

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE FARMÁCIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

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)

LIZ GIRARDI MÜLLER

PORTO ALEGRE, 2014.

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

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 apresentada por **Liz Girardi Müller**
para obtenção do título de DOUTOR em
Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof. Dr. Stela Maris Kuze Rates

Porto Alegre, 2014.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 07.11.2014, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dr. Carmen Regla Vargas

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Lucas Alvares

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Roberto Andreatini

Universidade Federal do Paraná

Membro Suplente

Prof. Dr. Diogo Lara

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

CIP - Catalogação na Publicação

Girardi Müller, Liz

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) / Liz Girardi Müller. -- 2014.
273 f.

Orientador: Stela Maris Kuze Rates.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. *Valeriana glechomifolia*. 2. Valepotriatos. 3. Antidepressivo. 4. Mecanismo de ação. 5. Alvos biológicos. I. Kuze Rates, Stela Maris, orient. II. Título.

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

Este trabalho foi desenvolvido nos seguintes laboratórios: Psicofarmacologia Experimental e Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia e Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular da Faculdade de Veterinária da UFRGS, Laboratório de Operações Unitárias da PUC-RS, em Porto Alegre, RS; Laboratório de Psicofarmacologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, em Ribeirão Preto, SP; Laboratório de Bioquímica e Farmacologia Molecular da UFRJ, no Rio de Janeiro, RJ e no *Laboratoire de Physiopathologie de la plasticité synaptique dans différents modèles de maladies neuropsychiatriques*, no *Institut de Neurobiologie de la Méditerranée* (INSERM – U901), da Université Aix-Marseille, em Marseille – França, com apoio financeiro do Programa de Pós -Graduação em Ciências Farmacêuticas - UFRGS e do CNPq (processo 480647/2011-9). O autor recebeu bolsa de estudos da CAPES e bolsa de doutorado sanduíche do CNPq, pelo programa Ciência sem Fronteiras.

*Aos Lucas, com amor maior que a
distância que nos separou, e à Dora, com
todo o amor que nos uniu.*

AGRADECIMENTOS

À Stela, por ter me orientado durante os últimos 4 anos, por ter contribuído de forma tão importante para a minha formação científica e crescimento pessoal, pela oportunidade de fazer parte de seu grupo de pesquisa e pelo apoio em todos os momentos (tenham sido bons ou ruins), pelos quais passei desde o início desta caminhada.

À Gil, pela contribuição de sempre em todos os trabalhos realizados, pelas conversas tão produtivas. Tua presença representou um grande estímulo para mim. À professora Sâmia Joca e a todo seu querido grupo de pesquisa do Laboratório de Psicofarmacologia da USP, especialmente à Caroline Biojone e à Amanda Sales, muitíssimo obrigada. Vocês todos são realmente muito especiais como pessoas e profissionais.

À professora Ana Paula Ravazzolo, muito obrigada pela atenção e supervisão durante os experimentos no Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular da UFRGS. Foi um grande prazer aprender e trabalhar contigo.

Aos professores Luis Eduardo Quintas e François Noël, e ao grupo de pesquisa do Laboratório de Bioquímica e Farmacologia Molecular da UFRJ, obrigada pela disposição e pela parceria sempre produtiva.

Je remercie Dr Pascale Chavis de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire à l'INMED, pour m'avoir soutenue dans ce travail et pour le partage de son expertise scientifique. Je remercie également très chaleureusement Dr Olivier Manzoni, ainsi que tous les membres de l'INMED, et en particulier, Jillian Iafrati, Nazim Kourdougli, Lamine Bouamrane, Olivier Lassale, Henry Martin, Bahija Hafidh, Roman Nardou, Robin Cloarec, Axel Bernabeau.

Je souhaite exprimer ma gratitude aux filles Daniela Neuhofer, Marion Jalabert, Manal Salmi, Vanessa Morales, Diana Ferrari, Emmanuelle Goubert et, spécialement, Anissa Bara et Carola Sales-Carbonell, grâce à qui mon quotidien à Marseille était toujours des plus agréable.

Aos professores Eduardo Cassel e Rubem Vargas, obrigada pela parceria que possibilitou a extração por fluido supercrítico no Laboratório de Operações Unitarias da PUC-RS.

Às secretárias do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Liane e Marise, sempre dispostas a resolver as questões burocráticas do caminho, muito obrigada por tudo. Beijos da Liz *Taylor*.

Às minhas queridas colegas e amigas que fazem ou fizeram parte do laboratório de Psicofarmacologia Experimental da UFRGS: Ana Cristina Stein, Andressa Braga, Alice Viana, Camila Boque, Caroline Marangon, Caroline Siqueira, Eveline Stolz, Fernanda Centurião, Luisa Salles, Satchie Sakamoto, Vivian Herzfeldt muito obrigada pela amizade, carinho e pela ajuda e apoio de sempre. Agradeço especialmente à Andresa Betti pela amizade e grande apoio desde minha ida para a França até a volta ao Brasil e retomada dos experimentos. Temos muito em comum, amiga. Tu me inspiras! À Milene Borsoi, obrigada por todos os momentos hilários divididos em Marseille e pela Europa, bem como pelo suporte emocional e profissional. Foi um prazer viver um tempo desta grande experiência contigo. Mais uma vez, agradeço à minha tia Rosane (aquela tia, a dos sonhos!) por tudo que representa para mim e para nossa família. Um dia tu disseste que tomaria conta da gente. Eu não poderia nem imaginar o quão sério tu estavas falando.

Obrigada por tudo, te amo.

Ao meu pai, Roberto, e minha irmã, Bruna, dois pés do nosso tripé. Meus queridos incentivadores, vocês são parte de mim e a base de tudo! Obrigada por todo o amor e carinho de sempre. Amo vocês.

À minha luz norteadora, minha mãe Elizabeth, que sei está por perto em todos os momentos, mesmo que não fisicamente. Obrigada por ter me conduzido até aqui e pelo amor que me deste, que é o grande apoio para que eu prossiga em frente.

Sempre te amarei.

Ao Lucas: não tenho palavras para expressar o que sinto por ti e minha gratidão pelo teu apoio em tudo. Mesmo que mil oceanos nos separassem mais uma vez, eles não diminuiriam a força do nosso sentimento. Tu és especial, único e eu te amo. Nossa pequena Dora é a consagração deste sentimento e tem sido, junto contigo, a grande força para que eu siga em frente, trazendo luz e cor para minha vida. Obrigada, minha filha Dora, por ter entrado em nossas vidas como um grande presente divino, nós te amamos.

« – Adieu, dit le renard. Voici mon secret. Il est très simple: on ne voit bien qu'avec le coeur. L'essentiel est invisible pour les yeux. – L'essentiel est invisible pour les yeux, répéta le petit prince, afin de se souvenir. – C'est le temps que tu as perdu pour ta rose qui fait ta rose si importante. – C'est le temps que j'ai perdu pour ma rose... fit le petit prince, afin de se souvenir. – Les hommes ont oublié cette vérité, dit le renard. Mais tu ne dois pas l'oublier. Tu deviens responsable pour toujours de ce que tu as apprivoisé. Tu es responsable de ta rose... – Je suis responsable de ma rose... répéta le petit prince, afin de se souvenir. »

Antoine de Saint-Exupéry

RESUMO

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). Espécies do gênero *Valeriana* são tradicionalmente utilizadas no tratamento de ansiedade e insônia, sendo aceitas pela Organização Mundial da Saúde como sedativas, e os valepotriatos constituem um grupo de metabólitos do gênero que contribui para seus efeitos farmacológicos. Trabalhos recentes demonstraram a atividade do tipo antidepressiva de diversas espécies de *Valeriana*, o que representa uma nova abordagem para o emprego terapêutico do gênero. Recentemente, nosso grupo demonstrou que uma fração enriquecida em valepotriatos diênicos (VAL) obtida de *V. glechomifolia*, espécie nativa do Rio Grande Sul, apresenta atividade do tipo antidepressiva mediada pelos sistemas neurotransmissores dopaminérgico e noradrenérgico, o que representa uma ação dual diferenciada da maioria dos antidepressivos convencionais. Apesar da relativa falta de conhecimento sobre a neurobiologia da depressão, evidências recentes indicam que diferentes alvos biológicos (além do sistema monoaminérgico) poderiam desempenhar um papel na fisiopatologia deste transtorno do humor. O objetivo deste trabalho foi aprofundar o estudo do mecanismo de ação de VAL, focando em novos alvos biológicos relacionados à fisiopatologia da depressão, bem como investigar o efeito da coadministração de VAL e fármacos antidepressivos. A análise isobolográfica da administração oral combinada de VAL com imipramina, desipramina ou bupropiona aponta para um sinergismo entre estas substâncias no teste da natação forçada (FST) em camundongos, sugerindo que VAL não age sobre os transportadores de dopamina e noradrenalina (ou não no mesmo sítio dos transportadores onde estes antidepressivos atuam). O efeito anti-imobilidade de VAL no FST foi acompanhado por uma redução na metilação global do DNA hipocampal, sugerindo que mecanismos epigenéticos do controle da transcrição gênica estão envolvidos no modo de ação de VAL, o que está de acordo com evidências recentes que demonstram que a redução na metilação do DNA está associada com efeito do tipo antidepressivo em roedores. Além disso, o efeito antidepressivo de

VAL foi prevenido pela administração (i.p.) de anisomicina (inibidor de síntese de proteínas) e K252a (inibidor de tirosina cinase da família de receptores Trk, incluindo o TrkB, ativado pelo BDNF), sugerindo que a ação antidepressiva de VAL envolve síntese de proteínas (ou um possível aumento na atividade transcricional) e participação da via de sinalização ativada pelo BDNF. Além disso, a administração repetida de VAL a camundongos aumentou a atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase e a expressão da isoforma $\alpha 2$ desta enzima no córtex dos animais, o que é particularmente relevante, visto que trabalhos clínicos e pré-clínicos relacionam uma redução na atividade cerebral desta enzima com o desenvolvimento da depressão. Ainda, VAL foi ativa em um modelo animal que relaciona a ativação de vias inflamatórias com o desenvolvimento de depressão. VAL preveniu o comportamento de doente e do tipo deprimido causado pela administração de LPS em camundongos, bem como o aumento na expressão cortical de citocinas pró-inflamatórias e o prejuízo causado na potenciação de longa-duração dependente de receptores NMDA (LTP NMDA-dependente) no córtex pré-frontal dos animais que receberam injeção de LPS. O conjunto de dados deste trabalho traz novas perspectivas quanto à ação farmacológica dos valepatriatos e corrobora hipóteses recentes sobre o envolvimento de diferentes alvos biológicos na neurobiologia da depressão, o que pode contribuir para uma melhor compreensão da etiologia e fisiopatologia deste distúrbio do humor.

Palavras-chaves: valepatriatos, *Valeriana glechomifolia*, antidepressivo, análise isobolográfica, sinergismo, epigenética, metilação do DNA, Na^+/K^+ -ATPase, inflamação, comportamento de doente, LTP NMDA-dependente.

ABSTRACT

Involvement of different biological targets on the mode of antidepressant-like action of *Valeriana glechomifolia* Meyer (Valerianaceae) diene valepotriates.

Species of *Valeriana* genus are the most used herbal supplement for treating anxiety and mild sleep disorders, being accepted by The World Health Organization as sedative, and valepotriates (non-glicosilated carbocyclic iridoids) contribute to the pharmacology of the genus. Some studies on potential *Valeriana* antidepressant activity were also published. *Valeriana glechomifolia* is a native species from southern Brazil flora, which has been studied by our group regarding its antidepressant properties. We demonstrated the antidepressant-like effect of diene valepotriates (VAL) in rodents, which is mediated by dopaminergic and noradrenergic neurotransmission, suggesting a dual mechanism distinct from most of the conventional antidepressants. Despite the relative lack of knowledge of the etiology and pathophysiology of depression, accumulating evidence indicates different biological targets (beyond the monoaminergic system) that could play a role in the pathophysiology of this mood disorder. In this regard, we further investigated the mechanism of antidepressant activity of VAL focusing on the novel theories related to depression etiology. Also, we investigated the interaction between VAL and imipramine, desipramine and bupropion by using isobolographic analysis. The isobolographic analysis indicated that the fixed ratio combinations of VAL with all the antidepressants studied resulted in a synergistic interaction in mice forced swimming test (FST), suggesting that VAL does not directly act on the same site of dopaminergic and noradrenergic neuronal transporters that are the target of those antidepressants. The antidepressant-like effect of VAL in mice FST was accompanied by reduced global DNA methylation in the hippocampus, which is in line with accumulating evidences indicating that DNA demethylation is associated with antidepressant-like effects in rodents. In addition, mice pre-treatment (i.p.) with anisomycin (an inhibitor of protein synthesis) or K252a (a selective inhibitor of tyrosine protein kinase activity of Trk receptor family, including the receptor TrkB, which is activated by BDNF) prevented the anti-immobility effect of VAL in the FST, indicating that VAL

antidepressant-like effect requires protein synthesis (or increased transcriptional activity) and the BDNF signaling contributes to this effect. In addition, mice repeated treatment with VAL increased the activity of Na⁺/K⁺-ATPase and the expression of the α 2 isoform in the cortex of the animals, which is particularly relevant, since clinical and pre-clinical studies reported a reduction in the cerebral activity of this enzyme in depressive disorders. Also, VAL was able to prevent LPS-triggered sickness and depressive-like behavior as well as the increase in the expression of cortical pro-inflammatory cytokines and the impairment in prefrontal cortex long-term potentiation NMDA dependent (LTP-NMDA dependent) in LPS-injected animals. These findings are in accordance with accumulating evidence suggesting that inflammation may play a role in the pathophysiology of major depressive disorder, and antidepressants possess anti-inflammatory properties. Altogether, our findings provide new data on the range of action of valepotriates and give further support to the involvement of different biological targets in the neurobiology of depression, which may contribute to an improved comprehension about its etiology and pathophysiology.

Keywords: valepotriates, *Valeriana glechomifolia*, antidepressant, isobolographic analysis, epigenetics, DNA methylation, Na⁺/K⁺-ATPase, inflammation, sickness behavior, LTP NMDA-dependent.

LISTA DE FIGURAS

Revisão Bibliográfica

Figura 1. Estrutura geral de um iridoide carbocíclico.....	40
---	----

Capítulo 1

Figure 1. Diene valepotriates from <i>Valeriana glechomifolia</i>	70
--	----

Figure 2. Log dose–response curves for the antidepressant-like activity induced by oral administration of diene valepotriates from <i>Valeriana glechomifolia</i> , imipramine, desipramine, bupropion and the combination of diene valepotriates with these antidepressants in mice forced swimming test...	71
---	----

Figure 3. Effects of the highest ED50 treatment combinations used in the dose-response curves on locomotor activity of mice assessed in the Open Field test.....	72
---	----

Figure 4. Isobolograms for the oral co-administration of diene valepotriates from <i>Valeriana glechomifolia</i> (VAL) with antidepressants: VAL + imipramine, VAL + desipramine, VAL + bupropion.....	73
---	----

Capítulo 2

Figure 1. Effects of the acute administration of diene valepotriates from <i>V. glechomifolia</i> obtained by supercritical CO ₂ extraction in mice forced swimming test and Open Field test.....	90
---	----

Figure 2. Effects of the acute administration of diene valepotriates from <i>V. glechomifolia</i> obtained by supercritical CO ₂ extraction on global DNA methylation in mice hippocampus and pre-frontal cortex.....	91
---	----

Figure 3. Effect of the pretreatment of mice with anisomycin on the anti-immobility effect of diene valepotriates from <i>V. glechomifolia</i> obtained by supercritical CO ₂ extraction in the FST.....	92
--	----

Figure 4. Effect of the pretreatment of mice with K252a on the anti-immobility effect of diene valepotriates from <i>V. glechomifolia</i> obtained by supercritical CO ₂ extraction in the FST.....	93
---	----

Figure 5. Effects of the acute administration of diene valepotriates from <i>V. glechomifolia</i> obtained by supercritical CO ₂ extraction on the concentration of BDNF and TrkB receptor in mice hippocampus.....	94
---	----

Capítulo 3

Figure 1. Diene valepotriates from <i>Valeriana glechomifolia</i>	146
--	-----

Figure 2. Effects of acute and repeated administration of diene valepotriates from <i>V. glechomifolia</i> obtained by supercritical CO ₂ extraction (VAL) in mice FST and OFT.....	147
Figure 3. Effects of acute and repeated administration of diene valepotriates from <i>V. glechomifolia</i> obtained by supercritical CO ₂ extraction (VAL) on Na ⁺ /K ⁺ -ATPase activity from mice hippocampus and cortex.....	148
Figure 4. Effects of repeated administration of diene valepotriates from <i>V. glechomifolia</i> obtained by supercritical CO ₂ extraction (VAL) on Na ⁺ /K ⁺ -ATPase α1, α2 and α3 isoforms expression in mice cortex.....	149
Capítulo 4	
Figure 1. Experimental timeline and design.....	163
Figure 2. Effects of diene valepotriates from <i>V. glechomifolia</i> pretreatment on sickness and depressive-like behavior induced by a stressful stimulus (6 min forced swimming session) + <i>E. coli</i> LPS injection in mice.....	167
Figure 3. Effects of diene valepotriates from <i>V. glechomifolia</i> post treatment on sickness and depressive-like behavior induced by a stressful stimulus (6 min forced swimming session) + <i>E. coli</i> LPS injection in mice.....	168
Figure 4. Effects of diene valepotriates from <i>V. glechomifolia</i> pretreatment on the alterations in the cortical expression of IL1-β, TNF-α and BDNF induced by a stressful stimulus (6 min forced swimming session) + <i>E. coli</i> LPS injection in mice.....	169
Figure 5. Effects of diene valepotriates from <i>V. glechomifolia</i> (VAL) post treatment on the alterations in the cortical expression of IL1-β, TNF-α and BDNF induced by a stressful stimulus (6 min forced swimming session) + <i>E. coli</i> LPS injection in mice.....	170
Capítulo 5	
Figura 1. Efeito do tempo após a indução da inflamação sobre o comportamento de doente e do tipo deprimido em camundongos C57BL/6 J....	199
Figura 2. Efeito da inflamação sobre a potenciação de longa duração (induzida por <i>theta-burst</i>) no córtex pré-frontal de camundongos.....	200
Figura 3. Efeito da inflamação sobre as correntes espontâneas pós-sinápticas excitatórias mediadas por receptores glutamatérgicos ionotrópicos do tipo AMPA e NMDA nas células piramidais das camadas V/VI do córtex pré-frontal de camundongos C57BL/6 J tratados ou não com LPS.....	201
Figura 4. Efeito da fração enriquecida em valepotriatos diênicos e de imipramina administrados 1 hora antes do evento inflamatório, sobre o	

comportamento de doente e do tipo deprimido em camundongos C57BL/6 J causado pela administração de LPS.....	203
Figura 5. Efeito da fração enriquecida em valepotriatos diênicos e de imipramina, administradas 5 horas depois do evento inflamatório, sobre o comportamento de doente e do tipo deprimido em camundongos C57BL/6 J causado pela administração de LPS.....	204
Figura 6. Efeito da fração enriquecida em valepotriatos diênicos e de imipramina, administradas 1 hora antes do evento inflamatório, sobre a potenciação de longa duração (induzida por <i>theta-burst</i>) no córtex pré-frontal de camundongos C57BL/6 J.....	205
Figura 7. Efeito da fração enriquecida em valepotriatos diênicos e de imipramina, administradas 5 horas depois do evento inflamatório, sobre a potenciação de longa duração (induzida por <i>theta-burst</i>) no córtex pré-frontal de camundongos C57BL/6 J.....	206
Figura 8. Efeito da fração enriquecida em valepotriatos diênicos e de imipramina, administradas 1 hora antes do evento inflamatório, sobre as correntes espontâneas pós-sinápticas excitatórias mediadas por receptores glutamatérgicos ionotrópicos do tipo AMPA nas células piramidais das camadas V/VI do córtex pré-frontal de camundongos C57BL/6 J tratados ou não com LPS.....	208
Figura 9. Atividade sináptica basal e propriedades intrínsecas das células das camadas V/VI do córtex pré-frontal de camundongos C57BL/6 J tratados com uma fração enriquecida em valepotriatos diênicos ou veículo 1 hora antes do evento inflamatório.....	210
Discussão Geral	
Figura 1. Diagrama do efeito do tipo antidepressivo agudo da fração enriquecida em valepotriatos diênicos nos ensaios <i>in vivo</i> realizados até o momento.....	240

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Table 1. ED50 values (mg/kg) for the antidepressant-like effect of diene valepotriates from <i>V. glechomifolia</i> , bupropion, imipramine, desipramine and the combinations of drugs in mice forced swimming test, determined by non-linear regression.....	68
--	----

Capítulo 3

Table 1. Diene valepotriates content of the supercritical CO ₂ <i>V. glechomifolia</i> extract determined through HPLC.....	145
---	-----

ABREVIATURAS E SIGLAS

5-azaD - 5-aza-2-deoxicitidina (do inglês *5-aza-2-deoxycytidine*)

5-azaC - 5-azacitidina (do inglês *5-azacytidine*)

AMPA - ácido alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico

ANOVA - análise de variância

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

BUP – bupropiona

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CCD – cromatografia em camada delgada

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

CFMV - Conselho Federal de Medicina Veterinária

CIOMS – Conselho da Organização Internacional de Ciências Médicas (do inglês *Council for International Organizations of Medical Sciences*)

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CNQX - 6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona

CPF – córtex pré-frontal

DESI – desipramina

DNA – ácido desoxirribonucleico

DNMT – DNA metiltransferase

ED50 – Dose efetiva necessária para produzir 50% do efeito (do inglês *Effective dose required to produce 50% of the effect*)

ED50 add – Dose efetiva necessária para produzir 50% do efeito teórica calculada (do inglês *Theoretical ED50*)

ED50 mix – Dose efetiva necessária para produzir 50% do efeito obtida experimentalmente (do inglês *Experimental ED50 of the drug mixture*)

ELISA - Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

FEPPS – Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde.

fEPSP - Registros extracelulares (de campo) de potenciais excitatórios pós-sinápticos (do inglês *field Excitatory postsynaptic potentials*)

FST – teste da natação forçada (do inglês *Forced Swimming Test*)

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

i.p. - intraperitoneal

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

IDO – indolamina 2,3 – dioxigenase

IL - interleucina (do inglês *interleukin*)

IMI – imipramina

INMED – Instituto Mediterrâneo de Neurobiologia (do francês *Institut de Neurobiologie de la Méditerranée*)

INSERM – Instituto Nacional da Saude e da Pesquisa Médica (do francês *Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale*)

K⁺ - íon potássio

LCA – líquido cerebrospinal artificial

LPS – lipopolissacarídeo (do inglês *Lipopolysaccharide*)

LTP – potenciação de longa-duração (do inglês *Long Term Potentiation*)

LTP - NMDA dependente – potenciação de longa duração dependente de receptores glutamatérgicos ionotrópicos do tipo NMDA

MDD – Depressão Maior (do inglês *Major Depressive Disorder*)

Na⁺ - íon sódio

NaCl – cloreto de sódio

NMDA - N-metil-D-aspartato

OFT – Teste do Campo Aberto (do inglês *Open Field Test*)

OMS – Organização Mundial da Saude

PPGCF – Programada de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

PFC – Cortex pré-frontal (do inglês *Prefrontal Cortex*)

PUC-RS – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

RNA – ácido ribonucleico (do inglês *Ribonucleic Acid*)

RNA m - ácido ribonucleico mensageiro

RT-qPCR – Transcrição Reversa e Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (do inglês *Reverse Transcription and Real-time polymerase chain reaction*)

SCCO₂ – dióxido de carbono supercrítico

SISBIO - Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade

S.D. – Desvio Padrão (do inglês *Standard Deviation*)

S.E.M. – Erro Padrão da Média (do inglês *Standard Error of the Mean*)

sEPSCs-AMPA – correntes excitatórias espontâneas mediadas por receptores glutamatérgicos ionotrópicos do tipo AMPA (do inglês *Spontaneous excitatory postsynaptic currents mediated by AMPA receptors*)

sEPSCs-NMDA – correntes excitatórias espontâneas mediadas por receptores glutamatérgicos ionotópicos do tipo NMDA (do inglês *Spontaneous excitatory postsynaptic currents mediated by NMDA receptors*)

TNF- α – fator de necrose tumoral α (*tumor necrosis factor α*)

TST – teste da suspensão pela cauda (do inglês *Tail Suspension Test*)

UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro

USP – Universidade de São Paulo

v.o. – via oral

VAL – fração enriquecida em valepotriatos diênicos (*diene valepotriates fraction*)

WHO – *World Health Organization*

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	27
OBJETIVOS	31
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	34
CAPÍTULO 1 “Synergistic interaction between diene valepotriates from <i>Valeriana glechomifolia</i> Meyer (Valerianaceae) and classical antidepressants: an isobolographic analysis”	45
CAPÍTULO 2 “Involvement of hippocampal DNA methylation in the antidepressant-like effect of diene valepotriates from <i>Valeriana glechomifolia</i> Meyer”	74
CAPÍTULO 3 “Effects of diene valepotriates from <i>Valeriana glechomifolia</i> on Na ⁺ /K ⁺ -ATPase activity in the cortex and hippocampus of mice”	112
CAPÍTULO 4 “Diene valepotriates from <i>Valeriana glechomifolia</i> prevent lipopolysaccharide-induced sickness and depressive-like behavior in mice” ...	151
CAPÍTULO 5	181
RESUMO	184
1.INTRODUÇÃO	187
2.1 Animais	191
2.2 Tratamentos	191
2.3 Ética.....	192
2.4 Avaliação temporal do efeito da inflamação sobre o comportamento de doente e do tipo deprimido.....	192
2.5 Avaliação do efeito de VAL sobre o comportamento de doente e do tipo deprimido	194
2.6 Avaliação da LTP NMDA-dependente de circuitos do córtex pré-frontal (CPF)	195
2.6.1 <i>Preparação de fatias coronais do córtex pré-frontal</i>	195
2.6.1.1 <i>Registros de campo para avaliação da potenciação de longa duração (LTP) no córtex pré-frontal (CPF)</i>	195
2.6.1.1.1 <i>Instrumentos e aparato</i>	195

2.6.1.1.2 Registros extracelulares (de campo) de potenciais excitatórios pós-sinápticos (fEPSP)	196
2.6.2 Registros em whole-cell configuration pela técnica de Patch-clamp.	197
2.6.2.1 Registro de sEPSC mediadas por receptores glutamatérgicos ionotrópicos do tipo AMPA (sEPSC-AMPA)	197
2.6.2.2 Registro de sEPSC mediadas por receptores glutamatérgicos ionotrópicos do tipo NMDA (sEPSC-NMDA)	197
2.6.2.3 Avaliação das propriedades intrínsecas celulares	198
2.7 Análise Estatística.....	198
3. RESULTADOS	199
3.1 Avaliação temporal do efeito da inflamação sobre as alterações comportamentais, LTP NMDA-dependente e sEPSC-AMPA ou sEPSC-NMDA em circuitos neuronais do CPF.....	199
3.2 Avaliação do efeito de VAL sobre o comportamento de doente e do tipo deprimido	202
3.3 Avaliação do efeito de VAL sobre a potenciação de longa duração (LTP) NMDA-dependente no córtex pré-frontal	204
3.4 Avaliação do efeito de VAL sobre as sEPSC-AMPA, sEPSC-NMDA e propriedade intrínseca dos neurônios piramidais das camadas V/VI do córtex pré-frontal	207
4. DISCUSSÃO	211
5. CONCLUSÃO	215
6. REFERÊNCIAS	216
DISCUSSÃO GERAL E PERSPECTIVAS	225
CONCLUSÕES	243
REFERÊNCIAS	247
ANEXOS	271

INTRODUÇÃO GERAL

O presente trabalho visou o aprofundamento do estudo da atividade sobre o sistema nervoso central de uma espécie vegetal nativa do Rio Grande do Sul: *Valeriana glechomifolia*. Esta espécie já vem sendo estudada há alguns anos pelos grupos de pesquisa das professoras Stela Maris Kuze Rates e Gilsane Lino von Poser, na faculdade de Farmácia da UFRGS, e os resultados obtidos demonstram que a mesma apresenta potencial atividade antidepressiva (SALLES, 2010; MÜLLER et al., 2012), podendo constituir um produto de partida para o isolamento de moléculas (valepotriatos diênicos) com atividade antidepressiva. Os valepotriatos são iridoides carbocíclicos não glicosilados e representam um padrão molecular inovador em relação aos antidepressivos disponíveis na clínica. Também, a atividade antidepressiva representa uma nova abordagem para o emprego terapêutico de espécies do gênero *Valeriana*, que tradicionalmente são empregadas como sedativas.

O envolvimento da neurotransmissão noradrenérgica e dopaminérgica no modo de ação de uma fração enriquecida em valepotriatos diênicos (VAL) obtida de *V. glechomifolia* já foi demonstrado por nosso grupo de pesquisa (MÜLLER et al., 2012a). Este mecanismo dual é diferenciado em relação à maioria dos antidepressivos atualmente disponíveis na clínica. Tendo em vista estes resultados e as novas teorias da fisiopatologia da depressão, a proposta desta tese foi investigar a ação de VAL sobre diferentes alvos biológicos que têm sido recentemente relacionados àquele transtorno do humor: atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase cerebral, mecanismos epigenéticos de controle da transcrição gênica (metilação de DNA), neuroinflamação e plasticidade sináptica. Além disso, o potencial efeito aditivo e/ou sinérgico da combinação de VAL com antidepressivos sintéticos de diferentes classes foi estudado através de análise isobolar. VAL foi obtida através de extração com CO_2 supercrítico das partes aéreas e subterrâneas de *V. glechomifolia* e foi caracterizada quanto ao teor de valepotriatos diênicos através de cromatografia líquida de alta eficiência.

Este trabalho será apresentado na forma de 5 capítulos: o primeiro capítulo aborda a análise isobológica da interação de VAL com diferentes

antidepressivos convencionais disponíveis na clínica, na forma de um manuscrito que está submetido ao periódico *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. No segundo capítulo, está apresentado o envolvimento da metilação global do DNA (no córtex pré-frontal e no hipocampo de camundongos) no modo de ação de VAL. Estes resultados estão organizados na forma de um artigo científico que será submetido ao periódico *Journal of Natural Products*. O terceiro capítulo compreende um artigo científico onde estão apresentados os resultados relacionados ao efeito de VAL sobre a atividade da enzima Na⁺/K⁺-ATPase hipocampal e cortical, que está submetido ao periódico *Planta Medica*. O quarto capítulo está apresentado na forma de um artigo científico que será submetido ao periódico *Phytomedicine*, onde foram abordados os efeitos de VAL em um modelo animal de depressão relacionado à ativação de vias inflamatórias, com foco em experimentos comportamentais e expressão central de citocinas pró-inflamatórias. Por fim, no quinto capítulo estão apresentados os resultados obtidos durante o estágio sanduíche de doutoramento, onde foram estudados os efeitos da inflamação sobre alterações comportamentais, LTP NMDA-dependente e transmissão sináptica e a ação de VAL sobre estes parâmetros.

A execução deste trabalho teve a participação de laboratórios de diferentes universidades (Lab. de Imunologia e Biologia Molecular da UFRGS, Lab. de Bioquímica e Farmacologia Molecular da UFRJ, Lab. de Psicofarmacologia da USP e Lab. de *Physiopathologie de la plasticité synaptique dans différents modèles de maladies neuropsychiatriques*, no *Institut de Neurobiologie de la Méditerranée*, da Université Aix-Marseille na França) em parcerias já previamente estabelecidas ou que foram efetivadas no âmbito desta tese. A maior parte dos experimentos comportamentais foi realizada no Laboratório de Psicofarmacologia Experimental da Faculdade de Farmácia da UFRGS. A extração utilizando CO₂ supercrítico foi realizada no Laboratório de Operações Unitárias da Faculdade de Engenharia da PUC-RS, sob supervisão dos professores Dr. Rubem Vargas e Dr. Eduardo Cassel, e a caracterização de VAL foi realizada no Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da UFRGS, sob supervisão da Prof. Dr. Gilsane Lino von Poser.

OBJETIVOS

Tendo em vista os resultados já obtidos até o momento para os valepotriatos diênicos obtidos das partes aéreas e subterrâneas de *V. glechomifolia*, o objetivo geral deste trabalho é a ampliação do estudo da atividade antidepressiva destas moléculas através da investigação de sua ação sobre alvos biológicos que têm sido recentemente relacionados à etiologia da depressão.

Os objetivos específicos são:

- Avaliar a natureza da interação existente entre VAL e antidepressivos convencionais, no teste da natação forçada (FST, do inglês *Forced swimming test*) em camundongos, através de análise isobolar;
- Investigar a participação de mecanismos epigenéticos da expressão gênica no efeito de VAL, especificamente o perfil de metilação do DNA, no córtex e hipocampo de camundongos;
- Avaliar os efeitos de VAL sobre a atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase pela medida da atividade enzimática *ex vivo* no hipocampo e córtex de animais tratados aguda e repetidamente com VAL e submetidos ao FST;
- Avaliar o efeito de VAL sobre o modelo experimental de comportamento de doente (*sickness behavior*) e do tipo deprimido induzido por LPS em camundongos e seu efeito sobre a expressão de citocinas pró-inflamatórias e do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF, do inglês *Brain Derived Neurotrophic Factor*), bem como seus efeitos e sobre a potenciação de longa duração dependente de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA (LTP NMDA-dependente) e transmissão sináptica de circuitos do córtex pré-frontal de camundongos.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Atualmente, os transtornos depressivos representam o mais comum e recorrente distúrbio do humor (MÖLLER et al., 2012). A organização mundial da saúde estima que 90 % das pessoas que cometem suicídio são pacientes deprimidos e prevê que em 2030, este transtorno psiquiátrico será a principal causa de incapacidade no mundo (OMS, 2008). Muitos medicamentos antidepressivos estão disponíveis na terapêutica, mas, apesar da gravidade do cenário que envolve este transtorno psiquiátrico, de 30 a 35 % dos pacientes deprimidos não apresentam boa resposta ao tratamento e a maioria dos medicamentos possui efeitos adversos importantes, que limitam a adesão ao tratamento (OLESEN et al., 2007). Estas observações salientam a importância do desenvolvimento de novos fármacos e do melhor conhecimento da neurobiologia da depressão.

A maioria dos estudos relacionados à etiologia da depressão é ainda embasada na teoria monoaminérgica da gênese deste transtorno psiquiátrico, que relaciona a depressão com uma menor disponibilidade de monoaminas cerebrais, em particular de serotonina, noradrenalina e dopamina (DUMAN et al., 1999; STAHL, 2008) e os antidepressivos disponíveis foram desenvolvidos com base nessa teoria (STAHL, 2008). Porém, esse foco de estudo não resultará em fármacos inovadores, nem auxiliará na evolução do conhecimento sobre as doenças mentais (NESTLER e CARLEZON, 2006). Assim, além da teoria monoaminérgica e de todos os seus desdobramentos, estão sendo discutidas outras hipóteses etiológicas; entre estas, ganham destaque as que relacionam a participação de fatores neurotróficos e da neuroplasticidade (DUMAN et al., 1999; CASTRÉN et al., 2007), da enzima Na^+/K^+ -ATPase cerebral (GOLDSTEIN et al., 2006; GOLDSTEIN et al., 2009), da regulação da transcrição de genes específicos por mecanismos epigenéticos (VIALOU et al., 2013), do sistema imune (KHAIROVA et al., 2009; DANTZER et al., 2011) e da neurotransmissão glutamatérgica (SANACORA et al., 2008).

Tendo em vista a identificação de diferentes vias e alvos biológicos envolvidos na fisiopatologia da depressão, o desenvolvimento de novos

antidepressivos torna-se uma prioridade, uma vez essa abordagem pode resultar no desenvolvimento de antidepressivos mais eficazes e de ação mais rápida.

Nesse contexto, a pesquisa de produtos naturais com ação central se insere como uma alternativa para o desenvolvimento de fármacos com mecanismos de ação possivelmente diferenciados (WANG et al., 2008). A diversidade química das moléculas de origem natural e a pressão dos mecanismos de seleção biológica determinam uma alta probabilidade de moléculas bioativas com mecanismos inovadores e os produtos naturais permanecem ainda como uma fonte de grande interesse para obtenção de novos modelos moleculares bioativos (GOTTLIEB et al., 1996; NEWMAN, 2008).

Dentre as espécies vegetais com ação no sistema nervoso central, as pertencentes ao gênero *Valeriana* encontram-se entre as mais estudadas, principalmente no que diz respeito à ação sedativa e ansiolítica das mesmas (KRYSTAL e RESSLER, 2001). As espécies mais empregadas na produção de medicamentos (que são geralmente compostos pelo extrato seco das raízes, padronizados em ácidos valerênicos) são *V. officinalis*, *V. wallichii* e *V. edulis* (FUGG-BERMAN e COTT, 1999; HERRERA-ARELLANO et al., 2001). A Organização Mundial da Saúde considera que o uso oral de preparações farmacêuticas obtidas a partir de *V. officinalis* pode ser utilizado como alternativa aos benzodiazepínicos, sendo sua principal indicação o uso como sedativo leve (OMS, 1999). Ainda, um trabalho da *Community Herbal Monograph* adotado pelo *Committee on Herbal Medicinal Products* da *European Medicines Agency* (2006) enumera as seguintes indicações terapêuticas da raiz de *Valeriana officinalis*: “uso bem estabelecido para o alívio de tensão nervosa leve e dificuldade em adormecer”.

Existe um número considerável de estudos clínicos abordando o uso de *Valeriana* no tratamento de distúrbios do sono e ansiedade na literatura, cujos resultados são controversos. Em uma meta-análise realizada FERNÁNDEZ-SAN-MARTÍN e colaboradores (2010), concluiu-se que o uso de *Valeriana* pode melhorar subjetivamente a qualidade do sono, mas este achado não é comprovado

quantitativamente ou através de medidas objetivas. Outros autores também realizaram uma revisão sistemática de ensaios duplo-cegos e placebo-controlados relacionados ao uso de *V. officinalis* para tratamento da insônia concluindo que a mesma pode ter algum efeito no tratamento de insônia moderada (NUNES e SOUZA, 2011). Em relação ao emprego de *Valeriana* no tratamento de distúrbios de ansiedade, revisões sistemáticas da literatura e meta-análises concluem que as evidências clínicas ainda são insuficientes para recomendar a utilização de preparações de *Valeriana* nestes casos, pois são necessários estudos de melhor qualidade metodológica, com menor variabilidade no delineamento, número e características da amostra, padronização de doses, da composição de extratos e do tempo de tratamento, para que os achados apresentem credibilidade (CHIAPPEDI e BEJOR, 2010; FAUSTINO et al., 2010; NUNES e SOUZA, 2011; SARRIS et al., 2013).

Muitos estudos apontam para o envolvimento da neurotransmissão GABAérgica na atividade desta planta. Embora seu mecanismo de ação não esteja plenamente esclarecido, é relatado que *V. officinalis* ativa receptores GABA_A (MENNINI et al., 1993; CAVADAS et al., 1995; ORTIZ et al., 2004) e que o ácido valerênico inibe o sistema enzimático responsável pelo catabolismo cerebral do ácido gama aminobutírico (GABA) (HOUGHTON, 1999). DIETZ e colaboradores (2005) demonstraram em estudos *in vitro* que diferentes extratos de *V. officinalis* e o ácido valerênico parecem também atuar como agonista parcial sobre receptores serotoninérgicos 5-HT_{5a} e que o ácido valerênico e diidrovaltrato possuem afinidade pelo sítio barbitúrico do receptor GABA_A e não apresentam afinidade pelo sítio benzodiazepínico destes receptores (MENNINI et al., 1993). SALLES (2010) demonstrou que valepotriatos (valtrato, acevaltrato, 1-β-acevaltrato e diavaltrato) não se ligam ao sítio benzodiazepínico do complexo receptor GABA_A nem ao receptor serotoninérgico (5-HT_{1a}), na faixa de concentração de 1-100 μM.

Em relação aos constituintes neuroativos do gênero, há estudos demonstrando que valepotriatos parecem contribuir para as atividades

farmacológicas relatadas (PATOCKA e JAKL, 2010). Os valepotriatos são iridóides carbocíclicos (cujo núcleo central está demonstrado na Figura 1) não glicosilados e sua diversidade estrutural é definida por diferentes substituintes ácidos esterificados com os grupos hidroxila, pela presença ou ausência de um grupo epóxido e pelo número e posição das ligações duplas no núcleo principal (HOBBS, 1989). Dividem-se em dois grupos principais: monoênicos e diênicos. Os diênicos distinguem-se dos monoênicos por possuírem uma segunda ligação dupla entre C5 e C6. Estes compostos são altamente instáveis; sob influência de umidade e acidez, decompõem-se rapidamente produzindo ácidos livres e núcleos monoterpênicos; também ocorre a abertura do grupamento epóxido gerando os produtos de degradação baldrinal e homobaldrinal (HOUGHTON, 1988; HOBBS, 1989). A quebra das ligações ésteres dos substituintes do núcleo principal, liberando ácido valérico, é responsável pelo odor característico das espécies de *Valeriana*. Nosso grupo de pesquisa demonstrou que as condições de armazenamento exercem grande influência sobre o teor de valepotriatos diênicos de uma fração obtida por extração com dióxido de carbono supercrítico de *V. glechomifolia*, sendo que a fração seca conservada em atmosfera de nitrogênio conservou o núcleo iridoide carbocíclico enquanto a fração armazenada em metanol apresenta produtos de degradação (MÜLLER et al., 2012b).

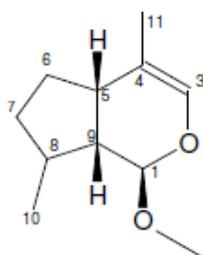


Figura 1. Estrutura geral de um iridoide carbocíclico.

No Brasil, foram descritas dezessete espécies de *Valeriana* (BORSINI, 1962; SOBRAL, 1999a, 1999b, 1999c). Entre as espécies descritas, doze ocorrem no Rio Grande do Sul, e dentre essas se encontra *Valeriana glechomifolia*

(SOBRAL, 1999a, 1999b). SALLES e colaboradores (2000) isolaram e identificaram nove iridóides, sendo oito valepotriatos e um iridóide glicosilado, de folhas, caules e raízes de *V. glechomifolia*. SILVA e colaboradores (2002) desenvolveram metodologia por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e quantificaram cinco valepotriatos (acevaltrato, 1- β -acevaltrato, diavaltrato, diidrovaltrato e valtrato) em nove espécies de *Valeriana* coletadas no Rio Grande do Sul, sendo que dentre as espécies de *Valeriana* que ocorrem no Rio Grande do Sul, *V. glechomifolia* é a espécie que apresenta os teores mais elevados de valepotriatos (2,05 %), sendo o caule o órgão de maior acúmulo (SILVA et al., 2002).

Diversos trabalhos têm relacionado toxicidade ao uso de espécies de *Valeriana*, atribuindo-a, frequentemente, aos valepotriatos. Em um estudo *in vitro*, BOUNTHAN e colaboradores (1981) demonstraram que a exposição de células de hepatoma de ratos a valtrato e diidrovaltrato em diferentes concentrações (0,28; 0,14 e 0,7 μ M por 24, 48 e 72 horas, respectivamente) é capaz de induzir 100% de mortalidade nas culturas. TORTAROLO (1982) demonstrou que os valepotriatos são tóxicos *in vitro* às células medulares de ratos, embora não tenha observado nenhuma alteração significativa nessas células após a administração oral de doses maiores que 1500 mg/kg. A administração aguda de valtrato por via i.p. (45 and 65 mg/kg) ou oral (45 e 1350 mg/kg) em ratos não teve efeitos tóxicos sobre as células precursoras hematopoiéticas em comparação com os grupos controle (BRAUN et al., 1984). TUFIK e colaboradores (1994) investigaram o efeito da administração prolongada (30 dias) de uma mistura de valepotriatos nas doses de 6, 12 e 24 mg/kg (v.o.) a ratas grávidas. Não foram observadas alterações na fertilidade, tampouco nas ninhadas das fêmeas tratadas durante a gravidez. LIN e colaboradores (2009) demonstraram que os valepotriatos e seus derivados acilados apresentam acentuada citotoxicidade frente a culturas celulares de adenocarcinoma de pulmão, linhagens celulares de hepatoma, câncer de próstata e cólon. Acevaltrato foi considerado o mais ativo. SALLES (2010) realizou um estudo de toxicidade aguda com extrato diclorometano de *V. glechomifolia* (enriquecido em valepotriatos) nas doses de 10, 20, 30, 40 e 50 mg/kg por via intraperitoneal (i.p.),

e 5, 10, 20, 40 e 80 mg/kg por v.o. Não houve morte nem sinais de toxicidade nos animais tratados pela via oral nas primeiras 24 horas após o tratamento; porém, nas doses de 20 - 80 mg/kg houve uma morte na primeira semana. A dose letal mediana (DL50) encontrada para a via i.p. foi de 42 mg/kg, atribuindo aos valepotriatos, segundo a OECD (2001), toxicidade de alta a moderada. A menor toxicidade pela via oral pode ser explicada pela baixa absorção e distribuição dos valepotriatos (HOUGHTON, 1997) e também pela instabilidade dos mesmos em meio fortemente ácido ou alcalino, condição que leva à formação dos produtos de degradação baldrinal e homobaldrinal, que não apresentam grupo epóxido, ao qual é relacionada à citotoxicidade dos valepotriatos (HOBBS, 1989).

MAURMANN e colaboradores (2011) demonstraram que a administração intraperitoneal aguda de uma fração enriquecida em valepotriatos do extrato de *V. glechomifolia* apresenta propriedades sedativa e ansiolítica e, além disso, prejudica a memória de reconhecimento em camundongos, achado este que está acordo com HOUGHTON (1988) que demonstrou o efeito sedativo de uma mistura de valepotriatos administrada por via oral em ratos. Além disso, ANDREATINI e LEITE (1994) demonstraram que o efeito ansiogênico desenvolvido pela retirada de benzodiazepínicos é atenuado por uma mistura de valepotriatos em ratos. Ainda, em um ensaio clínico, foi demonstrado que uma mistura de valepotriatos apresenta efeito ansiolítico potencial em pacientes diagnosticados com distúrbio de ansiedade (ANDREATINI et al., 2002). SALLES (2010) demonstrou que a administração aguda de um extrato diclorometano padronizado em valepotriatos (10 mg/kg, v.o.), foi inefetiva no teste do labirinto em cruz elevado e tempo de sono barbitúrico em camundongos, sugerindo a ausência de propriedades ansiolíticas e hipnótico-sedativas destas moléculas quando administradas agudamente em camundongos.

De uma maneira geral, os fitomedicamentos constituídos por extratos de espécies de *Valeriana* europeias requerem de 2 a 4 semanas para apresentarem efeitos positivos na qualidade do sono dos pacientes (BLUMENTHAL, 2000). Este perfil é semelhante ao de antidepressivos, pois estes medicamentos também

requerem este tempo até atuarem na melhora dos sintomas da depressão (UHER et al., 2011). Além disso, os antidepressivos são utilizados no tratamento de distúrbios de ansiedade, sendo os inibidores seletivos da recaptação de serotonina os medicamentos de primeira escolha para o tratamento de ansiedade generalizada e síndrome do pânico (STAHL, 2008). Essas observações instigaram nosso grupo de pesquisa, que demonstrou recentemente a atividade do tipo antidepressiva de VAL em camundongos (SALLES, 2010; MÜLLER et al., 2012a). Este achado está em acordo com dados recentes da literatura, que têm apontado o potencial antidepressivo de outras espécies do gênero, como *V. officinalis* (HATTESOHL et al., 2008), *V. wallichii* (SUBHAN et al., 2010; SAH et al., 2011), *V. prionophylla* (HOLZMANN et al., 2011), *V. fauriei* (LIU et al., 2012).

Recentemente, nosso grupo de pesquisa demonstrou, em roedores, que o efeito do tipo antidepressivo de VAL é mediado pela neurotransmissão dopaminérgica e noradrenérgica (MÜLLER et al., 2012b), o que representa uma ação dual diferenciada em relação aos antidepressivos convencionais. Esses dados estão em consonância com achados de SAH e colaboradores (2011), os quais demonstraram que a atividade do tipo antidepressiva de um extrato diclorometano de *V. wallichii* enriquecido em valepotriatos é dependente principalmente das neurotransmissões dopaminérgica e noradrenérgica. Além disso, nosso grupo também demonstrou que valepotriatos diênicos (valtrato, acevaltrato e 1- β -acevaltrato) isolados de *V. glechomifolia* inibem *in vitro* a atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase de cérebro de rato (BETTERO et al., 2011), o que é particularmente relevante, visto que há relatos que a atividade dessa enzima é alterada em desordens psiquiátricas, incluindo a depressão (EL-MALLAKH e WYATT, 1995), e antidepressivos como a fluoxetina e a imipramina, apresentam atividade inibitória *in vitro* sobre a Na^+/K^+ -ATPase em córtex de rato (ZANATTA et al., 2001).

Considerando as abordagens recentes relacionadas à etiologia da depressão, que relacionam o envolvimento de alvos biológicos diferentes do sistema monoaminérgico (citados anteriormente) na etiologia deste transtorno de humor,

como a participação de fatores neurotróficos e da neuroplasticidade (DUMAN et al., 1999; CASTRÉN et al., 2007), da enzima Na^+/K^+ -ATPase cerebral (GOLDSTEIN et al., 2006; GOLDSTEIN et al., 2009), da regulação da transcrição de genes específicos por mecanismos epigenéticos (VIALOU et al., 2013), do sistema imune (KHAIROVA et al., 2009; DANTZER et al., 2011) e da neurotransmissão glutamatérgica (SANACORA et al., 2008), novos enfoques de estudo se fazem necessários para uma melhor compreensão do efeito antidepressivo de *V. glechomifolia*.

Dessa forma, o presente trabalho visou aprofundar o estudo do mecanismo de ação antidepressiva de VAL, através da avaliação da sua ação sobre diferentes alvos biológicos.

CAPÍTULO 1

Os experimentos apresentados nesta parte do trabalho foram realizados no Laboratório de Psicofarmacologia Experimental da Faculdade de Farmácia da UFRGS, sob orientação da Prof. Dr. Stela Rates.

As páginas 51 a 73 desta tese referem-se ao artigo “Synergistic interaction between diene valepotriates from *Valeriana glechomifolia* Meyer (Valerianaceae) and classical antidepressants: an isobolographic analysis”, submetido à publicação no periódico *Journal of Pharmacy and Pharmacology*.

Neste trabalho, a natureza da interação existente entre valepotriatos diênicos obtidos de *V. glechomifolia* (VAL) e antidepressivos convencionais (bupropiona, imipramina e despramina) foi investigada através de análise isobolográfica utilizando o teste da natação forçada em camundongos. VAL apresentou interação do tipo sinérgica com todos os antidepressivos utilizados no estudo, o que indica que o modo de ação antidepressiva de VAL envolve a ativação de vias ou sítios diferentes daqueles envolvidos no mecanismo de ação dos antidepressivos estudados. Além disso, estes resultados apontam para o potencial uso adjuvante de VAL com antidepressivos utilizados na clínica.

Carta de submissão do manuscrito:

From: JPPedoffice@wiley.com

To: stela.rates@ufrgs.br, ratesmk@hotmail.com

lizgirardi@yahoo.com.br, evestolz@yahoo.com.br,

CC: ahbetti@gmail.com, vivianherz@hotmail.com, stela.rates@ufrgs.br,
ratesmk@hotmail.com

Subject: Journal of Pharmacy and Pharmacology - Manuscript ID JPP-14-0571 [email ref: SE-6-a]

Body: 18-Aug-2014

Dear Dr. RATES:

Your manuscript entitled "Synergistic interaction between diene valepotriates from *Valeriana glechomifolia* Meyer (Valerianaceae) and classical antidepressants: an isobolographic analysis" by Muller, Liz; Stolz, Eveline; Betti, Andresa; Herzfeldt, Vivian; RATES, STELA, has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in Journal of Pharmacy and Pharmacology.

Co-authors: Please contact the Editorial Office as soon as possible if you disagree with being listed as a co-author for this manuscript.

Your manuscript ID is JPP-14-0571.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <http://mc.manuscriptcentral.com/jppharm> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <http://mc.manuscriptcentral.com/jppharm>.

Thank you for submitting your manuscript to Journal of Pharmacy and Pharmacology.

Sincerely,
Journal of Pharmacy and Pharmacology Editorial Office

Date Sent: 18-Aug-2014

CAPÍTULO 2

Os experimentos apresentados nesta parte do trabalho foram realizados no Laboratório de Psicofarmacologia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, sob supervisão da Prof. Dr. Sâmia Joca.

As páginas 79 a 111 desta tese referem-se ao artigo “Involvement of hippocampal DNA methylation in the antidepressant-like effect of diene valepotriates from *Valeriana glechomifolia* Meyer” que será submetido ao periódico *Journal of Natural Products*.

Neste trabalho, o envolvimento da metilação global do DNA hipocampal e cortical no modo de ação antidepressiva de valepotriatos diênicos obtidos de *Valeriana glechomifolia* Meyer (VAL) foram estudados. Os resultados demonstraram que o efeito do tipo antidepressivo da administração aguda de VAL (5 mg/kg, p.o.) no teste de natação forçada (FST) em camundongos foi seguido por uma redução significativa na metilação global do DNA no hipocampo dos animais (sem efeitos no córtex pré-frontal). O pré-tratamento dos animais com anisomicina (20 mg/kg, s.c., um inibidor da síntese de proteínas) e K252a (80 µg/kg, i.p., um bloqueador do receptor de TrkB, que é ativado pelo fator neurotrófico derivado do cérebro - BDNF) previniu o efeito do tipo antidepressivo de VAL no FST. A administração aguda de VAL induziu uma *up regulation* no receptor TrkB e uma tendência em aumentar os níveis de BDNF no hipocampo dos camundongos. Estes resultados dão suporte à hipótese de que mecanismos epigenéticos do controle da transcrição gênica, como a metilação do DNA, estão envolvidos no desenvolvimento de comportamentos depressivos e sugerem que a inibição da metilação gênica pode ser um alvo molecular *in vivo* de VAL. Além disso, a redução da metilação do DNA de hipocampo causada pela administração VAL é seguida por um aumento da atividade transcricional, uma vez que a síntese de proteína está envolvida na sua atividade antidepressiva. Ainda, a sinalização mediada por BDNF-TrkB pode contribuir para o efeito do tipo antidepressivo de VAL.

CAPÍTULO 3

Os experimentos apresentados nesta parte do trabalho foram realizados no Laboratório de Psicofarmacologia Experimental da UFRGS sob orientação da Prof. Dr. Stela Rates e no Laboratório de Bioquímica e Farmacologia Molecular da UFRJ, no Rio de Janeiro – RJ, sob supervisão do Prof. Dr. Luis Eduardo Quintas.

As páginas 119 a 149 desta tese referem-se ao artigo “Effects of diene valepotriates from *Valeriana glechomifolia* on Na⁺/K⁺-ATPase activity in the cortex and hippocampus of mice”, aceito para publicação no periódico *Planta Medica*.

Neste trabalho, foram estudados os efeitos da administração aguda (5 mg/kg, p.o.) e repetida (5 mg/kg, p.o., uma vez por dia durante 3 dias) de valepotriatos diênicos obtidos de *V. glechomifolia* Meyer (VAL) sobre a enzima Na⁺/K⁺-ATPase no córtex e hipocampo de camundongos submetidos ou não ao teste da natação forçada (FST). Além disso, a expressão protéica das isoformas α 1, α 2 e α 3 da enzima no córtex de camundongos tratados repetidamente com VAL (e submetidos ou não ao FST) foi investigada. A administração aguda de VAL diminuiu significativamente o tempo de imobilidade dos camundongos no FST quando comparado com o grupo controle. Apenas os animais tratados repetidamente com VAL apresentaram aumento da atividade global da Na⁺/K⁺-ATPase no córtex cerebral e a exposição ao FST neutralizou estes efeitos de VAL. Não foram observadas alterações na atividade da Na⁺/K⁺-ATPase no hipocampo dos animais. A administração repetida de VAL aumentou o teor cortical da isoforma α 2, e a expressão protéica da isoforma α 3 foi aumentada apenas em camundongos tratados repetidamente com VAL e submetidos à natação forçada. Os animais tratados com veículo e submetidos ao FST também apresentaram um aumento no conteúdo cortical da isoforma α 2, mas não na atividade global da enzima. Estes resultados sugerem que a Na⁺/K⁺-ATPase cortical pode representar um alvo molecular *in vivo* de VAL. Além disso, o FST *per se* influencia a expressão protéica das isoformas de Na⁺/K⁺-ATPase e neutraliza os efeitos de VAL sobre a enzima no córtex.

Carta de aceite do artigo:

From: Jose.L.Rios@uv.es
To: stela.rates@ufrgs.br
CC:
Subject: Planta Medica - Decision on PLAMED-2014-08-0982-OP.R2
Body: 04-Dec-2014

Dear Dr. Rates,

It is a pleasure to accept your revised manuscript entitled "Effects of diene valepotriates from *Valeriana glechomifolia* on Na⁺/K⁺-ATPase activity in the cortex and hippocampus of mice" in its current form for publication in *Planta Medica*.

Thank you for your fine contribution. I look forward to your continued contribution to the Journal.

As you might know, *Planta Medica* is the official journal of GA, the "Society for Medicinal Plants and Natural Products Research". You are kindly invited to join the Society. For further information please visit www.ga-online.org.

Sincerely,

Prof. Jose-Luis Rios
Editor *Planta Medica*
Jose.L.Rios@uv.es

Prof. Luc Pieters
Editor-In-Chief *Planta Medica*
luc.pieters@uantwerpen.be

Date Sent: 04-Dec-2014

CAPÍTULO 4

Os experimentos apresentados nesta parte do trabalho foram realizados no Laboratório de Psicofarmacologia Experimental da Faculdade de Farmácia da UFRGS, sob orientação da Prof. Dr. Stela Maris Kuze Rates e no Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular da Faculdade de Veterinária da UFRGS, sob supervisão da Prof. Dr. Ana Paula Ravazzolo.

As páginas 155 a 180 desta tese referem-se ao artigo “Diene valepotriates from *Valeriana glechomifolia* prevent lipopolysaccharide-induced sickness and depressive-like behavior in mice”, que será submetido ao periódico *Phytomedicine*.

Neste trabalho, foram investigados os efeitos de valepotriatos diênicos obtidos de *V. glechomifolia* Meyer (VAL) (10 mg/kg, p.o.) sobre o comportamento de doente e do tipo deprimido e a expressão de citocinas pró-inflamatórias e do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) no córtex de camundongos expostos a um desafio imune (5 min de natação forçada seguidos da injeção de LPS de *E. coli* - 600 µg/kg, i.p.). O evento inflamatório reduziu o número de *crossings* no teste do campo aberto e aumentou a imobilidade dos camundongos no teste de suspensão pela cauda, o que caracteriza o desenvolvimento de comportamento de doente e do tipo deprimido, respectivamente. Além disso, a natação forçada + injeção de LPS aumentou a expressão cortical de citocinas pró-inflamatórias (IL - 1 β e TNF- α) e diminuiu a expressão de BDNF. Para avaliar a ação de VAL, a mesma foi administrada por via oral 1 h antes (pré-tratamento) ou 5 horas após (pós - tratamento) a injeção de LPS de *E. coli*. O pré-tratamento com VAL restaurou tanto as alterações comportamentais como a expressão de citocinas pró-inflamatórias corticais nos animais que receberam o LPS, mas não teve nenhum efeito sobre a expressão de BDNF, enquanto o pós-tratamento foi eficaz apenas em normalizar as alterações comportamentais. Estes resultados demonstram pela primeira vez os efeitos preventivos de VAL em um modelo experimental de depressão associada à inflamação. Além disso, os efeitos VAL foram acompanhados pela normalização da expressão de citocinas pró-inflamatórias, fornecendo novos dados sobre a gama de ação dessas moléculas.

CAPÍTULO 5

Os experimentos apresentados nesta parte do trabalho foram realizados no Laboratório de *Physiopathologie de la plasticité synaptique dans différents modèles de maladies neuropsychiatriques*, no *Institut de Neurobiologie de la Méditerranée* (INSERM – U901), da Université Aix-Marseille, em Marseille (França), sob supervisão da Dr. Pascale Chavis, através de bolsa de doutorado sanduíche CNPq - Ciência sem Fronteiras (período de maio 2013 – abril 2014).

RESUMO

A relação entre a ativação do sistema imune e a etiologia da depressão maior e tem sido recentemente demonstrada. Ainda, prejuízos na potenciação de longa-duração depende de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA (LTP NMDA-dependente), têm sido associados à fisiopatologia da depressão e os efeitos deletérios de níveis centrais aumentados de citocinas pró-inflamatórias sobre esta forma de plasticidade sináptica têm sido estudados. Neste trabalho, foram investigados os efeitos de valepotriatos diênicos (VAL, 10 mg/kg, p.o.) obtidos de *Valeriana glechomifolia*, uma espécie nativa do sul Brasil que apresenta potencial antidepressivo, sobre as alterações comportamentais (comportamento de doente, avaliado no teste do campo aberto, e do tipo deprimido, avaliado no teste da suspensão pela cauda), na LTP-NMDA dependente e na transmissão sináptica de circuitos do córtex pré-frontal (CPF) de camundongos C57Bl/6 J causadas pela administração de lipopolissacarídeo (LPS) de *E. coli* (600 µg/kg, i.p.). A administração de VAL foi realizada 1 h antes (pré-tratamento) ou 5 h após (pós-tratamento) a injeção de LPS. A ativação das vias inflamatórias causou redução da distância percorrida pelos animais no teste do campo aberto e aumento do tempo de imobilidade dos animais no teste da suspensão pela cauda, indicando o desenvolvimento de comportamento de doente e do tipo deprimido, respectivamente. Além disso, a injeção de LPS causou um prejuízo na magnitude da LTP NMDA-dependente no CPF dos animais - que perdurou por até 3 dias (ainda que as alterações comportamentais tenham sido normalizadas) - e uma redução significativa na amplitude das correntes excitatórias pós-sinápticas mediadas por receptores-canal AMPA (sEPSC-AMPA) nos neurônios piramidais das camadas V/VI do CPF. O pré-tratamento dos animais com VAL preveniu as alterações comportamentais causadas pela inflamação, bem como o prejuízo sobre a LTP NMDA-dependente no CPF, que foi acompanhado pela normalização das sEPSC-AMPA nos neurônios em estudo. O pós-tratamento dos animais com VAL não teve efeitos sobre as alterações comportamentais e LTP NMDA-dependente. Estes resultados demonstram pela primeira vez a ação deletéria da inflamação

sobre a LTP NMDA-dependente no CPF de camundongos e os efeitos preventivos de VAL em um modelo animal de depressão relacionado à ativação de vias inflamatórias, sugerindo que estes efeitos podem ser mediados pela normalização no número ou função de receptores-canal AMPA nesta estrutura cerebral.

1. INTRODUÇÃO

Diversos estudos sugerem que a depressão é acompanhada pela ativação de vias imunoinflamatórias e, recentemente, fatores inflamatórios como interleucina 1 β (IL-1 β), interleucina 6 (IL6), fator de necrose tumoral (TNF- α), proteína C reativa, interferon α e γ tem sido relacionados com o sistema nervoso central, principalmente no que diz respeito a sua associação com a fisiopatologia da depressão (MAES et al., 1990; MAES et al., 1991; GARCIA-BUENO et al., 2008; MAES et al., 2011; WAGER-SMITH e MARKOU, 2011). Corroborando essa hipótese, evidências apontam para níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias no soro de pacientes deprimidos (MAES, 2008; DOWLATI et al., 2010; HANNESTAD et al., 2011) e o uso de interferon γ no tratamento de pacientes com hepatite C está relacionado à alta incidência de depressão nos mesmos (PRATHER et al., 2009). Além disso, uma série de trabalhos evidencia uma maior incidência de depressão em pacientes com artrite reumatoide, câncer, problemas cardiovasculares ou asma (CAPURON et al.; 2004; LESPERANCE e FRASURE-SMITH, 2007; WOLFE e MICHAUD, 2009; XI et al., 2012; LABOR et al.; 2012). Ainda, alguns estudos de intervenção confirmam a associação entre o sistema imune e a depressão em humanos. TYRING e colaboradores (2006) demonstraram que a administração de um antagonista de receptores do TNF- α em pacientes com psoríase resulta em uma melhora dos sintomas da depressão que normalmente é associada a essa doença. Em outros estudos, o tratamento de pacientes deprimidos com celecoxib, um bloqueador da enzima ciclooxygenase 2, aumentou a eficácia dos antidepressivos reboxetina (MULLER et al., 2006), fluoxetina (AKHONDZADEH et al., 2009) e sertralina (ABBASI et al., 2012). Além disso, a associação de aspirina a inibidores seletivos da recaptação de serotonina reduz a taxa de refratariedade ao tratamento com os antidepressivos e o tempo requerido para que os mesmos sejam efetivos na melhora dos sintomas da depressão (MENDLEWICZ et al., 2006).

Além destas observações em humanos, estudos pré-clínicos mostram que a administração sistêmica de lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (LPS) em roedores causa alterações comportamentais dependentes do tempo relacionadas ao aumento no nível periférico (e, subsequentemente, central) de citocinas pró-inflamatórias (FRENOIS et al., 2007; DANTZER et al., 2008; VIANA et al., 2010). Resumidamente, a administração periférica de LPS aos camundongos induz um aumento no nível sérico e central de citocinas pró-inflamatórias, que acarreta no desenvolvimento do comportamento de doente, o qual é caracterizado principalmente pela prostração dos animais (redução na atividade locomotora) e tem um pico de 2 a 6 horas após o estabelecimento do evento inflamatório (DANTZER et al., 2008; VIANA et al., 2010). O comportamento do tipo deprimido, caracterizado pelo aumento no tempo de imobilidade do animal no TST, é estabelecido a partir deste *background*, uma vez que as citocinas pró-inflamatórias que induzem o comportamento de doente (como IL-1 β e TNF- α) também aumentam a atividade central da enzima indolamina 2,3 dioxigenase (IDO), a qual participa do metabolismo do triptofano (MULLER et al., 2011). Esse aumento na atividade da IDO tem um pico 24 h após a injeção de LPS e resulta em redução dos níveis de serotonina, uma vez que a ativação desta enzima causa um desvio no metabolismo de triptofano, levando a um aumento na produção de quinurenina e outros metabólitos diferentes da serotonina, como ácido quinolínico, que apresenta potencial neurotóxico (DANTZER et al., 2008; DANTZER et al., 2011; SUBLETTE e POSTOLACHE, 2012). Desta forma, a ativação desta enzima, que ocorre devido ao pico sérico e central na expressão das citocinas pró-inflamatórias, está diretamente envolvida no desenvolvimento do comportamento do tipo deprimido (DANTZER et al., 2011; MAES et al., 2011). O tratamento de animais submetidos a este modelo de depressão com antidepressivos (MELLO et al., 2013; OHGI et al., 2013) ou anti-inflamatórios (MELLO et al., 2013) previne o desenvolvimento do comportamento do tipo deprimido. Ainda, a ação antidepressiva de anti-inflamatórios já foi demonstrada no teste do nado forçado e em modelos de depressão relacionados ao estresse em ratos (SANTIAGO et al., 2014).

Além destas evidências, prejuízos funcionais em formas de plasticidade sináptica, como na potenciação de longa-duração (LTP, do inglês *Long term potentiation*), por exemplo, têm sido associados à fisiopatologia da depressão (SCHLOESSER et al., 2008). A LTP é uma forma de plasticidade sináptica que leva a um aumento na eficácia da sinapse e é relacionada à memória e ao aprendizado (BLISS e COLLINGRIDGE, 1993). De acordo com essas observações, estudos clínicos já demonstraram que pacientes deprimidos apresentam prejuízos na memória e redução da capacidade cognitiva (PAPAKOSTAS, 2014) e um estudo *post-mortem* com pacientes bipolares relatou uma redução na expressão cerebral de marcadores moleculares de plasticidade sináptica (VAWTER et al., 2002). Um tipo de LTP que tem sido extensivamente estudado é a LTP NMDA-dependente (revisado por CITRI e MALENKA, 2008), a qual já teve sua importância descrita em modelos experimentais de depressão (revisado por MARSDEN, 2013) e tem sua magnitude reduzida no córtex pré-frontal de ratos submetidos a modelos experimentais de depressão (JAY et al., 2004; CERQUEIRA et al., 2007; QUAN et al., 2011a; QUAN et al., 2011b). Este prejuízo pode ser restaurado por antidepressivos disponíveis na clínica (DUPIN et al., 2006; QI et al., 2009). Os efeitos deletérios da administração periférica de LPS sobre a magnitude da LTP-NMDA dependente já foi demonstrado no hipocampo de camundongos (STREHL et al., 2014). Porém, não existem trabalhos na literatura relacionando os efeitos da inflamação periférica sobre esta forma de plasticidade sináptica no CPF.

Fatores neuroimunes, como IL-1 β e TNF- α , são essenciais para a indução e manutenção de processos de neuroplasticidade, como a LTP NMDA-dependente (KHAIROVA et al., 2009; YIRMIYA e GOSHEN, 2011; EYRE e BAUNE, 2012). Porém, em situações patofisiológicas onde ocorre um aumento dos níveis destes fatores, como na depressão (DOWLATI et al., 2010), os mesmos são responsáveis pela indução de prejuízo na LTP NMDA-dependente, pois ocorre uma ativação excessiva dos receptores TNFR1 neuronais, o que levaria ao acionamento de vias de sinalização intracelulares como a via da MAPK p38 e de ativação do fator de transcrição Nf κ B (KHAIROVA et al., 2009).

Tendo em vista a identificação de diferentes vias e alvos biológicos envolvidos na fisiopatologia da depressão, o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento deste transtorno do humor torna-se uma prioridade, uma vez que esta abordagem pode resultar no desenvolvimento de antidepressivos mais eficazes e de ação mais rápida, ou melhorar a ação dos antidepressivos disponíveis na clínica.

Nesse sentido, o objetivo deste capítulo da presente tese foi investigar o efeito de uma fração enriquecida em valepotriatos diênicos (VAL) obtida das partes aéreas e subterrâneas de *Valeriana glechomifolia* através de extração utilizando CO₂ supercrítico em um modelo animal de depressão relacionado à ativação de vias inflamatórias. O potencial antidepressivo de VAL já foi previamente demonstrado por nosso grupo de pesquisa, bem como sua ação sobre a neurotransmissão noradrenérgica e dopaminérgica (MÜLLER et al., 2012). De fato, alguns estudos têm trazido abordagens recentes da ação farmacológica de espécies do gênero *Valeriana*, relacionando diferentes extratos de espécies do gênero com o sistema imune e apontando para um potencial anti-inflamatório de espécies como *V. wallichii* (KHUDA et al., 2013), *V. amurensis* (ZHANG et al., 2010) e *V. officinallis*, a qual apresenta ação preventiva ao desenvolvimento do comportamento de doente e do tipo deprimido em um modelo de depressão relacionado à inflamação (NEAMATI et al., 2014).

Outros autores demonstraram o potencial antidepressivo das mesmas espécies do gênero (HATESOHL et al., 2008; SUBHAN et al., 2010; SAH et al., 2011). Além disso, a inibição da ativação da microglia por terpenos já foi demonstrada em um estudo *in vitro* (CHEN et al., 2014), bem como o potencial anti-inflamatório *in vivo* destas moléculas (JARDÓN-DELGADO et al., 2014; JUERGENS, 2014; TANG et al., 2014). Estes achados são relevantes para a hipótese do presente trabalho, uma vez que os valepotriatos são moléculas que pertencem a esta família de metabólitos (GEU-FLORES et al., 2012).

Assim, no presente estudo, foram investigados os efeitos de VAL sobre as alterações comportamentais (comportamento de doente e do tipo deprimido)

causadas pela injeção de LPS em camundongos C57Bl/6 J, bem como o seu efeito sobre a LTP-NMDA dependente e transmissão sináptica de circuitos do córtex pré-frontal dos animais.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O material vegetal utilizado, extração por dióxido de carbono supercrítico e caracterização da fração enriquecida em valepotriatos diênicos (VAL) por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram previamente descritos nos capítulos anteriores desta tese.

2.1 Animais

Camundongos machos e fêmeas C57BL/6 J (com idade entre P22 - P29) provenientes da empresa Janvier (Saint Berthevin, Pays de la Loire, França) foram utilizados para ensaios comportamentais e registros eletrofisiológicos e não foram observadas diferenças dependentes do sexo. Antes de serem submetidos aos experimentos comportamentais ou de neuroquímica, os animais foram ambientados por um período mínimo de 72 horas nos biotérios de passagem do instituto. Os camundongos foram mantidos em caixas plásticas de 17 x 28 x 13 cm com, no máximo, 6 animais por caixa e sob ciclo claro/escuro de 12 horas, com temperatura constante (23 ± 1 °C), com sistema de exaustão e umidade monitorada e tiveram livre acesso à água e alimento. Nos experimentos realizados com administração das substâncias teste por via oral, os animais passaram por um período de 2 horas de jejum antes do teste.

2.2 Tratamentos

Os camundongos foram tratados com volumes 10 ml/kg pelas vias intraperitoneal (i.p.) ou oral (v.o.), conforme protocolo específico de cada experimento. VAL foi administrada aos animais por v.o. na dose de 10 mg/kg e o antidepressivo utilizado como controle positivo foi imipramina (IMI) (20 mg/kg, v.o.).

A solubilização de IMI e de VAL foi realizada em salina com 1% de polissorbato 80. As doses testadas foram escolhidas com base nos estudos anteriores do grupo (SALLES, 2010; MÜLLER et al., 2012).

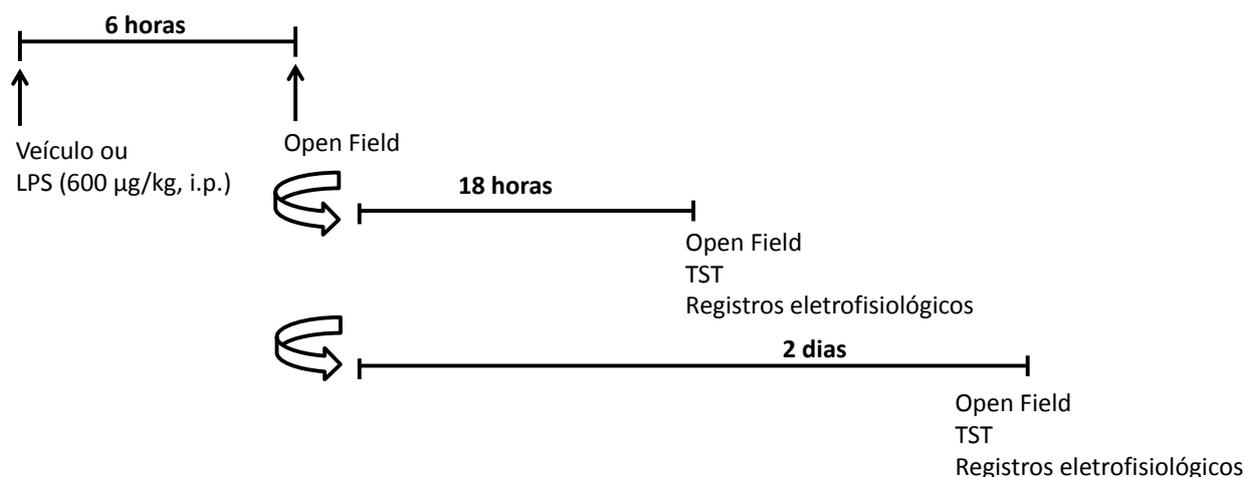
2.3 Ética

A manipulação animal foi realizada segundo os princípios éticos relatados por GOLDIM (1995) e as normas do *Council for International Organizations of Medical Sciences* (CIOMS, 1985), Resolução 714, de junho de 2002, do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV, 2002) e a Legislação Brasileira (BRASIL 2008; 2013a; 2013b), que estão de acordo com o European Communities Council Directive de 24 de novembro de 1986 (86/609/EEC). Imediatamente após a finalização dos experimentos comportamentais, os camundongos foram submetidos isoladamente à eutanásia pelo método de deslocamento cervical. Para a realização dos registros eletrofisiológicos os animais foram previamente anestesiados em câmara saturada com isoflurano e posteriormente decapitados com auxílio de tesoura.

2.4 Avaliação temporal do efeito da inflamação sobre o comportamento de doente e do tipo deprimido

Inicialmente, foi realizada uma curva de tempo para avaliação da duração do efeito da inflamação sobre as alterações comportamentais. Para indução do comportamento de doente, LPS de *E. coli* (600 µg/kg, i.p.) foi administrado aos camundongos de acordo com WALKER e colaboradores (2013), com pequenas

modificações. O grupo controle recebeu salina (10 ml/kg, i.p.). Decorridas 6 h após a injeção, o comportamento de doente dos animais foi avaliado no teste de atividade locomotora (Open Field), onde a distância total percorrida pelo animal dentro da arena foi registrada com auxílio do software Ethovision XT (© Noldus Information Technology). Depois desta exposição ao Open Field, os camundongos foram divididos em 2 grupos: 1 grupo foi reavaliado 24 h após a injeção de LPS e outro grupo, 3 dias depois. A reavaliação consistiu em uma nova submissão ao teste do Open Field e, imediatamente após o término do mesmo, avaliação no teste de suspensão pela cauda (TST, do inglês “Tail suspension Test”) (STERU et al., 1985), onde o tempo de imobilidade dos animais foi registrado durante os últimos 4 minutos do teste (que totaliza 6 minutos) (KWON et al., 2010).



Esquema 1. Esquema de avaliação do tempo de duração do efeito da inflamação sobre as alterações comportamentais em camundongos C57BL/6 J. Os animais foram avaliados 6 h após a injeção de LPS (ou veículo) e posteriormente foram divididos em 2 grupos: avaliados 24 h ou 3 dias após o desafio imune.

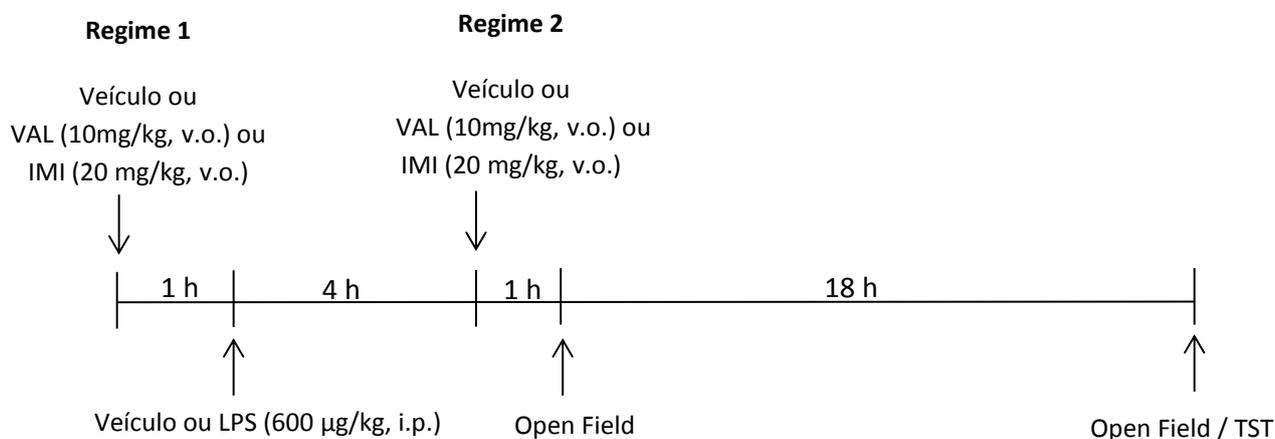
2.5 Avaliação do efeito de VAL sobre o comportamento de doente e do tipo deprimido

Para avaliação do efeito de VAL sobre o comportamento de doente e do tipo deprimido, os animais foram tratados com VAL (10 mg/kg, v.o.) ou IMI (20 mg/kg, v.o.) de 2 diferentes maneiras:

Regime 1, avaliação do efeito preventivo. VAL ou IMI foram administradas 1 h antes da injeção de LPS (600 µg/kg, i.p.). O grupo controle recebeu veículo (10 ml/kg, v.o. ou i.p.);

ou

Regime 2, avaliação do efeito terapêutico. VAL ou IMI foram administradas 5 h depois da injeção de LPS (600 µg/kg, i.p.). O grupo controle recebeu veículo (10 ml/kg, v.o. ou i.p.).



Esquema 2. Esquema de tratamento com VAL (ou IMI, utilizada como controle positivo) empregado no experimento de indução de comportamento de doente e do tipo deprimido em camundongos C57BL/6 J. O efeito de VAL foi avaliado através da administração por via oral em dois diferentes momentos.

2.6 Avaliação da LTP NMDA-dependente de circuitos do córtex pré-frontal (CPF)

2.6.1 Preparação de fatias coronais do córtex pré-frontal

A realização dos registros eletrofisiológicos foi realizada em grupo independente de animais, que não foi previamente submetido a testes comportamentais. As fatias coronais do CPF foram preparadas de acordo com LAFOURCADE e colaboradores (2011). Os animais (tratados conforme o Esquema 1, apresentado no item 2.4, para estudo da avaliação temporal do efeito do LPS e aqueles tratados ou não com VAL (ou IMI) (conforme o Esquema 2, apresentado no item 2.5)), foram sacrificados por decapitação e o cérebro foi imediatamente retirado e colocado em tampão para dissecação gelado (NaCl 87 mM; KCl 2,5 mM; MgCl₂ 4 mM; CaCl₂ 0,5 mM; NaHCO₃ 23 mM; NaH₂PO₄ 1,25 mM, sacarose 75 mM e glicose 11 mM), sob constante saturação de O₂ 95 % e CO₂ 5 %. As fatias coronais (300 µm) foram preparadas com auxílio de um vibrátomo (Campden Instruments Ltda.) e mantidas em banho contendo líquido cerebrospinal artificial (LCA – NaCl 130 mM; KCl 2,5 mM; MgCl₂ 2,4 mM; CaCl₂ 1,2 mM; NaHCO₃ 23 mM; NaH₂PO₄ 1,2 mM e glicose 11 mM) à 32-35 °C, sob constante saturação de O₂ 95 % e CO₂ 5 %.

2.6.1.1 Registros de campo para avaliação da potenciação de longa duração (LTP) no córtex pré-frontal (CPF)

2.6.1.1.1 Instrumentos e aparato

Para observação das fatias e posicionamento dos eletrodos no CPF, foi utilizado um microscópio equipado de sistema de visualização infravermelho (Olympus BX51W1) posicionado sobre uma mesa antivibracional (TMC – Technical Manufacturing Corporation). As fatias foram colocadas na câmara de registro perfundida com LCA (1 ml/min) a 32-35 °C, contendo picrotoxina (100 µM) para bloquear os receptores GABA_A e isolar as respostas excitatórias. A

resistência dos eletrodos utilizados para o registro foi de 4 - 6 M Ω . As respostas foram registradas utilizando-se um amplificador Axopatch-1D (Axon Instruments), filtradas a 2 kHz e digitalizadas a 10 kHz, através de uma interface DigiData 1440A. A aquisição dos dados foi realizada a partir do software Clampex 10.2 e os mesmos foram analisados com auxílio dos softwares Clampfit 10 ou AxoGraph.

2.6.1.1.2 Registros extracelulares (de campo) de potenciais excitatórios pós-sinápticos (fEPSP)

Os registros de campo foram realizados conforme descrito por IAFRATI e colaboradores (2014), com auxílio de micropipetas de vidro preenchidas com LCA. O eletrodo de estímulo foi posicionado nas camadas II/III do CPF e o de registro nas camadas V/VI para a evocação dos fEPSP por estímulos de duração de 200 μ s, a 0,01 Hz. Após a obtenção de uma resposta, foram efetuadas curvas *input-output* com estímulo crescente (de 0 - 180 μ A, utilizando aumento gradual de 20 μ A na intensidade) para avaliar as propriedades sinápticas basais e a magnitude do estímulo que seria utilizado durante o ensaio (correspondente a 60 % da resposta máxima). Após a obtenção de uma linha de base (estabilização do fEPSP) de, pelo menos, 10 minutos, o protocolo de estímulo elétrico tetânico (*theta-burst* - consistindo de 5 trens de estímulo com 4 pulsos de 100 Hz em intervalos de 200 ms, repetido 4 vezes em intervalos de 10 s) foi aplicado para indução da LTP NMDA-dependente (IAFRATI et al., 2014). Ao final de cada ensaio, um antagonista (CNQX, 20 μ M) de receptores glutamatérgicos ionotrópicos não-NMDA (receptores AMPA e kainato) foi adicionado ao banho de perfusão da fatia para substrair o componente não sináptico e confirmar a natureza glutamatérgica dos fEPSP. A área e a amplitude dos fEPSP foram analisadas e a magnitude da LTP foi calculada 20-30 min após a indução do protocolo de *theta-burst*, como % da resposta em relação à linha de base.

2.6.2 Registros em whole-cell configuration pela técnica de Patch-clamp

Para avaliar os efeitos da inflamação os receptores glutamatérgicos ionotrópicos do tipo AMPA (ácido alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico) ou NMDA (N-metil-D-aspartato) causada pela inflamação e/ou pelo tratamento dos animais com VAL ou IMI, as correntes espontâneas pós-sinápticas excitatórias (sEPSC, do inglês *spontaneous excitatory postsynaptic currents*) mediadas por receptores AMPA e NMDA foram registradas nos neurônios piramidais das camadas V/VI do CPF. A resistência de acesso foi continuamente monitorada e somente as células que não apresentaram variação maior que 20% na mesma e valores menores que 25 MΩ foram mantidas.

2.6.2.1 Registro de sEPSC mediadas por receptores glutamatérgicos ionotrópicos do tipo AMPA (sEPSC-AMPA)

As sEPSC-AMPA foram registradas em *voltage-clamp*, com potencial fixado em -70 mV. Os registros foram realizados utilizando-se solução intramicropipeta contendo K⁺-gluconato 128mM; NaCl 20mM; MgCl₂ 1mM; EGTA 1mM; CaCl₂ 0,3 mM; Na²⁺-ATP 2mM; Na⁺-GTP 0,3 mM; cAMP 0,2 mM; Hepes 10m; pH 7,3; 290 mOsm. Como meio extracelular, foi usado LCA (1 ml/min) a 32-35 °C, contendo picrotoxina (100 μM).

2.6.2.2 Registro de sEPSC mediadas por receptores glutamatérgicos ionotrópicos do tipo NMDA (sEPSC-NMDA)

As sEPSC-NMDA foram registradas em *voltage-clamp*, com potencial fixado em +40 mV. Os registros foram realizados utilizando-se solução intramicropipeta contendo Cs-metanosulfonato 143 mM; NaCl 5 mM ; MgCl₂ 1 mM ; EGTA 1 mM ; CaCl₂ 0,3 mM; Na²⁺-ATP 2 mM; Na⁺-GTP 0,3mM; cAMP 0,2 mM; glicose 10 mM e Hepes 10mM; pH 7,0; 290 mOsm. Como meio

extracelular, foi usado LCA (1 ml/min) a 32-35 °C, contendo picrotoxina (100 μ M) e CNQX (20 μ M).

2.6.2.3 Avaliação das propriedades intrínsecas celulares

Para avaliar as propriedades intrínsecas dos neurônios em estudo, foram realizadas curvas de corrente-voltagem (curvas I-V), registradas em *current clamp*, com a aplicação de uma série de *steps* de correntes hiperpolarizantes e despolarizantes de diferentes intensidades (de - 400 pA a 900 pA, com aumento gradual de 50 pA na intensidade, duração de 50 ms). As alterações no potencial da membrana e a frequência de potenciais de ação decorrentes da aplicação dos *steps* de corrente de diferentes intensidades foram registradas. Além disso, o potencial de repouso, a *rheobase* e a resistência membranar de cada célula foi avaliada. Estes registros foram realizados utilizando-se a mesma solução intra-micropipeta descrita no item 2.6.2.1.

2.7 Análise Estatística

Os resultados dos ensaios comportamentais e dos registros eletrofisiológicos foram avaliados por teste *t* de Student ou ANOVA de uma ou duas vias, seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls quando apropriado. A distribuição dos dados e o design experimental foram considerados para a escolha de cada teste estatístico aplicado. Para comparação das distribuições cumulativas das amplitudes e frequências das sEPSC-AMPA ou sEPSC-NMDA, foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Sigma Stat versão 2.03 (Jandel Scientific Corporation®). Aceitou-se o nível de significância $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

A concentração de valepotriatos diênicos em VAL determinada por CLAE, e a estrutura química dos mesmos estão demonstradas nos capítulos anteriores desta tese.

3.1 Avaliação temporal do efeito da inflamação sobre as alterações comportamentais, LTP NMDA-dependente e sEPSC-AMPA ou sEPSC-NMDA em circuitos neuronais do CPF

A administração de LPS aos animais (conforme Esquema 1, apresentado no item 2.4) reduziu significativamente ($p < 0.001$) a distância percorrida pelos mesmos na arena durante o teste de exposição ao Open Field em comparação ao grupo que recebeu somente o veículo decorridas 6 h da injeção, caracterizando o desenvolvimento do comportamento de doente. Essa redução não foi observada 24 h ou 3 dias depois da administração intraperitoneal de LPS (Fig. 1A).

O tempo de imobilidade dos animais no TST após o evento inflamatório está demonstrado na Figura 1B. A imobilidade dos camundongos no teste foi aumentada significativamente ($p < 0.001$) 24 h depois da injeção de LPS, indicando o desenvolvimento de comportamento do tipo deprimido subsequente ao comportamento de doente, e foi reestabelecida ao nível do controle quando decorridos 3 dias após a injeção de LPS

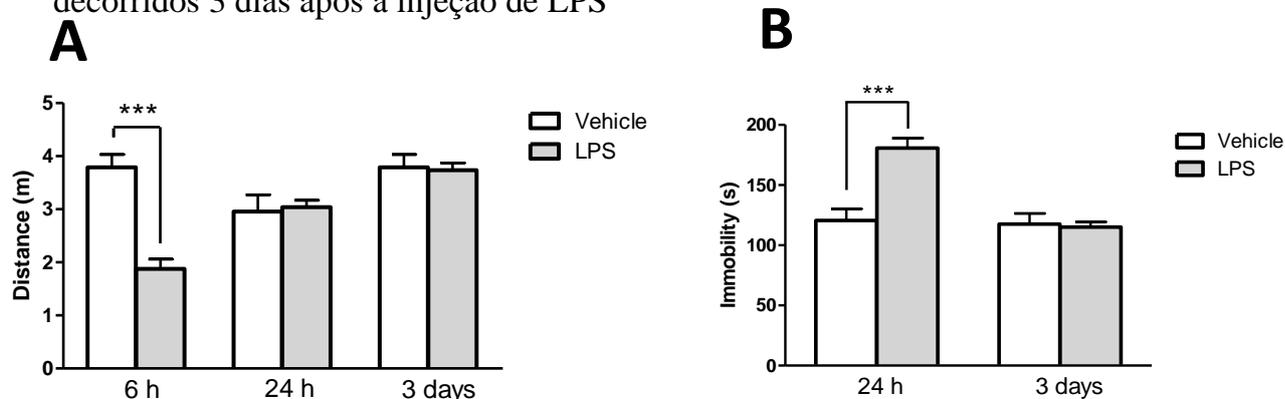


Figura 1. Efeito do tempo após a indução da inflamação sobre o comportamento de doente e do tipo deprimido em camundongos C57BL/6 J. Grupos independentes de animais ($n = 5-8/\text{grupo}$) foram avaliados nos testes comportamentais (Open Field (A) e Teste da suspensão pela cauda (B)) 6 horas, 24 horas e 3 dias após a administração de LPS (600 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i.p.). Resultados estão expressos em média \pm erro padrão. Teste *t* de Student. Diferença significativa: *** $p < 0,001$.

A inflamação teve efeitos deletérios sobre a magnitude da LTP NMDA-dependente induzida por *theta-burst* no CPF dos camundongos (Fig. 2A), reduzindo-a significativamente ($p < 0.001$) em comparação ao grupo controle quando decorridas 24 h da injeção de LPS (Figs. 2B e 2C). Decorridos 3 dias do desafio imune, o prejuízo sobre a LTP NMDA-dependente cortical é parcialmente amenizado (Figs. 2B e 2C).

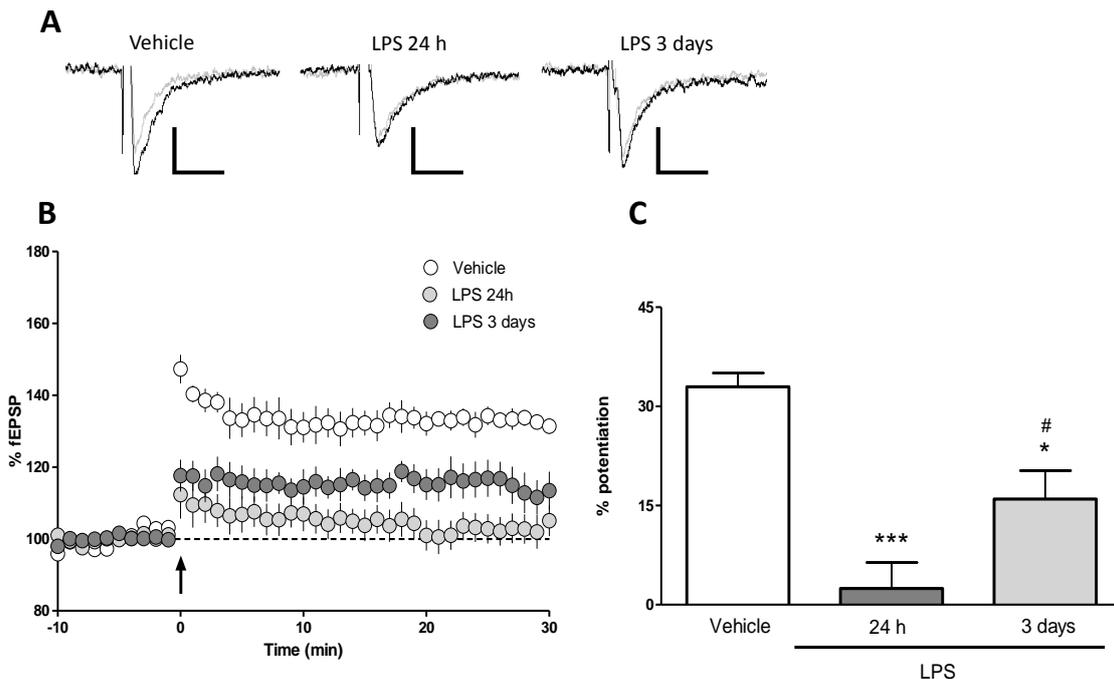


Figura 2. Efeito da inflamação sobre a potenciação de longa duração (induzida por *theta-burst*) no córtex pré-frontal de camundongos. Grupos independentes de animais ($n = 5-9/\text{grupo}$) foram sacrificados 24 horas ou 3 dias após a administração de LPS ($600 \mu\text{g}/\text{kg}$, i.p.). (A) Traços representativos dos fEPSP (média de 10) antes (cinza) e 30 min após (preto) a indução do protocolo de *theta-burst* dos diferentes grupos experimentais (Calibração: $0,1 \text{ mV}$; 10 ms); (B) Representação do *time course* das amplitudes médias dos fEPSP, expressos como % da linha de base, antes e após a indução do protocolo de *theta-burst* (indicado pela seta) dos diferentes grupos experimentais; (C) Representação da potenciação média das amplitudes dos fEPSP entre 20-30 minutos após o estímulo por *theta-burst*. Resultados expressos em média \pm erro padrão. ANOVA de 1 via, *post hoc* Student-Newman-Keuls. Diferença significativa em relação ao grupo *Vehicle* * $p < 0,05$ *** $p < 0,001$. Diferença significativa em relação ao grupo *LPS 24 h* # $p < 0,05$.

A distribuição cumulativa das amplitudes dos eventos mediados por receptores AMPA mostra que a inflamação causou um deslocamento significativo ($p < 0.05$, teste de Kolmogorov-Smirnov) à esquerda (em direção a amplitudes menores, que é observado já desde os menores valores) na curva de distribuição cumulativa (Fig. 3A). Essa alteração é observada 24 h após a injeção de LPS e persiste mesmo quando decorridos 3 dias depois do desafio imune (Fig. 3A). A

análise das médias das amplitudes dos eventos demonstrou que a injeção de LPS causa uma redução significativa nas amplitudes médias das sEPSC-AMPA nestas células (Fig. 3A, histograma em *input* e Fig. 3C) quando comparadas ao grupo que recebeu veículo. Porém, não foi observado efeito da inflamação sobre a distribuição cumulativa e as frequências médias dos eventos mediados por receptores-canal AMPA (Figs. 3B e 3C).

Foi observada uma tendência ao deslocamento à esquerda, em direção à amplitudes menores ($p = 0.086$), na curva de distribuição das amplitudes das sEPSC-NMDA dos grupos tratados com LPS 24 h ou 3 dias após a injeção quando comparada à curva de distribuição do grupo tratado com veículo (Fig. 3D). O mesmo foi observado após a análise das amplitudes médias dos eventos 24 h ou 3 dias após a injeção de LPS (Figs. 3D, histograma em *input* e Fig. 3F). Não houve alterações na frequência das sEPSC-NMDA entre os grupos experimentais (Figs. 3E, 3F).

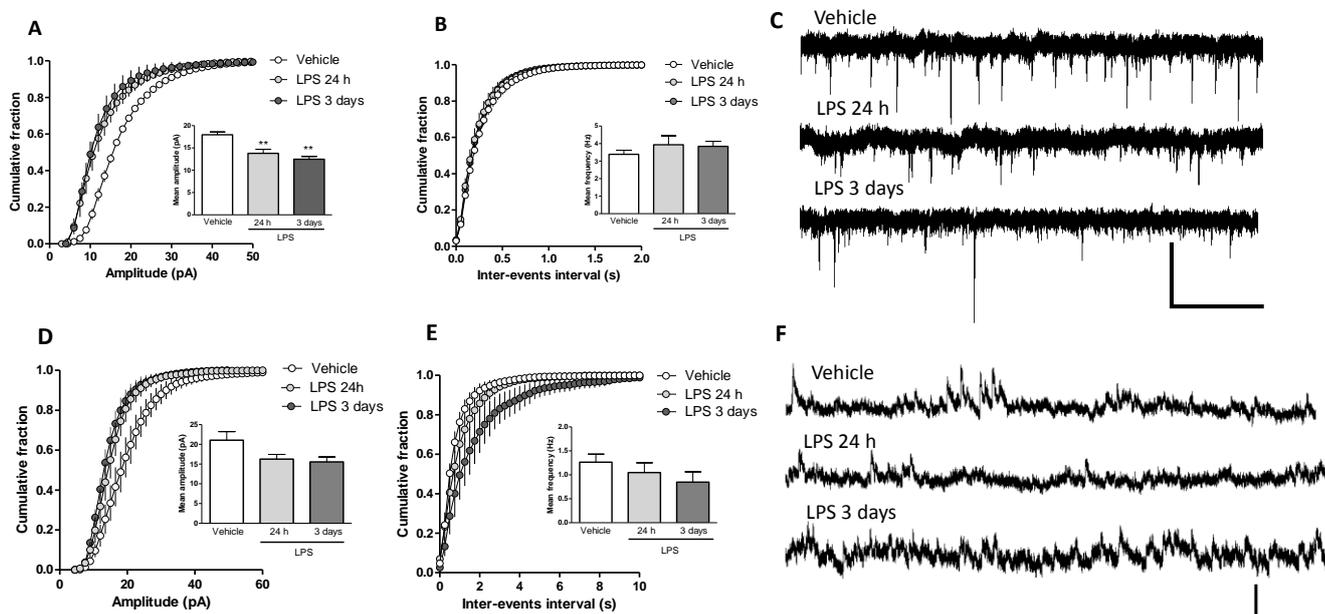


Figura 3. Efeito da inflamação sobre as correntes espontâneas pós-sinápticas excitatórias (sEPSC) mediadas por receptores glutamatérgicos ionotrópicos do tipo AMPA (A, B e C) e NMDA (D, E e F) nas células piramidais das camadas V/VI do córtex pré-frontal de camundongos C57BL/6 J tratados ou não com LPS. Grupos independentes de animais ($n = 3$ animais, 6 células/grupo) foram sacrificados 24 horas ou 3 dias após a administração de LPS (600 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i.p.). A distribuição cumulativa das amplitudes dos eventos (em pA) (A e D) e do tempo de intervalo inter-eventos (em s) (B e E), assim como suas respectivas médias (histogramas em *input*), estão demonstradas. A representação dos registros das sEPSC-AMPA (C, calibração: 20 pA, 2s) e sEPSC-NMDA (F, calibração: 50 pA, 2s) estão apresentadas. Os registros foram realizados em *patch clamp, whole cell configuration*, com potencial fixado em +40 mV ou -70mV para estudo de sEPSC-NMDA e sEPSC-AMPA, respectivamente. Resultados estão expressos em média \pm erro padrão. As distribuições cumulativas foram avaliadas pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e as médias por ANOVA de 1 via, *post hoc* Student-Newman-Keuls. ** $p < 0.01$ diferente em relação ao grupo *Vehicle*.

Considerando os resultados obtidos na avaliação temporal do efeito da inflamação sistêmica sobre o comportamento de doente e do tipo deprimido, todos os experimentos subsequentes, para avaliação do efeito de VAL neste modelo, foram realizados utilizando-se o tempo máximo de 24 h após a injeção de LPS, tanto para os ensaios comportamentais (no TST) quanto os registros eletrofisiológicos.

3.2 Avaliação do efeito de VAL sobre o comportamento de doente e do tipo deprimido

A gavagem de VAL aos camundongos 1 h antes da administração intraperitoneal de LPS (Regime 1 de tratamento, conforme Esquema 2 de administração apresentado no item 2.5) preveniu a redução na distância percorrida pelos animais no teste de Open Field causada pelo LPS 6 h após o evento inflamatório (Fig. 4A). A atividade locomotora dos animais retornou ao nível do grupo tratado somente com veículo (grupo *Vehicle/Vehicle*) 24 h depois da injeção de LPS (Fig. 4B). O pré-tratamento dos animais com VAL preveniu o aumento no tempo de imobilidade no TST que ocorre 24 horas após o desafio imune (Fig. 4C), indicando ação preventiva dos valepotriatos sobre o desenvolvimento do comportamento de doente e do tipo deprimido causado pela inflamação. Este efeito foi similar ao apresentado por IMI, utilizada como antidepressivo controle no modelo animal empregado neste estudo.

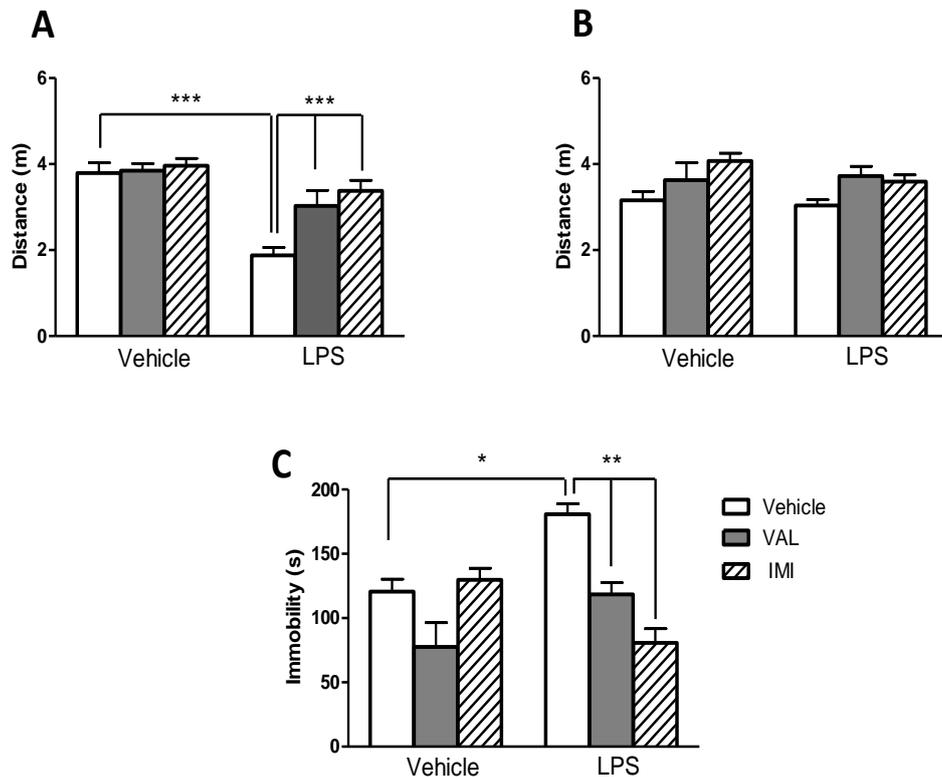


Figura 4. Efeito da fração enriquecida em valepotriatos diênicos e de imipramina (VAL - 10 mg/kg, v.o., e IMI - 20 mg/kg, v.o., respectivamente) administrados 1 hora antes do evento inflamatório, sobre o comportamento de doente e do tipo deprimido em camundongos C57BL/6 J causado pela administração de LPS (600 µg/kg, i.p.). Os animais (n=5-6/grupo) foram avaliados no teste do Open Field 6 horas (A) e 24 horas (B) após a injeção de LPS e no Teste da suspensão pela cauda 24 horas (C) após a indução da inflamação. Resultados estão expressos em média ± erro padrão. ANOVA de 2 vias, *post hoc* Student-Newman-Keuls. Diferenças significativas * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

O tratamento dos animais com VAL 5 h após a injeção de LPS (Regime 2 de tratamento, conforme Esquema 2 apresentado no item 2.5) não teve efeito sobre o desenvolvimento do comportamento de doente (Fig. 5A) induzido pela inflamação. Decorridas 24 h do desafio imune, a atividade locomotora dos animais equiparou-se à do grupo tratado somente com veículo (grupo *Vehicle/Vehicle*) (Fig. 5B). A administração de VAL após a injeção de LPS não teve efeito sobre o desenvolvimento do comportamento do tipo deprimido nos animais (Fig. 5C), enquanto o mesmo esquema de tratamento com IMI restaurou todas as alterações comportamentais causadas pela injeção de LPS.

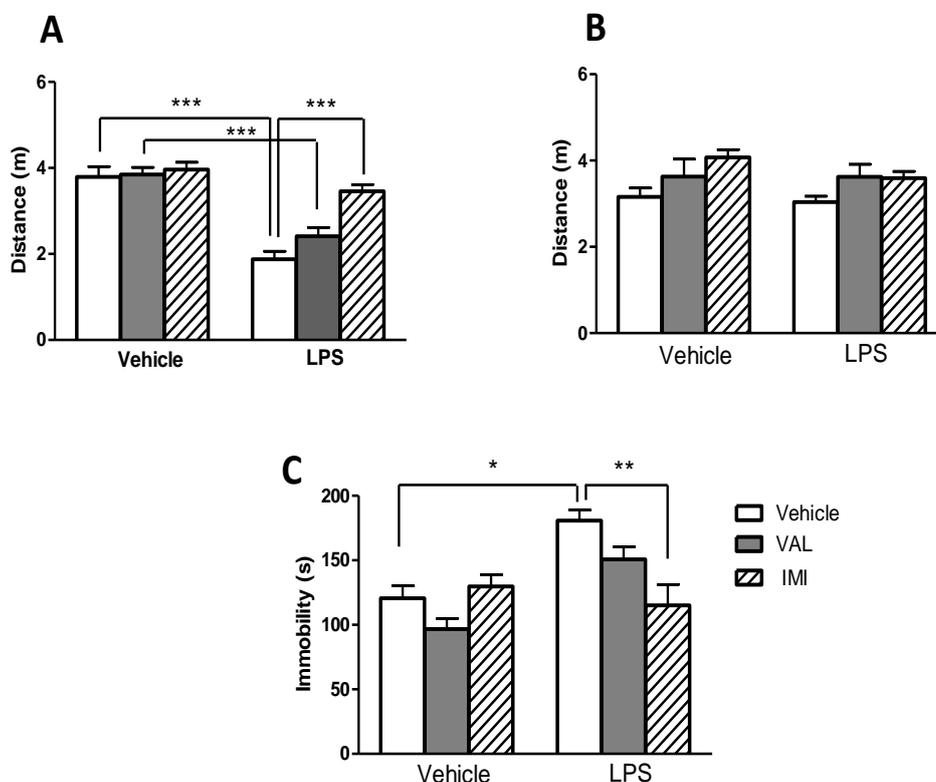


Figura 5. Efeito da fração enriquecida em valepotriatos diênicos e de imipramina (VAL - 10 mg/kg, v.o., e IMI - 20 mg/kg, v.o., respectivamente), administradas 5 horas depois do evento inflamatório, sobre o comportamento de doente e do tipo deprimido em camundongos C57BL/6 J causado pela administração de LPS (600 µg/kg, i.p.). Os animais (n=5-6/grupo) foram avaliados no teste do Open Field 6 horas (A) e 24 horas (B) após a injeção de LPS e no Teste da suspensão pela cauda 24 horas (C) após a indução da inflamação. Resultados estão expressos em média ± erro padrão. ANOVA de 2 vias, *post hoc* Student-Newman-Keuls. Diferenças significativas: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

3.3 Avaliação do efeito de VAL sobre a potenciação de longa duração (LTP) NMDA-dependente no córtex pré-frontal

A inflamação teve efeitos deletérios sobre a magnitude da LTP induzida por *theta-burst* no CPF dos camundongos, reduzindo-a significativamente ($p < 0,001$) em comparação ao grupo controle. A administração prévia (1 h antes da injeção de LPS, Regime 1 de tratamento conforme o Esquema 2 de administração, apresentado no item 2.5) de VAL (Figs. 6A, 6B e 6C) e IMI (Figs. 6A, 6D e 6E) aos animais preveniu essa redução e as duas substâncias não tiveram efeito *per se* sobre a magnitude da LTP cortical.

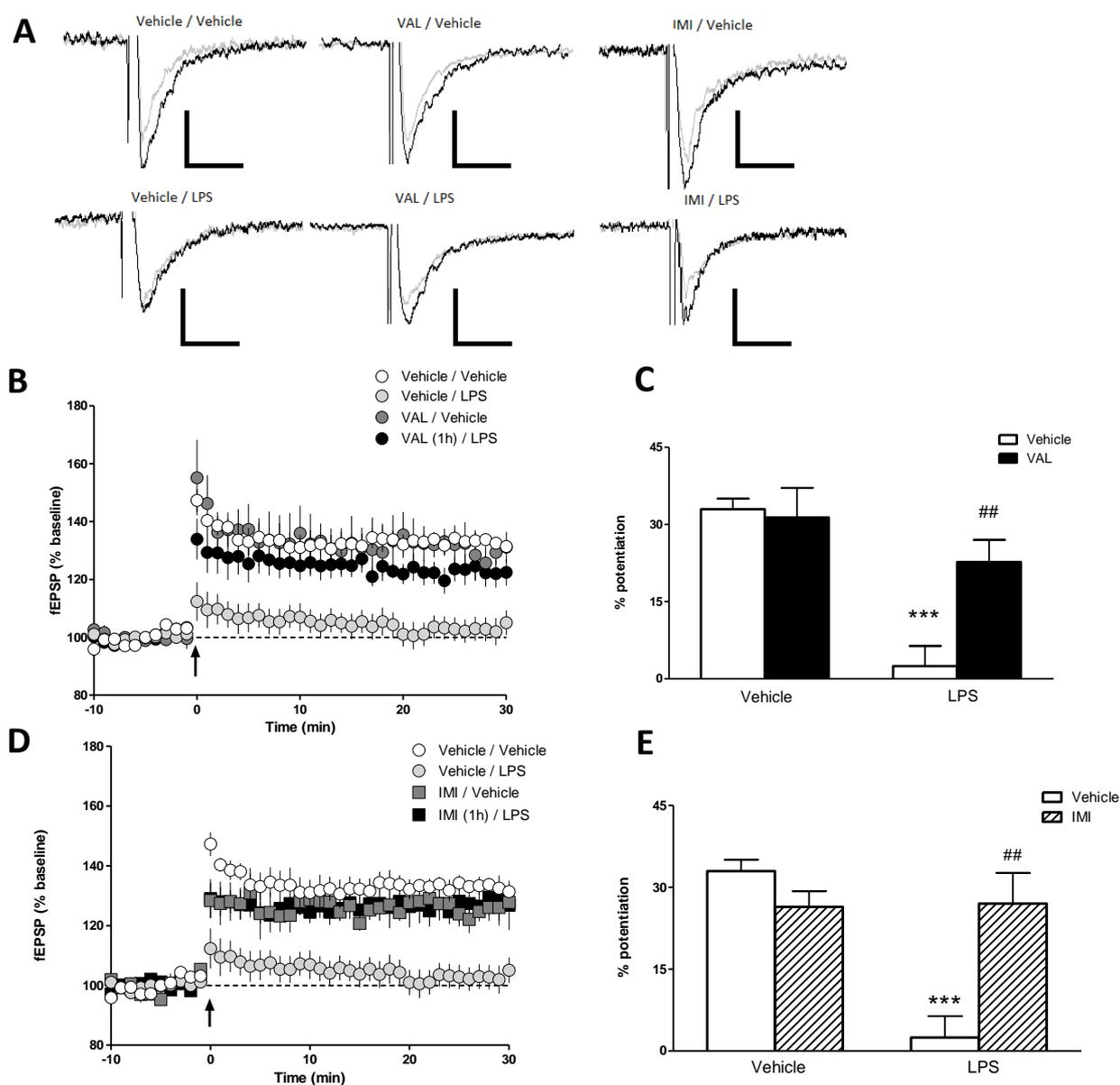


Figura 6. Efeito da fração enriquecida em valepotriatos diênicos e de imipramina (VAL - 10 mg/kg, v.o., e IMI - 20 mg/kg, v.o., respectivamente, administração 1 hora antes do evento inflamatório) sobre a potenciação de longa duração (induzida por *theta-burst*) no córtex pré-frontal de camundongos C57BL/6 J. Os animais (n = 5-9/grupo) foram sacrificados 24 horas após a administração de LPS (600 µg/kg, i.p.). (A) Traços representativos dos fEPSP (média de 10) antes (cinza) e 30 min após (preto) a indução do protocolo de *theta-burst* dos diferentes grupos experimentais (Calibração: 0,1 mV; 10 ms); (B e D) Representação do *time course* das amplitudes médias dos fEPSP, expressos como % da linha de base, antes e depois da indução do protocolo de *theta-burst* (indicado pela seta); (C e E) Representação da potenciação média das amplitudes dos fEPSP entre 20-30 minutos depois do estímulo por *theta-burst*. Resultados estão expressos em média ± erro padrão. ANOVA de 2 vias, *post hoc* Student-Newman-Keuls. Diferença significativa em relação ao grupo *Vehicle / Vehicle* *** $p < 0,001$. Diferença significativa em relação ao grupo *Vehicle / LPS* ## $p < 0,01$.

A administração de VAL aos animais 5 h após o estabelecimento do evento inflamatório (Regime 2 de tratamento, conforme Esquema 2 apresentado no item 2.5) não restaurou os prejuízos na LTP NMDA-dependente causados pela inflamação no CPF dos camundongos (Figs. 7A, 7B e 7C). Porém, quando IMI foi

administrada aos animais utilizando-se o mesmo esquema de tratamento, observou-se recuperação na magnitude da LTP-NMDA no CPF dos animais (Figs. 7A, 7D e 7E).

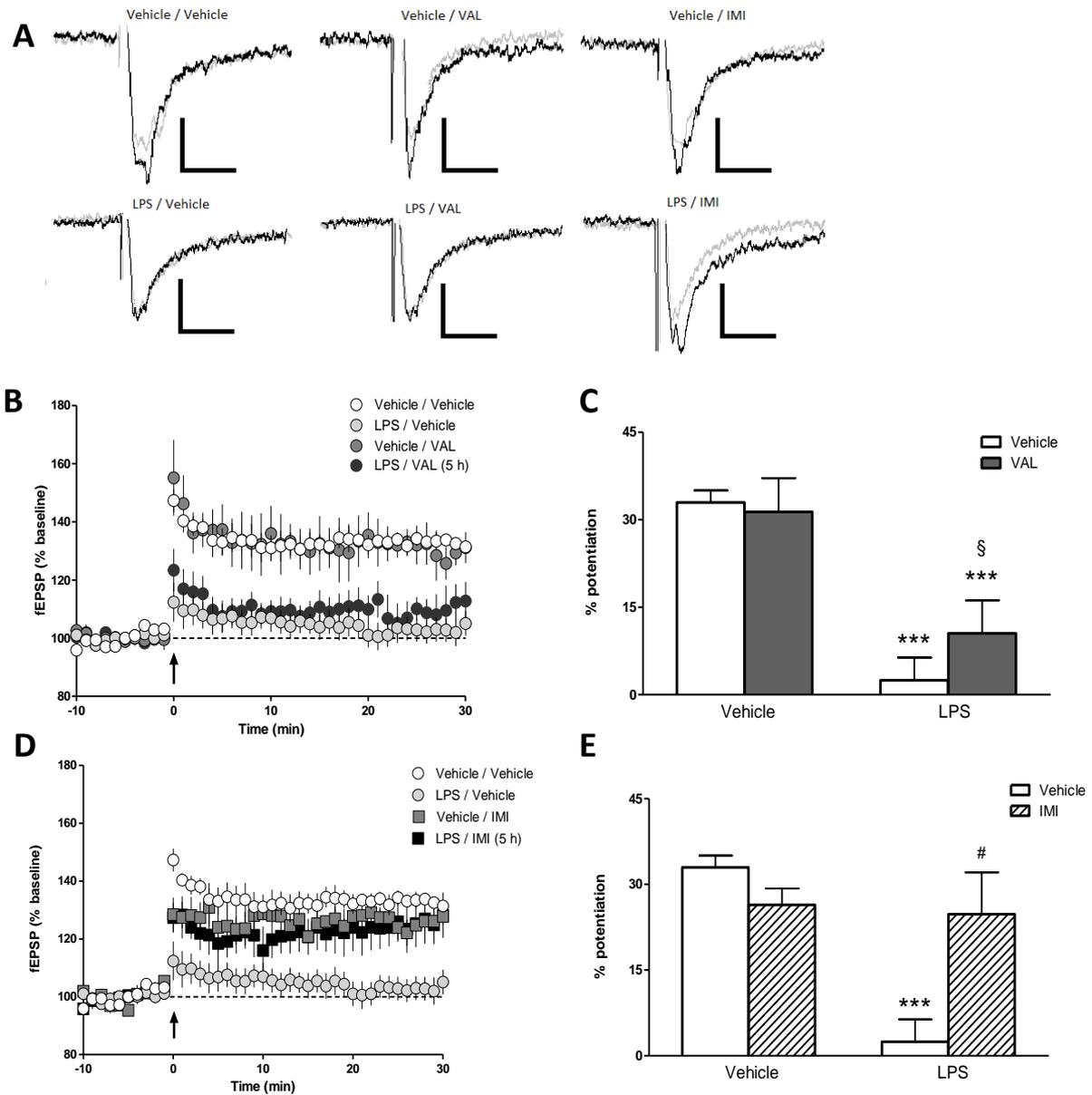


Figura 7. Efeito da fração enriquecida em valepotriatos diênicos e de imipramina (VAL - 10 mg/kg, v.o., e IMI - 20 mg/kg, v.o., respectivamente) administradas 5 horas depois do evento inflamatório, sobre a potenciação de longa duração (induzida por *theta-burst*) no córtex pré-frontal de camundongos C57Bl/6 J. Os animais (n = 4-9/grupo) foram sacrificados 24 horas após a administração de LPS (600 µg/kg, i.p.). (A) Traços representativos dos fEPSP (média de 10) antes (cinza) e 30 min após (preto) a indução do protocolo de *theta-burst* dos diferentes grupos experimentais (Calibração: 0,1 mV; 10 ms). (B e D) Representação do *time course* das amplitudes médias dos fEPSP, expressos como % da linha de base, antes e depois da indução do protocolo de *theta-burst* (indicado pela seta); (C e E) Representação da potenciação média das amplitudes dos fEPSP entre 20-30 minutos depois do estímulo por *theta-burst*. Resultados estão expressos em média ± erro padrão. ANOVA de 2 vias, *post hoc* Student-Newman-Keuls. Diferença significativa em relação ao grupo Vehicle / Vehicle ****p*<0,001. Diferença significativa em relação ao grupo Vehicle / VAL §*p*<0,05; Diferença significativa em relação ao grupo LPS / Vehicle #*p*<0,05.

3.4 Avaliação do efeito de VAL sobre as sEPSC-AMPA, sEPSC-NMDA e propriedade intrínseca dos neurônios piramidais das camadas V/VI do córtex pré-frontal

A redução na amplitude das sEPSC-AMPA causadas pela inflamação foi prevenida pela administração de VAL aos animais 1 h antes da injeção de LPS (Fig. 8A). As curvas de distribuição cumulativa das amplitudes das sEPSC-AMPA mostram que o deslocamento significativo ($p < 0.05$, teste de Kolmogorov-Smirnov) à esquerda causado pela injeção de LPS (que é observado desde as menores amplitudes) não ocorre no grupo que recebe previamente a administração de VAL (Fig. 8B), o que é também demonstrado pela análise das médias das amplitudes dos eventos (Fig. 8B, histograma em *input*). Ainda, VAL não teve efeito *per se* sobre as sEPSC-AMPA dos neurônios em questão e IMI não apresentou nenhum efeito sobre a redução na amplitude das sEPSC-AMPA destas células causada pela injeção de LPS (Figs. 8A e 8C). Não foram observadas diferenças entre as frequências das sEPSC-AMPA entre todos os grupos experimentais (dados não mostrados).

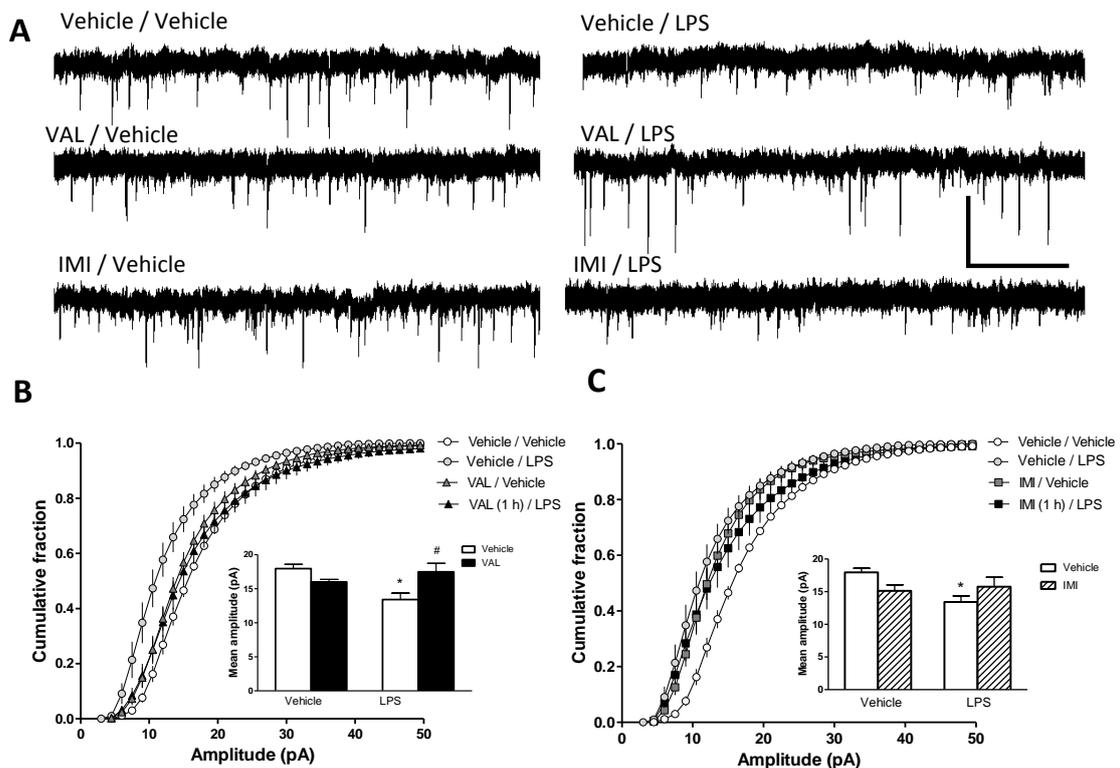


Figura 8. Efeito da fração enriquecida em valepotriatos diênicos e de imipramina (VAL - 10 mg/kg, v.o., e IMI - 20 mg/kg, v.o., respectivamente) administradas 1 hora antes do evento inflamatório, sobre as correntes espontâneas pós-sinápticas excitatórias mediadas por receptores glutamatérgicos ionotrópicos do tipo AMPA nas células piramidais das camadas V/VI do córtex pré-frontal de camundongos C57BL/6 J tratados ou não com LPS (600 µg/kg, i.p.). Grupos independentes de animais (n = 3 animais, 6 células/grupo) foram sacrificados 24 horas após a indução da inflamação. (A) Representação dos registros das sEPSC-AMPA dos diferentes grupos experimentais (calibração: 20 pA, 2s). As distribuições cumulativas das amplitudes dos eventos, assim como suas respectivas médias (em pA - histogramas em *input*), estão demonstradas (pré-tratamento com VAL (B) e pré-tratamento com IMI (C)). Os registros foram realizados com potencial fixado em -70 mV, em *patch clamp, whole cell configuration*. Resultados estão expressos em média ± erro padrão. As distribuições cumulativas foram avaliadas pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e as médias, por ANOVA de 2 vias, *post hoc* Student-Newman-Keuls. Diferença significativa em relação ao grupo *Vehicle / Vehicle* * $p < 0,05$; diferença significativa em relação ao grupo *Vehicle / LPS* # $p < 0,01$.

Conforme ilustrado nas Figuras 3D, 3E e 3F (item 3.1), a inflamação não teve efeito sobre as sEPSC-NMDA e VAL e IMI não tiveram nenhum efeito sobre esse parâmetro (dados não mostrados).

A inflamação reduziu a excitabilidade sináptica basal no CPF dos camundongos C57BL/6 J e este efeito foi prevenido pela administração de VAL aos animais (Fig. 9A). O conjunto de amplitudes dos fEPSP de cada grupo experimental obtidos a partir das curvas *input-output* foi analisado por regressão linear e a inclinação das retas geradas foram comparadas entre si estatisticamente através de ANOVA de duas vias. Observou-se diferença significativa ($p < 0,01$) entre todos os grupos experimentais com o grupo que foi tratado somente com

veículo 1 h antes da injeção de LPS, indicando que o pré-tratamento dos animais com VAL previne as alterações na atividade sináptica basal causada pela inflamação (Fig. 9B).

Independente do tratamento, os neurônios piramidais das camadas V/VI do CPF dos animais apresentaram perfis semelhantes de resposta da membrana devido aos *steps* de injeção de corrente de diferentes intensidades (Fig. 9C), avaliados através de curvas corrente-voltagem (I-V). As alterações no potencial de membrana (Fig. 9D) e a frequência de potenciais de ação decorrentes a partir dos diferentes *steps* de corrente injetada (Fig. 9E) foram iguais em todos os grupos experimentais, assim como o potencial de repouso (Fig. 9F), a *rheobase* (Fig. 9G) e a resistência membranar (Fig. 9H) destas células.

O tratamento com VAL 5 h após a injeção de LPS (Regime 2 de tratamento, conforme Esquema 2 apresentado no item 2.5) e os dois esquemas de tratamento com IMI (Regimes 1 e 2 de tratamento, conforme Esquema 2 apresentado no item 2.5) não foram efetivos sobre as alterações nas sEPSC-AMPA causadas pelo LPS e não apresentaram nenhum efeito sobre as sEPSC-NMDA. Ainda, o tratamento com IMI não teve ação sobre a atividade sináptica basal nem sobre as propriedades intrínsecas dos neurônios em estudo (dados não mostrados).

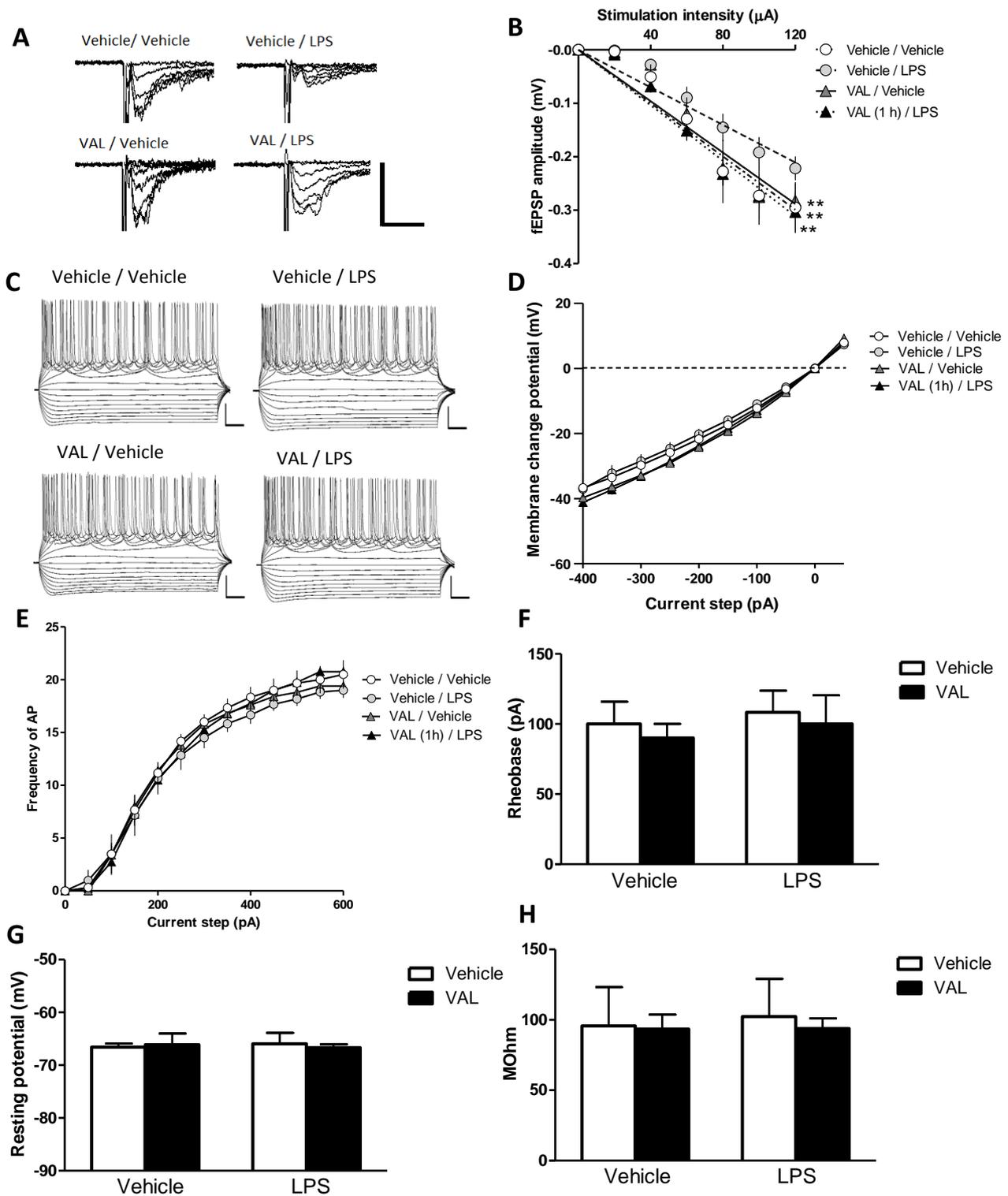


Figura 9. Atividade sináptica basal e propriedades intrínsecas das células das camadas V/VI do córtex pré-frontal (CPF) de camundongos C57BL/6 J tratados com uma fração enriquecida em valepotriatos diênicos (VAL - 10 mg/kg, v.o) ou veículo 1 hora antes do evento inflamatório (administração de LPS, 600 µg/kg, i.p., ou veículo). (A) Traçados representativos dos registros de curvas *input—output* de fEPSP evocados nas camadas profundas do córtex pré-frontal (em resposta a um aumento gradual de 20 µA no estímulo) dos diferentes grupos experimentais (Calibração: 0,5 mV; 10 ms); (B) Média da amplitude dos fEPSP resultantes do aumento gradual de estímulo (20 pA/step) aplicado na curva *input-output*; (C) Traçados representativos dos registros das respostas membranares à injeção de *steps* de corrente de diferentes intensidades (aumento gradual de 50 pA) nos neurônios piramidais das camadas V/VI do CPF; (D) Resumo das curvas corrente-voltagem (I-V) em células piramidais do CPF, registros em *current-clamp*; (E) Resumo das curvas corrente-disparo (*current-firing curves*), indicando a frequência de potenciais de ação evocados em resposta a diferentes intensidades de corrente injetadas nos neurônios piramidais do CPF; (F) Potencial de repouso, *rheobase* (G) e resistência membranar (H) dos neurônios em estudo. Os resultados estão expressos em média ± erro padrão. ANOVA de 2 vias, *post hoc* Student-Newman-Keuls. Diferença significativa em relação ao grupo *Vehicle / LPS* **p<0,01.

4. DISCUSSÃO

No presente estudo, o potencial antidepressivo de uma fração enriquecida em valepatriatos obtida por extração com CO₂ supercrítico das partes aéreas e subterrâneas de *V. glechomifolia* (VAL) foi confirmado, corroborando os resultados obtidos previamente pelo nosso grupo de pesquisa (SALLES, 2010; MÜLLER et al., 2012). Além disso, observou-se que VAL apresenta efeito do tipo antidepressivo em um modelo de depressão relacionado a uma abordagem da etiologia deste transtorno do humor que postula o envolvimento de fatores inflamatórios (DANTZER et al., 2008; 2011; DANTZER, 2012). Há uma série de evidências demonstrando que espécies do gênero *Valeriana* apresentam ação anti-inflamatória e, ainda, atividade do tipo antidepressiva (NEILL e DIXON, 2007; HATESOHL et al., 2008; SUBHAN et al., 2010; ZHANG et al., 2010; SAH et al., 2011; KHUDA et al., 2013). Em consonância com os resultados obtidos no presente trabalho, NEAMATI e colaboradores (2014) demonstraram a ação preventiva de um extrato hidroalcoólico de *V. officinallis* ao desenvolvimento do comportamento de doente e do tipo deprimido em um modelo de depressão relacionado à inflamação utilizando sensibilização com ovalbumina em ratos.

Os resultados obtidos demonstram que o modelo experimental empregado foi validado para a linhagem de animais utilizada, a C57Bl/6 J, uma vez que os camundongos apresentaram uma redução na atividade locomotora (devido à letargia que é apresentada pelo animal durante a manifestação do comportamento de doente 6 h após a injeção de LPS (DANTZER et al., 2008; VIANA et al., 2010)), que foi seguida pelo aumento no tempo de imobilidade no TST após o evento inflamatório. Tendo em vista que a atividade locomotora dos animais foi normalizada depois de 24 h da injeção de LPS, pode-se inferir que o aumento na imobilidade dos mesmos que foi observada no TST é devido ao desenvolvimento de comportamento do tipo deprimido, e não a alterações na atividade locomotora.

A administração de VAL e IMI aos camundongos preveniu o desenvolvimento das alterações comportamentais causadas pela injeção de LPS de *E. coli*. Os resultados deste trabalho estão de acordo com dados da literatura que demonstram que antidepressivos de diferentes classes (como imipramina, paroxetina e fluoxetina) apresentam resultados positivos neste modelo animal (MELLO et al., 2013; OHGI et al., 2013).

Ainda, o pré-tratamento dos animais com VAL resultou na manutenção da LTP NMDA-dependente e regularização da amplitude das sEPSC-AMPA no córtex pré-frontal (CPF) dos animais, região cerebral relacionada à fisiopatologia da depressão (NESTLER e CARLEZON, 2006; KRISHNAN e NESTLER, 2008) e que apresenta maturação e refinamento pós-natal dos circuitos neuronais que se estendem até a adolescência (FUSTER, 1991; GOLDMAN-RAKIC, 1995) – período correspondente à idade dos animais utilizados neste estudo. O efeito do pré-tratamento dos animais com VAL sobre a LTP-NMDA dependente foi semelhante àquele apresentado por IMI, porém esta não teve efeitos sobre as alterações na amplitude das sEPSC-AMPA causada pelo evento inflamatório sugerindo que a manutenção da LTP NMDA-dependente cortical resultante do pré-tratamento dos animais com IMI ou VAL ocorre, provavelmente, pela atuação sobre vias distintas.

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram de maneira inédita que a inflamação tem impactos negativos sobre a LTP NMDA-dependente no CPF. Observou-se um prejuízo robusto na magnitude deste tipo de plasticidade sináptica no CPF dos animais que permaneceu por, pelo menos, 3 dias após o desafio imune, mesmo que as alterações comportamentais já estivessem normalizadas. Além disso, o evento inflamatório teve efeitos negativos sobre a transmissão sináptica mediada por receptores AMPA em circuitos do CPF, pois foi observada uma diminuição na amplitude das sEPSC-AMPA no CPF dos animais, sugerindo uma possível redução no número ou alteração na função dos receptores-canaís pós-sinápticos (HAMMOND, 2008). Ainda, os resultados obtidos nas curvas *input-output* evidenciam que ocorre uma mudança na resposta sináptica,

uma vez que foi observada alteração na atividade sináptica basal, mas não nas propriedades intrínsecas dos neurônios em estudo. Ou seja, é possível que ocorra uma redução na eficácia e capacidade de resposta destas sinapses, que pode estar relacionada aos achados obtidos nas sEPSC-AMPA. Para confirmar esta hipótese, estão em andamento experimentos para avaliação da razão AMPA/NMDA (utilizando EPSCs evocados) nos neurônios piramidais das camadas V/VI do CPF. Além disso, a avaliação da densidade e morfologia de espinhos dendríticos dos neurônios em estudo dos diferentes grupos experimentais também se encontra em andamento.

A LTP NMDA-dependente está relacionada a uma grande liberação de glutamato pelo neurônio pré-sináptico após uma estimulação de alta frequência (revisado por CITRI e MALENKA, 2008; LÜSCHER e MALENKA, 2012). O glutamato liberado na fenda sináptica liga-se tanto a receptores-canais AMPA quanto NMDA. Porém, quando a célula encontra-se no potencial de repouso, os receptores NMDA encontram-se bloqueados por magnésio. Contudo, com a ativação de receptores-canais AMPA e o consequente influxo de sódio através destes canais após a ligação de glutamato, o neurônio pós-sináptico se despolariza, e ocorre a dissociação do íon magnésio do sítio de ligação do receptor-canal NMDA, permitindo a passagem de íons Na^+ e Ca^{2+} pelo canal. A ativação destes receptores e o subsequente aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} ativam as vias de sinalização envolvidas na indução da LTP, como a proteína-quinase II dependente de cálcio/calmodulina (CaMKII), que autofosforila após a indução de LTP, promovendo a fosforilação das subunidades GluR1 de receptores AMPA. Esse evento resulta em um aumento da condutância dos canais AMPA e, simultaneamente, os mesmos são expostos na fenda sináptica via exocitose ocasionando um aumento da concentração desses receptores na membrana neuronal. Além da CaMKII, uma série de outras proteínas-quinasas parece estar implicada na indução da LTP, dentre elas a PKA, PKC e a MAPK (CITRI e MALENKA, 2008). No presente trabalho, além da redução significativa das amplitudes das sEPSC-AMPA, foi encontrada uma tendência a redução nas amplitudes de sEPSC-NMDA no CPF dos animais que receberam a administração

intraperitoneal de LPS. Considerando a dependência da LTP NMDA-dependente aos receptores AMPA e NMDA, a redução no número ou alteração na função destes receptores pós-sinápticos pode estar ligada ao prejuízo na LTP NMDA-dependente do CPF dos camundongos que foi observado.

Corroborando estes resultados, WALKER e colaboradores (2013) demonstraram que a ativação de receptores AMPA causada pela administração de cetamina está envolvida na prevenção do desenvolvimento do comportamento de doente e do tipo deprimido que ocorre após a injeção aguda de LPS em camundongos. Considerando que VAL não teve efeito *per se* sobre a amplitude das sEPSC-AMPA e sEPSC-NMDA, é possível que seus efeitos protetores sobre a LTP NMDA-dependente e transmissão sináptica no CPF seja um efeito indireto, não relacionado a efeitos diretos destas moléculas nos receptores, mas que culmina na normalização das sEPSC-AMPA no CPF dos animais submetidos à injeção de LPS.

A administração de VAL aos animais 5 h após a injeção de LPS não teve efeito sobre as alterações comportamentais e neuroquímicas nos animais utilizados no presente estudo. Por outro lado, IMI foi efetiva quando empregada neste esquema de tratamento no que diz respeito ao restauro das alterações comportamentais e da LTP NMDA-dependente no CPF, sem atuar sobre as sEPSC-AMPA ou sEPSC-NMDA nos neurônios piramidais do CPF dos animais. Estes resultados sugerem que a ativação da enzima IDO possa estar sendo atenuada por IMI e não por VAL neste esquema de tratamento em camundongos C57BL/6 J. Recentemente, MOHAMED e colaboradores (2013) demonstraram que IMI apresenta atividade inibitória sobre a expressão de IDO no CPF de ratos submetidos ao estresse crônico variado, modelo animal de depressão. De fato, substâncias que atuam concomitantemente inibindo o aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias e na atividade da enzima IDO são igualmente eficazes no modelo animal empregado neste trabalho quando administradas antes ou após o desafio imune (DANTZER et al., 2008; 2011). Os resultados deste trabalho sugerem que este pode não ser o caso de VAL; assim, a investigação do efeito de

VAL sobre a enzima IDO cerebral em animais C57BL/6 J surge como uma perspectiva do presente estudo.

5. CONCLUSÃO

Os resultados discutidos até o momento apontam pela primeira vez para o potencial anti-inflamatório preventivo dos valepotriatos diênicos obtidos de *Valeriana glechomifolia* e reforçam a hipótese de que estas moléculas apresentam um potencial antidepressivo, visto que as mesmas foram ativas em um modelo animal que relaciona a contribuição do sistema imune com o desenvolvimento da depressão e com prejuízo na LTP NMDA-dependente no córtex pré-frontal. O efeito de VAL neste modelo pode ser mediado pela normalização do número ou função de receptores-canal AMPA nesta estrutura cerebral.

6. REFERÊNCIAS

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(2-3), pp. 308-314, 2012.

AKHONDZADEH, S.; JAFARI S, R. 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.

BLISS, T.V.; COLLINGRIDGE, G.L. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. **Nature**, v. 361(6407), pp. 31-39, 1993.

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

BRASIL, Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, CONCEA. **Diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos - DBCA**. Portaria nº 465, de 23 de maio de 2013, Brasília-DF, Brasil, p. 50, 2013a.

BRASIL, Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, CONCEA. **Diretrizes da prática de eutanásia do CONCEA**. Portaria n. 596, de 25 de junho de 2013, Brasília-DF, Brasil, p. 54, 2013b.

CAPURON, L.; RAVAUD, A.; MILLER, A.H.; DANTZER, R. Baseline mood and psychosocial characteristics of patients developing depressive symptoms during interleukin-2 and/or interferon-alpha cancer therapy. **Brain Behavior and Immunity**, v.18(3), pp. 205-213, 2004.

CERQUEIRA, J.J.; MAILLIET, F.; ALMEIDA, O.F.X.; JAY, T.M.; SOUSA, N. The prefrontal cortex as a key target of the maladaptive response to stress. **Journal of Neuroscience**, v. 27: 2781–2787, 2007.

CHEN, H.; XIE, C.; WANG, H.; JIN, D.Q.; LI, S.; WANG, M.; REN, Q.; XU, J.; OHIZUMI, Y.; GUO, Y. Sesquiterpenes inhibiting the microglial activation from *Laurus nobilis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.62(20), pp. 4784 – 4788, 2014.

CITRI, A.; MALENKA, R.C. Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms. **Neuropsychopharmacology**, v. 33(1), pp.18-41, 2008.

CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA (CFMV). **Resolução n° 714**, de 26 de agosto de 2002.

COUNCIL FOR INTERNATIONAL ORGANIZATIONS OF MEDICAL SCIENCES (CIOMS). **International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals**. Geneva: 1985.

DANTZER R.; O'CONNOR, J.C.; LAWSON, M.A.; KELLEY, K.W. Inflammation-associated depression: from serotonin to kynurenine. **Psychoneuroendocrinology**, v.36(3), pp. 426-436, 2011.

DANTZER, R. Depression and Inflammation: An Intricate Relationship. **Biological Psychiatry**, v.71(1), pp. 4–5, 2012.

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.

DOWLATI, Y.; HERRMANN, N.; SWARDFAGER, W.; LIU, H.; SHAM, L.; REIM, E.K.; LANCTOT, K.L. A meta-analysis of cytokines in major depression. **Biological Psychiatry**, v.67(5), pp. 446-457, 2010.

DUPIN, N.; MAILLIET, F.; ROCHER, C.; KESSAL, K.; SPEDDING, M.; JAY, T.M. Common efficacy of psychotropic drugs in restoring stress-induced impairment of prefrontal plasticity. **Neurotoxicity Research**, v.10, pp. 193–198, 2006.

EYRE, H.; BAUNE, B.T. Neuroplastic changes in depression: a role for the immune system. **Psychoneuroendocrinology**, v. 37(9), pp. 1397-1416, 2012.

FRENOIS, F.; MOREAU, M.; O'CONNOR, J.; LAWSON, M.; MICON, C.; LESTAGE, J.; KELLEY, K.W.; DANTZER, R.; CASTANON, N. Lipopolysaccharide induces delayed FosB/DeltaFosB immunostaining within the mouse extended amygdala, hippocampus and hypothalamus, that parallel the expression of depressive-like behavior. **Psychoneuroendocrinology**, v.32(5), pp. 516-531, 2007.

FUSTER, J.M. The prefrontal cortex and its relation to behavior. **Progress in Brain Research**, v.87, pp. 201–211, 1991.

GARCÍA-BUENO, B.; CASO, J.R.; LEZA, J.C. Stress as a neuroinflammatory condition in brain: damaging and protective mechanisms. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v.32(6), pp. 1136-1151, 2008.

GEU-FLORES, F.; SHERDEN, N.H.; COURDAVAULT, V.; BURLAT, V.; GLENN, W.S.; WU, C.; NIMS, E.; CUI, Y.; O'CONNOR, S.E. An alternative route to cyclic terpenes by reductive cyclization in iridoid biosynthesis. **Nature**, v. 492(7427), pp. 138-142, 2012.

GOLDIM, J. R. **Pesquisa em Saúde e Direito dos Animais**. Porto Alegre: HCPA, 1995.

GOLDMAN-RAKIC, P.S. Architecture of the prefrontal cortex and the central executive. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.769, pp. 71–83, 1995.

HAMMOND, C. **Cellular and Molecular Neurophysiology**, 3 ed. Academic Press, Elsevier: London, 2008.

HANNESTAD, J.; DELLAGIOIA, N.; BLOCH, M. The effect of antidepressant medication treatment on serum levels of inflammatory cytokines: a meta-analysis. **Neuropsychopharmacology**, v. 36(12), pp. 2452-2459, 2011.

HATTESOHL, M.; FEISTEL, B.; SIEVERS, H.; LEHNFELD, R.; HEGGER, M.; WINTERHOFF, H. Extracts of *Valeriana officinalis* L. s.l. show anxiolytic and antidepressant effects but neither sedative nor myorelaxant properties. **Phytomedicine**, v. 15, pp. 2-15, 2008.

IAFRATI, J.; OREJARENA, M.J.; LASSALLE, O.; BOUAMRANE, L.; CHAVIS, P. Reelin, an extracellular matrix protein linked to early onset psychiatric diseases, drives postnatal development of the prefrontal cortex via GluN2B-NMDARs and the mTOR pathway. **Molecular Psychiatry**, v. 19(4), pp. 417-26, 2014.

JARDÓN-DELGADO, A.; MAGOS-GUERRERO, G.A.; MARTÍNEZ-VÁZQUEZ, M. Isolation of a new anti-inflammatory 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27-octanorcucurbitacin-type triterpene from *Ibervillea sonora*. **Natural Products Communications**, v. 9(1), pp. 15-16, 2014.

JAY, T.M.; ROCHER, C.; HOTTE, M.; NAUDON, L.; GURDEN, H.; SPEDDING, M. Plasticity at hippocampal to prefrontal cortex synapses is impaired by loss of dopamine and stress: importance for psychiatric diseases. **Neurotoxicity Research**, v. 6(3), pp. 233-244, 2004.

JUERGENS, U.R. Anti-inflammatory properties of the monoterpene 1,8-cineole: current evidence for co-medication in inflammatory air anti-inflammatory terpenes from flowers of *Inula japonica*. **Drug Research** DOI: 10.1055/s-0034-1372609, publicado online em maio de 2014.

KHAIROVA, R.A.; MACHADO-VIEIRA, R.; DU, J.; MANJI, H.K. A potential role for pro-inflammatory cytokines in regulating synaptic plasticity in major depressive disorder. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 12(4), pp. 561-578, 2009.

KHUDA, F.; IQBAL, Z.; KHAN, A.; ZAKIULLAH; NASIR, F.; SHAH, Y. Anti-inflammatory activity of the topical preparation of *Valeriana wallichii* and *Achyranthes aspera* leaves. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 26(3), pp. 451-454, 2013.

KWON, S.; LEE, B.; KIM, M.; LEE, H.; PARK, H.J.; HAHM, D.H.. Antidepressant-like effect of the methanolic extract from *Bupleurum falcatum* in the tail suspension test. **Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 34, pp. 265–270, 2010.

KRISHNAN, V.; NESTLER, E.J. The molecular neurobiology of depression. **Nature**, v. 455, pp. 894–902, 2008.

LABOR, S.; LABOR, M.; JURIC, I.; VUKSIĆ, Z. The prevalence and pulmonary consequences of anxiety and depressive disorders in patients with asthma. **Collegium Antropologicum**, v. 36, pp. 473–481, 2012.

LAFORCADE, M.; LARRIEU, T.; MATO, S.; DUFFAUD, A.; SEPERS, M.; MATIAS, I.; DE SMEDT-PEYRUSSE, V.; LABROUSSE, V.F.; BRETILLON, L.; MATUTE, C.; RODRÍGUEZ-PUERTAS, R.; LAYÉ, S.; MANZONI, O.J. Nutritional omega-3 deficiency abolishes endocannabinoid-mediated neuronal functions. **Nature Neuroscience**, v. 14(3), pp. 345 – 350, 2011.

LESPERANCE, F.; FRASURE-SMITH, N. Depression and heart disease. **Cleveland Clinic Journal of Medicine**, v.74 (Suppl. 1), pp. S63-S66, 2007.

LÜSCHER, C.; MALENKA, R.C. NMDA receptor-dependent long-term potentiation and long-term depression (LTP/LTD). **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 4(6), pp. 1-15, 2012.

MAES, M.; BOSMANS, E.; SUY, E.; VANDERVORST, C.; DE JONCKHEERE, C.; RAUS, J. Immune disturbances during major depression: upregulated expression of interleukin-2 receptors. **Neuropsychobiology**, v. 24(3), pp. 115–120, 1990.

MAES, M.; BOSMANS, E.; SUY, E.; VANDERVORST, C.; DEJONCKHEERE, C.; RAUS, J. Depression-related disturbances in mitogen-induced lymphocyte

responses and interleukin-1 beta and soluble interleukin-2 receptor production. **Acta Psychiatrica Scandinavica**, v. 84(4), pp. 379–386, 1991.

MAES, M. The cytokine hypothesis of depression: inflammation, oxidative & nitrosative stress (IO&NS) and leaky gut as new targets for adjunctive treatments in depression. **Neuroendocrinology Letters**, v. 29(3), pp. 287-291, 2008.

MAES, M.; LEONARD, B.E.; MYINT, A.M.; KUBERA, M.; VERKERK, R. The new “5-HT” hypothesis of depression: cell-mediated immune activation induces indoleamine 2,3-dioxygenase, which leads to lower plasma tryptophan and an increased synthesis of detrimental tryptophan catabolites (TRYCATs), both of which contribute to the onset of depression. **Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 35(3), pp. 702–721, 2011.

MARSDEN, W.N. Synaptic plasticity in depression: molecular, cellular and functional correlates. **Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 43, pp. 168-184, 2013.

MELLO, B.S.; MONTE, A.S.; MCINTYRE, R.S.; SOCZYNSKA, J.K.; CUSTÓDIO, C.S.; CORDEIRO, R.C.; CHAVES, J.H.; VASCONCELOS, S.M.; NOBRE, H.V.; FLORENÇO DE SOUSA, F.C.; 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(10), pp. 1521-1529, 2013.

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

MOHAMED, B.M.S.A.; ABOUL-FOTOUH, S.; IBRAHIM,E.A.; SHEHATA, H.; MANSOUR, A.A.; YASSIN, N.A.Z.; EL-ERAKY, W.; ABDEL-TAWAB, A.M. Effects of pentoxifylline, 7-nitroindazole, and imipramine on tumor necrosis factor- α and indoleamine 2,3-dioxygenase enzyme activity in the hippocampus and frontal cortex of chronic mild-stress-exposed rats. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v. 9, pp. 697 – 708, 2013.

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

MULLER, N.; MYINT, A.M.; SCHWARZ, M.J. Inflammatory biomarkers and depression. **Neurotoxicity Research**, v. 19, pp. 308–318, 2011.

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 Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 36(1), pp. 101-109, 2012.

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

NEILL, M.; DIXON, P.S. Effects of a preincisional 14-day course of valerian on natural killer cell activity in Sprague-Dawley male rats undergoing abdominal surgery. **Holistic Nursing Practice**, v. 21(4), pp. 187-93, 2007.

NESTLER, E.J.; CARLEZON, W.A. The mesolimbic dopamine reward circuit in depression. **Biological Psychiatry**, v. 59, pp. 1151–1159, 2006.

OHGI, Y.; FUTAMURA, T.; KIKUCHI, T.; HASHIMOTO, K. Effects of antidepressants on alternations in serum cytokines and depressive-like behavior in mice after lipopolysaccharide administration. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 103(4), pp. 853-859, 2013.

PAPAKOSTAS, G.I. Cognitive symptoms in patients with major depressive disorder and their implications for clinical practice. **Journal of Clinical Psychiatry**, v. 75(1), pp. 8-14, 2014.

PRATHER, A.A.; RABINOVITZ, M.; POLLOCK, B.G.; LOTRICH, F.E. Cytokine-induced depression during IFN-alpha treatment: the role of IL-6 and sleep quality. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 23(8), pp. 1109-1116, 2009.

QI, H.; MAILLIET, F.; SPEDDING, M.; ROCHER, C.; ZHANG, X.; DELAGRANGE, P.; MCEWEN, B.; JAY, T.M.; SVENNINGSSON, P. Antidepressants reverse the attenuation of the neurotrophic MEK/MAPK cascade in frontal cortex by elevated platform stress; reversal of effects on LTP is associated with GluA1 phosphorylation. **Neuropharmacology**, v. 56, pp. 37–46, 2009.

QUAN, M. ; ZHENG, C. ; ZHANG, N.; HAN, D. ; TIAN, Y. ; ZHANG, T. ; YANG, Z. Impairments of behavior, information flow between thalamus and cortex, and prefrontal cortical synaptic plasticity in an animal model of depression. **Brain Research Bulletin**, v. 85, pp. 109-116, 2011a.

QUAN, M.; ZHANG, N.; WANG, Y-Y. ; ZHANG, T.; YANG, Z. Possible antidepressant effects and Mechanisms of memantine in behaviors and synaptic plasticity of a depression rat model. **Neuroscience**, v. 182, pp. 88–97, 2011b.

SAH, S.P.; MATHELA, C.S.; CHOPRA, K. Antidepressant effect of *Valeriana wallichii* patchouli alcohol chemotype in mice: behavioural and biochemical evidence. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 135(1), pp. 197-200, 2011.

SALLES, L. A. **Obtenção de frações de valepotriatos através de fluido supercrítico e triagem psicofarmacológica de *Valeriana glechomifolia* Meyer.** Tese de doutorado – Curso de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

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.

SCHLOESSER, R.J.; HUANG, J.; KLEIN, P.S.; MANJI, H.K. Cellular plasticity cascades in the pathophysiology and treatment of bipolar disorder. **Neuropsychopharmacology**, v. 33(1), pp. 110-133, 2008.

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.

STREHL, A.; LENZ, M.; ITSEKSON-HAYOSH, Z.; BECKER, D.; CHAPMAN, J.; DELLER, T.; MAGGIO, N.; VLACHOS, A. Systemic inflammation is associated with a reduction in Synaptopodin expression in the mouse hippocampus. **Experimental Neurology**, v. 261C, pp. 230-235, 2014.

SUBHAN, F.; KARIM, N.; GILANI, A.H.; SEWELL, R.D.E. Terpenoid content of *Valeriana wallichii* extracts and antidepressant-like response profiles. **Phytotherapy Research**, v. 24, pp. 686–691, 2010.

SUBLETTE, M.E.; POSTOLACHE, T.T. Neuroinflammation and depression: the role of Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) as a molecular Pathway. **Psychosomatic Medicine**, v. 74, pp. 668-672, 2012.

TANG, S.A.; ZHU, H.; QIN, N.; ZHOU, J.Y.; LEE, E.; KONG, D.X.; JIN, M.H.; DUAN, H.Q. Anti-inflammatory terpenes from flowers of *Inula japonica*. **Planta Medica**, v. 80(07), pp. 583-589, 2014.

TYRING, S.; GOTTLIEB, A.; PAPP, K.; GORDON, K.; LEONARDI, C.; WANG, A.; LALLA, D.; WOOLLEY, M.; JAHREIS, A.; ZITNIK, R.; CELLA,

D.; KRISHNAN, R. Etanercept and clinical outcomes, fatigue, and depression in psoriasis: double-blind placebo-controlled randomised phase III trial. **Lancet**, v. 367(9504), pp. 29-35, 2006.

VAWTER, M.P.; THATCHER, L.; USEN, N.; HYDE, T.M.; KLEINMAN, J.E.; FREED, W.J. Reduction of synapsin in the hippocampus of patients with bipolar disorder and schizophrenia. **Molecular Psychiatry**, v. 7(6), pp. 571-578, 2002.

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.

WAGER-SMITH, K.; MARKOU, A. Depression: a repair response to stress-induced neuronal microdamage that can grade into a chronic neuroinflammatory condition? **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 35(3), pp. 742-764, 2011.

WALKER, A.K.; BUDAC, D.P.; BISULCO, S.; LEE, A.W.; SMITH, R.A.; BEENDERS, B.; KELLEY, K.W.; DANTZER R. NMDA receptor blockade by ketamine abrogates lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior in C57BL/6 J mice. **Neuropsychopharmacology**, v. 38(9), pp. 1609-1616, 2013.

WOLFE, F.; MICHAUD, K. Predicting depression in rheumatoid arthritis: the signal importance of pain extent and fatigue, and comorbidity. **Arthritis & Rheumatology**, v.61(5), pp. 667-673, 2009.

XI, L.; ZHANG, Y.; HAN, D.; ZHANG, L. Effect of asthma, aeroallergen category, and gender on the psychological status of patients with allergic rhinitis. **Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology**, v. 22, pp. 264–269, 2012.

YIRMIYA, R.; GOSHEN, I. Immune modulation of learning, memory, neural plasticity and neurogenesis. **Brain Behavior and Immunity**, v. 25(2), v. 181-213, 2011.

ZHANG, Z.L.; ZUO, Y.M.; WANG, Q.H.; XIAO, H.B.; KUANG, H.X. Effects of *Valeriana amurensis* on the expressions of iNOS, COX-2 and IkappaCB-alpha in Alzheimer's disease model rat's brain. **Zhong Yao Cai**, v. 33(4), pp. 581-583, 2010.

DISCUSSÃO GERAL E PERSPECTIVAS

O presente trabalho visou contribuir para o aprofundamento do estudo do mecanismo de ação antidepressiva de uma fração enriquecida em valepotriatos diênicos (VAL) obtida a partir das partes aéreas e subterrâneas de *Valeriana glechomifolia*, espécie nativa do Rio Grande do Sul. Trabalhos anteriores conduzidos pelo grupo de pesquisa coordenado pela professora Dr. Stela Rates já apontavam para o potencial antidepressivo destas moléculas (SALLES, 2010; MÜLLER et al., 2012a), uma vez que reduziram significativamente o tempo de imobilidade de camundongos nos testes da suspensão pela cauda (TST) e da natação forçada (FST), que são modelos roedores preditivos de ação antidepressiva, nas mesmas doses em que não aumentam a atividade locomotora no OFT. No presente trabalho, estes achados foram confirmados. Além disso, em um estudo prévio foi observado que VAL apresenta um mecanismo de ação antidepressiva mediado principalmente pelos sistemas neurotransmissores dopaminérgico e noradrenérgico (MÜLLER et al., 2012a), o que representa uma ação dual diferenciada, quando comparada com a maioria dos antidepressivos convencionais.

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que VAL apresenta interação do tipo sinérgica com os antidepressivos imipramina (IMI), desipramina (DESI) e bupropiona (BUP), e age sobre alvos biológicos que têm sido recentemente relacionados à neurobiologia da depressão. VAL atua sobre mecanismos epigenéticos do controle da transcrição gênica, reduzindo a metilação global do DNA no hipocampo de camundongos, e apresenta resultados positivos em um modelo animal que relaciona o desenvolvimento da depressão com a ativação de vias inflamatórias, reduzindo o aumento cortical na expressão de citocinas pró-inflamatórias e os prejuízos na LTP NMDA-dependente após o desafio imune. Ainda, o tratamento repetido de camundongos com VAL aumenta a atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase cortical. Estes achados apontam para o envolvimento de diferentes alvos biológicos no mecanismo de ação antidepressiva de VAL e dão suporte às hipóteses recentes da etiologia da depressão, que postulam o envolvimento destas vias e alvos biológicos no desenvolvimento deste transtorno do humor.

Nosso grupo de pesquisa demonstrou que a administração combinada de doses sub-efetivas de VAL com subdoses de IMI, DESI e BUP reduziram o tempo de imobilidade de camundongos no FST (MÜLLER et al., 2012a). A partir desses achados, neste trabalho foi investigada a natureza de interação ocorrente entre VAL e IMI, DESI ou BUP no FST em camundongos através de análise isobolográfica, a qual representa uma estratégia para o estudo das interações entre substâncias (TALLARIDA, 1997; 2007; WAGNER e ULRICH-MERZENICH, 2009) e gera evidências sobre o mecanismo de ação das mesmas (GESSNER, 1995). Assim, de acordo com TALLARIDA (2000; 2001; 2006; 2011), interações do tipo sinérgicas podem ser o resultado da associação de substâncias que acionam diferentes vias ou atuam em sítios distintos, o que potencializaria seus efeitos quando combinadas. Os resultados deste trabalho demonstram que a ED50 obtida para a mistura de VAL com IMI, DESI ou BUP (ED50 mix) é significativamente menor que a ED50 teórica calculada para a combinação (ED50 add). Ainda, todos os índices de interação são menores que 1, o que indica que a associação de VAL com os antidepressivos estudados é do tipo sinérgica, sugerindo que VAL apresenta um mecanismo de ação diferente do destes fármacos, ou que VAL e estes antidepressivos não agem sobre mesmos sítios.

Os antidepressivos utilizados nas combinações com VAL na análise isobolográfica deste estudo atuam sobre a recaptação de monoaminas cerebrais: IMI é um inibidor da recaptação de serotonina e noradrenalina (STAHL, 2008), DESI, por sua vez, inibe seletivamente a recaptação de noradrenalina (STAHL, 2008) e BUP atua como inibidor da recaptação de dopamina e noradrenalina (FERRIS and COOPER, 1993; ASCHER et al., 1995; STAHL et al., 2004). Considerando que a ação antidepressiva de VAL é mediada pelos sistemas neurotransmissores dopaminérgico e noradrenérgico (MÜLLER et al., 2012a), o sinergismo encontrado entre VAL e os antidepressivos estudados sugere que VAL não age sobre os transportadores de dopamina e noradrenalina (pelo menos, não no mesmo sítio dos transportadores onde estes antidepressivos atuam). Ainda, a ação dopaminérgica de VAL pode contribuir para o sinergismo decorrente de sua associação com DESI e IMI (além da ação de IMI sobre a recaptação de

serotonina). Além disso, VAL poderia estar agindo diretamente sobre os receptores destas monoaminas ou em outros alvos diferentes do sistema monoaminérgico. Assim, as perspectivas que surgem a partir destes resultados são o estudo de ligação de VAL aos transportadores de monoaminas cerebrais e também a realização de ensaios de *binding* a receptores dopaminérgicos e noradrenérgicos. A microdiálise cerebral em ratos acordados para avaliação dos efeitos de VAL nos níveis monoaminas em diferentes regiões cerebrais encontra-se em andamento.

De fato, os demais achados do presente trabalho corroboram a hipótese levantada a partir dos resultados da análise isoblográfica de que VAL atuaria sobre alvos biológicos diferentes do sistema monoaminérgico, uma vez que o efeito do tipo antidepressivo da administração aguda de VAL no FST em camundongos é acompanhado por uma redução significativa do nível global de metilação do DNA hipocampal. Estes resultados estão de acordo com SALES e colaboradores (2011), que demonstraram que inibidores da metilação do DNA apresentam atividade do tipo antidepressiva no FST em camundongos. Além disso, LAPLANT e colaboradores (2010) demonstraram que a inibição da metilação do DNA no núcleo accumbens induz efeito do tipo antidepressivo no FST. Os resultados deste trabalho apontam para uma diferença entre os efeitos de VAL e dos antidepressivos convencionais, uma vez que em todos os estudos realizados até o momento, somente o tratamento crônico, mas não o agudo, com estes fármacos induz alterações epigenéticas, como a acetilação de histonas, em regiões promotoras do gene para o BDNF, regulando assim sua expressão (TSANKOVA et al., 2006; KRISHNAN e NESTLER, 2008; ONISHCHENKO et al., 2008), enquanto uma única administração de VAL alterou rapidamente este parâmetro no hipocampo dos animais.

Em consonância com os efeitos encontrados para VAL, LIU e colaboradores (2009) demonstraram que terpenos são inibidores da metilação do DNA (pois inibem a atividade da enzima DNA Metiltransferase 1 (DNMT1)) em ensaios *in vitro* e *in vivo*. Curiosamente, VAL não teve efeitos sobre a metilação global do DNA no córtex pré-frontal (CPF) dos animais. Atualmente, uma das

maiores críticas aos inibidores da metilação do DNA é a falta de seletividade dos mesmos (FENG et al., 2010), o que torna promissores os resultados apresentados por VAL. Esse efeito seletivo de VAL pode ser devido ao fato de terpenos atuarem sobre a enzima DNMT1, que tem a expressão aumentada em células em divisão (SUETAKE et al., 2001; FENG et al., 2010). Assim, VAL poderia estar atuando seletivamente no hipocampo devido ao fato de esta região cerebral apresentar ativa neurogênese (VAN PRAAG et al., 2002; SAHAY e HEN, 2007), diferentemente do CPF.

Os resultados deste trabalho demonstram que o efeito de VAL sobre a metilação do DNA pode estar relacionado com um aumento na transcrição gênica e síntese de proteínas, pois a pré-administração de anisomicina (um inibidor da síntese de proteínas) aos animais preveniu o efeito do tipo antidepressivo de VAL no FST. De fato, a remodelação da cromatina decorrente de alteração epigenética modula a expressão gênica na medida em que o aumento (heterocromatina) ou diminuição (eucromatina) da condensação da cromatina dificulta ou facilita, respectivamente, o acesso da maquinaria transcricional a regiões promotoras específicas, resultando em mudança nos níveis de RNA mensageiros (RNAm) e de proteínas expressas (TSANKOVA et al., 2006; TSANKOVA et al., 2007; KRISHNAN e NESTLER, 2008). Desta forma, a redução na metilação do DNA acarretaria em aumento de atividade transcricional e, conseqüentemente, na síntese de proteínas.

Estudos clínicos com pacientes deprimidos demonstram alteração nos níveis de metilação do DNA na região promotora de diversos genes como, por exemplo, do que codifica para o BDNF (WEAVER et al., 2004; KELLER et al., 2010; UCHIDA et al., 2011). Estas evidências são corroboradas por estudos pré-clínicos, que demonstram que animais submetidos a modelos experimentais de depressão apresentam repressão na transcrição do gene que codifica para BDNF através de controle por mecanismos epigenéticos (TSANKOVA et al., 2006; NESTLER and KRISHNAN, 2008; ONISHCHENKO et al., 2008). O efeito do tipo antidepressivo agudo de VAL é acompanhado pelo acionamento das vias de sinalização ativadas

por BDNF, pois o pré-tratamento dos animais com K252a (um inibidor seletivo de tirosina cinase que bloqueia o receptor TrkB, ativado pelo BDNF) preveniu parcialmente o efeito do tipo antidepressivo de VAL no FST em camundongos e a administração aguda de VAL causou um rápido aumento na concentração hipocampal de receptores TrkB e uma tendência a aumento nos níveis de BDNF nesta estrutura cerebral, sugerindo contribuição deste fator neurotrófico para o efeito de VAL. Assim, o efeito agudo de VAL sobre a metilação global do DNA poderia também contribuir para o sinergismo no FST em camundongos que decorre da combinação de VAL e com os antidepressivos estudados.

Uma das hipóteses da neurobiologia da depressão relaciona alterações na atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase cerebral com o desenvolvimento deste transtorno psiquiátrico. Estudos já demonstraram que a atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase cerebral encontra-se diminuída em pacientes com depressão e distúrbio bipolar (GOLDSTEIN et al., 2006; 2009; TOCHIGI et al., 2008), reduzindo a excitabilidade neuronal e causando um prejuízo na manutenção do volume celular, uma vez que estas são funções da enzima (DOBRETSOV e STIMERS, 2005). Estes achados são corroborados por estudos pré-clínicos em roedores submetidos a modelos experimentais de depressão (GAMARO et al., 2003; VASCONCELLOS et al., 2005; CREMA et al., 2010). Neste trabalho, foi demonstrado que a administração repetida de VAL aumenta significativamente a atividade global da enzima Na^+/K^+ -ATPase e a expressão da isoforma $\alpha 2$ no córtex de camundongos, sem alterações na atividade global da enzima hipocampal, sugerindo uma ação região-específica de VAL sobre a Na^+/K^+ -ATPase.

Nosso grupo demonstrou que valepotriatos diênicos isolados de *V. glechomifolia* inibem a enzima Na^+/K^+ -ATPase em cérebro de rato *in vitro* (BETTERO et al., 2011). Estes resultados estão de acordo com dados da literatura que demonstram que o tratamento repetido com fluoxetina aumenta a atividade cerebral da enzima *in vivo* e apresenta efeito contrário em ensaios *in vitro*, inibindo a Na^+/K^+ -ATPase no córtex de ratos (ZANATTA et al., 2001). A discrepância entre os resultados *in vitro* e *in vivo* para a ação de VAL sobre a enzima pode ser

atribuída à instabilidade dos valepotriatos em meio fortemente ácido ou alcalino, condição que leva à formação dos produtos de degradação baldrinal e homobaldrinal, que não apresentam grupo epóxido (HOUGHTON, 1988; HOBBS, 1989). Assim, existe a possibilidade de que os resultados dos experimentos *in vivo* sejam decorrentes da ação de baldrinais sobre a enzima, o que não seria o caso dos ensaios *in vitro*; e, por isso, foram encontrados resultados dissonantes nos dois tipos de experimentos.

A manutenção do gradiente iônico de Na^+ e, conseqüentemente, do potencial de membrana, que são mantidos principalmente pela enzima Na^+/K^+ -ATPase (KAPLAN, 2002; JORGENSEN et al., 2003), são indispensáveis para o funcionamento ótimo dos transportadores monoaminas (como dopamina, noradrenalina e serotonina), que realizam a recaptação destes neurotransmissores da fenda sináptica (XHAARD et al., 2008). Estes transportadores, também conhecidos como co-transportadores de Na^+ , fazem o transporte das monoaminas do meio extracelular para o meio intracelular acoplado o Na^+ contra o gradiente de concentração (KRISTENSEN et al., 2011). Já foi demonstrado que alterações no gradiente iônico de Na^+ levam à redução da recaptação de monoaminas (GU et al., 1994; PIFL et al., 1997). Além disso, experimentos *in vitro* demonstraram que a endobaína E, um inibidor da bomba Na^+/K^+ -ATPase, inibe a recaptação de monoaminas em sinaptossomas de ratos (VATTA et al., 2004). Os achados obtidos para VAL até o momento sugerem que a mesma pode causar uma alteração no gradiente de Na^+ , através do aumento da atividade da Na^+/K^+ -ATPase *in vivo* e inibição da mesma *in vitro*, o que poderia levar a uma redução na recaptação de monoaminas, por exemplo, contribuindo para o efeito antidepressivo de VAL.

Os resultados do presente trabalho demonstram que a submissão dos animais ao FST pode influenciar o efeito de VAL sobre a atividade da Na^+/K^+ -ATPase, pois o grupo tratado com VAL e submetido ao teste não apresenta aumento na atividade cortical da enzima. Ainda, o FST *per se* pode influenciar a expressão das isoformas da Na^+/K^+ -ATPase. Tais assertivas são sustentadas pelo fato de o FST aumentar os níveis plasmáticos e corticais de corticosterona e de

compostos do tipo ouabaína em roedores (GOTO et al., 1995; VIANA et al., 2008), que estão diretamente relacionados com a regulação da atividade da Na^+/K^+ -ATPase, e apresentam efeitos inibitórios sobre a enzima. Assim, a exposição ao FST pode afetar a interação que ocorre entre VAL e a Na^+/K^+ -ATPase.

Embora o grupo tratado com veículo e submetido ao FST não tenha apresentado alterações na atividade da enzima, foi observado neste grupo um aumento no conteúdo cortical da isoforma $\alpha 2$. Ainda, camundongos tratados repetidamente com VAL e submetidos ao FST apresentaram aumento na expressão da isoforma $\alpha 3$ no córtex. Considerando esse aumento na expressão das isoformas e a não alteração da atividade global da enzima quando os animais são tratados com VAL e submetidos ao FST, é possível que a submissão dos animais ao nado forçado esteja de certa forma causando uma perda de função ou prejuízo nestas enzimas, e o aumento na expressão das isoformas observado no grupo tratado com VAL e submetido ao FST surgiria como uma compensação deste efeito, mantendo a atividade global da enzima inalterada. Não foram detectadas alterações na expressão da isoforma $\alpha 1$ em nenhum grupo experimental. De fato, alguns estudos já demonstraram que esta isoforma é menos sensível a diferentes insultos que as demais (AZUMA et al., 1991; OSTADAL et al., 2004).

A administração aguda de VAL não exerceu qualquer efeito sobre a atividade cortical ou hipocampal da Na^+/K^+ -ATPase, sugerindo que o efeito agudo destas moléculas no FST em camundongos não é mediado por alterações na atividade da enzima. Assim, o efeito de VAL sobre a Na^+/K^+ -ATPase é possivelmente mediado por mecanismos regulatórios de longa duração, os quais levam de horas a dias para ocorrerem (THERIEN e BLOSTEIN, 2000). Além disso, é possível também que os níveis plasmáticos de VAL necessários para exercer efeitos sobre a enzima somente sejam atingidos após a administração repetida e, por isso, a administração aguda de VAL não altera a atividade da Na^+/K^+ -ATPase. O sinergismo encontrado entre VAL e os demais antidepressivos

após administração aguda (nos experimentos realizados na análise isobolográfica) possivelmente não conta com a contribuição do efeito de VAL sobre a enzima.

Em outro conjunto de experimentos, foi demonstrado que VAL previne o desenvolvimento do comportamento de doente e do tipo deprimido em camundongos CF1 e C57Bl/6 em um modelo animal que relaciona o desenvolvimento de depressão à ativação de vias inflamatórias periféricas e, subsequentemente, centrais (DANTZER et al., 2008; 2011; DANTZER, 2012). Estes resultados estão em consonância com outros trabalhos da literatura que demonstram o potencial anti-inflamatório e antidepressivo de espécies do gênero *Valeriana* (NEILL e DIXON, 2007; HATESOHL et al., 2008; SUBHAN et al., 2010; ZHANG et al., 2010; SAH et al., 2011; KHUDA et al., 2013). Ainda, a ação preventiva de *V. officinalis* em um modelo de depressão relacionada à inflamação em ratos foi recentemente demonstrada (NEAMATI et al., 2014).

De fato, diversos estudos recentes têm associado a inflamação com a depressão, demonstrando elevação dos níveis plasmáticos de mediadores inflamatórios em pacientes de deprimidos (MAES, 2008; DOWLATI et al., 2010; HANNESTAD et al., 2011). Esta “hipótese inflamatória da depressão” propõe que este transtorno psiquiátrico é caracterizado pela ativação do sistema de resposta inflamatória, com o aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 β , IL-6, e fator de necrose tumoral (TNF- α) (CALABRESE et al., 1986; DANTZER, 2001; ABDEL-WAHAB e SALAMA, 2011). Estes fatores atuam sobre a via metabólica triptofano levando à redução da disponibilidade de serotonina, estabelecendo um elo importante entre os níveis de citocinas inflamatórias e monoaminas cerebrais (MÜLLER et al., 2009). Estudos têm demonstrado que as citocinas pró-inflamatórias induzem a atividade glial da enzima indolamina 2,3-dioxigenase (IDO) e, subsequentemente, o catabolismo do triptofano, reduzindo a síntese de serotonina e diminuindo a disponibilidade neuronal deste neurotransmissor (LEONARD e MAES, 2012; CATENA-DELL'OSSO et al., 2013).

Neste trabalho, foram necessárias adaptações ao modelo experimental empregado de acordo com a linhagem de camundongos utilizada. Por exemplo, foi preciso expor os camundongos CF1 a um estímulo estressante (sessão de natação forçada) antes da administração de LPS (em uma dose que é comumente utilizada em outros trabalhos da literatura) para a manifestação do comportamento de doente e do tipo deprimido nestes animais. Ainda, os animais C57Bl/6 J não puderam ser expostos duas vezes ao TST (nas 6 h e 24 h que seguem a injeção de LPS). O intuito da dupla exposição ao TST seria demonstrar que o desenvolvimento da depressão ocorre somente nas 24 h subsequentes ao estímulo inflamatório. De fato, existem limitações quanto ao uso da linhagem C57Bl/6 J no TST (MAYORGA e LUCKI, 2001), por isso a dupla exposição dos mesmos não foi possível. Estes resultados apontam para a necessidade do uso de outro teste comportamental para avaliar o desenvolvimento do comportamento do tipo deprimido neste modelo de depressão em animais C57Bl/6 J, como o teste de preferência pela solução de sacarose (WALKER et al., 2013).

Apesar das diferenças entre as linhagens de animais, o modelo foi validado para tanto para camundongos CF1 quanto para os C57Bl/6 J, e o efeito preventivo de VAL foi consistente para os animais das duas linhagens empregadas. De fato, existem diversos trabalhos na literatura apresentando principalmente os efeitos preventivos – e não terapêuticos – de antidepressivos convencionais e de moléculas/extratos com potencial antidepressivo (CHOI et al., 2012; PARK et al., 2012; LEE et al., 2013; MELLO et al., 2013; NEAMATI et al., 2014).

Sabe-se que a incidência de depressão é significativamente maior em pacientes que apresentam um quadro inflamatório. Já foi demonstrado que pacientes com artrite reumatoide, câncer, problemas cardiovasculares ou asma são mais suscetíveis ao desenvolvimento de depressão que indivíduos saudáveis (CAPURON et al.; 2004; LESPERANCE e FRASURE-SMITH, 2007; WOLFE e MICHAUD, 2009; XI et al., 2012; LABOR et al.; 2012). Assim, considerando os resultados do presente trabalho, o uso de VAL ou de outras espécies do gênero

Valeriana nestes pacientes visando à prevenção da ocorrência de depressão é uma perspectiva que merece ser estudada.

A administração de VAL e IMI preveniu o aumento na expressão cortical de IL-1 β e de TNF- α em camundongos CF1, o que está em consonância com o estudo realizado por MELLO e colaboradores (2013), que demonstram que a administração de IMI previne o desenvolvimento do comportamento de doente e do tipo deprimido induzido por LPS em camundongos e reduz os níveis destas citocinas no hipocampo e CPF dos animais. Ainda, OHGI e colaboradores (2013) demonstraram que fluoxetina e paroxetina (antidepressivos inibidores seletivos da recaptação de serotonina) previnem o aumento de TNF- α no soro e CPF de camundongos causado pela injeção de LPS. Estes trabalhos também estão de acordo com estudos *in vitro* que demonstram que antidepressivos clássicos como IMI e DESI depletam os níveis de mRNA e da proteína TNF α em neurônios de ratos localizados em regiões cerebrais relacionadas à regulação do humor (NICKOLA et al., 2001). O efeito de VAL não foi superior ao de IMI neste modelo animal de depressão; porém, os resultados da presente tese apontam pela primeira vez para o potencial anti-inflamatório destas moléculas, abrindo uma nova abordagem de estudo da ação farmacológica das mesmas.

A inflamação periférica causou uma redução na amplitude das sEPSC-AMPA no CPF de camundongos C57BL/6 J, o que possivelmente está associado ao prejuízo observado na LTP-NMDA no CPF dos animais, tendo em vista que a LTP-NMDA é relacionada à atividade de receptores AMPA que são inseridos na superfície do neurônio pós-sináptico (CITRI e MALENKA, 2008; LÜSCHER e MALENKA, 2012). A administração de VAL 1 h antes da injeção de LPS aos camundongos preveniu este dano, possivelmente por atuar sobre as sEPSC-AMPA, normalizando-as. VAL não teve efeitos *per se* sobre as sEPSC-AMPA no CPF dos animais, o que sugere que seus efeitos protetores sobre a plasticidade e transmissão sináptica no CPF seja um efeito indireto, que talvez esteja relacionado à sua capacidade em prevenir o aumento da expressão cortical de TNF- α e IL-1 β . Todavia, a expressão de citocinas pró-inflamatórias foi avaliada somente no córtex

de animais CF1, e não nos animais C56Bl/6 J, portanto não é possível avançar nesta discussão. ZHANG e colaboradores (2009) demonstraram que sinapses associadas a receptores AMPA são enriquecidas em enzimas Na^+/K^+ -ATPase, e que estas enzimas estão diretamente relacionadas à expressão de receptores AMPA na superfície neuronal atuando, dessa forma, sobre a plasticidade e força sináptica. Assim, o efeito de VAL sobre as sEPSC-AMPA pode estar associado à sua ação sobre a enzima Na^+/K^+ -ATPase cortical. Neste trabalho, a atividade da enzima não foi avaliada 24 h após a administração aguda de VAL, porém, os resultados deste trabalho sugerem que os mecanismos regulatórios de longa duração, que levam de horas a dias para ocorrerem (THERIEN e BLOSTEIN, 2000) podem estar envolvidos no efeito de VAL, o que não descarta um possível efeito sobre a enzima neste intervalo de tempo.

A sessão natação + LPS foi seguida por uma redução robusta na expressão cortical de BDNF em camundongos CF1, o que está de acordo com outros trabalhos da literatura (VIANA et al., 2010; MELLO et al., 2013; GUO et al., 2014). Além disso, a redução na expressão desta neurotrofina não foi prevenida nem restaurada por VAL nem por IMI, as quais também não apresentaram nenhum efeito *per se* sobre a expressão de BDNF. Embora os demais resultados apresentados na presente tese demonstrem que a administração de K252a aos animais previne parcialmente o efeito anti-imobilidade de VAL no FST (indicando que a via de sinalização mediada por BDNF participa, pelo menos em parte, do efeito do tipo antidepressivo agudo de VAL), é importante salientar que VAL agiu significativamente sobre a metilação global do DNA e causou uma tendência a níveis aumentados de BDNF e do seu principal receptor somente no hipocampo (e não no córtex) dos animais. Tendo em vista que a expressão do gene que codifica para o BDNF é controlada por mecanismos epigenéticos (WEAVER et al., 2004; KELLER et al., 2010; UCHIDA et al., 2011), a falta de efeito de VAL sobre a expressão cortical de BDNF encontrada neste trabalho está de acordo com a hipótese de que a mesma não atua sobre a metilação global do DNA no córtex dos animais. Assim, o efeito de VAL no córtex dos animais pode ser exercido

preferencialmente por intermédio de vias inflamatórias, e não através da interferência com o BDNF.

De fato, esta ação hipocampal seletiva de VAL sobre a expressão de BDNF representa um resultado interessante, tendo em vista que a ação desta neurotrofina pode ser diferente, ou até oposta, em outros circuitos neurais (BERTON e NESTLER, 2006). É sabido que a promoção dos efeitos do BDNF no hipocampo tem efeitos antidepressivos (BERTON e NESTLER, 2006), contudo a infusão desta neurotrofina na área tegmental ventral – núcleo accumbens causa efeitos pró-depressivos no FST em ratos, enquanto o bloqueio das funções do BDNF nesta mesma área (em camundongos *knockout* para BDNF na área tegmental ventral – núcleo accumbens) causa efeito do tipo antidepressivo e a exposição de camundongos ao estresse crônico variado causa aumento dos níveis de BDNF nesta região cerebral (EISCH et al., 2003; BERTON et al., 2006). Dessa forma, moléculas que atuam promovendo aumento de BDNF sem alguma seletividade nas regiões cerebrais podem acabar produzindo efeitos opostos ou que competem entre si em diferentes estruturas cerebrais (BERTON e NESTLER, 2006). Os achados da presente tese sugerem que este parece não ser o caso de VAL.

Os resultados comportamentais obtidos para a administração de VAL 5 h após o estímulo inflamatório são dissonantes para as duas linhagens de animais testadas: VAL é ativa sobre as alterações comportamentais e neuroquímicas em animais CF1 e não teve efeitos quando administrada seguindo o mesmo protocolo em animais C57Bl/6 J. As diferenças biológicas entre as linhagens de animais empregadas e entre os modelos experimentais aplicados para os diferentes tipos de animais podem estar envolvidas na diferença de resultados encontrada. Assim, os achados relativos aos efeitos de VAL na linhagem CF1 podem ser consequência da ação destas moléculas sobre o estresse da natação forçada à qual os animais CF1 foram submetidos, e não sobre os efeitos da injeção de LPS. Além disso, em animais C57Bl/6 J, é possível que VAL não atue sobre a enzima IDO. Assim, a investigação do efeito de VAL sobre a enzima IDO cerebral naqueles animais é uma perspectiva do presente estudo.

Ainda que VAL tenha apresentado resultados que apontam para o potencial antidepressivo destas moléculas nos modelos animais utilizados até o momento, os efeitos apresentados pelas mesmas não foi, de maneira geral, superior aos dos controles positivos empregados. Assim, é preciso avaliar o efeito de VAL outros modelos animais de depressão como, por exemplo, o desamparo aprendido, que apresenta melhor validade preditiva (resposta aos mesmos tratamentos que são eficazes na doença) (VOLLMAYR e HENN, 2001; YAN et al., 2010) e a submissão ao estresse crônico moderado, que dentre os modelos de depressão destaca-se como o que apresenta melhor validade de face (semelhança com o fenômeno e sua patofisiologia em humanos), constructo (etiologia comparável) e preditiva (WILLNER et al., 2005), com posterior avaliação da anedonia dos animais no teste de preferência pela solução de sacarose. Além disso, a avaliação dos efeitos de VAL em outras espécies de animais (ratos, por exemplo) também se faz necessária.

De maneira geral, os resultados relativos ao mecanismo de ação antidepressiva de VAL que foram obtidos até o momento estão esquematizados na Figura 1, apresentada abaixo:

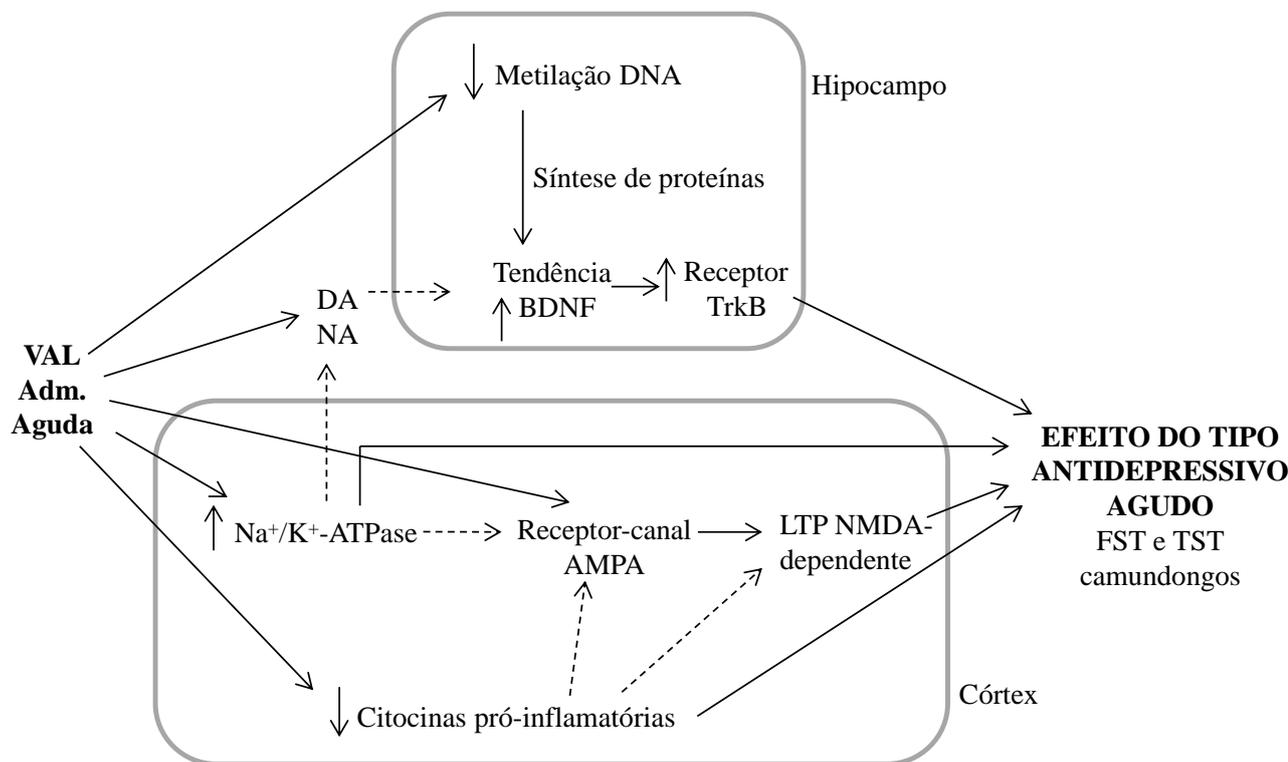


Figura 1. Diagrama do efeito do tipo antidepressivo agudo de VAL nos ensaios *in vivo* realizados até o momento. DA: neurotransmissão dopaminérgica; NA: neurotransmissão noradrenérgica; BDNF: fator neurotrófico derivado do cérebro; LTP NMDA-dependente: potenciação de longa duração dependente da ativação de receptores glutamatergicos ionotrópicos do tipo NMDA. Flechas pontilhadas indicam um possível efeito.

Resumidamente, VAL atua sobre a neurotransmissão dopaminérgica e noradrenérgica, o que pode (entre outros efeitos) levar a um aumento na expressão central de BDNF, conforme a ação dos antidepressivos que atuam sobre a neurotransmissão monoaminérgica (CASTRÉN e RANTAMAKI, 2010), ativando as vias de sinalização mediadas por este fator neurotrófico. A redução da metilação global do DNA no hipocampo causada por VAL ativa a síntese de proteínas (levando a uma tendência no aumento da síntese de BDNF nesta estrutura cerebral), causando uma rápida *up regulation* hipocampal do receptor TrkB, ativado por este fator neurotrófico. VAL previne o aumento na expressão cortical de citocinas pró-inflamatórias após a injeção de LPS. É possível que esta ação restaure os prejuízos na LTP-NMDA dependente através da normalização da atividade de receptores-canal AMPA (KHAIROVA et al., 2009). VAL aumenta a atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase cortical, o que favorece a manutenção da

excitabilidade neuronal e transmissão sináptica, e pode ter efeitos sobre a neurotransmissão monoaminérgica (GU et al., 1994; PIFL et al., 1997). Ainda, os efeitos sobre a enzima podem estar relacionados à normalização da atividade de receptores-canal AMPA (ZHANG et al., 2009) e, conseqüentemente, da LTP NMDA-dependente cortical. A ativação das diferentes vias e ação sobre estes alvos biológicos citados culmina na manifestação do efeito do tipo antidepressivo observado no FST e TST em camundongos.

Esta proposta de mecanismo de ação após a administração aguda de VAL deve ser confirmada em experimentos envolvendo a administração crônica.

CONCLUSÕES

A partir dos resultados deste trabalho, conclui-se que o mecanismo antidepressivo de valepotriatos diênicos obtidos de *V. glechomifolia* é mediado pelos sistemas neurotransmissores dopaminérgico e noradrenérgico (possivelmente sem atuação direta sobre os sítios de ligação das monoaminas nos transportadores neuronais destes neurotransmissores), por redução na metilação global do DNA hipocampal e aumento na atividade cortical da enzima Na^+/K^+ -ATPase, o que representa resultados inéditos para a ação destas moléculas. Ainda, os valepotriatos apresentam efeitos positivos em um modelo animal que relaciona a contribuição do sistema imune para o desenvolvimento da depressão, com ação mediada pela redução cortical da expressão de citocinas pró-inflamatórias, e previnem o prejuízo causado na LTP-NMDA dependente e transmissão sináptica do córtex pré-frontal causado pela inflamação. Este é um enfoque totalmente novo para a ação farmacológica de valepotriatos diênicos, os quais podem representar um novo padrão químico de moléculas com atividade antidepressiva. Ainda, o conjunto de dados deste trabalho dá suporte às hipóteses que postulam o envolvimento de diferentes alvos biológicos na neurobiologia da depressão, o que pode contribuir para uma melhor compreensão sobre a etiologia e fisiopatologia deste transtorno de humor.

REFERÊNCIAS

ABDEL-WAHAB, B.A.; SALAMA, R.H. Venlafaxine protects against stress-induced oxidative DNA damage in hippocampus during antidepressant testing in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 100, pp. 59–65, 2011.

ANDREATINI, R.; LEITE, J.R. Effect of valepotriates on the behavior of rats in the elevated plus-maze during diazepam withdrawal. **European Journal Pharmacology**, v. 1(260), pp. 233-235, 1994.

ANDREATINI, R.; SARTORI, V. A.; SEABRA, M. L.; LEITE, J. R. Effect of valepotriates (valerian extract) in generalized anxiety disorder: a randomized placebo-controlled pilot study. **Phytoterapy Research**, v. 165(7), pp. 650-654, 2002.

ASCHER, J.A.; COLE, J.O.; COLIN, J.N.; FEIGHNER, J.P.; FERRIS, R.M.; FIBIGER, H.C.; GOLDEN, R.N.; MARTIN, P.; POTTER, W.Z.; RICHELSON, E. Bupropion: a review of its mechanism of antidepressant activity. **Journal of Clinical Psychiatry**, v. 56(9), pp. 395-401, 1995.

AZUMA, K.K., HENSLEY, C.B.; PUTNAM, D.S.; MCDONOUGH, A.A. Hypokalemia decreases Na(+)-K(+)-ATPase alpha 2- but not alpha 1-isoform abundance in heart, muscle, and brain. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 26(5 Pt 1), pp. C958-C964, 1991.

BERTON, O.; MCCLUNG, C.A.; DILEONE, R.J.; KRISHNAN, V.; RENTHAL, W.; RUSSO, S.J.; GRAHAM, D.; TSANKOVA, N.M.; BOLANOS, C.A.; RIOS, M.; MONTEGGIA, L.M.; SELF, D.W.; NESTLER, E.J. Essential role of BDNF in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress. **Science**, v. 311(5762), pp. 864-868, 2006.

BERTON, O.; NESTLER, E.J. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 7(2), pp. 137-151, 2006.

BETTERO, G.M.; SALLES, L.; ROSÁRIO, R.M.F.; VON POSER, G.L.; RATES, S.M.K.; NOËL, F.; QUINTAS, L.M.E. In vitro effect of valepotriates isolated from *Valeriana glechomifolia* on rat P-type ATPases. **Planta Medica**, v. 77(15), pp. 1702-1706, 2011.

BLUMENTHAL, M. The Complete German Commission E Monographs: **Therapeutic Guide to Herbal Medicines**. Texas: American Botanical Council, 2000.

BORSINI, O. E. Revisión de las Valeraniaceas de Brasil. **Lilloa**, v. 31, pp. 149-170, 1962.

BOUNTHANH, C.; BERGMANN, C.; BECK, J. P.; HAAG-BERRUER, M.; ANTON, R. Valepotriates, a new class of cytotoxic and antitumor agents. **Planta Medica**, v. 41, pp. 21-28, 1981.

BRAUN, R.; DITTMAR, W.; HÜBNER, G.E.; MAURER, H.R. Influence of valtrate/isovaltrate on the hematopoiesis and metabolic liver activity in mice *in vivo*. **Planta Medica**, v. 50(1), pp. 1-4, 1984.

CALABRESE, J.R.; SKWERER, R.G.; BARNA, B.; GULLEDGE, A.D.; VALENZUELA, R.; BUTKUS, A.; SUBICHIN, S.; KRUPP, N.E. Depression, immunocompetence, and prostaglandins of the E series. **Psychiatry Research**, v. 17, pp. 41-47, 1986.

CAPURON, L.; RAVAUD, A.; MILLER, A.H.; DANTZER, R. Baseline mood and psychosocial characteristics of patients developing depressive symptoms during interleukin-2 and/or interferon-alpha cancer therapy. **Brain Behavior and Immunity**, v. 18(3), pp. 205-213, 2004.

CASTRÉN, E.; RANTAMAKI, T. The role of BDNF and its receptors in depression and antidepressant drug action: Reactivation of developmental plasticity. **Developmental Neurobiology**, v. 70, pp. 289-297, 2010.

CASTRÉN, E.; VOIKAR, V.; RANTAMAKI, T. Role of neurotrophic factors in depression. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 7(1), pp. 18-21, 2007.

CATENA-DELL'OSSO, M.; ROTELLA, F.; DELL'OSSO, A.; FAGIOLINI, A.; MARAZZITI, D. Inflammation, serotonin and major depression. **Current Drug Targets**, v. 14(5), pp. 571–577, 2013.

CAVADAS, C.; ARAUJO, I.; COTRIM, M.D.; AMARAL, T.; CUNHA, A.P.; MACEDO, T.; RIBEIRO, C.F. In vitro study on the interaction of *Valeriana officinalis* L. extracts and their amino acids on GABAA receptor in rat brain. **Arzneimittelforschung**, v. 45, pp. 753-755, 1995.

CHIAPPEDI, M.; BEJOR, M. Herbals and natural dietary supplements in psychiatric practice. **Recent Patents in CNS Drug Discovery**, v. 5(2), pp. 164-171, 2010.

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- κ B signaling pathway. **Neurochemistry International**, v. 60(1), pp. 68–77, 2012.

CITRI, A.; MALENKA, R.C. Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms. **Neuropsychopharmacology**, v. 33(1), pp. 18-41, 2008.

CREMA, L.; SCHLABITZ, M.; TAGLIARI, B.; CUNHA, A.; SIMÃO, F.; KROLOW, R.; PETTENUZZO, L.; SALBEGO, C.; VENDITE, D.; WYSE,

A.T.; DALMAZ, C. Na⁺, K⁺ATPase activity is reduced in amygdala of rats with chronic stress-induced anxiety-like behavior. **Neurochemical Research**, v. 35(11), pp. 1787-1795, 2010.

DANTZER, R. Cytokine-induced sickness behavior: where do we stand? **Brain Behavior and Immunology**, v. 15, pp. 7–24, 2001.

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(3), pp. 426-436, 2011.

DANTZER, R. Depression and Inflammation: An Intricate Relationship. **Biological Psychiatry**, v. 71(1), pp. 4–5, 2012.

DIETZ, B.M.; MAHADY, G.B.; PAULI, G. F.; FARNSWORTH, N.R. Valerian extract and valerenic acid are partial agonists of the 5-HT_{5a} receptor in vitro. **Molecular Brain Research**, v. 138, pp. 191-197, 2005.

DOBRETSOV, M.; STIMERS, J.R. Neuronal function and alpha3 isoform of the Na⁺/K⁺-ATPase. **Frontiers in Bioscience**, v. 10, pp. 2373-2396, 2005.

DOWLATI, Y.; HERRMANN, N.; SWARDFAGER, W.; LIU, H.; SHAM, L.; REIM, E.K.; LANCTOT, K.L. A meta-analysis of cytokines in major depression. **Biological Psychiatry**, v. 67(5), pp. 446-457, 2010.

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

EISCH, A.J.; BOLAÑOS, C.A.; DE WIT, J.; SIMONAK, R.D.; PUDIAK, C.M.; BARROT, M.; VERHAAGEN, J.; NESTLER, E.J. Brain-derived neurotrophic factor in the ventral midbrain-nucleus accumbens pathway: a role in depression. **Biological Psychiatry**, v. 54(10), pp. 994-1005, 2003.

EL-MALLAKH, R.S.; WYATT, R.J. The Na⁺K⁺ ATPase hypothesis for bipolar illness. **Biological Psychiatry**, v. 37, pp. 235-244, 1995.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY. Committee on Herbal Medicinal Products. **Community Herbal Monograph on *Valeriana officinalis* L. radix**. London, Doc. Ref. EMEA/HMPC/340719/2005, 2006.

FAUSTINO, T.T.; ALMEIDA, R.B.; ANDREATINI, R. Medicinal plants for the treatment of generalized anxiety disorder: a review of controlled clinical studies. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 32(4), pp. 429-436, 2010.

FENG, J.; ZHOU, Y.; CAMPBELL, S.L.; LE, T.; LI, E.; SWEATT, J.D.; SILVA, A.J.; FAN, G. Dnmt1 and Dnmt3a maintain DNA methylation and regulate synaptic function in adult forebrain neurons. **Nature Neuroscience**, v. 13, pp. 423-430, 2010.

FERNÁNDEZ-SAN-MARTÍN, M.I.; MASA-FONT, R.; PALACIOS-SOLER, L.; SANCHO-GÓMEZ, P.; CALBÓ-CALDENTEY, C.; FLORES-MATEO, G. Effectiveness of Valerian on insomnia: a meta-analysis of randomized placebo-controlled trials. **Sleep Medicine**, v. 11(6), pp. 505-511, 2010.

FERRIS, R.M.; COOPER, B.R. Mechanism of antidepressant activity of bupropion. **Journal of Clinical Psychiatry Monograph Series**, v. 11(1), pp. 2-14, 1993.

FUGG-BERMAN, A.; COTT, J. M. Dietary supplements and natural products as psychotherapeutic agents. **Psychosomatic Medicine**, v. 61, pp. 712-728, 1999.

GAMARO, G. D.; STRECK, E. L.; MATTÉ, C.; PREDIGER, M. E.; WYSE, A. T. S.; DALMAZ, C. Reduction of hippocampal Na⁺,K⁺-ATPase activity in rats subjected to an experimental model of depression. **Neurochemical Research**, v. 28, pp. 1339 – 1344, 2003.

GESSNER, P.K. Isobolographic analysis of interactions: an update on applications and utility. **Toxicology**, v. 105, pp. 161- 179, 1995.

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

GOLDSTEIN, I.; LERER, E.; LAIBA, E.; MALLET, J.; MUJAHEED, M.; LAURENT, C.; ROSEN, H.; EBSTEIN, R.P.; LICHTSTEIN, D. Association between sodium- and potassium-activated adenosine triphosphatase alpha isoforms and bipolar disorders. **Biological Psychiatry**, v. 65, pp. 985–991, 2009.

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

GOTTLIEB, O.R.; KAPLAN, M.A.C.; BORIN, M.R. **Biodiversidade. Um enfoque químico-biológico.** Editora da UFRJ, Rio de Janeiro, 1996.

GU, H.; WALL, S.C.; RUDNICK, G. Stable expression of biogenic amine transporters reveals differences in inhibitors sensitivity, kinetics and ion dependence. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, pp. 7124-7130, 1994.

GUO, J.; LIN, P.; ZHAO, X.; ZHANG, J.; WEI, X.; WANG, Q.; WANG, C. Etazolate abrogates the lipopolysaccharide (LPS)-induced downregulation of the cAMP/pCREB/BDNF signaling, neuroinflammatory response and depressive-like behavior in mice. **Neuroscience**, v. 263, pp. 1-14, 2014.

HANNESTAD, J.; DELLAGIOIA, N.; BLOCH, M. The effect of antidepressant medication treatment on serum levels of inflammatory cytokines: a meta-analysis. **Neuropsychopharmacology**, v. 36(12), pp. 2452-2459, 2011.

HATTESOHL, M.; FEISTEL, B.; SIEVERS, H.; LEHNFELD, R.; HEGGER, M.; WINTERHOFF, H. Extracts of *Valeriana officinalis* L. s.l. show anxiolytic and antidepressant effects but neither sedative nor myorelaxant properties. **Phytomedicine**, v. 15, pp. 2-15, 2008.

HERRERA-ARELLANO, A.; LUNA-VILLEGAS, G.; CUEVAS-URIOSTEGUI, M.L.; ALVAREZ, L.; VARGAS-PINEDA, G.; ZAMILPA-ALVAREZ, A.; TORTORIELLO, J. Polysomnographic evaluation of the hypnotic effect of *Valeriana edulis* standardized extract in patients suffering from insomnia. **Planta Medica**, v. 67, pp. 695-699, 2001.

HOBBS, C. Valerian. **Herbal Gram**, v.21, pp.19-34, 1989.

HOLZMANN, I.; FILHO, V.C.; MORA, T.C.; CÁCERES, A., MARTÍNEZ, J.V.; CRUZ, S.M.; SOUZA, M.M. Evaluation of behavioral and pharmacological effects of hydroalcoholic extract of *Valeriana prionophylla* Standl. from Guatemala. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, pp. 1-9, 2011.

HOUGHTON, P.J. The biological activity of valerian and related plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 22, pp. 121-142, 1988.

HOUGHTON, P.J. **Valerian, The Genus *Valeriana***. Harwood Academic Publishers, Londres, 1997.

HOUGHTON, P.J. The scientific basis for the reputed activity of Valerian. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 51, pp. 505-512, 1999.

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

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

KELLER, S.; SARCHIAPONE, M.; ZARRILLI, F.; VIDETIC, A.; FERRARO, A.; CARLI, V.; SACCHETTI, S.; LEMBO, F.; ANGIOLILLO, A.; JOVANOVIC, N.; PISANTI, F.; TOMAIUOLO, R.; MONTICELLI, A.; BALAZIC, J.; ROY, A.; MARUSIC, A.; COCOZZA, S.; FUSCO, A.; BRUNI, C.B.; CASTALDO, G.; CHIARIOTTI, L. Increased BDNF promoter methylation in the Wernicke area of suicide subjects. **Archives of General Psychiatry**, v. 67, pp. 258-267, 2010.

KHAIROVA, R.A.; MACHADO-VIEIRA, R.; DU, J.; MANJI, H.K. A potential role for pro-inflammatory cytokines in regulating synaptic plasticity in major

depressive disorder. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 12(4), pp. 561-578, 2009.

KHUDA, F.; IQBAL, Z.; KHAN, A.; ZAKIULLAH; NASIR, F.; SHAH, Y. Anti-inflammatory activity of the topical preparation of *Valeriana wallichii* and *Achyranthes aspera* leaves. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 26(3), pp. 451-454, 2013.

KRISHNAN, V.; NESTLER, E.J. The molecular neurobiology of depression. **Nature**, v. 455, pp. 894-902, 2008.

KRISTENSEN, A.S.; ANDERSEN, J.; JORGENSEN, T.N.; SORENSEN, L.; ERIKSEN, J.; LOLAND, C.J.; STROMGAARD, K.; GETHER, U. SLC6 neurotransmitter transporters: structure, function, and regulation. **Pharmacological Reviews**, v. 63(3), pp. 585-640, 2011.

KRYSTAL, A. D.; RESSLER, I. The use of valerian in neuropsychiatry. **Central Nervous System Spectrums**, v. 6, pp. 841-847, 2001.

LABOR, S.; LABOR, M.; JURIC, I.; VUKSIC, Z. The prevalence and pulmonary consequences of anxiety and depressive disorders in patients with asthma. **Collegium Antropologicum**, v. 36, pp. 473-481, 2012.

LAPLANT, Q.; VIALOU, V.; COVINGTON, H.E.; DUMITRIU, D.; FENG, J.; WARREN, B.L.; MAZE, I.; DIETZ, D.M.; WATTS, E.L.; IÑIGUEZ, S.D.; KOO, J.W.; MOUZON, E.; RENTHAL, W.; HOLLIS, F.; WANG, H.; NOONAN, M.A.; REN, Y.; EISCH, A.J.; BOLAÑOS, C.A.; KABBAJ, M.; XIAO, G.; NEVE, R.L.; HURD, Y.L.; OOSTING, R.S.; FAN, G.; MORRISON, J.H.; NESTLER, E.J. Dnmt3a regulates emotional behavior and spine plasticity in the nucleus accumbens. **Nature Neuroscience**, v. 13, pp. 1137-1143, 2010.

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.

LEONARD, B.; MAES, M. Mechanistic explanations how cellmediated immune activation, inflammation and oxidative and nitrosative stress pathways and their sequels and concomitants play a role in the pathophysiology of unipolar depression. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 36(2), pp. 764–785, 2012.

LESPERANCE, F.; FRASURE-SMITH, N. Depression and heart disease. **Cleveland Clinic Journal of Medicine**, v. 74 (Suppl. 1), pp. S63-S66, 2007.

LIN, S.; SHEN, Y-H; LI, H-L.; YANG, X-W.; CHEN, T.; LU, L-H.; HUANG, Z-S; LIU, R-H; XU, X-K.; ZHANG, W-D; WANG,H. Acylated iridoids with cytotoxicity from *Valeriana jatamansi*. **Journal Natural Products**, v. 72, pp. 650-655, 2009.

LIU, X.G.; GAO, P.Y.; WANG, G.S.; SONG, S.J.; LI, L.Z.; LI, X.; YAO, X.S.; ZHANG, Z.X. *In vivo* antidepressant activity of sesquiterpenes from the roots of *Valeriana fauriei* Briq. **Fitoterapia**, v. 83(3), pp. 599-603, 2012.

LIU, Z.; LIU, S.; XIE, Z.; PAVLOVICZ, R.E.; WU, J.; CHEN, P.; AIMIUWU, J.; PANG, J.; BHASIN, D.; NEVIANI, P.; FUCHS, J.R.; PLASS, C.; LI, P.K.; LI, C.; HUANG, T.H.; WU, L.C.; RUSH, L.; WANG, H.; PERROTTI, D.; MARCUCCI, G.; CHAN, K.K. Modulation of DNA methylation by a sesquiterpene lactone parthenolide. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 329(2), pp. 505-514, 2009.

LÜSCHER, C.; MALENKA, R.C. NMDA receptor-dependent long-term potentiation and long-term depression (LTP/LTD). **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 4(6), pp. 1-15, 2012.

MAES, M. The cytokine hypothesis of depression: inflammation, oxidative & nitrosative stress (IO&NS) and leaky gut as new targets for adjunctive treatments in depression. **Neuroendocrinology Letters**, v. 29(3), pp. 287-291, 2008.

MAURMANN, N.; REOLON, G.K.; RECH, S.B.; FETT-NETO, A.G.; ROESLER, R. A valepotriate fraction of *Valeriana glechomifolia* shows sedative and anxiolytic properties and impairs recognition but not aversive memory in mice. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, pp. 1-7, 2011.

MAYORGA, A.J.; LUCKI, I. Limitations on the use of the C57BL/6 mouse in the tail suspension test. **Psychopharmacology**, v. 155(1), pp. 110-112, 2001.

MELLO, B.S.; MONTE, A.S.; MCINTYRE, R.S.; SOCZYNSKA, J.K.; CUSTÓDIO, C.S.; CORDEIRO, R.C.; CHAVES, J.H.; VASCONCELOS, S.M.; NOBRE, H.V.; FLORENÇO DE SOUSA, F.C.; 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(10), pp. 1521-1529, 2013.

MENNINI, T.; BERNASCONI, P.; BOMBARDELLI, E.; MORAZZONI, P. *In vitro* study on the interaction of extracts and pure compounds from *Valeriana officinalis* roots with GABA, benzodiazepine and barbiturate receptors in rat brain. **Fitoterapia**, v. 64(4), pp. 291-300, 1993.

MÖLLER, H.J.; BITTER, I.; BOBES, J.; FONTOULAKIS, K.; HOSCHL, C.; KASPER, S. Position statement of the European Psychiatric Association (EPA) on

the value of antidepressants in the treatment of unipolar depression. **European Psychiatry**, v. 27, pp. 114-128, 2012.

MÜLLER, N.; MYINT, A.M.; SCHWARZ, M.J. The impact of neuroimmune dysregulation on neuroprotection and neurotoxicity in psychiatric disorders: relation to drug treatment. **Dialogues in Clinical NeuroSciences**, v. 11, pp. 319 - 332, 2009.

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 Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 36(1), pp. 101-109, 2012a.

MÜLLER, L.G.; SALLES L.A.; SAKAMOTO, S.; STEIN, A.C.; CARGNIN, S.T.; CASSEL, E.; VARGAS, R.F.; RATES, S.M.; VON POSER, G.L. Effect of storage time and conditions on the diene valepotriates content of the extract of *Valeriana glechomifolia* obtained by supercritical carbon dioxide. **Phytochemical Analysis**, v. 23(3), pp. 222-227, 2012b.

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

NEILL, M.; DIXON, P.S. Effects of a preincisional 14-day course of valerian on natural killer cell activity in Sprague-Dawley male rats undergoing abdominal surgery. **Holistic Nursing Practice**, v. 21(4), pp. 187-93, 2007.

NESTLER, E.J.; CARLEZON, W.A. The mesolimbic dopamine reward circuit in depression. **Biological Psychiatry**, v. 59, pp. 1151–1159, 2006.

NEWMAN, D.J. Natural Products as Leads to Potential Drugs: an old process or the new hope for drug discovery? **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51(3), pp. 2589–2599, 2008.

NICKOLA, T.J.; IGNATOWSKI, T.A.; REYNOLDS, J.L.; SPENGLER, R.N. Antidepressant drug-induced alterations in neuron-localized tumor necrosis factor- α mRNA and $\alpha(2)$ -adrenergic receptor sensitivity. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 297(2), pp. 680-687, 2001.

NUNES, A.; SOUSA, M. Use of Valerian in anxiety and sleep disorders: What is the best evidence? **Acta Médica Portuguesa**, v. 24, pp. 961-966, 2011.

OECD SERIES ON TESTING AND ASSESSMENT. **Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing**, N.24, 2001.

OHGI, Y.; FUTAMURA, T.; KIKUCHI, T.; HASHIMOTO, K. Effects of antidepressants on alternations in serum cytokines and depressive-like behavior in mice after lipopolysaccharide administration. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 103(4), pp. 853-859, 2013.

OLENSEN, J.; LEKANDER, I.; SOBOCKI, P. Resource allocation to brain research in Denmark: an example for other European countries. **European Journal of Neurology**, v. 14(6), pp. 667-671, 2007.

ONISHCHENKO, N.; KARPOVA, N.; SABRI, F.; CASTRÉN, E.; CECCATELLI, S. Long-lasting depression-like behavior and epigenetic changes of BDNF gene expression induced by perinatal exposure to methylmercury. **Journal of Neurochemistry**, v. 106, pp. 1378-1387, 2008.

ORTIZ, J. G.; NIEVES-NATAL, J.; CHAVEZ, P. Effects of *Valeriana officinalis* extracts on [3H]Flunitrazepam binding, synaptosomal [3H]GABA uptake, and hippocampal [3H]GABA release. **Neurochemical Research**, v. 24, pp. 1373-1378, 2004.

OSTADAL, P.; ELMOSELHI, A.B.; ZDOBNICKA, I.; LUKAS, A.; ELIMBAN, V.; DHALLA, N.S. Role of oxidative stress in ischemia–reperfusion-induced changes in Na⁺,K⁺-ATPase isoform expression in rat heart. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 6(5), pp. 914-923, 2004.

PARK, S.M.; CHOI, M.S.; SOHN, N.W.; SHIN, J.W. Ginsenoside Rg3 attenuates microglia activation following systemic lipopolysaccharide treatment in mice. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 35(9), pp. 1546-1552, 2012.

PATOCKA, J.; JAKL, J. Biomedically relevant chemical constituents of *Valeriana officinalis*. **Journal of Applied Biomedicine**, v. 8, pp. 11-18, 2010.

PIFL, A.; DROBNY, H.; REITHER, H.; SINGER, E.A. Introduction by low Na⁺ or Cl⁻ of cocaine sensitive carrier-mediate efflux of amines from cells transfected with cloned human catecholamine transporters. **British Journal of Pharmacology**, v. 121, pp. 205-212, 1997.

SAH, S.P.; MATHELA, C.S.; CHOPRA, K. Antidepressant effect of *Valeriana wallichii* patchouli alcohol chemotype in mice: behavioural and biochemical evidence. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 135(1), pp. 197-200, 2011.

SAHAY, A.; HEN, R. Adult hippocampal neurogenesis in depression. **Nature Neuroscience**, v. 10, pp. 1110 – 1115, 2007.

SALES, A.J.; BIOJONE, C.; TERCETI, M.S.; GUIMARÃES, F.S.; GOMES, M.V.; JOCA, S.R. Antidepressant-like effect induced by systemic and

intrahippocampal administration of DNA methylation inhibitors. **British Journal of Pharmacology**, v. 164, pp. 1711-1721, 2011.

SALLES, L. A.; SILVA, A. L.; RECH, S. B.; ZANATTA, N.; von POSER, G. L. Constituents of *Valeriana glechomifolia* Meyer. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 28, pp. 907-910, 2000.

SALLES, L. A. **Obtenção de frações de valepotriatos através de fluido supercrítico e triagem psicofarmacológica de *Valeriana glechomifolia* Meyer.** Tese de doutorado – Curso de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

SANACORA, G.; ZARATE, C.A.; KRYSTAL, J.H.; MANJI, H.K. Targeting the glutamatergic system to develop novel, improved therapeutics for mood disorders. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 7, pp. 426–437, 2008.

SARRIS, J.; MCINTYRE, E.; CAMFIELD, D.A. Plant-based medicines for anxiety disorders, part 2: a review of clinical studies with supporting preclinical evidence. **CNS Drugs**, v. 27(4), pp. 301-319, 2013.

SILVA, A. L.; RECH, S. B.; von POSER, G. L. Quantitative determination of valepotriates from valeriana native to south Brazil. **Planta Medica**, v. 68, pp. 570-572, 2002.

SOBRAL, M. Flora ilustrada do Rio Grande do Sul/25: Valerianaceae. **Boletim do Instituto de Biociências**, v. 58, pp. 1-61, 1999a.

SOBRAL, M. *Valeriana tajuvensis* (Valerianaceae). A new species from southern Brazil. **Novon**, v. 9(1), pp. 114-117, 1999b.

SOBRAL, M. *Valeriana eupatoria* (Valerianaceae). A new species from Rio Grande do Sul. **Novon**, v. 10(2), pp. 149-152, 1999c.

STAHL, S.M.; PRADKO, J.F.; HAIGHT, B.R.; MODELL, J.G.; ROCKETT, C.B.; LEARNED-COUGHLINE, S. A review of the neuropharmacology of bupropion, a dual norepinephrine and dopamine reuptake inhibitor. **Primary Care Companion to the Journal of Clinical Psychiatry**, v. 6(4), pp. 159–166, 2004.

STAHL, S.M. **Essential Psychopharmacology – Neuroscientific Basis and Practical Applications**, third ed. Cambridge University Press, New York, 2008.

SUBHAN, F.; KARIM, N.; GILANI, A.H.; SEWELL, R.D.E. Terpenoid content of *Valeriana wallichii* extracts and antidepressant-like response profiles. **Phytotherapy Research**, v. 24, pp. 686–691, 2010.

SUETAKE, L.; SHI, L.; WATANABE, D.; NAKAMURA, M.; TAJIMA, S. Proliferation stage-dependent expression of DNA methyltransferase (Dnmt1) in mouse small intestine. **Cell Structure and Function**, v. 26(2), pp. 79-86, 2001.

TALLARIDA R.J.; STONE D.J.; RAFFA, R.B. Efficient designs for studying synergistic drug combinations. **Life Sciences**, v. 61, pp. PL417–PL425, 1997.

TALLARIDA, R.J. **Drug synergism and dose-effect data analysis**. Florida, USA: CHAPMAN & HALL/CRC, 2000.

TALLARIDA, R.J. Drug synergism: its detection and applications. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 298(3), pp. 865-872, 2001.

TALLARIDA, R.J. An overview of drug combination analysis with isobolograms. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 319(1), pp. 1-7, 2006.

TALLARIDA, R.J. Interactions between drugs and occupied receptors. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 113, pp. 197-209, 2007.

TALLARIDA, R.J. Quantitative methods for assessing drug synergism. **Genes Cancer**, v. 2(11), pp. 1003-1008, 2011.

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

TOCHIGI, M.; IWAMOTO, K.; BUNDO, M.; SASAKI, T.; KATO, N.; KATO, T. Gene expression profiling of major depression and suicide in the prefrontal cortex of postmortem brains. **Neuroscience Research**, v. 60, pp. 184–191, 2008.

TORTAROLO, M. *In vitro* effects of epoxide-bearing valepotriates on mouse early hematopoietic progenitor cells and human T-lymphocytes. **Archives of Toxicology**, v. 51, pp. 37-42, 1982.

TUFIK, S.; FUJITA, K.; SEABRA, M. L. V.; LOBO, L. L. Effects of a prolonged administration of valepotriates in rats on the mothers and their offspring. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 41, pp. 39-44, 1994.

TSANKOVA, N.M.; BERTON, O.; RENTHAL, W.; KUMAR, A.; NEVE, R.L.; NESTLER, E.J. Sustained hippocampal chromatin regulation in a mouse model of depression and antidepressant action. **Nature Neuroscience**, v. 9, pp. 519-525, 2006.

TSANKOVA, N.; RENTHAL, W.; KUMAR, A.; NESTLER, E.J. Epigenetic regulation in psychiatric disorders. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 8, pp. 355-367, 2007.

UCHIDA, S.; HARA, K.; KOBAYASHI, A.; OTSUKI, K.; YAMAGATA, H.; HOBARA, T.; SUZUKI, T.; MIYATA, N.; WATANABE, Y. Epigenetic status of Gdnf in the ventral striatum determines susceptibility and adaptation to daily stressful events. **Neuron**, v. 69, pp. 359-372, 2011.

UHER, R.; MORS, O.; RIETSCHER, M.; RAJEWSKA-RAGER, A.; PETROVIC, A.; ZOBEL, A.; HENIGSBERG, N.; MENDLEWICZ, J.; AITCHISON, K.J.; FARMER, A.; MCGUFFIN, P. Early and delayed onset of response to antidepressants in individual trajectories of change during treatment of major depression: a secondary analysis of data from the Genome-Based Therapeutic Drugs for Depression (GENDEP) study. **Journal of Clinical Psychiatry**, v. 72(11), pp. 1478-1484, 2011.

VAN PRAAG, H.; SCHINDER, A.F.; CHRISTIE, B.R.; TONI, N.; PALMER, T.D.; GAGE, F.H. Functional neurogenesis in the adult hippocampus. **Nature**, v. 415, pp. 1030-1034, 2002.

VASCONCELLOS, A. P. S.; ZUGNO, A. I.; SANTOS, A. H. D. P.; NIETTO, F. B.; CREMA, L. M.; GONÇALVES, M.; FRANZON, R.; WYSE, A. T. S.; ROCHA, E. R.; DALMAZ, C. Na⁺,K⁺ ATPase activity is reduced in hippocampus of rats submitted to an experimental model of depression: effect of chronic lithium treatment and possible involvement in learning deficits. **Neurobiology of Learning Deficits**, v. 84, pp. 102– 110, 2005.

VATTA, M.; PEÑA, C.; FERNÁNDEZ, B. E.; RODRÍGUEZ, G.; ARNAIZ, R. L. Endobain E, a brain Na⁺K⁺ ATPase inhibitor, decreases norepinephrine uptake in rat hypothalamus. **Life Sciences**, v. 76, pp. 359-365, 2004.

VIALOU, V.; FENG, J.; ROBISON, A.J.; NESTLER, E.J. Epigenetic mechanisms of depression and antidepressant action. **Annual Review Pharmacology and Toxicology**, v. 53, pp. 59-87, 2013.

VIANA, A.F.; RATES, S.M.K.; NAUDIN, B.; JANIN, F.; COSTENTIN, J.; DO REGO, J.C. Effects of acute or 3-day treatments of *Hypericum caprifoliatum* Cham. & Schlttd. (Guttifereae) extract on two established antidepressants on basal and stress induced increase in serum and brain corticosterone levels. **Journal of Psychopharmacology**, v. 22(6), pp. 681-690, 2008.

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.

VOLLMAYR, B.; HENN, F.A. Learned helplessness in the rat: improvements in validity and reliability. **Brain Research Protocols**, v. 8, pp. 1-7, 2001.

WAGNER, H.; ULRICH-MERZENICH, G. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. **Phytomedicine**, v. 16, pp. 97-110, 2009.

WANG, R.; XU, Y.; WU, H.L.; LI, Y.B.; LI, Y.H.; GUO, J.B.; LI, X.J. The antidepressant effects of curcumin in the forced swimming test involve 5-HT1 and 5-HT2 receptors. **European Journal of Pharmacology**, v. 578, pp. 43 – 50, 2008.

WALKER, A.K.; BUDAC, D.P.; BISULCO, S.; LEE, A.W.; SMITH, R.A.; BEENDERS, B.; KELLEY, K.W.; DANTZER R. NMDA receptor blockade by ketamine abrogates lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior in C57BL/6 J mice. **Neuropsychopharmacology**, v. 38(9), pp. 1609-1616, 2013.

WEAVER, I.C.; CERVONI, N.; CHAMPAGNE, F.A.; D'ALESSIO, A.C.; SHARMA, S.; SECKL, J.R.; DYMOV, S.; SZYF, M.; MEANEY, M.J. Epigenetic programming by maternal behavior. **Nature Neuroscience**, v. 7, pp. 847-854, 2004.

OMS, Organização Mundial da Saude. **WHO Monographs on Selected Medicinal Plants**, v.1. Malta: WHO Graphics, 1999.

OMS, Organização Mundial da Saude, 2008. **The global burden of disease: update 2004**. Disponível em http://www.who.int/topics/global_burden_of_disease/en/. Acessado em maio de 2014.

WILLNER, P. Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. **Neuropsychobiology**, v. 52(2), pp. 90-110, 2005.

WOLFE, F.; MICHAUD, K. Predicting depression in rheumatoid arthritis: the signal importance of pain extent and fatigue, and comorbidity. **Arthritis & Rheumatology**, v. 61(5), pp. 667-673, 2009.

XHAARD, H.; BACKSTRÖM, V.; DENESSIOUK, K.; JOHNSON, M.S. Coordination of Na(+) by monoamine ligands in dopamine, norepinephrine, and serotonin transporters. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 48(7), pp. 1423-1437, 2008.

XI, L.; ZHANG, Y.; HAN, D.; ZHANG, L. Effect of asthma, aeroallergen category, and gender on the psychological status of patients with allergic rhinitis. **Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology**, v. 22, pp. 264–269, 2012.

YAN, H.C.; CAO, X.; DAS, M.; ZHU, X.H.; GAO, T.M. Behavioral animal models of depression. **Neuroscience Bulletin**, v. 26, pp. 327-337, 2010.

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

ZHANG, D.; HOU, Q.; WANG, M.; LIN, A.; JARZYLO, L.; NAVIS, A.; RAISSI, A.; LIU, F.; MAN, HY. Na,K-ATPase activity regulates AMPA receptor turnover through proteasome-mediated proteolysis. **Journal of Neuroscience**, v. 29(14), pp. 4498-4511, 2009.

ZHANG, Z.L.; ZUO, Y.M.; WANG, Q.H.; XIAO, H.B.; KUANG, H.X. Effects of *Valeriana amurensis* on the expressions of iNOS, COX-2 and IkappaCB-alpha in Alzheimer's disease model rat's brain. **Zhong Yao Cai**, v. 33(4), pp. 581-583, 2010.

ANEXOS

Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa 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: 22648

Título: ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO ANTIDEPRESSIVA DE Valeriana glechonifolia MEYER (VALERIANACEAE).

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

STELA MARIS KUZE RATES - coordenador desde 01/09/2011
GILSANE LINO VON POSER - pesquisador desde 01/09/2011
ANA PAULA RAVAZZOLO - pesquisador desde 01/09/2011
LUIZA DE ANDRADE SALLES - pesquisador desde 01/09/2011
Liz Girardi Müller - pesquisador desde 01/09/2011

Equipe Externa:

Sâmia Regiane Lourenço Joca - pesquisador desde 01/09/2011

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo, em reunião realizada em 23/04/2012 - Sala de Reuniões do 2º andar do Prédio da Reitoria, Campus Central da UFRGS., em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 490 camundongos e 50 ratos Wistar, 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, 3 de Maio de 2012

FLAVIO ANTONIO PACHECO DE ARAUJO
Coordenador da comissão de ética