenberg, T. S.; Jayanthi, L. Regulation of monoamine transporters: role of transporter phosphorylation. *Pharmacology and Therapeutics*, v. 129, p. 220 – 238, 2011.
- Rates, S.M.K., von Poser, G.L., Viana, A.F., Costentin, J., Do Rego, J.C., 2010. 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*. Patent Number: WO2010092162-A1. Accessed in January of 2010.

- Ribeiro, V.L.S.; Toigo, E.; Bordignon, S.A.L.; Gonçalves, K.; Von Poser, G.L. Acaricidal properties of extracts from the aerial parts of *Hypericum polyanthum* on the cattle tick *Boophilus microplus*. *Veterinary Parasitology*, v.147, p.199-203, 2007.
- Rocha, L.; Marston, A.; Kaplan, M.A.C.; 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.1381-1385, 1994.
- Rocha, L.; Marston, A.; Potterat, O.; Kaplan, M.A.C.; Stoeckli-Evans, H.; Hostettmann, K. Antibacterial phloroglucinols and flavonoids from *Hypericum brasiliense*. *Phytochemistry*, v. 40, n. 5, p.1447-1452, 1995.
- Rocha, L.; Marston, A.; Potterat, O.; Kaplan, M.A.C.; Hostettmann, K. More phloroglucinols from *Hypericum brasiliense*. *Phytochemistry*, v. 42, p. 185-188, 1996.
- Rommelspacher, H.; Siemanowitz, B.; Mannel, M. Acute and chronic actions of a dry methanolic extract of *Hypericum perforatum* and hyperforin-rich extract on dopaminergic and serotonergic neurons in rat nucleus accumbens. *Pharmacopsychiatry*, v. 34, p. 119-126, 2001.
- Ruedeberg, C.; Wiesmann, U. N.; Brattstroem, A.; Honegger, U. E. *Hypericum perforatum* L. (St John's Wort) Extract Ze 117 Inhibits Dopamine Re-uptake in Rat Striatal Brain Slices. An Implication for Use in Smoking Cessation Treatment? *Phytoterapy research*, v. 24, p. 249 – 251, 2010.
- Sarris, J.; Kavanagh, D.J.; Byrne, G. Adjuvant use of nutritional and herbal medicines with antidepressants, mood stabilizers and benzodiazepines. *Journal of Psychiatric Research*, v. 44, p. 32 – 41, 2010.
- Schmitt, A.C.; Ravazzolo, A.P.; Von Poser, G.L. Investigation of some *Hypericum* species native to Southern of Brazil for antiviral activity. *Journal of Ethnopharmacology*, v.77, p.239-245, 2001.
- Silva, Gabriela. Estudo da qualidade da informação constante nas bulas dos principais medicamentos fitoterápicos registrados no Brasil. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005.
- Simmen, U.; Bobirnac, I.; Schoeffter, P. Antagonist effect of pseudohypericin at CRF1 receptors. *European Journal Pharmacology*, v.5, p.251-256, 2003.
- Singer, M.S.; Wonnemann, M.; Müller, W.E. Hyperforin, a major antidepressant constituent of St John's Wort, inhibits serotonin uptake by elevating free intracellular Na⁺. *Journal of Pharmacology Experimental Therapy*, v.290, p.1363-1368, 1999.
- Sinyor, M.; Schaffer, A.; Levitt, A. The Sequenced Treatment Alternatives to Relieve Depression (STAR*D) Trial: A Review. *Canadian Journal of Psychiatry*, v. 55, n. 3, p. 126-35, 2010.
- Shankman, S.A.; Nelson, B.D.; Harrow, M.; Faull, R. Does physical anhedonia play a role in depression? A 20-year longitudinal study. *Journal of Affective Disorders*, v. 120, p. 170 – 176, 2010.

- Steffens, M.; Feuerstein, T.J. Receptor-independent depression of DA and 5-HT uptake by cannabinoids in rat neocortex--involvement of Na(+)/K(+)-ATPase. *Neurochemistry international*, v. 44, n. 7, p. 529 – 538, 2004.
- 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.K. Uliginosin B, a phloroglucinol derivative from *Hypericum polyanthemum*: a promising new molecular pattern for the development of antidepressant drugs. *Behavioural Brain Research*, v. 228, p. 66-73, 2012.
- Steru, L.; Chermat, R.; Thierry, B.; Simon, P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology*, v. 85, p. 367 – 370, 1985.
- Skolnick, P.; Krieter, P.; Tizzano, J.; Basile, A.; Popik, P.; Czobor, P.. Preclinical and clinical pharmacology of DOV 216,303, a “triple” reuptake inhibitor. *CNS Drug Review*, v. 12, p. 123–34, 2006..
- 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.
- Tochigi, M.; Iwamoto, K.; Bundo, M.; Sasaki, t.; Kato, N.; Kato, T. Gene expression profiling of major depression and suicide in the prefrontal cortex of postmortem brains. *Neuroscience Research*, v. 60, p. 184–191, 2008.
- Vatta, M.; Peña, C.; Fernández, B. E.; Arnaiz, G. R. L. Endobain E, a brain Na,K-ATPase inhibitor, decreases norepinephrine uptake in rat hypothalamus. *Life sciences*, v. 76, p. 359 – 365, 2004.
- Viana, A. F. Estudo da atividade psicofarmacológica de espécies de *Hypericum* nativas do Rio Grande do Sul e toxicidade aguda de *Hypericum caprifoliatum* Cham. & Schledt. Dissertação de Mestrado, 2002.
- Viana, A.F.; Heckler, A.P.; Fenner, R.; Rates, S.M. Antinociceptive activity of *Hypericum caprifoliatum* and *Hypericum polyanthemum* (Guttiferae). *Brazilian Journal of Medicinal and Biological Research*, v.36, p.631-634, 2003.
- Viana, A.F.; Do Rego, J.C.; Von Poser, G.; Ferraz, A.; Heckler, A.P.; Costentin, J.; Kuze-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, p.1042-1052, 2005.
- Viana, A.F. Estudo de moléculas potencialmente antidepressivas e analgésicas de espécies de *Hypericum* nativas do Rio Grande do Sul. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007.
- Viana, A.F.; Rates, S.M.K.; Naudin, B.; Janin, F.; Costentin, J.; Do Rego, J.C. Effects of acute or 3-day treatments of *Hypericum caprifoliatum* Cham. & Schldtd.

(Guttiferae) extract or for two established antidepressants on basal and stress-induced increase in serum and brain corticosterone levels. *Journal of Psychopharmacology*, v.22, n.6, p.681-690, 2008.

Von Poser, G.L.; Rech, S.B.; Rates, S.M.K. Chemical and Pharmacological Aspects of Southern Brazilian *Hypericum* Species. In: *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology*. Global Science Books, v.4, p.510-516, 2006.

Wachtel-Galor, S.; Benzie, F. F. An Introduction to Its History, Usage, Regulation, Current Trends, and Research Needs. *Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects*, Chapter 1. 2nd edition. Boca Raton (FL): CRC Press; 2011.

Uzbay, T.I. *Hypericum perforatum* and substance dependence: a review. *Phytotherapy research*, v. 22, p. 578 – 582, 2008.

Yoshitake, T.; Iizuka, R.; Yoshitake, S.; Weikop, P.; Müller, W.E.; Ögren, 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.

Zanoli, P. Role of hyperforin in the pharmacological activities of St. John's Wort. *CNS Drugs Reviews*, v. 10, v. 3, p. 203 – 218, 2004.

ANEXOS

PARECERES DO COMITÊ DE ÉTICA

UFRGS
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

pro*pesq

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CARTA DE APROVAÇÃO

A Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul analisou o projeto:

Título: Estudo do efeito de hypericum polyanthemum sobre a neurotransmissão monoaminérgica

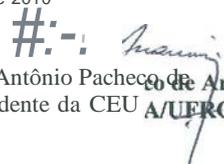
Nº no Sistema Pesquisa: 18518

Pesquisador (es)

NOME	PARTICIPACÃO
GILSANE LINO VON POSER	PESQUISADOR RESPONSÁVEL
STELA MARIS KUZE RATES	PESQUISADOR RESPONSÁVEL
ALICE FIALHO VIANA	PESQUISADOR
JEAN CLAUDE DO REGO	PESQUISADOR

O mesmo foi aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes 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, 19 de julho de 2010


Flávio Antônio Pacheco de Araujo
Presidente da CEU UFRGS

**UFRGS**UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA****Comissão De Ética Na Utilização De Animais****CARTA DE APROVAÇÃO****Comissão De Ética Na Utilização De Animais analisou o projeto:****Número:** 19488**Título:** Estudo exploratório da toxicidade oral de *Hypericum polyanthemum* Klotzsch ex Reichardt (Guttiferare) em camundongos**Pesquisadores:****Equipe UFRGS:**

STELA MARIS KUZE RATES - coordenador desde 01/09/2010
DAVID DRIEMEIER - pesquisador desde 01/09/2010
ELIANE DALLEGRAVE - pesquisador desde 01/09/2010
ANDREIA BUFFON - pesquisador desde 01/09/2010
ANDRESA HEEMANN BETTI - pesquisador desde 01/09/2010
Ana Cristina Stein - pesquisador desde 01/09/2010

Comissão De Ética Na Utilização De Animais aprovou o mesmo em seus aspectos éticos e metodológicos 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, Sexta-Feira, 29 de Outubro de 2010

FLAVIO ANTONIO PACHECO DE ARAUJO
Coordenador da comissão de ética

BIOGRAFIA

1 DADOS PESSOAIS

Nome: Ana Cristina Stein

Filiação: José Stein e Teresinha Lunkes Stein

Nascimento: 27/09/1979

2 FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

1998- 2002 Graduação em Farmácia & Bioquímica- Habilitação em .Tecnologia dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria.

2003- 2005 Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós-Graduação em Ciências farmacêuticas – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

2008- 2012 Doutorado em Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós-Graduação em Ciências farmacêuticas - Universidade Federal do Rio Grande do Sul

3 ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS

(trabalhos realizados em paralelo durante o doutorado)

Socolsky, C; Rates, S. M. K.; Stein, A.C.; Asakawa Y.; Bardon, A. Acylphloroglucinols from *Elaphoglossum crassipes*. Antidepressant-like Activity of Crassipin A. *Journal of Natural Products*, v. 75, p. 1007-1017, 2012.

Muller, L.G. ; Salles, L. ; Stein, A.C.; Betti, A.H. ; Sakamoto, S. ; Cassel, E. ; Vargas, R. F. ; POSER, Gilsane Lino Von ; RATES, S.M.K. . Antidepressant-like effect of *Valeriana glechomifolia* Meyer (Valerianaceae) in mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, v. 36, p. 101-109, 2012.

Haas J. S. ; Stolz, E. D. ; Betti, A. H. ; Stein, AC ; Schripsema, J. ; Poser, Gilsane Lino Von ; Rates, S. M. K. . The anti-immobility effect of hyperoside on the forced swimming test in rats is mediated by the D2-like receptors activation. *Planta Medica*, v. 77, p. 334-339, 2011.

Muller, LG ; Salles, L. ; Sakamoto, S. ; Stein, AC ; Cassel, E. ; Vargas, R. F. ; Rates, S. M. K. ; Poser, Gilsane Lino Von . The effect of storage time and conditions on the diene valepotriates content of the extract of *Valeriana glechomifolia* obtained by supercritical carbon dioxide. *Phytochemical Analysis*, v. 26, p. 1-6, 2011.