

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

Avaliação do efeito de derivados floroglucinóis presentes em *Hypericum caprifoliatum* sobre parâmetros glutamatérgicos e parâmetros relacionados à homeostasia dos íons sódio em roedores.

Fernanda Bossemeyer Centurião

Porto Alegre, 2012

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

Avaliação do efeito de derivados floroglucínóis presentes em *Hypericum caprifoliatum* sobre parâmetros glutamatérgicos e parâmetros relacionados à homeostasia dos íons sódio em roedores.

Tese apresentada por **Fernanda Bossemeyer Centurião** para obtenção do TÍTULO DE DOUTOR em Ciências Farmacêuticas.

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

Porto Alegre, 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 19 de novembro de 2012, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dr. Carmen Regla Vargas

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Daniela Marti Barros

Universidade Federal do Rio Grande

Prof. Dr. Luis Eduardo M. Quintas

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Bossemeyer Centurião, Fernanda

Avaliação do efeito de derivados floroglucínóis presentes em *Hypericum caprifoliatum* sobre parâmetros glutamatérgicos e parâmetros relacionados à homeostasia dos íons sódio em roedores. / Fernanda Bossemeyer Centurião. -- 2012.
150 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, 2012.

1. *Hypericum caprifoliatum*. 2. derivados floroglucínóis. 3. antidepressivos. 4. Na⁺, K⁺ ATPase. 5. canais de Na⁺. I. Kuze Rates, Stela Maris, orient. II. 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.

**Dedico este trabalho à minha mãe Marion e à minha
dinda Pati.**

**Sem a dedicação e cuidado de vocês, este trabalho
não existiria.**

Muito Obrigada.

AGRADECIMENTOS

À Stela, que me aceitou sem me conhecer e não me deixou desistir. Se hoje esta tese está impressa, é por causa dela.

À minha “família” Bébi, Ju, Vó Ica e Vô Ronnie: apoio emocional, estrutural e financeiro incondicionais. Amor.

Ao Felipe, “base” da reta final. Amor.

À Cristina, pela orientação e pelo apoio na vida científica e na vida real.

Às amigas e colegas do laboratório, Liz, Ana, Camila, Eve, Desa, Mile, Vivian, Dessinha, Gusti, Gilda e Alice. Essas são, com certeza, as melhores pessoas que já conheci na vida. Difícil imaginar a vida sem elas. Amor.

À Gil, por me orientar sem ser minha orientadora.

Aos colegas da fitoquímica, Simone, Ju, Maikon, Gari, que agüentaram toda minha ignorância e chatice com toda a paciência do mundo. E um muito obrigado em especial à Sati, “mãe” do hiper.

Ao meu paizão Gerson, pela torcida constante.

Aos colegas que pegaram no batente e foram pra bancada comigo. Liz, Ana, Dessa e Diego do Laboratório 505C. À Marina, Bibi e Pietro da Bioquímica de Santa Maria. À Fernanda, Barbára e Janaína do Laboratório de Neuroproteção e Doenças Metabólicas da UFRGS. Esse trabalho só existe por causa de vocês.

À Prof^a Angela Wyse, por ter aceitado a parceria e disponibilizado parte deste trabalho.

Aos amigos de fé, Gre, Cíntia, Israel, Marcos e Camila. Amor.

Ao CNPq, por financiar minha bolsa de estudo.

“Se o amor não é a cura, ele sem dúvida pode atuar como um remédio muito eficaz.”

Kay Redfield Jamison

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito dos derivados floroglucínóis HC1 e hiperbrasilol B, presentes em *Hypericum caprifoliatum*, sobre a neurotransmissão glutamatérgica, canais de Na⁺ sensíveis à voltagem e atividade da Na⁺, K⁺ ATPase, visando aprofundar o estudo da atividade antidepressiva de *Hypericum caprifoliatum*. O envolvimento da neurotransmissão glutamatérgica no efeito antidepressivo de HC1 foi estudado através de manipulação farmacológica com MK-801 (antagonista NMDA) no teste da natação forçada, e captação e liberação de [³H]-glutamato em sinaptossomas de cérebro total de ratos. Os resultados demonstraram que pelo menos em nível de receptores NMDA e captação e liberação de glutamato, a neurotransmissão glutamatérgica não está envolvida na atividade antidepressiva de HC1. A veratrina, um ativador de canais de Na⁺, preveniu o efeito de HC1 no teste da natação forçada e três dias de tratamento com HC1 aumentaram a atividade da enzima Na⁺, K⁺ ATPase em córtex total e hipocampo de camundongos quando medida *ex vivo* 2h depois da última administração. Porém esta inibição desapareceu quando os animais foram submetidos a uma sessão de 6 minutos de nado forçado. Assim como o HC1, o hiperbrasilol B também teve seu efeito prevenido pela veratrina no teste da natação forçada, e o tratamento por três dias com hiperbrasilol B aumentou a atividade da enzima Na⁺, K⁺ ATPase apenas no hipocampo, e não no córtex total de camundongos. Os resultados deste trabalho reforçam a utilidade das estruturas diméricas de floroglucínóis na pesquisa por novas moléculas com ação antidepressiva e indicam que o hiperbrasilol B pode possuir propriedades moduladoras do humor ou anticonvulsivantes, uma vez que altera a atividade cerebral da Na⁺, K⁺ ATPase em camundongos e tem seu efeito na natação forçada alterado pela veratrina.

Palavras-chave: *Hypericum caprifoliatum*, derivados floroglucínóis, antidepressivo, hiperbrasilol B, HC1, Na⁺, K⁺ ATPase, canais de Na⁺, veratrina.

ABSTRACT

Aiming to narrow the study of the antidepressant activity of *Hypericum caprifoliatum*, this work evaluated the effect of the phloroglucinol derivatives HC1 and hyperbrasilol B, present in *H. caprifoliatum* on glutamatergic neurotransmission, Na⁺ channels and Na⁺, K⁺ ATPase activity. The involvement of glutamatergic neurotransmission in the antidepressant effect of HC1 was investigated by pharmacological manipulation with MK-801 (NMDA antagonist) in the forced swimming test, and [³H]-glutamate uptake and release in total rat brain synaptosomes. The results demonstrated that at least at level of NMDA receptors and glutamate uptake and release, the glutamatergic neurotransmission is not involved in the antidepressant activity of HC1. Veratrine, a Na⁺ channel activator, prevented the effect of HC1 in the forced swimming test and three days of treatment with HC1 increased the enzymatic activity of Na⁺, K⁺ ATPase in mice brain cortex and hippocampus. However, this inhibition disappeared when animals were subjected to a 6-minute forced swim session. Like HC1, the effect of hyperbrasilol B on forced swimming session was also prevented by veratrine; and treatment for three days with hyperbrasilol B increased the activity of Na⁺, K⁺ ATPase in hippocampus, but not in brain cortex of mice. The results of this work reinforce the usefulness of the dimeric phloroglucinols structures in the research for new molecules with antidepressant action and suggest that hyperbrasilol B may possess anticonvulsant and mood stabilizing properties, since it alters mice brain Na⁺, K⁺ ATPase activity and has its effect on the forced swimming test affected by veratrine.

Keywords: *Hypericum caprifoliatum*, phloroglucinol derivatives, antidepressive, hyperbrasilol B, HC1, Na⁺, K⁺ ATPase, Na⁺ channels, veratrine.

LISTA DE ABREVIATURAS

NMDA	N-metil-D-aspartato
AMPA	α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-ácido propiônico
TTX	tetrodotoxina
CCNSs	Canais de cátion não seletivos
TRPC	Canais receptores de potencial transitório
HC1	Fração com floroglucinóis do extrato ciclo-hexano de <i>H. caprifoliatum</i>
HCP	Extrato ciclo-hexano purificado das partes aéreas de <i>H. caprifoliatum</i>
ECH	Extrato ciclo-hexano partes aéreas de <i>H. caprifoliatum</i>
DA	dopamina
NA	noradrenalina
5-HT	serotonina
SBF1	Corante indicador de Na ⁺

LISTA DE FIGURAS

PARTE I

Figura 1. Estruturas dos canais de Na ⁺ e localização dos sítios de ligação das neurotoxinas.	31
Figura 2. Esquema da inserção da Na ⁺ , K ⁺ ATPase na membrana plasmática.	38
Figura 3. Etapas do ciclo de atividade da Na ⁺ , K ⁺ ATPase.	40
Figura 4: Estrutura da hiperforina.	43
Figura 5. Estrutura do hiperbrasilol B.	47

SUMÁRIO

PARTE I	22
1. Introdução	23
2. Objetivos	24
3. Revisão Bibliográfica	25
PARTE II: Resultados	53
Capítulo I: Avaliação do efeito de <i>Hypericum caprifoliatum</i> Cham. & Schltidl (Guttiferae) sobre a neurotransmissão glutamatérgica em roedores.	55
Capítulo II: Study of antidepressant-like activity of an enriched phloroglucinol fraction obtained from <i>Hypericum caprifoliatum</i> Cham & Schltidl (Guttiferae).	73
Capítulo III: The antidepressant-like effect of hyperbrasilol b, a natural dimeric phloroglucinol derivative, is prevented by veratrine, a sensitive-voltage Na ⁺ channel opener.	105
PARTE III: Discussão Geral e Conclusões	115
Referências bibliográficas	123
Anexo	147

PARTE I

INTRODUÇÃO

OBJETIVOS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. INTRODUÇÃO

A depressão é uma condição incapacitante que afeta negativamente a vida social, o trabalho e a família do indivíduo afetado. Embora os antidepressivos disponíveis tenham demonstrado sua eficácia e melhorado muito o prognóstico da doença, os tratamentos disponíveis ainda apresentam limitações, tais como tolerabilidade e efeitos secundários comuns, incluindo náusea, fadiga, disfunção sexual e ganho de peso (Sarris, 2011). Meta-análises de ensaios randomizados controlados demonstraram que preparações de *Hypericum perforatum* são superiores ao placebo e similarmente eficazes a antidepressivos clássicos no tratamento da depressão leve a moderada (Kasper *et al.*, 2010). Uma vantagem clara em relação aos antidepressivos é o baixo índice de efeitos adversos e a boa adesão ao tratamento, principais variáveis que afetam o custo-efetividade de uma determinada forma de terapia (Kasper *et al.*, 2010).

Uma característica interessante do efeito antidepressivo de *H. perforatum* é a sua ação não específica. O extrato e algumas substâncias isoladas inibem a recaptação sinaptossomal de serotonina, noradrenalina, dopamina, GABA e glutamato (Wonnemann *et al.*, 2000; Roz e Rehavi, 2003). A hiperforina, um derivado floroglucinol bicíclico acilado com pouca semelhança estrutural e funcional a qualquer outro antidepressivo utilizado terapeuticamente, é o principal constituinte ativo de *H. perforatum* (Linde *et al.*, 2008). Postulou-se que a hiperforina ative canais de cátion não seletivos (Treiber *et al.*, 2005), e de fato, Leuner e colaboradores (2007) demonstraram que a hiperforina ativa seletivamente TRPC6, um membro da classe C dos canais receptores de potencial transitório (TRPs), resultando num aumento imediato das concentrações intracelulares de sódio e cálcio.

Dentro deste contexto, nosso grupo de pesquisa vem trabalhando há mais de uma década com uma linha de pesquisa que visa à investigação química e farmacológica das espécies do gênero *Hypericum* nativas do Rio Grande do Sul. Dentre as espécies pesquisadas, destacou-se a espécie *H. caprifoliatum* como ativa em modelos animais de depressão (Daudt *et al.*, 2000;

Viana *et al.*, 2005). Essa espécie foi incluída pelo Ministério do Meio Ambiente entre as espécies da flora nativa de valor econômico atual e potencial dentro do projeto denominado “Plantas para o futuro”, uma iniciativa que tem como objetivo promover o conhecimento, a conservação e o uso sustentável de espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial, de uso local ou regional (Biawatti, 2011).

Um extrato ciclohexânico bruto (ECH) e um extrato ciclohexânico purificado (HCP) de *H. caprifoliatum* ricos em floroglucínóis demonstraram efeito antidepressivo dependente da dose, quando foram avaliados no teste da natação forçada em ratos e camundongos (Viana *et al.*, 2005). Os trabalhos desenvolvidos até agora demonstram que estes extratos, assim como HC1 (uma fração enriquecida em floroglucínóis obtida de *H. caprifoliatum*) inibem a captação neuronal de monoaminas de forma pouco seletiva, sugerindo que esta ação depende de algum mecanismo envolvido no transporte de neurotransmissores em geral (Viana *et al.*, 2006). Porém, os mecanismos moleculares pelos quais estes extratos de *H. caprifoliatum* exercem ação do tipo antidepressiva ainda não estão esclarecidos. Desta forma, esta tese de doutorado visou aprofundar o estudo da atividade antidepressiva de *H. caprifoliatum*, avaliando o efeito de HC1 e de hiperbrasilol B, outro composto com estrutura dimérica consistindo de ácido filicínico e uma porção floroglucinol isolado de *H. caprifoliatum* (Nör *et al.*, 2004) sobre parâmetros glutamatérgicos e parâmetros relacionados à homeostasia dos íons Na⁺.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar o efeito de HC1 e hiperbrasilol B, derivados floroglucínóis presentes em *H. caprifoliatum*, sobre parâmetros glutamatérgicos e parâmetros relacionados à homeostasia dos íons Na⁺ em roedores.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar o efeito do antagonista glutamatérgico NMDA, MK-801 sobre a atividade antidepressiva de HC1, observada no teste da natação forçada em camundongos.
- Avaliar o efeito de HC1 sobre parâmetros glutamatérgicos *in vitro*, tais como: captação de glutamato em sinaptossomas de cérebro total de ratos e liberação de glutamato em sinaptossomas de cérebro total de ratos.
- Avaliar possível envolvimento de canais de Na⁺ na atividade antidepressiva de *H. caprifoliatum*, associando a veratrina, um ativador de canais de Na⁺, ao HC1 e hiperbrasilol B, no teste da natação forçada em camundongos.
- Avaliar o efeito de um tratamento agudo e de um tratamento repetido com HC1 e hiperbrasilol B sobre a atividade da enzima Na⁺, K⁺-ATPase *ex vivo* em camundongos.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. GLUTAMATO NA DEPRESSÃO

As primeiras teorias sobre a depressão concentraram-se principalmente nas aminas biogênicas (serotonina, noradrenalina e dopamina) (Schildkraut, 1965; Nestler *et al.*, 2002) e a maioria dos antidepressivos disponíveis atualmente têm como alvo receptores e/ou mecanismos de recaptação de neurotransmissores monoaminérgicos. Recentemente, a pesquisa sobre a neurobiologia da depressão tem-se centrado em diversos neuromoduladores e neurotransmissores não-monoaminérgicos (Vidal *et al.*, 2011; Connolly e Thase, 2012) e entre os caminhos mais interessantes de investigação a este respeito, estão aqueles que envolvem o aminoácido excitatório glutamato. Há cada vez mais evidências de que o sistema glutamatérgico desempenha um papel importante na neurobiologia e no tratamento da depressão (Sen e Sanacora, 2008; Zarate *et al.*, 2010; Szakacs *et al.*, 2012; Sanacora *et al.*, 2012).

As principais vias excitatórias do sistema nervoso central utilizam glutamato como neurotransmissor (Meldrum *et al.*, 1999; Segovia *et al.*, 2001). O glutamato é encontrado, no cérebro de mamíferos, em altas concentrações (10 nM) e participa de funções metabólicas idênticas às exercidas em outros tecidos (Meldrum *et al.*, 1999). Está envolvido em uma variedade de processos fisiológicos, tais como aprendizado, memória e formação de redes neurais durante o desenvolvimento (Ozawa *et al.*, 1998; Martini *et al.*, 2006). É sintetizado nos terminais pré-sinápticos, predominantemente a partir de glutamina devido à ação da enzima glutaminase, mas pode provir do α -cetoglutarato, via glutamato desidrogenase e α -cetoglutarato aminotransferases (Watts *et al.*, 2005). A ação excitatória do glutamato é finalizada através de sua captação da fenda sináptica pelas células gliais ou pelos neurônios pré-sinápticos, onde é armazenado nas vesículas sinápticas. A captação do glutamato da fenda sináptica envolve dois sistemas de transporte: um carreador com alta afinidade e dependente de Na^+ , localizado nas membranas pré-sinápticas e gliais (Robinson e Dowd, 1997) e outro com baixa afinidade e independente de Na^+ , nas membranas das vesículas sinápticas. Uma vez armazenado, o glutamato poderá ser liberado na fenda, desde que as membranas pré-sinápticas sejam despolarizadas.

Quando liberado na fenda sináptica, o glutamato exerce suas funções fisiológicas ativando receptores localizados nas membranas pré- e pós-sinápticas, bem como nas membranas das células gliais (Meldrum *et al.*, 1999). A neurotransmissão glutamatérgica pode ser modulada por diferentes tipos de receptores, incluindo receptores ionotrópicos e metabotrópicos (Ozawa *et al.*, 1998). Os receptores ionotrópicos são canais iônicos que permeiam cátions através da membrana neuronal. Portanto, a sua ativação provoca a despolarização da membrana sináptica e desencadeia uma resposta excitatória. Estes receptores são subdivididos em N-metil-D-aspartato (NMDA), α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-ácido propiônico (AMPA) e ácido caínico (KA), com base na sua sensibilidade a agonistas específicos (Ozawa *et al.*, 1998). Os receptores metabotrópicos estão associados a sistemas de segundo mensageiros intracelulares (Conn e Pin, 1997). Estes receptores são acoplados

a proteínas G (proteínas ligantes de nucleotídeos da guanina) e modulam a atividade de fatores intracelulares, tais como adenilato ciclase e fosfolipase C, responsáveis pela produção de segundos mensageiros (AMPc, diacilglicerol e inositol trifosfato) (Conn e Pin, 1997). Atualmente são conhecidos por clonagem oito subtipos de receptores glutamatérgicos metabotrópicos (mGluR1 a mGluR8).

Existem diversos trabalhos relatando alterações nos níveis de glutamato no sangue e fluído cérebro-espinhal de pacientes com depressão. Kim e colaboradores (1982) demonstraram que os níveis de glutamato no soro de pacientes com depressão estavam significativamente mais elevados do que em pacientes controles saudáveis. Além disso, Altamura e colaboradores (1993) relataram que os níveis de glutamato no plasma de pacientes com transtornos afetivos estavam maiores em relação ao grupo controle. Existe também uma correlação positiva entre os níveis de glutamato no plasma e a severidade dos sintomas depressivos em pacientes com depressão (Mitani *et al.*, 2006). Utilizando amostras de cérebro *post mortem* de pacientes depressivos da 'Stanley Foundation Brain Collection' (Torrey *et al.*, 2000), Hashimoto e colaboradores (2007) relataram que havia níveis elevados de glutamato no córtex frontal, o que indica que ocorram anormalidades da neurotransmissão glutamatérgica nas características patofisiológicas da depressão.

A hipótese de que antagonistas de receptores NMDA atuem como antidepressivos foi baseada nas observações de que a exposição ao choque inescapável interrompe a potenciação de longa duração (LTP) no hipocampo de ratos (Shors *et al.*, 1989), um fenômeno que é dependente da ativação de receptores NMDA (Morris *et al.*, 1986). Os testes iniciais realizados para comprovar esta hipótese, avaliaram o bloqueador protótipo de canal de receptores NMDA dizolcipina (MK-801), o antagonista competitivo NMDA AP-7 e o agonista parcial ACPC, numa variante do teste da natação forçada em roedores (Skolnick *et al.*, 2009), um paradigma de desespero comportamental. Cada um desses compostos produziu uma redução na imobilidade de maneira dependente da dose, uma característica de antidepressivos protótipos, como a imipramina. Existem vários modelos experimentais de depressão em roedores,

embora nenhum seja capaz de mimetizar totalmente os sintomas comportamentais apresentados por humanos. Induzindo-se uma situação de estresse, não havendo escapatória para ratos e camundongos, consegue-se um tipo de inibição comportamental ('desespero') que é responsiva a tratamentos com fármacos antidepressivos (Overstreet, 2012). Este efeito é central no teste da natação forçada, um modelo experimental clássico capaz de prever possíveis compostos com atividade antidepressiva. No teste da natação forçada, os animais que são forçados a nadar em espaço restrito, eventualmente cessam suas tentativas de escapar e ficam imóveis, com exceção de alguns movimentos para manter suas cabeças fora da água (Porsolt *et al.*, 1978). O tempo de imobilidade é reduzido por antidepressivos que são terapêuticamente eficazes.

Apesar dos vários indícios da participação do glutamato na patogênese da depressão, ainda não se sabe ao certo qual estrutura anatômica estaria envolvida nesta função. Estudos demonstram a ligação do núcleo acumbens com a depressão comportamental no teste da natação forçada (Cervo *et al.*, 1990; Chau *et al.*, 2001), e o glutamato estaria envolvido, uma vez que o núcleo acumbens recebe muitas informações do sistema glutamatérgico vindas do córtex pré-frontal, hipocampo, amígdala e sítios relacionados (Cotman e Monaghan, 1986), ao mesmo tempo em que a administração de antagonista NMDA (AP7) diretamente no núcleo acumbens, apresenta efeito antidepressivo no teste da natação forçada (van den Bos *et al.*, 1992). Por outro lado, existem evidências que sugerem que a estrutura anatômica envolvida no papel do glutamato na depressão seja o hipocampo (Przegalinski *et al.*, 1997). Esta estrutura estaria envolvida nas respostas neuroquímicas e comportamentais, observadas em resposta a estímulos adversos (Padovan e Guimarães, 2004), e a administração de CGP 37489, um antagonista NMDA, demonstrou efeito antidepressivo no teste da natação forçada (Przegalinski *et al.*, 1997).

Ao longo dos últimos 20 anos, inúmeros trabalhos descreveram as propriedades do tipo antidepressivas de antagonistas NMDA diversos entre si estruturalmente, em procedimentos de desespero comportamental em roedores. A cetamina, um antagonista NMDA, reduz a imobilidade no teste da

natação forçada em ratos (Wang *et al.*, 2011). De maneira semelhante, o riluzol, uma molécula que inibe a liberação de glutamato de neurônios pré-sinápticos, reverte a redução no metabolismo glial e os efeitos comportamentais do estresse crônico imprevisível em ratos (Banar *et al.*, 2008). Zarate e colaboradores (2006) demonstraram o efeito antidepressivo rápido e robusto de uma única dose de cetamina (0,5 mg/kg; infusão endovenosa por 40 min) no tratamento da depressão maior resistente. Nesse estudo, viu-se uma resposta antidepressiva significativa em apenas 2h após a administração; 50% dos pacientes demonstraram melhora dentro de 2h e 71% 24h após uma dose única de cetamina. Esta resposta foi mantida por mais de uma semana. Esse estudo confirmou resultados preliminares de um estudo pequeno (n=7) que demonstrou que a cetamina teve efeitos antidepressivos rápidos em pacientes com depressão resistente ao tratamento (Berman *et al.*, 2000). Essa resposta rápida e eficiente à cetamina ocorre por um caminho totalmente diferente, envolvendo o aumento da transmissão glutamatérgica e indução de sinaptogênese (Li *et al.*, 2010). Duman e Li (2012) consideram esses resultados um dos avanços mais significativos no campo da depressão ao longo dos últimos 50 anos: um antidepressivo novo, eficaz e de rápida atuação, cujo mecanismo é completamente diferente dos medicamentos atualmente disponíveis.

3.2. CANAIS DE Na⁺

Os sinais neuronais são compostos por potenciais de ação que passam ao longo do comprimento de axônios e de um neurônio a outro nas sinapses, sendo que os canais de Na⁺ constituem a base da despolarização que inicia este potencial de ação. Em resposta à despolarização, eles são ativados, permitindo a passagem de íons através de seus poros, sendo inativados dentro de milissegundos (Scheuer e Catterall, 2006). Contudo, uma pequena fração de canais de Na⁺ permanece ativa entre os potenciais de ação. Esta atividade contribui para a rede de despolarização; e a modulação destas pequenas correntes de Na⁺ fornece um substrato sensível para a neuromodulação. Os canais de Na⁺ são os membros fundadores da superfamília dos canais iônicos, incluindo os canais de cálcio e potássio sensíveis à voltagem.

3.2.1. Estrutura molecular dos canais de Na⁺ sensíveis à voltagem

Os canais de Na⁺ são moléculas heterotriméricas consistindo de uma subunidade α de aproximadamente 260 KDa, que contém um poro condutor de íons e a maquinaria molecular que detecta a voltagem, fazendo com que o canal se abra (Catterall, 2000). Esta subunidade α está associada com uma subunidade do tipo $\beta 1$ ($\beta 1$ ou $\beta 3$) de 36 KDa e é acoplada por pontes dissulfeto à uma subunidade do tipo $\beta 2$ ($\beta 2$ ou $\beta 4$) de 33 KDa. Nove isoformas funcionais da subunidade α foram descritas, das quais quatro são altamente expressas no cérebro (Goldin *et al.*, 2000). As subunidades α dos canais de Na⁺ fazem parte da superfamília de canais iônicos (Yu e Catterall, 2004). Juntamente com os canais de cálcio, eles formam um subgrupo onde os canais consistem de quatro domínios homólogos. Cada domínio homólogo assemelha-se a canais de potássio sensíveis à voltagem e contém seis segmentos transmembrana α -hélice e um poro condutor de íons. O loop intracelular altamente conservado, que conecta os domínios homólogos III e IV (loop III-IV) forma o portão de inativação (West *et al.*, 1992; Catterall, 2000). O grande loop intracelular que conecta os domínios homólogos I e II (loop I-II) dos canais de Na⁺ cerebrais contém a série de sítios de fosforilação para PKA (proteína quinase A) e PKC (FIGURA 1). O alcalóide veratridina liga-se ao sítio 2 do receptor para neurotoxinas dos canais de Na⁺. Esta toxina liga-se preferencialmente ao estado ativado dos canais de Na⁺ e causa ativação persistente no potencial de membrana de repouso através de mecanismo alostérico, levando à inibição da inativação do canal de Na⁺ e alteração da dependência de voltagem de ativação para potências mais negativos (Ulbricht, 1969). O aumento na concentração intracelular de Na⁺ induzido por veratridina em terminais nervosos isolados (sinaptossomas) pré-carregados com SBFI, um corante indicador seletivo para Na⁺, é inibido por tetrodotoxina, um bloqueador de canais de Na⁺, independentemente da concentração extracelular de cálcio (Sitges *et al.*, 1998). A liberação de neurotransmissores induzida por veratridina em sinaptossomas também é sensível à tetrodotoxina, independente da concentração de cálcio externo, e depende da presença externa de Na⁺ (Sitges e Chiu, 1995; Sitges e Galindo, 2005). Portanto, a sensibilidade das respostas induzidas por veratridina às drogas indica antagonismo ao canal de Na⁺. A

veratrina é também um ativador de canais de Na^+ , que aumenta a liberação de glutamato (Lizasoain *et al.*, 1995).

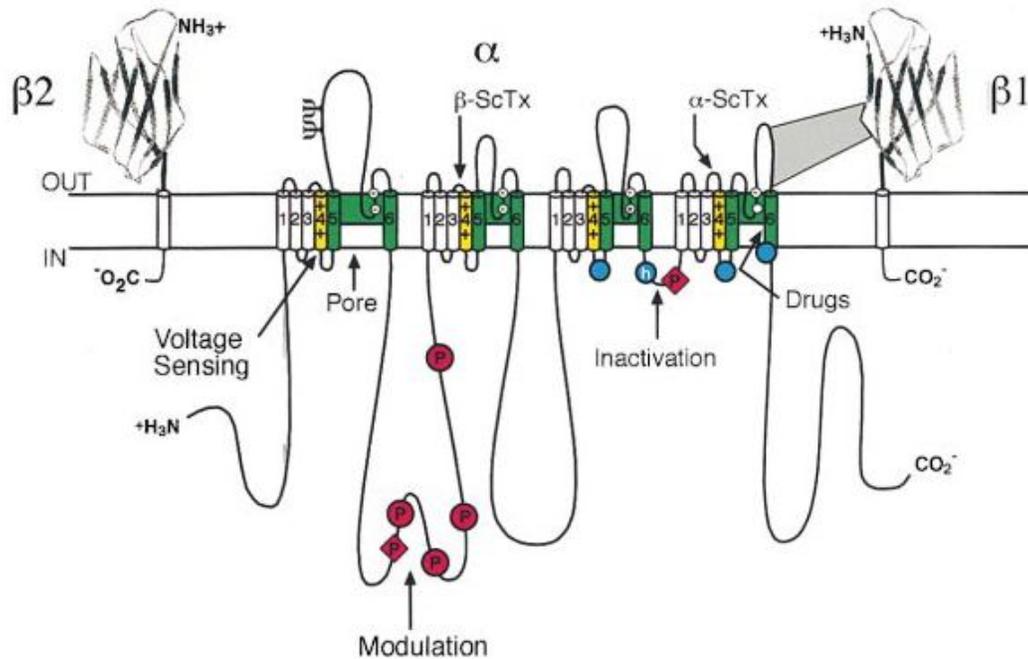


Figura 1. Estrutura dos canais de Na^+ e localização dos sítios de ligação das neurotoxinas (Catterall, 2000).

Funcionalmente, os canais de Na^+ sensíveis à voltagem podem existir em três estados conformacionais e a transição entre eles permite que ocorra a transição iônica seletiva e dependente do tempo. No potencial de repouso na maioria dos neurônios, os canais de Na^+ sensíveis à voltagem encontram-se no estado fechado não condutor, comumente conhecido como estado de 'repouso'. O movimento de cargas que induz a abertura do canal foi medido eletrofisiologicamente (Armstrong e Benzanilla, 1973) e foi atribuído à seqüência de resíduos de arginina e lisina carregados positivamente e situados no segmento transmembrana quatro (S4) da subunidade α (Catterall, 1992). O movimento da região S4 perpendicular ao plano da membrana resulta na abertura do portão de ativação e permite o fluxo de Na^+ . A neutralização dos resíduos carregados na região S4 altera bruscamente a ativação dependente de voltagem (Stuhmer *et al.*, 1989). Após a abertura do portão de ativação, o poro do canal (formado pelo loop reentrante entre S5 e S6) conduz

seletivamente íons Na^+ através do seu gradiente eletroquímico, do espaço extracelular para o interior da célula, despolarizando então ainda mais o potencial transmembrana neuronal. Entretanto, em poucos milissegundos após a abertura do portão de ativação, a despolarização sustentada resulta no término da condutância de Na^+ , através de um processo conhecido como inativação. A inativação usualmente, porém não sempre, ocorre rapidamente, atenuando a maioria das correntes de Na^+ , sendo assim referida como inativação 'rápida' (Vassilev *et al.*, 1988).

3.2.2. Interação de antidepressivos monoaminérgicos com canais de Na^+

Nicholson e colaboradores (2002) realizaram um estudo onde avaliaram os efeitos de uma série de antidepressivos sobre canais neuronais de Na^+ e K^+ sensíveis à voltagem. Todos os antidepressivos testados inibiram a captação de $^{22}\text{Na}^+$ estimulada por batracotoxina, provavelmente por inibição alostérica negativa da ligação da neurotoxina ao sítio 2 (receptor da neurotoxina) no canal de Na^+ . A imipramina também produziu uma ação diferencial sobre as correntes macroscópicas dos canais de Na^+ e K^+ no gânglio da raiz dorsal de ratos, dissecado agudamente, e bloqueio dependente do uso de canais de Na^+ . Essas ações sobre os canais iônicos sensíveis à voltagem podem estar envolvidas tanto nos efeitos terapêuticos, quanto nos efeitos tóxicos dos antidepressivos (Nicholson *et al.*, 2002, Lenkey *et al.*, 2010). Pancrazio e colaboradores (1998) demonstraram a capacidade dos antidepressivos tricíclicos em bloquear canais de Na^+ neuronais; a amitriptilina mantém os canais no estado inativado, requerendo uma repolarização mais longa para reverter para o estado fechado. A localização exata do sítio de ligação dos antidepressivos nos canais de Na^+ sensíveis à voltagem permanece desconhecida, podendo ser diferente daquela dos anestésicos locais ou coincidir com esta (Yang *et al.*, 2010).

O estudo do mecanismo de ação dos antidepressivos sobre os canais de Na^+ tem sido focado há muito tempo nos antidepressivos tricíclicos. Foram realizadas análises detalhadas utilizando a imipramina (Yang e Kuo, 2002; Yang *et al.*, 2010) e amitriptilina (Yan *et al.*, 2010). Estes estudos sugerem que a conformação inativada rapidamente é a preferida dos antidepressivos. Até

agora, o significado da inibição dos canais de Na⁺ pelos antidepressivos tricíclicos parece estar relacionado aos seus efeitos adversos cardíacos (Marshall e Forker, 1982) e à sua potência analgésica (Namaka *et al.*, 2004). A observação de que estas drogas obviamente afetam canais de Na⁺ neuronais em concentrações similares às aquelas que apresentam efeito antidepressivo, levanta a questão de se o efeito de inibição de canais de Na⁺ estaria envolvido em suas ações antidepressivas. Além disso, descobriu-se que a fluoxetina (um inibidor seletivo da recaptação de serotonina), que possui seletividade diferente dos tricíclicos em relação ao transporte de monoaminas, age sobre os canais de Na⁺ com mecanismo similar e em concentração similar à desipramina, sugerindo que este efeito pode ter significância terapêutica (Karoly *et al.*, 2010). A inibição mostrou-se altamente sensível aos parâmetros experimentais, tal como o pH extracelular, sugerindo que a inibição *in vivo* é altamente seletiva e dependente dos padrões locais de atividade.

Antidepressivos, em concentrações terapêuticas, não apenas bloqueiam a recaptação de diferentes monoaminas, mas também afetam outros alvos protéicos, como a inibição de diversos tipos de canais iônicos (Aldana e Sitges, 2012). Assim, em sua ação terapêutica, fármacos antidepressivos modificam de diferentes maneiras a atividade dos neurônios, aumentando os níveis de monoaminas e modulando os canais iônicos. Ainda, os canais de Na⁺ são alvos moleculares para fármacos anticonvulsivantes, tais como lamotrigina, topiramato, fenitoína e ácido valpróico, que atuam também como estabilizadores do humor.

3.2.3. Envolvimento dos canais de Na⁺ no efeito antidepressivo dos estabilizadores de humor

O transtorno bipolar é uma desordem severa e crônica, caracterizada por episódios recorrentes de mania e depressão (Pail *et al.*, 2011). O maior desafio no tratamento da depressão bipolar é a tendência das medicações antidepressivas, particularmente os antidepressivos tricíclicos, em precipitar episódios de mania, ou aumentar a frequência do ciclo e a intensidade dos sintomas. Nos últimos anos, vários estudos demonstraram que

anticonvulsivantes, tais como carbamazepina e lamotrigina (Ketter *et al.*, 2003; El-Mallakh *et al.*, 2010), topiramato e valproato, em adição aos seus efeitos antiepiléticos, também são eficientes no tratamento do transtorno bipolar (Mishory *et al.*, 2003; Rapoport *et al.*, 2009). Estes fármacos também são bloqueadores de canais de Na⁺ sensíveis à voltagem (Lenkey *et al.*, 2010).

3.2.3.1. Lamotrigina

A lamotrigina é um fármaco anticonvulsivante com amplo espectro de atividade (Goa *et al.*, 1993). De mesma maneira que ocorre com outros anticonvulsivantes, como o valproato de sódio e a carbamazepina, a lamotrigina possui propriedade estabilizadora do humor, o que torna o seu uso útil no tratamento do transtorno bipolar (El-Mallakh *et al.*, 2010). Nos últimos anos, evidências clínicas indicaram que a lamotrigina também é efetiva na fase depressiva da doença bipolar (Seo *et al.*, 2011; Frye, 2011) e na forma de ciclagem rápida da doença, que é de difícil tratamento (Walden *et al.*, 2000; Calabrese *et al.*, 2001), com baixo potencial para induzir a troca para mania, minimizando assim o risco de ciclismo acelerado que é comumente associado ao uso de antidepressivos convencionais (Calabrese *et al.*, 2001).

A ação anticonvulsivante da lamotrigina parece ocorrer via inibição da liberação de aminoácidos excitatórios, como glutamato e aspartato (Seo *et al.*, 2011), bloqueio de canais de Na⁺ sensíveis à voltagem e estabilização das membranas neuronais (Mantegazza *et al.*, 2010). A base molecular desse bloqueio tem sido atribuída à inibição de correntes de Na⁺ dependentes de voltagem em diferentes preparações (Mantegazza *et al.*, 2010). Kuo e Lu (1997) concluíram que a lamotrigina, em concentrações terapêuticas e em potenciais de membrana relativamente despolarizados, pode inibir correntes de Na⁺ de maneira potente, pela ligação lenta ao estado rapidamente inativado dos canais de Na⁺.

A lamotrigina inibe a liberação de glutamato induzida por veratrina e veratridina (Lingamaneni *et al.*, 1999). A veratrina reverte alguns efeitos comportamentais da lamotrigina, como o seu efeito ansiolítico em modelo de reposta emocional condicionada (Mirza *et al.*, 2005). Codagnone e

colaboradores (2007) demonstraram que o pré-tratamento com veratrina, reverte o efeito antiimobilidade da lamotrigina no teste da natação forçada modificado, bloqueando o aumento no comportamento de nado, que está relacionado ao sistema serotoninérgico. Estes resultados estão de acordo com os de Prica e colaboradores (2008), que observaram que quando combinado com veratrina, o efeito antiimobilidade da lamotrigina no teste da natação forçada em camundongos é bloqueado. Contudo, o efeito antiimobilidade da lamotrigina não foi completamente revertido pela veratrina; uma explicação poderia ser de que a dose de veratrina utilizada não é suficiente para ativar todos os canais de Na^+ , mas pode-se também presumir que o efeito antiimobilidade da lamotrigina pode envolver mecanismos diferentes. De fato, Bourin e colaboradores (2005) realizaram estudos de associação utilizando ligantes específicos e não específicos de receptores 5-HT_{1A} para avaliar um papel em potencial desses receptores no efeito antiimobilidade da lamotrigina. Observou-se o envolvimento de receptores 5-HT_{1A} no mecanismo de ação da lamotrigina no teste da natação forçada, sugerindo-se que este efeito pode ser mediado através de uma interação com o sistema serotoninérgico (Bourin *et al.*, 2005).

No teste da natação forçada modificado, a lamotrigina reduz o comportamento de imobilidade, aumentando os comportamentos de 'climbing' e nado (Consoni *et al.*, 2006). Foi demonstrado que fármacos antidepressivos serotoninérgicos (por exemplo, fluoxetina e paroxetina) aumentam o comportamento de nado no teste da natação forçada modificado, enquanto que drogas antidepressivas noradrenérgicas (por exemplo, reboxetina e nortriptilina) aumentam o comportamento de 'climbing'; ambas as classes de antidepressivos reduzindo a imobilidade (Cryan *et al.* 2002; 2005; Consoni *et al.*, 2006). Além disso, a lesão química do feixe ventral noradrenérgico bloqueou o efeito de drogas noradrenérgicas no 'climbing', enquanto que a depleção serotoninérgica por para-clorofenilalanina bloqueou o efeito da fluoxetina no comportamento de nado (Cryan *et al.*, 2005). Assim, os efeitos da lamotrigina no teste da natação forçada modificado parecem ser de ação noradrenérgica e serotoninérgica.

3.2.3.2. Outros anticonvulsivantes

De maneira similar à lamotrigina, dois outros anticonvulsivantes, o topiramato e a fenitoína, reduzem o tempo de imobilidade no teste da natação forçada, sendo esta resposta consistente com efeito do tipo antidepressivo (Prica *et al.*, 2008). Ainda, o efeito antiimobilidade de ambos os fármacos foi totalmente revertido pela veratrina, sugerindo que este efeito pode ser exclusivamente dependente de canais de Na^+ .

Tem-se observado que o efeito dos estabilizadores de humor no teste da natação forçada é mais significativo do que aquele apresentado pelos antidepressivos. O mecanismo de ação dos anticonvulsivantes usados no tratamento da depressão bipolar é muito complexo e ainda não foi totalmente elucidado (Bourin *et al.*, 2009). Os canais de Na^+ estão presentes em locais distintos nos neurônios, onde eles exercem diferentes funções e diferentes papéis; logo, dependendo da isoforma de canal de Na^+ ativada, expressas em diferentes partes do neurônio, pode-se produzir efeitos funcionais altamente diferenciados. Alguns canais de Na^+ , especialmente aqueles expressos no segmento inicial do axônio, iniciam potenciais de ação e controlam os limiares de disparo e os limiares de descargas neuronais. Canais de Na^+ pós-sinápticos somatodendríticos atuam em conjunto com uma série de canais sensíveis à voltagem e sensíveis a ligantes para gerar descargas neuronais. Em contraste, canais de Na^+ pré-sinápticos contribuem para a liberação de neurotransmissores (Prica *et al.*, 2008). Todos os anticonvulsivantes bloqueadores de canais de Na^+ irão atuar até certo ponto nessas três populações de canais de Na^+ , mas pode haver diferenças dos efeitos relativos em determinada população. Por exemplo, o riluzol, um anticonvulsivante bloqueador de canal de Na^+ , pode inibir preferencialmente a liberação de glutamato porque as interações seletivas com canais de Na^+ ocorrem nos terminais glutamatérgicos pré-sinápticos (Prakryia e Mennerick, 2000). Os anticonvulsivantes também podem diferenciar-se uns dos outros, em relação aos seus efeitos secundários sobre outros canais Na^+ . Vários anticonvulsivantes comercializados que possuem a ação de bloquear canais de Na^+ , como o topiramato, também possuem ações proeminentes em outros

canais iônicos, como os de Ca^{2+} . A combinação destas ações pode contribuir para a eficácia clínica única destes fármacos (Sitges *et al.*, 2007).

3.3. Na^+ , K^+ ATPase

A adenosina trifosfatase ativada por sódio, potássio e dependente de magnésio (Na^+ , K^+ ATPase; bomba de sódio) é um complexo protéico associado à membrana plasmática encontrado em células animais, que atua acoplando a energia estocada na molécula de ATP ao transporte de íons Na^+ e K^+ através da membrana celular. Para cada três íons Na^+ bombeados para fora da célula, dois íons K^+ são bombeados para dentro (Skou, 1957; 1965; 2004). Este transporte produz gradiente químico e elétrico através da membrana celular, o qual é essencial para manter o potencial de membrana das células e para a atividade excitável do músculo e células nervosas.

A enzima Na^+ , K^+ ATPase possui estrutura oligomérica com duas subunidades ligadas de maneira não-covalente – ‘ α ’ e ‘ β ’ (Cornelius, 1991) e uma pequena subunidade ‘ γ ’. A subunidade α ou catalítica apresenta 10 domínios hidrofóbicos transmembranares, contendo todos os sítios de ligantes que estimulam ou inibem a atividade enzimática. Os ligantes necessários para a fosforilação da enzima interagem nos sítios da subunidade α , localizados na superfície citoplasmática da membrana, enquanto que os íons K^+ necessários para a hidrólise enzimática e os inibidores clássicos desta enzima (glicosídeos cardíacos) ligam-se à superfície extracelular. A subunidade β tem um simples domínio hidrofóbico transmembranar e sua superfície extracelular é altamente glicosilada. Acredita-se que a função desta subunidade seja orientar e estabilizar a subunidade na membrana, além de regular a afinidade desta pelo íon K^+ e pelos glicosídeos cardíacos. A presença da subunidade β é essencial para o funcionamento enzimático (Abriel *et al.*, 1999; Mobasheri *et al.*, 2000).

Quanto à isoforma γ , a última a ser descoberta, é um proteolípido presente principalmente em células renais, atuando como moduladora da afinidade da enzima por diferentes ligantes (Béguin *et al.*, 1997; Therien *et al.*, 2001) e apresenta um efeito direto e positivo sobre a velocidade máxima da

hidrólise de ATP (Cortes *et al.*, 2006). A Figura 2 mostra um modelo do complexo enzimático inserido na membrana plasmática.

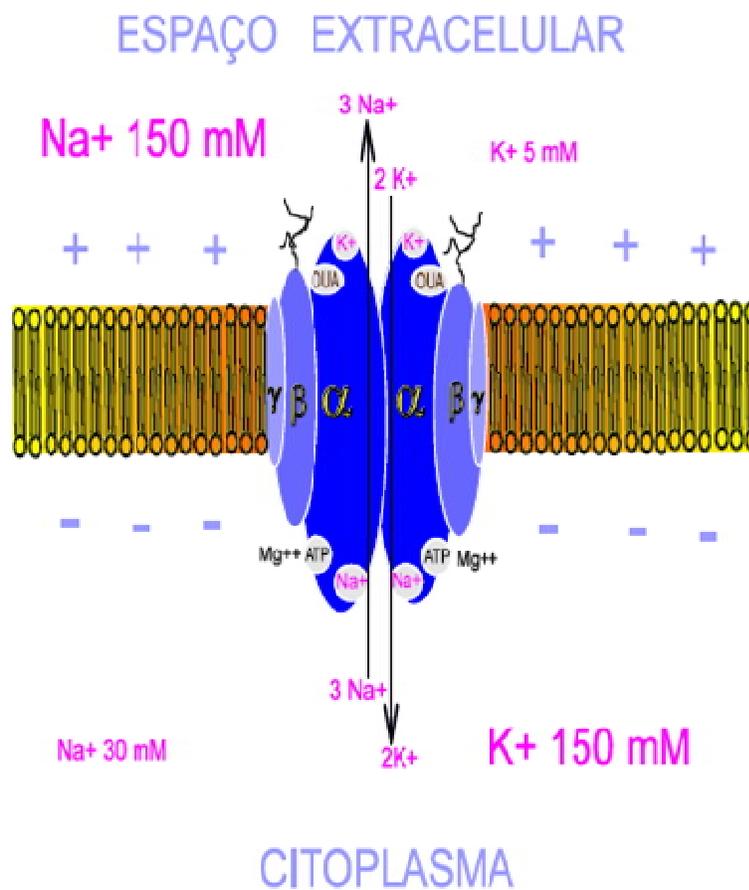


Figura 2. Esquema da inserção da Na⁺, K⁺ ATPase na membrana plasmática. São apresentadas as subunidades (com seus sítios para Na⁺, K⁺, ATP e glicosídeos cardíacos – (OUA) ouabaína), as subunidades (glicoproteínas) e as subunidades. É também indicado o transporte de 3 Na⁺ e 2 K⁺ por ATP hidrolisado, bem como as concentrações fisiológicas destes íons dentro e fora da célula (Burth, 1997).

A Na⁺, K⁺ ATPase existe como múltiplas isoenzimas, resultante da combinação de diferentes isoformas das subunidades α e β. Existem isoformas para ambas as subunidades: α (α1, α2, α3 e α4) e β (β1, β2 e β3) (Blanco *et al.*, 1998). As quatro isoformas α são expressas diferentemente ao longo do desenvolvimento do organismo em diferentes tecidos. A isoforma α1 ocorre na

maioria dos tecidos, enquanto que a $\alpha 2$ predomina no músculo esquelético e também foi detectada (em menor quantidade) no cérebro e coração. A isoforma $\alpha 3$ está limitada essencialmente ao tecido nervoso e ao coração e a $\alpha 4$ é encontrada somente nos testículos e espermatozóides. Estas isoformas têm diferentes propriedades funcionais com respeito à afinidade por ligantes como Na^+ e ouabaína, embora a função essencial de transporte de íons seja a mesma (Blanco e Mercer, 1998, Blanco *et al.*, 2000, Mobasheri *et al.*, 2000; Kaplan, 2002). O tecido renal parece expressar unicamente a isoforma $\alpha 1$, embora Barlet-Bas *et al.* (1993) tenham detectado a presença, também, da isoforma $\alpha 3$ em segmentos de túbulos renais isolados. As isoformas $\beta 1$ e $\beta 2$ são as predominantes nas células de mamíferos, sendo a $\beta 1$ expressa ubiquamente, enquanto que a $\beta 2$ aparece principalmente no tecido nervoso. A isoforma $\beta 3$ foi identificada no músculo esquelético, pulmão e principalmente no tecido nervoso (Appel *et al.*, 1996).

De acordo com Skou (1988), as funções fisiológicas da Na^+ , K^+ ATPase são de manutenção do controle do gradiente de Na^+ e K^+ , gerando o potencial de repouso, manutenção de altas concentrações de K^+ intracelular, responsáveis por reações celulares como a glicólise, regulação osmótica e transporte ativo de outras substâncias como açúcares, aminoácidos, íons cloreto e contenção do transporte de íons cálcio e prótons hidrogênio. A Na^+ , K^+ ATPase possui dois estados conformacionais: E1 e E2, que caracterizam as enzimas do tipo P e, segundo a reação de Albert–Post, em um deles se dá a hidrólise do ATP (Chow e Forte, 1995). Segundo Jorgensen (2003), os mecanismos de transporte iônico se dão pela ligação de três íons Na^+ em sítios de ligação com alta afinidade para este íon na porção citoplasmática da enzima e com fosforilação dependente de Na^+ e oclusão dos íons ligados. Com isso, acontece uma transição conformacional (E1 para E2) e transporte dos íons Na^+ para a região intracelular. Logo após esta transição, a enzima perde a afinidade com o Na^+ e acontece uma ligação de dois íons K^+ em sítios de alta afinidade para este íon, agora orientados para a região extracelular. Com a desfosforilação ativada por K^+ e oclusão destes íons ocorre outra transição

conformacional (E2 para E1) e transporte dos íons potássio para a região intracelular. Um modelo deste ciclo reacional está mostrado na Figura 3.

O estado de fosforilação da enzima Na^+ , K^+ ATPase pode ser regulado por substâncias endógenas como a ouabaína, neurotransmissores como a dopamina (inibidor) e noradrenalina (estimulador) e hormônios como a insulina, além do ATP (Yu, 2003) e agentes que ativam a proteína quinase C, como o GMPc e o NO. Por outro lado, há evidências de que a proteína quinase C (PKC) ative a Na^+ , K^+ ATPase via ativação de receptores glutamatérgicos (Nathanson *et al.*, 1995).

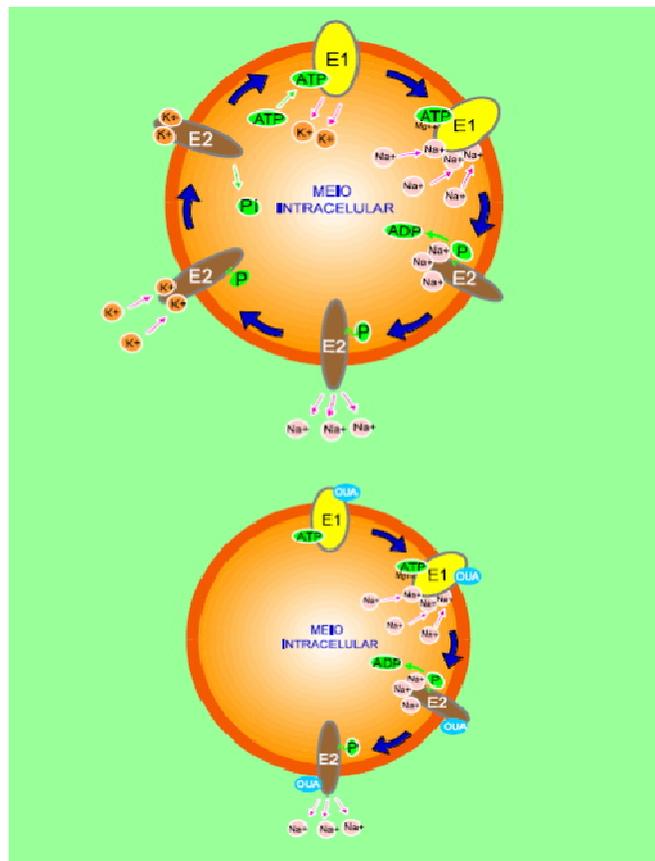


Figura 3. Etapas do ciclo de atividade da Na^+ , K^+ ATPase. Na figura superior são mostradas as 2 conformações E1 e E2 e suas interações com Na^+ , ATP.Mg^{++} e K^+ . Abaixo, é indicado o mecanismo de ação de glicosídeos cardíacos (OUA) - ouabaína, que paralisam a reação enzimática na etapa E2 – fosforilada (Burth, 1997).

3.3.1. Na⁺, K⁺ ATPase e os transtornos depressivos

Visto que a enzima Na⁺, K⁺ ATPase é responsável pelo potencial de repouso da membrana, propagação do impulso nervoso e outras atividades importantes, uma falha em seu funcionamento pode ocasionar aumento ou diminuição da excitabilidade neuronal (Grisar, 1984). De fato, ainda no início do rumo da pesquisa biológica sobre a fisiopatologia do transtorno bipolar, foram feitas observações de que a atividade da enzima Na⁺, K⁺ ATPase de eritrócitos estava reduzida durante as fases doentes do transtorno (Herman *et al.*, 2007). Esta anormalidade biológica foi amplamente reproduzida no transtorno bipolar, e acredita-se que esteja intimamente relacionada com o aumento de Na⁺ e Ca²⁺ intracelular livre, observado durante a mania e depressão bipolar (Hamid *et al.*, 2009). A expressão reduzida da isoforma $\alpha 2$ da Na⁺, K⁺ATPase no córtex temporal de indivíduos bipolares (Rose *et al.*, 1998) confirmou que as observações originalmente periféricas, possuem análogos no sistema nervoso. Estas observações levaram à introdução ao modelo da Na⁺, K⁺ ATPase do transtorno bipolar (Herman *et al.*, 2007), que postula que uma pequena redução na atividade da enzima pode alterar a excitabilidade neuronal de tal maneira a reproduzir os sintomas tanto da depressão, quanto da mania.

Linfócitos obtidos de indivíduos bipolares do tipo I são incapazes de aumentar a atividade da enzima quando tratados com ácido etracínico, um agente que aumenta o Na⁺ intracelular (Li e El-Mallakh, 2004). Ainda, observou-se que a ligação de [³H]-ouabaína foi significativamente menor em pacientes bipolares quando comparados tanto à pacientes esquizofrênicos, quanto à pacientes com depressão maior, mas não demonstrou nenhuma alteração na expressão de nenhuma das isoformas (Goldstein *et al.*, 2009). Já Rose e colaboradores (1998) relataram que havia menos da isoforma $\alpha 2$ na massa cinzenta do córtex temporal de pacientes bipolares comparados à controles normais. A quantidade das subunidades $\alpha 1$ e $\alpha 3$ permaneceu inalterada (Rose *et al.*, 1998).

Modelos animais de 'desespero' estão associados com atividade da Na⁺, K⁺ ATPase reduzida e antidepressivos tratam concomitantemente a depressão

e aumentam a atividade da Na⁺, K⁺ ATPase. Ratos expostos ao stress variável crônico (SVC) desenvolvem endofenótipos do tipo depressivos e apresentam atividade reduzida da Na⁺, K⁺ ATPase no hipocampo e amígdala (Willner, 2005; Crema *et al.*, 2010). O antidepressivo fluoxetina e o estabilizador de humor lítio previnem simultaneamente o comportamento de 'desespero' induzido pelo SVC e a redução na atividade da Na⁺, K⁺ ATPase (de Vasconcellos *et al.*, 2005). Um mecanismo comum para fluoxetina, um inibidor seletivo da recaptção de serotonina, desipramina, um antidepressivo tricíclico e do estabilizador do humor lítio pode ser a estimulação da atividade da Na⁺, K⁺ ATPase (Zanatta, 2001; Viola e Rodríguez de Lopes Arnaiz, 2007).

Kirshenbaum e colaboradores (2011) observaram uma relação entre atividade da Na⁺, K⁺ ATPase reduzida no cérebro e a severidade dos endofenótipos do tipo depressivo em camundongos heterozigotos $\alpha 3$ (Atp 1a3+/-). Além disso, a redução na atividade da Na⁺, K⁺ ATPase foi relacionada com diversos endofenótipos depressivos ou relacionados com depressão. Este estudo demonstra ainda que a herança genética que resulta numa menor atividade da Na⁺, K⁺ ATPase torna os camundongos vulneráveis ao desenvolvimento de diversos sintomas depressivos induzidos por estresse via reduções patológicas na atividade da enzima Na⁺, K⁺ ATPase. Os autores sugerem haver uma faixa ótima de atividade da enzima que se relaciona com um estado de humor equilibrado, e reduções na atividade abaixo desta faixa resultariam em alterações no humor.

A relação entre humor e atividade neuronal da Na⁺, K⁺ ATPase é relevante tanto para depressão bipolar, quanto unipolar, uma vez que amostras humanas de ambas as populações demonstraram alteração na expressão gênica e na função da Na⁺, K⁺ ATPase (Goldstein *et al.*, 2009). Ainda, a atividade da Na⁺, K⁺ ATPase neuronal regula a ativação do elemento de ligação a proteínas responsivo ao AMPc (CREB) (Desfrere *et al.*, 2009), receptores de dopamina (Hazelwood *et al.*, 2008) e o transporte de glutamato (Rose *et al.*, 2009), que podem influenciar o comportamento e a neurobiologia relacionados à depressão.

3.4. HIPERFORINA

Extratos da planta medicinal *Hypericum perforatum* (St. John's wort) são amplamente utilizados em diversos países no tratamento de pacientes leve a moderadamente deprimidos (Linde *et al.*, 2011). O extrato de *Hypericum perforatum* possui um grande número de constituintes ativos. Entre estes, o derivado floroglucinol hiperforina (Figura 4), e seu análogo adhiperforina, inibem a captação neuronal de vários neurotransmissores incluindo serotonina, norepinefrina, dopamina, GABA e glutamato em neurônios e astrócitos (Chatterjee *et al.*, 1998; Jensen *et al.*, 2001; Neary *et al.*, 2001; Wonnemann *et al.*, 2001). Conseqüentemente, a administração de hiperforina a ratos resulta em elevadas concentrações de serotonina, norepinefrina, dopamina e glutamato no cérebro (Kaehler *et al.*, 1999; Phillipu, 2001). Além disso, a hiperforina é ativa em modelos comportamentais de atividade antidepressiva (Misane e Ogren, 2001; Cervo *et al.*, 2002).

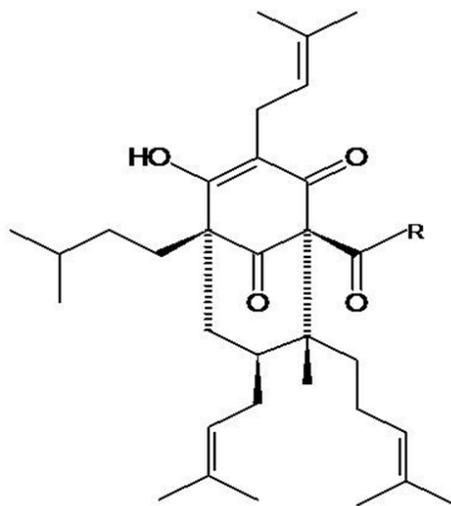


Figura 4. Estrutura da hiperforina.

Comparada a todos os outros fármacos antidepressivos conhecidos, a hiperforina inibe a captação de diversos neurotransmissores e da colina com potência comparável (Chatterjee *et al.*, 1998; Jensen *et al.*, 2001; Buchholzer *et al.*, 2002). Este perfil não seletivo indica que a hiperforina provavelmente exerce seus efeitos por um mecanismo de ação diferente ao dos antidepressivos clássicos. Estudos sugerem que o efeito da hiperforina sobre a

inibição da captação de monoaminas pode ser mediado por um aumento na concentração de sódio intracelular livre (Singer *et al.*, 1999) e pode envolver tanto a ativação do trocador Na^+/H^+ e/ou o bloqueio de canais de Na^+ sensíveis à voltagem (Wonnemann *et al.*, 2000). A força condutora dos transportadores de todos os neurotransmissores é o gradiente de Na^+ , de maneira que os transportadores são operados pelo co-transporte de Na^+ (Malandro e Kilberg, 1996). Já está bem documentado que condições que reduzem o gradiente de Na^+ da membrana neuronal, tanto reduzindo o Na^+ extracelular, ou aumentando o Na^+ intracelular, inibem os transportadores de neurotransmissores neuronais (Wonnemann *et al.*, 2000). O gradiente de Na^+ é mantido principalmente pela Na^+ , K^+ ATPase, porém resultados preliminares indicaram que a hiperforina não é um inibidor desta enzima (Wonnemann *et al.*, 2000). Além disso, nem ouabaína ou TTX em altas concentrações alteraram a inibição da captação de ^3H -L-glutamato e ^3H -GABA causada pela hiperforina, sugerindo que seja pouco provável que a hiperforina atue via ativação de canais de Na^+ sensíveis à voltagem (Wonnemann *et al.*, 2000). Porém, Marsh e Davies (2003) demonstraram que a hiperforina aumentou significativamente a liberação tanto de aspartato, quanto de glutamato estimuladas por veratridina, enquanto que a incubação com TTX atenuou a liberação de glutamato induzida por hiperforina, o que poderia sugerir algum envolvimento de canais de Na^+ sensíveis à voltagem.

Roz e colaboradores (2002) demonstraram que um extrato rico em hiperforina inibe de maneira não competitiva a captação de ^3H -monoaminas em vesículas sinápticas e sinaptossomas de ratos. Em estudo anterior, levantou-se a hipótese de que a hiperforina poderia atuar por um 'mecanismo do tipo da reserpina', onde ela induziria a liberação de neurotransmissores vesiculares no citoplasma, e esta liberação seria responsável pela inibição da captação pré-sináptica de neurotransmissores (Gobbi *et al.*, 1999). Uma explicação possível para este efeito é de que a hiperforina interaja com transportadores de monoaminas vesiculares. A inibição não parece envolver reconhecimento direto do transportador vesicular pela hiperforina, uma vez que a inibição da captação de monoaminas é de natureza não competitiva. Ainda, a ligação do ligante

específico utilizado para marcar o transportador de monoaminas vesicular, ^3H -dihidrotetrabenazina (Rehavi *et al.*, 1998), não foi inibida pela hiperforina. Outra explicação possível para o efeito inibitório da hiperforina sobre o armazenamento vesicular é uma interferência com a força motriz da captação vesicular. O gradiente de pH através da membrana da vesícula sináptica, induzido pela H^+ -ATPase vacuolar, é a principal força motriz da captação e armazenamento das monoaminas vesiculares (Toll e Howard, 1978). Roz e Rehavi (2003) sugeriram que a hiperforina dissipa um ΔpH gerado por um efluxo de prótons bombeados internamente. Este efeito da hiperforina sobre a captação de prótons dependente de ATP pode explicar o efeito sobre a captação vesicular e sinaptossomal, mas ainda não fornece uma explicação satisfatória da sua propriedade antidepressiva.

Em 2005, Treiber e colaboradores realizaram um trabalho focado no efeito da hiperforina sobre vias condutoras de Na^+ alternativas em plaquetas humanas e células PC12, o trocador de Na^+/Ca^+ , o trocador de Na^+/H^+ e canais de cátion não seletivos (CCNSs). Os dois primeiros não estão envolvidos no aumento de Na^+ e Ca^{2+} intracelular induzido por hiperforina; mas o SK&F 96365, um inibidor de CCNSs, bloqueou o aumento de Na^+ e Ca^{2+} intracelular induzido pela hiperforina em plaquetas humanas e células PC12 em concentrações micromolares. Os CCNSs são parcialmente ativados por forças mecânicas, onde a sinalização é mediada por proteínas-G e fosfolipase C (Davies, 1995). Estes mecanismos são muito sensíveis ao estado físico da membrana e podem ser afetados por alterações na fluidez de membrana. A hiperforina modifica diferentes parâmetros de membranas neuronais *in vitro*, o que pode estar envolvido no seu efeito sobre diferentes mecanismos de condutância iônica (Eckert e Muller, 2001). Outra possibilidade de mecanismo para a hiperforina seria através de uma alteração não específica nas características físicas da bi-camada lipídica, como por exemplo, um efeito de desordenamento ou expansão, que poderia induzir uma alteração conformacional na proteína do canal ou receptor, influenciando assim sua função fisiológica (Eckert *et al.*, 2004).

Além de inibir proteínas envolvidas no transporte de íons através da membrana plasmática, a hiperforina ativa correntes catiônicas internas de maneira dependente da dose (Chatterjee *et al.*, 1999; Treiber *et al.*, 2005). TRPC6, um membro da classe C dos canais receptores de potencial transitório (TRPC), é o componente molecular chave destes canais ativados por hiperforina (Leuner *et al.*, 2007). TRPC6 é ativado por hiperforina, mas as outras isoformas (TRPC1, TRPC3, TRPC4, TRPC5 e TRPC7) são insensíveis ao antidepressivo, sugerindo que a hiperforina é o primeiro ativador seletivo de um canal TRPC. Leuner e colaboradores (2007) caracterizaram este mecanismo de ativação utilizando registros eletrofisiológicos que demonstraram que a ativação pela hiperforina resulta em correntes comparáveis àquelas induzidas por carbacol ou diacilglicerol. Estes dados indicam qual o alvo da hiperforina no SNC, demonstrando que este composto ativa correntes que são mediadas por TRPC6, alterando assim as concentrações intracelulares de Na^+ e Ca^{2+} . As correntes de Na^+ que são mediadas por TRPC6 e induzidas por hiperforina, elevam a concentração de Na^+ intracelular, reduzindo o gradiente de Na^+ , que é a força motriz dos transportadores de monoaminas, podendo levar à redução da captação de monoaminas. Ainda, o influxo de Ca^{2+} mediado por TRPC6 induzido pela hiperforina mimetiza o efeito neurotrófico do fator de crescimento neural (NGF) ou do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF). A combinação desses efeitos biológicos, que são de particular relevância para a resposta a antidepressivos (Duman, 2004), fornece uma base molecular para o perfil farmacológico da hiperforina. Posteriormente, Leuner *et al.* (2010) lançaram a hipótese de que o sítio floroglucinol poderia ser o farmacóforo essencial da hiperforina e que seu perfil de atividade poderia ser devido a similaridades estruturais com o diacilglicerol (DAG), um ativador endógeno não-seletivo de TRPC3, TRPC6 e TRPC7. Porém, o floroglucinol por si só, falhou em inibir a captação de serotonina e em ativar canais TRPC6. Apenas os derivados simétricos 2,4-diacilfloroglucinol, que possuem cadeias acil compostas de um ou cinco carbonos, ou cadeias acil compostas por um ou dois carbonos substituídos por anel benzeno, levaram a uma ativação pronunciada de canais TRPC6. A seletividade da hiperforina e os derivados simétricos 2,4-

diacilfloroglucinol por TRPC6 deve ocorrer devido à estrutura mais rígida destes compostos. Este núcleo estrutural é essencial para a ativação de canais TRPC6, o que resulta indiretamente na inibição da captação de neurotransmissores e estimulação de processos de diferenciação neuronal (Leuner *et al.*, 2012).

3.5. *Hypericum caprifoliatum* (Guttiferae) Cham. & Schlttdl.

Determinou-se a presença de taninos e flavonóides em extratos metanólicos totais de *H. caprifoliatum*. A fração de taninos (6,1%) inclui triflavonóides e heptaflavonóides. A fração de compostos não taninos contém compostos fenólicos (compostos flavonóides monoméricos e derivados do ácido hidroxicinamico), carboidratos (glicose, frutose, sacarose e gomas hidrocoloidais) e compostos nitrogenados (tais como aminoácidos). Os principais flavonóides são hiperosídeos e outros glicosídeos da quercetina (Dall'Agnol *et al.*, 2003).

Espécies de *Hypericum* apresentam uma forte tendência em acumular compostos fenólicos com padrão de substituição floroglucinol. Duas estruturas diméricas, constituídas de ácido filicínico e um sítio floroglucinol foram isoladas de *H. caprifoliatum*: hiperbrasílo B (Figura 5) (Nör *et al.*, 2004) e uma mistura tautomérica ainda não definida, denominada de HC1 (Viana *et al.*, 2005). HC1 corresponde a 8% do extrato ciclohexânico purificado e parece ser a fração ativa no sistema nervoso central (Viana *et al.*, 2005).

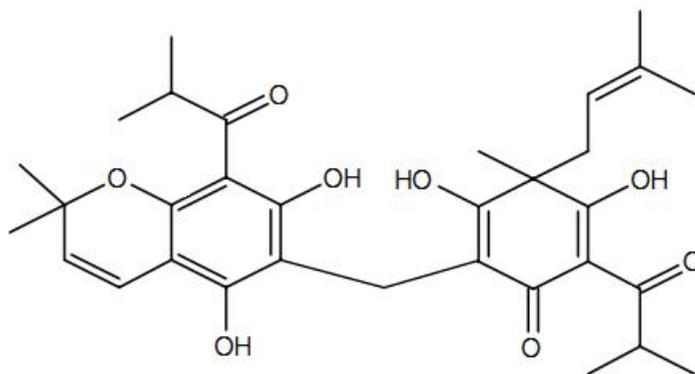


Figura 5. Estrutura do hiperbrasílo B.

Apesar das espécies de *Hypericum* não serem caracteristicamente aromáticas, usualmente apresentando não mais que 1% de óleos essenciais, a presença destes compostos também foi avaliada. Nestas espécies, sesquiterpenos estão presentes em concentrações maiores que monoterpenos, e ambos contêm alcanos na fração volátil (Ferraz *et al.*, 2002).

Para os estudos picofarmacológicos, nosso grupo obteve diversos extratos, por extração contínua com solventes de polaridade crescente (éter de petróleo, clorofórmio e metanol) ou por maceração com ciclohexano (Viana *et al.*, 2005). Extratos de éter de petróleo, clorofórmio e metanol de *H. caprifoliatum* foram testados no teste da natação forçada, teste da placa quente e sobre a atividade da enzima monoamina oxidase (Daudt *et al.*, 2000; Gnerre *et al.*, 2001; Viana *et al.*, 2005). O extrato mais promissor no teste da natação forçada foi o de éter de petróleo, que é rico em floroglucinóis. Contudo, em experimentos subseqüentes, este extrato demonstrou uma toxicidade significativa, levando ao preparo de outro extrato lipofílico, através da maceração com ciclohexano. Este extrato ciclohexânico (ECH) foi avaliado especialmente em relação à atividade antidepressiva. Além disso, ECH foi purificado, originando um extrato livre de clorofilas e ceras, denominado HCP. Experimentos *in vivo* foram conduzidos com extratos ciclohexânico e metanólico. Estudos *in vitro* foram realizados com HCP e com um mistura tautomérica de floroglucinóis (HC1), o principal constituinte de ECH e HCP (Viana *et al.*, 2006).

Ratos tratados com extrato de éter de petróleo pela via intraperitoneal (270 mg/kg/dia) demonstraram sinais de toxicidade (pilo ereção, hipotermia, apnéia e prostração), e alguns morreram entre 24 e 48h depois do último tratamento (Viana *et al.*, 2006). Durante a autópsia, verificou-se a presença de líquido ascítico no abdômen. Análises histológicas e bioquímicas revelaram necrose superficial do fígado e baixos níveis de albumina. Estes resultados sugerem que a morte foi causada por colapso circulatório, isto é, na tentativa de diluir o extrato, ocorre infiltração do líquido para o peritônio. A dose letal 50% (DL50) determinada em camundongos foi de 197 mg/kg. Quando os animais (ratos e camundongos) foram tratados oralmente com os extratos de

éter de petróleo e de ciclohexano (50-2000 mg/kg), não houve sinais de toxicidade (Viana *et al.*, 2006).

A fim de se determinar os efeitos não específicos do extrato ciclohexânico (ECH) sobre o sistema nervoso central, avaliaram-se a atividade locomotora, a coordenação motora, tempo de sono induzido por pentobarbital e hipotermia em camundongos tratados com doses de 90 a 360 mg/kg v.o. O tratamento com ECH (90-360 mg/kg) reduziu a atividade locomotora (Viana *et al.*, 2005), mas não interferiu com a coordenação motora, demonstrando que ECH não apresenta neurotoxicidade generalizada, nem afeta a junção neuromuscular. O extrato aumentou o tempo de sono dos camundongos tratados com pentobarbital, mas não alterou a latência do sono. ECH na dose de 90 mg/kg causou uma hipotermia significativa por si mesmo, e aumentou a hipotermia induzida por apomorfina (Viana *et al.*, 2005). Estes resultados sugerem que ECH exerce efeito depressor sobre o sistema nervoso central, ou afeta o metabolismo de substâncias depressoras. ECH foi testado em modelos de ansiedade, como o labirinto em cruz elevado ('plus maze'), e também no modelo de convulsões induzidas por pentilenotetrazol. Todos os testes foram realizados com doses variando de 90 a 360 mg/kg. O extrato não demonstrou nem efeito ansiolítico, nem efeito anticonvulsivante (Viana *et al.*, 2006).

Nosso grupo já relatou o efeito de *H. caprifoliatum* no teste da natação forçada em ratos (Daudt *et al.*, 2000). Neste estudo, entre os extratos analisados (éter de petróleo, clorofórmio e metanol), o único que apresentou efeito do tipo antidepressivo, foi o de éter de petróleo (270 mg/kg/dia, i.p.). Este extrato foi submetido ao ensaio de inibição da monoamino oxidase (MAO) *in vitro*, e demonstrou uma inibição não maior que 25% tanto em relação a MAO-A, quanto em relação a MAO-B. A magnitude deste efeito é considerada muito baixa para explicar o efeito do tipo antidepressivo observado no teste da natação forçada (Gnerre *et al.*, 2001).

O efeito do tipo antidepressivo do extrato metanólico de *H. caprifoliatum*, foi também demonstrado por outro extrato lipofílico e purificado, chamado de ECH. O ECH demonstrou um efeito dependente da dose (90-360 mg/kg, v.o.),

quando avaliado no teste da natação forçada em ratos e camundongos (Viana *et al.*, 2005). Além disso, o efeito antiimobilidade no teste da natação forçada, não ocorreu devido a um estímulo comportamental não específico, uma vez que ECH (90 mg/kg) reduziu também atividade locomotora dos animais. Este resultado reforça a hipótese de que ECH possua propriedades antidepressivas.

Com o objetivo de avaliar o modo de ação dos extratos lipofílicos de *H. caprifoliatum*, um segundo conjunto de experimentos foi realizado, a fim de se determinar se o sistema monoaminérgico estaria envolvido no efeito antiimobilidade (Viana *et al.*, 2005). O efeito do ECH no teste da natação forçada em camundongos foi prevenido pela administração prévia de sulpirida ou SCH 23390 (antagonistas dos receptores dopaminérgicos D₂ e D₁, respectivamente). Estes resultados levaram a estudos adicionais em relação à ação do ECH e do HC1 sobre o sistema monoaminérgico, mais precisamente, sobre o sistema dopaminérgico. ECH foi purificado (Viana *et al.*, 2005) gerando HCP, que possui perfil químico comparável ao ECH: ambos os extratos apresentam HC1 como constituinte principal. HCP e HC1 inibiram, de maneira monofásica e dependente da concentração a captação sinaptossomal de [³H]-DA (dopamina), [³H]-NA (noradrenalina) e [³H]-5HT (serotonina) (Viana *et al.*, 2005). Esta inibição foi maior para DA do que NA e 5HT, confirmando o caráter dopaminérgico do efeito do tipo antidepressivo de *H. caprifoliatum*. Estes efeitos parecem estar relacionados ao derivado floroglucinol presente em ECH, uma vez que este inibiu a captação de [³H]-DA com potência equivalente ao ECH, apesar de HC1 constituir apenas 8% de ECH. Quando testado em concentrações correspondentes a sua CI₅₀ em relação à [³H]-DA, HC1 não foi capaz de induzir a liberação de [³H]-DA de maneira significativa, enquanto que em concentrações maiores (200 ng/ml), aumentou em 12% a liberação sinaptossomal de DA (Viana *et al.*, 2005). Apesar dos efeitos sobre a captação e liberação de DA, o tratamento agudo com ECH (270 mg/kg, v.o.) não alterou os níveis extracelulares de dopamina, ácido homovanílico (HVA) e ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) no núcleo acumbens medidos por microdiálise em ratos acordados, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (Munari, 2006, Viana *et al.*, 2006).

Diferentemente dos demais antidepressivos, a inibição da captação de monoaminas conduzida por extratos de *H. caprifoliatum* não ocorre devido à ligação de HC1, ou ao bloqueio dos transportadores de DA, NA e 5-HT aos sítios de ligação de [³H]-mazindol, [³H]-nisoxetina e [³H]-citalopram, respectivamente (Viana *et al.*, 2005). Estas observações sugerem que o mecanismo de ação do extrato de *H. caprifoliatum*, provavelmente não está associado com a ligação específica da dopamina, nem com nenhum dos diferentes transportadores de monoaminas, mas pode depender de certo mecanismo envolvido no transporte de neurotransmissores em geral (Viana *et al.*, 2006).

Esta hipótese já havia sido relatada para outras espécies de *Hypericum*, tais como *H. perforatum* (Muller *et al.*, 1998) e *H. triquetrifolium* (Chatterjee *et al.*, 1998). Nestes trabalhos, diversos estudos animais *in vitro* e *in vivo* demonstraram que as propriedades antidepressivas e os efeitos inibitórios dos extratos destas espécies sobre a captação neuronal de monoaminas ocorreram devido ao derivado floroglucinol lipofílico, hiperforina, que é considerada a principal substância ativa de *H. perforatum*. Comparando os resultados de *H. caprifoliatum* com os dados existentes para *H. perforatum*, podemos destacar que, embora a Cl₅₀ para ECH e HC1 para a inibição de [³H]-DA (98 e 85 ng/ml, respectivamente) seja quase duas vezes maior que a demonstrada por extrato enriquecido em hiperforina (55 ng/ml) (Chatterjee *et al.*, 1998), *H. caprifoliatum* parece ter a mesma potência que outras espécies de *Hypericum* no teste da natação forçada. No teste da natação forçada em camundongos, as doses efetivas de outros extratos de *Hypericum* variam entre 250 e 1000 mg/kg (Öztürk *et al.*, 1996), enquanto que a menor dose efetiva de ECH é 270 mg/kg.

Nesta última década, uma segunda linha de investigação, realizada paralelamente à abordagem monoaminérgica têm focado na ação dos antidepressivos no eixo HPA (Franklin *et al.*, 2000). Nosso grupo investigou o efeito de ECH (360 mg/kg, v.o.) sobre os níveis de corticosterona no cérebro e soro de camundongos, estressados ou não por nado forçado (Viana *et al.*, 2008). O aumento nos níveis de corticosterona induzido por nado forçado no córtex, mas não no soro, foi diminuído por tratamento repetido (3 dias) com

ECH. O tratamento agudo (1 dia) não reduziu o aumento de corticosterona induzido por nado forçado, e os níveis basais de corticosterona (em animais não estressados) não foram alterados por nenhum dos tratamentos. Em paralelo, este trabalho demonstra que a administração repetida de imipramina e bupropiona reduz os níveis cerebrais e no soro de corticosterona. Portanto, o mecanismo pelo qual *H. caprifoliatum* reduz os níveis de corticosterona, parece ser diferente dos outros antidepressivos, considerando que o extrato não teve efeito em animais não estressados e a proteção contra o aumento de corticosterona induzido pelo nado forçado, foi observada somente no córtex.

PARTE II

RESULTADOS

CAPÍTULO I: Avaliação do efeito de *Hypericum caprifoliatum* Cham. & Schltl (Guttiferae) sobre a neurotransmissão glutamatérgica em roedores.

1. INTRODUÇÃO

Extratos de *Hypericum perforatum* são amplamente utilizados na Europa, Estados Unidos, e também no Brasil, para o tratamento de depressão leve à moderada. Inúmeros dados terapêuticos e experimentais demonstram que esta planta é clinicamente efetiva como medicação antidepressiva (Kasper *et al.*, 2010; Linde *et al.*, 2011). Uma vez que a composição química e o perfil farmacológico das espécies de *Hypericum* são comparáveis, o estudo deste gênero pode ser importante na busca por fontes alternativas de moléculas com ação antidepressiva e na identificação de fármacos com mecanismos de ação inovadores.

Desde 1998, existe no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) uma linha de pesquisa que visa à investigação química e farmacológica das espécies de *Hypericum* nativas da região. Dentre as espécies pesquisadas, destacou-se a espécie *Hypericum caprifoliatum*, sendo ativa em modelos animais de depressão (Daudt *et al.*, 2000; Viana *et al.*, 2005). Um extrato ciclohexânico bruto (ECH) e um extrato ciclohexânico purificado de *H. caprifoliatum* ricos em floroglucínóis (HCP) demonstraram efeito antidepressivo dependente da dose, quando avaliados no teste da natação forçada em ratos e camundongos (Viana *et al.*, 2005).

Os mecanismos moleculares pelos quais estes extratos de *H. caprifoliatum* exercem ação do tipo antidepressiva ainda não estão esclarecidos. Os trabalhos desenvolvidos até agora demonstram que estes extratos inibem a captação neuronal de monaminas de forma pouco seletiva, sugerindo que esta ação depende de algum mecanismo envolvido no transporte de neurotransmissores em geral (Viana *et al.*, 2006). Outro provável mecanismo de ação pode estar relacionado com alterações na condutância de íons Na^+ , uma vez que a hiperforina, um derivado floroglucinol presente na espécie *H. perforatum*, parece exercer sua ação antidepressiva por mecanismos dependentes de canais de Na^+ (Wonnemann *et al.*, 2000), ao mesmo tempo em que parece aumentar o fluxo de neurotransmissores do

córtex cerebral de camundongos, possivelmente pela facilitação da entrada de íons Na^+ nos neurônios (Marsh e Davies, 2002).

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório no sistema nervoso central de mamíferos, participando de processos plásticos, tais como os envolvidos na memória e aprendizado, formação de redes neurais, desenvolvimento cerebral e envelhecimento (Ozawa *et al.*, 1998; Martini *et al.*, 2006). Contudo, uma estimulação excessiva do sistema glutamatérgico leva à excitotoxicidade, fenômeno observado em distúrbios neurodegenerativos e danos cerebrais agudos (Danbolt, 2001). A participação da transmissão glutamatérgica na patogênese dos transtornos depressivos já foi demonstrada (Mitchell e Baker, 2010; Machado-Vieira *et al.*, 2012; Sanacora *et al.*, 2012). Em aspectos clínicos, o subtipo de receptor glutamatérgico N-metil-D-aspartato (NMDA) parece estar envolvido em diversas patologias neurológicas. A disfunção de receptores NMDA parece exercer papel fundamental na neurobiologia de distúrbios tais como doença de Parkinson, doença de Alzheimer, epilepsia, choque isquêmico, ansiedade e depressão (Tzschentke, 2002). Vários antagonistas de receptores NMDA produzem efeitos antidepressivos (Duman e Voleti, 2012; Szakacs *et al.*, 2012), e ainda, pacientes deprimidos demonstraram uma significativa melhora após a administração de cetamina, um antagonista NMDA não-competitivo (Berman *et al.*, 2000; Murrough, 2012). Também, inibidores inorgânicos de receptores NMDA, tais como o magnésio (Nowak *et al.*, 1984) exibem atividade do tipo antidepressiva no teste da natação forçada (Poleszak *et al.*, 2004).

Assim, visando o aprofundamento do estudo da atividade antidepressiva de *H. caprifoliatum*, avaliamos o efeito de HC1, uma fração enriquecida em floroglucínóis obtido das partes aéreas de *H. caprifoliatum*, sobre a neurotransmissão glutamatérgica em roedores.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar o efeito de HC1, uma fração enriquecida em floroglucínóis obtida de *H. caprifoliatum*, sobre a neurotransmissão glutamatérgica em roedores.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar o efeito do antagonista glutamatérgico MK-801 sobre a atividade antidepressiva de HC1, observada no teste da natação forçada em camundongos.
- Avaliar o efeito de HC1 sobre parâmetros glutamatérgicos *in vitro*, tais como: captação de glutamato em sinaptossomas de cérebro total de ratos e liberação de glutamato em sinaptossomas de cérebro total de ratos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Preparação do Extrato de *Hypericum caprifoliatum*

As partes aéreas de *H. caprifoliatum* foram coletadas no Morro Santana, Porto Alegre, RS (outubro e dezembro/2008). A autorização para coleta e acesso do material vegetal está registrada no CGEN/IBAMA (Processo 02000.001717/2008-60). Imediatamente após a coleta, o material foi selecionado e seco em ambiente arejado, ao abrigo da luz direta. O material seco foi triturado em moinho de facas e o pó resultante foi acondicionado em recipiente com abrigo da luz.

O material vegetal seco e pulverizado (200g) foi extraído com ciclohexano (razão planta solvente 1:5 p/v, 10 macerações x 24 h), seguido de evaporação (45°C) sob pressão reduzida originando um extrato ciclohexânico bruto (ECH). Após a evaporação do ciclohexano, o extrato foi ressuscitado em acetona para remoção de ceras insolúveis. Para isso, o extrato adicionado de acetona foi filtrado com filtro de papel, e o solvente evaporado sob pressão reduzida a 45°C, rendendo 12g de um extrato livre de ceras denominado de HCP.

3.2. Obtenção de HC1

O HCP foi analisado por cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando sílica gel GF254 (Merck) como fase estacionária, clorofórmio/hexano (1:1 v/v) como fase móvel, e reagente de Godin, como agente cromogênico

característico para derivados floroglucinóis (Rocha *et al.*, 1995). HCP demonstrou uma mancha principal (R_f 0,10-0,40), reativa ao reagente de Godin, que foi removida por CCD preparativa, caracterizada por RMN (^1H e ^{13}C , 400 MHz) e este composto foi denominado HC1.

3.3. Experimentos comportamentais

Nos experimentos realizados no laboratório de Psicofarmacologia Experimental da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), foram utilizados camundongos CF1 machos adultos pesando de 20 a 30g, provenientes da colônia da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde – FEPPS. Os animais foram mantidos em caixas plásticas, sendo reunidos no máximo 08 animais por caixa, sob um ciclo claro/escuro de 12 horas (luzes ligadas às 7h), com temperatura constante ($22 \pm 21^\circ\text{C}$), sob sistema de exaustão e umidade monitorada. Os animais tiveram livre acesso à água e alimentação padronizada para roedores (Nuvilab®). Nos experimentos realizados com administração das substâncias teste por via oral, os animais passaram por um período de 06 horas de jejum antes do teste.

A manipulação animal foi realizada seguindo normas internacionalmente adotadas e divulgadas pelos seguintes órgãos: International Guiding Principles for Biomedical Involving Animals (CIOMS), Centre d'Information sur les Animaux de Laboratoire (CIAL) e Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFRGS (CEUA/UFRGS nº 18203).

3.3.1. Tratamentos

Os camundongos foram tratados com volume proporcional a 1ml/100g, com extratos e drogas pelas vias intraperitoneal (i.p.) e oral (v.o.), conforme protocolo específico de cada experimento. Todos os grupos experimentais constituíram-se de no mínimo oito animais. A fração HC1 foi suspensa a uma concentração de 36 mg/ml em salina com 2% de polisorbato 80 e auxílio de ultrassom. O MK-801 foi diluído em salina 0,9%. Em todos os experimentos, animais controle receberam tratamento com veículo (polisorbato 80 2% em salina e salina, v.o. ou i.p., 10ml/kg), em seus respectivos tempos.

3.3.2. Teste da natação forçada

O teste da natação forçada em camundongos foi realizado conforme descrito por Viana e colaboradores (2005). O aparato consistiu de cilindros de vidro (diâmetro interno de 10 cm, altura 25 cm) preenchidos com água (altura 19 cm) a $23 \pm 2^\circ\text{C}$. Diferentes grupos de animais foram tratados com HC1 (360 mg/kg, v.o.), imipramina (20 mg/kg, v.o.) ou solução de polisorbato 2% em água 30 min antes do teste. Para avaliar uma possível ação glutamatérgica da fração HC1, os animais foram tratados com MK-801 (0,05 e 0,1 mg/kg, i.p), um antagonista NMDA não-competitivo, que foi administrado 30 min antes de HC1. As doses de MK-801 que foram utilizadas neste trabalho foram escolhidas de acordo com estudos prévios (Poleszak *et al.*, 2007a, Poleszak *et al.*, 2007b).

Após 60 min, os animais foram colocados no cilindro por 6 minutos. A duração total da imobilidade foi medida durante os 6 minutos de teste. Os camundongos foram considerados imóveis quando permaneceram flutuando na água, e fazendo apenas movimentos necessários para manter a cabeça fora da água.

3.4. Experimentos bioquímicos

Nos experimentos de neuroquímica realizados no laboratório de Síntese, Reatividade e Avaliação Farmacológica e Toxicológica de Organocalcogênios da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), sob orientação da Prof. Dr. Cristina Wayne Nogueira foram utilizados ratos Wistar machos albinos (200-250g) provenientes do biotério da UFSM. Estes animais foram mantidos em caixas separadas, sendo reunidos no máximo 05 animais por caixa em ciclo de claro/escuro de 12 horas (luzes ligadas às 7h), à temperatura ambiente de $22 \pm 1^\circ\text{C}$, com livre acesso a ração e água.

3.4.1. Preparação de sinaptossomas de cérebro total de ratos

Os sinaptossomas foram preparados em gradiente descontínuo de Percoll, de acordo com Dunkley e colaboradores (1988). Brevemente, os animais foram decapitados com guilhotina e o cérebro total foi removido. Os cérebros foram pesados e homogeneizados 1:9 (peso/volume) em solução de

homogeneização (sacarose, EDTA, DTT). O homogeneizado foi centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos (4°C). Após, foram aplicados lentamente 2 ml do sobrenadante em cada um dos tubos contendo os 4 gradientes de Percoll (23%, 15%, 7%, 3%). Os tubos foram centrifugados a 17000 rpm por 10 minutos (4°C). As frações dos tubos contendo Percoll 7 e 3% foram transferidas para um tubo grande de centrífuga, aonde foram adicionados 16 ml de solução salina tamponada com HEPES (HBSS) e foram centrifugadas a 15000 rpm por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado, e o pellet resuspenso em 1 ml de HBSS (solução salina tamponada com HEPES, composição em mM: HEPES 27, NaCl 133, KCl 2,4, MgSO₄ 1,2, KH₂PO₄ 1,2, glicose 12, CaCl₂ 1,0). A concentração de proteína nos sinaptossomas foi medida pelo método de Lowry *et al.* (1951).

3.4.2. Captação de glutamato em sinaptossomas

A preparação sinaptossomal foi lavada duas vezes por suspensão em três volumes de sacarose 0,3M em tampão Tris/acetato 15mM (pH 7,4) e centrifugação a 35000 x g por 15 min. O pellet final foi resuspenso em sacarose 0,3M, tampão Tris/acetato 15 mM (pH 7,4), e incubado em HBSS (solução salina tamponada com HEPES, composição em mM: HEPES 27, NaCl 133, KCl 2,4, MgSO₄ 1,2, KH₂PO₄ 1,2, glicose 12, CaCl₂ 1,0), pH 7,4 (ajustado com HCl), na ausência (controle – apenas DMSO) ou presença de HC1 (10 e 100 ng/ml) juntamente com [³H]-glutamato (solução aquosa de [³H]-glutamato, composição: [³H]-glutamato 100 nM, glutamato 100 μM) por 1 min a 37°C. Cada experimento foi realizado em triplicata. A reação foi parada por centrifugação (16000 x g, 1 min, 4°C), e os pellets foram lavados três vezes em tampão Tris/HCl por centrifugação a 16000 x g por 1 min (a 4°C). Após, os pellets foram dissolvidos em solução de SDS 1% e misturados em líquido de cintilação. A radioatividade presente no pellet foi medida por contador de cintilação. Uma alíquota (10 μM) de solução aquosa de [³H]-glutamato pura foi testada separadamente para avaliar a radioatividade da solução. A captação específica de [³H]-glutamato foi calculada como sendo a diferença entre a captação obtida no meio de incubação descrito acima, e a captação obtida em

meio de incubação similar, onde o NaCl é substituído por cloreto de colina 770mM.

3.4.3. Liberação de glutamato em sinaptossomas

A determinação da liberação de [³H]-glutamato foi realizada de acordo com o método descrito por Miguez e colaboradores (1999). A preparação sinaptossomal foi carregada com [³H]-glutamato 0,25 µCi (Amersham, atividade específica 53 mCi/mmol, concentração final 5µM) por pré-incubação com solução salina tamponada com tampão Tris/HCl (composição em mM: Tris/HCl 27, NaCl 133, KCl 2,4, MgSO₄ 1,2, KH₂PO₄ 1,2, glicose 12, CaCl₂ 1,0) pH 7,4 (ajustado com HCl), por 15 min a 37°C. Alíquotas de sinaptossomas marcadas (1,4 mg de proteína) foram centrifugadas a 16000 x g por 1 min. Sobrenadantes foram descartados, e os pellets foram lavados quatro vezes em tampão Tris/HCl por centrifugação a 16000 x g por 1 min (a 4°C). Para acessar a liberação basal de [³H]-glutamato, o pellet final foi ressuspenso em tampão Tris/HCl e incubado por 60s na ausência (controle - DMSO) ou presença de HC1, a 30°C. A incubação foi terminada por centrifugação imediata (16000x g por 1 min a 4°C). A radioatividade presente nos sobrenadantes e pellets foi determinada separadamente em contador de cintilação. O [³H]-glutamato liberado foi calculado como a porcentagem da quantidade total de radioatividade presente nos sinaptossomas no início do período de incubação.

3.5. Análise Estatística

Os dados foram expressos como média + EPM, e foram analisados por ANOVA de uma via, seguido pelo teste *post hoc* de Dunnett. O nível de significância foi aceito como diferente quando o valor de P foi inferior a 0,05.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A fração HC1 obtida sob nossas condições experimentais foi efetiva no teste da natação forçada (Figura 1), reduzindo o tempo de imobilidade dos camundongos que foram tratados na dose de 360 mg/kg, em relação ao grupo controle, que foi tratado com salina.

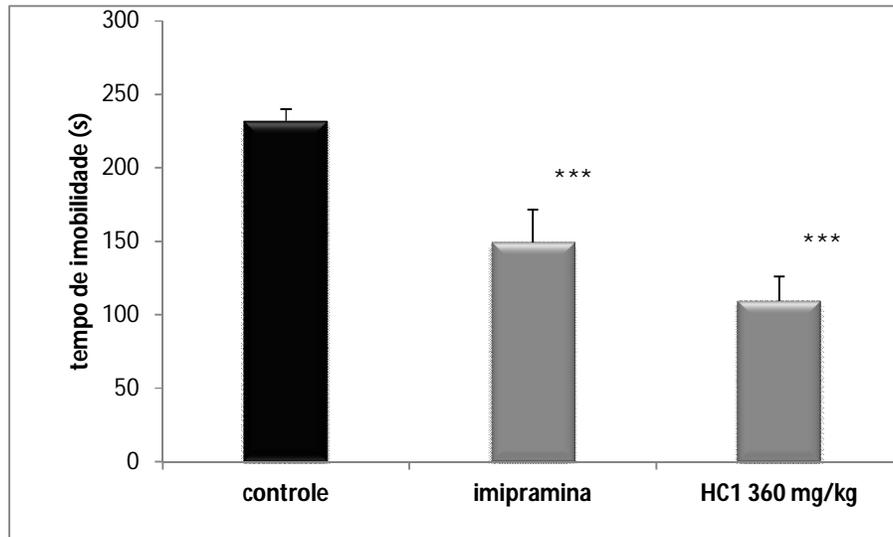


Figura 1. Efeito do HC1 (360 mg/kg, v.o.) e imipramina (20 mg/kg, v.o.) sobre o tempo de imobilidade no teste da natação forçada em camundongos. Resultados expressos em média \pm E.P. ***Diferença significativa em relação ao grupo controle. ANOVA de uma via seguida de Dunnett ($F_{(2,23)} = 15,183$; $P < 0,001$).

Com a finalidade de avaliar se o sistema glutamatérgico está envolvido no efeito antiimobilidade de HC1, realizamos um experimento de antagonismo farmacológico. Determinamos uma dose efetiva de MK-801 no teste da natação forçada e uma dose sem efeito no teste. Quando administramos o MK-801 na dose de 0,1 mg/kg, houve uma redução no tempo de imobilidade no teste da natação forçada em camundongos, mas na dose de 0,05 mg/kg, este foi ineficaz (Figura 2).

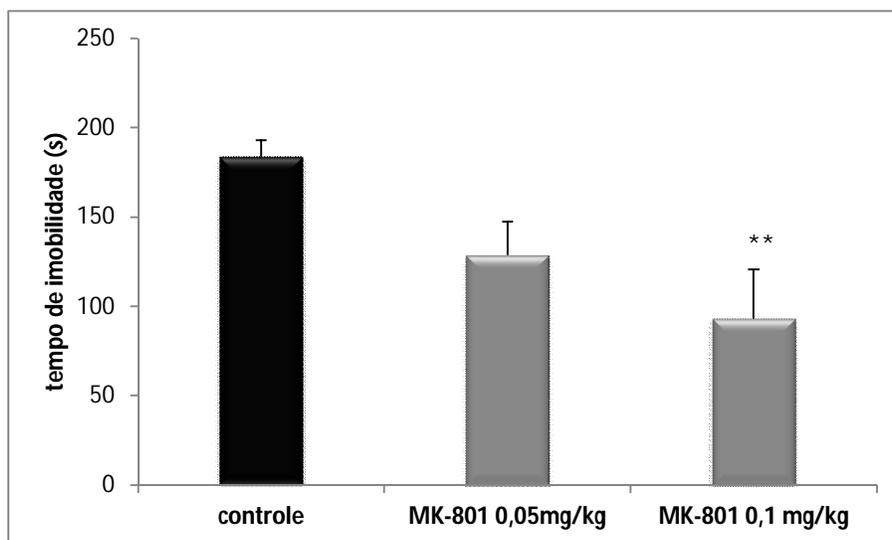


Figura 2. Efeito do MK-801 (0,05 e 0,1 mg/kg i.p.) sobre o tempo de imobilidade de camundongos no teste da natação forçada. Resultados expressos em média \pm E.P. **Diferença significativa em relação ao grupo controle. ANOVA de uma via seguida de Dunnett ($F_{(2,25)} = 6,238$; $P < 0,01$).

O MK-801 bloqueia os efeitos neurofisiológicos dos receptores NMDA ligando-se a um sítio no canal iônico do receptor, bloqueando assim a entrada de cátions pelo canal (Wong *et al.*, 1986). O tratamento agudo com MK-801 demonstrou ser ativo no teste da natação forçada em ratos e camundongos numa faixa de doses que vai de 0,05 a 1,0 mg/kg (Trullas e Skolnick, 1990). Alguns autores sugeriram que a redução na imobilidade induzida por MK-801 está relacionada com o aumento da atividade locomotora observada nas mesmas doses (Poleszak *et al.*, 2007b). Porém, no trabalho de Trullas e Skolnick (1990), o MK-801 afetou os tempos de imobilidade em doses menores daquelas requeridas para estimular a atividade locomotora.

Ao associarmos uma sub-dose de MK-801 (0,05 mg/kg) (Figura 3) e uma dose efetiva de MK-801 (0,1 mg/kg) no teste da natação forçada (Figura 4), não houve alteração no efeito antiimobilidade de HC1, demonstrando que o efeito antiimobilidade desta fração enriquecida em floroglucinóis não se deve à ativação de receptores glutamatérgicos NMDA.

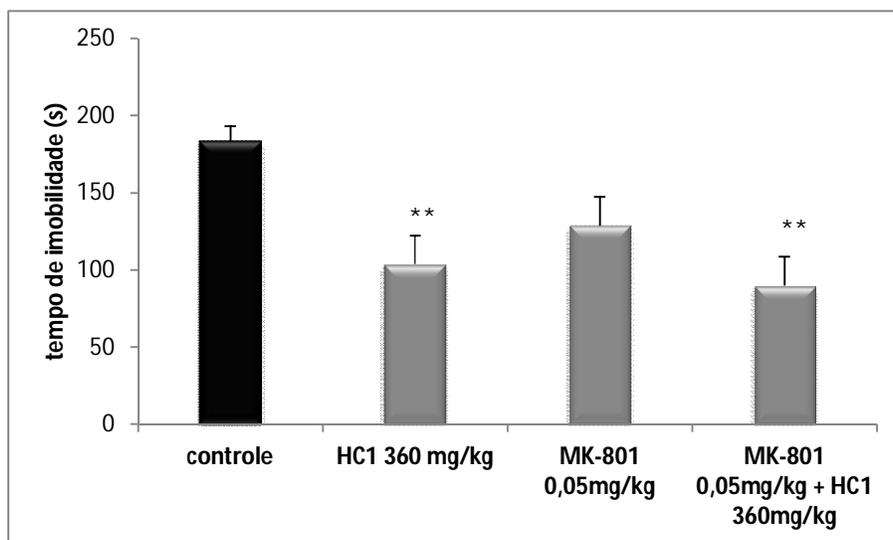


Figura 3. Efeito da administração de MK-801 (0,05 mg/kg, i.p.) no efeito antiimobilidade do HC1 (360 mg/kg, v.o.) no teste da natação forçada. Resultados expressos em média ± E.P. **Diferença significativa em relação ao grupo controle. ANOVA de uma via seguida de Dunnett ($F_{(3,40)} = 5,740$; $P < 0,01$).

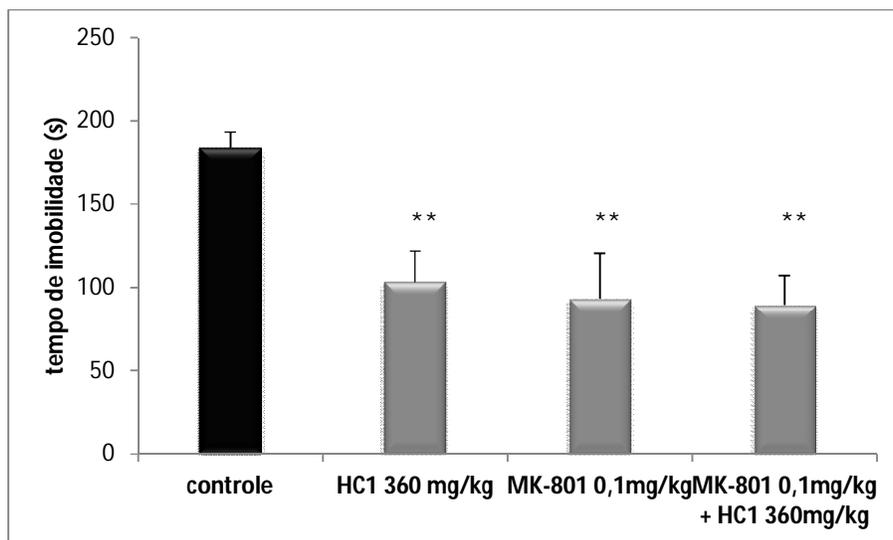


Figura 4. Efeito da administração de MK-801 (0,1 mg/kg, i.p.) no efeito antiimobilidade do HC1 (360 mg/kg, v.o.) no teste da natação forçada. Resultados expressos em média ± E.P. **Diferença significativa em relação ao grupo controle. ANOVA de uma via seguida de Dunnett ($F_{(3,41)} = 5,565$; $P < 0,01$).

Além disso, HC1 (10 e 100 ng/ml) não teve efeito significativo sobre a captação e liberação de [3 H]-glutamato em sinaptossomas de cérebro total de rato em nenhuma das concentrações testadas (Figuras 5 e 6). Este dado

diferencia a ação de HC1 da ação da hiperforina, que inibe a captação de glutamato, com IC_{50} de 143 nM (Wonnemann *et al.*, 2000). Ainda, estes autores e Chatterjee e colaboradores (1998) demonstraram que a hiperforina inibe também a captação de GABA, noradrenalina, serotonina e dopamina, indicando que a hiperforina não apresenta seletividade para algum transportador específico. Com relação a HC1, se considerarmos em conjunto nossos resultados e os resultados de Viana e colaboradores (2005), podemos sugerir que este composto tem seletividade para transportadores monomaminérgicos. Estudos sobre outros transportadores são necessários para confirmar esta hipótese.

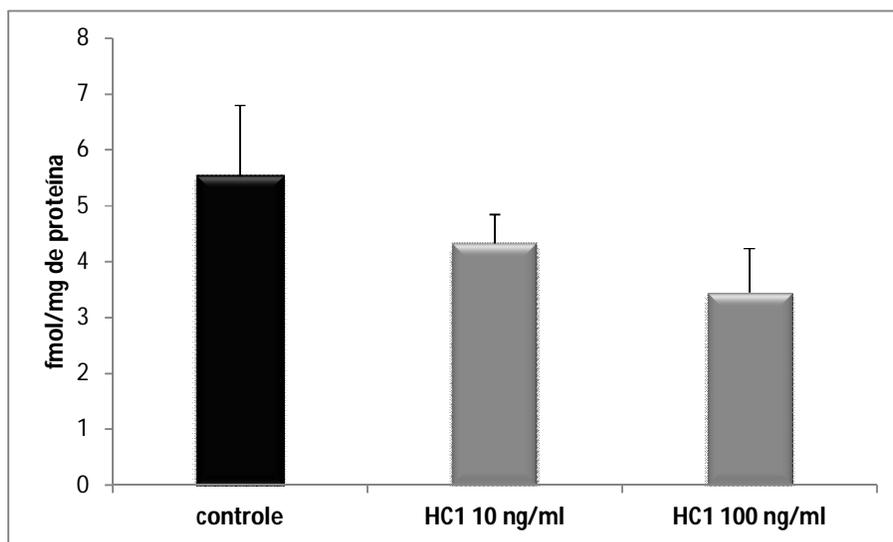


Figura 5. Efeito de HC1 (10 e 100 ng/ml) sobre a captação de [3 H] glutamato *in vitro* de sinaptossomas de cérebro total de ratos. A captação de glutamato está expressa como fmol/mg de proteína. Os resultados são expressos como média +E.P. de quatro experimentos independentes (em triplicatas). ANOVA de uma via ($F_{(2,11)} = 1,29$; $P = 0,319$).

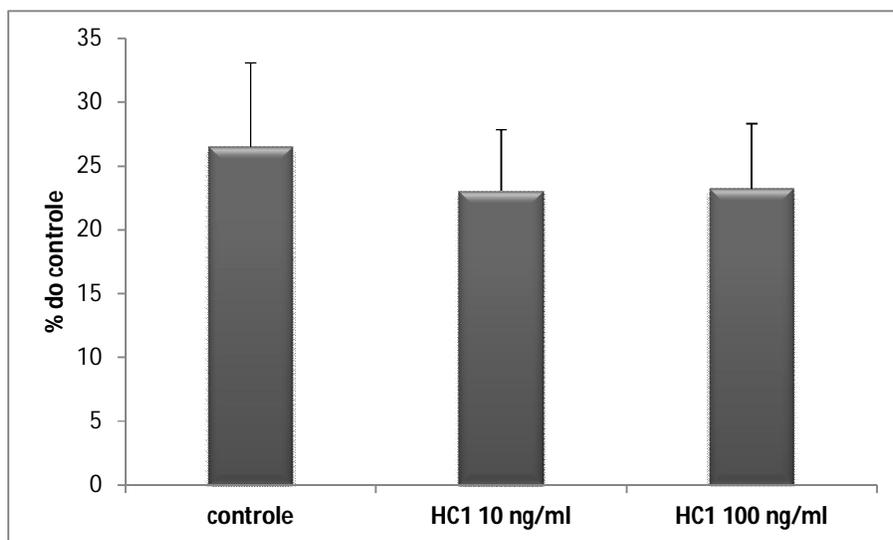


Figura 6. Efeito do HC1 (10 e 100 ng/ml) sobre a liberação de [^3H] glutamato *in vitro* de sinaptossomas de cérebro de ratos. A liberação de glutamato está expressa como porcentagem do controle. Os resultados são expressos como média + E.P. de três experimentos independentes (em triplicatas). ANOVA de uma via ($F_{(2,8)}=0,126$, $P=0,884$).

Estes resultados indicam que a neurotransmissão glutamatérgica, em nível de receptores NMDA e captação e liberação de glutamato, não está envolvida na atividade antidepressiva de *Hypericum caprifoliatum*.

6. REFERÊNCIAS

BERMAN, R.M.; CAPPUELO, A.; ANAND, A.; OREN, D.A.; HENINGER, G.R.; CHARNEY, D.S.; KRYSTAL, J.H. Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. **Biological Psychiatry**, v.47, p. 52-59, 2000.

DANBOLT, N.C. Glutamate uptake. **Progress in Neurobiology**, v.65, p. 1-105, 2001.

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.14, p. 344-346, 2000.

DUMAN, R.S. e VOLETI, B. Signaling pathways underlying the pathophysiology and treatment of depression: novel mechanisms for rapid-acting agents. **Trends in Neurosciences** v.35, p. 47-56, 2012.

KASPER, S.; GASTPAR, M.; MOLLER, H.J.; MULLER, W.E.; VOLZ, H.P.; DIENEL, A.; KIESER, M. Better tolerability of St. John's wort extract WS 5570 compared to treatment with SSRIs: a reanalysis of data from controlled clinical trials in acute major depression. **International Clinical Psychopharmacology** v.25, 204-213, 2010.

LINDE, K.; SCHUMANN, I.; MEISSNER, K.; JAMIL, S.; KRISTON, L.; RUCKER, G.; ANTES, G.; SCHNEIDER, A. Treatment of depressive disorders in primary care-protocol of a multiple treatment systematic review of randomized controlled trials. **BMC Family Practice** v.12, p.127-133, 2011.

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

MACHADO-VIEIRA, R.; IBRAHIM, L; HENTER, I.D.; Zarate, C.A Jr. Novel glutamatergic agents for major depressive disorder and bipolar disorder. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**v.100, p.678-87, 2012.

MARSH, W.E e DAVIES, J.A.The involvement of sodium and calcium ions in the release of amino acid neurotransmitters from mouse cortical slices elicited by hyperforin. **Life Sciences** v. 71, p. 2645-2655, 2003.

MARTINI, L.H; CERESER, L.; ZANONATO JUNIOR, I.; JARDIM, F.M.A.; VENDITE, D.A.; FRIZZO, M.E.S.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B.; WOFCHUK, S.; SOUZA, D.O. The sesquiterpenes polygodial and drimaniol in vitro affect glutamatergic transport in rat brain. **Neurochemical Research**, v.31, p. 431-438, 2006.

MIGUES, P.V.; LEAL, R.B.; MANTOVANI, M.; NICOLAU, M.; GABILAN, N.H. Synaptosomal glutamate release induced by the fraction Bc2 from the venom of the sea anemone *Bunodosoma caissarum*. **Neuroreport** v.18, p.67-70, 1999.

MITCHELL, N.D. e BAKER, G.B. An update on the role of glutamate in the pathophysiology of depression. **Acta Psychiatrica Scandinavica** v.122, p.192-210, 2010.

MURROUGH, J.W. Ketamine as a novel antidepressant: from synapse to behavior. **Clinical Pharmacology & Therapeutics** v.91, p. 303-9, 2012.

NOWAK, L.; BREGESTOVSKI, P.; ASCHER, P.; HERBERT, A.; PROCHIANTZ, A. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurons. **Nature**, v.307, p. 462-465, 1984.

OZAWA, S.; KAMYIAR, K.; TSUZUKI, K. Glutamate receptors in the mammalian cerebral nervous system. **Progress in Neurobiology**, v.54, 581-618, 1998.

POLESZAK, E.; SZEWEZYC, B.; KEDZIERSKA, E.; WLAZ, P.; PILC, A., NOWAK, G. Antidepressant-like activity of magnesium in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior** v.78, p. 7-12, 2004.

POLESZAK, E.; WLAZ, P.; KEDZIERSKA, E.; NIEOCZYM, D.; WRÓBEL, A.; FIDECKA, S.; PILC, A.; NOWAK, G. NMDA/glutamate mechanism of antidepressant-like action of magnesium in forced swim test in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior** v.88, p. 158-164, 2007a.

POLESZAK, E.; WLAZ, P.; WRÓBEL, A.; DYBATA, M.; SOWA, M.; FIDECKA, S.; PILC, A.; NOWAK, G. Activation of the NMDA/glutamate receptor complex antagonizes the NMDA antagonist-induced antidepressant-like effects in the forced swim test. **Pharmacological Reports** v.59, p. 595-600, 2007b.

PORSOLT, R.D.; ANTON, G.; BLAVET, N.; JALFRE, M. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. **European Journal of Pharmacology** 47, 379-391, 1978.

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, p. 1447-1452, 1995.

SANACORA, G.; TRECCANI, G.; POPOLI, M. Towards a glutamate hypothesis of depression: an emerging frontier of neuropsychopharmacology for mood disorders. **Neuropharmacology** v.62, p. 63-77, 2012.

SZAKACS, R.; JANKA, Z.; KALMAN, J. The "blue" side of glutamatergic neurotransmission: NMDA receptor antagonists as possible novel therapeutics for major depression. **Neuropsychopharmacologia Hungarica** v.14, p. 29-40, 2012.

TRULLAS, R. e SKOLNICK, P. Functional antagonists at the NMDA receptor complex exhibit antidepressant actions. **European Journal of Pharmacology** v.185, p. 1-10, 1990.

TZSCHENTKE T.M. Glutamatergic mechanisms in different disease states: overview and therapeutical implications – an introduction. **Amino Acids**, v.23, p.147-152, 2002.

VIANA, A.F.; REGO J.C.; von POSER, G. L.; FERRAZ, A.F.; HECKLER, A.P.; CONSTANTIN, J; RATES, S.M.K.The antidepressant like effect of *Hypericum caprifoliatum* Cham.& Schltld (Guttiferae) on forced swimming test results from an inhibition of neuronal monoamine uptake. **Neuropharmacology**, v.49, p.1042-1052, 2005.

VIANA, A. F.; REGO, J.; MUNARI, L.; DOURMAP, N.; HECKLER, A.P.; COSTA, T.D.; von POSER, G.L.; CONSTANTIN, J.; RATES, S.M.K. *Hypericum caprifoliatum* (Guttiferae) Cham. &Schltld.: a species native to South Brazil with antidepressant-like activity. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v.20, p. 507-514, 2006.

WONNEMANN, M.; SINGER, A.; MÜLLER, W.E. Inhibition of synaptosomal uptake of ³H-L-glutamate and ³H-GABA by hyperforin, a major constituent of St. John's Wort: the role of amiloride sensitive sodium conductive pathways. **Neuropsychopharmacology** v.23, p. 188-197, 2000.

WONG, E.H.; KEMP, J.A.; PRIESTLEY, T.; KNIHGT, A.R.; WOODRUFF, G.N.; IVERSEN, L.L. The anticonvulsant MK-801 is a potent N-methyl-D-aspartate antagonist. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** v.83, p. 7104-7108, 1986.

CAPÍTULO II: Study of antidepressant-like activity of an enriched phloroglucinol fraction obtained from *Hypericum caprifoliatum* Cham & Schlttdl (Guttiferae).

Manuscrito submetido ao periodico *Pharmaceutical Biology*

CAPÍTULO III: The antidepressant-like effect of hyperbrasilol b, a natural dimeric phloroglucinol derivative, is prevented by veratrine, a sensitive-voltage na⁺ channel opener.

Manuscrito submetido ao periódico *Natural Products Communications*

III PARTE

DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

DISCUSSÃO GERAL, CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O principal objetivo deste trabalho foi dar continuidade à procura por moléculas farmacologicamente ativas em espécies de *Hypericum* nativas da região sul do Brasil. Ao longo dos últimos anos, nosso grupo demonstrou que extratos de *Hypericum caprifoliatum* e *Hypericum polyanthemum* têm potencial atividade antidepressiva e analgésica, e que derivados floroglucínóis presentes nestas espécies podem ser os responsáveis por estes efeitos. Alguns trabalhos demonstraram o envolvimento da neurotransmissão dopaminérgica e da ativação indireta do sistema opióide nos efeitos observados (Viana *et al.*, 2005; Stein *et al.*, 2012; Stolz *et al.*, 2012). Nesta tese, avaliamos os mecanismos envolvidos na ação antidepressiva de HC1 e hiperbrasilol B, derivados floroglucínóis presentes em *H. caprifoliatum*, buscando duas abordagens diferentes daquelas que vêm sendo estudadas: a transmissão glutamatérgica e mecanismos dependentes de canais de Na⁺.

O envolvimento da neurotransmissão glutamatérgica no efeito antidepressivo de HC1 foi investigado no Capítulo 1, através de manipulação farmacológica com MK-801 (antagonista NMDA) no teste da natação forçada, bem como captação e liberação de [³H]-glutamato. Os resultados que obtivemos em ambas as abordagens indicam que a neurotransmissão glutamatérgica, pelo menos em nível de receptores NMDA e captação e liberação de glutamato, não está envolvida na atividade antidepressiva de HC1. Porém, temos que levar em conta que outros tipos de receptores de glutamato (AMPA e receptores metabotrópicos) ou transportadores parecem estar envolvidos na etiologia da depressão ou no mecanismo de ação de antidepressivos, e não podemos descartar a possibilidade de *Hypericum caprifoliatum* atuar nestes alvos. Além disso, estes dados, aliados a outros do grupo, sugerem que HC1 apresenta seletividade para transportadores monomaminérgicos. Estudos sobre outros transportadores são necessários para confirmar esta hipótese.

Os dados apresentados no Capítulo II reproduzem resultados anteriores do nosso laboratório, demonstrando que HC1 reduz o comportamento de

imobilidade de camundongos no teste da natação forçada. Este efeito é prevenido quando uma dose ativa de HC1 é associada à uma sub-dose de veratrina. A veratrina também preveniu o efeito antiimobilidade no teste da natação forçada do hiperbrasilol B, um derivado floroglucinol isolado de *H. caprifoliatum*, que teve sua atividade antidepressiva demonstrada pela primeira vez neste trabalho (Capítulo III).

Os resultados obtidos com veratrina e os floroglucinóis HC1 e hiperbrasilol B vêm a corroborar com a hipótese de que o mecanismo de ação de extratos de *H. caprifoliatum* depende de algum mecanismo basal envolvido no transporte de neurotransmissores, uma vez que o gradiente de Na^+ é a principal força motriz dos transportadores de monoaminas (Xhaard *et al.*, 2008). Estes transportadores são transportadores ativos secundários (Chen *et al.*, 2004), uma vez eles utilizam a diferença do potencial eletroquímico de Na^+ através da membrana celular como fonte de energia para o transporte. Ocorre o co-transporte de íons Na^+ com a molécula de substrato (neste caso, monoaminas), sendo o Na^+ transportado ao longo de seu gradiente eletroquímico, provendo a energia necessária para o transporte termodinamicamente desfavorável do substrato (Kristensen *et al.*, 2011).

O fato dos derivados floroglucinóis de *Hypericum* inibirem a captação de monoaminas por mecanismo diferente ao dos inibidores de transportadores típicos é coerente com sua estrutura química. Estas moléculas não possuem átomo de nitrogênio, e estudos da relação estrutura-atividade revelaram que a presença deste átomo é indispensável para a ligação dos antidepressivos com o sítio de monoaminas nos transportadores (Appel *et al.*, 2004). Singer e colaboradores (1999) demonstraram que a hiperforina altera as concentrações extracelulares de neurotransmissores possivelmente interferindo com rotas condutoras de íons Na^+ . Hoje, sabe-se que este composto ativa correntes mediadas por canais TRPC6, alterando assim as concentrações intracelulares de Ca^{2+} e Na^+ (Leuner *et al.*, 2007). A lamotrigina é um anticonvulsivante inibidor da recaptação de monoaminas (Southam *et al.*, 1998) amplamente utilizado no tratamento dos transtornos do humor. Um dos mecanismos de ação da lamotrigina é o bloqueio de canais de Na^+ sensíveis à voltagem e

estabilização da membrana neuronal (Mantegazza *et al.*, 2010) e seu efeito antiimobilidade no teste da natação forçada é revertido pela veratrina (Prica *et al.*, 2008), o que sugere que HC1 e hiperbrasilol B possuem um perfil de ação lamotrigina-*like*.

Os transportadores de neurotransmissores não são diretamente acoplados à hidrólise de ATP, no entanto, eles estão ligados indiretamente através do gradiente de íons gerado por ATPases bombeadoras de íons (Rudnick, 1998). Os transportadores da membrana plasmática são indiretamente impulsionados pela enzima Na^+ , K^+ ATPase, que gera gradientes de Na^+ e K^+ , e nesse processo acaba criando um potencial de membrana (Rudnick, 1998). Demonstramos nesse trabalho que a administração repetida por 3 dias com HC1 causou um aumento significativo na atividade da Na^+ , K^+ ATPase no córtex cerebral e hipocampo de camundongos, enquanto que o mesmo regime de tratamento com hiperbrasilol B aumentou a atividade da enzima apenas no hipocampo dos animais. Contudo, deve-se ressaltar que a redução no tempo de imobilidade no teste da natação forçada após a administração aguda de HC1 e hiperbrasilol B parece não estar associada a um aumento na atividade da Na^+ , K^+ ATPase, uma vez que quando administrados de forma aguda estes compostos não demonstraram qualquer efeito na atividade da enzima. A regulação da atividade da Na^+ , K^+ ATPase é complexa e parece ser regulada por diversos fatores e por conveniência foi dividida em 'curto prazo', responsável por alterações rápidas na atividade da bomba de sódio, ocorrendo em minutos, e em 'longo prazo', envolvendo alterações nas taxas de síntese ou degradação protéica, ocorrendo em horas ou dias (Therien e Blostein, 2000). Apesar de não sabermos os exatos mecanismos envolvidos nos resultados obtidos com HC1 e hiperbrasilol B, é possível que um controle em longo prazo esteja envolvido. Outra explicação seria que o tratamento agudo com estes compostos não altere a atividade da enzima de maneira suficiente a alterar o gradiente de Na^+ inibindo o transporte das monoaminas e causando o aumento das mesmas na fenda sináptica.

Existem linhas de pesquisas que sustentam que a regulação iônica esteja anormal nos transtornos do humor. Ainda em meados dos anos 1960 e

início dos 1970, vários pesquisadores notaram haver um aumento na concentração intracelular corporal total (Coppen e Shaw, 1963; Coppen *et al.*, 1966; Shaw, 1966) e nos eritrócitos de Na^+ (Naylor *et al.*, 1971; Naylor *et al.*, 1973) em pacientes maníacos. Tais mudanças estariam ocorrendo como conseqüência da redução da atividade da Na^+ , K^+ ATPase (Greenspan *et al.*, 1968; Almy e Taylor, 1973). De fato, tanto a mania, quanto a depressão bipolar, têm sido associadas com concentrações intracelulares aumentadas de Na^+ (Li and El-Mallakh, 2004) e com a redução da atividade da Na^+ , K^+ ATPase em eritrócitos (Looney and El-Mallakh, 1997). Nossos resultados demonstram que tanto HC1, quanto hiperbrasilol B aumentam a atividade da enzima Na^+ , K^+ ATPase, o que pode contribuir para a manutenção da excitabilidade neuronal em condições patológicas. Associando os resultados obtidos nesse trabalho aos já reportados anteriormente por Viana e colaboradores (2005) e Stein e colaboradores (2012) podemos supor que HC1 e hiperbrasilol B alterem o gradiente de Na^+ através da estimulação da Na^+ , K^+ ATPase e/ou bloqueio de canais de Na^+ sensíveis à voltagem, podendo estes eventos serem interligados ou não.

Curiosamente, nenhum dos tratamentos, agudo ou repetido, com HC1 foi capaz de alterar a atividade da Na^+ , K^+ ATPase quando os camundongos foram submetidos ao nado forçado. Modelos animais de depressão foram associados com uma diminuição da atividade da Na^+ , K^+ ATPase (Gamaro *et al.*, 2003; de Vasconcellos *et al.*, 2005) e foi já demonstrado o possível envolvimento de moléculas endógenas do tipo ouabaína no estresse comportamental (Bagrov *et al.*, 2009). Weidemann e colaboradores (2004) relataram que o estresse agudo pode induzir a produção de compostos do tipo digitalis na glândula supra-renal e no hipotálamo de ratos, sendo estes capazes de inibir a Na^+ , K^+ ATPase. Além disso, Goto e colaboradores (1995) demonstraram que o estresse agudo da natação em ratos resultou em aumento significativo nos níveis plasmáticos e da adrenal de moléculas endógenas do tipo ouabaína. Ainda, hormônios esteróides, em particular, os corticosteróides, possuem efeitos reguladores específicos de longo e curto prazo, sobre a atividade da Na^+ , K^+ ATPase (Therien and Blostein, 2000) e já foi demonstrado

que uma sessão de natação curta aumenta os níveis plasmáticos e corticais de corticosterona em camundongos (Viana *et al.*, 2008). Os antidepressivos imipramina e bupropiona, assim como um extrato lipofílico de *H. caprifoliatum* reduziram o aumento de corticosterona cortical induzido pelo nado forçado (Viana *et al.*, 2008). Portanto, podemos pensar que o HC1 possa estar evitando essa redução na atividade da Na⁺, K⁺ ATPase induzida pelo estresse da natação forçada.

Fármacos bloqueadores de canais de Na⁺ sensíveis à voltagem têm sido utilizados há muito tempo no tratamento de diversas doenças do SNC. Os anticonvulsivantes fenitoína e carbamazepina foram introduzidos sete e cinco décadas atrás, respectivamente, porém, o fato de seus efeitos anticonvulsivantes serem atribuídos à inibição de canais de Na⁺ sensíveis à voltagem foi reconhecido há apenas 20 anos (Clare *et al.*, 2000). O reconhecimento da importância destes canais como alvo molecular para fármacos atuando no SNC têm levado diversas companhias farmacêuticas a conduzirem estudos na busca de agentes terapeuticamente ativos. Visto que os canais de Na⁺ sensíveis à voltagem participam de diversas funções fisiológicas, a janela terapêutica de compostos bloqueadores destes canais é uma questão fundamental. A maioria dos programas sintéticos ainda utiliza drogas mais antigas, como a lamotrigina, como protótipos. Porém, estes programas obtiveram apenas um modesto avanço por fármacos mais específicos e eficientes (Tarnawa *et al.*, 2007).

Substâncias procedentes de plantas possuem uma função pertinente no processo de descoberta de novos fármacos (Calixto *et al.*, 2000). Sendo comprovada a ação bloqueadora de derivados floroglucinóis de *Hypericum* sobre canais de Na⁺ sensíveis à voltagem, seria interessante o uso de sua estrutura química na pesquisa por novos fármacos para o tratamento de diversas doenças do SNC associadas à hiperexcitabilidade neuronal. Conforme realizado neste trabalho, as plantas podem ser submetidas a sucessivas extrações e procedimentos de purificação com a finalidade de isolar compostos de interesse, podendo eles próprios serem ativos e usados como fármacos, ou

ainda se tornando um protótipo, servindo como modelo para a síntese total de um fármaco (Rates, 2001).

Em conclusão, os resultados experimentais demonstrados nesta tese confirmaram o potencial efeito antidepressivo de *Hypericum caprifoliatum*, demonstrando um perfil farmacológico diferente dos antidepressivos clássicos. Tanto HC1, quanto hiperbrasilol B, parecem exercer efeitos sobre as concentrações intracelulares de Na^+ , alterando o influxo de Na^+ , seja pela modificação de canais de Na^+ ou pela ativação da Na^+ , K^+ ATPase. Estes resultados reforçam a utilidade das estruturas de floroglucínóis diméricos na busca por novas moléculas com propriedades antidepressivas. Além disso, podemos considerar estas moléculas como possíveis candidatos a estabilizadores do humor ou anticonvulsivantes.

Após a discussão deste estudo, observa-se que a principal questão a ser respondida é se HC1 e hiperbrasilol B realmente afetam canais de Na^+ sensíveis à voltagem. A fim de esclarecer este aspecto, este trabalho deixa como perspectivas:

- ✓ Avaliar o efeito de hiperbrasilol B, um composto que tem sua estrutura molecular definida, em modelos animais de atividade anticonvulsivante.
- ✓ Avaliar os efeitos de hiperbrasilol B em ensaios funcionais, como a captação de $^{22}\text{Na}^+$ e ensaios de radioligação com $[\text{}^3\text{H}]\text{-BTX}$. Havendo uma resposta positiva nestes ensaios, experimentos de eletrofisiologia devem ser realizados a fim de se caracterizar a interação do composto com os canais.

**REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS**

ABRIEL, H.; HASLER, U.; GEERING, K.; HORISBERGER, J.D. Role of the intracellular domain of the β subunit in Na^+ , K^+ pump function. **Biochimica et Biophysica Acta** v.1418, p. 85-96, 1999.

ALDANA, B.I.; SITGES, M. Sertraline inhibits pre-synaptic Na^+ channel-mediated responses in hippocampus-isolated nerve endings. **Journal of Neurochemistry** v.21, 197-205, 2012.

ALMY, G.L.; TAYLOR M.A. Lithium retention in mania. **Archives of General Psychiatry** v.29, p. 232-234, 1973.

ALTAMURA, C.A.; MAURI, M.C.; FERRARA, A. MORO, A.R.; D'ANDREA, G.; ZAMBERLAN, F. Plasma and platelet excitatory amino acids in psychiatric disorders. **The American Journal of Psychiatry** v. 150, p. 1731-1723, 1993.

APPEL, M., BERFIELD, J.L., WANG, L.C., DUNN, W.J., CHEN, N., REITH, M.E.A. Structure-activity relationship for substrate recognition by the human dopamine transporter. **Biochemical Pharmacology** v.67, p. 293–302, 2004.

APPEL, C.; GLOOR, S.; SCHMALZING, G.; SCHACHNER, M.; BERNHARDT, R.R. Expression of a Na^+ , K^+ -ATPase beta 3 subunit during development of the zebrafish central nervous system. **Journal of Neuroscience Research** v. 46, p. 551-564, 1996.

ARMSTRONG, C.M.; BENZANILLA, F. Currents related to movement of the gating particles of the sodium channels. **Nature** v. 242, p. 459-461, 1973.

BAGROV, A.Y.; SHAPIRO, J.I.; FEDOROVA, O.V. Endogenous cardiotonic steroids: physiology, pharmacology, and novel therapeutic targets. **Pharmacological Reviews** v. 61, p. 9-38, 2009.

BANASR, M.; CHOWDHURY, G.M.; TERWILLIGER, R.; NEWTON, S.S.; DUMAN, R.S.; BEHAR, K.L.; SANACORA, G. Glial pathology in an animal model of depression: reversal of stress-induced cellular, metabolic and behavioral deficits by the glutamate-modulating drug riluzole. **Molecular Psychiatry** v.15, p. 501-511, 2010.

BARLET-BAS, C.; ARYSTARKHOVA, E.; CHEVAL, L.; MARSY, S.; SWEADNER, K.; MODYANOV, N. AND DOUCET, A. Are there several isoforms of Na⁺,K⁺-ATPase subunit in the rabbit kidney? **Journal of Biology Chemistry** v. 268, p.11512-11515, 1993.

BÉGUIN, P.; WANG, X.; FIRSOV, D.; PUOTI, A.; CLAEYS, D.; HORISBERGER, J.D. AND GEERING, K. The gamma subunit is a specific component of the Na⁺, K⁺-ATPase and modulates its transport function. **The EMBO Journal** v.16, p. 4250-60, 1997.

BERMAN, R.M.; CAPPIELLO, A.; ANAND, A.; OREN, D.A.; HENINGER, G.R.; CHARNEY, D.S.; KRYSTAL J.H. Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. **Biological Psychiatry** v. 47, p. 351-354, 2000.

BLANCO, G. AND MERCER, R.W. Isozymes of the Na⁺,K⁺-ATPase: Heterogeneity in structure, diversity in function. **American Journal of Physiology** v.275, p. 633-650, 1998.

BLANCO, G.; SANCHEZ, G.; MERCER, R.W. Differential regulation of Na⁺, K⁺-ATPase isozymes by protein kinases and arachidonic acid. **Archives of Biochemistry and Biophysics** v.359, p. 139-50, 1998.

BLANCO, G.; SANCHEZ, G.; MELTON, R. J.; TOURTELLOTTE, W.G.; MERCER, R.W. The alpha 4 isoform of the Na⁺,K⁺-ATPase is expressed in the germ cells of the testes. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry** v.48, p. 1023-1032, 2000.

BOURIN, M.; MASSE, F.; HASCOET, 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.; HASCOET, M. Topiramate and phenytoin anti-immobility effect in the mice forced swimming test is reversed by veratrine: Implication for bipolar depression treatment. **Behavioral Brain Research** v.205, p. 421-425, 2009.

BUCHHOLZER, M.L.; DVORAK, C.; CHATTERJEE, S.S.; KLEIN, J. Dual modulation of striatal acetylcholine release by hyperforin, a constituent of St John's wort. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics** v. 301, 714-719, 2002.

BURTH, P. Uma contribuição ao estudo da fisiopatologia da leptospirose: propriedades, purificação e identificação de inibidores da Na⁺, K⁺ ATPase presentes em endotoxina de *Leptospira interrogans*. Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 130p. **Tese de Doutorado em Ciências**, Rio de Janeiro, 1997.

CAESER, M.; EVANS, M.L.; BENHAM, C.D. Lack of effect of the novel anticonvulsant SB-204269 on voltage-dependent currents in neurons cultured from rat hippocampus. **Neuroscience Letters** v. 271, p. 57-60, 1999.

CALABRESE, J.R.; SHELTON, M.D.; BOWDEN, C.L.; RAPPORT, D.J.; SUPPES, T.; SHIRLEY, E.R.; KIMMEL, S.E.; CABAN, S.J. Bipolar rapid cycling: focus on depression as its hallmark. **Journal of Clinical Psychiatry** v. 62, p. 34-41, 2001.

CALIXTO, J.B.; BEIRITH, A.; FERREIRA, J.; SANTOS, A.R.; FILHO, V.C.; YUNES, R.A. Naturally occurring antinociceptive substances from plants. **Phytotherapy Research** v.14, p. 401-418, 2000.

CATTERALL, W.A. Cellular and molecular biology of voltage-gated sodium channels. **Physiological Reviews** v. 724, p. S15-48, 1992.

CATTERALL, W.A. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. **Neuron** v. 26, p. 13-25, 2000.

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, 1998.

CHATTERJEE, S.S.; FILIPPOV, V.; LISHKO, P.; MAXIMYUK, O.; NOLDNER, M.; KRISHAL, O. Hyperforin attenuates various ionic conductance mechanisms in the isolated hippocampal neurons of rat. **Life Sciences** v.65, p. 2395-2405, 1999.

CHEN, N.H.; REITH, M.E.; QUICK, M.W. Synaptic uptake and beyond: the sodium- and chloride-dependent neurotransmitter transporter family SLC6. **Pflugers Archiv European Journal of Physiology** v.447, p. 519–531, 2011.

CHOW, D.C.; FORTE, J.G. Functional significance of the beta-subunit for heterodimeric P-type ATPases. **The Journal of Experimental Biology** v.198, p. 1-17, 1995.

CERVO, L.; ROZIO, M.; EKALLE-SOPRO, C.B.; GUIISO, G.; MORAZZONI, P.; CACCIA, S. Role of hyperforin in the antidepressant-like activity of *Hypericum perforatum* extracts. **Psychopharmacology** v.164, p. 423-428, 2002.

CLARE, J.J.; TATE, S.N.; NOBBS, M.; ROMANOS, M.A. Voltage-gated sodium channels as therapeutic targets. **Drug Discovery Today** v. 5, p. 506-520, 2000.

CODAGNONE, F.T.; CONSONI, F.T.; RODRIGUES, A.L.S.; VITAL, M.A.B.F.; ANDREATINI, R. Veratrine blocks the lamotrigine-induced swimming increase and immobility decrease in the modified forced swimming test. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry** v.31, p. 1307-1311, 2007.

CONN, P.J.; PIN, J.P. Pharmacology and function of metabotropic glutamate receptors. **Annual Reviews in Pharmacology and Toxicology** v. 37, p. 205-237, 1997.

CONNOLLY, K.R.; THASE, M.E. Emerging drugs for major depressive disorder. **Expert Opinion on Emerging Drugs**, v.17, p. 105-126, 2012.

CONSONI, F.T.; VITAL, M.A.B.F.; ANDREATINI, R. Dual monoamine modulation for the antidepressant-like effect of lamotrigine in the modified forced swimming test. **European Neuropsychopharmacology** v.16, p. 451-458, 2006.

COPPEN, A.; SHAW, D.M. Mineral metabolism in melancholia. **BMJ** v. 2, p. 1439-1444, 1963.

COPPEN, A.; SHAW, D.M.; MALLESON, A.; COSTAIN, R. Mineral metabolism in mania. **BMJ** v. 1, p. 71-75, 1966.

CORNELIUS, F. Functional reconstitution of the sodium pump. Kinetics of exchange reactions performed by reconstituted (Na-K)-ATPase. **Biochimica et Biophysica Acta** v.1071, p. 19-66, 1991.

CORTES, V.F.; VEIGA-LOPES, F.E.; BARRABIN, H.; ALVES-FERREIRA, M. AND FONTES, C.F.L. The γ subunit of Na⁺, K⁺ ATPase: Role on ATPase activity and regulatory phosphorylation by PKA. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology** v. 38, p. 1901-13, 2006.

CREMA, L.; SCHLABITZ, M.; TAGLIARI, B.; CUNHA, A.; SIMÃO, F.; KROLOW, R.; PETTENUZZO, L.; SALBEGO, C.; VENDITE, D.; WYSE, A.T.; DALMAZ, C. Na⁺, K⁺ ATPase activity is reduced in amygdala of rats with chronic stress-induced anxiety-like behavior. **Neurochemical Research** v. 35, p. 1787-1795, 2010.

CRYAN, J.F.; MARKOU, A.; LUCKI, I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. **Trends in Pharmacological Sciences** v. 23, p. 238-245, 2002.

CRYAN, J.F.; VALENTINO, R.J.; LUCKI, I. Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews** v. 29, p. 547-569, 2005.

DALL'AGNOL, R.; FERRAZ, A.; BERNARDI, A.P.; ALBRING, D.; NÖR, C.; SARMENTO, L.; LAMB, L.; HASS, M., von POSER, G.L.; SCHAPOVAL, E.E.S. Antimicrobial activity of some *Hypericum* species. **Phytomedicine** v.10, p. 511-516, 2003.

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.14, p. 344-346, 2000.

DAVIES, P.F. Flow-mediated endothelial mechanotransduction. **Physiological Reviews** v. 75, p. 519-560, 1995.

de VASCONCELLOS, A.P.; ZUGNO, A.I.; DOS SANTOS A.H.; NIETTO, F.B.; CREMA, L.M.; GONÇALVES, M.; FRANZON, R.; WYSE, A.T.; da ROCHA,

E.R.; DALMAZ, C. Na⁺,K⁺-ATPase activity is reduced in hippocampus of rats submitted to an experimental model of depression: effect of chronic lithium treatment and possible involvement in learning deficits. **Neurobiology of Learning and Memory** v. 84, p. 102-110, 2005.

DESFRERE, L.; KARLSSON, M.; HIYOSHI, H.; MALMERSJÖ, S.; NANOU, E.; ESTRADA, M.; MIYAKAWA A.; LAGERCRANTZ, H.; EL MANIRA, A.; LAL, M.; UHLÉN, P. Na,K-ATPase signal transduction triggers CREB activation and dendritic growth. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** v. 106, p. 2212-2217, 2009.

DUMAN, R.S. Depression: A case of neuronal life and death? **Biological Psychiatry** v. 56, p.140-145, 2004.

DUMAN, R.S.; VOLETI, B. Signaling pathways underlying the pathophysiology and treatment of depression: novel mechanisms for rapid-acting agents. **Trends in Neuroscience** v. 35, p. 47–56, 2012.

ECKERT, G.P.; MULLER, W.E. Effects of hyperforin on the fluidity of brain membranes.**Pharmacopsychiatry** v. 34, p. S22-S25, 2001.

ECKERT, G.P.; KELLER, J.H.; JOURDAN, C.; KARAS, M.; VOLMER, D.A.; SCHUBERT-ZSILAVECZ, M.; MULLER, W.E. Hyperforin modifies neuronal membrane properties in vivo. **Neuroscience Letters** v. 36, p. 139-143, 2004.

EL-MALLAKH, R.S.; ELMAADAWI, A.Z.; LOGANATHAN, M.; LOHANO, K.; GAO Y. Bipolar disorder: an update. **Postgraduate Medical** v. 122, p. 24-31, 2010.

FERRAZ, A.; BORDIGNON, S.; MANS, D.; SCHMITT, A.; RAVAZZOLO, A.P. Screening for the presence of hypericins in southern Brazilian species of *Hypericum* (Guttiferae). **Pharmaceutical Biology** v. 40, p. 294-297, 2002.

FRANKLIN, M.; CHI, J.D.; MANNEL, M.M; COWEN, P.J. Acute effects of L1 160 (extract of *Hypericum perforatum*, St John's wort) and two of its constituents on neuroendocrine responses in the rat. **Journal of Psychopharmacology** v. 14, p. 189-201, 2000.

FRYE, M.A. Clinical practice. Bipolar disorder--a focus on depression. **The New England Journal of Medicine** v. 364, p.51-59, 2011.

GAMARO, G.D.; STRECK, E.L.; MATTÉ, C.; PREDIGER, M.E.; WYSE, A.T.; 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. Monoamine oxidase inhibitory activity of some *Hypericum* species native to South Brazil. **Journal of Pharmacy and Pharmacology** v. 53, p. 1273-1279, 2001.

GOA, K.L.; ROSS, S.R.; CHRISP, P. Lamotrigine, a review of its pharmacological properties and efficacy in epilepsy. **Drugs** v. 46, p. 152-176, 1993.

GOBBI, M.; DALLA VELLE, F.; CLAPPARELLI, C.; DIOMEDE, L.; MORAZZONI, P.; VEROTTA, P.; CACCIA, S.; CERVO, L.; MENNINI, T. *Hypericum perforatum* L. extract does not inhibit 5-HT transporter in rat brain cortex. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology** v. 360, p. 262-9, 1999.

GOLDIN, A.L.; BARCHI, R.L.; CALDWELL, J.H.; HOFMANN, F.; HOWE, J.R.; HUNTER, J.C.; KALLEN, R.G.; MANDEL, G.; MEISLER, M.H.; NETTER, Y.B.; NODA, M.; TAMKUN, M.M.; WAXMAN, S.G.; WOOD, J.N.; CATTERALL, W.A. Nomenclature of voltage-gated sodium channels. **Neuron** v. 28, p. 365-368, 2000.

GOLDSTEIN, I.; LEVY, T.; GALILI, D.; OVADIA, H.; YIRMIYA, R.; ROSEN, H.; LICHSTEIN, D. Involvement of Na⁺, K⁺-ATPase and endogenous digitalis-compounds in depressive disorders. **Biological Psychiatry** v. 60, p. 491-499, 2006.

GOLDSTEIN, I.; LERER, E.; LAIBA, E.; MALLETT, J.; MUJAHEED, M.; LAURENT, C.; ROSEN, H.; EBSTEIN, R.P.; LICHSTEIN, D. Association

between sodium- and potassium-activated adenosine triphosphatase alpha isoforms and bipolar disorders. **Biological Psychiatry** v. 65, p. 985-991, 2009.

GOTO, A.; YAMADA, K.; NAGOSHI, H.; TERANO, Y.; OMATA, M. Stress-induced elevation of ouabain-like compound in rat plasma and adrenal. **Hypertension** v. 26, P. 1173-1176, 1995.

GREENSPAN, K.; GOODWIN, F. K.; BUNNEY, W.E. Jr. Lithium ion retention and distribution: Patterns during acute mania and normothymia. **Archives of General Psychiatry** v. 19, p. 664-673, 1968.

GRISAR, T. Glial and neuronal Na⁺-K⁺ pump in epilepsy. **Annals of Neurology** v. 16, p. S128-S134, 1986.

HAMID, H.; GAO, Y.; LEI, Z.; HOUGLAND, M.T.; EL-MALLAKH, R.S. Effect of ouabain on sodium pump alpha-isoform expression in an animal model of mania. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry** v. 33, p. 1103-1106, 2009.

HASHIMOTO, K.; SAWA, A.; IYO, M. Increased levels of glutamate in brains from patients with mood disorders. **Biological Psychiatry** v. 62, p.1310-1316, 2007.

HAZELWOOD, L.A.; FREE, R.B.; CABRERA, D.M.; SKINBJERG, M.; SIBLEY, D.R. Reciprocal modulation of function between the D1 and D2 dopamine receptors and the Na⁺,K⁺-ATPase. **The Journal of Biological Chemistry** v. 283, p. 6441-6453, 2008.

HERMAN, L.; HOUGLAND, T.; EL-MALLAKH, R.S. Mimicking human bipolar ion dysregulation models mania in rats. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews** v. 31, p. 874-881, 2007.

HUANG, C.J., HAROOTUNIAN, A.; MAHER, M.P.; QUAN, C.; RAJ, C.D.; McCORMACK, K.; NUMANN, R.; NEGULESCU, P.A.; GONZÁLEZ, JE. Characterization of voltage-gated sodium-channel blockers by electrical

stimulation and fluorescence detection of membrane potential. **Nature Biotechnology** v. 24, p. 439-446, 2006.

INOUE, N.; MATSUI, H. Activation of a brain type Na pump after glutamate excitation of cerebral neurons. **Brain Research** v. 534, p. 309-312, 1990.

JENSEN, A.G.; HANSEN, S.H.; NIELSEN, E.O. Adhyperforin as contributor to the effects of *Hypericum perforatum*, L. in biochemical models of antidepressant activity. **Life Sciences** v. 68, p. 1593-1605, 2001.

JORGENSEN, P.L.; HAKANSSON, K.O.; KARLISH, S.J.D. Structure and mechanism of Na,K-ATPase: functional sites and their interactions. **Annual Review of Physiology** v. 65, p. 817-849, 2003.

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, p. 199-202, 1999.

KAPLAN, J.H. Biochemistry of Na⁺,K⁺ATPase. **Annual Review of Biochemistry** v. 71, p. 511-535, 2002.

KAROLY, R.; LENKEY, N.; JUHASZ, A.O.; VIZI, E.S.; MIKE A. Fast- or slow-inactivated state preference of Na⁺ channel inhibitors: a simulation and experimental study. **PLoS Computational Biology** v. 6, e1000818, 2010.

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. 747-65, 2010.

KETTER, T.A.; MANJI, H.K.; POST, R.M. Potential mechanisms of action of lamotrigine in the treatment of bipolar disorders. **Journal of Clinical Psychopharmacology** v. 23, p. 484-495, 2003.

KIM, J.S.; SCHMID-BURGK, W.; CLAUS, D.; KORNHUBER, H. H. Increased serum glutamate in depressed patients. **Archiv fur Psychiatrie und Nervenkrankheiten**. v. 232, p. 299-304, 1982.

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.

KRISTENSEN, A.S.; ANDERSEN, J.; JØGERSEN, T.N.; SØRENSEN, L.; ERIKSEN, J.; LOLAND, C.J.; STRØMGAARD, K.; GETHER, U. SLC6 neurotransmitter transporters: structure, function, and regulation. **Pharmacological Reviews** v. 63, p. 585-640, 2011.

KUO, C.C.; LU, L. Characterization of lamotrigine inhibition of Na⁺ channels in rat hippocampal neurones. **British Journal of Pharmacology** v. 121, p. 1231-1238, 1997.

KUO, C.C. A common anticonvulsant binding site for phenytoin, carbamazepine, and lamotrigine in neuronal Na⁺ channels. **Molecular Pharmacology** v. 54, p. 712–721, 1998.

LANG, D.G.; WANG, C.M.; COOPER, B.R. Lamotrigine, phenytoin and carbamazepine interactions on the sodium current present in N4TG1 mouse neuroblastoma cells. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics** v. 266, p. 829–835, 1993.

LENKEY, N.; KAROLY, R.; LUCAKS, P.; VIZI, E.S.; SUNESEN, M.; FODOR, L.; MIKE, A. Classification of drugs based on properties of sodium channel inhibition: a comparative automated patch-clamp study. **PLoS One**, v. 5, e15568, 2010.

LEUNER, K.; KAZANSKI, V.; MÜLLER, M.; ESSIN, K.; HENKE, B.; GOLLASCH, M.; HARTENECK, C.; MÜLLER, W.E. Hyperforin -a key constituent of St. John's wort specifically activates TRPC6 channels. **FASEB Journal** v. 21, p. 4101-4111, 2007.

LEUNER, K.; HEISER, J.H.; DERKSEN, S.; MLADENOV, M.I.; FEHSKE, C.J.; SCHUBERT, R.; GOLLASCH, M.; SCHNEIDER, G.; HARTENECK, C.; CHATTERJEE, S.S.; MULLER, W.E. Simple 2,4-diacylphloroglucinols as

classic transient receptor potential-6 activators - Identification of a novel pharmacophore. **Molecular Pharmacology** v. 77, p. 368-377, 2010.

LEUNER, K.; LI, W.; AMARAL, M.D.; RUDOLPH, S.; CALFA, G.;SCHUWALD, A.M.;HARTENECK, C.; INOUE, T.; POZZO-MILLER, L.Hyperforin modulates dendritic spine morphology in hippocampal pyramidal neurons by activating Ca⁽²⁺⁾ -permeable TRPC6 channels.**Hippocampus** doi: 10.1002/hipo.22052, 2012.

LI, R.; EL-MALLAKH, R.S. Differential response of bipolar and normal control lymphoblastoid cell sodium pump to ethacrynic acid. **Journal of Affective Disorders** v. 80, p. 11-17, 2004.

LI, N.; LEE, B.; LIU, R.J.; BANASR, M.; DWYER, J.M.; IWATA, M.; LI X.Y.; AGHAJANIAN, G.; DUMAN, R.S. mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists. **Science** v. 329, p. 959-964, 2010.

LINDE, K.; BERNER, M.M.; KRISTON, L. St John's wort for major depression. **Cochrane Database of Systematic of Reviews** v. 8, CD000448, 2008.

LINDE, K., SCHUMANN, I., MEISSNER, K., JAMIL, S., KRISTON, L., RUCKER, G., ANTES, G., SCHNEIDER, A. Treatment of depressive disorders in primary care-protocol of a multiple treatment systematic review of randomized controlled trials. **BMC Family Practice** v. 12, p.127-133, 2011.

LINGAMANENI, R.; HEMMINGS Jr H.C.Effects of anticonvulsivants on veratridine- and KCl- evoked glutamate release from rat cortical synaptosomes. **Neuroscience Letters** v. 276, p. 127-130, 1999.

LIZASOAIN, I.; KNOWLES, R.G.; MONCADA, S. Inhibition by lamotrigine of the generation of nitric oxide in forebrain slices. **Journal of Neurochemistry** v. 64, p. 636-642, 1995.

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

MALANDRO, M.S.; KILBERG, M.S. Molecular biology of mammalian amino acid transporters. **Annual Review of Biochemistry** v. 65, p. 305-336, 1996.

MANTEGAZZA, M.; CURIA, G.; BIAGINI, G.; RAGSDALE, D.S.; AVOLI, M. Voltage-gated sodium channels as therapeutic targets in epilepsy and other neurological disorders. **The Lancet Neurology** v. 9, p. 413-424, 2010.

MARSHALL, J.B.; FORKER, A.D. Cardiovascular effects of tricyclic antidepressants: therapeutic usage, overdose, and management of complications. **American Heart Journal** v. 1033, p.401-414, 1982.

MARSH, W.E.; DAVIES, J.A. The involvement of sodium and calcium ions in the release of amino acid neurotransmitters from mouse cortical slices elicited by hyperforin. **Life Sciences** v. 71, p. 2645-2655, 2003.

MARTINI, L.H; CERESER, L.; ZANONATO JUNIOR, I.; JARDIM, F.M.A.; VENDITE, D.A.; FRIZZO, M.E.S.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B.; WOFCHUK, S.; SOUZA, D.O. The sesquiterpenes polygodial and drimaniol in vitro affect glutamatergic transport in rat brain. **Neurochemical Research**, v.31, p. 431-438, 2006.

MELDRUM, B.S.; AKBAR, M.T.; CHAPMAN, A.G. Glutamate receptors and transporters in genetic and acquired models of epilepsy. **Epilepsy Research** v. 36, p. 189-204, 1999.

MIRZA, N.R.; BRIGHT, J.L.; STANHOPE, K.J.; WYATT, A. Lamotrigine has an anxiolytic-like effect in the rat conditioned emotional response test of anxiety: a potential role for sodium channels? **Psychopharmacology (Berl)** v. 180, 159-168, 2005.

MISANE, I.; OGREN, S.O. Effects of *Hypericum perforatum* (St John's Wort) on passive avoidance in the rat: evaluation of potential neurochemical mechanisms underlying its antidepressant activity. **Pharmacopsychiatry** v. 34, p. S89-S97, 2001.

MISHORY, A.; WINOKUR, M.; BERSUDSKY, Y. Prophylactic effect of phenytoin in bipolar disorder: a controlled study. **Bipolar Disorders** v. 5, p. 464-467, 2003.

MITANI, H.; SHIRAYAMA, Y.; YAMADA, T.; MAEDA, K.; ASHBY Jr, C.R.; KAWARA, R. Correlation between plasma levels of glutamate, alanine and serine with severity of depression. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry** v. 30, p. 1155-1158, 2006.

MOBASHERI, A.; AVILA, J.; CÓZAR-CASTELLANO, I.; BROWNLEADER, M.D.; TREVAN, M.; FRANCIS, M.J.O.; LAMB, J.F. AND MARTÍN-VASALLO, P. Na,K-ATPase isozyme diversity; comparative biochemistry and physiological implications of novel functional interactions. **Bioscience Reports** v. 20, p. 51–91, 2000.

MORRIS, R.G.; ANDERSON, E.; LYNCH, G.S.; BAUDRY, M. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. **Nature** v. 319, p. 774-776, 1986.

MÜLLER, W.E.; SINGER, A.; WONNEMANN, M.; HAFNER, U., ROLLI, M.; SCHAFER, C. Hyperforin represents the neurotransmitter uptake inhibiting constituent of Hypericum extract. **Pharmacopsychiatry** v. 31, p.16-21, 1998.

MUNARI, L. Avaliação do efeito de um extrato lipofílico de *Hypericum caprifoliatum* Cham. & Schltl sobre os níveis cerebrais de dopamina e seus metabólitos através de microdiálise cerebral em ratos conscientes. **Dissertação de Mestrado**. Porto Alegre: Gráfica UFRGS, 2006, 144p.

NAMAKA, M.; GRAMLICH, C.R.; RUHLEN, D.; MELANSON, M.; SUTTON, I.; MAJOR, J.A treatment algorithm for neuropathic pain. **Clinical Therapeutics** v. 267, p. 951-079, 2004.

NATHANSON, J.A. The cellular Na⁺ pump as a site of action for carbon monoxide and glutamate: a mechanism for long-term modulation of cellular activity. **Neuron** v. 4, p. 781-791, 1995.

NAYLOR, G.J.; McNAMEE, H.B.; MOODY, J.P. Changes in erythrocyte sodium and potassium on recovery from depressive illness. **British Journal of Psychiatry** v. 118, p. 219-223, 1971.

NAYLOR, G.J.; DICK D.A.T.; Le POIDEVIN, D.; WHYTE S.F. Erythrocyte membrane cation carrier in depressive illness. **Psychological Medicine** v. 3, p. 502-508, 1973.

NEARY, J.T.; WHITTEMORE, S.R.; BU, Y.; MEHTA, H.; SHI, Y.F. Biochemical mechanisms of action of Hypericum LI 160 in glial and neuronal cells: inhibition of neurotransmitter uptake and stimulation of extracellular signal regulated protein kinase. **Pharmacopsychiatry** v. 34, p. S103-S107, 2001.

NESTLER, E.J.; BARROT, M.; DILEONE, R.J.; EISCH, A.; GOLD, S.J.; MONTEGGIA, L.M. Neurobiology of depression. **Neuron** v. 34, p. 13-25, 2002.

NICHOLSON, G.M.; BLANCHE, T.; MANSFIELD, K.; TRAN, Y. Differential blockade of neuronal voltage-gated Na⁽⁺⁾ and K⁽⁺⁾ channels by antidepressants drugs. **European Journal of Pharmacology** v.4521, p. 35-48, 2002.

NOR, C.; ALBRING, D.; FERRAZ, A.B.F; SCHRIPSEMA, J.; PIRES, V.; SONNET, P.; GUILLAUME, P.; von POSER, G.L. Phloroglucinol derivatives from our Hypericum species belonging to the Trigynobrathys section. **Biochemical Systematics and Ecology** v. 32, 517-519.

OVERSTREET, D. Modeling depression in animal models. **Methods in Molecular Biology** v. 829, 125-44, 2012.

OZAWA, S.; KAMYIAR, K.; TSUZUKI, K. Glutamate receptors in the mammalian cerebral nervous system. **Progress in Neurobiology** v. 54, 581-618, 1998.

ÖZTÜRK, Y.; AYDI, S.; BEIS, R.; BASER, K.H.C; BERBEROGLU, K.H.C. Effects of *Hypericum perforatum* e *Hypericum calycinum* L. extracts on the central nervous system in mice. **Phytomedicine** v. 3, p. 139-146, 1996.

PAIL, G.; HUF, W.; PJREK, E.; WINKLER, D.; WILLEIT, M.; PRASCHAK-RIEDER, N.; KASPER S. Bright-light therapy in the treatment of mood disorders. **Neuropsychobiology** v. 3, p.152-162, 2011.

PANCRAZIO, J.J.; KAMATCHI, G.L.; ROSCOE, A.K.; LYNCH, C. 3rd. Inhibition of neuronal Na⁺ channels by antidepressants. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics** v. 2841, p. 208-214, 1998.

PHILIPPU, A. *In vivo* neurotransmitter release in the Locus coeruleus – effects of hyperforin, inescapable shock and fear. **Pharmacopsychiatry** v. 34, p. S111-S115, 2001.

PRICA, C.; HASCOET, M.; BOURIN, M. Antidepressant-like effect of lamotrigina is reversed by veratrina: A possible role of sodium channels in bipolar depression. **Behavioral Brain Research** v.191, p. 49-54, 2008.

PRAKRIYA, M.; MENNERICK, S. Selective depression of low-release probability excitatory synapses by sodium channel blockers. **Neuron** v. 26, p. 671-682, 2000.

RAPOPORT, S.I.; BASSELIN, M.; KIM, H.W.; RAO, J.S. Bipolar disorder and mechanisms of action of mood stabilizers. **Brain Research Reviews** v. 61, p.185-209, 2009.

RATES, S.M. Plants as source of drugs. **Toxicicon** v. 39, p. 603-613, 2001.

REHAVI, M.; GOLDIN, M.; ROZ, N.; WEIZMAN, A. Regulation of rat brain vesicular monoamine transporter by chronic treatment with ovarian hormones. **Molecular Brain Research** v. 57, p. 31-37, 1998.

ROSE, A.M.; MELLET, B.J; VALDES Jr, R.;KLEINMAN, J.E.; HERMANN, M.M.; LI, R.; EL-MALLAKH, R.S. Alpha2 isoform of the Na,K-ATPase is reduced in temporal cortex of bipolar individuals. **Biological Psychiatry** v. 44, p. 892-897, 1998.

ROSE, E.M.; KOO, J.C.; ANTFlick, J.E.; AHMED, S.M.; ANGERS, S.; HAMPSON, D.R. Glutamate transporter coupling to Na,K-ATPase. **The Journal of Neuroscience** v. 29, p. 8143-8155, 2009.

ROZ, N.; REHAVI, M. Hyperforin inhibits vesicular uptake of monoamines by dissipating pH gradient across synaptic vesicle membrane. **Life Sciences** v. 73, p. 461-470, 2003.

RUDNICK, G. Bioenergetics of Neurotransmitter Transport. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes** v. 30, p. 173-185, 1998.

SANACORA, G.; TRECANNI, G.; POPOLI, M. Towards a glutamate hypothesis of depression: An emerging frontier of neuropsychopharmacology for mood disorders. **Neuropharmacology** v. 62, p. 63-77, 2012.

SARRIS, J. Clinical depression: an evidence-based integrative complementary medicine treatment model. **Alternative Therapies in Health and Medicine** v. 17, p. 26-37, 2011.

SCHEUER, T.; CATTERALL, W.A. Control of neuronal excitability bay phosphorylation and dephosphorylation of sodium channels.**Biochemical Society Transactions** v. 34, p. 1299-1302, 2006.

SCHILDKRAUT, J.J. The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. **American Journal of Psychiatry** v. 122, p. 509-522, 1965.

SEGOVIA, G.; PORRAS, A.; DEL ARCO, A. MORA, F. Glutamatergic neurotransmission in aging: a critical perspective. **Mechanisms of Ageing and Development**, v.122, 1-29, 2001.

SEN, S.; SANACORA, G. Major depression: emerging therapeutics. **Mount Sinai Journal of Medicine** v. 75, p. 205-225, 2008.

SEO, H.J.; CHIESA A.; LEE, S.J.; PATKAR, A.A.; HAN, C.; MASAND, P.S.; SERRETTI, A.; PAE, C.U. Safety and tolerability of lamotrigine: results from 12 placebo-controlled clinical trials and clinical implications. **Clinical Neuropharmacology** v. 34, p. 39-47, 2011.

SHAW, D.M. Mineral metabolism, mania, and melancholia. **BMJ** v. 2, p. 262-267, 1966.

SHORS, T.J.; SEIB, T.B.; LEVINE, S.; THOMPSON, R.F. Inescapable versus escapable shock modulates long-term potentiation in the rat hippocampus. **Science** v. 244, p. 224-226, 1989.

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

SITGES, M.; CHIU, L.M. ω -Aga IVA selectively inhibits the calcium dependent fraction of the evoked release of [^3H]GABA from synaptosomes. **Neurochemical Research** v. 20, p. 1065-1071, 1995.

SITGES, M.; PEÑA, F.; CHIU, L.M.; GUARNEROS, A. Study on the possible involvement of protein kinases in the modulation of brain presynaptic sodium channels. **Neurochemistry International** v. 32, p. 177-190, 1998.

SITGES, M.; GALINDO, C. Omega-agatoxin-TK is a useful tool to study P-type Ca^+ channel-mediated changes in internal Ca^+ and glutamate release in depolarized brain nerve terminals. **Neurochemistry International** v. 46, p. 53-60, 2005.

SITGES, M.; GUARNEROS, A.; NEKRASSOV, V. Effects of carbamazepine, phenytoin, valproic acid, oxcarbazepine, lamotrigine, topiramate and vinpocetine on the presynaptic Ca^{2+} channel-mediated release of

[³H]glutamate: comparison with the Na⁺ channel-mediated release. **Neuropharmacology** v. 53, p. 854-86, 2007.

SKOLNICK, P.; POPIK, P.; TRULLAS, R. Glutamate-based antidepressants: 20 years on. **Trends in Pharmacological Sciences** v. 30, p. 563-569, 2009.

SKOU, J.C. The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. **Biochimica et Biophysica Acta** v. 23, p. 394-401, 1957.

SKOU, J.C. Enzymatic basis for active transport of Na⁺ and K⁺ across cell membrane. **Physiological Reviews** v. 45, p. 596-617, 1965.

SKOU, J.C. The Na,K-pump. **Methods in Enzimology** v. 156, p. 1-25, 1988.

SKOU, J.C. The identification of the sodium pump. **Bioscience Reports** v. 24, p. 437-51, 2004.

SOUTHAM, E., KIRKBY, D., HIGGINS, G.A., HAGAN, R.M. Lamotrigine inhibits monoamine uptake in vitro and modulates 5-hydroxytryptamine uptake in rats. **European Journal of Pharmacology** v. 358, p. 19-24, 1998.

STUHMER, W.; CONTI, F.; SUZUKI, H.; WANG, X.D.; NODA, M.; YAHAGI, N.; KUBO, H.; NUMA, S. Structural parts involved in activation and inactivation of the sodium channel. **Nature** v. 339, p. 597-603, 1989.

SZAKACS, R.; JANKA, Z.; KALMAN, J. The "blue" side of glutamatergic neurotransmission: NMDA receptor antagonists as possible novel therapeutics for major depression. **Neuropsychopharmacologia Hungarica** v.14, p. 29-40, 2012.

THERIEN, A.G.; BLOSTEIN, R. Mechanisms of sodium pump regulation. **American Journal of Physiology - Cell Physiology** v. 279, p. 541-566, 2000.

THERIEN, A.G.; PU, H.P.; KARLISH, S.J.D.; BLOSTEIN, R. Molecular and functional studies of the gamma subunit of the sodium pump. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes** v. 33, p. 407-14, 2001.

TOLL, L.; HOWARD, B.D. Role of Mg²⁺-ATPase and pH gradient in storage of catecholamines in synaptic vesicles. **Biochemical Journal** v. 17, p. 2517-2523, 1978.

TORREY, E.F.; WEBSTER, M.; KNABLE, M.; JOHNSTON, N.; YOLKEN, R.H. The Stanley Foundation Brain Collection and neuropathology consortium. **Schizophrenia Research** v. 44, p.151-155, 2000.

TREIBER, K.; SINGER, A.; HENKE, B.; MÜLLER, W.E. Hyperforin activates nonselective cation channels (NSCCs). **British Journal of Pharmacology** v. 145, p. 75-83, 2005.

ULBRICHT, W. The effect of veratridine on excitable membranes of nerve and muscle. **Ergeb Physiol** v. 61, p. 18-71, 1969.

VASSILEV, P.M.; SCHEUER, T.; CATTERALL, W.A. Identification of an intracellular peptide segment involved in sodium channel inactivation. **Science** v. 241, p. 1658-1661, 1988.

VIANA, A.F.; REGO J.C.; von POSER, G. L.; FERRAZ, A.F.; HECKLER, A.P.; CONSTANTIN, J; RATES, S.M.K. The antidepressant like effect of *Hypericum caprifoliatum* Cham. & Schltld (Guttiferae) on forced swimming test results from an inhibition of neuronal monoamine uptake. **Neuropharmacology** v. 49, p.1042-1052, 2005.

VIANA, A. F.; REGO, J.; MUNARI, L.; DOURMAP, N.; HECKLER, A.P.; COSTA, T.D.; von POSER, G.L.; CONSTANTIN, J.; RATES, S.M.K. *Hypericum caprifoliatum* (Guttiferae) Cham. &Schltld.: a species native to South Brazil with antidepressant-like activity. **Fundamental & Clinical Pharmacology** v. 20, p. 507-514, 2006.

VIANA, A.F.; RATES, S.M.K.; NAUDIN, B.; JANIN, F.; COSTENTIN, J.; REGO, J.C. Effects of acute or 3-day treatments of *Hypericum caprifoliatum* Cham. & Schlttd. (Guttiferae) extract or of two established antidepressants on basal and stress-induced increase in serum and brain corticosterone levels. **Journal of Psychopharmacology** v. 6, p. 681-690, 2008.

VIDAL, R.; PILAR-CUÉLLAR, F.; dos ANJOS, S.; LINGE, R.; TRECEÑO, B.; VARGAS, V.I.; RODRIGUEZ-GAZTELUMENDI, A.; MOSTANY, R.; CASTRO, E.; DIAZ, A.; VALDIZÁN, E.M.; PAZOS, A. New strategies in the development of antidepressants: towards the modulation of neuroplasticity pathways. **Current Pharmaceutical Design** v. 17, p. 521-533, 2011.

VIOLA, M.S.; RODRÍGUEZ de LORES ARNAIZ, G. Brain Na⁺, K⁺-ATPase isoforms: different hypothalamus and mesencephalon response to acute desipramine treatment. **Life Sciences** v. 81, p. 228-233, 2007.

WANG, G.K.; RUSSEL, C.; WANG, S.Y. State-dependent block of voltage-gated Na⁺ channels by amitriptyline via the local anesthetic receptor and its implication for neuropathic pain. **Pain** v. 110, p. 166-174, 2004.

WANG, S.Y.; CALDERON, J.; KUO WANG, G. Block of neuronal Na⁺ channels by antidepressant duloxetine in a state-dependent manner. **Anesthesiology** v. 113, p. 655-665, 2010.

WANG, X.; YANG, Y.; ZHOU, X.; WU, J.; LI, J.; JIANG X, QU, Q.; OU, C.; LIU, L.; ZHOU, S. Propofol pretreatment increases antidepressant-like effects induced by acute administration of ketamine in rats receiving forced swimming test. **Psychiatry Research** v. 185, p. 248-253, 2011.

WEIDEMANN, H.; SALOMON, N.; AVNIT-SAGIA, T.; WEIDENFELD, J.; ROSEN, H., LICHTSTEIN, D. Diverse effects of stress and additional adrenocorticotrophic hormone on digitalis-like compounds in normal and nude mice. **Journal of Neuroendocrinology** v. 16, p. 458-463, 2004.

WEST, J.W.; PATTON, D.E.; SCHEUER, T.; WANG, Y.; GOLDIN, A.L.; CATTERALL, W.A. A cluster of hydrophobic amino acid residues required for fast Na⁽⁺⁾-channel inactivation. **Proceedings of the National Academy of Sciences** v. 89, p. 10910-10914, 1992.

WONNEMANN, M.; SINGER, A.; SIEBERT, B.; MULLER, W.E. Evaluation of synaptic uptake inhibition of the most relevant constituents of St John's Wort. **Pharmacopsychiatry** v. 34, p. S148-S152, 2001.

WILLNER, P. Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. **Neuropsychobiology** v. 52, p. 90-110, 2005.

XHAARD, H.; BACKSTRÖM, V.; DENESSIOUK, K.; JOHNSON, M.S.; Coordination of Na⁽⁺⁾ by monoamine ligands in dopamine, norepinephrine, and serotonin transporters. **Journal of Chemical Information and Modeling** v. 48, p. 1423-1437, 2008.

XIE, X.; HAGAN, R.M. Cellular and molecular actions of lamotrigine: possible mechanisms of efficacy in bipolar disorder. **Neuropsychobiology** v. 38, p.119–130, 1998.

YAN, L.; WANG, Q.; FU, Q.; YE, Q.; XIAO, H.; WAN, Q. Amitriptyline inhibits currents and decreases the mRNA expression of voltage-gated sodium channels in cultured rat cortical neurons. **Brain Research** v.1336, p. 1-9, 2010.

YANG, Y.C.; KUO, C.C. Inhibition of Na⁽⁺⁾ current by imipramine and related compounds: different binding kinetics as an inactivation stabilizer and as an open channel blocker. **Molecular Pharmacology** v. 625, p.1228-1237, 2002.

YANG, Y.C.; HUANG, C.S.; KUO, C.C. Lidocaine, carbamazepine, and imipramine have partially overlapping binding sites and additive inhibitory effect on neuronal Na⁺ channels. **Anesthesiology** v. 113, p. 160-174, 2010.

YU, S.P. The new face of an old player in pathogenesis and apoptotic/hybrid cell death. **Biochemical Pharmacology** v. 66, p. 1601-1609, 2003.

YU, F.H.; CATTERALL, W.A. The VGL-chanome: a protein superfamily specialized for electrical signaling and ionic homeostasis. **Science SKTE**, re15, 2004.

ZANATTA, L.M.; NASCIMENTO, F.C.; BARROS, S.V.; SILVA, G.R.; ZUGNO, A.I.; NETTO, C.A.; WYSE, A.T. In vivo and in vitro effect of imipramine and fluoxetine on Na⁺,K⁺-ATPase activity in synaptic plasma membranes from the cerebral cortex of rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** v. 34, p. 1265-1269, 2001.

ZARATE, C.Jr.; MACHADO-VEIRA, R.; HENTER, I.; IBRAHIM, L.; DIAZGRANADOS, N.; SALVADORE G. Glutamatergic modulators: the future of treating mood disorders? **Harvard Review of Psychiatry** v. 18, p. 293-303, 2010.

ZONA, C. e AVOLI, M. Effects induced by the antiepileptic drug valproic acid upon the ionic currents recorded in rat neocortical neurons in cell culture. **Experimental Brain Research** v. 81, p. 313–317, 1990.

ANEXOS



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: 18203

Título: Avaliação do efeito de *Hypericum caprifoliatum* Cham. & Schltl (Guttifereae) sobre a neurotransmissão glutamatérgica em roedores.

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

STELA MARIS KUZE RATES - coordenador desde 01/03/2009
Ana Cristina Stein - Aluno de Doutorado desde 01/03/2009
DJEGO RAFAEL HASSE - Aluno de Graduação desde 01/03/2009
FERNANDA BOSSEMEYER CENTURIÃO - Aluno de Doutorado desde 01/03/2009

Equipe Externa:

Cristina Wayne Nogueira - pesquisador desde 01/03/2009
Jean-Claude do Rego - pesquisador desde 01/03/2009

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

