

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

**Estudo da ação do flavonoide hiperosídeo nos modelos de comportamento de doente e do tipo depressivo induzidos pela exposição à natação forçada combinada a administração de LPS em camundongos.**

**SATCHIE SAKAMOTO**

**PORTO ALEGRE, 2015.**



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

**Estudo da ação do flavonoide hiperosídeo nos modelos de comportamento de doente e do tipo depressivo induzidos pela exposição à natação forçada combinada a administração de LPS em camundongos.**

Dissertação apresentada por **Satchie Sakamoto** para obtenção de GRAU DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dr. Stela Maris Kuze Rates

Porto Alegre, 2015.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 30.03.2015, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Alexandre Fuentesfria  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Alice Fialho  
Grupo RPH – setor de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação

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

Membro Suplente  
Profa. Dr. Ana Paula Ravazollo  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

#### CIP - Catalogação na Publicação

Sakamoto, Satchie  
Estudo da ação do flavonoide hiperosídeo nos  
modelos de comportamento de doente e do tipo  
depressivo induzidos pela exposição à natação forçada  
combinada a administração de LPS em camundongos /  
Satchie Sakamoto. -- 2015.  
143 f.

Orientadora: Stela Maris Kuze Rates.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa  
de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto  
Alegre, BR-RS, 2015.

1. Hiperosídeo. 2. Neuroinflamação. 3.  
Comportamento de doente. 4. Antidepressivo. 5. IL-  
10. I. Maris Kuze Rates, Stela, orient. II. Título.

Este trabalho foi desenvolvido nos laboratórios de Psicofarmacologia Experimental, sob supervisão da Prof. Dr. Stela M.K. Rates e no laboratório da Prof. Dr. Andréia Buffon na Faculdade de Farmácia da UFRGS, com apoio financeiro do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - UFRGS e do CNPq (processo 480647/2011-9). A autora recebeu bolsa de estudos do CNPq.



*À minha família que sempre me apoia e acredita em meu potencial.*





## AGRADECIMENTOS

À Professora Stela, por ter me recebido de forma tão generosa em seu grupo de pesquisa. Obrigada por contribuir para o meu crescimento pessoal e por todos os ensinamentos durante esses dois anos, sei que não foi fácil me ver errar, mas aprendi muito com meus erros, acredite.

Às colegas e amigas do lab 505C Andresa Betti, Eveline Stolz, Camila Boque, Milene Borsoi por me receberem carinhosamente, por todo apoio e amizade. Agradeço às bolsistas Caroline Siqueira e Vivian Herzfeldt por todas as conversas e ajuda nos experimentos, não sei o que seria de mim sem vocês! Obrigada Caroline Marangon e Tielle Morais pelo apoio, amizade e longas conversas que tivemos. Um agradecimento especial a Liz Müller, por se dispor a me ajudar durante a reta final do trabalho, obrigada por ter arranjado um tempinho pra mim, pois sei que a Dora exige bastante da tua atenção.

À Professora Andréia Buffon pela ajuda, possibilitando a vinda da representante científica da BD, Flávia Calmon, para me auxiliar nos experimentos com o citômetro de fluxo, e aos seus alunos pelo apoio. Agradeço especialmente ao Leonardo Bodo pela pronta ajuda no citômetro e ter disponibilizado um sábado para isso.

Às minhas amigas para toda vida, Soraia Lunardelli e Kamila Zenki, que embarcaram na mesma aventura chamada mestrado. Obrigada Kami pela incrível disposição em ajudar e ensinar, grande parte do que aprendi aqui, tu me ensinou. Sol, por compartilhar momentos de desabafo e também de ajuda.

A Deus, por ter me dado uma família incrível que me apoia em tudo e desde o início dessa jornada. Ao meu padrinho Marco pelos conselhos e preocupação

durante meus momentos de fraqueza. À minha irmã, Sayuri, por ser uma excelente ouvinte.

Aos meus pais, Toshinobu e Vera, que sempre estão ao meu lado, ouvindo, apoiando, aconselhando, cuidando em todos os momentos, tristes e, principalmente, felizes.

Obrigada a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização desse trabalho e minha chegada até aqui.

*“Não adianta forçar a barra para adaptar a realidade às  
nossas teses, como quem quer encher um copo com mais  
água do que cabe nele. A elegância de uma explicação não  
garante sua eficácia. A necessidade de uma explicação não  
garante sua existência”.*

*Humberto Gessinger*



## RESUMO

**Estudo da ação do flavonoide hiperosídeo nos modelos de comportamento de doente e do tipo depressivo induzidos pela exposição à natação forçada combinada a administração de LPS em camundongos.** A neuroinflamação vem sendo estudada através da administração aguda, central ou periférica, de lipopolissacarídeos bacterianos (LPS) em roedores. A administração de LPS causa uma mudança na resposta imune do animal, aumentando os níveis de citocinas e outras quimiocinas inflamatórias. Essas alterações levam a um estado comportamental do tipo doente, que tende a ser extinto 24 h depois da administração de LPS, momento no qual se pode visualizar o desenvolvimento de um comportamento do tipo deprimido no animal. O hiperosídeo (HYP) é um flavonoide glicosilado, encontrado em diversas espécies vegetais e apresenta efeito do tipo antidepressivo, atividade citoprotetora, antioxidante e anti-inflamatória em roedores. O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito do flavonoide hiperosídeo (HYP) no modelo do comportamento de doente e do tipo deprimido induzidos pela administração de LPS em camundongos e sobre os níveis hipocampais de citocinas (IL-6, TNF, IFN- $\gamma$ , IL-12 e IL-10) e quimiocina MCP-1. O modelo consistiu na exposição dos animais a uma sessão de 5 min de natação forçada (estímulo estressor) com posterior administração de LPS (600  $\mu$ g/kg, i.p.) ou solução salina (10 mL/kg, i.p., SAL, animais controle do modelo). O comportamento de doente foi avaliado em campo aberto, através da medida do número de cruzamentos e *score* de sintomas, 06 e 24 h após a administração de LPS. O comportamento do tipo deprimido foi avaliado pela medida da imobilidade no teste de suspensão pela cauda (TSC) 24 h após a administração de LPS. Os tratamentos imipramina (IMI, 20 mg/kg), HYP (20 mg/kg) ou solução salina 10 mL/kg (grupo controle do tratamento) foram administrados (i.p.) 30 min antes (protocolo profilático) ou 5 h e 30 min depois (protocolo terapêutico) da administração de LPS ou SAL. Os níveis hipocampais de citocinas foram medidas por citometria de fluxo nos animais eutanasiados uma hora após o TSC. A administração profilática de HYP aumentou

os níveis de todas as citocinas tanto no grupo LPS quanto no grupo SAL. A análise da correlação citocinas pró-/anti-inflamatórias demonstrou que o tratamento profilático HYP resultou em uma correlação positiva IL-6/IL10 e TNF/IL-10 tanto nos animais SAL quanto LPS. A administração terapêutica de HYP aumentou somente os níveis de IL-10 e resultou em uma correlação IL-6/IL-10 positiva apenas no grupo SAL. Nos animais do grupo LPS, o tratamento terapêutico HYP aumentou os níveis de MCP-1 e resultou numa correlação positiva TNF/IL-10. O tratamento profilático HYP preveniu parcialmente o desenvolvimento do comportamento de doente, diminuindo o *score* de sintomas e o comportamento do tipo deprimido no grupo LPS. O tratamento terapêutico HYP preveniu o desenvolvimento do comportamento do tipo deprimido apenas no grupo SAL. A administração profilática de IMI nos animais SAL não alterou os níveis de IL-6, IL-10 e TNF, mas resultou em correlações IL-6/IL-10 e TNF/IL-10 positivas. Nos animais que receberam LPS, a administração profilática de IMI somente diminuiu os níveis de IL-6 e TNF, sem apresentar nenhuma correlação entre os níveis de citocinas. A administração terapêutica de IMI não alterou os níveis de nenhuma citocina, porém resultou em uma correlação TNF/IL-10 positiva. O tratamento profilático IMI preveniu tanto o desenvolvimento do comportamento de doente como do tipo deprimido. O tratamento terapêutico com IMI não reverteu os prejuízos induzidos pela administração de LPS, nem no comportamento de doente nem no do tipo deprimido. Em conclusão, os dados deste trabalho confirmam o efeito do tipo antidepressivo de hiperosídeo em camundongos e demonstram que o tratamento profilático com HYP tem efeito protetor parcial contra a manifestação dos sintomas de doente e comportamento do tipo deprimido induzidos pela natação forçada e administração de LPS. A ação do HYP pode estar relacionada ao aumento dos níveis hipocâmpais da citocina antiinflamatória IL-10.

**Palavras chave:** hiperosídeo, inflamação, neuroinflamação, comportamento de doente, antidepressivo, interleucina 10, IL-10, citocinas.

## ABSTRACT

**Effect of the flavonoid hyperoside on sickness and depressive-like behaviors induced by forced swimming exposure associated with LPS administration in mice.** The neuroinflammation has been studied through acute, central or peripheral administration of bacterial lipopolysaccharides (LPS) in rodents. LPS alters the animal immune response increasing the cytokines and others inflammatory chemokines levels. These alterations generate a group of symptoms and behavioral changes known as sickness behavior, which tends to be extinct 24 h after LPS administration when the animals develop a depressive-like behavior. Hyperoside (HYP) is a glycosylated flavonoid that present antidepressant, cytoprotective, antioxidant and anti-inflammatory properties in rodents. The aim of this study was to evaluate the HYP effects on sickness and depressive-like behaviors induced by LPS administration in mice as well as to investigate its effect on hippocampal cytokines (IL-6, TNF, IFN- $\gamma$ , IL-12 e IL-10) and chemokine MCP-1 levels. The model consisted of a 5 min forced swimming session (stressor stimuli) with posterior LPS (600  $\mu$ g/kg, i.p.) or saline (10 ml/kg, i.p., SAL) administration. The sickness behavior was assessed in the open field test by measuring the number of crossings and by scoring symptoms, 06 and 24 h after LPS administration. The depressive-like behavior was evaluated by measuring the immobility time in the tail suspension test (TST) 24 h after LPS administration. The treatments imipramine (IMI, 20 mg/kg), HYP (20 mg/kg) or saline 10 mL/kg (treatment control group) were administered (i.p.) 30 min before (prophylactic protocol) or 5 h and 30 min after (therapeutic protocol) LPS or saline (SAL - experiment control) administration. The cytokines levels were measured by flow cytometry in animals euthanized by decapitation 1 h after TST. The prophylactic administration of HYP increased all cytokines in both LPS and SAL groups, and resulted in an IL-6/IL-10 and a TNF/IL-10 positive correlation in both SAL and LPS animals. The therapeutic administration of HYP increased IL-10 levels, with an IL-6/IL10 positive correlation in SAL group only. In LPS animal group, the therapeutic

administration of HYP increased the MCP-1 levels and resulted in a TNF/IL-10 positive correlation. The prophylactic HYP did not prevent the reduction on spontaneous locomotion induced by LPS but decreased the symptoms score in LPS group and the depressive-like behavior in both LPS and SAL groups. The therapeutic HYP did not revert the sickness behavior and prevented the depressive-like behavior only in SAL group. The prophylactic IMI decreased IL-6 and TNF without any correlation between cytokines levels in animals that received LPS. In SAL animals, the prophylactic administration of IMI did not alter the cytokines levels but resulted in an IL-6/IL-10 and TNF/IL-10 positive correlations. The therapeutic IMI did not alter any cytokine levels, but resulted in a positive TNF/IL-10 correlation. The prophylactic IMI prevented both sickness and depressive-like behavior in LPS and SAL groups. The therapeutic IMI did not revert any LPS impairment. In conclusion, this study confirmed the antidepressant-like effect of hyperoside in mice and demonstrated that prophylactic treatment with this flavonoid partially protect the animals against sickness and depressive-like behaviors induced by LPS combined with forced swimming stress. Ability of HYP to increase the anti-inflammatory cytokine IL-10 hippocampal levels may underlies its effects on this model.

**Keywords:** hyperoside, inflammation, neuroinflammation, sickness behavior, antidepressive-like, interleukin 10, IL-10, cytokines.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Diferentes vias de atuação das citocinas pró-inflamatórias no sistema nervoso central para o desenvolvimento do comportamento do tipo depressivo.. 42
- Figura 2.** Estrutura molecular do hiperosídeo.....47
- Figura 3.** Efeito de hiperosídeo e de imipramina administrados 30 minutos antes da indução do evento inflamatório sobre o comportamento de doente e do tipo deprimido em camundongos CF1 machos causados pela exposição à natação forçada seguida da administração de LPS ou SAL.....73
- Figura 4.** Efeito de hiperosídeo e de imipramina administrados 5 horas e 30 minutos depois da indução do evento inflamatório, sobre o comportamento de doente e do tipo deprimido em camundongos CF1 machos, causados pela exposição à natação forçada seguida da administração de LPS ou SAL.....75
- Figura 5.** Efeito de hiperosídeo e de imipramina administrados 30 minutos antes da indução do evento inflamatório, sobre os níveis de citocinas inflamatórias em hipocampo de camundongos CF1 causados pela exposição à natação forçada seguida da administração de LPS ou SAL.....78
- Figura 6.** Gráficos de correlação positiva entre as citocinas IL-6/IL-10 e TNF/IL10 quando os tratamentos são administrados seguindo o protocolo profilático..80
- Figura 7.** Efeito de hiperosídeo e de imipramina administrados 5 horas e 30 minutos depois da indução do evento inflamatório, sobre os níveis de citocinas inflamatórias em hipocampo de camundongos CF1 causados pela exposição a natação forçada seguida da administração de LPS ou SAL.....83
- Figura 8.** Gráficos de correlação positiva entre as citocinas IL-6/IL-10 e TNF/IL10 quando os tratamentos são administrados seguindo o protocolo terapêutico .....85
- Figura 9.** Comparação entre os níveis de MCP-1 entre os grupos LPS do protocolo profilático e terapêutico.....87



## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Principais funções das citocinas inflamatórias durante a resposta imune .....37
- Tabela 2.** Resultados da análise de correlação (Correlação de Pearson) entre IL-6/IL-10 e TNF/IL-10 quando os tratamentos são administrados seguindo o protocolo profilático.....79
- Tabela 3.** Resultados da análise de relação (*ratio*) entre IL-10/IL6 e IL-10/TNF quando os tratamentos são administrados seguindo o protocolo profilático. ....81
- Tabela 4.** Resultados da análise de correlação (Correlação de Pearson) entre IL-6/IL-10 e TNF/IL-10 quando os tratamentos são administrados seguindo o protocolo profilático.....84
- Tabela 5.** Resultados da análise da relação (*ratio*) entre IL-10/IL-6 e IL-10/TNF quando os tratamentos são administrados seguindo o protocolo terapêutico. ....86



## LISTA DE ESQUEMAS

- Esquema 1.** Esquema dos protocolos de administração dos tratamentos imipramina e hiperosídeo, indução do evento inflamatório e de avaliação comportamental utilizado nesse trabalho.....64
- Esquema 2.** Esquema de diluição seriada da curva padrão de *beads* de captura fornecidos no kit *CBA Mouse Inflammation*<sup>®</sup> (BD Bioscience).....66



## ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH – hormônio adrenocorticotrópico

AMPc – adenosina monofosfato cíclico

BDNF – fator neurotrófico derivado do cérebro (do inglês *Brain Derived Neurotrophic Factor*)

Ca<sup>2+</sup> – íon cálcio

Células NK – células *natural killers*

Células Th – células T auxiliares (do inglês *T helper*)

CK – creatina quinase

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

COX-2 – ciclo-oxigenase 2

CREB – proteína ligante do elemento de resposta ao AMPc

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – peróxido de hidrogênio

HMGB1 – *high mobility group box 1*

HPA – hipotalâmico-pituitário-adrenal

HYP – hiperosídeo

i.c.v. – intra cérebro ventricular

i.p. – intraperitoneal

IDO – indolamina 2,3 - dioxigenase

IFN-γ – interferon gama

IgG – imunoglobulina G

IL – interleucina (do inglês *interleukin*)

IMI – imipramina

LDH – lactatodesidrogenase

LPS – lipopolissacarídeo (do inglês *Lipopolysaccharide*)

MCP-1 – proteína quimiotática de monócitos-1 (do inglês *Monocyte Chemoattract Protein-1*)

MHC-II – Moléculas de Histocompatibilidade Classe II

mRNA – ácido ribonucleico mensageiro (do inglês messenger Ribonucleic Acid)

NaCl – cloreto de sódio

NF- $\kappa$ b – fator nuclear  $\kappa$ b (do inglês *nuclear factor  $\kappa$  b*)

PBS – Solução tampão fosfato (do inglês *phosphate buffer solution*)

PGE<sub>2</sub> – prostaglandina E<sub>2</sub>

PMACI – *phorbol myristate acetate plus calcium ionophore A23187*

PPGCF – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

SAL – solução salina (NaCl 0,9%)

SB – comportamento de doente (do inglês *Sickness Behavior*)

SNC – sistema nervoso central

TNF- $\alpha$  – fator de necrose tumoral alfa (do inglês *Tumor Necrosis Factor alpha*)

TPA – *12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate*

TSC – Teste de Suspensão pela Cauda

UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

WHO – *World Health Organization*

$\beta$ -A – receptores  $\beta$ -adrenérgicos



## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	25
2 OBJETIVOS .....	31
2.1 Objetivo Geral .....	33
2.2 Objetivos Específicos .....	33
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	35
3.1 Citocinas e neuroinflamação na depressão.....	36
3.2 Hiperosídeo.....	46
3.2.1 Farmacocinética do HYP .....	47
3.2.2 Atividade Anti-inflamatória .....	49
3.2.3 Atividade do tipo antidepressiva.....	50
3.2.4 Atividade antioxidante, citoprotetora e antiapoptótica .....	52
3.2.5 Outras atividades .....	55
4 MATERIAIS E MÉTODOS .....	59
4.1 Animais.....	61
4.2 Indução dos comportamentos de doente e do tipo depressivo .....	61
4.3 Tratamentos .....	62
4.4 Avaliação Comportamental .....	62
4.4.1 Avaliação do efeito sobre o comportamento de doente .....	62
4.4.2 Avaliação do efeito do tipo antidepressivo no teste da suspensão pela cauda.....	63
4.5 Experimentos <i>ex-vivo</i> .....	64
4.5.1 Coleta dos tecidos cerebrais .....	64
4.5.2 Quantificação de citocinas pró e anti-inflamatórias.....	65

4.6 Análise Estatística .....	66
4.7 Ética e Biossegurança .....	67
5 RESULTADOS .....	69
5.1 Avaliação comportamental.....	71
5.1.1 Protocolo Profilático .....	71
5.1.2 Protocolo Terapêutico.....	74
5.2 Quantificação de citocinas pró e anti-inflamatórias.....	76
5.2.1 Protocolo Profilático .....	76
5.2.2 Protocolo Terapêutico.....	82
5.3 Comparação entre os níveis de MCP-1 nos dois protocolos.....	86
5.4 Relação entre o tempo de imobilidade e os níveis de IL-10 .....	87
6 DISCUSSÃO .....	89
7 CONCLUSÕES .....	99
8 REFERÊNCIAS .....	103
9 ANEXOS .....	141

## **1 INTRODUÇÃO**

---



A depressão é o transtorno psicológico mais comum, afetando cerca de 350 milhões de pessoas mundialmente, na sua maioria mulheres. Vem sendo relatada como umas das doenças mais incapacitantes e algumas estimativas indicam que, em 2030, a depressão pode ser a segunda causa de incapacidade funcional e social (WHO, 2013).

O indivíduo diagnosticado deprimido normalmente relata sentimento de tristeza, vazio, desesperança e inutilidade, falta de concentração e interesse, culpa excessiva, mudança de apetite com perda ou ganho de peso, agitação, distúrbios do sono como vontade de dormir o dia todo ou insônia, fadiga, perda de energia e falta de vontade de pensar ou decidir (DSM-5, 2013; Bentley et al., 2014). Dependendo da intensidade, quantidade e frequência do surgimento dos sintomas e do grau de incapacidade funcional do indivíduo, a depressão pode ser classificada de diferentes maneiras, sendo a depressão severa a forma mais comum de manifestação desse transtorno psicológico (DSM-5).

A neurobiologia da depressão ainda não está muito bem estabelecida, no entanto a teoria monoaminérgica é a mais difundida. Essa teoria é relacionada com a deficiência total ou parcial de monoaminas (dopamina, noradrenalina e serotonina) na fenda sináptica (Nutt, 2008; Stahl, 2008; Willner et al., 2013). No entanto, novos dados na literatura indicam que a etiologia da depressão também está relacionada com outras teorias, como a hipótese neurotrófica, na qual ocorre a diminuição da síntese proteica do fator neurotrófico BDNF, fator importante para a manutenção e a sobrevivência de neurônios, integridade e plasticidade sináptica (Lee e Kim, 2010; Yu e Chen, 2011; Archer et al., 2013; Dwivedi, 2013; Li et al., 2013). Também é relatada a participação do sistema glutamatérgico (Hashimoto, 2011; Sanacora et al., 2012) e a ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (Graeff e Guimarães, 2012; Lee e Kim, 2011; Murri et al., 2014) no desenvolvimento dos sintomas depressivos.

Outros estudos mostram que o aumento de citocinas pró-inflamatórias, principalmente interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), no cérebro podem estar relacionadas com o desenvolvimento da depressão, uma vez que o tratamento com alguns tipos de antidepressivos podem reduzir os níveis dessas interleucinas (Dantzer et al., 2008; Howren et al., 2009; Maes, 2011; Baune et al., 2012; Rizzo et al., 2012; Stepanichev et al., 2014).

Os antidepressivos são efetivos no tratamento da depressão moderada a severa, não sendo medicamentos de primeira escolha na depressão leve (Marcus et al., 2012). Existem diferentes classes de antidepressivos, desde inibidores da monoamino oxidase, antidepressivos tricíclicos até inibidores seletivos da recaptação de serotonina e/ou noradrenalina (Stahl, 2008), sendo fluoxetina, imipramina, amitriptilina, trazodona e bupropiona exemplos de antidepressivos que atuam por alguma dessas vias (Aguilar et al., 2011).

A depressão também pode ser tratada com o uso de algumas plantas, como o *Hypericum perforatum*, pertencente ao gênero *Hypericum* (Guttiferae) - popularmente conhecida como *St. John's Wort* - é amplamente utilizada como antidepressivo na Europa - e seu uso vêm aumentando significativamente nos Estados Unidos (Larzelere et al., 2010) e na Alemanha, onde é utilizada no tratamento da depressão leve desde a década de 1980 (Nahas e Sheikh, 2011). Além disso, outros estudos clínicos demonstram que extratos de *H. perforatum* apresentam atividade antidepressiva no tratamento da depressão leve a moderada (Behnke et al., 2002; Szegedi et al., 2005; Kasper et al., 2010).

Algumas classes de metabólitos secundários identificadas nos extratos de *H. perforatum*, como naftodiantronas, derivados de floroglucinol, xantonas e flavonóis glicosilados – como quercetina, rutina, isoquercitrina, quercitrina e hiperosídeo vêm apresentando atividade no sistema nervoso central, como atividade do tipo antidepressiva e antinociceptiva (Giorgetti et al., 2007; Crockett

and Robinson, 2011). Extratos e substâncias isoladas de espécies de *Hypericum* nativas do Rio Grande do Sul também apresentam atividades do tipo antidepressiva e antinociceptiva (Viana et al., 2003; Viana et al., 2005; Haas et al., 2010; Stein et al., 2012; Stolz et al., 2012; Stolz et al., 2014).

Outras plantas contendo flavonoides vêm sendo utilizadas e investigadas quanto à atividade antidepressiva. Em 2013, Zheng e colaboradores testaram um extrato de folhas de *Apocynum venetum* rico em flavonoides, em diferentes modelos de depressão, além de caracterizarem a presença dos neurotransmissores monoaminérgicos no cérebro de camundongos. O grupo verificou que a administração do extrato reduziu significativamente o tempo de imobilidade dos animais nos testes de natação forçada e de suspensão da cauda, além de aumentar a concentração dos neurotransmissores serotonina e noradrenalina no hipocampo desses animais. Também identificaram uma possível interação com receptores dopaminérgicos, já que o efeito do extrato foi prevenido tanto pelo pré-tratamento com sulpirida quanto com SCH23390, antagonistas de receptores dopaminérgicos do tipo D<sub>2</sub> e D<sub>1</sub>, respectivamente.

Flavonoides isolados como quercetina, hiperosídeo e canferol, também apresentam atividade do tipo antidepressiva. Em 2000, Butterweck e colaboradores testaram frações ricas em flavonoides, principalmente hiperosídeo, de *H. perforatum* no teste de natação forçada. O grupo mostrou que hiperosídeo e outros flavonoides isolados também tiveram efeito antidepressivo avaliado no teste de natação forçada, no entanto o hiperosídeo não parece ser o único flavonoide responsável por essa ação, já que o seu efeito não foi superior ao verificado com as frações ricas em flavonoides.

Haas e colaboradores (2011) testaram um possível efeito do tipo antidepressivo do flavonoide hiperosídeo (HYP) isolado de *H. caprifoliatum* em roedores no teste de natação forçada. Verificaram que tanto em ratos como em camundongos o HYP apresentou uma atividade do tipo antidepressiva, uma vez

que diminui o tempo de imobilidade dos animais sem estimular a locomoção no teste de campo aberto. Além disso, o grupo demonstrou que o efeito do tipo antidepressivo apresentado por esse flavonoide foi prevenido pelo pré-tratamento com sulpirida, antagonista dopaminérgico de receptores do tipo D<sub>2</sub>. Esse resultado indica que a ativação de receptores do tipo D<sub>2</sub> estão envolvidos no efeito anti-imobilidade do flavonoide HYP.

Também em 2011, Sah e colaboradores testaram o efeito do tipo antidepressivo do flavonoide quercetina frente ao comportamento de doente (*sickness behavior*), que se caracteriza por redução da atividade locomotora, além do desenvolvimento de sintomas do tipo depressivos no animal. Após a indução do comportamento de doente com a administração de lipopolisacarídeo (LPS) de bactéria gram-negativa em ratos, a administração de diferentes doses de quercetina intraperitonalmente e reduziu levemente a indução do comportamento de doente pelo LPS, sugerindo a ação do tipo antidepressiva da quercetina.

Analisados em conjunto, esses dados de literatura apontam para um possível efeito antidepressivo do hiperosídeo. No entanto, não foram encontrados estudos em animais relacionando o efeito antidepressivo do hiperosídeo e de marcadores imunológicos de neuroinflamação.



## **2 OBJETIVOS**

---



## **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar o efeito do flavonoide hiperosídeo no modelo do comportamento de doente e do tipo depressivo em camundongos, bem como seus efeitos nos níveis hipocampais de citocinas inflamatórias.

## **2.2 Objetivos Específicos**

Avaliar o efeito do flavonoide hiperosídeo em camundongos CF1 no modelo comportamental de doente;

Avaliar o efeito do flavonoide hiperosídeo em camundongos CF1 no modelo no teste de suspensão pela cauda;

Avaliar o efeito do flavonoide hiperosídeo nos níveis de citocinas pró-inflamatórias TNF, INF- $\gamma$ , IL-6, MCP-1 e anti-inflamatórias IL-10 e IL-12 no hipocampo de camundongos.



### **3 REVISÃO DE LITERATURA**

---



### 3.1 Citocinas e neuroinflamação na depressão

As citocinas são um conjunto de proteínas regulatórias secretadas pelas células do corpo, principalmente do sistema imunológico, em resposta a diferentes estímulos, regulando a resposta imune, o processo inflamatório e a hematopoese (Dunn et al., 2006; Kindt et al., 2008; Yadav et al., 2010). A secreção das citocinas é rápida e autolimitada e pode influenciar a síntese e a ação de outras citocinas (Abbas, 2012; Rang and Dale, 2012).

Dentro do grupo das citocinas estão as interleucinas, que são secretadas por leucócitos e tem sua ação voltada a ativação e regulação da atividade de outros leucócitos (Kindt, 2008; Rang and Dale, 2012). Algumas das interleucinas são responsáveis pela resposta inflamatória e são secretadas por células responsáveis pela resposta imune inata, dentre elas estão a interleucina (IL)-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-12, fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$  e interferon (IFN)- $\gamma$ . Na tabela 1 estão resumidas algumas atividades dessas interleucinas.

**Tabela 1:** Principais funções das citocinas inflamatórias durante a resposta imune

Interleucina	Células produtoras	Funções
IL-1 $\beta$	Fagócitos mononucleares ativados, neutrófilos	Induz a febre e a síntese de proteínas de fase aguda, aumenta a permeabilidade vascular e o número de moléculas de adesão, induz a proliferação de fibroblastos e plaquetas, induz a liberação de quimiocinas e IL-6, ativa células T.
IL-6	Fagócitos mononucleares, fibroblastos, células endoteliais vasculares	Síntese de proteínas de fase aguda, produção de plaquetas, induz a febre, aumenta a permeabilidade vascular, ativa células T e B com síntese de imunoglobulinas.
IL-10	Macrófagos, Linfócitos Th2 e Células dendríticas	Regula a produção de IL-12 e TNF- $\alpha$ pelos macrófagos, inibe a expressão de moléculas de MHC-II nos macrófagos, suprime a produção de metabólitos microbicidas e de mediadores inflamatórios

IL-12	Macrófagos e células dendríticas	Estimula a produção de IFN- $\gamma$ pelos linfócitos Th1 e células NK, amplifica a atividade citolítica das células NK e dos linfócitos T citotóxicos
TNF- $\alpha$	Macrófagos e Linfócitos T	Pirogênico, síntese de proteínas de fase aguda, aumenta a permeabilidade vascular, induz a produção de moléculas de adesão, induz a liberação de quimiocinas e IL-6, ativa células T.
IFN- $\gamma$	Células NK e Linfócitos Th1	Regulação de fagócitos mononucleares, maturação ou inibição do desenvolvimento de células Th, estimula a produção de IgG; aumenta a atividade microbicida das células fagocitárias, estimula a produção de IL-12.

Th = *T helper* (T auxiliares); Células NK = células *natural killers*; MHC-II = moléculas de histocompatibilidade classe II; IgG = imunoglobulina G  
Referências: Kindt et al., 2008; Abbas, 2012.

Também existem quimiocinas, grupo de citocinas que influenciam a quimiotaxia e controlam o recrutamento das células do sistema imune no organismo para dentro dos tecidos (Kindt, 2008; Yadav et al., 2010; Conductier et al., 2010; Young et al., 2014). Durante a resposta inflamatória aguda, uma das quimiocinas secretadas é a proteína quimioatrativa de monócitos (MCP)-1, responsável pelo recrutamento dos neutrófilos, monócitos e linfócitos circulantes para o tecido (Abbas, 2012; Young et al., 2014). A MCP-1 é produzida em decorrência da presença de citocinas pró-inflamatórias por diferentes células como astrócitos, fibroblastos, microglia, macrófagos (Yadav et al., 2010; Abbas, 2012).

Uma vez que a produção de interleucinas pró-inflamatórias é estimulada por alguma infecção ou injúria tecidual, elas possuem a capacidade de agir sistemicamente, podendo atuar no sistema nervoso central (SNC) (Dantzer et al., 2008; Abbas, 2012). As citocinas podem atingir o SNC por diferentes formas: através de vias neurais aferentes pelo nervo vago, através da captação das citocinas periféricas por transportadores na barreira hematoencefálica, passando por regiões circumventriculares ou ativando macrófagos na vasculatura cerebral que produzem citocinas no cérebro (Felger e Lotrich, 2013; McCusker e Kelley, 2013). No



cérebro, as citocinas pró-inflamatórias atuam no hipotálamo, induzindo a febre, mas também podem iniciar uma resposta inflamatória, caracterizando uma neuroinflamação (Lenczowski et al., 1999; Dantzer et al., 2008; McCusker e Kelley, 2013).

A neuroinflamação vem sendo amplamente estudada através da administração aguda, central ou periférica, de lipopolissacarídeos bacterianos (LPS) em roedores, a qual causa uma mudança significativa na resposta imune do animal, aumentando os níveis de citocinas e outras quimiocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , MCP-1 (Dantzer et al., 2008; Viana et al., 2010; Rizzo et al., 2012; Cazareth et al., 2014). Essa alteração nos níveis de citocinas é capaz de desenvolver no animal um estado comportamental do tipo doente, também conhecido como *sickness behavior* (SB), que tende a ser extinto 24 h depois da administração de LPS (Danzer et al., 2008).

Durante o SB, os animais se apresentam letárgicos, com ptose, piloereção, ocorre uma diminuição na interação social, na ingestão de alimentos, febre e alguns sintomas semelhantes à depressão (Gibb et al., 2009; Dantzer et al., 2008; Maes et al., 2012a). Os sintomas começam a se manifestar depois de 2 h da administração de LPS e atingem a intensidade máxima após 6 h (Dantzer et al., 2008).

Huang e colaboradores (2008) mostraram que após a administração intracerebroventricular (i.c.v.) de LPS em camundongos, os animais apresentam uma redução na atividade locomotora, na interação social e na ingestão de alimentos, indicando a manifestação do SB e que ocorre um aumento significativo nos níveis de expressão gênica das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ , tanto no hipocampo quanto no cerebelo desses animais.

Lawson e colaboradores (2013) administraram LPS em camundongos *knockout* para a enzima conversora de IL-1 $\beta$  e em animais normais, tanto por i.c.v. quanto pela via sistêmica. Os autores encontraram que, nas duas formas de

administração de LPS, os níveis de expressão gênica cerebral de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  estão aumentados 4 h depois da administração, indicando o desenvolvimento do SB. Quando esses marcadores pró-inflamatórios foram quantificados 24 h depois, somente a administração de LPS pela via sistêmica mantém os níveis de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  elevados nas duas linhagens de animais, no entanto somente os animais *knockout* voltam a ter a atividade locomotora normal, demonstrando que a enzima conversora de IL-1 $\beta$  é importante para a persistência da manifestação dos sintomas do SB.

Noh e colaboradores (2014) verificaram que a expressão do mRNA de IL-1 $\beta$  aumenta no córtex pré-frontal, córtex parietal, hipocampo e estriado após a administração sistêmica aguda de LPS em camundongos, indicando a indução da neuroinflamação em diferentes regiões cerebrais. Já Biesmans e colaboradores (2013) realizaram uma curva dose-resposta de LPS e demonstraram que 2 h após a administração sistêmica de LPS em camundongos apresentaram a atividade locomotora reduzida, sendo mantida após 6 h e que os níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e MCP-1 estão aumentados tanto no soro quanto no cérebro dos animais.

Diferentes estudos têm demonstrado que as alterações imunológicas que o animal sofre pela administração de LPS acarretam em distúrbios neurológicos semelhantes a doença de Alzheimer, esquizofrenia e depressão (Deng et al, 2014; Zhu et al., 2014a; Müller, 2013; Dantzer et al., 2008; Viana et al., 2010; Maes et al., 2012a).

Os sintomas do tipo depressivo, como o desenvolvimento de anedonia, são consequentes ao aumento nos níveis de citocinas pró-inflamatórias, principalmente IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ , que ocorrem de forma exagerada ou por muito tempo, como uma forma de má adaptação à condição de doente (Dantzer et al., 2008).

Esse comportamento do tipo depressivo, normalmente aparece 24 h depois da administração de LPS, quando a atividade locomotora dos animais retorna ao

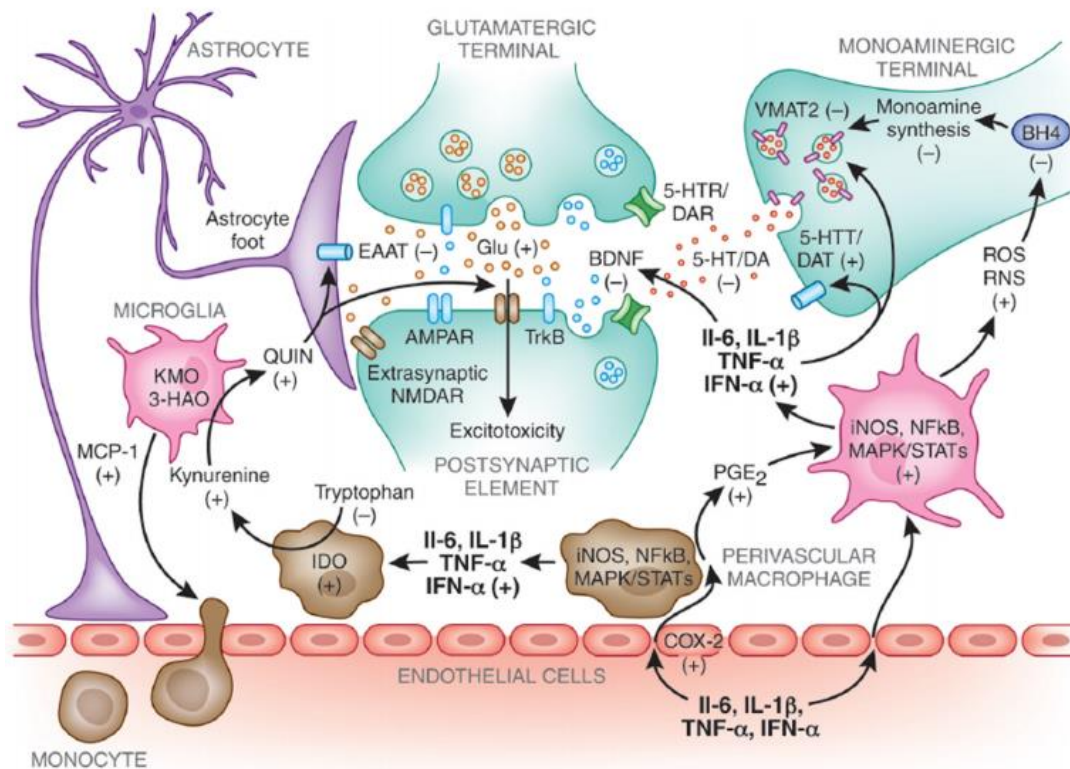
normal e o SB é resolvido (Dantzer et al., 2008; Viana et al., 2010). Mesmo com a resolução do comportamento de doente, os níveis de citocinas pró-inflamatórias permanecem elevados, indicando que a neuroinflamação faz parte do desenvolvimento da depressão (Biesmans et al., 2013; Viana et al., 2010)

Assim como a elevação nos níveis séricos ou centrais das citocinas pró-inflamatórias induzidas por LPS, a administração direta dessas citocinas também causa um comportamento do tipo depressivo nos animais. Rizzo e colaboradores (2012) verificaram que a administração i.c.v. de IL-6 recombinante em roedores é capaz de induzir um comportamento do tipo depressivo, aumentando a imobilidade dos animais nos testes de suspensão pela cauda e de natação forçada, sem induzir os sintomas do SB, o que não acontece quando é administrado IL-1 $\beta$ . Ainda, o grupo demonstrou que a administração de IL-6 não aumenta os níveis centrais de IL-1 $\beta$  e a coadministração de anticorpo anti-IL-6 e do antidepressivo fluoxetina impediram o aumento da imobilidade causada pelo IL-6.

Kaster e colaboradores (2012) investigaram a influência do TNF- $\alpha$  no comportamento do tipo depressivo em camundongos nos testes de natação forçada, suspensão pela cauda e preferência pela ingestão de sacarose. Nesse estudo, observou-se que a administração de diferentes doses pela via i.c.v. de TNF- $\alpha$  causou uma resposta do tipo depressiva dos animais, que foi revertida com a administração de antidepressivos como fluoxetina, imipramina e desipramina, além do anticorpo anti-TNF- $\alpha$ . Assim, a administração aguda de TNF- $\alpha$  pode ser uma nova forma de estudar a influência dos componentes inflamatórios na fisiopatologia da depressão.

As citocinas pró-inflamatórias atuam de diferentes maneiras no sistema nervoso central para o desenvolvimento do comportamento do tipo deprimido (Figura 1). Elas são capazes de recrutar células da imunidade adaptativa, ativar o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal, antagonizar a atividade de algumas neurotrofinas, de interagir diretamente com os neurotransmissores

monoaminérgicos e de ativar a enzima indolamina 2,3-dioxigenase (IDO), que degrada o triptofano em metabólitos de quinurenina, reduzindo a disponibilidade desses precursor para a síntese de serotonina, levando a um desvio na sua rota sintética (Dunn, 2006; O'Connor et al., 2009a; Dowlati et al., 2010; Dantzer et al., 2011; Maes, 2011; Felger e Lotrich, 2013; Quak et al., 2014; Graeff e Guimarães, 2012).



**Figura 1:** Diferentes vias de atuação das citocinas pró-inflamatórias no sistema nervoso central para o desenvolvimento do comportamento do tipo depressivo. Adaptado de Felger e Lotrich, 2013.

Diferentes trabalhos científicos realizados *in vitro* e *in vivo* tem mostrado que os antidepressivos diminuem os níveis de citocinas pró-inflamatórias, tendem a aumentar as citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10, e alguns desses fármacos, como a fluoxetina, exercem uma neuroproteção contra a ação das citocinas (Tynan

et al., 2012; Zhang et al., 2012; Taraz et al., 2013; Leonard, 2014; Graeff e Guimarães, 2012). Assim como a fluoxetina, a imipramina, um antidepressivo tricíclico largamente utilizado na clínica, apresenta atividade anti-inflamatória, sendo capaz de prevenir a indução do SB e o comportamento do tipo depressivo causado pela administração de LPS, modulando a resposta imune, resultando em neuroproteção (Liu et al., 2011a; Peng et al., 2008; Viana et al., 2010; Réus et al., 2013). Além disso, a administração crônica de desipramina em ratos aumenta os níveis de IL-10, exercendo um efeito anti-inflamatório (Wrona et al., 2013)

Viana e colaboradores (2010) demonstraram que a combinação de uma sessão de natação forçada com a administração sistêmica de LPS induz o desenvolvimento do comportamento de doente, reduzindo a atividade locomotora de camundongos 6 horas depois da administração de LPS, aumentando o tempo de imobilidade no teste de suspensão pela cauda 24 horas depois da administração de LPS, indicando o desenvolvimento de um comportamento do tipo depressivo. Além disso, ocorre um aumento nos níveis séricos, no fluido cérebro espinhal e no cérebro de TNF- $\alpha$ . Ainda, o grupo demonstrou que a imipramina e antagonistas de receptores quinina- $\beta_1$  reduzem o aumento do tempo de imobilidade causada pela sessão de natação junto com a administração de LPS.

Alguns estudos clínicos mostram também que pacientes diagnosticados com depressão grave possuem os níveis séricos de IL-6, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  elevados e que o tratamento com alguns tipos de antidepressivos é capaz de reduzir os níveis dessas interleucinas (Howren et al., 2009; Baune et al., 2012; Hiles et al., 2012a; Walker, 2013).

Dhabhar e colaboradores (2009) verificaram que, comparado com um grupo controle de pacientes saudáveis, pacientes deprimidos não tratados possuem uma redução nos níveis séricos da interleucina anti-inflamatória IL-10 e essa redução também está relacionada com o grau de sintomas apresentado por eles. Além disso, o grupo verificou que, correlacionando-se os níveis de IL-6 e IL-10, o grupo

controle saudável possui uma forte correlação positiva, que é perdida, chegando quase a uma correlação nula nos pacientes deprimidos. A partir desses resultados o grupo sugere que a redução da ação e/ou da indução da produção de IL-10, pode contribuir para o desenvolvimento da depressão, assim como facilitar os efeitos da elevação nos níveis de citocinas pró-inflamatórias.

Hiles e colaboradores (2012a) mostraram que pacientes deprimidos apresentaram altos níveis de IL-6 em comparação com um grupo não-deprimido. Em outro trabalho, Hiles e colaboradores (2012b) relatam em um estudo de meta-análise, que o uso de antidepressivos diminuem os níveis de IL-6, e proteína C reativa em pacientes deprimidos.

Taraz e colaboradores (2013) viram que ao se administrar sertralina em pacientes doentes renais sob hemodiálise, os níveis de citocinas pró-inflamatórias, principalmente IL-6, diminuíram, independentemente do efeito antidepressivo.

Em um estudo clínico, Rudolf e colaboradores (2014) mostraram que os níveis de IL-6 são mais elevados em pacientes diagnosticados com depressão atípica em relação a outros pacientes deprimidos e em relação ao grupo controle não deprimido. Já Dahl e colaboradores (2014) verificaram que o uso de antidepressivos durante 12 dias em pacientes diagnosticados com depressão grave sem tratamento foi capaz de reduzir os níveis iniciais de IL-6, IL-10 e IFN- $\gamma$  no plasma desses pacientes, indicando uma relação entre os níveis de citocinas e a fisiopatologia da depressão.

Estudos mostram que o uso de alguns anti-inflamatórios não esteroidais podem servir de adjuvantes no tratamento dos sintomas do tipo depressivo decorrentes do aumento de citocinas pró-inflamatórias (Wang et al., 2011; Müller, 2013; Berk et al., 2013). Soncini e colaboradores (2012) demonstraram que a pré-administração de dipirona foi capaz de atenuar o comportamento exploratório e locomotor de camundongos causados pela administração de LPS, assim como

diminuiu o tempo de imobilidade nos testes de natação forçada e de suspensão pela cauda.

Wang e colaboradores (2011) verificaram que o estresse crônico induz a expressão hipocampal de ciclo-oxigenase 2 (COX-2) e prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) e que a administração de fluoxetina não diminuiu o comportamento do tipo depressivo decorrente do estresse crônico em aproximadamente 30% dos ratos submetidos ao teste de natação forçada e de preferência por ingestão de sacarose. No entanto, ao ser coadministrado ácido acetilsalicílico a esse grupo de animais não responsivos à fluoxetina, o comportamento do tipo depressivo foi revertido, provavelmente pela diminuição dos níveis hipocampais de COX-2 e PGE<sub>2</sub>.

Mendlewickz e colaboradores (2006) mostraram que a coadministração de ácido acetilsalicílico em pacientes que não respondem ao tratamento com antidepressivos durante quatro semanas aumentou a taxa de resposta dos pacientes em aproximadamente 50% durante a primeira semana de tratamento.

O celecoxibe apresentou um efeito do tipo antidepressivo no teste de natação forçada quando administrado agudamente em ratos (Santiago et al., 2014) e no teste de suspensão pela cauda em camundongos (Maciel et al., 2013). Somando a esses efeitos, a coadministração repetida de doses sub-efetivas de celecoxibe e bupropiona, em camundongos submetidos à inflamação crônica induzida pela administração de adjuvante completo de Freud, parece atuar de forma sinérgica na prevenção do comportamento do tipo depressivo, uma vez que a combinação diminuiu significativamente o tempo de imobilidade no teste de natação forçada desses animais e reduziu a resposta inflamatória e os níveis de IL-1 $\beta$  e COX-2 (Maciel et al., 2013).

Estudos clínicos mostram que o uso concomitante de celecoxibe com antidepressivos, como fluoxetina e reboxetina, em pacientes deprimidos diminuiu significativamente o *score* de manifestação dos sintomas da depressão (*Hamilton Rate Scale*) quando comparado ao grupo de pacientes que foram tratados com

somente um dos antidepressivos (Müller et al., 2006; Akhondzadeh et al., 2009). Abbasi e colaboradores (2012) ao coadministrarem celecoxibe com o antidepressivo sertralina em pacientes diagnosticados com depressão grave, verificaram que esses pacientes tiveram uma resposta melhor ao tratamento e que ocorreu uma maior redução no nível de IL-6 em relação aos pacientes que foram tratados somente com sertralina.

### 3.2 Hiperosídeo

O hiperosídeo (hiperina, quercetina-3-O-galactosídeo; HYP, Figura 2) é um metabólito secundário pertencente ao grupo dos flavonóides glicosilados, encontrado em diferentes espécies vegetais como *Hypericum perforatum* (Butterweck et al., 2000), *Apocynum venetum* (Zheng et al., 2012), espécies de *Hypericum* nativas do Rio Grande do Sul (Dall'Agnol et al., 2003) entre outras (Miño et al., 2002; Khanavi et al., 2013). Apresenta-se como um pó amarelo e teve seu logP definido em 0,43, se comportando como uma molécula relativamente hidrofílica (Jia et al., 2012).

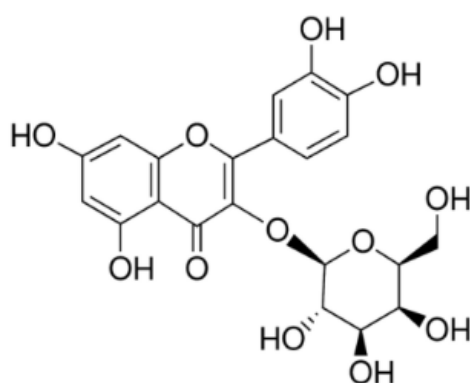
Os primeiros estudos com o HYP mostram que ele reduz o conteúdo intracelular de  $Ca^{2+}$  através do bloqueio de canais de  $Ca^{2+}$  em células musculares papilares e inibe o influxo de  $Ca^{2+}$  induzido tanto por noradrenalina, serotonina ou glutamato em cérebro de ratos neonatos (Chen et al., 1994; Chen e Ma, 1999).

Desde então, diferentes trabalhos já foram publicados demonstrando que o HYP atua no Sistema Nervoso Central (SNC) (Butterweck et al., 2000; Grundmann et al., 2006; Guo et al., 2011a; Haas et al., 2011), tem capacidade de citoproteção (Zhang et al., 2010; Zhang et al., 2011), tem atividade antioxidante (Luo et al., 2004; Gioti et al., 2009; Rainha et al., 2013) e anti-inflamatória (Hammer et al., 2007; Sosa et al., 2007; Süntar et al., 2010), além de seu perfil



farmacocinético estar em estudo (Guo et al., 2011b; Guo et al., 2012; Yin et al., 2013).

Extratos brutos e frações contendo o HYP como composto majoritário também apresentam atividade antiviral (Schmitt et al., 2001; dos Santos et al., 2014), antibacteriana *in vitro* (Rocha et al., 1995; Dall'Agnol et al., 2005; Zhang et al., 2014a), anti-inflamatória no teste de edema de pata (Moreira et al., 2000; Mansour et al., 2014), reduz a produção de óxido nítrico induzida por LPS em cultura de macrófagos (Lee et al., 2008), antioxidante *in vitro* (Gioti et al., 2009; Liang et al., 2010; Kirakosyan et al., 2003 ; Liaudanskas et al., 2014), hepatoprotetora (Xiong et al., 2000; Khan et al., 2012; Kalegari et al., 2014), contra fungos patogênicos de plantas (Zhang et al., 2014a), inibe a enzima  $\alpha$ -glucosidase, importante para o controle da hiperglicemia pós-prandial (Liu et al., 2014), e cicatrizante em modelos em ratos (Süntar et al., 2010).



**Figura 2:** Estrutura molecular do hiperosídeo.

### 3.2.1 Farmacocinética do HYP

Estudos farmacocinéticos têm identificado o perfil de absorção e metabolização do HYP. Quando uma dose de 2,5 mg/kg de HYP é administrado em camundongos por via intravenosa, consegue-se uma concentração máxima no plasma dos animais de 4  $\mu\text{g/mL}$  (Ku et al., 2013). Essa pequena quantidade de

HYP pode ser decorrente da sua rápida eliminação do plasma, uma vez que o HYP tende a ser conjugado a grupos metil, sulfato e glucuronil quando é administrado por via intravenosa (Liu et al., 2010; Guo et al., 2011b). Além disso, um estudo realizado *in vitro* mostra que o HYP se liga fortemente e de forma espontânea a albumina sérica bovina através de ligações hidrofóbicas (Qin et al., 2010).

No entanto, quando o HYP é administrado por via oral, não é possível detectar no plasma nem o HYP na sua forma livre, nem na forma de aglicona livre ou conjugada (Chang et al., 2005), apesar de se ter um relato de o HYP ser absorvido no trato intestinal (Jia et al., 2012). Isso pode ocorrer em decorrência da metabolização do HYP por bactérias intestinais, as quais metabolizam o HYP a um composto dehidroxilado ou o conjugam a metabólito acetilado e hidroxilado (Yang et al., 2013). No entanto, quando o HYP é administrado em cães da raça beagle, é possível detectá-lo na sua forma livre (Yin et al., 2013).

Como o HYP apresenta metabolização quando administrado tanto intravenosamente quanto por via oral, Guo e colaboradores (2012) realizaram um estudo de microdiálise cerebral para verificar se o HYP ou seus metabólitos estão presentes no cérebro, já que o HYP apresenta diferentes atividades ligadas ao SNC, (Butterweck et al., 2000; Butterweck et al., 2004; Grundmann et al., 2006; Haas et al., 2011). No estudo de microdiálise cerebral em ratos (Guo et al., 2012), o HYP foi administrado tanto pela via oral quanto pela via intraperitoneal (i.p), a fim de se comparar a farmacocinética do HYP nessas vias. Durante a análise do microdialisado cerebral, quando o HYP foi administrado pela via oral, não foi possível detectá-lo nem em sua forma livre nem seu metabólito metilado, assim como em estudos anteriores (Chang et al., 2005). Contudo, quando o HYP é administrado pela via i.p., é possível detectá-lo no cérebro tanto na sua forma livre quanto seu metabólito metilado. Isso demonstra que o HYP sofre uma intensa metabolização quando administrado por via oral e que uma alternativa para aumentar a biodisponibilidade do HYP é não administrá-lo por via oral (Guo et al., 2012).

### 3.2.2 Atividade Anti-inflamatória

A maior parte dos relatos na literatura de atividade anti-inflamatória do HYP está associada a sua presença em extratos ou frações ricas em flavonoides. Melzig e colaboradores (2001) verificaram que a inibição da enzima elastase neutrofílica de humanos obtida pelo extrato etanólico de *Drosera madagascariensis* se deve pela elevada quantidade de flavonoides, sendo o HYP um dos constituintes majoritários do extrato.

Hammer e colaboradores (2007) mostraram que extratos etanólicos de *Hypericum perforatum* reduziram significativamente os níveis de prostaglandina E<sub>2</sub> induzidos por LPS em cultura de macrófagos RAW264.7. Sosa e colaboradores (2007) verificaram que a fração acetato de etila de *H. perforatum* com HYP majoritário apresentou uma fraca atividade anti-inflamatória quando administrado topicamente

Extratos de diferentes plantas contendo HYP diminuem o edema na pata de ratos induzido por carragenina (Tadic et al., 2008; Akkol et al., 2012; Mansour et al., 2014). Uma mistura de HYP com isoquercitrina também apresentou atividade anti-inflamatória uma vez que diminui o edema de pata induzido por carragenina e o edema de orelha induzido por TPA (Erdemoglu et al., 2008).

Contudo, a literatura científica mostra que o HYP *per se* também apresenta atividade anti-inflamatória, uma vez que inibe a atividade da enzima elastase neutrofílica de humanos (Melzig et al., 2001), a qual compõe os grânulos do neutrófilo e contribui à resposta imune e inflamatória (Korkmaz et al., 2010). O HYP também inibe a produção de prostaglandina E<sub>2</sub> em cultura de macrófagos RAW264.7 (Hammer et al., 2007), inibe a atividade de enzimas proteína quinases mitógeno-ativadas, as quais estão envolvidas na resposta inflamatória, fazendo com que diminua a produção de nitritos induzida por LPS pelos macrófagos peritoneais de ratos (Lee et al., 2008), inibe a regulação dos receptores *N*-metil-D-

aspartato NR2B da substância cinzenta periaquedutal, que durante a inflamação estão super expressos (Hu et al., 2009).

Han e colaboradores (2014) mostraram que o HYP diminui a expressão do mRNA da citocina linfopoiética estromal tímica, de IL-1 $\beta$  e IL-6 em cultura de mastócitos humanos tipo 1, através da diminuição do nível de Ca<sup>2+</sup> intracelular induzido por PMACI e da atividade da caspase-1 e do NF- $\kappa$ B e aumento da atividade da procaspase-1.

Ku e colaboradores (2014a) testaram o HYP tanto *in vivo*, em um modelo de sepse induzida por ligação e punção cecal, quanto *in vitro*, estimulando células de cultura primária de endotélio venoso umbilical (HUVECs): O HYP inibe a secreção do mediador inflamatório HMGB1, inibe a expressão do receptor TLR-4 e de moléculas de adesão importantes para a resposta inflamatória e reduz a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e MCP-1 em cultura de células. O HYP também protege a integridade celular do endotélio vascular que é danificado pelo LPS e pela secreção de HMGB1.

Em outro trabalho, Ku e colaboradores (2014b) induziram o dano tecidual e estado inflamatório através da adição de altas concentrações de glicose nas células HUVECs. Assim como no trabalho anterior do grupo, o HYP protegeu a membrana tecidual da inflamação inibindo a atividade do NF- $\kappa$ B, diminuiu a expressão de mRNA de citocinas como MCP-1 e IL-8 e diminuiu a expressão de moléculas de adesão.

### **3.2.3 Atividade do tipo antidepressiva**

A atividade do tipo antidepressiva do HYP vem sendo estudada a partir de sua identificação em frações de *Hypericum perforatum* ricas em flavonoides (Butterweck et al., 2000). Butterweck e colaboradores (2000) verificaram que as frações ricas em HYP apresentaram atividade do tipo antidepressiva no teste de

natação forçada em ratos e que parte dessa atividade se deve ao HYP, uma vez que ele, isoladamente, também diminuiu o tempo de imobilidade no FST tanto administrado agudamente quanto durante 12 dias.

Butterweck e colaboradores (2001) também estudaram extratos de *Apocynum venetum* que continham HYP como um dos compostos majoritários. Eles observaram que, como as frações ricas em HYP de *H. perforatum*, o extrato de *A. venetum* também apresentou atividade do tipo antidepressiva no teste de natação forçada em ratos tanto administrado agudamente quanto depois de 14 dias, e que essa redução na imobilidade pode ser atribuída ao HYP, por ele ser um composto majoritário do extrato e já ter apresentado esse tipo de atividade.

Guo e colaboradores (2011a) identificaram o HYP como um dos principais compostos de extratos etanólicos de *Abelmoschus manihot* e que pode ser um dos responsáveis pela redução do tempo de imobilidade no FST quando administrado agudamente em camundongos.

A partir dos resultados da atividade do tipo antidepressiva do HYP, foram iniciados estudos do seu mecanismo de ação no SNC. Butterweck e colaboradores (2004) mostraram que o HYP modula o eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal (HPA) em ratos, reduzindo os níveis plasmáticos de hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) e corticosterona após administração diária por duas semanas. Esses resultados são interessantes, uma vez que a ativação constante do eixo HPA está envolvida no surgimento dos sintomas depressivos (Graeff e Guimarães, 2012; Jacobson, 2014; Murri et al., 2014).

A ação do HYP frente a receptores  $\beta$ -adrenérgicos ( $\beta$ -A) também foi investigada. Apesar do HYP não alterar a densidade dos receptores  $\beta$ -A nem a capacidade de ligação a esses receptores de uma forma geral, após a administração prolongada (Simbray et al., 2004), estudos mais recentes mostram que o HYP diminui a afinidade dos receptores  $\beta_2$ -A de células C6 glioblastoma de ratos e o conteúdo de adenosina monofosfato cíclico (AMPc), sem induzir a internalização

desses receptores (Prenner et al., 2007). No entanto, o mesmo não ocorre com receptores  $\beta_1$ -A dessas células, pois o tratamento com HYP, diminui a densidade dos receptores  $\beta_1$ -A, assim como a reduz a afinidade de ligação e a produção de AMPc. Isso indica que o HYP interage de forma seletiva com receptores  $\beta_1$ -A (Jakobs et al., 2013).

Em 2011, Haas e colaboradores demonstraram que a atividade do tipo antidepressiva do HYP pode ser dependente da ativação de receptores dopaminérgicos do tipo D<sub>2</sub>, uma vez que a redução da imobilidade foi prevenida quando se pré-administrou sulpirida nos animais.

Mais recentemente, Zheng e colaboradores (2012) testaram outro possível mecanismo de ação antidepressiva de HYP isolado das folhas de *Apocynum venetum*. O grupo verificou que HYP aumentou a viabilidade celular de linhagem de células PC12 tratadas com corticosterona, a qual diminui significativamente a viabilidade celular. Eles observaram também que nas células PC12 ocorre um aumento dose-dependente na expressão dos genes que codificam tanto para BDNF quanto para CREB. A partir destes resultados, o grupo sugere que o efeito antidepressivo do HYP esteja relacionado também à neuroproteção mediada tanto pela redução de cálcio intracelular quanto pela regulação para cima da expressão do gene BDNF através da sinalização CREB-AMPc.

### **3.2.4 Atividade antioxidante, citoprotetora e antiapoptótica**

A partir dos resultados obtidos por Chen e Ma (1999) sobre a capacidade do HYP de inibir canais de Ca<sup>2+</sup>, Wang e colaboradores (1996) investigaram a ação do HYP frente à injúria causada pela isquemia e reperfusão em células miocárdicas, uma vez que o excesso de Ca<sup>2+</sup> é prejudicial a essas células. Eles encontraram que, além de prevenir as mudanças hemodinâmicas que ocorrem durante a isquemia, inibe as enzimas lactatodesidrogenase (LDH) e creatina

quinase (CK), o HYP atenua o aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  no miocárdio após a reperfusão, protegendo-o de danos e facilitando a recuperação das funções do coração.

Continuando nessa linha de investigação, em 1998, Chen e colaboradores (1998a) testaram a capacidade citoprotetora do HYP em um modelo de infarto cerebral. O grupo verificou que o HYP exerceu um efeito protetor diminuindo a gravidade do infarto através do aumento do fluxo sanguíneo cerebral e da inibição da produção de óxido nítrico e de malondialdeído, marcadores de dano oxidativo. Em posse dos dados de inibição dos danos oxidativos, o grupo de Chen realizou outros testes para verificar a atividade do HYP em enzimas antioxidantes no cérebro dos animais. Nesse trabalho, o HYP se mostrou uma molécula antioxidante, pois reduziu a diminuição da atividade das enzimas glutathione peroxidase e superóxido dismutase que a isquemia causa, protegendo as células cerebrais do dano oxidativo e reestabelecendo as atividades eletroencefalográficas (Chen et al., 1998b). Em 2006, Chen e colaboradores verificaram que o pré-tratamento com HYP por cinco dias foi capaz de diminuir o tamanho da área cerebral infartada e o edema cerebral causado pela injúria por isquemia e reperfusão.

Mais recentemente, Li e colaboradores (2013) ao aprofundar a investigação cardioprotetora do HYP frente ao teste de injúria por isquemia e reperfusão, encontraram que o HYP reduz o tamanho da área infartada em até 70% provavelmente pelo aumento da capacidade de prevenir a hipóxia do miocárdio, uma vez que o HYP diminui a atividade da LDH e da CK, por inibir mecanismos de apoptose, uma vez que inibe a atividade da caspase 3, aumenta a expressão do fator antiapoptótico Bcl-2 e inibe a expressão do fator pró-apoptótico Bax, aumenta a expressão mitocondrial da proteína quinase p-ERK 1/2, a qual determina a sobrevivência celular ou apoptose, além de aumentar a capacidade antioxidante das células por aumentar a atividade da enzima superóxido dismutase e diminuir o conteúdo de malondialdeído.

O mecanismo de neuroproteção do HYP frente à isquemia cerebral também foi investigado. Diferentes trabalhos utilizando culturas neuronais primárias ou células PC12, mostraram que o pré-tratamento com HYP protege essas células através da inibição das enzimas óxido nítrico sintase e caspase-3, inibição da expressão do fator pró-apoptótico Bax e da ativação de mecanismos antiapoptóticos como o aumento da expressão da ERK e do fator Bcl-2 (Zhang et al., 2010; Zhang et al., 2011; Zeng et al., 2011; Liu et al., 2012).

Zeng e colaboradores (2011) mostraram que o HYP também protege a cultura cortical primária da citotoxicidade induzida pela adição de proteína  $\beta$ -amilóide através da reversão da disfunção mitocondrial, inibindo a liberação de citocromo C para o citosol, e da inibição da apoptose celular mediada pela ativação da caspase-3 e pelo aumento da expressão do fator pró-apoptótico Bad.

O HYP se mostrou hepatoprotetor, uma vez que protege culturas primárias de hepatócitos de ratos (Ito et al., 1990). Também diminui a atividade das enzimas hepáticas alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase, previne significativamente danos teciduais, aumenta a expressão do fator de citoproteção Nrf e heme oxigenase-1, inibe a peroxidação lipídica no modelo de injúria com tetracloreto de carbono em roedores (Choi et al., 2011) e em hepatócitos humanos normais (L02) após a indução de citotoxicidade por  $H_2O_2$  (Xing et al., 2011).

O HYP também tem demonstrado uma capacidade antioxidante e citoprotetora, protegendo queratinócitos humanos (HaCaT) frente à fotosensibilidade (Schmitt et al., 2006), células PC 12 da apoptose induzida por peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e hidróxido de *ter*-butila (Liu et al., 2005), células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC) do dano induzido por  $H_2O_2$  (Li et al., 2012), fibroblastos pulmonares do dano oxidativo e lipoperoxidativo (Piao et al., 2008), inibe a apoptose induzida por excitotoxicidade em cultura neuronal primária (Zhang et al., 2010), protege células humanas da linhagem ECV304 do dano oxidativo induzido por hidróxido de *ter*-butila (Li et al., 2008) e pela adição



de produtos finais de glicação (Zhang et al., 2014) e podócitos de murinos da ação apoptótica dos produtos finais de glicação (Zhou et al., 2012).

### 3.2.5 Outras atividades

O HYP apresenta muitos outros tipos de atividades como antifúngica frente a fungos patogênicos de plantas (Li et al., 2005), não permite o aumento da temperatura corporal de roedores submetidos a estresse por exposição a ambiente novo (Grundmann et al., 2006), hiperpolariza e relaxa o endotélio vascular da artéria basilar (Fan et al., 2011), ativa o receptor Nur77, que está envolvido na prevenção de doenças metabólicas e cardiovasculares, e inibe a proliferação celular vascular (Huo et al., 2014). Além disso, inibe a atividade da enzima citocromo P2D6, responsável pelo metabolismo de alguns medicamentos como antidepressivos (Song et al., 2013) e também apresenta atividade antitrombótica, uma vez que inibiu as vias intrínseca e extrínseca da coagulação e a síntese de trombina e de fator Xa (Ku et al., 2013).

Mesmo o HYP apresentando atividades citoprotetoras e antimutagênicas *in vitro* (Snijman et al., 2007), quando foi administrado em altas doses em ratas prenhas, causou mudanças no desenvolvimento dos fetos, como baixo peso e diminuição no comprimento da cauda (Ai et al.; 2012).

O HYP também apresenta atividade antiviral contra o vírus da hepatite B tanto em testes *in vitro* quanto *in vivo*, pois diminuiu a expressão de HBsAg e HBeAg, marcadores de infecção viral, e diminuiu a replicação do vírus em até 70% (Wu et al., 2007). No entanto, o HYP não foi efetivo contra o vírus do HIV (Shahat et al., 1998) nem contra o vírus herpes simplex tipo 1 (Fritz et al., 2007).

Estudos *in vitro* mostram que o HYP apresenta uma potencial atividade antitumoral. O HYP é capaz de inibir a proliferação de células de leucemia K562 (Cong et al., 2009). Utilizando células B16 de melanoma de camundongos

mostrou-se que o HYP diminui os níveis de melanina a partir da redução da expressão da enzima tirosinase, enzima responsável pela biossíntese de melanina e marcador de células de melanoma. Mesmo sem alterar a atividade da enzima, o HYP parece ser um potente inibidor da melanogênese, uma vez que a redução da biossíntese de melanina foi maior que o controle positivo ácido cojico (Ohguchi et al., 2010). Já a adição do HYP na cultura de células de osteosarcoma humano (linhagens U2OS e MG63) inibiu a proliferação celular sem causar morte celular significativa e induziu a diferenciação celular dessas células de osteosarcoma (Zhang et al., 2014c).

O HYP inibe a atividade da acetilcolinesterase, responsável por degradar a acetilcolina, neurotransmissor envolvido na preservação da memória e do aprendizado (Hernandez et al., 2010; Nam and Lee, 2014) e melhora a memória de camundongos no teste de esquiava (Nam and Lee, 2014). O HYP também inibe a atividade de outras enzimas como as proteases tripsina e uroquinase (Jedinák et al., 2006)

O HYP reduziu a hiperglicemia induzida em ratos por estreptozotocina e preveniu a redução do número de glândulas secretoras nas células  $\beta$ -pancreáticas. (Verma et al., 2013). O HYP inibe a atividade da  $\alpha$ -glicosidase, enzima responsável pela clivagem de dissacarídeos e oligossacarídeos facilitando a absorção pelo intestino (Islam et al., 2013), ativa as enzimas glicose-6-fosfato, frutose-1,6-bifosfatase, glicogênio fosforilase (Verma et al.2013), diminui a expressão de receptores de produtos de degradação de glicação, o que inibe a apoptose mediada por esses produtos da enzima c-Jun *N*-terminal quinase (Zhang et al., 2013). O HYP diminui alguns parâmetros ligados à diabete como os níveis de hemoglobina glicada sérica, colesterol total, triglicerídeos, LDL, VLDL, com aumento de HDL, e a excreção de uréia e creatinina (Verma et al., 2013).

Apesar de se ter um relato de que o HYP apresenta atividade analgésica mediada pela inibição do influxo de  $Ca^{2+}$  nos terminais das vias aferentes (Rylski

et al.; 1979; Chen et al.; 1989), publicações mais recentes mostram que o HYP não apresenta atividade antinociceptiva nem frente ao teste de contorções nem no teste da placa aquecida, independentemente se administrado por via oral (Galeotti et al., 2010) ou por via intraperitoneal (Haas et al., 2011). Todavia, Hu e colaboradores (2009) mostraram que ao modular a transmissão sináptica na substância cinzenta periaquedutal, que está envolvida no controle da dor, inibindo a regulação dos receptores *N*-metil-D-aspartato NR2B, o HYP apresenta uma atividade analgésica contra o estímulo de dor causada por uma inflamação persistente.

Outros estudos mostram que em associação com quercetina, o HYP tende a proteger as células renais de animais submetidos ao modelo de fibrose renal induzida por obstrução uretral unilateral e a cultura de células mesangiais (SV40 MES 13) estimuladas com IL-1 $\beta$ , reduzindo a expressão renal de proteínas relacionadas à fibrose, como  $\alpha$ -actina da musculatura lisa e fibronectina (Yan et al., 2014), além de evitar a formação e o depósito de cristais de oxalato de cálcio no rim de animais (Zhu et al., 2014b).



## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

---



#### **4.1 Animais**

Foram utilizados camundongos CF1 machos (23-31 g) provenientes da colônia da Universidade Federal de Santa Maria. Antes dos experimentos, os animais foram adaptados por, no mínimo, uma semana no biotério de passagem da Faculdade de Farmácia – UFRGS. Os camundongos foram mantidos em caixas plásticas de 17x28x13 cm, com no máximo 5 camundongos por caixa, sob ciclo claro/escuro de 12 horas (luzes acesas das 07 às 19 horas), com temperatura constante ( $23 \pm 2$  °C), sob sistema de exaustão controlada (estantes ventiladas Alesco®) e umidade monitorada, com acesso livre à água e alimento. Os experimentos foram realizados no período das 10 às 16 horas, com um período de adaptação dos animais de 1 hora à sala de experimentação, antes do início dos procedimentos.

O número de animais por grupo variou de sete (7) a quatorze (14). O tamanho amostral inicial foi calculado utilizando o programa estatístico Sigma Stat versão 2.03 (Jandel Scientific Corporation®), considerando um valor de alfa de 0,01, poder do teste de 0,9 e o teste estatístico a ser utilizado em cada experimento. Como parâmetros para as diferenças e desvios padrão esperados foram utilizados as referências bibliográficas citadas em cada experimento proposto.

#### **4.2 Indução dos comportamentos de doente e do tipo depressivo**

Inicialmente, todos os camundongos foram submetidos a um estressor (natação forçada de 5 minutos) de acordo com Viana e colaboradores (2010), com pequenas modificações validadas em nosso laboratório por Müller (2014): os animais foram colocados a nadar em um cilindro de vidro com 14 cm de diâmetro interno, com 19 cm de altura de água à temperatura de  $22 \pm 1$  °C. Ao término da sessão de natação, os camundongos foram gentilmente retirados da água, secados com toalha de algodão e retornaram para a caixa moradia com maravalha seca e limpa. Transcorridos 30 minutos, para indução do evento inflamatório, os animais

foram separados em dois grupos distintos e submetidos a duas diferentes condições: a um grupo foi administrado LPS de *Escherichia coli* (sorotipo 0111:B4, Sigma-Aldrich, 600 µg/kg, i.p.) e a outro, solução salina estéril (NaCl 0,9 %; 10 mg/kg, i.p.). A condição natação + LPS foi denominada de “grupo LPS” enquanto a condição natação + SAL foi denominada “grupo SAL” (Esquema 1).

A combinação de um evento estressor com a administração de LPS intensifica a manifestação do comportamento do tipo deprimido nos animais (Elgarf et al., 2014).

### **4.3 Tratamentos**

Todos os tratamentos foram administrados no volume de 10 mL/kg de peso corporal, pela via intraperitoneal (i.p.), a diferentes grupos de animais, em dois tempos diferentes: 30 min antes (*T1: regime profilático*) ou 5 h 30 min depois (*T2: regime terapêutico*) da indução do evento inflamatório (Esquema 1). O hiperosídeo (HYP, Sigma-Aldrich) foi solubilizado em solução salina (2 mg/mL; pH 6-7) e administrado aos animais na dose de 20 mg/kg. A dose foi escolhida com base em estudo anterior do grupo (Haas, 2010). Como controle positivo utilizou-se cloridrato de imipramina (IMI, Sigma-Aldrich), dissolvido em salina (2 mg/mL; pH 6-7) na dose de 20 mg/kg, e como controle negativo, salina (Esquema 1).

### **4.4 Avaliação Comportamental**

#### **4.4.1 Avaliação do efeito sobre o comportamento de doente**

Transcorridas 06 e 24 horas após a administração de LPS, os animais foram colocados no aparato de campo aberto e observados, durante 06 minutos, com relação aos seguintes parâmetros: letargia (dificuldade ou diminuição na

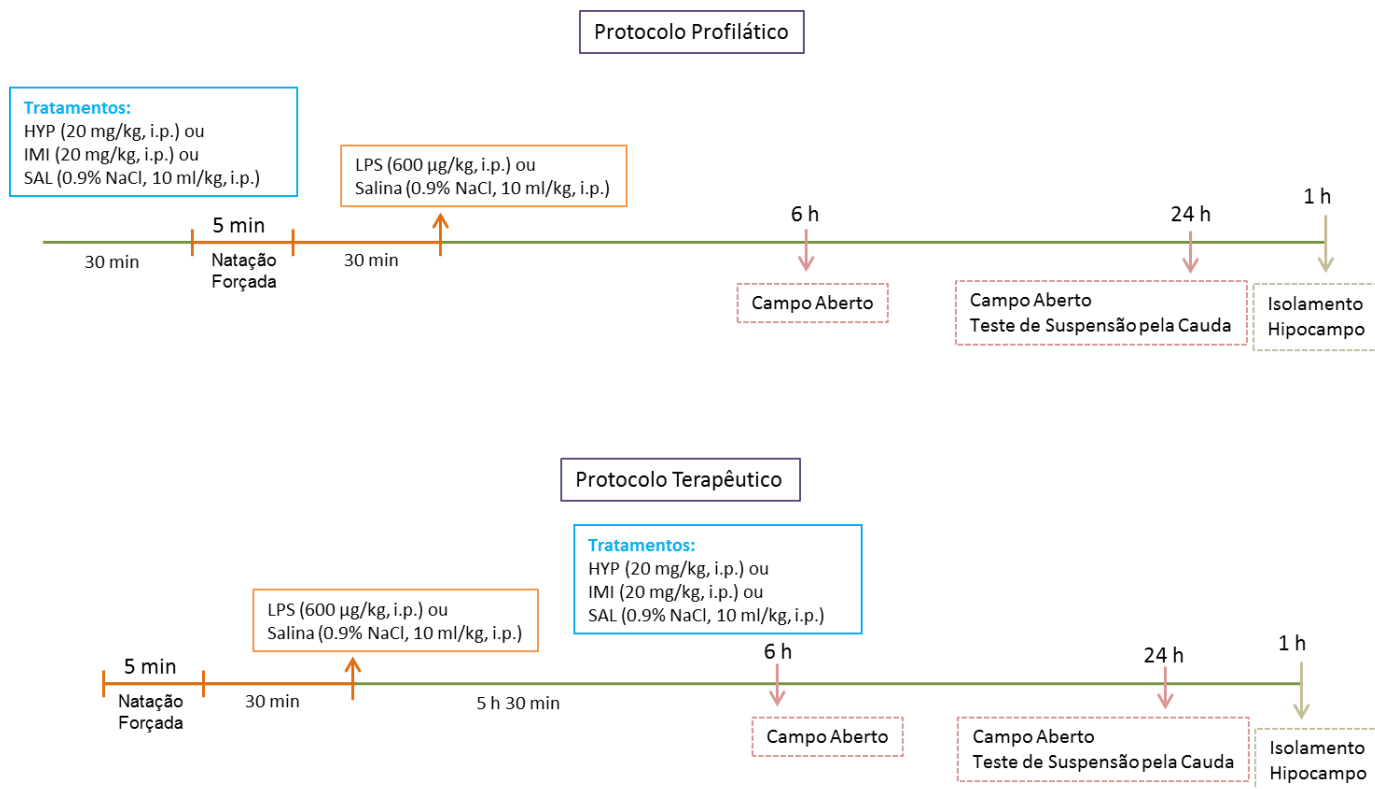


locomoção e exploração), ptose (pálpebras caídas), piloereção (geralmente na região da nuca), locomoção espontânea. Letargia, ptose e piloereção foram classificados de acordo com uma escala de 4 pontos (índice de sintomas), conforme Gibb e colaboradores (2011), sendo 0 (sem sintomas), 1 (1 dos sintomas), 2 (2 dos sintomas) e 3 (todos os sintomas).

O campo aberto foi constituído de uma caixa de acrílico transparente, medindo 40x30x30 cm, com o fundo dividido em 24 quadrantes iguais. Os camundongos foram colocados no centro do aparato e registrou-se o número de *crossings* (cruzamentos entre os quadrantes delimitados no fundo do aparato). O aparato foi limpo com etanol 96° GL entre um animal e outro. Todo o protocolo foi realizado em ambiente de penumbra e os registros realizados por um experimentador cego aos tratamentos.

#### **4.4.2 Avaliação do efeito do tipo antidepressivo no teste da suspensão pela cauda**

Logo após a segunda exposição dos camundongos ao campo aberto (24h depois da administração de LPS), foi realizado o teste de suspensão pela cauda (TSC) de acordo com Steru e colaboradores (1985), com pequenas modificações validadas em nosso laboratório (Müller et al., 2012; Duarte et al., 2014) para verificar uma possível efeito do tipo antidepressivo dos tratamentos. Nesse teste, realizado em ambiente de penumbra, os camundongos foram suspensos pela extremidade da cauda com auxílio de fita adesiva a 60 cm do solo, de forma que não ocorresse contato visual, por um período de 6 minutos, no qual a imobilidade foi registrada, em segundos, nos quatro últimos minutos. Os animais foram considerados imóveis quando permaneciam pendurados passiva e completamente parados (Müller et al., 2012).



**Esquema 1:** Esquema dos protocolos de administração dos tratamentos imipramina e hiperosídeo, indução do evento inflamatório e de avaliação comportamental utilizado nesse trabalho.

## 4.5 Experimentos *ex-vivo*

### 4.5.1 Coleta dos tecidos cerebrais

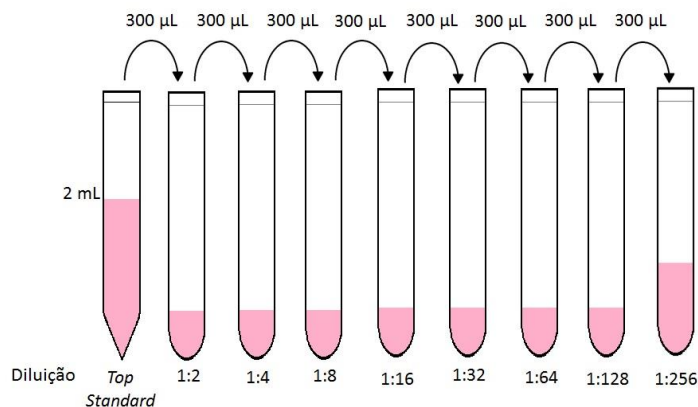
Uma hora após o TSC (item 4.4.2), os camundongos foram eutanasiados por deslocamento cervical, decapitados com tesoura, e os cérebros rapidamente removidos e lavados com solução salina gelada (4 °C). Imediatamente após, os cérebros foram dissecados sob gelo e os hipocampus isolados, congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer -80 °C até o momento da quantificação dos mediadores inflamatórios.

#### 4.5.2 Quantificação de citocinas pró e anti-inflamatórias

Os hipocampos foram homogeneizados (1:1; p:v) com solução PBS com inibidores de proteases (*Protease inhibitor cocktail animal component free*, Sigma) (1:1000) e centrifugados a 5000 g por 7 min sob refrigeração (4 °C). O sobrenadante foi utilizado para quantificação das citocinas inflamatórias através de citometria de fluxo utilizando o kit *CBA Mouse Inflammation*<sup>®</sup> (BD Bioscience, San Jose, CA).

Foram aliquotados 25 µL de cada amostra de sobrenadante em tubos de microcentrífuga de 1,5 mL. Em seguida, adicionou-se 25 µL do reagente de detecção *Mouse Inflammation PE* em todos os tubos, homogeneizou-os e os deixou incubando por 2 horas em temperatura ambiente, protegidos da luz. Após a incubação, adicionou-se 500 µL do tampão de lavagem fornecido pelo kit em cada tubo, os quais foram centrifugados a 200 g por 5 minutos. Ao final da centrifugação, cada sobrenadante foi cuidadosamente descartado e o *pellet* de *beads* ressuspenso em 150 µL do tampão de lavagem para serem analisados posteriormente. Como a detecção e quantificação das *beads* dependem da intensidade de emissão de fluorescência, todo o experimento foi realizado em ambiente de penumbra e as amostras e reagentes, quando não estavam sendo utilizadas, ficavam armazenadas protegidas da luz.

Uma curva padrão com a mistura das *beads* de captura para IL-6, IL-10, TNF, IFN- $\gamma$ , MCP-1 e IL1-2p70, fornecida no kit, foi realizada através da diluição seriada no mesmo dia e preparada para análise nas mesmas condições das amostras. O conteúdo do frasco *Mouse Inflammation Standards* foi diluído com 2 mL do *Assay Diluent (top standard)*, homogeneizado delicadamente com a pipeta e deixado estabilizando por 15 min em temperatura ambiente. A diluição seriada foi realizada adicionando-se 300 µL do tubo *top standard* a 300 µL de *Assay Diluent* (1:2) e seguiu-se a diluição de acordo com o Esquema 2. Preparou-se também um tubo controle negativo utilizando somente 300 µL de *Assay Diluent*.



**Esquema 2:** Esquema de diluição seriada da curva padrão de *beads* de captura fornecidos no kit *CBA Mouse Inflammation*<sup>®</sup> (BD Bioscience).

Para a utilização do kit no equipamento existente na Faculdade de Farmácia, é necessário fazer a compensação dos *lasers* de excitação antes da aquisição dos dados. Para isso, adiciona-se 50 µL de *Setup Beads*, fornecidas no kit, em três diferentes tubos. Em um deles, adiciona-se 50 µL de *FITC Positive Control Detector* (tubo B) e em outro, adiciona-se 50 µL de *PE Positive Control Detector* (tubo C). Deixar os três tubos incubando por 30 minutos a temperatura ambiente, protegidos da luz. Após a incubação, adiciona-se 400 µL de tampão de lavagem nos tubos B e C e 450 µL no tubo restante (tubo A).

A aquisição dos dados, tanto da curva padrão quanto das amostras, foram realizadas no equipamento FACSVerse™ (BD Bioscience, San Jose, CA) e a análise dos dados realizada no software FCAP Array™ v3.0.1 (Soft Flow, Pecs, Hungary).

#### 4.6 Análise Estatística

Os resultados dos ensaios comportamentais, doseamento das citocinas e relação (*ratio*) entre os níveis de interleucinas foram analisados por ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls, quando aplicável. Para a análise de correlação dos níveis de interleucinas entre si e das interleucinas com o tempo de imobilidade no TSC foi utilizado o teste de correlação de Pearson. As

análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa Sigma Stat versão 2.03 (Jardel Scientific Corporation®). As diferenças nos níveis MCP-1 e IL-10, na condição LPS, entre os dois protocolos de tratamento foram também analisadas pelo teste “t” de Student. Para todas as análises, foi aceito o nível de significância  $p < 0,05$ .

#### **4.7 Ética e Biossegurança**

A manipulação animal foi realizada segundo os princípios definidos pela Lei nº 11794 (BRASIL) de outubro de 2008 e pela Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (2013). O projeto foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais da UFRGS (CEUA) antes da realização dos experimentos, sendo aprovado sob número 25800.

Imediatamente após a finalização dos experimentos, os camundongos foram submetidos isoladamente à eutanásia pelo método de deslocamento cervical. As carcaças foram acondicionadas em sacos plásticos brancos e armazenadas em freezer a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  até o recolhimento (semanal) por empresa licitada pela UFRGS para este fim.

Os materiais perfurocortantes foram acondicionados em caixas Descarpack rígidas (que não permitam rupturas) até que atinjam 2/3 da sua capacidade. As caixas são semanalmente recolhidas pela Comissão de Saúde e Ambiente de Trabalho da Faculdade de Farmácia (COSAT-FAR).

Os resíduos químicos foram rotulados e recolhidos pela COSAT-FAR, a qual encaminha ao Instituto de Química desta universidade para os procedimentos de reciclagem e/ou descarte de material químico.



## **5 RESULTADOS**

---





## 5.1 Avaliação comportamental

### 5.1.1 Protocolo Profilático

A análise de variância de duas vias (LPS e tratamentos) demonstrou diferenças significativas no número de cruzamentos e *score* de sintomas dos diferentes grupos, quando avaliados seis horas depois da indução do evento inflamatório. Não foram detectadas diferenças no comportamento de doente quando os grupos foram avaliados vinte e quatro horas depois da indução do evento inflamatório. No teste da suspensão pela cauda, a análise estatística revelou que imipramina reduz o comportamento de imobilidade nos grupos de animais LPS e SAL, enquanto o hiperosídeo reduziu o tempo de imobilidade apenas nos animais LPS. Todos os dados estão representados na figura 3.

Todos os animais submetidos à natação forçada e que receberam LPS apresentaram redução significativa no número de cruzamentos no teste de campo aberto ( $F_{LPS(1,53)} = 9,170$ ;  $p < 0,01$ ) (Figura 3A) e aumento significativo no escore de sintomas ( $F_{LPS(1,53)} = 9,830$ ;  $p < 0,01$ ) (Figura 3B) em 6 horas, quando comparado ao grupo de animais SAL. Estes resultados demonstram a indução do comportamento de doente pelo evento inflamatório, como esperado.

IMI e HYP não alteraram o número de cruzamentos dos animais SAL e apenas a IMI preveniu a redução do número de cruzamentos induzida pelo LPS no campo aberto ( $F_{(1,53)} = 4,027$ ;  $p < 0,05$ ) (Figura 3A). Não houve interação entre os fatores LPS x tratamento ( $F_{(2,53)} = 1,133$ ,  $p = 0,331$ ).

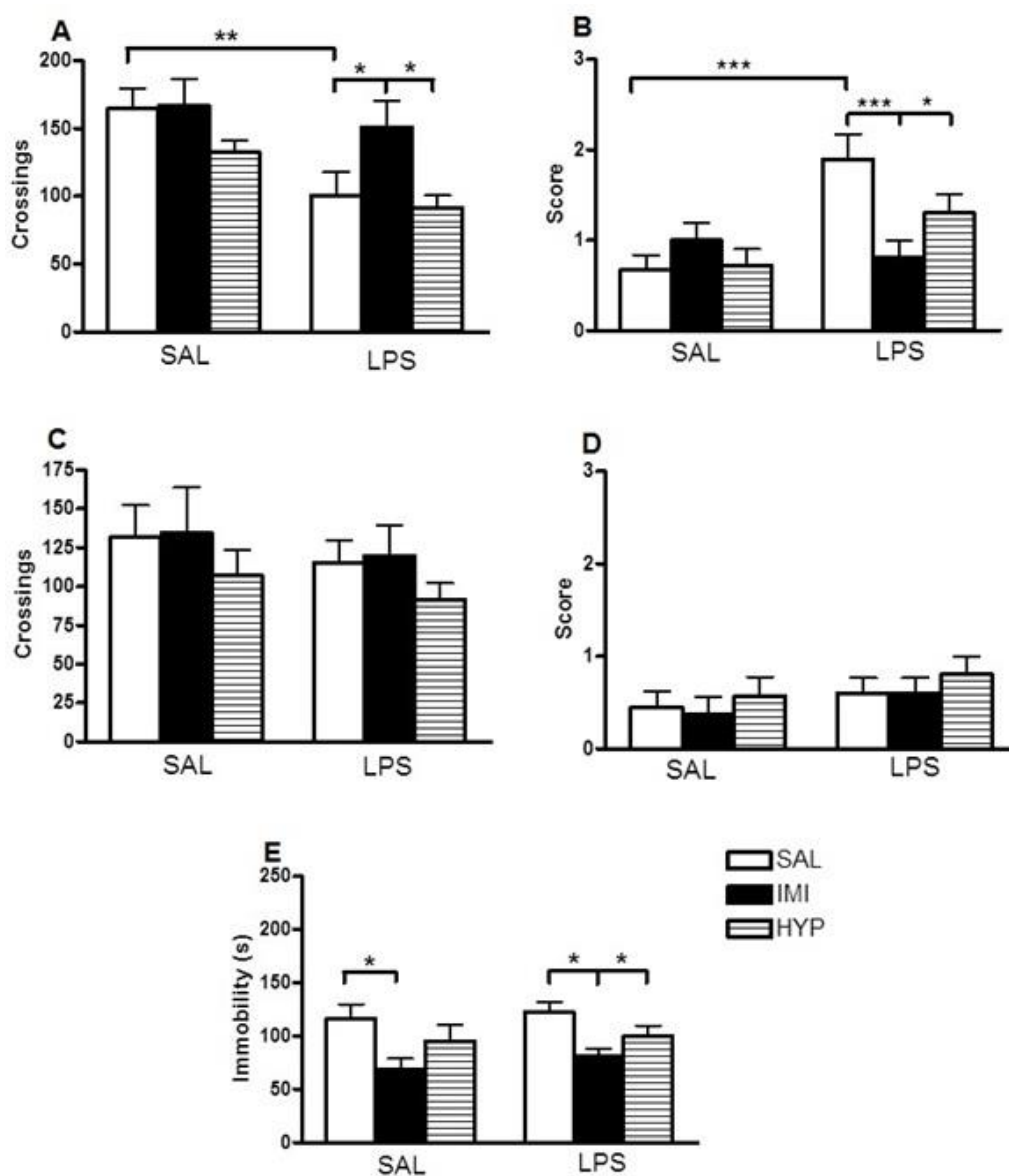
A manifestação dos sintomas de doente (*score*) foi reduzida por IMI e por HYP apenas nos animais que receberam LPS ( $F_{tratamento(1,53)} = 9,830$ ;  $p < 0,01$ ;  $F_{interação: F_{(2,53)} = 6,024$ ;  $p < 0,01$ ) (Figura 3B).

Vinte quatro horas após a indução do evento inflamatório, não foram detectadas diferenças significativas nem no número de cruzamentos nem no escore

de sintomas nem entre os grupos que receberam LPS e os grupos que receberam SAL, e nem entre os tratamentos, em nenhuma das condições (LPS ou SAL), demonstrando que os animais se recuperam do comportamento de doente (Figuras 3C e 3D).

No teste de suspensão pela cauda (Figura 3E), realizado 24 horas após a indução do evento inflamatório, a análise estatística revelou que a administração prévia de LPS não induziu aumento no tempo de imobilidade em nenhum dos grupos ( $F_{LPS(1,52)} = 0,330$ ,  $p=0,568$ ). IMI reduziu significativamente a imobilidade tanto dos animais que receberam LPS quanto do grupo SAL e o HYP reduziu significativamente apenas a imobilidade do grupo natação + LPS ( $F_{tratamento(2,52)} = 8,291$ ;  $p<0,001$ ).

A soma destes dados demonstra que, quando administrados profilaticamente, a imipramina e o hiperosídeo previnem o desenvolvimento do comportamento de doente e do tipo depressivo induzido pela administração de LPS combinada com a exposição à natação forçada. A proteção apresentada pelo hiperosídeo parece ser parcial.



**Figura 3:** Efeito de hiperosídeo e de imipramina (HYP 20 mg/kg, i.p. e IMI 20 mg/kg), administrados 30 minutos antes da indução do evento inflamatório, sobre o comportamento de doente e do tipo deprimido em camundongos CF1 machos, causados pela exposição à natação forçada (5 min) seguida da administração de LPS (600 µg/kg, i.p.) ou SAL (NaCl 0,9%; 10 mg/kg, i.p.). Os animais (n=7-10/grupo) foram avaliados nos testes de campo aberto, na manifestação dos sintomas de doente, 6 horas (A e B) e 24 horas (C e D), e no teste de suspensão pela cauda, 24 horas (E), após o evento inflamatório. Os resultados estão expressos em média ± erro padrão. ANOVA de duas vias, *post hoc* Student-Newman-Keuls. Diferenças significativas: \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,01.

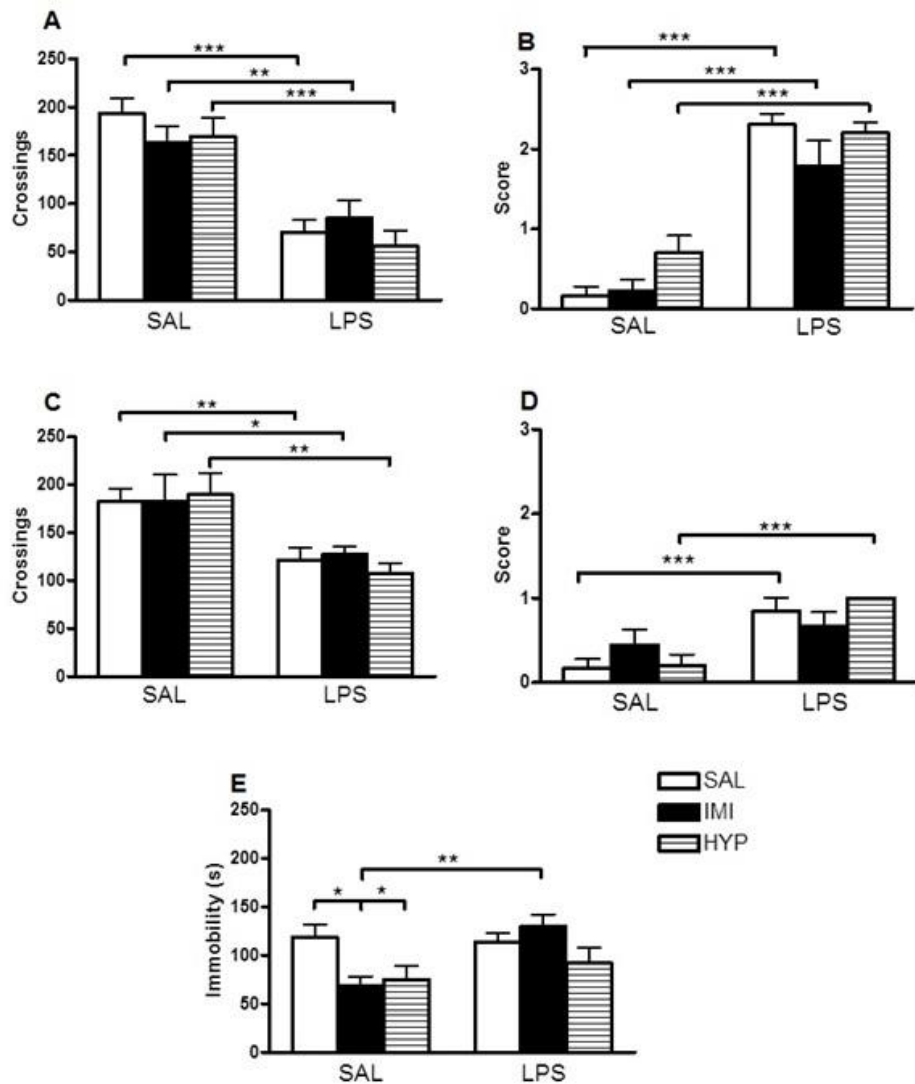
### 5.1.2 Protocolo Terapêutico

Neste protocolo, no qual os tratamentos foram administrados 05 horas e 30 minutos após a indução do evento inflamatório, a ANOVA de duas vias (LPS e tratamentos) revelou diferenças significativas no número de cruzamentos e *score* de sintomas dos diferentes grupos, quando avaliados 06 e 24 horas depois da indução do evento inflamatório.

Todos os grupos submetidos à natação + LPS apresentaram redução no número de cruzamentos e aumento no escore de sintomas em relação aos grupos SAL quando observados no campo aberto, seis (Cruzamentos:  $F_{LPS(1,62)} = 58,274$ ;  $p < 0,001$ ; *Score*:  $F_{evento(1,62)} = 110,498$ ;  $p < 0,001$ ) (Figuras 4A e 4B) e vinte e quatro horas (Cruzamentos:  $F_{LPS(1,62)} = 22,435$ ;  $p < 0,001$ ; *Score*:  $F_{LPS(1,62)} = 25,344$ ;  $p < 0,001$ ) (Figuras 4C e 4D) após a indução do evento inflamatório. Estes dados demonstram o desenvolvimento e a persistência do comportamento de doente.

No teste de suspensão pela cauda, realizado 24 horas depois da indução do evento inflamatório (Figura 4E), a ANOVA revelou diferenças significativas entre os tempos de imobilidade para os fatores evento ( $F_{(1,59)} = 5,572$ ;  $p < 0,05$ ), tratamento ( $F_{(2,59)} = 3,682$ ;  $p < 0,05$ ) e interação entre eles ( $F_{(2,59)} = 3,465$ ;  $p < 0,05$ ). A IMI e o HYP apenas reduziram significativamente o tempo de imobilidade no TSC dos animais controle do evento.

A soma destes dados mostra que, quando administrados após a indução do evento inflamatório, a imipramina e o hiperosídeo não impedem o desenvolvimento do comportamento de doente e do tipo depressivo induzido pela administração de LPS combinada com a exposição à natação forçada.



**Figura 4:** Efeito de hiperosídeo e de imipramina (HYP 20 mg/kg, i.p. e IMI 20 mg/kg), administrados 5 horas e 30 minutos depois da indução do evento inflamatório, sobre o comportamento de doente e do tipo deprimido em camundongos CF1 machos, causados pela exposição à natação forçada (5 min) seguida da administração de LPS (600 µg/kg, i.p.) ou SAL (NaCl 0,9%; 10 mg/kg, i.p.). Os animais (n=8-14/grupo) foram avaliados nos testes de campo aberto, na manifestação dos sintomas de doente, 6 horas (A e B) e 24 horas (C e D), e no teste de suspensão pela cauda, 24 horas (E), após o evento inflamatório. Os resultados estão expressos em média ± erro padrão. ANOVA de duas vias, *post hoc* Student-Newman-Keuls. Diferenças significativas: \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,01.

## 5.2 Quantificação de citocinas pró e anti-inflamatórias

### 5.2.1 Protocolo Profilático

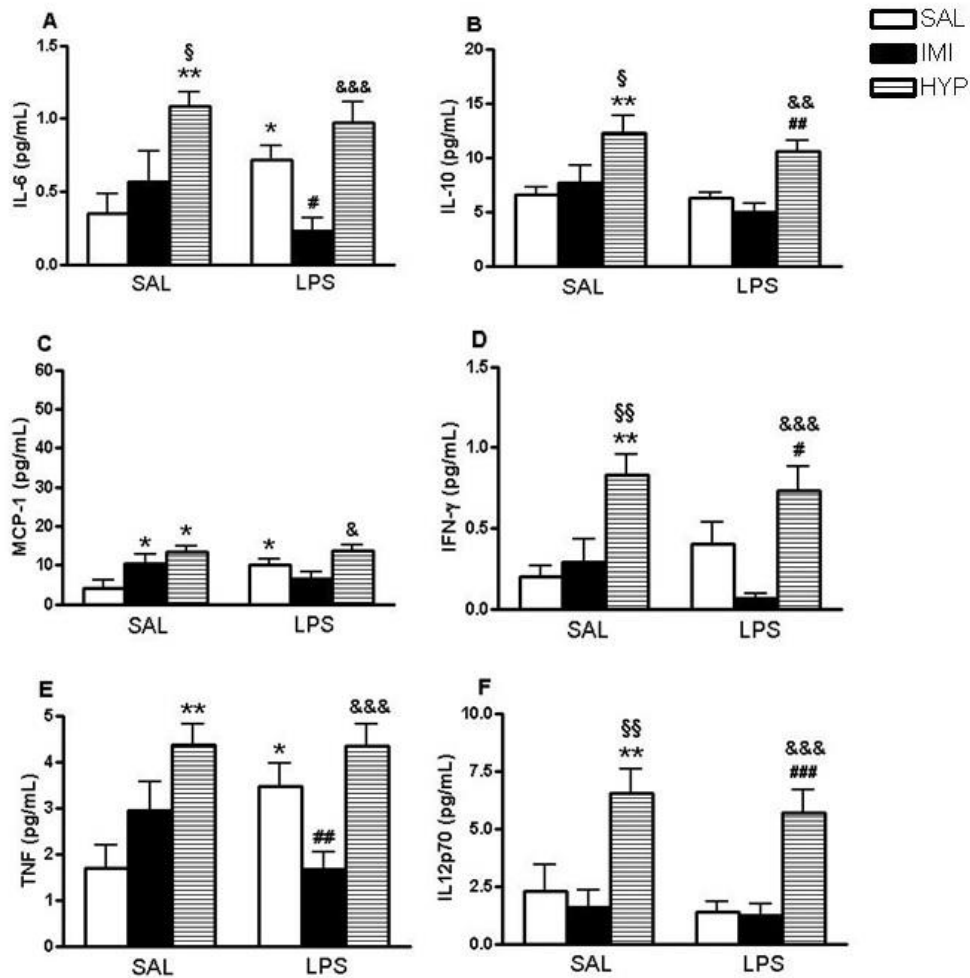
A ANOVA de duas vias (LPS e tratamentos) revelou diferenças significativas nos níveis de citocinas tanto pró quanto anti-inflamatórias induzidas pelos diferentes tratamentos. O aumento de citocinas pela administração de LPS foi diferentemente afetado pelos diferentes tratamentos. Porém as diferenças entre os tratamentos dependem da exposição ou não ao LPS. Todos os resultados estão apresentados na figura 5.

Globalmente, o LPS não alterou significativamente os níveis de interleucinas (F LPS: IL-6:  $F_{(1:48)} = 0,00154$ ;  $p=0,969$ ; IL-10:  $F_{(1:48)} = 3,155$ ;  $p=0,083$ ; MCP-1:  $F_{(1:47)} = 0,0328$ ;  $p=0,857$ ; IFN- $\gamma$ :  $F_{(1:49)} = 0,151$ ;  $p=0,699$ ; TNF:  $F_{(1:49)} = 0,173$ ;  $p=0,680$ ; IL12p70:  $F_{(1:47)} = 0,0663$ ;  $p=0,936$ ). Porém, a análise da interação dos fatores demonstrou que os animais tratados com salina que receberam LPS apresentaram um aumento significativo nos níveis de IL-6, MCP-1 e TNF, em relação aos animais tratados com salina que apenas nadaram (natação + SAL) (F interação: IL-6:  $F_{(2:48)} = 4,214$ ;  $p<0,05$ ; MCP-1:  $F_{(2:47)} = 4,198$ ;  $p<0,05$ ; TNF:  $F_{(2:49)} = 4,883$ ;  $p<0,05$ ) (Figura 5A,5C,5E).

A administração de IMI diminuiu significativamente os níveis das interleucinas pró-inflamatórias IL-6 (F tratamento $_{(2:48)} = 12,890$ ;  $p<0,001$ ) e TNF (F tratamento $_{(2:48)} = 12,890$ ;  $p<0,001$ ) (Figuras 5A e 5E) apenas no grupo que recebeu LPS (F interação: IL-6:  $F_{(2:48)} = 4,214$ ;  $p<0,05$ ; TNF:  $F_{(2:48)} = 1,883$ ;  $p<0,05$ ). Com relação aos níveis da quimiocina MCP-1, a IMI aumenta significativamente somente nos animais SAL (F tratamento $_{(2:48)} = 7,441$ ;  $p<0,01$ ; F interação $_{(2:48)} = 4,198$ ;  $p<0,05$ ) (Figura 5C). As citocinas anti-inflamatórias não foram alteradas por IMI em nenhuma condição (Figura 5B e 5F).

O HYP aumentou significativamente os níveis de todas as citocinas (Figura 5), tanto nos animais tratados posteriormente com SAL, quanto nos animais

tratados com LPS. (F tratamento: IL-6:  $F_{(2:48)} = 12,890$ ;  $p < 0,001$ ; IL-10:  $F_{(2:48)} = 14,065$ ;  $p < 0,001$ ; MCP-1:  $F_{(2:48)} = 7,441$ ;  $p < 0,01$ ; IFN- $\gamma$ :  $F_{(2:49)} = 13,295$ ;  $p < 0,001$ ; TNF:  $F_{(2:48)} = 12,890$ ;  $p < 0,001$ ; IL-12p70:  $F_{(2:47)} = 18,217$ ;  $p < 0,001$ ).



**Figura 5:** Efeito de hiperosídeo e de imipramina (HYP 20 mg/kg, i.p. e IMI 20 mg/kg), administrados 30 minutos antes da indução do evento inflamatório, sobre os níveis de citocinas inflamatórias em hipocampo de camundongos CF1, (A) IL-6, (B) IL-10; (C) MCP-1; (D) IFN-γ; (E) TNF; (F) IL12-p70; causados pela exposição à natação forçada (5 min) seguida da administração de LPS (600 µg/kg, i.p.) ou SAL (NaCl 0,9%; 10 mg/kg, i.p.). Os animais (n=7-10/grupo) foram eutanasiados 1 hora depois da exposição ao teste de suspensão pela cauda Os resultados estão expressos em média ± erro padrão. ANOVA de duas vias, *post hoc* Student-Newman-Keuls. Diferenças significativas: \*p<0,05; \*\*p<0,01 quando comparado ao grupo SAL-SAL; §p<0,05; §§p<0,01 quando comparado com o grupo IMI-SAL; #p<0,05; ##p<0,01; ###p<0,001 quando comparado ao grupo SAL-LPS; &p<0,05; && p<0,01; &&&p<0,001 em comparação ao grupo IMI-LPS.

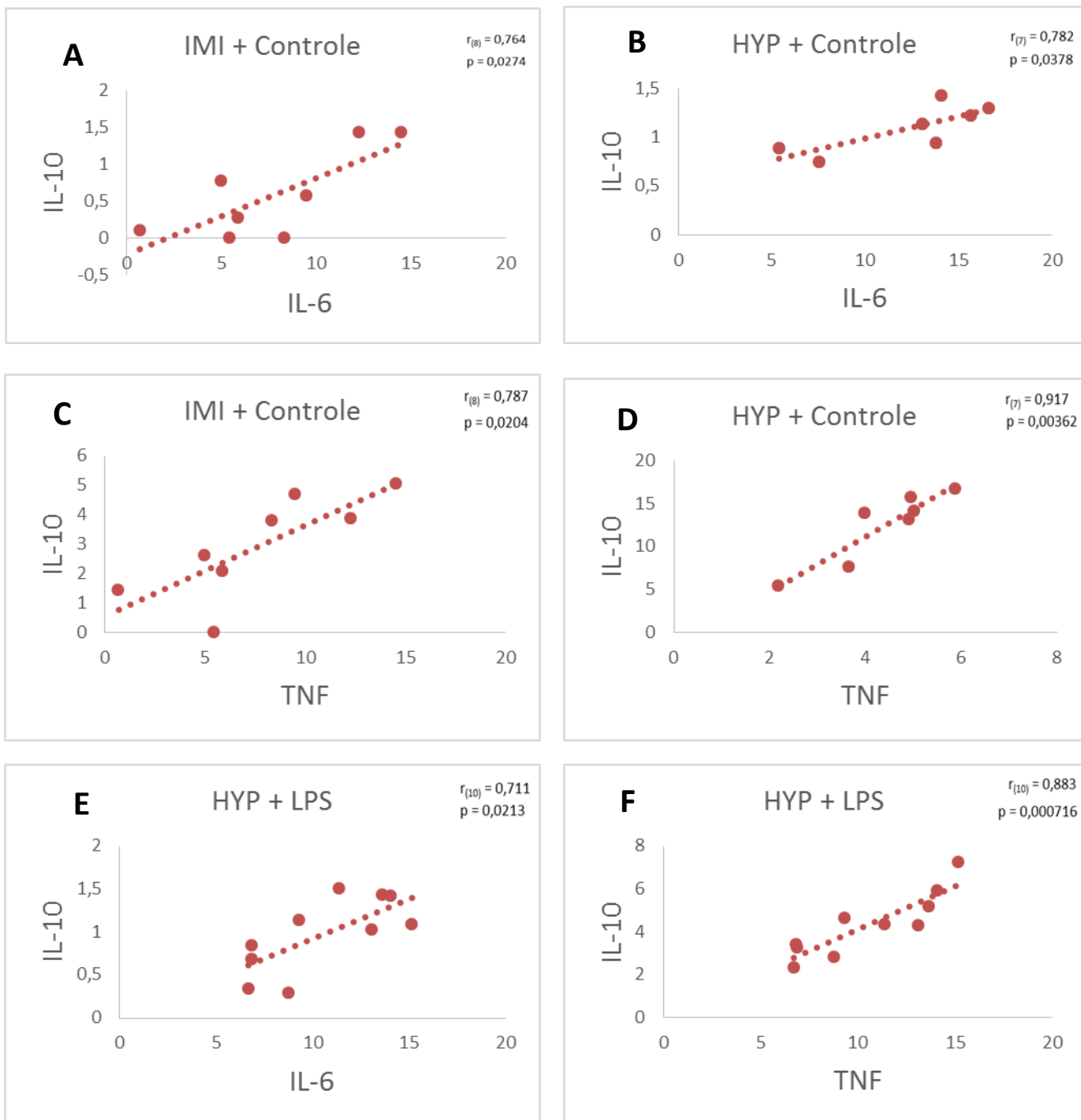


Os resultados das análises de correlação entre IL-6/IL-10 e TNF/IL-10 estão apresentados na Tabela 2. Foi possível observar uma correlação moderada positiva IL-6/IL-10 nos grupos tratados com hiperosídeo e submetidos ( $r_{(10)} = 0,711$ ;  $p = 0,0213$ ) ou não ( $r_{(7)} = 0,782$ ;  $p = 0,0378$ ) ao evento inflamatório. A análise da correlação entre os níveis de TNF/IL-10 revelou que o tratamento com HYP resultou em uma correlação forte positiva tanto nos grupos controle ( $r_{(7)} = 0,917$ ;  $p = 0,00362$ ) quanto submetidos ao evento inflamatório ( $r_{(10)} = 0,883$ ;  $p = 0,000716$ ). O tratamento com IMI resultou em uma correlação moderada positiva IL-6/IL-10 ( $r_{(8)} = 0,764$ ;  $p = 0,0274$ ) e TNF/IL-10 ( $r_{(8)} = 0,787$ ;  $p = 0,0204$ ) apenas nos animais não submetidos ao evento inflamatório. Nos demais grupos, não houve nem correlação IL-6/IL-10 nem TNF/IL-10.

**Tabela 2:** Resultados da análise de correlação (Correlação de Pearson) entre IL-6/IL-10 e TNF/IL-10 quando os tratamentos são administrados seguindo o protocolo profilático.

Correlação	Evento	Coefficiente ( $r_{(n)}$ )	p
IL-6/IL-10	Controle + salina	$r_{(7)} = -0,378$	0,402
	Controle + IMI	$r_{(8)} = 0,764$	0,0274
	Controle + HYP	$r_{(7)} = 0,782$	0,0378
	LPS + salina	$r_{(8)} = 0,711$	0,0213
	LPS + IMI	$r_{(9)} = -0,0726$	0,853
	LPS + HYP	$r_{(10)} = 0,711$	0,0213
	TNF/IL-10	Controle + salina	$r_{(7)} = 0,310$
Controle + IMI		$r_{(8)} = 0,787$	0,0204
Controle + HYP		$r_{(7)} = 0,917$	0,00362
LPS + salina		$r_{(8)} = -0,351$	0,394
LPS + IMI		$r_{(9)} = 0,337$	0,375
LPS + HYP		$r_{(10)} = 0,883$	0,000716

Coefficientes de correlação:  $r = 1$  (perfeita positiva);  $1 > r \geq 0,8$  (forte positiva);  $0,8 > r \geq 0,5$  (moderada positiva);  $0,5 > r \geq 0,1$  (fraca positiva);  $0,1 > r \geq 0$  (ínfima positiva);  $r = 0$  (nula);  $0 < r \leq -0,1$  (ínfima negativa);  $-0,1 < r \leq -0,5$  (fraca negativa);  $-0,5 < r \leq -0,8$  (moderada negativa);  $-0,8 < r \leq -1$  (forte negativa);  $r = -1$  (perfeita negativa). Aceitou-se os valores com  $p < 0,05$ .



**Figura 6:** Gráficos de correlação positiva entre as citocinas IL-6/IL-10 e TNF/IL-10 quando os tratamentos são administrados seguindo o protocolo profilático. (A) IL-6/IL-10 grupo controle + IMI, (B) IL-6/IL-10 grupo controle + HYP; (C) TNF/IL-10 grupo controle + IMI; (D) TNF/IL-10 grupo controle + HYP; (E) IL-6/IL-10 grupo LPS + HYP; (F) TNF/IL-10 grupo LPS + HYP; Correlação de Pearson. Aceitou-se os valores com  $p < 0,05$ .

A análise da relação (*ratio*) IL-10/IL-6 e IL-10/TNF (Tabela 3) demonstrou que os tratamentos e a administração de LPS combinada com a natação não alteraram as relações entre as citocinas (ANOVA de duas vias; F tratamento: IL-10/IL-6:  $F_{(2, 38)} = 0,544$ ;  $p = 0,585$ ; IL-10/TNF:  $F_{(2, 44)} = 0,593$ ;  $p = 0,558$ ; F LPS: IL-10/IL-6:  $F_{(1, 38)} = 0,209$ ;  $p = 0,651$ ; IL-10/TNF:  $F_{(1, 44)} = 0,00378$ ;  $p = 0,951$ ; F interação: IL-10/IL-6:  $F_{(2, 38)} = 0,661$ ;  $p = 0,523$ ; IL-10/TNF:  $F_{(2, 44)} = 0,745$ ;  $p = 0,482$ ).

**Tabela 3:** Resultados da análise de relação (*ratio*) entre IL-10/IL6 e IL-10/TNF quando os tratamentos são administrados seguindo o protocolo profilático.

Correlação	Evento	Média ± desvio padrão	
IL-10/IL-6	Controle + salina	11,069 ± 5,687	
	Controle + IMI	11,760 ± 6,109	
	Controle + HYP	11,163 ± 2,780	
	LPS + salina	11,088 ± 5,733	
	LPS + IMI	9,980 ± 5,893	
	LPS + HYP	17,081 ± 15,986	
	IL-10/TNF	Controle + salina	2,774 ± 0,285
		Controle + IMI	2,204 ± 0,899
		Controle + HYP	2,780 ± 0,455
LPS + salina		2,075 ± 0,792	
LPS + IMI		2,659 ± 2,050	
LPS + HYP		2,952 ± 1,545	

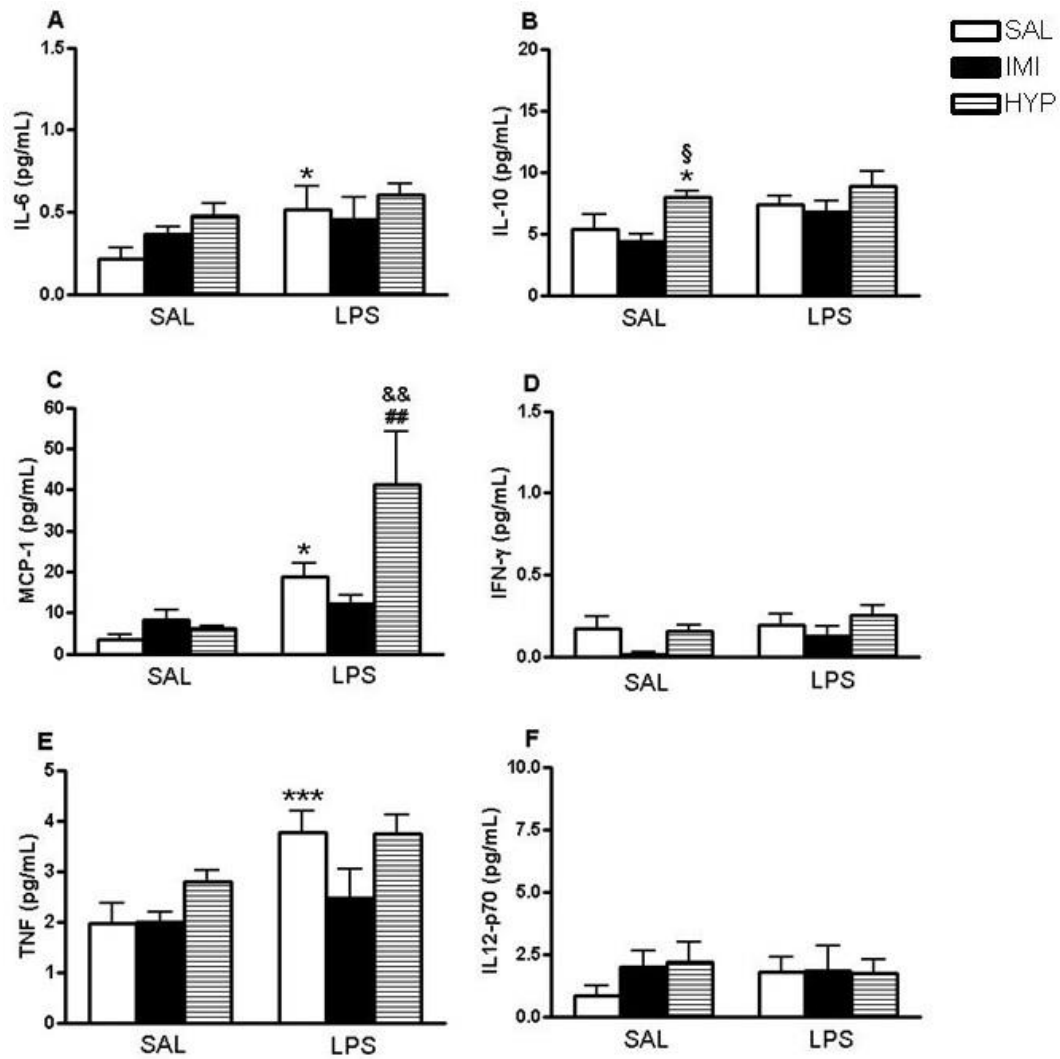
### 5.2.2 Protocolo Terapêutico

A ANOVA de duas vias (LPS e tratamentos) revelou diferentes efeitos dos tratamentos nos níveis de citocinas pró e anti-inflamatórias, dependendo da condição do animal (SAL ou LPS) e do tratamento. Todos os resultados estão apresentados na Figura 7.

Nesse protocolo, o grupo LPS tratado com salina apresentou aumento significativo os níveis das citocinas inflamatórias IL-6, MCP-1 e TNF (Figuras 7A, 7C e 7E), em relação ao grupo SAL tratado com salina (F tratamento: IL-6:  $F_{(2:62)} = 1,856$ ;  $p=0,166$ ; MCP-1:  $F_{(2:58)} = 3,464$ ;  $p<0,05$ ; TNF:  $F_{(2:48)} = 2,942$ ;  $p=0,061$ ); os níveis de IL-10, IFN- $\gamma$  e IL-12 não foram alterados (Figuras 7B, 7D, 7E).

A IMI não alterou significativamente os níveis de nenhuma das citocinas nem no grupo LPS nem no grupo SAL.

A administração de HYP aumentou significativamente os níveis de IL-10 apenas no Grupo SAL (F LPS $_{(1:61)} = 4,787$ ;  $p<0,05$ ; F tratamento $_{(2:61)} = 4,195$ ;  $p<0,05$ ) (Figura 7B). Por outro lado, o HYP aumentou significativamente os níveis de MCP-1 apenas no grupo LPS (F LPS $_{(1:59)} = 15,224$ ;  $p<0,001$ ; F tratamento $_{(2:59)} = 3,454$ ;  $p<0,05$ ; F interação $_{(2:59)} = 3,629$ ;  $p<0,05$ ) (Figura 7C).



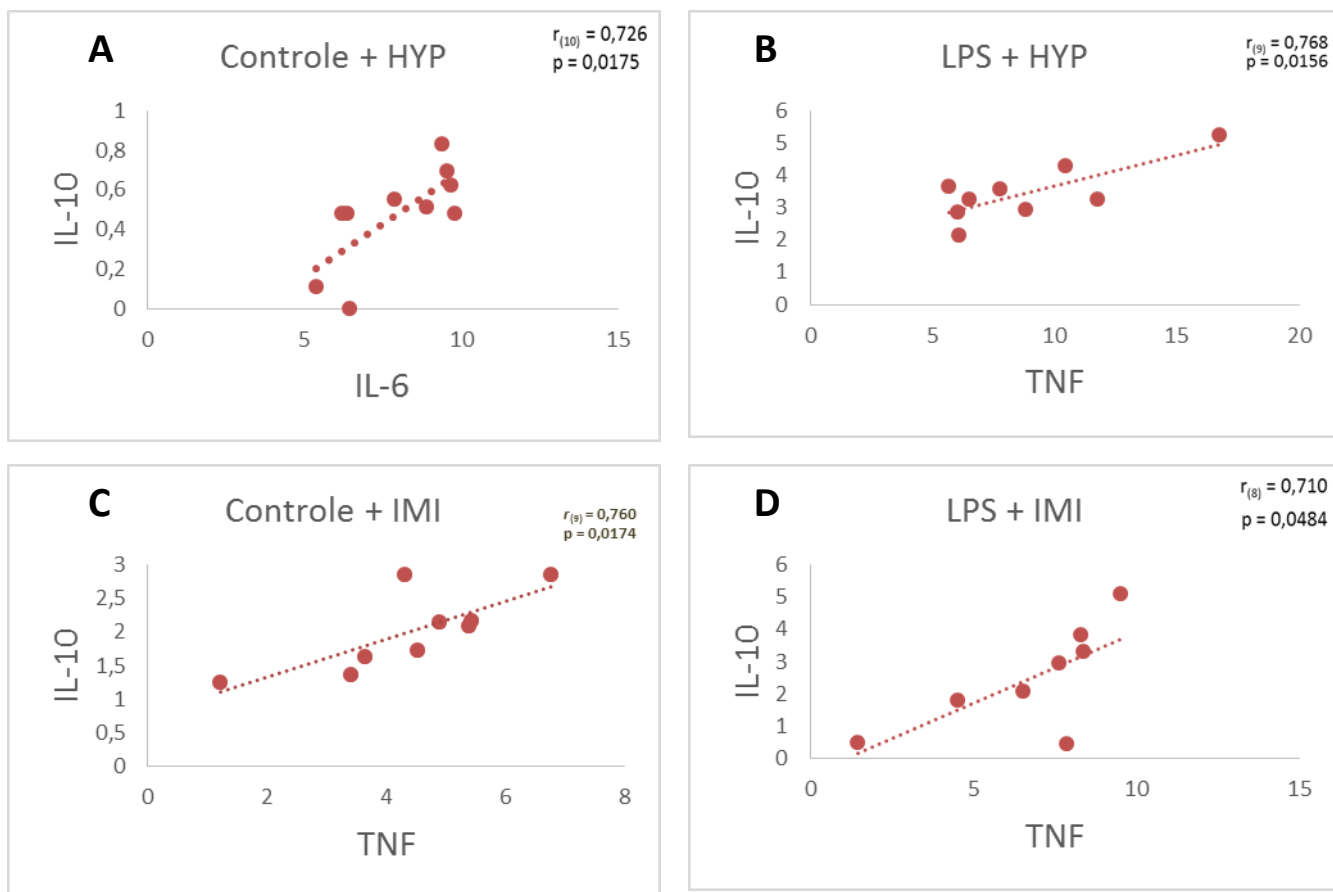
**Figura 7:** Efeito de hiperosídeo e de imipramina (HYP 20 mg/kg, i.p. e IMI 20 mg/kg), administrados 5 horas e 30 minutos depois da indução do evento inflamatório, sobre os níveis de citocinas inflamatórias em hipocampo de camundongos CF1, (A) IL-6, (B) IL-10; (C) MCP-1; (D) IFN- $\gamma$ ; (E) TNF; (F) IL12-p70; causados pela exposição a natação forçada (5 min) seguida da administração de LPS (600  $\mu$ g/kg, i.p.) ou SAL (NaCl 0,9%; 10 mg/kg, i.p.). Os animais (n=8-14/grupo) foram eutanasiados 1 hora depois da exposição ao teste de suspensão pela cauda. Os resultados estão expressos em média  $\pm$  erro padrão. ANOVA de duas vias, *post hoc* Student-Newman-Keuls. Diferenças significativas: \*p<0,05 quando comparado ao grupo SAL-SAL; §p<0,05 quando comparado com o grupo IMI-SAL; ##p<0,01 quando comparado ao grupo SAL-LPS; &&p<0,01 em comparação ao grupo IMI-LPS.

Os resultados da análise de correlação entre IL-6/IL-10 e TNF/IL-10 estão apresentados na Tabela 4. Foi possível observar uma correlação moderada positiva IL-6/IL-10 apenas no grupo tratado com hiperosídeo não submetido ao evento inflamatório ( $r_{(10)} = 0,726$ ;  $p = 0,0175$ ) e uma correlação moderada positiva TNF/IL-10 no grupo de animais submetidos ao evento inflamatório ( $r_{(9)} = 0,768$ ;  $p = 0,0156$ ). O tratamento com IMI resultou apenas em uma correlação moderada positiva TNF/IL-10 nos animais submetidos ( $r_{(8)} = 0,710$ ;  $p = 0,0174$ ) ou não ( $r_{(8)} = 0,710$ ;  $p = 0,0484$ ) ao evento inflamatório. O grupo controle do evento (natação + salina) apresentou uma correlação moderada TNF/IL-10 ( $r_{(14)} = 0,784$ ;  $p = 0,000897$ ). Os animais controle do evento que foram tratados com solução salina apresentaram uma correlação TNF/IL-10 moderada positiva. Nos demais grupos, não houve correlação IL-6/IL-10.

**Tabela 4:** Resultados da análise de correlação (Correlação de Pearson) entre IL-6/IL-10 e TNF/IL-10 quando os tratamentos são administrados seguindo o protocolo profilático.

Correlação	Evento	Coefficiente ( $r_{(n)}$ )	p
IL-6/IL10	Controle + salina	$r_{(14)} = 0,395$	0,163
	Controle + IMI	$r_{(9)} = 0,0753$	0,847
	Controle + HYP	$r_{(10)} = 0,726$	0,0175
	LPS + salina	$r_{(12)} = 0,571$	0,0524
	LPS + IMI	$r_{(8)} = 0,697$	0,0546
	LPS + HYP	$r_{(9)} = 0,155$	0,691
	TNF/IL10	Controle + salina	$r_{(14)} = 0,784$
Controle + IMI		$r_{(9)} = 0,760$	0,0174
Controle + HYP		$r_{(10)} = 0,534$	0,112
LPS + salina		$r_{(12)} = 0,00660$	0,984
LPS + IMI		$r_{(8)} = 0,710$	0,0484
LPS + HYP		$r_{(9)} = 0,768$	0,0156

Coefficientes de correlação:  $r = 1$  (perfeita positiva);  $1 > r \geq 0,8$  (forte positiva);  $0,8 > r \geq 0,5$  (moderada positiva);  $0,5 > r \geq 0,1$  (fraca positiva);  $0,1 > r \geq 0$  (ínfima positiva);  $r = 0$  (nula);  $0 < r \leq -0,1$  (ínfima negativa);  $-0,1 < r \leq -0,5$  (fraca negativa);  $-0,5 < r \leq -0,8$  (moderada negativa);  $-0,8 < r \leq -1$  (forte negativa);  $r = -1$  (perfeita negativa). Aceitou-se os valores com  $p < 0,05$ .



**Figura 8:** Gráficos de correlação positiva entre as citocinas IL-6/IL-10 e TNF/IL-10 quando os tratamentos são administrados seguindo o protocolo terapêutico. (A) IL-6/IL-10 grupo controle + HYP, (B) TNF/IL-10 grupo LPS + HYP; (C) TNF/IL-10 grupo controle + IMI; (D) TNF/IL-10 grupo LPS + IMI. Correlação de Pearson. Aceitou-se os valores com  $p < 0,05$ .

A análise da relação (*ratio*) IL-10/IL-6 e IL-10/TNF (Tabela 5) demonstrou que os tratamentos e a administração de LPS combinada com a natação não alteraram as relações entre as citocinas (ANOVA de duas vias; F tratamento: IL-10/IL-6:  $F_{(2, 47)} = 2,052$ ;  $p = 0,141$ ; IL-10/TNF:  $F_{(2, 56)} = 1,254$ ;  $p = 0,294$ ; F LPS: IL-10/IL-6:  $F_{(1, 47)} = 1,589$ ;  $p = 0,214$ ; IL-10/TNF:  $F_{(1, 56)} = 0,754$ ;  $p = 0,389$ ; F interação: IL-10/IL-6:  $F_{(2, 47)} = 2,495$ ;  $p = 0,095$ ; IL-10/TNF:  $F_{(2, 57)} = 1,492$ ;  $p = 0,235$ ).

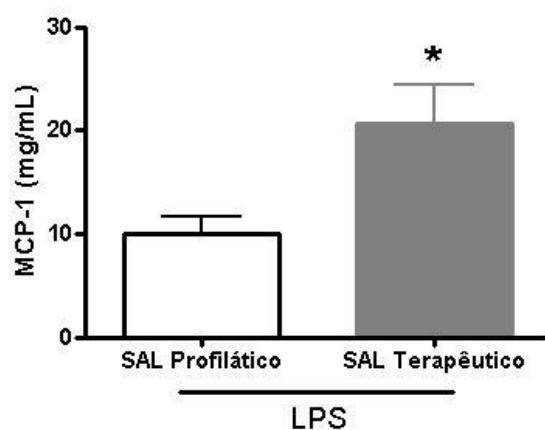
**Tabela 5:** Resultados da análise da relação (*ratio*) entre IL-10/IL-6 e IL-10/TNF quando os tratamentos são administrados seguindo o protocolo terapêutico.

Correlação	Evento	Média ± desvio padrão	
IL-10/IL-6	Controle + salina	35,693 ± 41,179	
	Controle + IMI	11,684 ± 5,639	
	Controle + HYP	14,891 ± 2,883	
	LPS + salina	13,571 ± 6,610	
	LPS + IMI	13,913 ± 4,308	
	LPS + HYP	15,605 ± 4,105	
	IL-10/TNF	Controle + salina	2,606 ± 1,382
		Controle + IMI	2,194 ± 0,567
		Controle + HYP	2,980 ± 0,786
LPS + salina		2,050 ± 0,595	
LPS + IMI		2,590 ± 0,486	
LPS + HYP		2,517 ± 1,108	

### 5.3 Comparação entre os níveis de MCP-1 nos dois protocolos

Tendo em vista alguns dados da relação de MCP-1 com a duração do comportamento de doente (Wohleb et al., 2011 e 2012) e a observação visual de diferenças entre os níveis desta citocina nos dois protocolos, no grupo LPS, foi realizado um teste “*t*” de Student para verificação de diferença entre as médias. Os níveis de MCP-1 hipocampais são significativamente maiores no protocolo terapêutico ( $p < 0,05$ ).





**Figura 9:** Comparação entre os níveis de MCP-1 entre os grupos LPS do protocolo profilático e terapêutico. O resultado está expresso em média  $\pm$  erro padrão. Teste “*t*” Student. Diferença significativa \* $p < 0,05$ .

#### 5.4 Relação entre o tempo de imobilidade e os níveis de IL-10

Considerando relatos na literatura que indicam o aumento nos níveis de IL-10 podem prevenir o comportamento do tipo deprimido (Bluthé et al., 1999; Mesquita et al., 2009), foi realizada a análise pela Correlação de Pearson, a qual revelou que não ocorreu correlação entre o tempo de imobilidade dos animais no teste de suspensão pela cauda com os níveis de IL-10 (dados não apresentados).



## **6 DISCUSSÃO**

---



Neste trabalho, o evento inflamatório foi induzido pela prévia exposição dos animais a um evento estressor (sessão de natação forçada) com posterior administração de LPS para que ocorresse a manifestação do comportamento de doente e do tipo deprimido nos animais. Independentemente do protocolo de administração dos tratamentos, a administração de LPS causou alterações comportamentais características do comportamento de doente ou *sickness behavior* (SB) observadas 06 horas depois da indução do evento inflamatório, como a redução da atividade locomotora, a manifestação de sintomas de doente e o aumento no nível das citocinas pró-inflamatórias IL-6, TNF, MCP-1 e IFN- $\gamma$ , assim como em outros trabalhos na literatura (Dantzer et al., 2008; Gibb et al., 2008; Viana et al., 2010; Maes et al., 2012b; Müller, 2014; Stepanichev et al., 2014).

Sabe-se que o comportamento de doente tende a ser extinto 24 horas depois da administração de LPS (Dantzer et al., 2008), no entanto, no presente trabalho, isso não ocorreu no grupo de animais submetidos ao esquema terapêutico de administração dos tratamentos, somente nos grupos submetidos ao esquema profilático. A atividade locomotora dos animais LPS submetidos ao esquema terapêutico continuou reduzida e eles ainda manifestaram os sintomas do SB, mesmo depois de 24 horas da indução do evento inflamatório.

A administração de LPS elevou os níveis da quimiocina MCP-1 nos grupos LPS dos dois protocolos, e esse aumento foi mais significativo nos animais LPS submetidos ao protocolo terapêutico do que naqueles submetidos ao esquema profilático de administração. Wohleb e colaboradores (2012) encontraram que a combinação de um estímulo estressor com a administração de LPS em camundongos aumentou os níveis de macrófagos com receptor para MCP-1 ativados principalmente no hipocampo, o que causa uma resposta neuroinflamatória prolongada e a atividade exploratória espontânea desses animais permaneceu reduzida por 72 horas depois da administração de LPS. Além disso,

em um estudo anterior do grupo (Wohleb et al., 2011) o estímulo com LPS em cultura de microglia, aumentou significativamente os níveis da quimiocina MCP-1.

Assim, esses dados podem explicar o prolongamento do comportamento de doente dos animais LPS submetidos ao protocolo terapêutico de tratamento no presente trabalho.

Quando IMI foi administrada seguindo o protocolo profilático de tratamento, preveniu o desenvolvimento do comportamento de doente, aumentando o número de cruzamentos no campo aberto e reduzindo o *score* da manifestação dos sintomas 06 horas depois da administração de LPS. Entretanto, quando a IMI foi administrada cinco horas e trinta minutos depois da indução do evento inflamatório, não reverteu a diminuição da atividade locomotora nem a manifestação dos sintomas do SB nos animais induzida pela administração de LPS, em nenhum momento (06 ou 24 horas depois da administração de LPS). Esses resultados vão ao encontro de outros dados da literatura, os quais mostram o efeito preventivo e não terapêutico da IMI frente ao comportamento de doente (Mello et al., 2013; Elgarf et al., 2014; Müller, 2014).

Ainda, no presente trabalho, a IMI diminuiu os níveis hipocâmpais das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF nos animais LPS, quando administrada antes da indução do evento inflamatório. No entanto, a IMI não alterou os níveis de nenhuma das citocinas, nem nos animais SAL nem nos animais LPS, no regime terapêutico de administração, indicando que a IMI pode exercer uma atividade anti-inflamatória quando administrada profilaticamente.

Esses resultados estão de acordo com a maioria dos trabalhos da literatura, os quais mostram que diferentes antidepressivos, previnem o aumento dos níveis de citocinas inflamatórias (Hwang et al., 2008; Horikawa et al., 2010; Liu et al., 2011). Ainda, estudos mostram que a IMI diminui os níveis das citocinas inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF (Hwang et al., 2008; Bielecka et al., 2009; Lee et al., 2012; Obuchowicz et al., 2014; Ramirez et al., 2015). Contudo, Elgarf e

colaboradores (2014) encontraram que a administração crônica de IMI depois da administração de LPS reverteu o comportamento de doente induzido por LPS seguido de estresse crônico. Essa diferença em relação aos nossos resultados pode ser pela diferença na frequência de administração dos tratamentos, pois a administração de IMI neste trabalho foi em dose única.

A administração de HYP, 30 min antes da indução da inflamação, reduziu a manifestação dos sintomas do SB, apesar de não prevenir a redução da atividade locomotora dos animais LPS, o que pode indicar uma atividade protetora parcial em relação ao comportamento de doente. Uma alternativa para se observar uma possível prevenção completa do comportamento de doente seria avaliar a variação de temperatura e peso corporal dos animais (Dantzer et al., 2008; Harden et al., 2011).

Assim como a IMI, quando o HYP foi administrado seguindo o protocolo terapêutico, não reverteu a redução da atividade locomotora nem reduziu a manifestação dos sintomas do SB nos animais LPS. Existem diversos trabalhos na literatura apresentando principalmente os efeitos preventivos (e não terapêuticos) de antidepressivos convencionais e de moléculas ou extratos com potencial antidepressivo (Choi et al., 2012; Park et al., 2012; Lee et al., 2013; Hwang et al., 2008; Mello et al., 2013; Neamati et al., 2014).

No modelo de indução do comportamento de doente e do tipo depressivo utilizado neste trabalho, a administração profilática de HYP, aumentou os níveis de todas as citocinas (IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , MCP-1, IL12p70), mas, ao ser administrada terapêuticamente, aumentou somente os níveis de IL-10, no grupo SAL, e de MCP-1, nos animais LPS. Esses dados indicam que o HYP pode estar atuando de uma forma pró-inflamatória e não anti-inflamatória como relatado na literatura.

Todavia, a maior parte dos relatos de atividade anti-inflamatória do HYP se baseia em modelos *in vitro* utilizando-se diferentes linhagens celulares e alvos

biológicos (Melzig et al., 2001; Hammer et al., 2007; Lee et al., 2008; Han et al., 2014; Ku et al., 2014a; Ku et al., 2014b). Nesses trabalhos o HYP diminui o aumento dos níveis das citocinas inflamatórias induzida por LPS quando adicionado às culturas de células. No entanto, Ku e colaboradores (2014a) testaram o HYP em um modelo *in vivo* de sepse causada por punção e ligação cecal, e o HYP reduziu a produção de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ .

Outros flavonoides também já foram testados no modelo de comportamento de doente induzido pela administração de LPS. O flavonoide mangiferina reverteu a redução da atividade locomotora e reduziu os níveis hipocámpais de IL-6 somente 24 horas depois da administração de LPS em camundongos (Fu et al., 2014). O flavonoide quercetina também atenuou a manifestação dos sintomas do SB induzidos pela administração de LPS em ratos (Sah et al., 2011). Estudos *in vitro* têm mostrado que a administração de flavonoides em diferentes tipos de cultura de células, microgliais ou de macrófagos, reduz a expressão e produção de citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  (Zheng et al., 2008; Ha et al., 2012; Zhang et al., 2014b).

A administração de LPS também induz um comportamento do tipo deprimido que pode ser observado 24 horas depois da administração do mesmo aos animais (Dantzer et al., 2008). A combinação de um evento estressor com a administração de LPS intensifica o comportamento do tipo deprimido em roedores, aumentando o tempo de imobilidade no teste de natação forçada ou no teste de suspensão pela cauda, além de aumentar os níveis de TNF- $\alpha$  comparado aos animais que recebem somente LPS ou foram somente estressados ou receberam solução salina (Viana et al., 2010; Elgarf et al., 2014).

No presente trabalho, o comportamento do tipo deprimido foi observado pela submissão dos animais ao teste de suspensão pela cauda. Os animais que receberam LPS e foram tratados com salina desenvolveram um comportamento do tipo deprimido, apesar de não apresentarem um aumento significativo no tempo de



imobilidade quando comparado ao grupo SAL, como era esperado (Viana et al., 2010; Elgarf et al., 2014).

A administração de IMI e HYP reduziu o tempo de imobilidade no TSC tanto dos animais LPS submetidos ao protocolo profilático quanto dos animais SAL do regime terapêutico, confirmando a atividade antidepressiva dessas moléculas (Haas et al, 2011; Müller et al., 2012). Contudo, somente a IMI diminuiu o tempo de imobilidade dos animais SAL do regime profilático.

O comportamento do tipo deprimido também está relacionado com a elevação nos níveis das citocinas pró-inflamatórias e diminuição das anti-inflamatórias (Dantzer et al., 2008; Hiles et al., 2012). Dhabhar e colaboradores (2009) mostraram que pacientes deprimidos não tratados possuem baixos níveis séricos de IL-10, o que leva a uma quebra na relação entre IL-6/IL-10, quando comparados a pacientes não deprimidos, que possuem uma correlação IL-6/IL-10 positiva.

Neste trabalho, a administração profilática de IMI nos animais SAL não alterou os níveis das citocinas IL-6, IL-10 e TNF, no entanto, correlacionando-se os níveis das citocinas pró-inflamatórias com IL-10, a IMI possui uma correlação IL-6/IL-10 e TNF/IL-10 positiva, sugerindo que esses animais não se encontram deprimidos, o que é visualizado pela diminuição no tempo de imobilidade no TSC. Entretanto, nos animais que receberam LPS, a IMI diminuiu os níveis das interleucinas IL-6 e TNF, o que também previne o desenvolvimento do comportamento de doente e do tipo deprimido, aumentando o número de cruzamentos no teste de campo aberto 06 horas após a indução do evento inflamatório e diminuindo o tempo de imobilidade no TSC 24 horas depois.

Já a administração terapêutica de IMI não alterou os níveis de nenhuma citocina, porém a correlação TNF/IL-10 foi positiva no grupo não submetido ao evento inflamatório, o que pode sugerir que esses animais não se encontram debilitados, não apresentando um comportamento do tipo deprimido no TSC.

Apesar de a IMI apresentar uma correlação positiva TNF/IL-10 nos animais LPS, a IMI não reverteu os prejuízos induzidos pela administração de LPS nem no comportamento de doente nem no tipo deprimido, como demonstrado anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa (Müller, 2014).

O HYP apresenta atividade do tipo antidepressiva em roedores no modelo de natação forçada, pois reduz o tempo de imobilidade dos animais (Haas et al., 2010; Zheng et al., 2012) e, nesse trabalho, foi observada, pela primeira vez, a atividade do tipo antidepressiva do HYP no teste de suspensão pela cauda, o que reforça o potencial antidepressivo desse flavonoide. Também foi relatada pela primeira vez a relação entre a atividade anti-inflamatória do HYP com a atividade antidepressiva. Ainda que o HYP, nesse trabalho, aumente os níveis de todas as citocinas quando administrado de forma profilática aos dois grupos de camundongos (grupo LPS e grupo SAL), correlacionando-se os níveis entre as citocinas pró-/anti-inflamatórias, o HYP apresentou uma correlação positiva IL-6/IL10 nos animais SAL e uma correlação positiva TNF/IL-10 tanto nos animais SAL quanto LPS. Essas correlações indicam que o HYP tende a aumentar os níveis de IL-10. Por outro lado, quando analisadas as relações (*ratio*) entre IL-10/IL-6 e IL-10/TNF, foi possível observar que estas não foram afetadas nem pela indução do evento inflamatório (natação+LPS), nem dos tratamentos.

Considerando que as medidas das citocinas foram realizadas 25 horas (protocolo profilático) ou 19 horas (protocolo terapêutico) após os tratamentos e a administração de LPS, este resultado sugere uma recuperação de todos os animais ao insulto inflamatório, o que está de acordo com estudos que demonstram que o comportamento de doente tende a ser extinto 24 h depois da administração de LPS (Dantzer et al., 2008). Além disso, a elevação persistente da relação citocinas anti-inflamatórias/citocinas pró-inflamatórias é considerada por alguns autores como um mau prognóstico em humanos (Gogos et al., 2000; Tsigou et al., 2014) .

A administração terapêutica de HYP aumentou somente os níveis de IL-10 e apresentou uma relação IL-6/IL-10 positiva no grupo SAL, o que pode contribuir para que esses animais não apresentassem um comportamento do tipo deprimido no TSC. Nos animais do grupo LPS, o HYP aumentou os níveis de MCP-1 e apresentou uma correlação positiva TNF/IL-10, mas não foi possível observar uma diminuição do tempo de imobilidade no TSC. Possivelmente, esses animais ainda estariam apresentando uma resposta inflamatória influenciada pelo recrutamento dos neutrófilos, monócitos e linfócitos no hipocampo (Abbas, 2012; Young et al., 2014).

Neste trabalho, a redução dos sintomas do SB e o efeito antidepressivo do HYP também podem ser decorrentes do aumento nos níveis da interleucina anti-inflamatória IL-10, já que o HYP aumentou os níveis de IL-10 tanto quando administrado profilaticamente (nos grupos SAL e LPS) quanto terapêuticamente (somente no grupo SAL).

O comportamento de doente e do tipo deprimido também está relacionado com a diminuição nos níveis de IL-10, dado que a administração central ou periférica de IL-10 atenua as mudanças comportamentais decorrentes da administração de LPS (Bluthé et al., 1999; Harvey et al., 2006; Harden et al., 2013).

Mesquita e colaboradores (2009) demonstraram que camundongos que super-expressam IL-10 reduzem o tempo de imobilidade no teste de natação forçada e que os animais que não expressam o gene para IL-10 tiveram o tempo de imobilidade aumentado, o qual foi revertido após a administração de IL-10, indicando uma atividade do tipo antidepressiva da IL-10.

Ademais, Dhabhar e colaboradores (2009) mostraram que pacientes depressivos não tratados possuem baixos níveis de IL-10 quando comparados a pacientes saudáveis. Holtzman e colaboradores (2012) verificaram que pacientes geneticamente pré-dispostos a produzir uma menor quantidade de IL-10 e,

consequentemente uma resposta anti-inflamatória menor, estão mais suscetíveis a apresentar sintomas depressivos.

O comportamento do tipo deprimido induzido pelo aumento das citocinas pró-inflamatórias ou por LPS também pode ser decorrente da ativação da enzima indolamina 2,3-dioxigenase (IDO) pelas citocinas pró-inflamatórias. Como uma das funções biológicas da IL-10 é inibir a produção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e MCP-1 pelos macrófagos ativados (Moore et al., 2001; Dhabhar et al., 2009; Kindt et al., 2012), a IL-10 pode, indiretamente, diminuir a atividade da IDO, a qual degrada o aminoácido triptofano, diminuindo os níveis de serotonina, o que leva ao desenvolvimento do comportamento do tipo depressivo em roedores (Myint and Kim, 2003; Dantzer et al., 2008; O'Connor et al., 2009b; Fu et al., 2010; Maes et al., 2012b; Dinel et al., 2014).

Como o HYP aumentou, de maneira geral, os níveis da interleucina anti-inflamatória IL-10, a atividade antidepressiva observada nos animais tratados profilaticamente e que receberam LPS, também pode ser decorrente da inibição indireta da enzima IDO. Contudo estudos mais específicos são necessários para verificar a hipótese de inibição indireta da enzima IDO e confirmar a relação entre as atividades anti-inflamatória e antidepressiva do HYP.

## **7 CONCLUSÕES**

---



A partir dos resultados apresentados, conclui-se que o hiperosídeo, quando administrado profilaticamente, protege parcialmente camundongos da indução do comportamento de doente pela exposição a um estímulo estressor juntamente com a administração de LPS, diminuindo a manifestação dos sintomas de doente. Além disso, esse trabalho confirma o efeito do tipo antidepressivo de HYP e, pela primeira vez, o HYP apresentou uma atividade do tipo antidepressiva no teste de suspensão pela cauda. Ainda, a ação do hiperosídeo nesse modelo pode ser mediada pelo aumento dos níveis hipocâmpais da interleucina anti-inflamatória IL-10.





## **8 REFERÊNCIAS**

---



ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular** [recurso eletrônico], Elsevier, Rio de Janeiro, 2012.

ABBASI, S.H.; HOSSEINI, F.; MODABBERNIA, A.; ASHRAFI, M.; AKHONDZADEH, S. Effect of celecoxib add-on treatment on symptoms and serum IL-6 concentrations in patients with major depressive disorder: randomized double-blind placebo-controlled study. **Journal of Affective Disorders**, v. 141, pp. 308–314, 2012.

AGUIAR, C.C.; CASTRO, T.R.; CARVALHO, A.F.; VALE, O.C.; SOUSA, F.C.; VASCONCELOS, S.M. Drogas antidepressivas. **Acta Médica Portuguesa**, v. 24, pp. 91-98, 2011.

AI, G.; HUANG, Z.; WANG, D.; LIU, Z. Study on toxicity of hyperoside in rat embryo-fetal development. **Zhongguo Zhong Yao Za Zhi**, v. 37(16), pp. 2452-5, 2012.

AKHONDZADEH, S.; JAFARI, S.; RAISI, F.; NASEHI, A.A.; GHOREISHI, A.; SALEHI, B.; MOHEBBI-RASA, S.; RAZNAHAN, M.; KAMALIPOUR, A. Clinical trial of adjunctive celecoxib treatment in patients with major depression: a double blind and placebo controlled trial. **Depression and Anxiety**, v. 26, pp. 607-611, 2009.

AKKOL, E.K.; ACIKARA, Ö.B.; SÜNTAR, I.; ERGENE, B.; ÇITOGLU, G.S. Ethnopharmacological evaluation of some *Scorzonera* species: in vivo anti-inflammatory and antinociceptive effects. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 140, pp. 261–270, 2012.

ARCHER, T.; OSCAR-BERNAN, M.; BLUM, K.; GOLD, M.S. Epigenetic modulation of mood disorders. **Journal of Genetic Syndromes & Gene Therapy**, v. 4, 2013

BAUNE, B.T.; SMITH, E.; REPPERMUND, S.; AIR, T.; SAMARAS, K.; LUX, O.; BRODATY, H.; SACHDEV, P.; TROLLOR, J.N. Inflammatory biomarkers predict depressive, but not anxiety symptoms during aging: The prospective Sydney memory and aging study. **Psychoneuroendocrinology**, v. 37, pp. 1521-1530, 2012.

BEHNKE, K.; JENSEN, G.S.; GRAUBAUM, H.J.; GRUENWALD, J.G. Hypericum perforatum versus fluoxetine in the treatment of mild to moderate depression. **Advances in therapy**, v. 19, pp.43-52, 2002.

BERK, M.; DEAN, O.; DREXHAGE, H.; MCNEIL, J.J.; MOYLAN, S.; O'NEIL, A.; DAVEY, C.G.; SANNA, L.; MAES, M. Aspirin: a review of its neurobiological properties and therapeutic potential for mental illness. **BMC Medicine**, v. 11(74), pp. 1-17, 2013.

BIELECKA, A.M.; PUDEKO, A.; OBUCHOWICZ, E.; Influence of imipramine, moclobemide and fluoxetine on pro-inflammatory (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) and anti-inflammatory (IL-10) cytokines in lipopolysaccharide-stimulated primary rat mixed glial cell cultures. **Pharmacological Reports**, v. 61(2), pp. 371, 2009.

BIESMANS, S.; MEERT, T.F.; BOUWKNECHT, J.A.; ACTON, P.D.; DAVOODI, N.; DE HAES, P.; KUIJLAARS, J.; LANGLOIS, X.; MATTHEWS, L.J.R.; DONCK, L.V.; HELLINGS, N.; NUYDENS. Systemic immune activation leads to neuroinflammation and sickness behavior in mice. **Mediators of Inflammation**; v. 2013, pp. 1-14, 2013. doi: 10.1155/2013/271359

BLUTHÉ, R.M.; CASTANON, N.; BRISTOW, F.P.A.; BALL, C.; LESTAGE, J.; MICHAUD, B.; KELLEY, K.W.; DANTZER, R. Central injection of IL-10 antagonizes the behavioural effects of lipopolysaccharide in rats; **Psychoneuroendocrinology**, v. 24, pp. 301–311, 1999.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) - **Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal**, 2013.

BRASIL. Ministério Público. Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. Publicada no DOU 9.10.2008.

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

BUTTERWECK, V.; NISHIBE, S.; SASAKI, T.; UCHIDA, M. Antidepressant effects of *Apocynum venetum* leaves in a forced swimming test. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 24(7), pp. 848—851, 2001.

BUTTERWECK, V.; HEGGER, M.; WINTERHOFF, H. Flavonoids of St. John's Wort reduce HPA axis function in the rat. **Planta Medica**, v. 70, pp. 1008-1011, 2004.

CAZARETH, J.; GUYON, A.; HEURTEAUX, C.; CHABRY, J.; PETIT-PAITEL, A. Molecular and cellular neuroinflammatory status of mouse brain after systemic lipopolysaccharide challenge: importance of CCR2/CCL2 signaling. **Journal of Neuroinflammation**, v. 11(132), pp. 1-15, 2014.

CHANG, Q.; ZUO, Z.; CHOW, M.S.S.; HO, W.K.K. Difference in absorption of the two structurally similar flavonoid glycosides, hyperoside and isoquercitrin in rats. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 59, pp. 549–555, 2005.

CHEN, H.Y.; WANG, J.H.; REN, Z.X.; YANG, X.B. Protective effect of hyperin on focal cerebral ischemia reperfusion injury in rats; **Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao**, v. 4(5), pp. 526-529, 2006.

CHEN, Z.; ZHANG, J.; MA, C.; Protective effect of hyperin on cerebral infarction in rats. **Zhongguo Zhong Yao Za Zhi**, v. 23(10), pp. 626-628, 1998a.

CHEN, Z.; MA, C.; ZHAO, W. Protective effect of hyperin against cerebral ischemia-reperfusion injury. **Yao Xue Xue Bao**, v. 33(1), pp. 14-17, 1998b.

CHEN, Z.W.; MA, C.G.; FANG, M.; XU S.Y. The blocking effect of hyperin on the inward flow of calcium ion. **Yao Xue Xue Bao**, v. 29(1), pp.15-9, 1994.

CHEN, Z.W.; MA, C.G. Effects of hyperin on free intracellular calcium in dissociated neonatal rat brain cells. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 30(1), pp. 27-30, 1999.

CHEN, Z.W.; MA, C.G.; XU, S.Y. Mechanism of analgesic action of hyperin. **Yao Xue Xue Bao**, v. 24(5), pp. 326-30, 1989.

CHOI, D.-Y.; LEE, J.W.; LIN, G.; LEE, Y.K.; LEE, Y.H.; CHOI, I.S.; HAN, S.B.; JUNG, J.K.; KIM, Y.H.; KIM, K.H.; OH, K.-W.; HONG, J.T.; LEE, M.S. Obovatol attenuates LPS-induced memory impairments in mice via inhibition of NF- $\kappa$ B signaling pathway. **Neurochemistry International**, v. 60(1), pp. 68-77, 2012.

CHOI, J.H.; KIM, D.W.; YUN, N.; CHOI, J.S.; ISLAM, N.; KIM, Y.S.; LEE, S.M. Protective effects of hyperoside against carbon tetrachloride-induced liver damage in mice. **Journal of Natural Products**, v. 74, pp. 1055–1060, 2011.

CONDUCTIER, G.; BLONDEAU, N.; GUYON, A.; NAHON, J.L.; ROVÈRE; C. The role of monocyte chemoattractant protein MCP1/CCL2 in neuroinflammatory diseases. **Journal of Neuroimmunology**, v. 224, pp. 93–100, 2010.

CONG, Y.; GUO, J.; WANG, T.; LI, M.; LI, K.; WANG, J.; LI, Q. Chemical constituents and antitumor activity on leukemia K562 cell of *Leonurus heterophyllus*. **Zhongguo Zhong Yao Za Zhi**, v. 34(14), pp.1816-1818, 2009.

CROCKETT, S.L.; ROBSON, N.K. Taxonomy and chemotaxonomy of the genus *Hypericum*. **Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology**, v. 5, pp.1-13, 2011.

DAHL, J.; ORMSTAD, H.; AASS, H.C.D.; MALT, U.F.; BENDZ, L.T.; SANDVIK, L.; BRUNDIN, L.; ANDREASSEN, O.A. The plasma levels of various cytokines are increased during ongoing depression and are reduced to normal levels after recovery. **Psychoneuroendocrinology**, v. 45, pp. 77—86, 2014.

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

DANTZER, R.; O'CONNOR, J.C.; FREUND, G.G.; JOHNSON, R.W.; KELLEY, K.W. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 9(1), pp. 46–56, 2008.

DANTZER, R.; O'CONNOR, J.C.; LAWSON, M.A.; KELLEY K.W.; Inflammation-associated depression: from serotonin to kynurenine. **Psychoneuroendocrinology**, v. 36, pp. 426-436, 2011.

DENG, X.; LI, M.; AI, W.; HE, L.; LU, D.; PATRYLO, P.R.; CAI, H.; LUO X.; LI Z.; YAN X. Lipopolysaccharide-induced neuroinflammation is associated with Alzheimer-like amyloidogenic axonal pathology and dendritic degeneration in rats. **Advances in Alzheimer's Disease**, v. 3(2), pp.78-93, 2014.

DHABHAR, F.S.; BURKE, H.M.; EPEL, L.S.; MELLON, S.H.; ROSSER, R.; REUS, V.I.; WOLKOWITZ, O.M.; Low serum IL-10 concentrations and loss of regulatory association between IL-6 and IL-10 in adults with major depression. **Journal of Psychiatric Research**, v. 43, pp. 962–969, 2009.

DINEL, A.L.; ANDRÉ, C.; AUBERT, A.; FERREIRA. G.; LAYÉ, S.; CASTANON, N. Lipopolysaccharide-induced brain activation of the indoleamine 2,3-dioxygenase and depressive-like behavior are impaired in a mouse model of metabolic syndrome. **Psychoneuroendocrinology**, v. 40, pp. 48-59, 2014.

DOS SANTOS, A.E.; KUSTER, R.M.; YAMAMOTO, K.A.; SALLES, T.S.; CAMPOS, R.; DE MENESES, M.D.F.; SOARES, M.R.; FERREIRA, D. Quercetin and quercetin 3- O-glycosides from *Bauhinia longifolia* (Bong.) Steud. show anti-Mayaro virus activity. **Parasites & Vectors**, v. 7, pp. 130-137, 2014.



DOWLATI, Y.; HERRMANN, N.; SWARDFAGER, W.; LIU, H.; SHAM, L.; REIM, E.K.; LANCTÔT, K.L. A meta-analysis of cytokines in major depression; **Biological Psychiatry**, v. 67, pp. 446-457, 2010.

DUARTE, M.O.; LUNARDELLI, S.; KIEKOW, C.J.; STEIN, A.C.; MÜLLER, L.; STOLZ, E.; RATES, S.M.; GOSMANN, G. Phloroglucinol derivatives present an antidepressant-like effect in the mice tail suspension test (TST). **Natural Products Communication**, v. 9(5), pp. 671-674, 2014.

DUNN, A.J. Effects of cytokines and infections on brain neurochemistry. **Clinical Neuroscience Research**, v. 6, pp. 52–68, 2006.

DWIVEDI, Y. Involvement of brain-derived neurotrophic factor in late-life depression. **American Journal of Geriatric Psychiatry**, v. 21, pp. 433-449, 2013.

ELGARF, A.S.A.; ABOUL-FOTOUH, S.; ABD-ALKHALEK, H.A.; EL TABBAL, M.; HASSAN, A.N.; KASSIM, S.K.; HAMMOUDA, G.A.; FARRAG, K.A.; ABDEL-TAWAB, A.M.; Lipopolysaccharide repeated challenge followed by chronic mild stress protocol introduces a combined model of depression in rats: reversibility by imipramine and pentoxifylline. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 126, pp. 152–162, 2014.

ERDEMOGLU, N.; AKKOL, E.K.; YESILADA, E.; CALIS, I. Bioassay-guided isolation of anti-inflammatory and antinociceptive principles from a folk remedy *Rhododendron ponticum* L. leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 119, pp. 172–178, 2008.

FAN, Y.F.; CHEN, Z.W.; GUO, Y.; WANG, Q.H.; SONG, B. Cellular mechanisms underlying hyperin-induced relaxation of rat basilar artery. **Fitoterapia**, v. 82, pp. 626–631, 2011.

FELGER, J.C.; LOTRICH, F.E. Inflammatory cytokines in depression: neurobiological mechanisms and therapeutic implications. **Neuroscience**, v. 246, pp. 199–229, 2013.

FRITZ, D.; VENTURI, C.R.; CARGNIN, S.; SCHRIPSEMA, J.; ROEHE, P.M.; MONTANHA, J.A.; VON POSER, G.L. Herpes virus inhibitory substances from *Hypericum connatum* Lam., a plant used in southern Brazil to treat oral lesions. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, pp.517-520, 2007.

FU, X.; ZUNICH, S.M.; O'CONNOR, J.C.; KAVELAARS, A.; DANTZER, R.; KELLEY, K.W.; Central administration of lipopolysaccharide induces depressive-like behavior in vivo and activates brain indoleamine 2,3 dioxygenase in murine organotypic hippocampal slice cultures. **Journal of Neuroinflammation**, v. 7, pp. 43, 2010.

FU, Y.Y.; ZHANG, F.; ZHANG, L.; LIU, H.Z.; ZHAO, Z.M.; WEN, X.R.; WU, J.; QI, D.S.; SUN, Y.; DU, Y.; DONG, H.Y.; LIU, Y.H.; SONG, Y.J. Mangiferin regulates interleukin-6 and cystathionine-b-synthase in lipopolysaccharide-induced brain injury. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 34, pp. 651–657, 2014.

GALEOTTI, N.; VIVOLI, E.; BILIA, A.R.; BERGONZI, M.C.; BARTOLINI, A.; GHELARDINI, C. A prolonged protein kinase C-mediated, opioid-related antinociceptive effect of St John's Wort in mice. **The Journal of Pain**, v. 11(2), pp. 149-159, 2010.

GELDERBLOM, W.C.A. The antimutagenic activity of the major flavonoids of rooibos (*Aspalathus linearis*): some dose–response effects on mutagen activation–flavonoid interactions. **Mutation Research**, v. 631, pp. 111–123, 2007.

GIBB, J.; AUDET, M.C.; HAYLEY, S.; ANISMAN, H.; Neurochemical and behavioral responses to inflammatory immune stressors. **Frontiers in Biosciences**, v. 1, pp. 275-295, 2009.

GIBB, J.; HAYLEY, S.; POULTER, M.O.; ANISMAN, H. Effects of stressors and immune activating agents on peripheral and central cytokines in mouse strains that differ in stressor responsivity. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 25, pp. 468–482, 2011.

GIORGETTI, M.; NEGRI, G.; RODRIGUES, E. Brazilian plants with possible action on the central nervous system – a study of historical source from the 16<sup>th</sup> to 19<sup>th</sup> century. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, pp. 338-347, 2007.

GIOTI, E.M.; FIAMEGOS, Y.C.; SKALKOS, D.S.; STALIKAS, C.D. Antioxidant activity and bioactive components of the aerial parts of *Hypericum perforatum* L. from Epirus, Greece. **Food Chemistry**, v. 117, pp. 398–404, 2009.

GOGOS, C.; DROSOU, E.; BASSARIS, H.P.; SKOUTELIS, A. Pro- versus anti-inflammatory cytokines profile in patients with severe sepsis: a marker for prognosis and future therapeutic options. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 181, pp. 176-180, 2000

GRAEFF, F.G.; GUIMARÃES, F.S. **Fundamentos de Psicofarmacologia**, segunda edição, Atheneu, São Paulo, 2012.

GRUNDMANN, O.; KELBER, O.; BUTTERWECK, V. Effects of St. John's Wort extract and single constituents on stress induced hyperthermia in mice. **Planta Medica**, v. 72, pp. 1366-1371, 2006.

GUO, J.; XUE, C.; DUAN J.A.; QIAN, D.; TANG, Y.; YOU, Y. Anticonvulsant, antidepressant-like activity of *Abelmoschus manihot* ethanol extract and its potential active components in vivo. **Phytomedicine**, v. 18, pp. 1250–1254, 2011a.

GUO, J.M.; XUE, C.; SHANG, E.X.; DUAN, J.A.; TANG, Y.; QIAN, D. Identification of hyperoside metabolites in rat using ultra performance liquid chromatography/quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 879, pp. 1987–1992, 2011b.

GUO, J.M.; LIN, P.; DUAN, J.A.; SHANG, E.X.; QIAN, D.W.; TANG, Y.P. Application of microdialysis for elucidating the existing form of hyperoside in rat brain: comparison between intragastric and intraperitoneal administration. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 144, pp. 664–670, 2012.

HA, S.K.; MOON, E.; LEE, P.; RYU, J.H.; OH, M.S.; KIM, S.Y. Acacetin attenuates neuroinflammation via regulation the response to LPS stimuli in vitro and in vivo. **Neurochemical Research**, v. 37, pp. 1560–1567, 2012.

HAAS, J.S.; STOLZ, E.D.; BETTI, A.H.; STEIN, A.C.; SCHRIPEMA, J.; VON POSER, G.L.; RATES, S.M.K. The anti-immobility effect of hyperoside on the forced swimming test in rats is mediated by the D2 like receptors activation. **Planta Medica**, v. 77, pp. 334–339, 2011.

HAMMER, K.D.P.; HILLWIG, M.L.; SOLCO, A.K.S.; DIXON, P.M.; DELATE, K.; MURPHY, P.A.; WURTELE, E.S.; BIRT, D.F. Inhibition of prostaglandin E2 production by anti-inflammatory *Hypericum perforatum* extracts and constituents in RAW264.7 mouse macrophage cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, pp. 7323–7331, 2007.

HAN, N.R.; GO, J.H.; KIM, H.M.; JEONG, H.J. Hyperoside regulates the level of thymic stromal lymphopoietin through intracellular calcium signaling. **Phytotherapy Research**, v. 28, pp. 1077–1081, 2014.

HARDEN, L.M.; DU PLESSIS, I.; ROTH, J.; LORAM, L.C.; POOLE, S.; LABURN, H.P. Differences in the relative involvement of peripherally released interleukin (IL)-6, brain IL-1 b and prostanoids in mediating lipopolysaccharide-induced fever and sickness behavior. **Psychoneuroendocrinology**, v. 36, pp. 608-622, 2011.

HARDEN, L.M.; RUMMEL, C.; LUHESHI, G.N.; POOLE, S.; GERSTBERGER, R.; ROTH, J. Interleukin-10 modulates the synthesis of inflammatory mediators in the sensory circumventricular organs: implications for the regulation of fever and sickness behaviors. **Journal of Neuroinflammation**, v. 10(22), 2013. doi:10.1186/1742-2094-10-22

HARVEY, D.; SMITH, R.; ENGLISH, K.; MAHON, B.; COMMINS, S. Interleukin-10 (IL-10) but not lipopolysaccharide (LPS) produces increased motor activity and abnormal exploratory patterns while impairing spatial learning in Balb/c mice. **Physiology & Behavior**, v. 87, pp. 842 – 847, 2006.

HASHIMOTO, K. The role of glutamate on the action of antidepressants. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 35, pp. 1558–1568, 2011.

HERNANDEZ, M.F.; FALÉ, P.L.V.; ARAÚJO, M.E.M.; SERRALHEIRO, M.L.M. Acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of the water extracts of several *Hypericum* species. **Food Chemistry**, v. 120, pp. 1076–1082, 2010.

HILES, S.A.; BAKER, A.L.; DE MALMANCHE, T.; ATTIA, J. A meta-analysis of differences in IL-6 and IL-10 between people with and without depression: exploring the causes of heterogeneity. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 26, pp. 1180–1188, 2012a.

HILES, S.A.; BAKER, A.L.; DE MALMANCHE, T.; ATTIA, J. Interleukin-6, C-reactive protein and interleukin-10 after antidepressant treatment in people with depression: a meta-analysis. **Psychological Medicine**, v. 42, pp. 2015–2026, 2012b.

HOLTZMAN, S.; ABBEY, S.E.; CHAN, C.; BARGMAN, J.M.; STEWART, D.E. A Genetic Predisposition to Produce Low Levels of IL-10 is Related to Depressive Symptoms: A Pilot Study of Patients with End Stage Renal Disease. **Psychosomatics**, v. 53, pp. 155-161, 2012.

HORIKAWA, H.; KATO, T.A.; MIZOGUCHI, Y.; MONJI, A.; SEKI, Y.; OHKURI, T.; GOTOH, L.; YONAHARA, M.; UEDA, T.; HASHIOKA, S.; KANBA, S. Inhibitory effects of SSRIs on IFN- $\gamma$  induced microglial activation through the regulation of intracellular calcium. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 34, pp. 1306–1316, 2010.

HOWREN, M.B.; LAMKIN, D.M.; SULS, J. Associations of depression with C-reactive protein, IL-1, and IL-6: a meta-analysis. **Psychosomatic Medicine**, v. 71, pp.171–186, 2009.

HU, J.; WANG, Z.; GUO, Y.Y.; ZHANG, X.N.; XU, Z.H.; LIU, S.B.; GUO, H.J.; YANG, Q.; ZHANG, F.X.; SUN, X.L.; ZHAO, M.G. A role of periaqueductal grey NR2B-containing NMDA receptor in mediating persistent inflammatory pain. **Molecular Pain**, v. 5, pp. 71-81, 2009.

HUANG, Y.; HENRY, C. J.; DANTZER, R.; JOHNSON, R.W.; GODBOUT, J. P. Exaggerated sickness behavior and brain proinflammatory cytokine expression in aged mice in response to intracerebroventricular lipopolysaccharide. **Neurobiology of Aging**, v. 29(11), pp. 1744–1753, 2008.

HUO, Y.; YI, B.; CHEN, M.; WANG, N.; CHEN, P.; GUO, C.; SUN, J. Induction of Nur77 by hyperoside inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal formation. **Biochemical Pharmacology**, v. 92, pp. 590–598, 2014.

HWANGA, J.; ZHENG, L.T.; OCK, J.; LEE, M.G.; KIM, S.H.; LEE, H.W.; LEE, W.H.; PARK, H.C.; SUK, K.; Inhibition of glial inflammatory activation and neurotoxicity by tricyclic antidepressants. **Neuropharmacology**, v. 55, pp. 826–834, 2008.

ISLAM, N.; JUNG, H.A.; SOHN, H.S.; KIM, H.M.; CHOI, J.S. Potent  $\alpha$ -glucosidase and protein tyrosine phosphatase 1 $\beta$  inhibitors from *Artemisia capillaris*. **Archives of Pharmacal Research**, v. 36, pp. 542–552, 2013.

ITO, M.; SHIMURA, H.; WATANABE, N.; TAMAI, M.; HANADA, K.; TAKAHASHI, A.; TANAKA, Y.; ARAI, K.; ZHANG, P.L.; CHANG, R.; ET AL. Hepatoprotective compounds from *Canarium album* and *Euphorbia nematocarpa*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 38(8), pp. 2201–2203, 1990.

JACOBSON, L. Hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis: neuropsychiatric aspects. **Comprehensive Physiology**, v. 4(2), pp.715–738, 2014.

JAKOBS, D.; HAGE-HÜLSMANN, A.; PRENNER, L.; KOLB, C.; WEISER, D.; HÄBERLEIN, H. Downregulation of  $\beta$ 1-adrenergic receptors in rat C6 glioblastoma cells by hyperforin and hyperoside from

St John's wort. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 65(6), pp. 907-915, 2013.

JEDINÁK, A.; MALIAR, T.; CAI, D.G.; NAGY, M. Inhibition activities of natural products on serine proteases. **Phytotherapy Research**, v. 20, pp. 214–217, 2006.

JIA, Y.; MA, X.-M.; YUN, F.; FAN, L.; WANG, N.; LIU, Z.-H. Apparent oil/water partition coefficients of hyperoside and its in situ intestinal absorption kinetics in rats. **Chinese Traditional and Herbal Drugs**, v. 43(5), pp. 934-939, 2012.

KALEGARI, M.; GEMIN, C.A.B.; ARAUJO-SILVA, G.; DE BRITO, N.J.N.; LOPEZ, J.A.; TOZETTO, S.O.; ALMEIDA, M.G.; MIGUEL, M.D.; STIEN, D.; MIGUEL; O.G. Chemical composition, antioxidant activity and hepatoprotective potential of *Rourea induta* Planch. (Connaraceae) against CCl<sub>4</sub>-induced liver injury in female rats. **Nutrition**, v. 30, pp. 713–718, 2014.

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, pp.747-765, 2010.

KASTER, M.P.; GADOTTI, V.M.; CALIXTO, J.B.; SANTOS, A.R.S.; RODRIGUES, A.L.S. Depressive-like behavior induced by tumor necrosis factor- $\alpha$  in mice. **Neuropharmacology**, v. 62, pp. 419-426, 2012.

KHAN, R.A.; KHAN, M.R.; AHMED, M.; SAHREEN, S.; SHAH, N.A.; SHAH, M.S.; BOKHARI, J.; RASHID, U.; AHMAD, B.; JAN, S. Hepatoprotection with a chloroform extract of *Launaea procumbens* against CCl<sub>4</sub>-induced injuries in rats. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 12, pp. 114-125, 2012.



KHANA VI, M.; MOGHADDAM, G.; OVEISI, M.R.; SADEGHI, N.; JANNAT, B.; ROSTAMI, M. Hyperoside and anthocyanin content of the different pomegranate cultivars. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 16(13), pp. 636-641, 2013.

KINDT, T.J.; GOLDSBY, R.A.; OSBORNE, B.A. **Imunologia de Kubi**, sexta edição, Artmed, Porto Alegre, 2008.

KIRAKOSYAN, A.; SEYMOUR, E.; KAUFMAN, P.B.; WARBER, S.; BOLLING, S.; CHANG, S.C. Antioxidant capacity of polyphenolic extracts from leaves of *Crataegus laevigata* and *Crataegus monogyna* (Hawthorn) subjected to drought and cold stress. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, pp. 3973–3976, 2003.

KORKMAZ, B.; HORWITZ, M.S.; JENNE, D.E.; GAUTHIER, F. Neutrophil elastase, proteinase 3, and cathepsin G as therapeutic targets in human diseases. **Pharmacological Reviews**, v. 62(4), pp. 726–759, 2010.

KU, S.K.; KIM, T.H.; LEE, S.; KIM, S.M.; BAE, J.S. Antithrombotic and profibrinolytic activities of isorhamnetin-3-O-galactoside and hyperoside. **Food and Chemical Toxicology**, v. 53, pp. 197–204, 2013.

KU, S.K.; ZHOU, W.; LEE, W.; HAN, M.S.; NA, M.; BAE, J.S. Anti-inflammatory effects of hyperoside in human endothelial cells and in mice. **Inflammation**, 2014a, doi: 10.1007/s10753-014-9989-8

KU, S.K.; KWAK, S.; KWON, O.J.; BAE, J.S. Hyperoside inhibits high-glucose-induced vascular inflammation in vitro and in vivo. **Inflammation**, v. 37(5), pp. 1389-1400, 2014b.

LARZELERE, M.M.; CAMPBELL, J.S.; ROBERTSON, M. Complementary and alternative medicine usage for behavioral health indications. **Primary Care: Clinics in Office Practice**, v. 37, pp. 213-236, 2010.

LAWSON, M.A.; MCCUSKER, R.H.; KELLEY, K.W. Interleukin-1 beta converting enzyme is necessary for development of depression-like behavior following intracerebroventricular administration of lipopolysaccharide to mice. **Journal of Neuroinflammation**, v. 10(54), pp. 1-15, 2013

LEE, B.H.; KIM, Y.K. The roles of BDNF in the pathophysiology of major depression and in antidepressant treatment. **Psychiatry Investigation**; v. 7, pp. 231-235, 2010.

LEE, B.H.; KIM, Y.K. Potential peripheral biological predictors of suicidal behavior in major depressive disorder. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 35, pp. 842–847, 2011.

LEE, J.-S.; SONG, J.H.; SOHN, N.-W.; SHIN, J.-W. Inhibitory effects of ginsenoside Rb1 on neuroinflammation following systemic lipopolysaccharide treatment in mice. **Phytotherapy Research**, v. 27(9), pp. 1270-1276, 2013.

LEE, S.; PARK, H.S.; NOTSU, Y.; BAN, H.S.; KIM, Y.P.; ISHIHARA, K.; HIRASAWA, N.; JUNG, S.H.; LEE, Y.S.; LIM, S.S.; PARK, E.H.; SHIN, K.H.; SEYAMA, T.; HONG, J.; OHUCH, K. Effects of hyperin, isoquercitrin and quercetin on lipopolysaccharide-induced nitrite production in rat peritoneal macrophages. **Phytotherapy Research**, v. 22, pp. 1552–1556, 2008.

LEE, Y.H.; KIM, S.H.; KIM, Y.; LIM, Y.; HA, K.; SHIN, S.Y.; Inhibitory effect of the antidepressant imipramine on NF- $\kappa$ B-dependent CXCL1 expression in TNF

$\alpha$  -exposed astrocytes. **International Immunopharmacology**, v. 12, pp. 547–555, 2012.

LENCZOWSKI, M.J.P.; BLUTHE, R.-M.; ROTH, J.; REES, G.S.; RUSHFORTH, D.A.; VAN DAM, A.-M.; TILDERS, F.J.H.; DANTZER, R.; ROTHWELL, N. J.; LUHESHI, G. N. Central administration of rat IL-6 induces HPA activation and fever but not sickness behavior in rats. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 276, pp. 652-568, 1999.

LEONARD, B.E. Impact of inflammation on neurotransmitter changes in major depression: an insight into the action of antidepressants. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 48, pp. 261–267, 2014.

LI, H.B.; YI, X.; GAO, J.M.; YING, X.X.; GUAN, H.Q.; LI, J.C. The mechanism of hyperoside protection of ECV-304 cells against tert-butyl hydroperoxide-induced injury. **Pharmacology**, v. 82(2), pp. 105-113, 2008.

LI, S.; ZHANG, Z.; CAIN, A.; WANG, B.; LONG, M.; TAYLOR, J. Antifungal activity of camptothecin, trifolin, and hyperoside isolated from *Camptotheca acuminata*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, pp. 32–37, 2005.

LI, Y.J.; XU, M.; GAO, Z.H.; WANG, Y.Q.; YUE, Z.; ZHANG, Y.X.; LI, X.X.; ZHANG, C.; XIE, S.Q.; WANG, P.Y. Alterations of serum levels of BDNF-related miRNAs in patients with depression. **Plos One**; v. 8, 2013.

LI, Z.L.; LIU, J.C.; HU, J.; LI, X.Q.; WANG, S.W.; YI, D.H.; ZHAO, M.G. Protective effects of hyperoside against human umbilical vein

endothelial cell damage induced by hydrogen peroxide. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, pp. 388–394, 2012.

LI, Z.L.; HU, J.; LI, Y.L.; XUE, F.; ZHANG, L.; XIE, J.Q.; LIU, Z.H.; LI, H.; YI, D.H.; LIU, J.C.; WANG, S.W. The effect of hyperoside on the functional recovery of the ischemic/reperfused isolated rat heart: potential involvement of the extra cellular signal-regulated kinase 1/2 signaling pathway. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 57, pp. 132–140, 2013.

LIANG, T.; YUE W.; LI; Q. Comparison of the phenolic content and antioxidant activities of *Apocynum venetum* L. (Luo-Bu-Ma) and two of its alternative species. **International Journal of Molecular Science**, v.11, pp. 4452-4464, 2010.

LIAUDANSKAS, M.; VISKELIS, P.; RAUDONIS, R.; KVIKLYS, D.; USELIS, N.; JANULIS, V. Phenolic composition and antioxidant activity of *Malus domestica* leaves. **The Scientific World Journal**, v. 2014, DOI: 10.1155/2014/306217

LIU, D.; WANG, Z.; LIU, S.; WANG, F.; ZHAO, S.; HAO, A. Anti-inflammatory effects of fluoxetine in lipopolysaccharide(LPS)-stimulated microglial cells. **Neuropharmacology**, v. 61, pp. 592-599, 2011a.

LIU, R.L.; XIONG, Q.J.; SHU, Q.; WU, W.N.; CHENG, J.; FU, H.; WANG, F.; CHEN, J.G.; HU, Z.L. Hyperoside protects cortical neurons from oxygen–glucose deprivation–reperfusion induced injury via nitric oxide signal pathway. **Brain Research**, v. 1469, pp. 164-173, 2012.

LIU, X.; WANG, D.; WANG, S.Y.; MENG, X.S.; ZHANG, W.J.; YING, X.X.; KANG, T.G. LC determination and pharmacoknetics study of hyperoside in rat

plasma after intravenous administration. **Yakugakki Zasshi**, v. 130(6), pp. 873-879, 2010.

LIU, X.; ZHU, L.; TAN, J.; ZHOU, X.; XIAO, L.; YANG X.; WANG, B. Glucosidase inhibitory activity and antioxidant activity of flavonoid compound and triterpenoid compound from *Agrimonia pilosa* Ledeb. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, pp.12-22, 2014.

LIU, Z.; TAO, X.; ZHANG, C.; LU, Y.; WEI, D. Protective effects of hyperoside (quercetin-3-o-galactoside) to PC12 cells against cytotoxicity induced by hydrogen peroxide and tert-butyl hydroperoxide. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 59, pp. 481–490, 2005.

LUO, L.; SUN, Q.; MAO, Y.Y.; LU, Y.H.; TAN, R.X. Inhibitory effects of flavonoids from *Hypericum perforatum* on nitric oxide synthase. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 93, pp. 221-225, 2004.

MACIEL, I.S.; SILVA, R.B.M.; MORRONE, F.B.; CALIXTO, J.B.; CAMPOS, M.M. Synergistic effects of celecoxib and bupropion in a model of chronic inflammation related depression in mice. **Plos One**, v. 8(9), e77227, doi: 10.1371/journal.pone.0077227.

MAES, M. Depression is an inflammatory disease, but cell-mediated immune activation is the key component of depression. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 35, pp. 664–675, 2011

MAES, M.; MIHAYLOVA, I.; KUBERA, M.; RINGEL, K. Activation of cell-mediated immunity in depression: association with inflammation, melancholia, clinical staging and the fatigue and somatic symptom cluster of depression.

**Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 36, pp. 169–175, 2012a.

MAES, M.; RINGEL, K.; KUBERA, M.; BERK, M.; RYBAKOWSKI, J. Increased autoimmune activity against 5-HT: a key component of depression that is associated with inflammation and activation of cell-mediated immunity, and with severity and staging of depression. **Journal of Affective Disorders**, v. 136, pp. 386–392, 2012b.

MANSOUR, S.; DJEBLI, N.; OZKAN, E.E.; MAT, A. In vivo antiinflammatory activity and chemical composition of *Hypericum scabroides*. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 7(Suppl 1), pp. 514-520, 2014.

MARCUS, M.; YASAMY, M.T.; VAN OMMEREN, M.; CHISHOLM, D.; SAXENA, S. **Depression: a global public health concern. Depression: a global crisis**, World Federation for Mental Health, 2012. – Disponível em [http://www.who.int/mental\\_health/management/depression/wfmh\\_paper\\_depression\\_wmhd\\_2012.pdf](http://www.who.int/mental_health/management/depression/wfmh_paper_depression_wmhd_2012.pdf) - acessado em 14/06/2013.

MCCUSKER, R.H.; KELLEY, K.W. Immune–neural connections: how the immune system’s response to infectious agents influences behavior. **The Journal of Experimental Biology**, v. 216, pp. 84-98, 2013.

MELLO, B.S.F.; MONTE, A.S.; MCINTYRE, R.S.; SOCZYNSKA, J.K.; CUSTÓDIO, C.S.; CORDEIRO, R.C.; CHAVES, J.H.; VASCONCELOS, S.M.M.V.; NOBRE JÚNIOR, H.V.; DE SOUSA, F.C.F.; HYPHANTIS, T.N.; CARVALHO, A.F.; MACÊDO, D.S. Effects of doxycycline on depressive-like behavior in mice after lipopolysaccharide (LPS) administration. **Journal of Psychiatric Research**, v. 47, pp. 1521-1529, 2013.

MELZIG, M.F.; PERTZ, H.H.; KRENN, L. Anti-inflammatory and spasmolytic activity of extracts from *Droserae herba*. **Phytomedicine**, v. 8(3), pp. 225–229, 2001.

MENDLEWICKZ, J.; KRIWIN, P.; OSWALD, P.; ALBONI, S.; BRUNELLO, N. Shortened onset of action of antidepressants in major depression using acetylsalicylic acid augmentation: a pilot open-label study. **International Clinical Psychopharmacology**, v. 21(4), pp. 227–231, 2006.

MESQUITA, A.R.; CORREIA-NEVES, M.; ROQUE, S.; CASTRO, A.G.; VIEIRA, P.; PEDROSA, J.; PALHA, J.A.; SOUSA, N. IL-10 modulates depressive-like behavior. **Journal of Psychiatric Research**, v. 43, pp. 89–97, 2009.

MIÑO, J.; ACEVEDO, C.; MOSCATELLI, V.; FERRARO, G.; HNATYSZYN, O. Antinociceptive effect of the aqueous extract of *Balbisia calycina*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79, pp. 179–182, 2002.

MOORE, K.W.; MALEFYT, R.W.; COFFMAN, R.L.; O’GARRA, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annual Review of Immunology**, v. 19, pp. 683–765, 2001.

MOREIRA, A.S.; SPITZER, V.; SCHAPOVAL, E.E.S.; SCHENKEL, E.P. Antiinflammatory activity of extracts and fractions from the leaves of *Gochnatia polymorpha*. **Phytotherapy Research**, v. 14, pp. 638–640, 2000.

MÜLLER, L.G.; SALLES, L.A.; STEIN, A.C.; BETTI, A.H.; SAKAMOTO, S.; CASSEL, E.; VARGAS, R.F.; VON POSER, G.L.; RATES, S.M.K. Antidepressant-like effect of *Valeriana glechomifolia* Meyer (Valerianaceae) in

mice. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 36(1), pp. 101–109, 2012.

MÜLLER, L.G. **Estudo do envolvimento de diferentes alvos biológicos no mecanismo de ação antidepressiva de uma fração enriquecida em valepotriatos diênicos obtida de *Valeriana glechomifolia* Meyer (Valerianaceae)**. Tese de doutorado – Curso de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

MÜLLER, N.; SCHWARZ, M.J.; DEHNING, S.; DOUHE, A.; CEROVECKI, A.; GOLDSTEIN-MÜLLER, B.; SPELLMANN, I.; HETZEL, G.; KLEINDIENST, N.; MÖLLER, H-J.; RIEDEL, M. The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib has therapeutic effects in major depression: results of a double-blind, randomized, placebo controlled, add pilot study to reboxetine. **Molecular Psychiatry**, v. 11, pp. 680-684, 2006.

MÜLLER, N. The role of anti-inflammatory treatment in psychiatric disorders. **Psychiatria Danubina**, v. 25(3), pp. 292-298, 2013.

MURRI, M.B.; PARIANTE, C.; MONDELLI, V.; MASOTTI, M.; ATTI, A.R.; MELLACQUA, Z.; ANTONIOLI, M.; GHIO, L.; MENCHETTI, M.; ZANETIDOU, S.; INNAMORATI, M.; AMORE, M. HPA axis and aging in depression: Systematic review and meta-analysis. **Psychoneuroendocrinology**, v. 41, pp. 46-62, 2014.

MYINT, A.M.; KIM, Y.K. Cytokine–serotonin interaction through IDO: a neurodegeneration hypothesis of depression. **Medical Hypotheses**, v. 61(5–6), pp. 519–525, 2003.



NAHAS, R.; SHEIKH, O. Complementary and alternative medicine for the treatment of major depressive disorder. **Canadian Family Physician**, v. 57, pp. 659-663, 2011.

NAM, Y.; LEE, D. Ameliorating effects of constituents from cortex *acanthopanax radice* on memory impairment in mice induced by scopolamine. **Journal of Traditional Chinese Medicine**, v. 34(1), pp. 57-62, 2014.

NEAMATI, A.; CHAMAN, F.; HOSSEINI, M.; BOSKABADY, M.H. The effects of *Valeriana officinalis* L. hydro-alcoholic extract on depression like behavior in ovoalbumin sensitized rats. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, v. 6(2), pp. 97-103, 2014.

NOH, H.; JEON, J.; SEO, H. Systemic injection of LPS induces region-specific neuroinflammation and mitochondrial dysfunction in normal mouse brain. **Neurochemistry International**, v. 69, pp. 35–40, 2014.

NUTT, D.J. Relationship of neurotransmitters to the symptoms of major depressive disorder. **Journal of Clinical Psychiatry**, v. 69, pp. 4–7, 2008.

O'CONNOR, J.C.; LAWSON, M.A.; ANDRÉ, C.; MOREAU, M.; LESTAGE, J.; CASTANON, N.; KELLEY, K.W.; DANTZER, R. Lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase activation in mice. **Journal of Molecular Psychiatry**, v. 14(5), pp. 511–522, 2009a.

O'CONNOR, J.C.; ANDRÉ, C.; WANG, Y.; LAWSON, M.A.; SZEGEDI, S.S.; LESTAGE, J.; CASTANON, N.; KELLEY, K.W.; DANTZER, R. Interferon- $\gamma$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  mediate the upregulation of indoleamine 2,3-dioxygenase and the induction of depressive-like behavior in mice in response to

*Bacillus calmette-Guérin*. **The Journal of Neuroscience**, v. 29(13), pp. 4200–4209, 2009b.

OBUCHOWICZ, E.; BIELECKA, A.M.; PAUL-SAMOJEDNY, M.; PUDEŁKO, A.; KOWALSK, J. Imipramine and fluoxetine inhibit LPS-induced activation and affect morphology of microglial cells in the rat glial culture. **Pharmacological Reports**, v. 66, pp. 34–43, 2014.

OHGUCHI, K.; NAKAJIMA, C.; OYAMA, M.; IINUMA, M.; ITOH, T.; AKAO, Y.; NOZAWA, Y.; ITO, M. Inhibitory effects of flavonoid glycosides isolated from the peel of japanese persimmon (*Diospyros kaki* ‘Fuyu’) on melanin biosynthesis. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 33(1), pp. 122-124, 2010.

PARK, S.M.; CHOI, M.S.; SOHN, N.K.; SHIN, J.W. Ginsenoside Rg3 attenuates microglia activation following systemic lipopolysaccharide treatment in mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 36(9), pp. 1546-1552, 2012.

PENG, C.H.; CHIOU, S.H.; CHEN, S.J.; CHOU, Y.C.; KU, H.H.; CHENG, C.K.; YEN, C.J.; TSAI, T.H.; CHANG, Y.L.; KAO, C.L. Neuroprotection by imipramine against lipopolysaccharide-induced apoptosis in hippocampus-derived neural stem cells mediated by activation of BDNF and the MAPK pathway. **European Neuropsychopharmacology**, v. 18, pp. 128–140, 2008.

PIAO, M.J.; KANG, K.A.; ZHANG, R.; KO, D.O.; WANG, Z.H.; YOU, H.J.; KIM, H.S.; KIM, J.S.; KANG, S.S.; HYUN, J.W. Hyperoside prevents oxidative damage induced by hydrogen peroxide in lung fibroblast cells via an antioxidant effect. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1780, pp. 1448–1457, 2008.

PRENNER, L.; SIEBEN, A.; ZELLER, K.; WEISER, D.; HÄBERLEIN, H. Reduction of high-affinity  $\beta$ 2-adrenergic receptor binding by hyperforin and hyperoside on rat C6 glioblastoma cells measured by fluorescence correlation spectroscopy. **Biochemistry**, v. 46, pp. 5106-5113, 2007.

QIN, Y.; ZHANG, Y.; YAN, S.; YE, L. A comparison study on the interaction of hyperoside and bovine serum albumin with Tachiya model and Stern–Volmer equation. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 75, pp. 1506–1510, 2010.

QUAK, J.; DOORNBOS, B.; ROEST, A.M.; DUIVIS, H.E.; VOGELZANGS, N.; NOLEN, W.A.; PENNINX, B.W.J.H.; KEMA, I.P.; DE JONGE, P. Does tryptophan degradation along the kynurenine pathway mediate the association between pro-inflammatory immune activity and depressive symptoms? **Psychoneuroendocrinology**, v. 45, pp. 202-210, 2014.

RAINHA, N.; KOCI, K.; COELHO, A.V.; LIMA, E.; BAPTISTA, J.; FERNANDES-FERREIRA, M.; HPLC-UV-ESI-MS analysis of phenolic compounds and antioxidante properties of *Hypericum undulatum* shoot cultures and wild-growing plants. **Phytochemistry**, v. 86, pp. 83-91, 2013.

RAMIREZ, K.G., SHEA, D.T.; MCKIM, D.B.; READER, B.F.; SHERIDAN, J.F. Imipramine attenuates neuroinflammatory signaling and reverses stress-induced social avoidance. **Brain Behavior and Immunity**, 2015, article in press, doi: 10.1016/j.bbi.2015.01.016.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; FLOWER, R.J.; HENDERSON, G. **Rang & Dale Farmacologia** [recurso eletrônico]; Rio de Janeiro:Elsevier; 2012.

RÉUS, G.Z.; DOS SANTOS, M.A.B.; ABELAIRA, H.M.; RIBEIRO, K.F.; PETRONILHO, F.; VUOLOB, F.; COLPO, G.D.; PFAFFENSELLER, B.;

KAPCZINSKI, F.; DAL-PIZZOL, F.; QUEVEDO, J. Imipramine reverses alterations in cytokines and BDNF levels induced by maternal deprivation in adult rats. **Behavioural Brain Research**, v. 242, pp. 40-46, 2013.

RIZZO, S.J.S.; NEAL, S.J.; HUGHES, Z.A.; BEYNA, M.; ROSENZWEIG-LIPSON, S.; MOSS, S.J.; BRANDON, N.J. Evidence for sustained elevation of IL-6 in the CNS as a key contributor of depressive-like phenotypes. **Translational Psychiatry**, v. 2012 (2), e199, 2012, doi: 10.1038/tp.2012.120.

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, pp. 1447-1452, 1995.

RUDOLF, S.; GREGGERSEN, W.; KAHL, K.G.; HÜPPE, M.; SCHWEIGER, U. Elevated IL-6 levels in patients with atypical depression but not in patients with typical depression. **Psychiatry Research**, v. 217, pp. 34–38, 2014.

RYLSKI, M.; DURIASZ-ROWIŃSKA, H.; REWERSKI, W. The analgesic action of some flavonoids in the hot plate test. **Acta Physiologica Polonica**, v. 30(3), pp. 385-388, 1979.

SAH, S.P.; TIRKEY, N.; KUHAD, A.; CHOPRA, K. Effect of quercetin on lipopolysaccharide induced-sickness behavior and oxidative stress in rats. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 43(2), pp. 192–196, 2011.

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

SANTIAGO, R.M.; BARBIERO, J.; MARTYNHAK, B.J.; BOSCHEN, S.L.; DA SILVA, L.M.; WERNER, M.F.; DA CUNHA, C.; ANDREATINI, R.; LIMA, M.M.; VITAL, M.A. Antidepressant-like effect of celecoxib piroxicam in rat models of depression. **Journal of Neural Transmission**, v. 121(6), pp. 671-682, 2014.

SCHMITT, A.C.; RAVAZZOLO, A.P.; VON POSER, G.L. Investigation of some *Hypericum* species native to Southern of Brazil for antiviral activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77, pp. 239–245, 2001.

SCHMITT, L.A.; LIU, Y.; MURPHY, P.A.; BIRT, D.F. Evaluation of the light-sensitive cytotoxicity of *Hypericum perforatum* extracts, fractions, and pure compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, pp. 2881-2890, 2006.

SHAHAT, A.A.; ISMAIL, S.I.; HAMMOUDA, F.M.; AZZAM, S.A.; LEMIÈRE, G.; DE BRUYNE, T.; DE SWAEF, S.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A. Anti-HIV activity of flavonoids and proanthocyanidins from *Crataegus sinaica*. **Phytomedicine**, v. 5(2), pp. 133-136, 1998.

SIMBREY, K.; WINTERHOFF, H.; BUTTERWECK, V. Extracts of St. John's wort and various constituents affect h-adrenergic binding in rat frontal cortex. **Life Sciences**, v. 74, pp. 1027–1038, 2004.

SNIJMAN, P.W.; SWANEVELDER, S.; JOUBERT, E.; GREEN, I.R.; SONCINI, R.; DE SOUZA, D.F.; NEVES, A.P.; BRAGA, D.S.; ANDRADE, C.A.F.; GIUSTI-PAIVA, A. Dipyrone attenuates acute sickness response to lipopolysaccharide in mice. **Neuroscience Letters**, v. 516, pp. 114-118, 2012.

SONG, M.; HONG, M.; LEE, M.Y.; JEE, J.G.; LEE, Y.M.; BAE, J.S.; JEONG, T.C.; LEE, S. Selective inhibition of the cytochrome P450 isoform by hyperoside and its potent inhibition of CYP2D6. **Food and Chemical Toxicology**, v. 59, pp. 549–553, 2013.

SOSA, S.; PACE, R.; BORNANCIN, A.; MORAZZONI, P.; RIVA, A.; TUBARO, A.; LOGGIA, R.D. Topical anti-inflammatory activity of extracts and compounds from *Hypericum perforatum* L. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 59, pp. 703–709, 2007.

STAHL, S.M. **Essential psychopharmacology - Neuroscientific Basis and Practical Applications**, third edition, Cambridge University, New York, 2008.

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

STEPANICHEV, M.S.; DYGALO, N.N.; GRIGORYAN, G.; SHISHKINA, G.T.; GULYAEVA, N. Rodent models of depression: neurotrophic and neuroinflammatory biomarkers. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014, doi: 10.1155/2014/932757.

STERU, L.; CHERMAT, R.; THIERRY, B.; SIMON, P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology**, v. 85, pp. 367-370, 1985.

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

dopaminergic and opioid systems in mice. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 39, pp. 80–87, 2012.

STOLZ, E.D.; HASSE, D.F.; VON POSER, G.L.; RATES; S.M.K. Uliginosin B, a natural phloroglucinol derivative, presents a multimediated antinociceptive effect in mice. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 66, pp. 1774–1785, 2014.

SÜNTAR, I.P.; AKKOL, E.K.; YILMAZER, D.; BAYKAL, T.; KIRMIZIBEKMEZ, H.; ALPER, M.; YESILADA, E. Investigation on the *in vivo* wound healing potential of *Hypericum perforatum* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, pp. 468-477, 2010.

SZEGEDI, A.; KOHNEN, R.; DIENEL, A.; KIESER, M. Acute treatment of moderate to severe depression with *Hypericum* extract WS 5570 (St John's Wort): randomized controlled double blind non-inferiority trial versus paroxetine. **British Medical Journal**, 2005 (doi:10.1136/bmj.38356.655266.82)

TADIC, V.M.; DOBRIC, S.; MARKOVIC, G.N.; ĐOREVIC, S.M.; ARSIC, I.A.; MENKOVIC, N.R.; STEVIC, T. Anti-inflammatory, gastroprotective, free-radical-scavenging, and antimicrobial activities of Hawthorn berries ethanol extract. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, pp. 7700–7709, 2008.

TARAZ, M.; KHATAMI, M.R.; DASHTI-KHAVIDAKI, S.; AKHONZADEH, S.; NOORBALA, A.A.; GHAELI, P.; TARAZ, S. Sertraline decreases serum level of interleukin-6 (IL-6) in hemodialysis patients with depression: results of a randomized double-blind, placebo-controlled clinical trial. **International Immunopharmacology**, v. 17, pp. 917–923, 2013.

TSIGOU, E.; STAVROS, A.; PAVLOS, M.; STAVROS, G.; ATHANASSIOS, T.; GEORGE, B. The immune response after stimulation with wall components of gram-positive bacteria and fungi. **Immunology Letters**, v. 159, pp. 23-29, 2014.

TYNAN, R.J.; WEIDENHOFER, J.; HINWOOD, M.; CAIRNS, M.J.; DAY, T.A.; WALKER, F.R. A comparative examination of the anti-inflammatory effects of SSRI and SNRI antidepressants on LPS stimulated microglia. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 26, pp. 469–479, 2012.

VERMA, N.; AMRESH, G.; SAHU, P.K.; MISHRA, N.; RAO, C.H.V.; SINGH, A.P. Pharmacological evaluation of hyperin for antihyperglycemic activity and effect on lipid profile in diabetic rats. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 51(1), pp. 65-72, 2013.

VIANA, A.F.; HECKLER, A.P.; FENNER, R.; RATES, S.M.K. Antinociceptive activity of *Hypericum caprifoliatum* and *Hypericum polyanthemum* (Guttiferae). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, pp. 631-634, 2003.

VIANA, A.; DO REGO, J.C.; VON POSER, G.; FERRAZ, A.; HECKLER, A.N.; COSTENTIN, J.; RATES, S.M.K. The antidepressant-like effect of *Hypericum caprifoliatum* Cham & Schlecht (Guttiferae) on forced swimming test results from an inhibition of neuronal monoamine uptake. **Neuropharmacology**, v. 49, pp. 1042-1052, 2005.

VIANA, A.F.; MACIEL, I.S.; DORNELLES, F.N.; FIGUEIREDO, C.P.; SIQUEIRA, J.M.; CAMPOS, M.M.; CALIXTO, J.B.; Kinin B1 receptors mediate depression-like behavior response in stressed mice treated with systemic *E. coli* lipopolysaccharide. **Journal of Neuroinflammation**, v. 7, pp. 98-110, 2010.



WALKER, F.R. A critical review of the mechanism of action for the selective serotonin reuptake inhibitors: do these drugs possess anti-inflammatory properties and how relevant is this in the treatment of depression? **Neuropharmacology**, v. 67, pp. 304-317, 2013.

WANG, W.Q.; MA, C.C.; XU, S.Y. Protective effect of hyperin against myocardial ischemia and reperfusion injury. **Acta Pharmacaologica Sinica**, v. 17(4), pp. 341-344, 1996.

WANG, Y.; YANG, F.; LIU, Y.F.; GAO, F.; JIANG, W. Acetylsalicylic acid as an augmentation agent in fluoxetine treatment resistant depressive rats. **Neuroscience Letters**, v. 499, pp. 74–79, 2011.

WHO. **Mental health action plan 2013-2020**, WHO Document Production

Services, Switzerland, 2013, disponível em:

[apps.who.int/iris/bitstream/10665/89966/1/9789241506021\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/89966/1/9789241506021_eng.pdf), acesso em: 29 de janeiro de 2015.

WILLNER, P.; SHEEL-KRÜGER, J.; BELZUNG, C. The neurobiology of depression and antidepressant action. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 2013. (in press: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2012.12.007>)

WOHLEB, E.S.; HANKE, M.L.; CORONA, A.W.; POWELL, N.D.; STINER, L.M.; BAILEY, M.T.; NELSON, R.J.; GODBOUT, J.P.; SHERIDAN, J.F.  $\beta$ -adrenergic receptor antagonism prevents anxiety-like behavior and microglial reactivity induced by repeated social defeat. **Journal of Neuroscience**, v. 31(17), pp. 6277–6288, 2011.

WOHLEB, E.S.; FENN, A.M.; PACENTA, A.M.; POWELL, N.D.; SHERIDAN, J.F.; GODBOUT, J.P. Peripheral innate immune challenge exaggerated microglia

activation, increased the number of inflammatory CNS macrophages, and prolonged social withdrawal in socially defeated mice. **Psychoneuroendocrinology**, v. 37(9), pp. 1491–1505, 2012.

WRONA, D.; LISTOWSKA, M.; KUBERA, M.; MAJKUTEWICZ, I.; GLAC, W.; WOJTYŁA-KUCHTA, B.; PLUCINSKA, K.; GREMBECKA, B.; PODLACHA, M. Chronic antidepressant desipramine treatment increases open field-induced brain expression and spleen production of interleukin 10 in rats. **Brain Research Bulletin**, v. 99, pp. 117–131, 2013.

WU, L.L.; YANG, X.B.; HUANG, Z.M.; LIU, H.Z.; WU, G.X. *In vivo* and *in vitro* antiviral activity of hyperoside extracted from *Abelmoschus manihot* (L) medik. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 28(3), pp. 404–409, 2007.

XING, H.Y.; LIU, Y.; CHEN, J.H.; SUN, F.J.; SHI, H.Q.; XIA, P.Y. Hyperoside attenuates hydrogen peroxide-induced L02 cell damage via MAPK-dependent Keap1–Nrf2–ARE signaling pathway. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 410, pp. 759–765, 2011.

XIONG, Q.; FAN, W.; TEZUKA, Y.; ADNYANA, K.; STAMPOULIS, P.; HATTORI, M.; NAMBA, T.; KADOTA, S. Hepatoprotective effects of *Apocynum venetum* and its active constituents. **Planta Medica**, v. 66, pp. 127–133, 2000.

YADAV, A.; SAINI, V.; ARORA, S. MCP-1: chemoattractant with a role beyond immunity: a review. **Clinica Chimica Acta**, v. 411, pp. 1570–1579, 2010.

YAN, Y.; FENG, Y.; LI, W.; CHE, J.P.; WANG, G.C.; LIU, M.; ZHENG, J.H. Protective effects of quercetin and hyperoside on renal fibrosis in rats with

unilateral ureteral obstruction. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 8, pp. 727-730, 2014.

YANG, J.; QIAN, D.; GUO, J.; JIANG, S.; SHANG, E.X.; DUAN, J.A.; XU, J. Identification of the major metabolites of hyperoside produced by the human intestinal bacteria using the ultra-performance liquid chromatography/quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 147, pp. 174–179, 2013.

YIN, X.; LI, Z.; ZHAI, Y.; ZHANG, H.; LIN, L.; YANG, P.; CAO, S.; ZHANG, J.; QI, J.; TIAN, J.; FU, J.; QU, C.; NI, J. Development and validation of a highly sensitive LC-ESI-MS/MS method for the determination of hyperoside in beagle dog plasma: application to a pharmacokinetic study. **Biomedical Chromatography**, v. 27, pp. 807–811, 2013.

YOUNG, J.J.; BRUNO, D.; POMARA, N. A review of the relationship between proinflammatory cytokines and major depressive disorder. **Journal of Affective Disorders**, v. 169, pp. 15–20, 2014.

YU, H.; CHEN, Z. The role of BDNF in depression on the basis of its location in the neural circuitry. **Acta Pharmacologica Sinica**; v. 32, pp. 3-11, 2011.

ZENG, K.; WANG, X.; FU, H.; LIU, G. Protective effects and mechanism of hyperin on CoCl<sub>2</sub>-induced PC12 cells. **Zhongguo Zhong Yao Za Zhi**, v. 36(17), pp. 2409-12, 2011.

ZENG, K.W.; WANG, X.M.; KO, H.; KWON, H.C.; CHA, J.W.; YANG, H.O. Hyperoside protects primary rat cortical neurons from neurotoxicity induced by amyloid  $\beta$  -protein via the PI3K/Akt/Bad/BclXL-regulated mitochondrial apoptotic pathway. **European Journal of Pharmacology**, v. 672, pp. 45–55, 2011.

ZHANG, F.; ZHOU, H.; WILSON, B.C.; SHI, J.S.; HONG, J.S.; GAO, H.M. Fluoxetine protects neurons against microglial activation-mediated neurotoxicity. **Parkinsonism and Related Disorders**, v. 18(1), pp. 213–217, 2012.

ZHANG, L.; CHENG, X.R.; HU, J.J.; SUN, L.; DU, G.H. Neuroprotective effects of hyperoside on sodium azide-induced apoptosis in PC12 cells. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 9(6), pp. 0450–0455, 2011.

ZHANG, N.; YING, M.D.; WU, Y.P.; ZHOU, Z.H.; YE, Z.M.; LI, H.; LIN, D.S. Hyperoside, a flavonoid compound, inhibits proliferation and stimulates osteogenic differentiation of human osteosarcoma cells. **Plos One**, v. 9(7), e98973, 2014c. doi:10.1371/journal.pone.0098973

ZHANG, X.; WANG, G.; GURLEY, E.C.; ZHOU, H. Flavonoid apigenin inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory response through multiple mechanisms in macrophages. **Plos One**, v. 9(9), e107072, 2014b. doi:10.1371/journal.pone.0107072

ZHANG, X.N.; LI, J.M.; YANG, Q.; FENG, B.; LIU, S.B.; XU, Z.H.; GUO, Y.Y.; ZHAO, M.G. Anti-apoptotic effects of hyperoside via inhibition of NR2B-containing NMDA receptors. **Pharmacological Reports**, v. 62, pp. 949-955, 2010.

ZHANG, Y.; LUO, Z.; WANG, D.; HE, F.; LI, D. Phytochemical profiles and antioxidant and antimicrobial activities of the leaves of *Zanthoxy lumbungeoanum*. **The Scientific World Journal**, v. 2014, pp. 1-13, 2014a.

ZHANG, Z.; SETHIEL, M.S.; SHEN, W.; LIAO, S.; ZOU, Y. Hyperoside downregulates the receptor for advanced glycation end products (RAGE) and promotes proliferation in ECV304 cells via the c-Jun N-Terminal Kinases (JNK)

pathway following stimulation by advanced glycation end-products *in vitro*. **International Journal of Molecular Science**, v. 14, pp. 22697-22707, 2013.

ZHENG, A.; FAN, Y.; SHI, D.; LIU, C. Antidepressant-like effect of flavonoids extracted from *Apocynum venetum* leaves on brain monoamine levels and dopaminergic system. **Journal of Ethnopharmacology**; v. 147, pp. 108-113, 2013.

ZHENG, L.T.; OCK, J.; KWON, B.M.; SUK, K. Suppressive effects of flavonoid fisetin on lipopolysaccharide-induced microglial activation and neurotoxicity. **International Immunopharmacology**, v. 8, pp. 484–494, 2008.

ZHENG, M.; LIU, C.; PAN, F.; SHI, D.; ZHANG, Y. Antidepressant-like effect of hyperoside isolated from *Apocynum venetum* leaves: possible cellular mechanism. **Phytomedicine**; v. 19, pp. 145-149, 2012.

ZHOU, L.; AN, X.F.; TENG, S.C.; LIU, J.S.; SHANG, W.B.; ZHANG, A.H.; YUAN, Y.G.; YU, J.Y. Pretreatment with the total flavone glycosides of *Flos Abelmoschus manihot* and hyperoside prevents glomerular podocyte apoptosis in streptozotocin-induced diabetic nephropathy. **Journal of Medicinal Food**, v. 15(5), pp. 461–468, 2012.

ZHU, F.; ZHANG, L.; DING, Y.Q.; ZHAO, J.; ZHENG, Y. Neonatal intrahippocampal injection of lipopolysaccharide induces deficits in social behavior and prepulse inhibition and microglial activation in rats: Implication for a new schizophrenia animal model. **Brain Behavior and Immunity**, v. 38, pp. 166-174, 2014a.

ZHU, W.; XU, Y.F.; FENG, Y.; PENG, B.; CHE, J.P.; LIU, M.; ZHENG, J.H. Prophylactic effects of quercetin and hyperoside in a calcium oxalate stone forming rat model. **Urolithiasis**, v. 42, pp. 519–526, 2014b.









## Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais da UFRGS – CEUA/UFRGS



**UFRGS**  
UNIVERSIDADE FEDERAL  
DO RIO GRANDE DO SUL

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA**

Comissão De Ética No Uso De Animais



### **CARTA DE APROVAÇÃO**

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

**Número:** 25800

**Título:** ESTUDO DA AÇÃO DO FLAVONOIDE HIPEROSÍDEO EM MODELOS ANIMAIS E ENSAIOS BIOLÓGICOS RELACIONADOS À DEPRESSÃO E NEUROINFLAMAÇÃO

**Pesquisadores:**

**Equipe UFRGS:**

STELA MARIS KUZE RATES - coordenador desde 07/10/2013  
MARIA FLAVIA MARQUES RIBEIRO - pesquisador desde 07/10/2013  
ANDRESA HEEMANN BETTI - pesquisador desde 07/10/2013  
SATCHIE SAKAMOTO - pesquisador desde 07/10/2013  
Caroline Guerra Marangon - pesquisador desde 07/10/2013

**Equipe Externa:**

François Germain Noel - pesquisador desde 07/10/2013

***Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo, em reunião realizada em 09/12/2013 - Sala 323 do Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro - Porto Alegre - RS, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 204 camundongos CF1, machos, de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa.***

Porto Alegre, Quinta-Feira, 26 de Dezembro de 2013

---

CRISTIANE MATTE  
Vice Coordenador da comissão de ética

