



**UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PELOTAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E COMPORTAMENTO**  
**LABORATÓRIO DE NEUROCIÊNCIAS CLÍNICAS**

**AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL E NEUROQUÍMICA DE COMPOSTOS**  
**NATURAIS EM MODELOS ANIMAIS DE TRANSTORNOS DO HUMOR**

**MARTA DE OLIVEIRA GAZAL**

**PELOTAS, FEVEREIRO 2014**

**UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PELOTAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E COMPORTAMENTO**  
**LABORATÓRIO DE NEUROCIÊNCIAS CLÍNICAS**

**AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL E NEUROQUÍMICA DE COMPOSTOS  
NATURAIS EM MODELOS ANIMAIS DE TRANSTORNOS DO HUMOR**

**MARTA DE OLIVEIRA GAZAL**

Tese de Doutorado apresentada ao curso de Pós-Graduação em Saúde e Comportamento da Universidade Católica de Pelotas como requisito parcial para obtenção do título de doutora em Saúde e Comportamento.

**Orientadora:** Prof<sup>ª</sup>. Dra Gabriele Cordenonzi Ghisleni

**Co-Orientador:** Prof. Dr. Claiton Leoneti Lencina

## **Agradecimentos**

Este trabalho não é resultado apenas de um esforço individual. Ele nasce de significativas contribuições que recolhi durante minha trajetória profissional, ao lidar com pessoas e instituições que foram fundamentais para elaboração dessa tese. Serei eternamente grata...

As professoras Gabriele Ghisleni e Manuella Kaster pela orientação deste trabalho, pelos ensinamentos e profissionalismo. Obrigada pela amizade e carinho depositado em mim durante esses anos. Vocês apareceram na minha vida e fizeram toda a diferença, é impossível descrever toda a minha gratidão. Adoro Vocês!

Ao professor Claiton Lencina pela orientação, confiança e amizade. Obrigada por enriquecer meu vocabulário com suas lindas palavras.

Várias pessoas ofereceram tempo e trabalho para este estudo, entre elas vão agradecimentos para as professoras Francieli Stefanello, e Elizandra Braganhol.

Aos amigos que tive a sorte de conhecer no laboratório de Neurociências Clínicas: Eduardo Schuch, Júlia Fabião, Guilherme Bittencourt, Matheus Valente, Régis Sturbelle, em especial para as minhas queridinhas Bruna Acosta, Fernanda Kaufmann obrigada principalmente pela amizade e apoio, foi ótimo trabalhar com vocês!

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Comportamento da Universidade Católica de Pelotas.

As minhas amigas Luciana Quevedo e Bárbara Spessato pela amizade e apoio.

A Daniela Pochmann obrigada por toda ajuda com os meus experimentos.

Ao pessoal do biotério da Universidade Federal de Pelotas em especial a Fabiane, Juliana, Cristina e Patrícia. Obrigada pelo apoio técnico durante todos os meus experimentos.

A CAPES pela bolsa que me foi concedida para a concretização deste trabalho.

Ao Rodrigo por estar ao meu lado em todos os momentos. Te amo!

À minha família, obrigada por tornarem possível a realização dos meus sonhos e por vibrarem pelas minhas conquistas! Obrigada por acreditarem e confiarem em mim! Amo vocês!

Finalmente, uma nota de agradecimento às instituições que apoiaram o projeto, de uma forma ou outra. Elas são a Universidade Católica de Pelotas, Universidade Federal de Pelotas, Universidade Federal de Santa Catarina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, CAPES, CNPq e FAPERGS.

## **LISTA DE FIGURAS E TABELAS**

<b>FIGURA 1.</b> Dano Celular Mediado pelas Espécies Reativas de Oxigênio.....	12
<b>FIGURA 2.</b> Estresse Oxidativo.....	12
<b>FIGURA 3.</b> Resumo dos Possíveis Mecanismos de Ação da Curcumina .....	14

## LISTA DE ABREVIATURAS

AMPA - ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol (do inglês,  $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid)

BDNF – Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (do inglês, brain-derived neurotrophic factor)

CAT – Catalase

CEEA – Comissão de ética em Experimentação Animal

COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

CPF – Córtex Pré-frontal

DNA - Ácido desoxirribonucleico (do inglês, deoxyribonucleic acid)

EA – Extrato Aquoso

ECI – Estresse Crônico Imprevisível

ERO - Espécies Reativas de Oxigênio

ERN – Espécies Reativas de Nitrogênio

GPX - Glutathione Peroxidase

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - Peróxido de Hidrogênio

HP - Hipocampo

i.p. – Via Intraperitoneal

LiCl – Cloridrato de Lítio

IL-1 $\beta$  - Interleucina 1 $\beta$

IL-6 – Interleucina 6

MDA - Malondialdeído

NMDA - N-metil-D-aspartato

(O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) - Ânion Superóxido,

(OH<sup>•</sup>) - Radical Hidroxila

p.o. – Via Oral

REM – Movimento Rápido dos Olhos (do inglês rapid eye movement)

RNA - Ácido Ribonucleico (do inglês, ribonucleic acid)

SOD - Superóxido Dismutase

TBARS - Espécies Reativas do Ácido Tiobarbitúrico (do inglês, thiobarbituric acid reactive substances)

TH – Transtornos de Humor

THB – Transtorno de Humor Bipolar  
TNF – Teste do Nado Forçado

TNF- $\alpha$  – Fator de Necrose Tumoral Alfa (do inglês, tumor necrosis factor alpha)

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	01
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	04
3.1. Objetivo geral .....	04
3.2. Objetivos específicos.....	04
<b>3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	05
3.1. Transtornos de Humor .....	05
3.1.1. Transtorno de Humor Bipolar .....	05
3.1.2. Depressão Maior.....	07
3.2. Modelos Animais .....	08
3.2.1. Modelo Animal do Episódio de Mania .....	09
3.2.2. Modelo Animal de Depressão Induzido pelo Estresse Crônico Imprevisível.....	10
3.3. Estresse Oxidativo .....	11
3.4. Compostos Naturais .....	13
3.4.1. Curcumina .....	13
3.4.2. <i>Cecropia pachystachya</i> .....	14
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	15
4.1. Animais .....	15
4.2. Compostos e Vias de Administração.....	16
4.3. Modelo de Estresse Crônico Imprevisível.....	16
4.4. Modelo de Mania .....	17
4.5. Testes Comportamentais .....	17
4.6. Preparação do Tecido .....	18

4.7. Avaliação do Dano Oxidativo e da Atividade das Enzimas Antioxidantes.....	19
4.8. Determinação Proteica .....	20
4.9. Análise Estatística.....	20
<b>5. ARTIGOS CIENTÍFICOS</b>	
<b>CAPÍTULO I .....</b>	<b>21</b>
<b>CAPÍTULO II .....</b>	<b>30</b>
<b>CAPÍTULO III.....</b>	<b>53</b>
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>74</b>
<b>7. PERSPECTIVA .....</b>	<b>76</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>77</b>



## 1. INTRODUÇÃO

Transtornos de humor (TH) são relevantes problemas de saúde mental no Brasil e no mundo, por acarretarem um alto custo social e econômico. Estima-se que 14% da população mundial sofra algum tipo de TH e menos de 75% desta, tenha acesso ao tratamento adequado. Acredita-se que futuramente estes transtornos serão uma das principais causas de incapacitação do mundo elevando a demanda nos serviços de saúde por atingirem uma ampla faixa etária da população (NESTLER, *et al.*, 2002; WHO, 2012).

Os TH são condições frequentes e debilitantes caracterizados por manifestações afetivas das quais as mais comuns são os transtornos unipolares (depressivos) e transtornos bipolares (episódios maníacos, hipomaníacos, depressivos ou mistos). Destes, a depressão maior caracteriza-se por um período mínimo de duas semanas de humor deprimido ou perda de interesse/prazer por quase todas as atividades. Inclui sintomas psicológicos, comportamentais e somáticos (NEMEROFF e OWENS, 2002; BORNSTEIN, *et al.*, 2006; LEMKE, 2008).

O transtorno de humor bipolar (THB) é uma doença psiquiátrica crônica e altamente debilitante (CALABRESE, *et al.*, 2003; TANG e WANG, 2012). No THB, os episódios de mania, diferentemente do episódio de depressão, geram um estado de energia excessiva, associada à euforia, impulsividade, falta de necessidade de sono e psicose (CALABRESE, *et al.*, 2003; TANG e WANG, 2012). Embora o diagnóstico e o tratamento precoce do THB reduzam a gravidade da doença, muitos indivíduos são normalmente diagnosticados no estado depressivo, sendo erroneamente classificados e tratados para depressão maior (MANNING, *et al.*, 1997; HIRSCHFELD, *et al.*, 2003).

Evidências recentes mostram que alterações neurobiológicas, comorbidades clínicas, resistência ao tratamento e disfunção cognitiva, podem decorrer a partir do número de episódios e da duração da doença unipolar ou bipolar recorrente (POST *et al.*, 2012). Entretanto, os principais mecanismos neuroquímicos relacionados à fisiopatologia dos TH não estão completamente esclarecidos. É conhecido que o estresse oxidativo medeia processos neuropatológicos de uma série de doenças neurodegenerativas e distúrbios neuropsiquiátricos, e dados recentes têm sugerido o seu envolvimento na fisiopatologia dos TH (ANDREZZA, *et al.*, 2008; MAGALHÃES, *et al.*, 2012; ZHANG e YOA, 2013).

O estresse oxidativo é uma condição na qual ocorre um desequilíbrio entre moléculas pró-oxidantes e antioxidantes, que resulta no dano aos lipídios de membrana, ácidos nucleicos

e proteínas celulares (GANDHI e ABRAMOV, 2012). O encéfalo é altamente susceptível ao estresse oxidativo, pois, além de possuir capacidade antioxidante limitada, metaboliza cerca de 20% do oxigênio total consumido pelo corpo (HALLIWELL e GUTTRIDGE 2007). Recentemente, vários estudos clínicos têm relatado que pacientes diagnosticados com THB ou depressão maior apresentam alterações significativas nas enzimas antioxidantes, aumento na peroxidação de lipídios e níveis de óxido nítrico (ON) (ANDREAZZA, *et al.*, 2008; MACHADO-VIEIRA, *et al.*, 2007; SELEK, *et al.*, 2008; MAGALHÃES, *et al.*, 2012; LOPRESTI, *et al.*, 2013).

De modo geral, os tratamentos dos TH apresentam resultados frustrantes, sendo que apenas 30% - 40% dos pacientes respondem às intervenções farmacológicas e psicoterápicas disponíveis. Além disso, meses de tratamento são usualmente necessários para uma resposta terapêutica completa, e o grande número de efeitos colaterais associados aos fármacos causa uma baixa adesão dos pacientes ao tratamento (NESTLER, *et al.*, 2002; CASSANO e FAVA, 2004; POST *et al.*, 2012). Na tentativa de encontrar novos alvos terapêuticos para os TH, especificamente para o THB e a depressão maior, diversos compostos derivados de plantas têm sido estudados. As terapias à base de plantas podem ser alternativas eficazes no tratamento dos TH, ou mesmo na prevenção de novos episódios, por apresentarem especialmente alta capacidade antioxidante e anti-inflamatória (ZHANG, *et al.*, 2004; DHINGRA e SARMA, 2005; QURESHI e AL-BEDAH, 2013). Além disso, o desenvolvimento de novas terapias com eficácia de tratamento e redução de efeitos adversos mostra-se necessário e imediato para o tratamento dos TH. Pensando nisso, selecionamos duas espécies promissoras para o tratamento dos TH, cuja ação é reconhecida pelo potencial antioxidante: a curcumina, principal curcuminóide da *Curcuma longa* Linn., e a *Cecropia pachystachya* onde os compostos majoritários são o ácido clorogênico e isoorientina, um ácido fenólico e um flavonoide respectivamente.

Neste sentido, o extrato da *C. pachystachya* foi descrito pela sua atividade antioxidante em ratos através da inibição da peroxidação de lipídios (VELÁZQUEZ, *et al.*, 2003). Dados da literatura em modelos animais mostram que o ácido clorogênico, presente no extrato aquoso (EA) de *C. Pachystachya*, apresenta efeito ansiolítico, antioxidante e neuroprotetor (BOUAYED, *et al.*, 2007; PATHAK, *et al.*, 2013). Além disso, os flavonoides como a isoorientina vêm sendo amplamente estudados por suas propriedades antioxidantes (GROSSO, *et al.*, 2013). Em relação à curcumina, seu efeito neuroprotetor tem sido associado ao seu potencial antioxidante e anti-inflamatório demonstrado em estudos *in vivo* e *in vitro*

(KULKARNI, *et al*, 2008. LOPRESTI, *et al*, 2012). Sua ação demonstrou eficácia em processos neurodegenerativos, assim como em modelos animais de depressão (KULKARNI, *et al*, 2008. LOPRESTI, *et al*, 2012; MONROY, *et al.*, 2013).

Considerando que os TH apresentam um forte impacto na qualidade de vida dos pacientes, a busca por estratégias inovadoras para o tratamento desses transtornos torna-se relevante. Desta forma, a geração de dados que contribuam para o preenchimento desta atual lacuna são os norteadores desta proposta. A variedade dos metabólitos secundários encontrados na natureza representa um dispositivo essencial na descoberta e desenvolvimento de novos fármacos, tornando-se uma inspiração para os pesquisadores, em função da sua diversidade química estrutural. Estas constatações demonstram que os estudos envolvendo tais fontes, aliados à tecnologia de identificação, purificação e, acima de tudo, testes farmacológicos que certifiquem suas atividades devem ser encorajados e fomentados.

## **2.OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de produtos naturais sobre os parâmetros comportamentais e neuroquímicos em modelos animais de TH.

### **2.2 Objetivos Específicos**

#### **2.2.1. Primeiro Artigo**

- Avaliar o efeito da administração de curcumina nas doses de 20 e 50 mg/kg na hiperlocomoção induzida pela cetamina no teste do campo aberto.
- Avaliar o efeito da curcumina nas doses de 20 e 50 mg/kg em parâmetros de estresse oxidativo, tais como: substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS), conteúdo total de grupamentos sulfidrilas e na atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) no córtex pré-frontal (CPF) e hipocampo (HP) de ratos submetidos ao modelo de mania induzida por cetamina.

#### **2.2.2. Segundo Artigo**

- Avaliar o efeito da administração do EA *C. pachystachya* na dose de 200 mg/kg nas modificações comportamentais e bioquímicas no modelo de depressão induzido pelo estresse crônico imprevisível em camundongos.
- Avaliar o efeito da administração do EA de *C. pachystachya* na dose de 200mg/kg em parâmetros de estresse oxidativo, tais como: TBARS, conteúdo total de grupamentos sulfidrilas e na atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT no CPF e HP de camundongos submetidos ao modelo de depressão induzido pelo estresse crônico imprevisível.

#### **2.2.3. Terceiro Artigo**

- Avaliar o efeito da administração do EA de *C. pachystachya* nas doses de 200 e 400 mg/kg na hiperlocomoção induzida pela cetamina no teste do campo aberto.
- Avaliar o efeito da administração do EA de *C. pachystachya* nas doses de 200 e 400mg/kg em parâmetros de estresse oxidativo, tais como: TBARS, conteúdo total de grupamentos sulfidrilas, conteúdo de carbonil e na atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT no CPF e HP de ratos submetidos ao modelo de mania induzida por cetamina.

### **3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

#### **3.1. Transtornos de Humor**

##### **3.1.1. Transtorno de Humor Bipolar (THB)**

O THB é uma doença crônica e grave caracterizada por episódios alternados de depressão, mania/ ou hipomania, ou ainda por episódios mistos. O diagnóstico do THB de acordo com o Manual Estatístico e Diagnóstico de Doenças Mentais, 5ª edição da Associação Americana de Psiquiatria (DSM-V) requer a ocorrência de pelo menos um episódio de mania ou hipomania, caracterizados por humor persistente e anormalmente elevado, expansivo ou irritável durando pelo menos uma semana. Além da alteração de humor, pelo menos três (ou quatro se o humor é irritável) dos seguintes sintomas devem estar presentes: grandiosidade, necessidade diminuída de sono, pressão para falar, fuga de idéias, distraibilidade, aumento da atividade dirigida a objetivos ou agitação psicomotora, envolvimento excessivo em atividades prazerosas (APA, 2002).

O THB pode ser classificado em: Tipo I, caracterizado por episódios recorrentes de mania e depressão, e Tipo II, o qual se assemelha as características do THB tipo I, entretanto apresentando uma forma mais branda de elevação do humor denominado como hipomania (DELGADO, *et al.*, 2012). De acordo com a Associação Brasileira de Transtorno Bipolar (ABTB), o THB do tipo I afeta cerca de 1% da população geral, enquanto no Tipo II a prevalência pode chegar a 8%. Além disso, estima-se que cerca de 1,8 a 15 milhões de brasileiros sejam portadores de THB (ABTB, 2012).

De uma maneira ampla, o tratamento para o THB consiste no uso de estabilizadores de humor, os quais implicam em uma série de riscos com relação às interações medicamentosas com antidepressivos, antipsicóticos e benzodiazepínicos, além de graves efeitos adversos. Existem também variadas modalidades psicoterapêuticas como as psicoterapias de apoio e terapias cognitivas que melhoram significativamente a qualidade de vida do paciente, porém sem dispensar o uso da farmacoterapia (SANCHES, *et al.*, 2005).

O tratamento psicofarmacológico do THB é bastante complexo. Além da dificuldade do diagnóstico clínico, muitos casos não respondem satisfatoriamente aos estabilizadores de humor convencionais. Além disso, a existência de fases pouco definidas e a presença de ciclos rápidos ou ultra-rápidos dificultam a escolha da medicação mais adequada, uma vez que o uso de algumas medicações, como os antidepressivos, podem piorar o curso do transtorno, quando

utilizados especialmente nas fases mistas da doença, as quais são, em grande parte difíceis de identificar (MACHADO-VIEIRA e SOARES, 2007).

De etiologia ainda não definida, diversas hipóteses têm sido descritas na investigação da fisiopatologia do THB em modelos pré-clínicos e clínicos. No entanto, resultados preliminares em pacientes com THB têm revelado que alterações nos níveis de neurotrofinas (CUNHA, *et al.*, 2006), citocinas pró-inflamatórias (GAMA, *et al.*, 2012), e no estresse oxidativo podem estar associados a doença (GANDHI e ABRAMOV, 2012 e GAMA, *et al.*, 2012). O estresse oxidativo por sua vez, constitui um dos principais mecanismos associados aos transtornos psiquiátricos como evidenciado pelo alto dano oxidativo sistêmico observado em pacientes com THB (BERK, *et al.*, 2011; ANDREAZZA, *et al.*, 2010; GAWRYLUK, *et al.*, 2011).

A principal evidência é demonstrada pelo aumento da peroxidação lipídica, indicada pelo nível elevado de TBARS no soro de pacientes com THB (ANDREAZZA, *et al.*, 2007b; MACHADO-VIEIRA, *et al.*, 2007). Outras evidências indicam que há uma diminuição da atividade das enzimas antioxidantes catalase e glutathione peroxidase (GPX) (OZCAN, *et al.*, 2004; KULOGLU, *et al.*, 2002), bem como aumento do dano ao ácido desoxirribonucleico (DNA) em pacientes com este transtorno (ANDREAZZA, *et al.*, 2007a; BUTTNER, *et al.*, 2007; FREY, *et al.*, 2007). Um estudo de Andrezza *et al.* (2007b) indicou que o estresse oxidativo é particularmente mais acentuado durante a fase maníaca. Além disso, estudos sugerem que agentes estabilizadores de humor como lítio e valproato exercem efeito antioxidante em culturas de células neuronais em condições excitotóxicas (SHAO, *et al.*, 2006, 2008).

Neste contexto, o interesse na compreensão do papel que o estresse oxidativo exerce nos transtornos psiquiátricos é de grande relevância, e estudos clínicos têm investigado a inclusão de espécies naturais ao tratamento convencional demonstrando redução da sobrecarga oxidativa em pacientes com THB (MACHADO-VIEIRA, *et al.*, 2008; MAGALHAES, *et al.*, 2011). Da mesma forma, modelos pré-clínicos de mania apresentam efeitos similares aos estudos clínicos, onde também foi observado desequilíbrio entre o sistema pró-oxidante e antioxidante que caracteriza o processo de estresse oxidativo (FREY, *et al.*, 2006; ANDREAZZA, *et al.*, 2008; VALVASSORI, *et al.*, 2008). Assim, de uma forma geral, estes achados sustentam a hipótese do envolvimento do estresse oxidativo na progressão do THB, justificando sua importância na pesquisa de novos alvos terapêuticos mais eficientes.

### 3.1.2. Depressão Maior

A depressão maior é um TH que causa forte impacto sobre a qualidade de vida do paciente e de seus familiares. O número crescente de casos e suas consequências sociais fazem da depressão um grande problema de saúde pública que afeta atualmente até 20% da população mundial (WONG e LICINIO, 2001; NESTLER, *et al.*, 2002; BERTON e NESTLER, 2006). A Organização Mundial da Saúde (OMS) classifica a depressão maior como a quarta principal causa de mortalidade e morbidade em todo o mundo (WHO, 2002).

Segundo o DSM-V, o diagnóstico do transtorno depressivo maior é estabelecido por um conjunto de sintomas clínicos como: 1) humor deprimido a maior parte do tempo; 2) diminuição marcante no interesse ou prazer em todas ou quase todas as atividades (anedonia); 3) aumento ou diminuição significativa de peso ou apetite; 4) insônia ou hiperinsônia; 5) agitação ou retardo psicomotor; 6) fadiga ou falta de energia; 7) sentimentos de culpa ou desvalia excessivos; 8) diminuição na capacidade de concentração e pensamento; 9) pensamentos recorrentes de morte, idéias ou tentativas de suicídio, sentimentos de desesperança. O indivíduo para preencher os critérios de depressão maior deve apresentar pelo menos um entre os dois primeiros sintomas e mais o número necessário para perfazer um total de cinco entre os sintomas três a nove, com duração mínima de duas semanas (APA, 2002). O transtorno depressivo maior apresenta ainda uma alta taxa de recorrência. Após o primeiro episódio a chance de uma segunda manifestação aumenta em 50% e após dois episódios o risco sobe para 80% (APA, 1994). Indivíduos com depressão maior têm, em média, cinco a nove episódios da doença durante a vida (KESSLER, *et al.*, 1997; KESSLER e WALTERS, 1998).

Os mecanismos envolvidos na patofisiologia da depressão maior ainda não são completamente conhecidos, entretanto é sabido que fatores psicológicos, genéticos e ambientais aumentam a vulnerabilidade ao quadro clínico (MACHADO-VIEIRA e SOARES, 2007). Assim como demonstrado para o THB, estudos clínicos e pré-clínicos demonstram o envolvimento do estresse oxidativo na depressão maior devido principalmente à maior vulnerabilidade do sistema nervoso central (SNC) ao dano oxidativo (NG, *et al.*, 2008; LOPRESTI, *et al.*, 2013). De fato, pacientes com diagnóstico de depressão maior apresentaram altos níveis de peroxidação lipídica (RYBKA, *et al.*, 2013), e estes níveis foram ainda maiores em pacientes com episódios recorrentes da doença (RYBKA, *et al.*, 2013). Alterações significativas também foram encontradas na atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT, porém com resultados bastante inconsistentes, havendo estudos demonstrando

diminuição e outros aumento da atividade dessas enzimas (HERKEN, *et al.*, 2007; KODYDKOVA, *et al.*, 2009; STEFANESCU e CIOBICA, 2012; KOTAN, *et al.*, 2011).

Apesar do grande número de tratamentos farmacológicos para a depressão, a taxa de sucesso da medicação não é mais do que 50-60%, o que significa que pelo menos 40% dos pacientes não respondem ao tratamento inicial (NESTLER, *et al.*, 2002). Vários estudos demonstraram que terapias à base de plantas podem ser alternativas eficazes no tratamento da depressão (ZHANG, *et al.*, 2004; DHINGRA e SARMA, 2005). Neste contexto, um grande número de plantas têm sido avaliada em modelos animais quanto ao potencial antidepressivo devido as suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias. Podemos encontrar alguns exemplo como o *Hypericum reflexum* L. (SANCHEZ-MATEO, *et al.*, 2007); *Ptychopetalum olacoides* (PIATO, *et al.*, 2008); *Rosmarinus officinalis* L. (MACHADO, *et al.*, 2009); *Polygala sabulosa* W. (CAPRA, *et al.*, 2010); entre outros.

### **3.2. Modelos Animais**

Os modelos animais são ferramentas amplamente utilizadas para compreensão dos mecanismos responsáveis pela etiologia e tratamento de doenças. Estes modelos sofrem com algumas restrições inerentes ao fato de não se poder reproduzir fidedignamente algumas características dos transtornos psiquiátricos em humanos, como o sentimento de culpa, pensamento de morte e suicídio. No entanto, são responsáveis, em grande parte, pelo desenvolvimento das hipóteses que relacionam as possíveis bases biológicas dos transtornos mentais e, pelo que se sabe atualmente, sobre as ações dos psicofármacos em diversas etapas dos processos de neurotransmissão (VALVASSORI, *et al.*, 2013).

Embora seja impossível recriar todos os aspectos de uma determinada doença, especialmente aquelas que envolvem condições complexas e multifatoriais como as doenças psiquiátricas, estes modelos mimetizam um ou alguns dos sintomas associados à doença ou são sensíveis aos fármacos utilizados clinicamente. Desta maneira, é possível se estabelecer um paralelo entre os efeitos comportamentais induzidos pelos fármacos com os sinais clínicos ou neurofisiológicos em humanos, visando contribuir para a elucidação das bases etiológicas das várias doenças mentais (KATO, *et al.*, 2007; VALVASSORI, *et al.*, 2013).



### 3.2.1. Modelo Animal de Mania

O episódio de mania permanece pouco elucidado e os modelos animais que mimetizam este episódio são bastante escassos baseando-se principalmente na administração de fármacos que produzem um efeito hiperlocomotor como descrito pela administração de D-anfetamina (VALVASSORI, *et al.*, 2012), ouabaína (WANG, *et al.*, 2013), e cetamina (GHEDIN, *et al.*, 2012). Contudo, cabe ressaltar que não existem modelos animais capazes de mimetizar a alternância entre as fases de depressão e mania característica do THB. Entretanto, os modelos animais de mania utilizados compartilham alterações comportamentais e neuroquímicas, as quais foram revertidas pela administração de estabilizadores de humor clássicos utilizados na clínica como lítio e ácido valpróico.

Recentes evidências postulam o envolvimento do sistema glutamatérgico na etiologia do THB. A cetamina, recente ferramenta farmacológica utilizada no modelo animal de mania e como modelo de outros transtornos psiquiátricos como a esquizofrenia, atua como um antagonista não-competitivo de receptores glutamatérgicos do subtipo *N*-metil-D-aspartato (NMDA). A cetamina foi inicialmente descrita e reconhecida por seus efeitos anestésicos e dissociativos de modo dose dependente. Estudos pré-clínicos mostraram que baixas doses de cetamina (5 a 10 mg / kg) exibem propriedades antidepressivas (KATALINIC, *et al.*, 2013). No entanto, em doses moderadas (10 a 50 mg / kg) induz hiperlocomoção e disfunção celular (MACHADO-VIEIRA, *et al.*, 2004, GHEDIM, *et al.*, 2012), e nas doses mais elevadas possui efeito anestésico dissociativo. Do ponto de vista clínico, infusões de baixas doses de cetamina induzem efeitos antidepressivos rápidos (KATALINIC, *et al.*, 2013).

A neurofarmacologia da cetamina é bastante complexa e ainda permanece pouco elucidada. Estudos demonstraram alguns mecanismos para o efeito hiperlocomotor da cetamina. Primeiro, que o bloqueio dos receptores NMDA pode aumentar a liberação dos aminoácidos excitatórios, glutamato e aspartato (LIU e MOGHADDAM, 1995; WANG e THUKRAL, 1996; MOGHADDAM, *et al.*, 1997), com subsequente ativação da neurotransmissão glutamatérgica em receptores não-NMDA, como os receptores ionotrópicos, ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol (AMPA) e cainato. A estimulação dos receptores AMPA ou cainato em neurônios dopaminérgicos aumenta a liberação de dopamina na fenda sináptica, atuando desta forma na promoção dos sintomas positivos observados na esquizofrenia e episódios de mania através da estimulação do sistema nervoso central (SNC) (TAN, *et al.*, 2012 e DUAM, *et al.*, 2013). Por outro lado, a cetamina, atuando como antagonista de receptores NMDA localizados em interneurônios GABAérgicos

promove a liberação de glutamato e consequente desinibição da transmissão glutamatérgica (ZUNSZAIN, *et al.*, 2013).

A administração de doses sub-anestésicas de cetamina em ratos, demonstrou ser capaz de causar um aumento na atividade locomotora dos animais concomitante ao aumento do dano oxidativo evidenciado pela peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas em áreas envolvidas na modulação do humor como o HP e CPF. Os efeitos comportamentais e neuroquímicos induzidos pela administração da cetamina foram entretanto prevenidos ou revertidos pela administração de lítio e ácido valpróico, fármacos utilizados na clínica para o tratamento do THB. Assim, a administração de cetamina representa um modelo farmacológico promissor para o estudo das bases biológicas de mania em ratos (GHEDIN, *et al.*, 2012).

### **3.2.2. Modelo Animal de Depressão Induzido pelo Estresse Crônico Imprevisível (ECI)**

Dados da literatura apontam que a manifestação dos transtornos depressivos sofre influência genética e ambiental, sendo que a exposição a eventos estressores ao longo da vida é postulada como o principal fator de risco na etiologia e progressão da depressão (HENN e VOLLMAYR, 2004).

O estresse é descrito como um mecanismo de resposta a estímulos (internos ou externos), que permite ao organismo reagir e adaptar-se frente a um estímulo nocivo, mantendo assim sua homeostasia. A resposta ao estresse ocorre através da ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), o qual corresponde ao sistema regulador primário da resposta ao estresse capaz de integrar as funções neurológicas e estímulos sensoriais à função endócrina. Entretanto, frente à cronicidade do estresse, o prejuízo da atividade do eixo HPA na regulação da resposta aos eventos estressores é eminente, desencadeando assim um estado patológico, como evidenciado nos transtornos depressivos.

O estresse crônico imprevisível (ECI) é um dos modelos que melhor mimetiza as principais causas da depressão em humanos. A exposição crônica de roedores a diferentes agentes estressores, tanto físicos quanto psicológicos, induz uma série de alterações fisiológicas e comportamentais, tais como: anedonia, diminuição da latência e aumento na quantidade de sono REM (do inglês, *rapid eye movement*) (MOREAU, *et al.*, 1995); diminuição no comportamento exploratório e sexual (D'AQUILA, *et al.*, 1994); aumento da secreção de corticosterona (KUBERA, *et al.*, 2001; JOELS, *et al.*, 2004); aumento da

transmissão glutamatérgica no giro denteado; aumento na expressão de canais de cálcio; apoptose e diminuição da neurogênese hipocampal (JOELS, *et al.*, 2004).

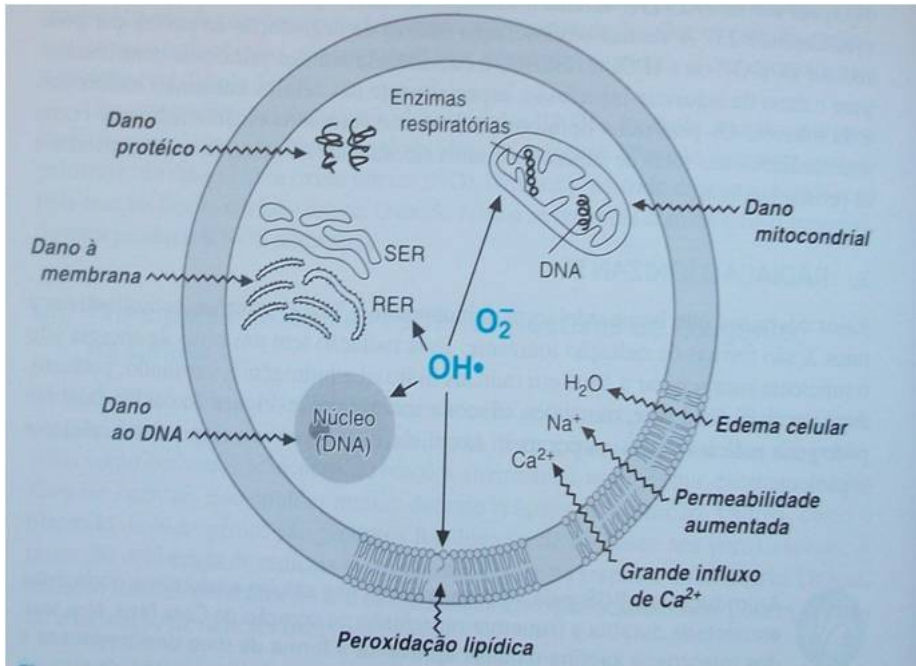
A relevância deste modelo é evidenciada através da reversão dos déficits no sistema de motivação e recompensa, assim como nos demais parâmetros comportamentais pelo tratamento crônico com antidepressivos de todas as classes (WILLNER, *et al.*, 1992; D'AQUILA, 1994; WILLNER, *et al.*, 1997). Todos esses parâmetros fisiológicos e comportamentais garantem ao modelo uma alta validade preditiva e fenomenológica, especialmente quando comparado aos modelos agudos de estresse (KATZ, *et al.*, 1981; WILLNER, *et al.*, 1987).

### 3.3. Estresse Oxidativo

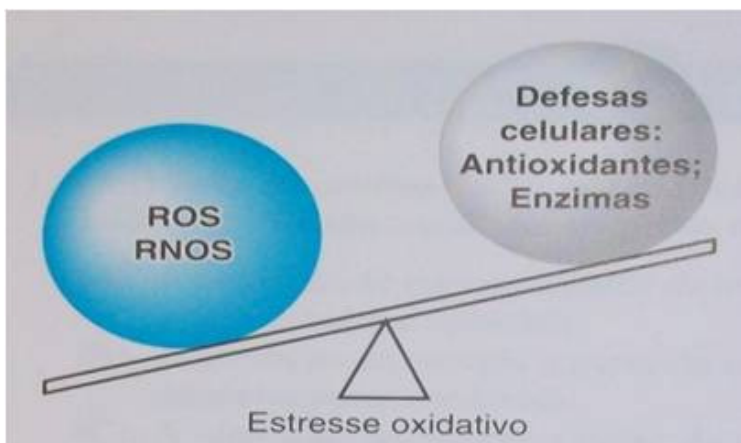
As reações chamadas redox são base de inúmeras vias e integram a biologia e regulação celular. A demanda pelo oxigênio ( $O_2$ ) por diferentes tecidos depende basicamente da atividade metabólica das células. No SNC, as células neuronais e astrogliais ocorrem em densidade majoritária e são as grandes responsáveis pelo alto consumo de oxigênio e glicose cerebral. Por vários processos enzimáticos e não-enzimáticos que ocorrem rotineiramente nas células, o  $O_2$  pode sofrer uma redução, recebendo quatro elétrons e formando duas moléculas de água. Contudo, também são formadas espécies parcialmente reduzidas de  $O_2$ , como o ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radical hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ), os quais contribuem para o desenvolvimento e progressão da neurodegeneração, e seus alvos celulares variam causando oxidação proteica, peroxidação lipídica, bem como dano ao DNA e RNA (Figura 1) (HALLIWELL e GUTTRIDGE, 2007).

O estresse oxidativo é um desequilíbrio na geração e eliminação das espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN), o qual induz um aumento da concentração intracelular destes intermediários instáveis e conseqüentemente induz a destruição oxidativa da célula por promover peroxidação lipídica, proteica e quebra do DNA (Figura 2) (HALLIWELL e GUTTRIDGE, 2007). Com a finalidade de neutralizar estas ERO o organismo conta com um sistema de defesa composto por enzimas antioxidantes como a CAT, SOD e glutathione peroxidase (GPX), além de compostos chamados antioxidantes não enzimáticos tais como a vitamina E, vitamina C e os tiois não proteicos, como por exemplo a glutathione. Assim, o estresse oxidativo é definido como uma condição em que o balanço entre a produção de ERO e a atividade antioxidante no organismo está significativamente desequilibrado resultando em um dano celular (HALLIWELL e GUTTRIDGE, 2007). O sistema nervoso é extremamente

sensível ao estresse oxidativo devido a presença de grandes quantidades de ácidos graxos poli-insaturados, grande reserva de ferro, alta taxa metabólica e por apresentar sistema de defesa antioxidante vulnerável e ineficiente (HALLIWELL e GUTTRIDGE, 2007).



**Figura 1:** Dano Celular Mediado pelas Espécies Reativas de Oxigênio (MARKS, *et al.*, 2007).



**Figura 2:** Estresse Oxidativo. O estresse oxidativo ocorre quando a taxa de ERO e ERN ultrapassa a taxa de remoção pelos mecanismos de defesa celular (MARKS, *et al.*, 2007).

### 3.4. Compostos Naturais

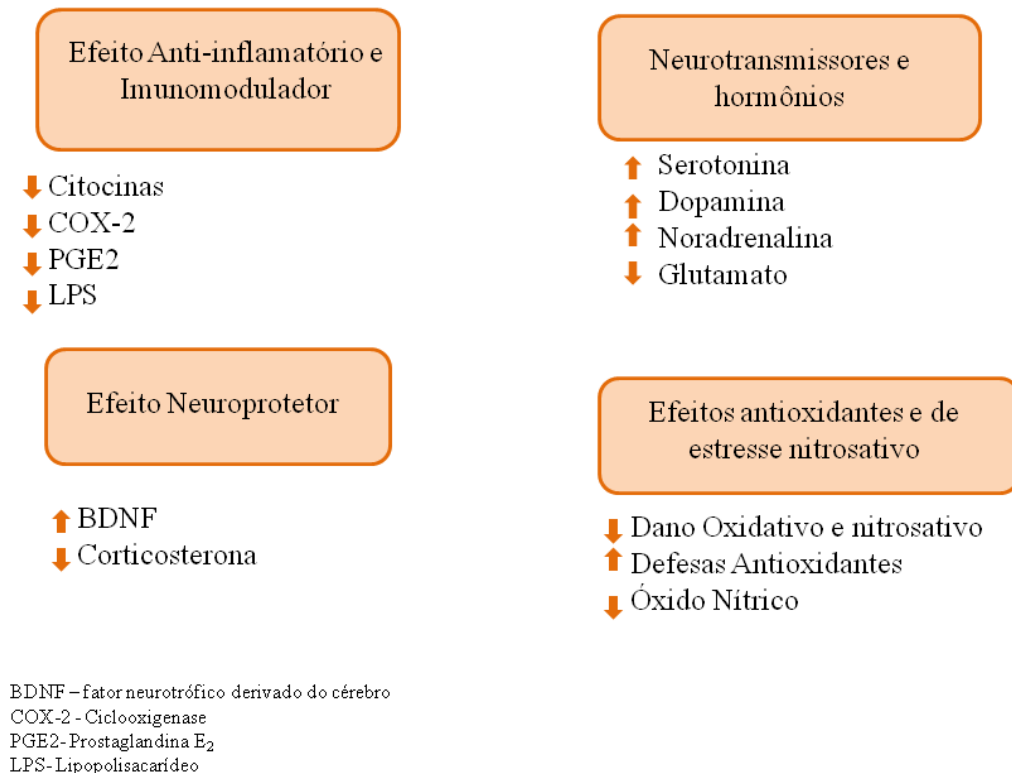
#### 3.4.1. Curcumina

Na expectativa de encontrar novos alvos terapêuticos para os TH, diversos compostos derivados de plantas têm sido estudados. A curcumina é o composto ativo extraído de *Curcuma longa* (*Zingiberaceae*) e extensos estudos têm mostrado que esta substância possui propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes, antitumorais e antidepressivas (LOPRESTI, *et al.*, 2012; ANDERSON e MAES, 2013).

O potencial anti-inflamatório da curcumina, está relacionado com a inibição do fator de sinalização nuclear kappa B (NFkB) e redução de citocinas pró-inflamatórias, tais como interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ). A curcumina também é um forte inibidor de enzimas geradoras de ERO, tais como a lipoxigenase, cicloxigenase, xantina-desidrogenase, oxidase e óxido nítrico sintase induzível, atuando como um potente antioxidante (LIN, 2007). A eficácia da curcumina como agente neuroprotetor em vários modelos pré-clínicos está sendo amplamente investigada, devido principalmente a sua baixa toxicidade, sugerindo este composto como um forte candidato para a prevenção dos TH (KULKARNI e DHIR, 2010; BRIETZKE, *et al.*, 2013).

A curcumina foi capaz de aumentar os níveis do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) no HP e CPF em animais submetidos ao modelo de depressão induzido pela administração de corticosterona (WEI, *et al.*, 2010). Estudos demonstraram que um possível mecanismo responsável pela ação antidepressiva da curcumina ocorre via inibição da enzima monoamina oxidase (MAO), envolvida no metabolismo das monoaminas (LOPRESTI, *et al.*, 2012). Recentemente, foi demonstrado que o efeito antidepressivo da curcumina pode ser mediado, pelo menos em parte, pela ativação do sistema glutamatérgico via subunidade GluN2B do receptor NMDA (ZHANG *et al.*, 2013).

Além disso, outros estudos mostram um efeito antioxidante considerável em modelos animais, o que fortalece cada vez mais a hipótese de que o princípio ativo possui uma atividade neuroprotetora e antioxidante no organismo (BASNET e SKALKO-BASNET, 2011, BUHRMANN, *et al.*, 2011; MOLINA-JIJÓN, *et al.*, 2011; KULKARNI e DHIR, 2010; LOPRESTI, *et al.*, 2012). Uma revisão recente sugeriu que o efeito antimaníaco da curcumina pode resultar das suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias ou pelo aumento dos níveis de BDNF (BRIETZKE, *et al.*, 2013). Embora suas ações em modelos pré-clínicos de mania não tenham sido avaliadas, os possíveis mecanismos de ação da curcumina estão resumidos na Figura 3.



Adaptado de Lopresti et al., 2012; Brietzke et al., 2013

**Figura 3:** Resumo dos possíveis mecanismos de ação da curcumina.

### 3.4.2. *Cecropia pachystachya*

Algumas espécies do gênero *Cecropia* têm extensivo uso popular no Brasil, sendo a *Cecropia glaziovii* e *C. pachystachya* as duas espécies mais comuns. As principais atividades farmacológicas relatadas para estas espécies são atividade hipotensora e efeitos no SNC como ansiolítico e antidepressivo (CONSOLINI, *et al.*, 2005; LIMA-LANDMAN, *et al.*, 2007; NINAHUAMAN, *et al.*, 2007). *C. pachystachya* é uma planta pertencente à família *Urticaceae* conhecida popularmente como embaúba que cresce na América do Sul e florestas tropicais. Folhas e casca de *C. pachystachya* são indicadas na medicina popular para tosse, asma, inflamação, hipertensão e por seu efeito diurético (LORENZI e MATOS, 2002; Pio-Corrêa, 1978). No entanto, nem todos os seus usos populares foram farmacologicamente comprovados.

Estudos prévios têm relatado algumas atividades farmacológicas dos extratos de *C. pachystachya*. O extrato hexânico das folhas exibiu um efeito anti-inflamatório significativo

(HIKAWCZUK, *et al.*, 1998). O extrato aquoso por sua vez, apresentou efeitos cardiotônicos e sedativo (CONSOLINI, *et al.*, 2006). Além disso, o extrato alcoólico das partes aéreas da *C. pachystachya* demonstrou atividade antioxidante em ratos através da inibição da peroxidação de lipídios (VELÁZQUEZ, *et al.*, 2003).

A partir do EA das folhas da *C. pachystachya* foram isolados e identificados os flavonoides C-glicosídeos isoorientina, orientina, e isovitexina, além do ácido clorogênico. Destes, o ácido clorogênico e a isoorientina foram identificados como os compostos majoritários do extrato, através de análises por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Figura 1, do Capítulo II) (COSTA, *et al.*, 2011).

Dados da literatura mostram que o ácido clorogênico apresenta atividade ansiolítica, antioxidante e neuroprotetora (BOUAYED, *et al.*, 2007; PATHAK, *et al.*, 2013). Os flavonóides, como a isoorientina, são bem conhecidos por suas propriedades antioxidantes, evitando o estresse oxidativo, o qual é sugerido como um dos mecanismos envolvidos na fisiopatologia dos TH (GROSSO, *et al.*, 2013).

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. Animais**

Para os experimentos com depressão foram utilizados 48 camundongos Swiss machos com 60 dias de idade, pesando entre 25 e 30g. Para o modelo de mania induzida por cetamina foram utilizados 100 ratos Wistar fêmeas com 90 dias de idade, pesando entre 250-300g. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas e foram colocados em gaiolas de residência (3-4 por gaiola) em condições experimentais controladas (24°C, água e comida *ad libitum*, ciclo claro/escuro de 12h). A manipulação e os cuidados com os animais foram conduzidos de acordo com o Guia de Uso e Cuidados com animais de Laboratório do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 1991). Todos os procedimentos realizados foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação animal (CEEA) da UFPel sob número 9194.

### **4.2. Compostos e Vias de Administração**

Foram utilizados para a realização dos experimentos *in vivo* deste estudo os seguintes compostos: cetamina (Sigma Chemical Co., EUA) dissolvida em solução salina (NaCl a 0,9%, w/v), e administrados por via intraperitoneal (i.p.); curcumina (Sigma Chemical Co.,

EUA) dissolvido em óleo de amendoim (Pazze Co., Brasil) e administrada por via oral (p.o.); cloridrato de lítio (LiCl) (Sigma Chemical Co., EUA) dissolvido em solução salina (NaCl a 0,9%, p/v) e administrado por p.o.. As doses de, curcumina, LiCl e cetamina utilizadas no presente estudo foram escolhidas de acordo com a literatura (KULKARNI e DHIR, 2010; BRUNING, *et al.*, 2012; GHEDIM, *et al.*, 2012).

#### **4.2.1. Material Vegetal:**

*C. pachystachya* foi coletada no município de Viamão (RS), e um *voucher* foi depositado no Herbarium da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil, sob o código ICN150025. O material vegetal foi seco em estufa de ar circulante ( $\pm 30^{\circ}\text{C}$ ), cominuído em moinho de facas e posteriormente armazenado a temperatura ambiente, em recipientes apropriados, sob o abrigo da luz, para posterior utilização.

#### **4.2.2. Preparação do extrato**

O extrato de *C. pachystachya* foi obtido através de extração das folhas com água destilada ( $100^{\circ}\text{C}$ ) por 30 minutos, obedecendo a uma relação droga vegetal: solvente de 1:10 (m/v). Em seguida, este foi filtrado, congelado e liofilizado para a obtenção do extrato aquoso utilizado nos modelos animais.

#### **4.2.3. Padronização das doses de *Cecropia pachystachya***

Com a finalidade de investigar o efeito antidepressivo do EA bruto de *C. pachystachya* foi realizada uma curva dose-resposta do tratamento agudo com o EA bruto *C. pachystachya* nos testes do nado forçado (TNF) e do campo aberto. O extrato foi dissolvido em água destilada e administrado p.o. em doses de 50, 100, 200 e 400 mg/kg, 60 minutos antes dos testes comportamentais. Para a curva dose-resposta utilizamos um total de 20 animais (Figura 2 do capítulo II).

#### **4.3. Modelo de Estresse Crônico Imprevisível (ECI)**

Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais: controle/veículo, controle/*C. pachystachya* 200mg/kg, ECI/veículo e ECI/*C. pachystachya* 200mg/kg. A *cecropia* foi administrada via oral uma vez ao dia, durante 14 dias do protocolo de ECI (Tabela 1).



O protocolo do ECI aplicado foi uma versão modificada daquele utilizado por Lu et al. (2006) e consiste na aplicação de diferentes tipos de agentes estressores, físicos e psicológicos, diariamente, por um período total de 14 dias (Tabela 1 do capítulo II). Os animais foram mantidos em condições experimentais adequadas e pesados no início de cada semana. Os parâmetros comportamentais foram avaliados 24 horas após a exposição ao último agente estressor com o TNF e teste do campo aberto.

#### **4.4. Modelo de Mania**

Este protocolo foi previamente proposto para avaliar o efeito de novos compostos na prevenção do episódio de mania, característico do THB (GHEDIM, *et al.*, 2012). Um esboço do protocolo utilizado está representado na Figura 1 do capítulo I; Figura 1 do capítulo III. O protocolo foi realizado por duas semanas sendo que nos sete primeiros dias os animais foram tratados com curcumina, *C. pachystachya*, ou veículo p.o. uma vez ao dia, ou com LiCl duas vezes ao dia. Entre os dias 8 e 14 os animais foram concomitantemente tratados com cetamina (25 mg/kg) ou veículo i.p. uma vez ao dia. No 15º dia de tratamento, os animais receberam uma única injeção de cetamina ou veículo e a atividade locomotora foi avaliada utilizando o teste de campo aberto após 30 minutos.

Para o tratamento com curcumina utilizamos 50 animais, os grupos experimentais foram: 1) salina/óleo de amendoim; 2) cetamina/óleo de amendoim; 3) salina/curcumina 20mg/kg; 4) cetamina/curcumina 20mg/kg; 5) salina/curcumina 50mg/kg; 6) cetamina/curcumina 50mg/kg; 7) salina/LiCl (45mg/kg); 8) cetamina/LiCl (45mg/kg).

Para o tratamento com *C. pachystachya* utilizamos 50 animais, os grupos experimentais foram os seguintes: 1) Salina/água; 2) cetamina/água; 3) salina/*C. pachystachya* 200mg/kg; 4) cetamina/*C. pachystachya* 200mg/kg; 5) salina/*C. pachystachya* 400mg/kg; 6) cetamina/*C. pachystachya* 400mg/kg; 7) salina/LiCl 45mg/kg; 8) cetamina/LiCl 45mg/kg.

#### **4.5. Testes comportamentais**

Alguns cuidados básicos foram sempre utilizados nos testes comportamentais, como a aclimatação dos animais na sala de comportamento no mínimo 1 hora antes do início dos testes, limpeza dos aparatos com álcool 10% entre cada sessão ou mudança da água no caso do teste do nado forçado.

#### **4.5.1. Teste do Nado Forçado (TNF)**

O TNF é um dos modelos comportamentais mais utilizados para detectar atividade antidepressiva de fármacos. O método original foi descrito por Porsolt (1977) e baseia-se na observação de que quando os animais são submetidos a uma situação onde não há possibilidade de escape, após um período de agitação inicial eles adotam uma postura de imobilidade. O camundongo é considerado imóvel quando flutua ou faz apenas movimentos necessários para manter sua cabeça acima da água. O tempo de imobilidade foi cronometrado durante 6 minutos em um cilindro plástico de 10 cm de diâmetro e 24 cm de altura contendo 19 cm de altura de água, à temperatura de  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . A redução no tempo de imobilidade é o efeito observado após a administração aguda de várias classes de fármacos antidepressivos (PORSOLT, *et al.*, 1977), já o aumento deste tempo caracterizará um estado “depressivo” dos animais ou um efeito depressogênico de fármacos.

#### **4.5.2. Teste do Campo Aberto**

Este modelo foi proposto por Hall (1936) para a avaliação da atividade locomotora dos animais. O aparato consiste em uma caixa de madeira medindo 40x60x50 cm, com o chão dividido em 12 quadrantes iguais. O número de quadrantes cruzados em um período de 6 minutos é o parâmetro utilizado para avaliar a atividade locomotora. O teste é feito em uma sala acusticamente isolada e com baixa luminosidade. Como fármacos que apresentam um efeito psicoestimulante podem representar um resultado “falso positivo” no TNF, o teste do campo aberto é imprescindível para se determinar a especificidade do efeito antidepressivo.

#### **4.6. Preparação do Tecido**

Os ratos foram decapitados imediatamente após os testes comportamentais e o CPF e HP foram dissecados manualmente, congelados imediatamente em gelo seco e armazenados à  $-80^{\circ}\text{C}$  até análise. Os camundongos foram eutanasiados por deslocamento cervical após os testes comportamentais, o CPF e HP foram dissecados e o mesmo procedimento do estudo em ratos será utilizado para conservação do material biológico. No momento das análises bioquímicas, as estruturas foram descongeladas e homogeneizadas em uma diluição de 1:10 (p/v) em tampão fosfato de sódio (20 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 20mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  e 140 mM KCl pH

7,4). Os homogenatos foram centrifugados a 3500 r.p.m. por 10 minutos à 4°C e o sobrenadante foi utilizado.

#### **4.7. Avaliação do Dano Oxidativo e da Atividade das Enzimas Antioxidantes**

##### **4.7.1. Determinação de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)**

Foi realizada pelo método de Esterbauer e Cheeseman (1990). As amostras reagiram com 10% de ácido tricloroacético e 0,67% de ácido tiobarbitúrico e em seguida foram aquecidas em banho seco por 1 hora. A curva de calibração foi realizada utilizando 1,1,3,3-tetrametoxipropano, seguindo o mesmo tratamento das amostras. A absorvância de TBARS foi determinada em 535 nm. Os resultados foram calculados em nmol de TBARS/mg de proteína (ESTERBAUER e CHEESEMAN, 1990).

##### **4.7.2. Medida do Conteúdo Tiólico Total**

Foi realizada pelo método de Aksenov e Markesbery (2001), o qual se baseia na redução de 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) por tióis resultando num derivado amarelo (TNB) cuja absorção é lida em 412 nm. Os resultados foram expressos em nmol de TNB/ mg de proteína (AKSENOV e MARKESBERY, 2001).

##### **4.7.3. Determinação da Atividade da Catalase (CAT)**

Foi determinada de acordo com o método descrito por Aebi (1984), baseado na decomposição da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, acompanhada a 240 nm, à temperatura ambiente. Os resultados foram expressos em unidades de atividade de catalase (sendo uma unidade definida como a quantidade de enzima que decompõe 1 µmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/min/mg de proteína) (AEBI, 1984).

##### **4.7.4. Determinação da Atividade da Superóxido Dismutase (SOD)**

O método utilizado foi realizado conforme descrito por Misra e Fridovich (1972). O método baseia-se na inibição de superóxido dismutase dependente da auto-oxidação de adrenalina em um comprimento de onda de 480 nm. Uma unidade de atividade de SOD é definida como a quantidade necessária para reduzir a velocidade da reação em 50%. Os resultados foram expressos em U/ mg de proteína (MISRA e FRIDOVICH, 1972).

##### **4.7.5. Medida dos Grupamentos Carbonil**

O dano oxidativo das proteínas foi avaliado pela determinação do teor de grupamentos carbonila baseado na reação com dinitrofenilhidrazina (DNPH), como descrito anteriormente (LEVINE, *et al.*, 1994). As proteínas foram precipitadas por adição de 20% de ácido tricloroacético e foram redissolvidos em DNPH. A absorvância dos grupamentos carbonila foi determinada em 370 nm. Os resultados foram expressos em nmol/mg de proteína.

#### **4.8. Determinação Proteica**

A concentração de proteína foi determinada pelo método de Lowry e colaboradores utilizando albumina bovina como padrão. O princípio do método de Lowry baseia-se numa mistura contendo molibdato tungstato e ácido fosfórico (reagente Folin-Ciocalteu), que sofre uma redução quando reage com proteínas na presença do catalisador cobre (II), e produz um composto com absorção máxima em 750 nm (LOWRY, *et al.*, 1951).

#### **4.9. Análise Estatística**

As análises estatísticas foram realizadas no programa GraphPad Prisma 5.0. Os resultados foram avaliados por análise de variância (ANOVA), de uma ou duas vias (de acordo com o protocolo experimental), seguido pelo post-hoc de Newman-Keuls quando apropriado. Um valor de  $P < 0,05$  foi considerado significativo.

## **CAPÍTULO I:**

Neuroprotective and Antioxidant Effects of Curcumin in a Ketamine- Induced Model of Mania in Rats. Publicado em *European Journal of Pharmacology*, 724 (2014) 132–139.



















## **CAPÍTULO II**

Antidepressant-like Effects of *Cecropia pachystachya* Leaves in a Mouse Model of Chronic Unpredictable Stress. Submetido para Brain Research Bulletin em 10/01/2014.

## **Antidepressant-like Effects of Aqueous Extract from *Cecropia pachystachya* Leaves in a Mouse Model of Chronic Unpredictable Stress**

Marta Gazal<sup>d‡</sup>, Caroline Flach Ortmann<sup>a‡</sup>, Fernanda Amelia Martins<sup>a</sup>, Emilio Luiz Streck<sup>b</sup>, João Quevedo<sup>b</sup>, Angela Machado de Campos<sup>a</sup>, Francieli M. Stefanello<sup>c</sup>, Gabriele Ghisleni<sup>d\*</sup>, Manuella P. Kaster<sup>d</sup>, Flávio Henrique Reginatto<sup>a</sup>; Claiton L. Lencina<sup>c\*</sup>.

<sup>a</sup>Programa de Pós-graduação em Farmácia – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil.

<sup>b</sup> Programa de Pós-graduação em Ciência da Saúde – Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, SC, Brasil.

<sup>c</sup> Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil.

<sup>d</sup> Programa de Pós-Graduação em Saúde e Comportamento – Universidade Católica de Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.

<sup>‡</sup> These authors equally contributed to this work

**Running Title:** Antidepressant and antioxidant-like effects of *Cecropia pachystachya*

\* Corresponding Authors

\* Gabriele Ghisleni

Programa de Pós-Graduação em Saúde e Comportamento, Centro de Ciências da Vida e da Saúde, Universidade Católica de Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.

Rua Gonçalves Chaves 373, 324C, 96015560, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil

Phone: +55 53 2128 8031 Fax: +55 53 2128 8229

E-mail address: [ghisleni.g@gmail.com](mailto:ghisleni.g@gmail.com)

\*Claiton L. Lencina

Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.

Campus Universitário Capão do Leão, corredor da Embrapa s/n, 96010-900. Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.

Phone: +55 53 32757233 Fax: +55 5332757453

E-mail address: [claiton.lencina@ufpel.edu.br](mailto:claiton.lencina@ufpel.edu.br)

**Abstract:**

Chronic stressful stimuli influence disease susceptibility to depression, cardiovascular, metabolic and neurodegenerative disorders. The present work investigated antidepressant and antioxidant properties of the aqueous extract from *Cecropia pachystachya* in a mouse model of chronic unpredictable stress (CUS). Our results indicated that acute administration of the aqueous extract (AE) from *Cecropia pachystachya* (200 and 400 mg/kg, p.o.) produced an antidepressant-like effect in the forced swimming test (FST). In addition, chronic treatment with *Cecropia pachystachya* extract (200 mg/kg, p.o., for 14 days) prevented the depressant-like effect but not the anxiogenic effect induced by CUS. In addition to the behavioural modifications, the 14 days of CUS increased lipid peroxidation in the hippocampus (HP) and prefrontal cortex (PFC) and decreased total thiol content in the HP. *Cecropia pachystachya* AE administration during CUS protocol was able to prevent the oxidative damage induced by stress. However, no changes were observed in the activity of the antioxidant enzymes superoxide dismutase and catalase in the above cited brain areas after the stress protocol and treatment. Our results suggest that *Cecropia pachystachya* prevented both depressive behavior and oxidative damage induced by CUS, supporting its neuroprotective potential against behavioral and biochemical dysfunctions induced by chronic stress.

**Keywords:** *Cecropia pachystachya*; antidepressant activity; antioxidant.



## 1. Introduction

Depressive disorders are severe psychiatric conditions with a lifetime prevalence approaching 16% in the population. These highly disabling disorders are predicted to become the second leading cause of disability by the year 2020 (Berton and Nestler, 2006). Unlike responses to acute stressful events that are protective and adaptive, repeated or chronic stress elicits neurochemical and neuroanatomical changes with deleterious consequences upon brain functioning (Nestler et al., 2002). Thus, chronic stress influences disease susceptibility and has been identified as a triggering factor for psychiatric disorders such as major depression (Berton and Nestler, 2006).

The exact neurochemical mechanisms underlying depression are not completely understood. However, clinical and preclinical studies suggested that oxidative stress might contribute to the etiology and progression of psychiatric disorders, including major depression (Ng et al., 2008). This hypothesis has a strong theoretical appeal, since the brain is considered particularly vulnerable to oxidative damage (Ng et al., 2008). In addition, there are several reports showing that chronic stress can increase the reactive oxygen species generation (ROS) in the several brain areas involved in the regulation of mood (Lucca et al., 2009; Moretti et al., 2012).

Available pharmacotherapy for depression is often associated with low remission rates and several undesirable effects (Berton and Nestler, 2006). Considering the prevalence and social impact of depression, alternative strategies to manage the impact of chronic stress in the neurodegenerative and behavioural patterns associated with the development of depressive disorder are urgently required. In this context, the search for novel pharmacotherapy approaches from medicinal plants has significantly progressed in the past decades. Several studies have shown that herbal therapies, like the St John's wort, might be effective approaches to manage and treat depressive disorders (Dhingra and Sarma, 2005).

*Cecropia pachystachya* Trécul (*Urticaceae*) is a typical tree of forest margins, and its leaves and bark are described in folk medicine as possessing antitussive, expectorant, antiasthmatic and hypoglycemic effects (Lorenzi and Matos, 2002). Previous studies reported the presence of flavonoids and phenolic compounds in the *Cecropia* sp leaves (Hikawczuk et al., 1998; Costa et al., 2011; Pathak et al., 2013). Moreover, pharmacological effects of *C. pachystachya* extracts as anti-inflammatory, cardiotoxic, sedative and antioxidant have been reported (Hikawczuk et al., 1998; Consolini et al., 2006; Aragão et al., 2013).

Thus, the aim of the present work was to examine the effect of the aqueous extract (AE) from leaves of *C. pachystachya* against behavioral and biochemical modification induced by chronic unpredictable stress in mice.

## **2. Materials and methods**

### **2.1. Chemical and reagents**

Acetic acid and acetonitrile (HPLC grade) were provided by Tedia® (Brazil). Water was purified on a MilliQ system (Millipore®, Bedford, USA). All solutions used in HPLC were filtered through a 0.45 µm membrane before use. Chlorogenic acid (3-O-caffeoylquinic acid, ≥ 98.0%), isovitexin (4',5,7-tetrahydroxyflavone-6-glucoside, ≥ 98.0%), isoquercitrin (3',4',5,7-tetrahydroxyflavone-3-O-glucoside, ≥ 98.0%), isoorientin (3',4',5,7-tetrahydroxyflavone-6-glucoside, ≥ 98.0%) and orientin (3',4',5,7-tetrahydroxyflavone-8-glucoside, ≥ 98.0%) were purchased from SigmaAldrich® Co. (St. Louis, USA).

### **2.2. Plant material and aqueous extract preparation**

Aerial parts of *Cecropia pachystachya* Trécul were collected in Viamão (State of Rio Grande do Sul) in March 2007. A voucher specimen (ICN 150025) was deposited in the Herbarium of Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil. The leaves of *C. pachystachya* were air-dried (35-40°C) for three days and then extracted by infusion. Briefly, powdered leaf material (100 g) was extracted with boiled distilled water (1000 mL, 90 °C) for 30 min, filtered, freeze-dried and stored at -20°C until use.

### **2.3. Chemical characterization by High-Performance Liquid Chromatography**

The qualitative and quantitative analyses of aqueous extract were performed as previously described (Costa et al., 2011). Briefly, a PerkinElmer Series 200 HPLC, composed by a Photo Diode Array Detector (PDA), quaternary pump, autosampler and online degasser were used. The data acquisition system was TotalChrom Workstation software. The separation was achieved on a Perkin Elmer Brownlee Choice C<sub>18</sub> column (150 x 4.6 mm i.d.; 5µm) and a gradient of solvent A (acetonitrile) and solvent B (acetic acid 1%, adjusted to pH 3.0) as follows: 5-20% A (0-30 min) and isocratic 20% A (30-40 min) as the mobile phase. The flow rate was kept at 1.0 mL/min. The chromatograms were recorded at 340 nm while the UV spectra were monitored over a range of 200-450 nm. All standard solutions were analyzed in triplicate.

## **2.4. Animals**

Male Swiss mice (8 weeks old, weighing 35–40 g) were obtained from the Central Animal House of the Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil. Animals were maintained under controlled environment ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ , 12h-light/dark cycle) and handled according to the Federation of Brazilian Societies for Experimental Biology guidelines upon approval by the Ethics Committee of the Federal University of Pelotas, Brazil (23110.009194/2013-90). All behavioral tests were carried out between 9:00 and 16:00 hours, with each animal used only once.

## **2.5. Acute experimental procedures and chronic unpredictable stress (CUS)**

Firstly, we performed a dose-response curve with *C. pachystachya* crude aqueous extract (AE) in the FST and open-field test. The extract was dissolved in distilled water and administered orally (p.o.) at doses of 50, 100, 200 and 400 mg/kg, 60 min before the behavioral tests.

A different group of animals was subject to CUS protocol. Animals were divided in four groups: control/vehicle, control/extract, CUS/vehicle and CUS/extract. The dose of 200 mg/kg of AE *C. pachystachya* was chosen based on the dose-response experiments. The CUS paradigm maximizes unpredictability and consists in a variety of stressors applied randomly and at different times of day during 14 days (Table 1). All control (i.e. non-stressed) and stressed animals were individually housed, but control mice were left undisturbed. Body weight was measured at the start of the stress period and again at the end of the protocol to calculate the total weight gain. In the CUS protocol, mice were submitted to the behavioural tests 24 hours after the last stressor.

## **2.6. Behavioral tests**

### **2.6.1. Forced swimming test**

Mice were individually forced to swim in an open cylindrical container (diameter 10 cm, height 25 cm), with 19 cm of water at  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ . The total amount of time that each animal remained immobile during a 6-min session was recorded as immobility time (Moretti et al., 2012). Each mouse was judged to be immobile when it ceased struggling and remained floating motionless in the water, making only those movements necessary to keep its head above water. A decrease in the duration of immobility is indicative of an antidepressant-like effect).

### **2.6.2. Open-field test**

Locomotor behavior was monitored using an open-field apparatus. The apparatus consisted of a wooden box measuring 40×60×50 cm with a frontal glass wall. The floor of the arena was divided into 12 equal squares and placed in a sound-free room. Animals were placed in the rear left square and left to freely explore the apparatus. The number of squares crossed with all paws (crossing) was counted in a 6-minute section. The apparatus was cleaned up with a 10% alcohol solution and dried after each individual mouse session.

### **2.7. Biochemical assay**

Mice were killed by decapitation immediately after the open-field test. The prefrontal cortex (PFC) and the hippocampus (HP) were manually dissected and homogenized in 10 volumes (1:10 w/v) of 20 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4 containing 140 mM KCl. Homogenates were centrifuged at 750 x *g* for 10 min at 4°C. The pellet was discarded and the supernatant was immediately separated and used for the stress oxidative measurements. The protein content was quantified by the method of Lowry et al. (1951), using bovine serum albumin as a standard.

#### **2.7.1. Thiobarbituric acid reactive species formation (TBARS)**

The lipid peroxidation was determined by TBARS, according to the protocol described by Esterbauer and Cheeseman (1990). Briefly, homogenates were mixed with trichloroacetic acid 10% and thiobarbituric acid 0.67% and heated in a boiling water bath for 25 min. TBARS levels were determined at 535 nm and the results were reported as nmol of TBARS per mg of protein.

#### **2.7.2. Total sulfhydryl content**

This assay was performed as described by Aksenov and Markesbery (2001). The method is based on the reduction of DTNB by thiols, which in turn, becomes oxidized (disulfide) generating a yellow derivative (TNB) whose absorption is measured spectrophotometrically at 412 nm. Briefly, homogenates were added to PBS buffer pH 7.4 containing EDTA. The reaction was started by the addition of 5,5'-dithio-*bis*(2-nitrobenzoic acid) (DTNB). Results were reported as μmol TNB per mg of protein.

### **2.7.3. Catalase (CAT) assay**

CAT activity was determined by the method described by Aebi (1984). The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> disappearance was continuously monitored during 90 s in a spectrophotometer adjusted at 240 nm. CAT specific activity was reported as units of enzyme per mg of protein.

### **2.7.4. Superoxide dismutase (SOD) assay**

SOD activity was measured by the method described by Misra and Fridovich (1972). This method is based on the inhibition of superoxide dependent adrenaline auto-oxidation in a spectrophotometer adjusted at 480 nm. The specific activity of SOD was reported as units per mg of protein.

## **2.8. Statistical analysis**

All experimental results are given as the mean  $\pm$  S.E.M. Statistical analysis was performed by two-way ANOVA except in the dose-response experiments where one-way ANOVA was performed. In all cases, Newman–Keuls test was applied for post-hoc comparison when appropriate. A value of  $P \leq 0.05$  was considered to be significant.

## **3. Results**

### **3.1. Chemical characterization of AE by HPLC**

The phenolic characterization of *C. pachystachya* AE was performed as Costa and colleagues (Costa et al., 2011). It was possible to identify five major compounds of the AE by comparing their UV spectra and the retention times (HPLC) with standard references. According to chromatogram (Fig. 1) were identified chlorogenic acid (1) isoorientin (2) orientin (3) isovitexin (4) and isoquercetrin (5).

### **3.2. Acute antidepressant-like effect of *C. pachystachya* in the mouse FST**

The results showed that AE (200 and 400 mg/kg, p.o.) administered 60 min before the FST (Fig. 2A) significantly decreased the immobility time [ $F_{(4,19)} = 3.79, p=0.02$ ] The specific antidepressant-like effect of AE was further confirmed in the open-field test since no global change of locomotion was observed (Fig 2B) [ $F_{(4,19)} = 1.94, p=0.16$ ]. In addition, the administration of AE (50, 100, 200 and 400 mg/kg, p.o) 60 min prior to testing did not

produced changes in the anxiogenic profile of mice, evaluated by the percentage of central exploration in the open-field test (Fig. 2C),  $[F_{(4,19)}=1.08, p=0.40]$ .

### 3.3. Antidepressant-like effect of *C. pachystachya* in the CUS model of depression

After mice were exposed to the 14 days protocol of chronic unpredictable stress (CUS, see Table 1) it is possible to verify a reduction in the gain of weight (Fig 3A), an increase in the immobility time in the forced swim test (Fig 3B), indicative of a depression-like state and a decrease in the percentage of central crossings in the open-field test, indicative of an anxiogenic behaviour (Fig 3 D). No significant modifications were observed in the number of crossings in an open field task indicating the lack of altered locomotion. This behavioural profile validates our CUS protocol and enabled us to test the effect of *C. pachystachya*.

The administration of the AE (200 mg/kg, p.o.) for 14 days (during all the CUS protocol) prevented the depressant-like effect of CUS in the FST  $[F_{(1,37)}=97.62, p<0.001]$ . Interestingly, the reduction in weight gain and the anxiogenic-like effect of CUS in the open-field test were not prevented by AE of *C. pachystachya* ( $[F_{(1,37)}=0.0001, p=0.99$  and  $F_{(1,35)}=4.30, p=0.40$ , respectively). In order to rule out non-specific motor effects that could influence activity in the other behavioural tasks, mice were also evaluated in the open-field task for total number of crossings. Neither control nor stress mice, treated with the AE or vehicle, displayed any significant alteration in the ambulatory behaviour in the open-field test ( $[F_{(1,37)}=2.15, p=0.15]$ ), suggesting that the antidepressant-like effects of *C. pachystachya* are not related to modified locomotor activity (Fig 3C).

### 3.4. Measurement of oxidative stress parameters in the prefrontal cortex (PFC)

Fig. 4A shows that AE of *C. pachystachya* (200 mg/kg, p.o.) was able to prevent the increase in TBARS levels induced by chronic unpredictable stress in the PFC (*C. pachystachya* treatment:  $[F_{(1,33)}=0.50, p=0.48]$ , stress:  $[F_{(1,33)}=6.65, p=0.01]$ , interaction:  $[F_{(1,33)}= 12.65, p<0.01]$ ). In addition, Fig. 4B neither CUS nor *C. pachystachya* (200 mg/kg) treatment changed the sulfhydryl content in the PFC (*C. pachystachya* treatment:  $[F_{(1,33)}=1.59, p=0.21]$ , stress:  $[F_{(1,33)}=0.85 p=0.36]$ , interaction:  $[F_{(1,33)}=0.14, p=0.70]$ ).

As shown in Fig. 4C neither the CUS nor the *C. pachystachya* treatment changed the activity of CAT in the PFC (treatment:  $[F_{(1,33)}=1.06, p=0.30]$ , stress:  $[F_{(1,33)}=2.09, p=0.15]$ , interaction:  $[F_{(1,33)}=1.74, p=0.19]$ ). In addition, no differences were found in the SOD activity after CUS protocol or *C. pachystachya* administration (treatment:  $[F_{(1,27)}=2.12, p=0.15]$ , stress:  $[F_{(1,26)}=0.81, p=0.37]$ , interaction:  $[F_{(1,27)}=2.76, p=0.10]$ ).

### 3.5. Measurement of oxidative stress parameters in the hippocampus (HP)

The effects of AE of *C. pachystachya* in oxidative stress parameters in the HP were evaluated. As depicted in Fig. 5A, *C. pachystachya* treatment (200 mg/kg, p.o.) was able to prevent increase in the TBARS levels induced by CUS in mice (stress: [ $F_{(1,32)}=27.72, p<0.001$ ], treatment: [ $F_{(1,32)}=26.50, p<0.001$ ], interaction: [ $F_{(1,32)}=30.17, p<0.001$ ]). The results in Fig. 5B demonstrated that the treatment with AE (200 mg/kg, p.o.) also prevented the decrease in the sulfhydryl content induced by CUS in the HP (*C. pachystachya* treatment [ $F_{(1,31)}=34.68, p<0.001$ ], stress: [ $F_{(1,31)}=0.43, p=0.43$ ], interaction: [ $F_{(1,33)}=11.17, p<0.01$ ]).

Finally no changes were observed in CAT activity (Fig. 5C) in the HP (treatment: [ $F_{(1,32)}=0.23, p=0.63$ ], stress: [ $F_{(1,32)}=8.23, p<0.01$ ], interaction: [ $F_{(1,32)}=0.82, p=0.37$ ]). In addition, neither CUS nor *C. pachystachya* treatment were able to modify SOD activity (treatment: [ $F_{(1,26)}=1.82, p=0.18$ ], stress: [ $F_{(1,26)}=1.13, p=0.29$ ], interaction: [ $F_{(1,27)}=0.54, p=0.38$ ]).

## 4. Discussion

The present study showed that acute administration of AE of *C. pachystachya* produced an antidepressant-like effect in the FST. In addition, after chronic treatment, the AE was able to prevent the depressive-like effect and the oxidative damage induced by chronic unpredictable stress in mice. Rocha et al (2007) showed that the AE of *Cecropia glaziovii* has antidepressant properties in animal models probably through the inhibition of monoamine reuptake (Rocha et al., 2007). However, this is the first report showing behavioral and neurochemical effects of AE of *C. pachystachya* in preclinical models of depression.

Phytochemical analysis of the AE of *C. pachystachya* leaves showed isoorientin and chlorogenic acid as the major compounds, as well as orientin, isovitexin and isoquercitrin (Costa et al., 2011). The biological activity of many medicinal plants and other natural products are directly related to their flavonoid and phenolic content (Rice-Evans 2004). Literature data showed that chlorogenic acid has anxiolytic, antioxidant and neuroprotective activities (Bouayed et al., 2007; Pathak et al., 2013). In addition, flavonoids, like the isoorientin, are well known by their antioxidant properties, preventing oxidative stress, which is believed to be one of the causes of many psychiatric disorders (Grosso et al., 2013). Sena et al. (2009) reported that the antidepressant-like effect of *Passiflora edulis* was related to the

isoorientin, the major compound found in the AE of *C. pachystachya*. In addition, the antidepressant-like effect of this flavonoid is dependent on the serotonergic neurotransmission, since it was inhibited by the irreversible tryptophan hydroxylase inhibitor, *p*-chlorophenylalanine (Sena et al., 2009). Park and colleagues also demonstrated an antidepressant-like activity of chlorogenic acid isolated from *Artemisia capillaris*, and suggested that the mechanism of action is dependent on  $\beta$ -endorphin release (Park et al., 2010). Thus, the presence of chlorogenic acid and isoorientin in the AE of *C. pachystachya* might underlie its antidepressant activity.

The FST is one of the most commonly used animal models to detect and characterize the efficacy of antidepressant compounds and is sensitive to most of these drugs after acute administration. This predictive test is based on the observation that animals, after initial escape-oriented movements, develop an immobile posture when placed in an acute but inescapable stressful situation (Moretti et al., 2012, McGonigle 2013). In the present study, acute treatment with *C. pachystachya* extract showed an antidepressant-like effect in the FST, without changing the ambulatory or anxiety-related behaviors evaluated in the open-field test.

After the initial evaluation, chronic administration of *C. pachystachya* extract was tested in an animal model of depression induced by chronic stress. In this study, chronic treatment with *C. pachystachya* extract did not produce an antidepressant-like effect *per se* in the FST, but completely prevented both the depressive-like state and the oxidative damage induced by CUS. Chronic stress acts as a predisposing factor in the onset of depression in humans (McEwen et al., 2000). Several studies indicated that animal models of stress are able to induce depressive-like states in rodents (Kubera et al., 2001; Joels et al., 2004; McGonigle 2013). Among these models, CUS is probably the most related to the depressive human situation since the rodents exposed to this model develop a number of behavioural, morphological and hormonal changes typical of depression (McGonigle 2013).

The present study showed a reduction in body-weight gain and an anxiogenic behavior in mice subjected to CUS associated with the depressive phenotype. The lower weight gain observed in stressed animals has been previously reported in several models of stress (Magarinos et al., 1999). Interestingly, *C. pachystachya* treatment did not prevent the low weight gain in mice subjected to CUS. Our results are in agreement with this hypothesis since the exposure of mice to CUS also produced an anxiogenic phenotype. However, the



anxiogenic effect of CUS was not prevented by *C. pachystachya* treatment, suggesting that the antidepressant effect of the extract is not related to changes in anxiogenic profile observed in stressed mice.

Oxidative stress is an important factor involved in the pathophysiology of major neuropsychiatric disorders, including major depression (Ng et al., 2008). Increase ROS levels generate deleterious effects on signal transduction, structural plasticity and cellular resilience, mostly by inducing lipid peroxidation in membranes, damage to proteins and nucleic acids (Mahadik et al., 2001). Our study shows that CUS induces oxidative damage by increasing the amount of TBARS in the PFC and HP of mice. Indeed, literature data show that chronic stress increase reactive oxygen species generation (ROS) in several brain regions (Lucca et al., 2009; Moretti et al., 2012). However, as far as we aware, this is the first work to report that *C. pachystachya* treatment was able to prevent this effect. Besides that, our results demonstrated a decrease in the total thiol content induced by CUS that was also prevented by *C. pachystachya* treatment only in the HP. These promising antioxidants results could be explained by accumulation of phenolic compounds and flavonoids shown to AE of this specie.

Differences in the vulnerability to damage between brain regions were already described (Candelario-Jalil et al., 2001). The mechanisms underlying this phenomenon are far from being understood and might be related to oxidative stress susceptibility or heterogeneous distribution of glucocorticoid receptors in these areas. Another relevant finding of our work was that CUS-induced oxidative damage was not accompanied by changes in the activity of the antioxidant enzymes SOD and CAT neither in the PFC nor in the HP.

Despite the large number of current pharmacological treatments for depression, the success rate of medication is no more than 50–60%, which means that at least 40% of the patients do not respond to the initial treatment (Nestler et al., 2002). Moreover, most drugs used to manage depression are poorly tolerated, reducing the adhesion of patients to treatment (Sleath et al., 2003). Therefore, there is a need for the research and development of more effective and well-tolerated antidepressant compound. This study show, that the AE of *C. pachystachya* leaves, produced a significant antidepressant-like response in the FST and was capable to prevent both the depression-like behavior and the oxidative damage induced by

chronic stress in mice, indicating that this plant could play an attractive tool for the treatment of depressive disorders.

### **Conflict of interest**

There is no conflict of interest.

### **Acknowledgements**

We would like to thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico [CNPq, MCTI (Grants 302516/2012-3, and 481070/2012-5), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC, Grant 6944/2011-2) for their financial support. The authors are also grateful to CNPq and CAPES for their research fellowships.

## References

- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105,121-126.
- Aksenov, M.Y., Markesbery, W.R. (2001). Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters* 302, 141-145.
- Aragao, D.M., Lima, I.V., da Silva, J.M., Bellozi, P.M., da Costa, J.de C., Cardoso, G.M., de Souza-Fagundes, E.M., Scio, E. (2013). Anti-inflammatory, antinociceptive and cytotoxic effects of the methanol extract of *Cecropia pachystachya* Trecul. *Phytotherapy Research* 27, 926-930.
- Berton, O., Nestler, E.J. (2006). New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. *Nature Review. Neuroscience* 7, 137-151.
- Bouayed, J., Rammal, H., Dicko, A., Younos, C., Soulimani, R. (2007). Chlorogenic acid, a polyphenol from *Prunus domestica* (Mirabelle), with coupled anxiolytic and antioxidant effects. *Journal of the Neurological Science* 262, 77-84.
- Candelario-Jalil, E., Al-Dalain, S.M., Castillo, R., Martinez, G., Fernandez, O.S. (2001) Selective vulnerability to kainate-induced oxidative damage in different rat brain regions. *Journal of Applied Toxicology* 21, 403-407.
- Consolini, A.E., Ragone, M.I., Migliori, G.N., Conforti, P., Volonte, M.G. (2006). Cardiotoxic and sedative effects of *Cecropia pachystachya* Mart. (ambay) on isolated rat hearts and conscious mice. *Journal of Ethnopharmacology* 106, 90-96.
- Costa, G.M., Schenkel, E.P., Ortmann, C.F. and Reginatto, F.H. (2011). An HPLC-DAD Method to Quantification of Main Phenolic Compounds from Leaves of *Cecropia* Species. *Brazian Chemical Society*. 26, 1096-1102.
- Dhingra, D., Sarma, A.(2005). A review on antidepressant plants. *Natural Product Radiance* 5, 144-150.
- Esterbauer, H., Cheeseman, K.H. (1990). Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol* 186, 407-21.
- Grosso, C., Valentao, P., Ferreres, F., Andrade, P.B. (2013). The use of flavonoids in central nervous system disorders. *Current Medicinal Chemistry. In Press*.
- Hikawczuk, V., Saad, J., Guardia, T., Juarez, A., Giordano, O. (1998). Anti-inflammatory activity of compounds isolated from *Cecropia pachystachya*. *Anales de la Asociación Química Argentina* 86, 167-170.

- Joels, M., Karst, H., Alfarez, D., Heine, V.M., Qin, Y., van Riel, E., Verkuyl, M., Lucassen, P.J., Krugers, H.J. (2004). Effects of chronic stress on structure and cell function in rat hippocampus and hypothalamus. *Stress* 7, 221-231.
- Lorenzi, H., Matos, F. (2008). *Plantas Mediciniais no Brasil: Nativas e Exóticas*. Instituto Plantarium de Estudos da Flora Ltda, Nova Odessa.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* 193, 265-275.
- Lucca, G., Comim, C.M., Valvassori, S.S., Reus, G.Z., Vuolo, F., Petronilho, F., Dal-Pizzol, F., Gavioli, E.C., Quevedo, J. (2009). Effects of chronic mild stress on the oxidative parameters in the rat brain. *Neurochemistry International* 54, 358-362.
- Magarinos, A.M., Deslandes, A. McEwen, B.S. (1999). Effects of antidepressants and benzodiazepine treatments on the dendritic structure of CA3 pyramidal neurons after chronic stress. *European Journal of Pharmacology* 371, 113-122.
- Mahadik, S.P., Evans, D., Lal, H (2001). Oxidative stress and role of antioxidant and omega-3 essential fatty acid supplementation in schizophrenia. *Progress in Neuropsychopharmacol Biological Psychiatry* 25, 463-493.
- McEwen, B.S. (2000). The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. *Brain Research* 886, 172-189.
- McGonigle, P. (2013). *Animal Models of CNS Disorders*. Biochemical Pharmacology. In Press.
- Misra, H.P., Fridovich, I. (1972). The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase *The Journal of Biological Chemistry* 247, 3170-3175.
- Moretti, M., Colla, A., de Oliveira Balen, G., dos Santos, D.B., Budni, J., de Freitas, A.E., Farina, M., Severo Rodrigues, A.L. (2012). Ascorbic acid treatment, similarly to fluoxetine, reverses depressive-like behavior and brain oxidative damage induced by chronic unpredictable stress. *Journal Psychiatry Research* 46, 331-340.
- Nestler ,E.J., Barrot, M., DiLeone, R.J., Eisch, A.J., Gold, S.J., Monteggia, L.M. (2002). Neurobiology of depression. *Neuron* 34, 13-25.
- Ng, F., Berk, M., Dean, O., Bush, A.I. (2008). Oxidative stress in psychiatric disorders: evidence base and therapeutic implications. *The International Journal Neuropsychopharmacol* 11, 851-876.

- Park, S.H., Sim, Y.B., Han, P.L., Lee, J.K., Suh, H.W. (2010). Antidepressant-like effect of chlorogenic acid isolated from *Artemisia capillaris* Thunb. . *Animal Cells and Systems* 14, 253-259.
- Pathak, L., Agrawal, Y., Dhir, A. (2013). Natural polyphenols in the management of major depression. *Expert Opinion Investigational Drugs* 22, 863-880.
- Rice-Evans, C. (2004). Flavonoids and isoflavones: absorption, metabolism, and bioactivity. *Free Radical Biology & Medicine* 36, 827-8.
- Rocha, F.F., Lima-Landman, M.T., Souccar, C., Tanae, M.M., De Lima, T.C., Lapa, A.J. (2007). Antidepressant-like effect of *Cecropia glazioui* Sneth and its constituents - in vivo and in vitro characterization of the underlying mechanism. *Phytomedicine* 14, 396-402.
- Sena, L.M., Zucolotto, S.M., Reginatto, F.H., Schenkel, E.P., De Lima, T.C. (2009). Neuropharmacological activity of the pericarp of *Passiflora edulis* flavicarpa degener: putative involvement of C-glycosylflavonoids. *Experimental Biology & Medicine* (Maywood) 234, 967-975.
- Sleath, B., Wurst, K., Lowery, T. (2003). Drug information sources and antidepressant adherence. *Community Mental Health J* 39, 359-368.

**Table 1:** Schedule of stressor agents used in the 14-day of chronic stressful stimuli.

Day	Stressor	Duration	Time of day
1	Restraint	1.5h	10:30 a.m.
2	Cold swim (15°C)	10 min	15:30 p.m.
3	Wet wood shavings/box housing tilted (45°)	16h	10:30 a.m.
4	Tail pinch	10min	14:30 p.m.
5	Tail suspension	6min	8:00 a.m.
6	Food and water deprivation	16h	12:00 p.m.
7	Stimuli smell (acetic acid)	16h	16:00 p.m.
8	Restraint	1.5h	14:30 p.m.
9	Cold swim (15°C)	10 min	9:00 a.m.
10	Wet wood shavings/box housing tilted (45°)	16h	10:00 a.m.
11	Tail pinch	10min	14:00 p.m.
12	Food and water deprivation	16h	8:00 a.m.
13	Tail suspension	6min	12:00 a.m.
14	Restraint	1.5h	10:00 a.m.

## Legends and Figures:

**Figure. 1:** HPLC chromatogram of AE of *C. pachystachya*. 1. Chlorogenic acid; 2. Isoorientin; 3. Orientin; 4. Isovitexin; 5. Isoquercitrin. Chromatographic conditions: see experimental section.

**Figure. 2:** Effect of AE of *C. pachystachya* (50, 100, 200 and 400 mg/kg, p.o.) in the forced swimming test (FST, A), ambulatory evaluation in the open-field test (B), and anxiety- related behavior in the open-field test (C). Data was expressed as the mean (s)  $\pm$  S.E.M. (n =6-10 for group). (\*\*) Denotes  $p < 0.01$  as compared to the vehicle /*C. pachystachya*.

**Figure. 3:** Effect of chronic unpredictable stress (CUS) and AE of *C. pachystachya* (200 mg/kg, p.o.) in the weight gain (A), forced swimming test (FST, B), ambulatory behavior in the open-field test (C) and anxiety- related behavior in the open-field test (D). Data was expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. (n =6-10 for group). (\*\*) Denotes  $p < 0.01$  as compared to the vehicle/control group. (#) Denotes  $p < 0.05$  as compared to vehicle/CUS group.

**Figure. 4:** Effects of chronic unpredictable stress (CUS) and AE of *C. pachystachya* (200 mg/kg, p.o.) on TBARS formation (A), total thiol content (B), catalase (CAT, D), and superoxide dismutase (SOD, C) activity in the prefrontal cortex (PFC) of mice. Data was expressed as mean  $\pm$  S.E.M. (n =6-10 for group). (\*\*) Denotes  $p < 0.01$  as compared to the vehicle/control group. (#) Denotes  $p < 0.05$  as compared to vehicle/CUS group.

**Figure. 5:** Effects of chronic unpredictable stress (CUS) and AE of *C. pachystachya* (200 mg/kg,p.o.) on TBARS formation (A), total thiol content (B), catalase (CAT, D) and superoxide dismutase (SOD, C) activity in the hippocampus (HP) of rats. Data was expressed as mean + S.E.M. (n =6-10 for group). (\*\*) Denotes  $p < 0.01$  as compared to the vehicle/control group. (#) Denotes  $p < 0.05$  as compared to vehicle/CUS group.

Figure 1.

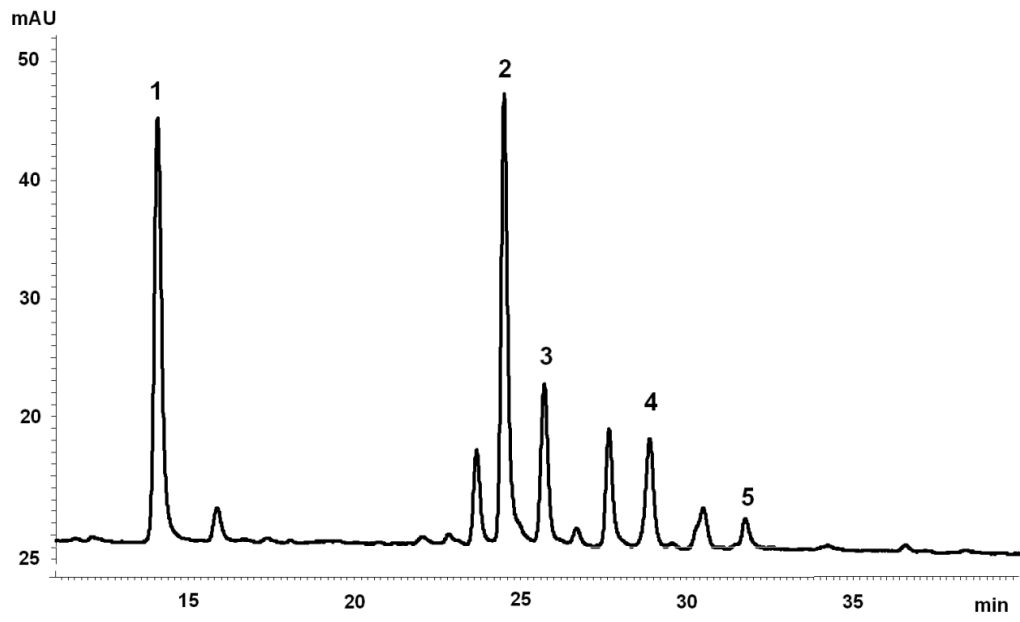




Figure 2.

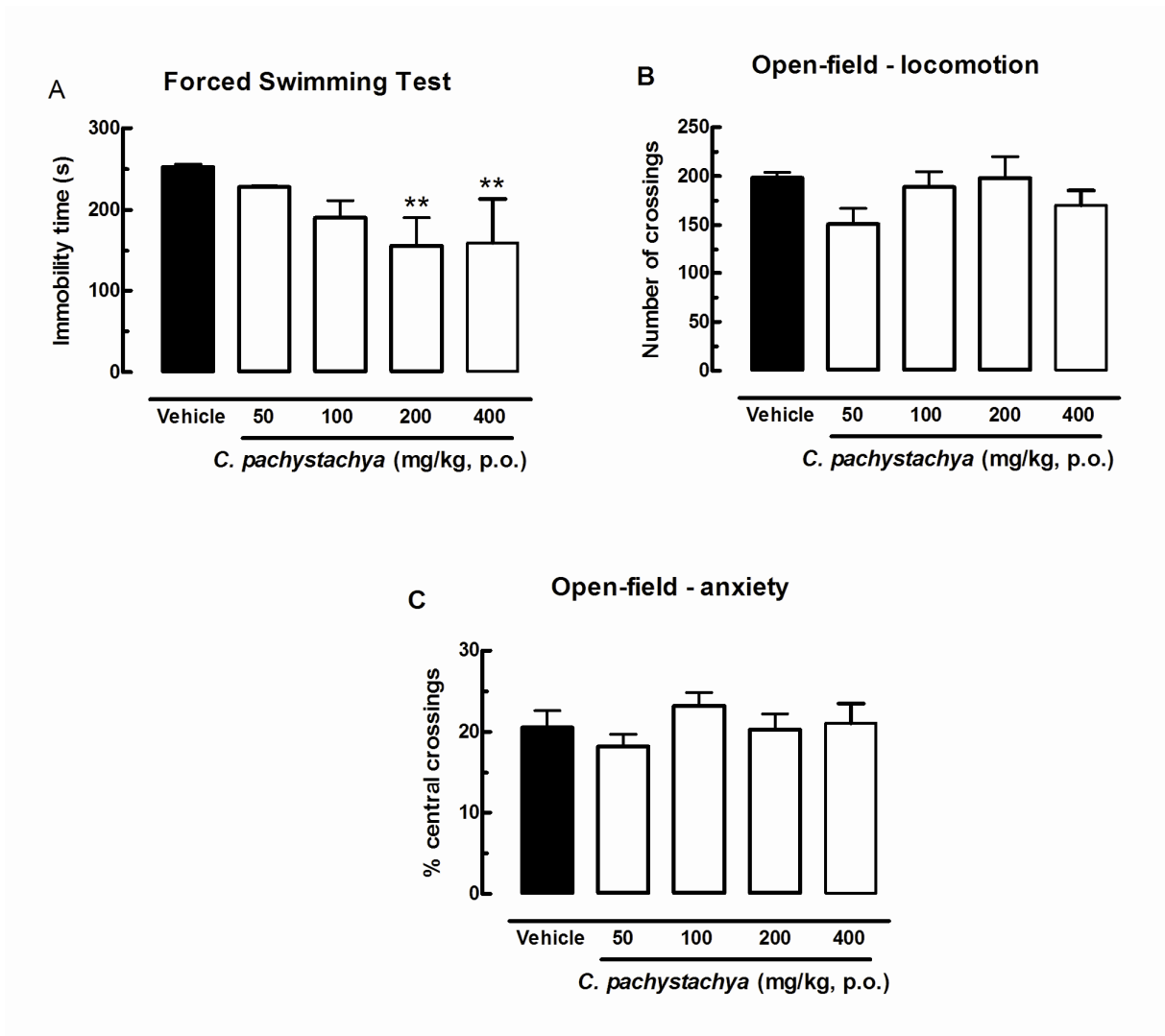
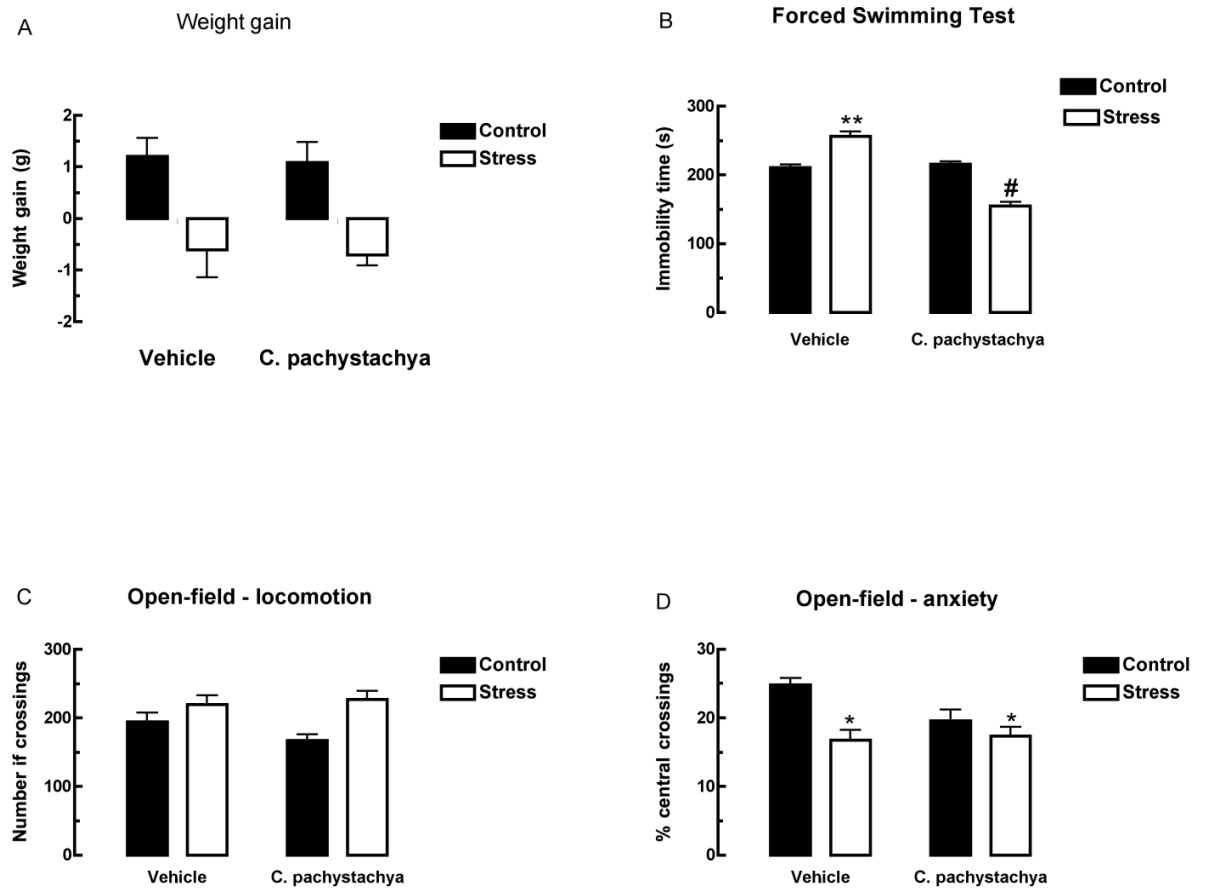
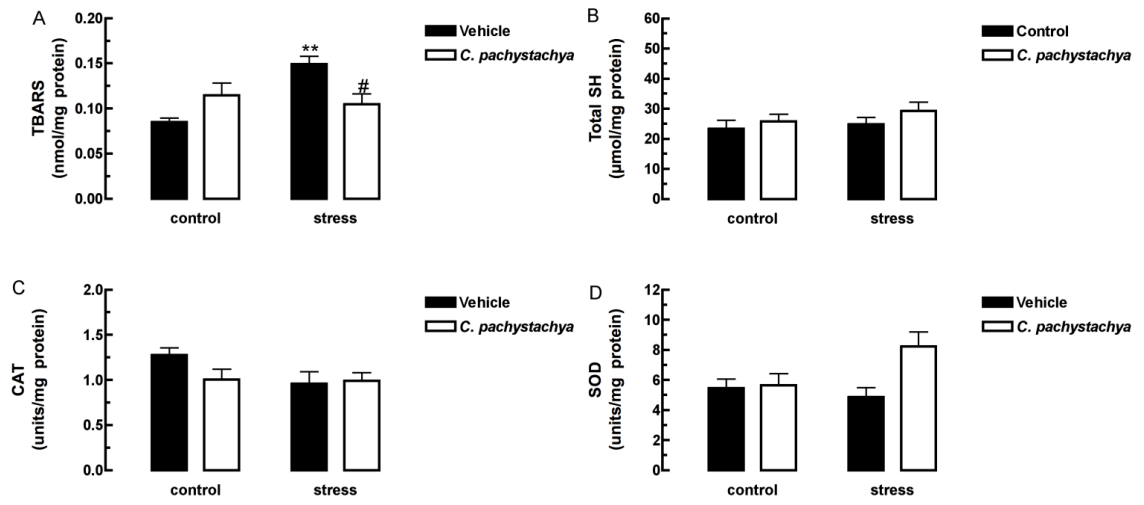


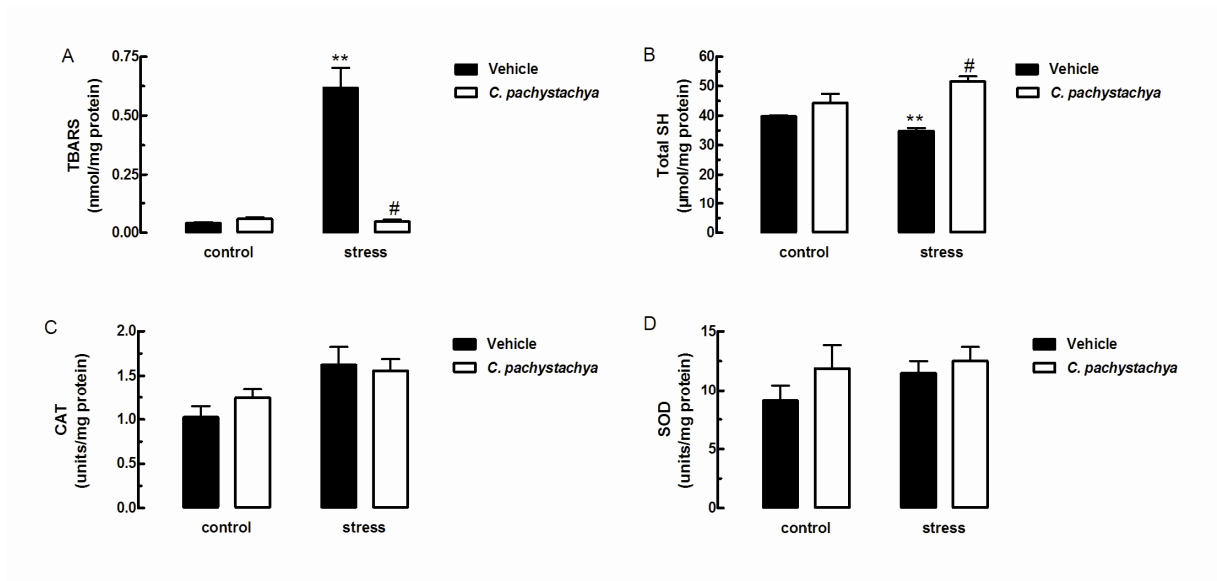
Figure 3.



**Figura 4.**



**Figure 5.**



### **CAPÍTULO III**

Preventive effect of *Cecropia pachystachya* Against Ketamine-Induced Manic Behavior and Oxidative Stress in Rats

**Preventive effect of *Cecropia pachystachya* against ketamine-induced manic behavior and oxidative stress in rats**

Marta Gazal<sup>a</sup>, Fernanda N. Kaufmann<sup>a</sup>, Bruna A. Acosta<sup>a</sup>, Francieli M. Stefanello<sup>b</sup>, Flávio Henrique Reginatto<sup>c</sup>; Régis Sturbelle<sup>a</sup>, Manuella P. Kaster<sup>a</sup>, Claiton L. Lencina<sup>b</sup>, Gabriele Ghisleni<sup>a\*</sup>.

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Saúde e Comportamento – Universidade Católica de Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.

<sup>b</sup> Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil.

<sup>c</sup>Programa de Pós-graduação em Farmácia – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil.

\*Corresponding Author

Gabriele Ghisleni (ghisleni.g@gmail.com)

Programa de Pós-Graduação em Saúde e Comportamento, Centro de Ciências da Vida e da Saúde, Universidade Católica de Pelotas, Pelotas, Brasil.

Rua Gonçalves Chaves 373

96015560

Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil

Phone: +55 53 2128 8031

FAX: +55 53 2128 8229

**Abstract:**

*Cecropia* species are widely used in traditional medicine by its antioxidant and anti-inflammatory properties. In the present study, we investigated the neuroprotective and antioxidant effect of the aqueous extract from *Cecropia pachystachya* in a rat model of mania induced by ketamine. The results indicated that ketamine treatment (25 mg/kg i.p., for 8 days) induced hyperlocomotion in the open-field test and oxidative damage in prefrontal cortex and hippocampus, evaluated by increased lipid peroxidation and carbonyl protein formation. Moreover, ketamine treatment reduced the activity of the antioxidant enzymes superoxide dismutase and catalase in hippocampus. Pretreatment of rats with aqueous extract from *Cecropia pachystachya* (200 and 400 mg/kg, p.o., for 14 days) or with lithium chloride (45 mg/kg p.o, for 14 days, used as a positive control) prevented both behavioral and pro-oxidant effects of ketamine. These findings suggest that *Cecropia pachystachya* might be an useful tool for preventive intervention in bipolar disorder, reducing the episode relapse and the oxidative damage associated with the manic phase of this disorder.

**Keyword:** *Cecropia pachystachya*, ketamine, mania, antioxidant, neuroprotective.

## 1. Introduction

Bipolar disorder (BD) is a severe and chronic psychiatric condition with an estimated prevalence around 1-3% in the worldwide population (Calabrese et al., 2003; Merikangas et al., 2007; Tang and Wang 2012). The clinical course of this disease is characterized by the occurrence of one or more manic episodes that often cycles with euthymic and depressive states. It has been increasingly recognized that recurrent episodes influence the outcome of BD by increasing a patient's vulnerability to subsequent episodes and reducing the treatment response (Ketter et al., 2006).

The pathophysiological mechanisms underlying BD are still unknown and include genetic variations, dysregulation of neurotransmitter systems and neural networks, neuroinflammation and neurodegeneration (Andreazza et al., 2008; Martinowich et al., 2009). In this context, the oxidative stress plays an important role triggering the cellular process associated with the development and progression of several neurological and psychiatric disorders, including BD (Andreazza et al., 2008; Kapczinski et al., 2011).

Oxidative stress occurs when there is an imbalance between the production of reactive oxygen species (ROS) and the antioxidant defense leaning towards increased levels of oxidants. In these situations, several biomolecules including the membrane lipids, proteins, and DNA can be damage, ultimately leading to cell death (Gandhi and Abramov, 2012). Since the brain is particularly susceptible to oxidative stress, considerable attention has been given to the role of ROS in the development of neuropsychiatric disorders (Ng et al., 2008). Preclinical studies conducted in animal models of mania have suggested that oxidative stress is a major feature associated with the neurodegeneration and behavioral alterations observed in these models (Valvassori et al, 2008; Frey et al., 2006; Ghedim et al., 2012; Gazal et al., 2014). Furthermore, clinical studies also indicate high systemic markers of oxidative damage in BD patients, suggesting that this biological phenomena accompany illness etiology and progression (Frey et al., 2007; Andreazza et at., 2008; Kapczinski et al., 2011).

Despite continued efforts to optimize pharmacological treatment for individuals with psychiatric disorders, efficacy and tolerability of medication remains highly variable. Recently, a growing abundance of preclinical and clinical studies reveal a range of complex psychotropic activity from herbal medicines potentially beneficial for treating certain psychiatric conditions (Sarris et al., 2011). The infusion of *Cecropia pachystachya* leaves is used in the traditional medicine for the treatment of some clinical diseases mainly due to its antitusive, cardiogenic, expectorant and antiasthmatic effects (Lorenzi and Matos, 2002). In



addition, pharmacological studies also reported anti-inflammatory, sedative and antioxidant effects (Hikawczuk et al., 1998; Consolini et al., 2006; Aragão et al., 2013). These properties of *C. pachystachya* might represent an interesting tool to manage the neurodegeneration associated with psychiatric conditions.

Considering the impact of BD on patients and society, there is an urgent need for the development of early intervention strategies aimed to better efficacy of treatment. Prevention of future episodes with natural compounds could avoid the substantial negative consequences associated with the disease (Leopold, 2013). In this context, the present work hypothesized that administration of aqueous extract (AE) from *C. pachystachya* might prevent some of the behavioral and neurochemical modifications in a model of mania induced by ketamine in rats.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1. Chemical and reagents**

Acetic acid and acetonitrile (HPLC grade) were provided by Tedia<sup>®</sup> (Brazil). Water was purified on a MilliQ system (Millipore<sup>®</sup>, Bedford, USA). All solutions used in HPLC were filtered through a 0.45 µm membrane before use. Chlorogenic acid (3-*O*-caffeoylquinic acid, ≥ 98.0%), isovitexin (4',5,7-tetrahydroxyflavone-6-glucoside, ≥ 98.0%) isoquercitrin (3',4',5,7-tetrahydroxyflavone-3-*O*-glucoside, ≥ 98.0%), isoorientin (3',4',5,7-tetrahydroxyflavone-6-glucoside, ≥ 98.0%) and orientin (3',4',5,7-tetrahydroxyflavone-8-glucoside, ≥ 98.0%) were purchased from SigmaAldrich<sup>®</sup> Co. (St. Louis, USA). Ketamine and Lithium Chloride (LiCl) were purchased from Sigma Aldrich<sup>®</sup> Co. (St. Louis, USA).

### **2.2. Plant material and aqueous extract preparation**

Aerial parts of *C. pachystachya* Trécul were collected in Viamão (State of Rio Grande do Sul) in March 2007. A voucher specimen (ICN 150025) was deposited in the Herbarium of Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil. The leaves of *C. pachystachya* were air-dried (35-40°C) for three days and then extracted by infusion. Briefly, powdered leaf material (100 g) was extracted with boiled distilled water (1000 mL, 90°C) for 30 min, filtered, freeze-dried and stored at -20°C until use.

### **2.3. Chemical characterization by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)**

The phenolic characterization of AE *C. pachystachya* was performed as described by Costa and colleagues (Costa et al., 2011). It was possible to identify by HPLC, five major compounds from AE *C. pachystachya* by comparing their ultraviolet spectra and retention

times with standard references. According to chromatogram, were identified the chlorogenic acid, isoorientin, orientin, isovitexin and isoquercetrin (Costa et al., 2011).

#### **2.4. Animals and drug treatments**

Female adult Wistar rats aged 11-12 weeks (250 – 300 g) were obtained from the Central Animal House of the Federal University of Pelotas, RS, Brazil. Animals were maintained under controlled environment ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ , 12h-light/dark cycle, free access to food and water) and handled according to the Federation of Brazilian Societies for Experimental Biology guidelines upon approval by the Ethics Committee of the Federal University of Pelotas, Brazil (9194). The following drugs were used: 1) ketamine dissolved in saline solution (NaCl 0.9%, w/v) administered by intraperitoneal route (i.p.); 2) AE *C. pachystachya* administered by oral route (p.o.); 3) LiCl dissolved in (NaCl 0.9%, w/v) and administered by p.o. route twice a day. Appropriated vehicle groups were also assessed simultaneously. The doses of ketamine and LiCl used in the present study were chosen according to the literature (Ghedim et al., 2012; Bruning et al., 2012). The *C. pachystachya* AE doses were previously determined by a dose response curve evaluated in the forced swim test and open field test (Unpublished data).

#### **2.5. Experimental protocol of mania state**

This protocol was designed to mimic the prevention protocol of the mania state, as previously proposed by Ghedim and colleagues (2012). Rats received saline, *C. pachystachya* 200 mg/kg and 400 mg/kg once a day and LiCl 45 mg/kg twice a day for 14 days. From the 8<sup>th</sup> to the 14<sup>th</sup> day the animals also received saline or ketamine (25 mg/kg), once a day, totaling eight experimental groups: saline/saline, ketamine/saline, saline/LiCl 45 mg/kg, ketamine/LiCl 45 mg/kg, saline/*C. pachystachya* 200 mg/kg, ketamine/*C. pachystachya* 200 mg/kg; saline/*C. pachystachya* 400 mg/kg, and ketamine/*C. pachystachya* 400 mg/kg. On the 15<sup>th</sup> day of treatment, the animals received a single injection of ketamine or saline and the locomotor activity was assessed in the open-field apparatus after 30 min (Fig. 1).

#### **2.6. Open-field test**

Locomotor and anxiety-related behavior was monitored using an open-field apparatus, as previously described (Gazal et al., 2014). The apparatus consisted of a wooden box measuring 40 x 60 x 50 cm. The floor of the arena was divided into 12 equal squares and placed in a sound free room. Animals were placed in the rear left square and left to explore it

freely for 5 min. The total number of squares crossed with all paws (crossing) was counted in order to evaluate the ambulatory behavior. The number of central crossings was the measure used to evaluate anxiety. The apparatus was cleaned up with a 10% alcohol solution and dried after each individual rat session.

## **2.7. Biochemical assay**

Rats were killed by decapitation immediately after the open-field test. Prefrontal cortex (PFC) and hippocampus (HP) were manually dissected and homogenized in 10 volumes (1:10 w/v) of 20 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4 containing 140 mM KCl. Homogenates were centrifuged at 750 x g for 10 min at 4°C, the pellet was discarded and the supernatant was immediately separated and used for the stress oxidative measurements. The protein content was quantified by the method of Lowry et al. (1951), using bovine serum albumin as a standard.

### **2.7.1. Thiobarbituric acid reactive species formation (TBARS)**

The measure of lipid peroxidation was determined by TBARS in according to protocol described by Esterbauer and Cheeseman (1990). Briefly, homogenates were mixed with trichloroacetic acid 10% and thiobarbituric acid 0.67% and heated in a boiling water bath for 25 min. TBARS was determined by the absorbance at 535 nm. Results were reported as nmol of TBARS per mg of protein.

### **2.7.2. Carbonyl protein formation**

The oxidative damage to proteins was assessed by the determination of carbonyl groups content based on the reaction with dinitrophenylhydrazine (DNPH), as previously described (Levine et al., 1994). Proteins were precipitated by addition of 20% trichloroacetic acid and were re-dissolved in DNPH. The absorbance was monitored spectrophotometrically at 370 nm. Results were reported as nmol carbonyl per mg of protein.

### **2.7.3. Total sulfhydryl content (SH content)**

This assay was performed as described by Aksenov and Markesbery (2001) which is based on the reduction of DTNB by thiols, which in turn, becomes oxidized (disulfide) generating a yellow derivative (TNB) whose absorption is measured spectrophotometrically at 412 nm. Briefly, homogenates were added to PBS buffer pH 7.4 containing EDTA. The

reaction was started by the addition of 5,5'-dithio-*bis*(2-nitrobenzoic acid) (DTNB). Results were reported as  $\mu\text{mol TNB}$  per mg of protein.

#### **2.7.4. Catalase (CAT) assay**

CAT activity was assayed by the method of Aebi (1984).  $\text{H}_2\text{O}_2$  disappearance was continuously monitored during 90 s in a spectrophotometer adjusted at 240 nm. CAT specific activity was reported as units of enzyme per mg of protein.

#### **2.7.5. Superoxide dismutase (SOD) assay**

Total SOD activity was measured by the method described by Misra and Fridovich (1972). This method is based on the inhibition of superoxide dependent adrenaline auto-oxidation in a spectrophotometer adjusted at 480 nm. The specific activity of SOD was reported as units per mg of protein.

### **2.8. Statistical analysis**

Comparisons between experimental groups were performed by one-way or two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni *post-hoc* test when appropriate. The values are expressed as mean  $\pm$  S.E.M.  $p < 0.05$  was considered significant.

## **3. Results**

### **3.1. Behavioral characterization focusing on ambulatory performance**

The treatment with ketamine was efficient to induce hyperlocomotion in rats, as evaluated by the increase in the number of crossings in the open-field test. This locomotor parameter is an indicative of mania episode as suggested by Ghedim et al. (2012). Notably, as presented in Fig. 2, AE *C. pachystachya* pretreatment (200 and 400 mg/kg) and LiCl pretreatment (45 mg/kg) prevented the hyperlocomotion induced by ketamine in the open-field test (pretreatment: [ $F(3,40) = 3.52, p < 0.01$ ], ketamine treatment: [ $F(1,40) = 16.42, p < 0.01$ ], interaction: [ $F(3,40) = 7.50, p < 0.05$ ]). No changes in the anxiety behavior, evaluated by the percentage of central crossings, were observed in the ketamine, AE *C. pachystachya* and/or LiCl treatment (pretreatment: [ $F(3,41) = 0.57, p = 0.64$ ], ketamine treatment: [ $F(1,41) = 0.27, p = 0.61$ ], interaction: [ $F(3,41) = 1.51, p = 0.23$ ]) (Data not shown).

### 3.2. Measurement of oxidative stress parameters in the prefrontal cortex (PFC)

In order to evaluate a neuroprotective effect of AE *C. pachystachya* against ketamine-induced model of mania, we studied the effects of AE *C. pachystachya* and/or LiCl in PFC oxidative stress parameters. Fig. 3A shows that AE *C. pachystachya* (200 and 400 mg/kg) and/or LiCl (45 mg/kg) pretreatment were able to prevent the increase in TBARS levels induced by ketamine administration in PFC (pretreatment: [ $F(3,41)=9.20, p<0.01$ ], ketamine treatment: [ $F(1,41)=0.01, p=0.92$ ], interaction: [ $F(3,41) =10.60, p<0.01$ ]). Fig. 3B indicated that AE *C. pachystachya* (200 and 400 mg/kg) and/or LiCl (45 mg/kg) pretreatment administration prevented the protein damage induced by ketamine. The two-way ANOVA revealed a significant increase in the carbonyl protein formation induced by ketamine, and a significant prophylactic effect of AE *C. pachystachya* and LiCl (pretreatment: [ $F(3,31)=7.76, p<0.01$ ], ketamine treatment: [ $F(1,31)=12.98, p<0.01$ ], interaction: [ $F(3,41)=7.78, p<0.01$ ]). In addition, Fig. 3C shows that LiCl (45 mg/Kg) alone is able to increase the SH content in relation to control group ( $p<0.01$ ). Moreover, AE *C. pachystachya* (200 and 400 mg/kg) and/or LiCl (45 mg/kg) pretreatment prevented the decrease in SH content induced by ketamine in PFC (pretreatment: [ $F(3,39)=53.17, p<0.01$ ], ketamine treatment: [ $F(1,39)=6.30, p<0.05$ ], interaction: [ $F(3,39)=6.51, p<0.01$ ]). We then compared the activity of the antioxidant enzymes SOD and CAT. As shown in Fig. 3D ketamine administration did not change the activity of SOD in the PFC, as well no interaction were observed with AE *C. pachystachya* (200 and 400 mg/kg) and/or LiCl (45 mg/kg) (pretreatment: [ $F(3,34)=1.50, p=0.23$ ], treatment: [ $F(1,34)=0.84, p=0.37$ ], interaction: [ $F(1,34)=2.70, p=0.07$ ]). There was also no evident difference in the CAT activity between groups (pretreatment: [ $F(3,41)=4.95, p<0.01$ ], treatment: [ $F(1,41)=0.33, p=0.60$ ], interaction: [ $F(3,41)=1.19, p=0.33$ ]).

### 3.3. Measurement of oxidative stress parameters in the hippocampus (HP)

We next have evaluated the effects of AE *C. pachystachya* in oxidative stress parameters in the HP. As depicted in Fig. 4A, AE *C. pachystachya* (200 and 400 mg/kg) and/or LiCl (45 mg/kg) pretreatment were able to prevent increase in the TBARS levels induced by ketamine administration in rats (pretreatment: [ $F(3,36)=4.97, p<0.01$ ], treatment: [ $F(1,36)=3.35, p=0.07$ ], interaction: [ $F(3,36)=3.31, p<0.05$ ]). Fig. 4B indicated that AE *C. pachystachya* (200 and 400 mg/kg) and/or LiCl (45 mg/kg) pretreatment administration prevented the carbonyl protein formation induced by ketamine, (pretreatment: [ $F(3,28)=2.82, p=0.06$ ], ketamine treatment: [ $F(1,28)=11.14, p<0.01$ ], interaction: [ $F(3,28)=5.24, p<0.01$ ]).

The results in Fig. 4C demonstrated that ketamine treatment did not change the total SH content when compared to the control group. However, LiCl pretreatment (45 mg/kg) associated to ketamine treatment increased the SH in the hippocampus of rats (pretreatment [F(3,41)=29.85,  $p<0.01$ ] ketamine treatment: [F(1,41)=1.61,  $p=0.21$ ], interaction: [F(2,33)=29.85,  $p<0.01$ ]). Notably, Fig. 4D shows that SOD activity was significantly decreased by ketamine and this effect was completely prevented by AE *C. pachystachya* (200 and 400 mg/kg) and/or LiCl (45 mg/kg) - pretreated groups (pretreatment: [F(3,34)=19.47,  $p<0.01$ ], ketamine treatment: [F(1,34)=1.44,  $p=0.24$ ], interaction: [F(3,34)=9.81,  $p<0.01$ ]). In addition, Fig. 4E also indicated that ketamine-treated rats had a decrease in CAT activity, and the pretreatment with both doses of AE *C. pachystachya* (200 and 400 mg/kg) was not able to prevent this effect (pretreatment: [F(3,35)=3.19,  $p<0.05$ ], ketamine treatment: [F(1,35)=17.87,  $p<0.01$ ], interaction: [F(3,35)=3.60,  $p<0.05$ ]).

#### 4. Discussion

Despite the challenge in replicating the complex symptoms associated with psychiatric disorders, animal models have been successfully able to mimic some of the neurochemical and physiological characteristics of these conditions (Kato et al., 2007). In the present study, we showed at the first time that the oral administration of AE *C. pachystachya* prevent behavioral and biochemical changes observed in the mania model induced by the administration of ketamine in rats.

Ketamine is a dissociative anesthetic that acts as a noncompetitive antagonist of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) glutamate receptor. This receptor is found especially in the HP and cerebral cortex, critical areas involved in several behavioral functions, including emotional patterns, memory processing and cognition. The administration of ketamine mimics several behavioral (e.g., hyperactivity) and neurochemical alterations observed in individuals with BD experiencing a mania episode. In this context, previous studies showed changes in the activity of glutamate receptors as well decreased expression of NMDA receptor subunits in the hippocampus of animals submitted to a pharmacological model of BD (Kugaya and Sanacora, 2005; Maeng and Zarate, 2007; Mccullumsmith et al., 2007). Moreover, ketamine administration induces a substantial release of presynaptic glutamate, increasing the firing rate of neurons after inhibition of GABAergic inputs (Moghaddam et al., 1997). Thus, several clinical and preclinical studies suggest that the glutamatergic system may represent a novel

therapeutic target for severe mood disorders (Coyle and Duman, 2003; Maeng and Zarate, 2007).

Previous studies have established that conventional mood stabilizers, such as lithium and valproate are able to prevent the alterations observed in ketamine-treated animals, thereby indicating the predictive validity of the model (Ghedim et al., 2012; Gazal et al., 2014). Moreover, preclinical studies demonstrated that the glutamatergic system abnormalities are involved in the pathophysiology of BD, pointing to the potential construct validity of this model (Kugaya and Sanacora, 2005; Maeng and Zarate, 2007). Our work corroborates and extends these data suggesting that this protocol fulfills adequate characteristics as an animal model of mania, reinforcing previous proposals that both glutamatergic system and oxidative stress might be involved in this particular episode of BD (Andreazza et al., 2008; Machado-Vieira, 2012).

In fact, oxidative stress has been implicated in the pathophysiology of BD (Ng et al., 2008). Increased ROS levels generate deleterious effects on signal transduction, structural plasticity and cellular resilience, mostly by inducing lipid peroxidation in membranes, damage to proteins and nucleic acids (Mahadik et al., 2001). Indeed, literature data show that mania model increases reactive oxygen species generation in several brain regions (Brocardo et al., 2010; Ghedim et al., 2012; Gazal et al., 2014). Our results showed that mania model induces oxidative damage by increasing the amount of TBARS and carbonyl protein formation in the PFC and HP of rats. Moreover, our data reveals that ketamine reduced the activity of antioxidant enzymes SOD and CAT in the HP. These effects can be explained by higher vulnerability of hippocampal neurons to neurodegenerative process as evidenced in the excitotoxicity, inflammation, ischemia, and traumatic injuries (Candelario-Jalil et al., 2001; Geddes et al., 2003).

However, as far as we aware, this is the first work reporting the preventive effects of *C. pachystachya* treatment in oxidative parameters induced by ketamine. These promising antioxidants results could be explained by the accumulation of phenolic compounds and flavonoids observed in the AE of this specie. Phytochemical analysis of the AE *C. pachystachya* leaves showed the presence of isoorientin and chlorogenic acid as the major compounds, as well as orientin, isovitexin and isoquercetrin (Costa et al., 2011). The biological activity of many medicinal plants and other natural products are directly related to their content of flavonoid and phenolic compounds (Rice-Evans, 2004). Literature data showed that chlorogenic acid has anxiolytic, antioxidant and neuroprotective activities

(Bouayed et al., 2007; Pathak et al., 2013). In addition, flavonoids, like the isoorientin, are well known by their antioxidant properties, preventing oxidative stress, which is believed to trigger neurodegeneration in these animal models, as well as in the clinical condition (Grosso et al., 2013).

Preclinical studies have showed that antioxidant compounds like folic acid and alpha-lipoic acid are able to prevent behavioral and neurochemical changes in ouabain and D-amphetamine models of mania (Brocardo et al., 2012; Macêdo et al., 2012). A previous work from our group showed that curcumin, another natural antioxidant agent, prevented the hyperlocomotion and the oxidative stress induced by ketamine in rats (Gazal et al., 2014). From the clinical point of view, a couple of studies investigated the potential of inositol, a member of vitamin B family in BD (Chengappa et al., 2000; Eden Evins et al., 2006). In addition, the antioxidant N-acetyl-cysteine has been extensively used in combination with BD pharmacotherapies, showing higher effectivity in the clinical trials (Sarris et al., 2011). Therefore, it is becoming clear that compounds with antioxidant properties could improve manic symptoms, counteract neurodegeneration associated with oxidative stress and should be explored as possible adjunct therapy.

The finding that AE of *C. pachystachya*, like LiCl, is able to prevent ketamine-induced biochemical and behavioral alterations is noteworthy. It is important to highlight that in our study AE of *C. pachystachya* administration produced similar protective effects to the well-established mood stabilizer lithium, used as a positive control. This finding may be of therapeutic relevance suggesting a potential role for *C. pachystachya* in the treatment of mania and possibly in the management of BD. Moreover, our findings support the hypothesis that the prevention of oxidative stress is a main mechanism that accounts for the etiology and progression of BD.

#### **Conflict of interest**

No conflict declared.

#### **Acknowledgements**

This work was supported by CNPq, FAPERGS and CAPES Brazil. We thank the team at the UFPel animal facility for managing the animals.



## References

- Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984;105:121-126.
- Aksenov MY, Markesbery WR. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 2001;302:141-145.
- Andreazza AC, Kauer-Sant'anna M, Frey BN, et al. Oxidative stress markers in bipolar disorder: a meta-analysis. *J Affect Disord* 2008;111:135-144.
- Aragao DM, Lima IV, da Silva JM, et al. Anti-inflammatory, antinociceptive and cytotoxic effects of the methanol extract of *Cecropia pachystachya* Trecul. *Phytother Res* 2013;27:926-930.
- Bouayed J, Rammal H, Dicko A, Younos C, Soulimani R. Chlorogenic acid, a polyphenol from *Prunus domestica* (Mirabelle), with coupled anxiolytic and antioxidant effects. *J Neurol Sci* 2007; 262:77-84.
- Brocardo PS, Budni J, Pavesi E, et al. Folic acid administration prevents ouabain-induced hyperlocomotion and alterations in oxidative stress markers in the rat brain. *Bipolar Disord* 2010;12:414-424.
- Bruning CA, Prigol M, Luchese C, Pinton S, Nogueira CW. Diphenyl diselenide ameliorates behavioral and oxidative parameters in an animal model of mania induced by ouabain. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2012; 38:168-174.
- Calabrese V, Scapagnini G, Giuffrida-Stella AM. Mitochondrial involvement in brain function and dysfunction: relevance to aging, neurodegenerative disorders and longevity. *Neurochemistry Research* 2003; 64:425-432.
- Candelario-Jalil E, Al-Dalain SM, Castillo R, Martinez G, Fernandez, OS. Selective vulnerability to kainate-induced oxidative damage in different rat brain regions. *Journal of Applied Toxicology* 2001; 21, 403-407
- Chengappa KN, Levine J, Gershon S, et al. Inositol as an add-on treatment for bipolar depression. *Bipolar Disord* 2000; 2:47-55.
- Consolini AE, Ragone MI, Migliori GN, Conforti P, Volonte MG. Cardiotoxic and sedative effects of *Cecropia pachystachya* Mart. (ambay) on isolated rat hearts and conscious mice. *J Ethnopharmacol* 2006;106:90-96.
- Costa GM, Ortmann CF, Schenkel EP, Reginatto FH. An HPLC-DAD Method to Quantification of Main Phenolic Compounds from Leaves of *Cecropia* Species. *Braz Chem Soc* 2011;26:1096-1102.

- Eden Evins A, Demopulos C, Yovel I, et al. Inositol augmentation of lithium or valproate for bipolar depression. *Bipolar Disord* 2006;8:168-174.
- Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol* 1990;186:407-421.
- Frey BN, Valvassori SS, Reus GZ, et al. Effects of lithium and valproate on amphetamine-induced oxidative stress generation in an animal model of mania. *J Psychiatry Neurosci* 2006;31:326-332.
- Gandhi S, Abramov AY. Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration. *Oxid Med Cell Longev* 2012:428010.
- Gazal M, Valente MR, Acosta BA, et al. Neuroprotective and antioxidant effects of curcumin in a ketamine-induced model of mania in rats. *Eur J Pharmacol* 2014;724C:132-139.
- Ghedim FV, Fraga DB, Deroza PF, et al. Evaluation of behavioral and neurochemical changes induced by ketamine in rats: implications as an animal model of mania. *J Psychiatr Res* 2012; 46:1569-1575.
- Geddes DM, LaPlaca MC, Cargill RS. Susceptibility of hippocampal neurons to mechanically induced injury. *Exp Neurol* 2003; 184, 420-427.
- Grosso C, Valentao P, Ferreres F, Andrade PB. The use of flavonoids in central nervous system disorders. *Curr Med Chem* 2013. *In Press*.
- Hikawczuk V, Saad J, Guardia T, Juarez A, Giordano O. Anti-inflammatory activity of compounds isolated from *Cecropia pachystachya*. *Anales de la Asociación Química Argentina* 1998;86:167-170.
- Kapczinski F, Dal-Pizzol F, Teixeira AL, et al. Peripheral biomarkers and illness activity in bipolar disorder. *J Psychiatr Res* 2011;45:156-161.
- Kato T, Kubota M, Kasahara T. Animal models of bipolar disorder. *Neurosci Biobehav Rev* 2007;31:832-842.
- Ketter TA, Houston JP, Adams DH, Risser RC, Meyers AL, Williamson DJ, et al. Differential efficacy of olanzapine and lithium in preventing manic or mixed recurrence in patients with bipolar I disorder based on number of previous manic or mixed episodes. *J Clin Psychiatry*. 2006;67:95-101.
- Kugaya A, Sanacora G. Beyond monoamines: glutamatergic function in mood disorders. *CNS Spectr* 2005;10:808-819.

- Kuloglu M, Ustundag B, Atmaca M, et al. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme levels in patients with schizophrenia and bipolar disorder. *Cell Biochem Funct* 2002;20:171-175.
- Leopold K, Pfennig A, Severus E, Bauer M. [Prevention of bipolar disorders.]. *Nervenarzt* 2013.
- Levine RL, Williams JA, Stadtman ER, Shacter E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 1994;233:346-357.
- Lorenzi H, Matos F. *Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas*. Instituto Plantarium de Estudos da Flora Ltda, Nova Odessa 2008.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-275.
- Macedo DS, Medeiros CD, Cordeiro RC, et al. Effects of alpha-lipoic acid in an animal model of mania induced by D-amphetamine. *Bipolar Disord* 2012;14:707-718.
- Machado-Vieira R. Purinergic system in the treatment of bipolar disorder: uric acid levels as a screening test in mania. *J Clin Psychopharmacol* 2012;32:735-736.
- Maeng S, Zarate CA, Jr. The role of glutamate in mood disorders: results from the ketamine in major depression study and the presumed cellular mechanism underlying its antidepressant effects. *Curr Psychiatry Rep* 2007;9:467-474.
- Mahadik SP, Evans D, Lal H. Oxidative stress and role of antioxidant and omega-3 essential fatty acid supplementation in schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2001;25:463-493.
- Martinowich K, Schloesser RJ, Manji HK. Bipolar disorder: from genes to behavior pathways. *J Clin Invest* 2009;119:726-736.
- Merikangas KR, Akiskal HS, Angst J, et al. Lifetime and 12-month prevalence of bipolar spectrum disorder in the National Comorbidity Survey replication. *Arch Gen Psychiatry* 2007;64:543-552.
- Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972;247:3170-3175.
- Ng F, Berk M, Dean O, Bush AI. Oxidative stress in psychiatric disorders: evidence base and therapeutic implications. *Int J Neuropsychopharmacol* 2008;11:851-876.
- Pathak L, Agrawal Y, Dhir A. Natural polyphenols in the management of major depression. *Expert Opin Investig Drugs* 2013;22:863-880.

- Rice-Evans C. Flavonoids and isoflavones: absorption, metabolism, and bioactivity. *Free Radic Biol Med* 2004;36:827-828.
- Sarris J, Mischoulon D, Schweitzer I. Adjunctive nutraceuticals with standard pharmacotherapies in bipolar disorder: a systematic review of clinical trials. *Bipolar Disord* 2011;13:454-465.
- Tang V, Wang J-F. Oxidative Stress in Bipolar Disorder. *Biochemistry and Analytical Biochemistry* 2012.
- Valvassori SS, Petronilho FC, Reus GZ, et al. Effect of N-acetylcysteine and/or deferoxamine on oxidative stress and hyperactivity in an animal model of mania. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2008; 32:1064-1068.

## Legends to the Figures:

**Figure 1:** Treatment protocol

**Figure 2:** Effect of AE *C. pachystachya* pretreatment (200 and 400 mg/kg) and lithium chloride pretreatment (45 mg/kg) on ketamine-induced hyperactivity in the open-field test. The number of crossings was recorded. Data was expressed as the mean (s)  $\pm$  S.E.M. (n =5-7 for group). (\*\*) Denotes  $p < 0.01$  as compared to the vehicle/saline group. (#) Denotes  $p < 0.05$  as compared to the vehicle/ketamine group.

**Figure 3:** Effect of AE *C. pachystachya* pretreatment (200 and 400 mg/kg) and lithium chloride pretreatment (45 mg/kg) on TBARS formation (A); protein carbonyl (B); total SH content (C); superoxide dismutase (SOD, D); and catalase (CAT, E) activity in the prefrontal cortex (PFC) of rats. Data was expressed as mean (s)  $\pm$  S.E.M. (n =5-7 for group). (\*\*) Denotes  $p < 0.01$  and (\*)  $p < 0.05$  as compared to the vehicle/saline group. (#) Denotes  $p < 0.05$  as compared to the vehicle/ketamine group.

**Figure 4:** Effect of AE *C. pachystachya* pretreatment (200 and 400 mg/kg) and lithium chloride pretreatment (45 mg/kg) on TBARS formation (A); protein carbonyl (B); total SH content (C); superoxide dismutase (SOD, D); and catalase (CAT, E) activity in the hippocampus (HP) of rats. Data was expressed as mean (s)  $\pm$  S.E.M. (n =5-7 for group). (\*\*) Denotes  $p < 0.01$  and (\*)  $p < 0.05$  as compared to the vehicle/saline group. (#) Denotes  $p < 0.05$  as compared to the vehicle/ketamine group.

**Figure 1.**

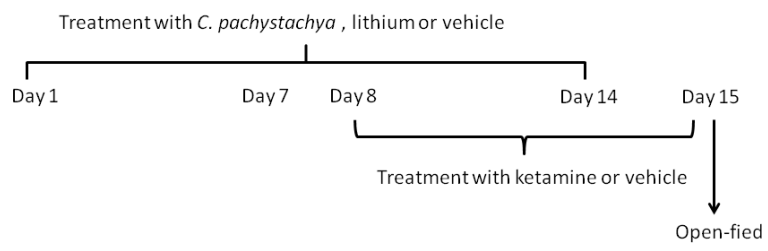
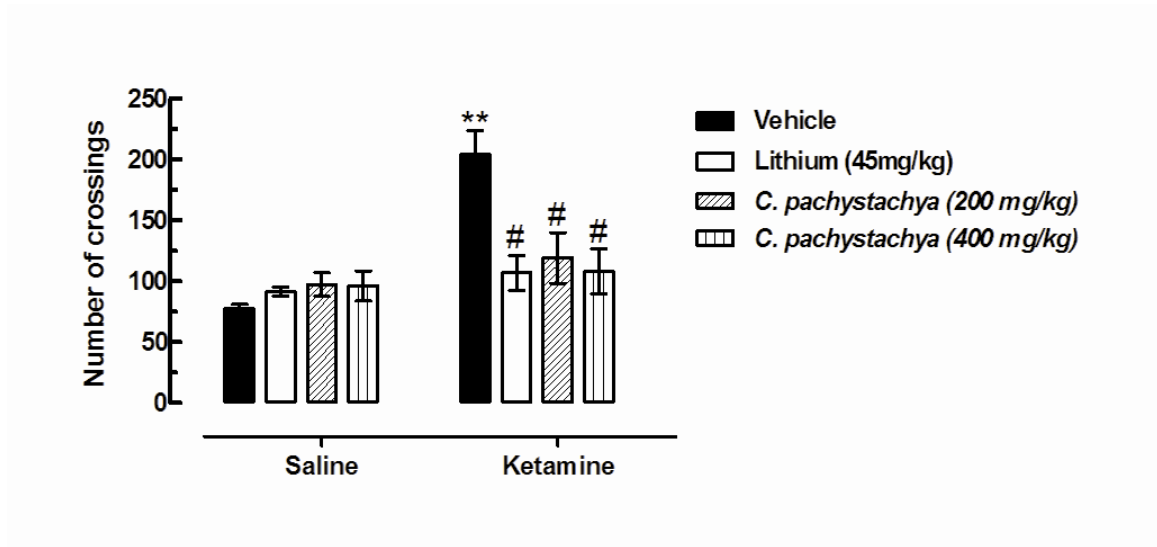
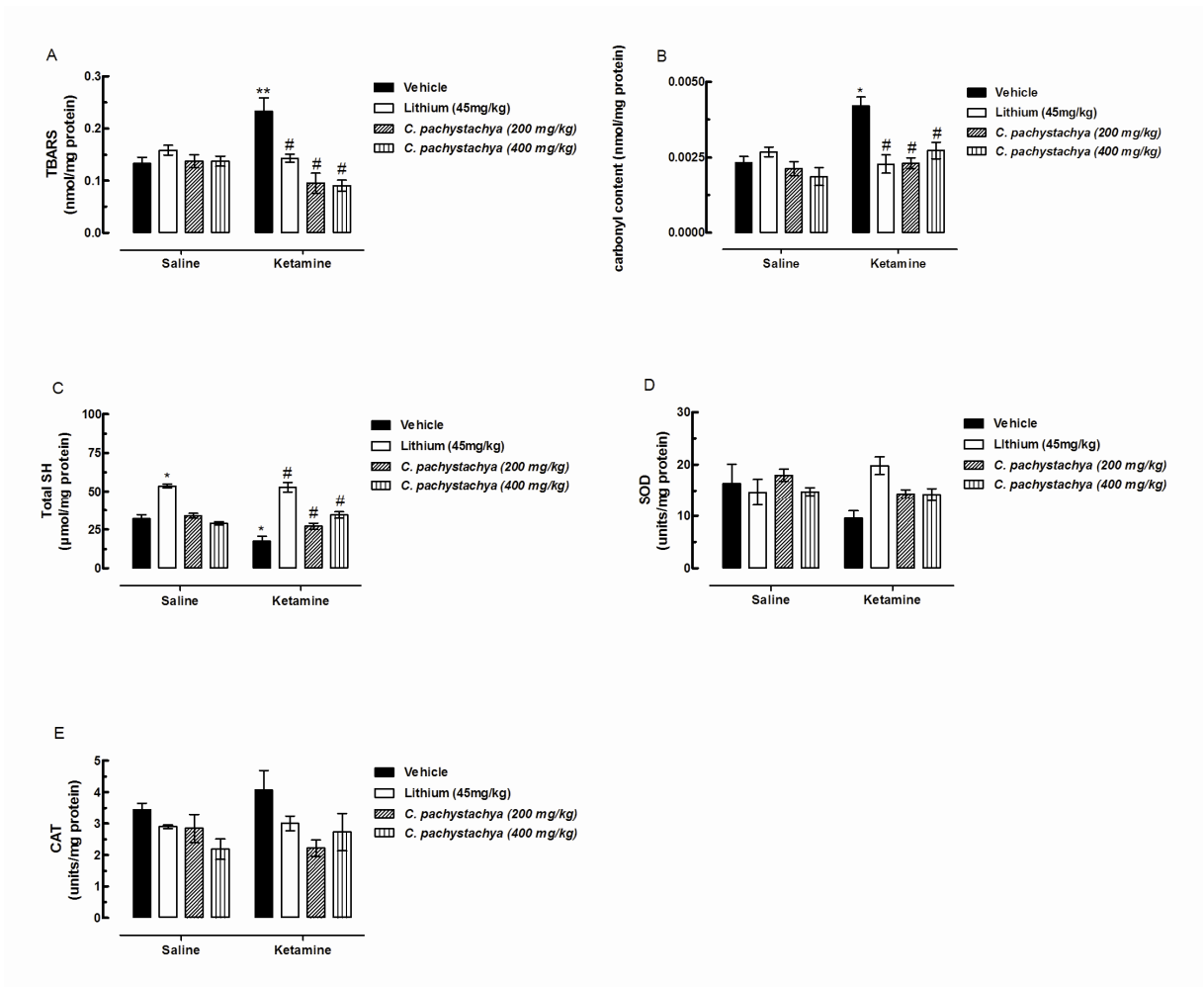


Figure 2.

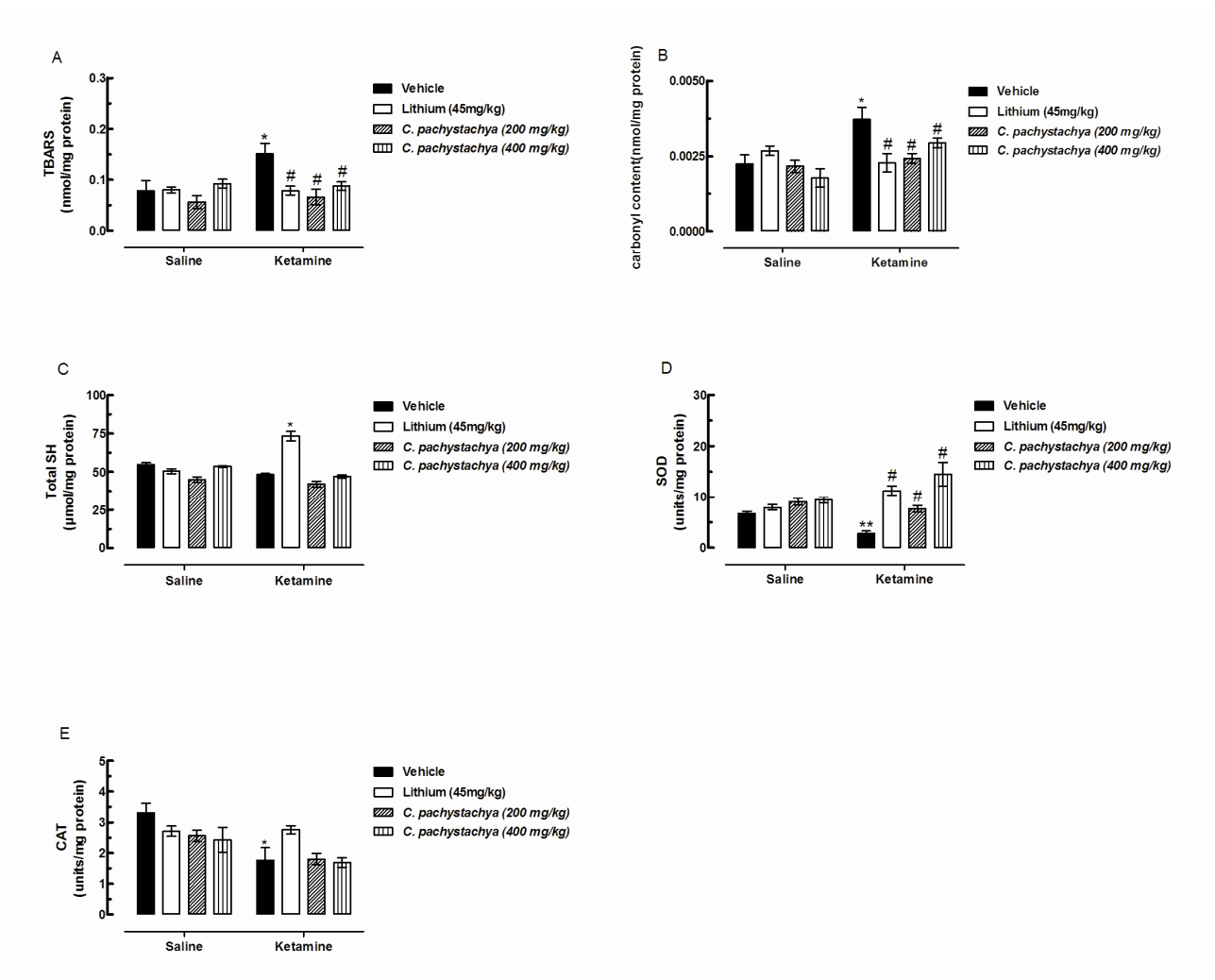


**Figure 3.**





**Figure 4.**



## 6.0. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dentre os transtornos psiquiátricos mais prevalentes estão a depressão maior e o THB, os quais comprometem as funções fisiológicas, o humor e a cognição de pacientes acometidos por estas doenças. A evolução dos transtornos de humor é flutuante, possuindo, em geral, uma característica de intervalos mais longos entre os episódios iniciais, e intervalos menores à medida que a doença progride. Os fatores de risco para o desenvolvimento de algum TH incluem a vulnerabilidade genética e estressores psicossociais globais, que podem deflagrar conjuntamente a ocorrência de episódios nessas doenças (MACHADO-VIEIRA e SOARES, 2007). Sendo assim, a busca por novos alvos terapêuticos com potencial para uma rápida e sustentável melhora do quadro clínico destes transtornos e que apresentem poucos efeitos colaterais se faz necessária.

A disponibilidade de modelos animais pode acelerar as pesquisas acerca dos TH por melhorar o entendimento da neurofisiologia destes transtornos e fornecer a possibilidade da descoberta de novos compostos potenciais, para posterior avaliação clínica (EL-MALLAKH, *et al.*, 2003; HERMAN *et al.*, 2007). Um modelo animal para ser confiável deve preencher, pelo menos, três critérios importantes. Primeiro, para a validade fenomenológica ou de face, o animal deve apresentar comportamentos similares àqueles encontrados em humanos com a doença. Segundo, para a validade de constructo, a patogênese das anormalidades comportamentais deve ser a mesma, ou pelo menos, similar à condição em humanos. Terceiro, para a validade preditiva, fármacos que são utilizados na clínica para a doença, devem ser hábeis em reverter à sintomatologia da doença no modelo animal (HERMAN *et al.*, 2007).

Alguns sintomas da depressão e de mania podem ser induzidos nestes modelos. Como exemplos, os modelos de estresse podem induzir no animal uma condição similar a distímia em humanos, além de provocar anedonia (perda do prazer a estímulos anteriormente prazerosos) a qual é um dos sintomas da depressão (WILLNER, 1997) e o modelo da cetamina pode induzir em ratos a agitação psicomotora, sintoma clínico da fase maníaca do THB (GHEDIM, *et al.*, 2012).

Considerando estudos pré-clínicos prévios nos quais os potenciais antioxidantes da curcumina e da *C. pachystachya* foram demonstrados, o presente estudo investigou o efeito destes produtos naturais sobre os parâmetros comportamentais e neuroquímicos em modelos animais de TH. Os nossos resultados indicam que a administração aguda do AE de *C. pachystachya* ( 200 e 400 mg/kg, p.o.) produziu um efeito antidepressivo no TNF. Além

disso, o tratamento crônico com AE de *C. pachystachya* (200 mg/kg, p.o., durante 14 dias), preveniu o comportamento tipo-depressivo induzido pelo estresse crônico em camundongos, sendo capaz de impedir o dano oxidativo produzido neste modelo. Um efeito similar foi demonstrado anteriormente pela curcumina neste modelo de depressão induzido pelo ECI (LOPRESTI, *et al.*, 2012).

Além disso, este estudo demonstra que a curcumina e o EA de *C. pachystachya* produzem efeitos similares a estabilizadores de humor clássicos utilizados na clínica uma vez que foram capazes de prevenir a hiperlocomoção induzida pela administração de cetamina em um modelo animal de mania em ratos (GHEDIM, *et al.*, 2012). Nossos resultados tanto para curcumina quanto para o EA, que o efeito antimaniaco parece ser, ao menos em parte, devido a suas propriedades antioxidantes, apoiando o potencial neuroprotetor contra disfunções comportamentais e neuroquímicas envolvidas no TH.

De forma geral, nosso estudo demonstrou que compostos naturais são capazes de prevenir alterações comportamentais e neuroquímicas produzidas em modelos animais de TH, demonstrando potencialidade de compostos naturais na prevenção ou redução dos episódios de mania e depressão. Entretanto, é importante salientar que mais estudos sobre mecanismos de ação, envolvimento dos sistemas de neurotransmissão e vias de sinalização, são de extrema relevância para a compreensão da fisiopatologia das doenças psiquiátricas assim como da escolha do tratamento adequado para tais patologias.

## 7.0. PERSPECTIVAS

Avaliar a densidade de proteínas no HP e CPF nos modelos animais estudados:

- Vias de sinalização:
  - Glicogênio sintase quinase-3 (GSK-3);
  - Proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR).
- Proteína associada ao sinaptossoma 25 (SNAP 25).
- Receptores (NMDA e AMPA) e transportadores (Glast, GLT1, VGlut1 e VGlut2).
- Avaliar os efeitos dos compostos naturais, curcumina e *C. pachystachya*, sobre a densidade das proteínas citadas anteriormente no modelo de mania induzido pela cetamina.
- Obtenção de frações com menor complexidade molecular, obtidas a partir do EA de *C. pachystachya*, correlacionando-se com as atividades farmacológicas.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEBI, H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol*, p.121-6, 1984.

AKSENOV, M. Y., MARKESBERY, E W. R. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters*, p.141-5, 2001.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. DSM-IV: Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais. Artmed, Porto Alegre, 2002.

ANDERSON, G.E., MAES, M. Oxidative/Nitrosative Stress and Immuno-inflammatory Pathways in Depression: Treatment Implications. *Current Pharmaceutical Desing*, 2013. *In Press*.

ANDREAZZA, A.C., FREY, B.N., ERDTMANN, B., SALVADOR, M., ROMBALDI, F., SANTIN, A., GONCALVES, C.A., KAPCZINSKI, F. DNA damage in bipolar disorder. *Psychiatry Research*, p.27-32, 2007a.

ANDREAZZA, A.C., CASSINI, C., ROSA, A.R., LEITE, M.C., DE ALMEIDA, L.M., NARDIN, P., CUNHA, A.B., CERESER, K.M., SANTIN, A., GOTTFRIED, C., SALVADOR, M., KAPCZINSKI, F., GONCALVES, C.A. Serum S100B and antioxidant enzymes in bipolar patients. *Journal Psychiatry Research*, p.523-529, 2007b.

ANDREAZZA, A.C., KAUER-SANT'ANNA, M., FREY, B.N., BOND, D.J., KAPCZINSKI, F., YOUNG, L.T., YATHAM, L.N. Oxidative stress markers in bipolar disorder: a meta-analysis. *Journal Affective Disorder*, p.135-44, 2008.

ANDREAZZA, A.C., SHAO, L., WANG, J.F., YOUNG, L.T. Mitochondrial complex I activity and oxidative damage to mitochondrial proteins in the prefrontal cortex of patients with bipolar disorder. *Archive General Psychiatry*, p.360-8, 2010.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE TRANSTORNO BIPOLAR, O que é Transtorno Bipolar? Disponível em: <[www.abtb.org.br/transtorno.php](http://www.abtb.org.br/transtorno.php)>. Acesso em: 20/10/2013.

BASNET, P., SKALKO-BASNET, N. Curcumin: an anti-inflammatory molecule from a curry spice on the path to cancer treatment. *Molecules*, p.4567-98, 2011.

BERK, M., KAPCZINSKI, F., ANDREAZZA, A.C., DEAN, O.M., GIORLANDO, F., MAES, M., YUCEL, M., GAMA, C.S., DODD, S., DEAN, B., MAGALHAES, P.V., AMMINGER, P., MCGORRY, P., MALHI, G.S. Pathways underlying neuroprogression in bipolar disorder: focus on inflammation, oxidative stress and neurotrophic factors. *Neuroscience Biobehavior Review*, p.804-17, 2011.

BERTON, O., NESTLER, E.J. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. *Nature Review Neuroscience*, p.137-51, 2006.

BORNSTEIN, S.R., SCHUPPENIES, A., WONG, M.L., LICINIO, J. Approaching the shared biology of obesity and depression: the stress axis as the locus of gene-environment interactions. *Molecular Psychiatry*, p.892-902, 2006.

BOUAYED, J., RAMMAL, H., DICKO, A., YOUNOS, C., SOULIMANI, R. Chlorogenic acid, a polyphenol from *Prunus domestica* (Mirabelle), with coupled anxiolytic and antioxidant effects. *Journal Neurological Science*, p.77-84, 2007.

BRIETZKE, E., MANSUR, R.B., ZUGMAN, A., CARVALHO, A.F., MACEDO, D.S., CHA, D.S., ABILIO, V.C., MCINTYRE, R.S. Is there a role for curcumin in the treatment of bipolar disorder? *Medical Hypotheses*, p.606-12, 2013.

BUTTNER, N., BHATTACHARYYA, S., WALSH, J., BENES, F.M. DNA fragmentation is increased in non-GABAergic neurons in bipolar disorder but not in schizophrenia. *Schizophrenic Research*, p. 33-41, 2007.

CALABRESE V., SCAPAGNINI G., GIUFFRIDA-STELLA A.M. Mitochondrial involvement in brain function and dysfunction: relevance to aging, neurodegenerative disorders and longevity. *Neurochemistry Research*, p.425-432, 2003.

CAPRA, J.C., CUNHA, M.P., MACHADO, D.G., ZOMKOWSKI, A.D., MENDES, B.G., SANTOS, A.R., PIZZOLATTI, M.G., RODRIGUES, A.L. Antidepressant-like effect of scopoletin, a coumarin isolated from *Polygala sabulosa* (Polygalaceae) in mice: evidence for the involvement of monoaminergic systems. *European Journal Pharmacology*, p.232-8, 2010.

CASSANO, P. E., FAVA, M. Depression and public health: an overview. *Journal Psychosomatic Research*, p.849-57, 2002.

COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL/COBEA. Princípios Éticos na Experimentação Animal (1991), Disponível em: <<http://www.cobea.org.br>> Acesso em: 13/05/2013.

CONSOLINI, A.E., MIGLIORI, G.N. Cardiovascular effects of the South American medicinal plant *Cecropia pachystachya* (ambay) on rats. *Journal of Ethnopharmacology*, p.417-22, 2005.

CONSOLINI, A.E., RAGONE, M.I., MIGLIORI, G.N., CONFORTI, P., VOLONTE, M.G. Cardiotonic and sedative effects of *Cecropia pachystachya* Mart. (ambay) on isolated rat hearts and conscious mice. *Journal of Ethnopharmacology*, p.90-6. 2006.

COSTA, G.M., ORTMANN, C.F., SCHENKEL, E.P., REGINATTO, F.H. An HPLC-DAD Method to Quantification of Main Phenolic Compounds from Leaves of *Cecropia* Species. *Brazilian. Chemical. Society*, p.1096-1102, 2011.

CUNHA, A.B., FREY, B.N., ANDREAZZA, A.C., GOI, J.D., ROSA, A.R., GONCALVES, C.A., SANTIN, A., KAPCZINSKI, F. Serum brain-derived neurotrophic factor is decreased in bipolar disorder during depressive and manic episodes. *Neuroscience Letters*, p.215-9, 2006.

D'AQUILA, P.S., BRAIN, P., WILLNER, P. Effects of chronic mild stress on performance in behavioural tests relevant to anxiety and depression. *Physiology & Behavior*, p.861-7, 1994.

DHINGRA, D., SARMA, A. A review on antidepressant plants. *Natural Product Radiance*, p.144-150, 2005

DUAN, T.T., TAN, J.W., YUAN, Q., CAO, J., ZHOU, Q.X., XU, L. Acute ketamine induces hippocampal synaptic depression and spatial memory impairment through dopamine D1/D5 receptors. *Psychopharmacology*, 2013. *In Press*.

EL-MALLAKH, R.S., EL-MASRI, M.A., HUFF, M.O., LI, X.P., DECKER, S., LEVY, R.S. Intracerebroventricular administration of ouabain as a model of mania in rats. *Bipolar Disorder*, p.362-365, 2003.

ESTERBAUER, H., CHEESEMAN, K.H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol*, p.407-21, 1990.

FREY, B.N., VALVASSORI, S.S., REUS, G.Z., MARTINS, M.R., PETRONILHO, F.C., BARDINI, K., DAL-PIZZOL, F., KAPCZINSKI, F., QUEVEDO, J. Effects of lithium and valproate on amphetamine-induced oxidative stress generation in an animal model of mania. *Journal Psychiatry Neuroscience*, p.326-32, 2006.

GAMA, C.S., KUNZ, M., MAGALHAES, P.V., KAPCZINSKI, F. Staging and neuroprogression in bipolar disorder: a systematic review of the literature. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, p.70-4, 2012.

GANDHI S., ABRAMOV A.Y. Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration. *Oxidative Medicine Cellular Longevity* ,428010, 2012.

GAWRYLUK, J.W., WANG, J.F., ANDREAZZA, A.C., SHAO, L., YOUNG, L.T. Decreased levels of glutathione, the major brain antioxidant, in post-mortem prefrontal cortex from patients with psychiatric disorders. *International Journal Neuropsychopharmacol*, p.123-30, 2011.

GHEDIM, F.V., FRAGA DDE, B., DEROZA, P.F., OLIVEIRA, M.B., VALVASSORI, S.S., STECKERT, A.V., BUDNI, J., DAL-PIZZOL, F., QUEVEDO, J., ZUGNO, A.I. Evaluation of behavioral and neurochemical changes induced by ketamine in rats: implications as an animal model of mania. *Journal Psychiatry Research*, p.1569-75, 2012.

GROSSO, C., VALENTAO, P., FERRERES, F., ANDRADE, P.B. The use of flavonoids in central nervous system disorders. *Current Medical Chemistry*. 2013. *In Press*.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals in biology and medicine. New York: Oxford University Press. 2007.

HENN, F.A., VOLLMEYR, B. Neurogenesis and depression: etiology or epiphenomenon? *Biological Psychiatry*, p.146-50, 2004

HERKEN, H., GUREL, A., SELEK, S., ARMUTCU, F., OZEN, M.E., BULUT, M., KAP, O., YUMRU, M., SAVAS, H.A., AKYOL, O. Adenosine deaminase, nitric oxide,



superoxidedismutase, and xanthine oxidase in patients with major depression: impact of antidepressant treatment. *Archives of Medical Research*, p.247-52, 2007.

HERMAN, L., HOUGLAND, T., EL-MALLAKH, R.S. Mimicking human bipolar ion dysregulation models mania in rats. *Neuroscience Biobehavior Review*, p. 874-881, 2007.

HIKAWCZUK, V., SAAD, J., GUARDIA, T., JUAREZ, A., GIORDANO, O. Antiinflammatory activity of compounds isolated from *Cecropia pachystachya*. *Anales de la Asociación Química Argentina*, p.167-170, 1998.

HIRSCHFELD, R.M., LEWIS, L., VORNIK, L.A. Perceptions and impact of bipolar disorder: how far have we really come? Results of the national depressive and manic-depressive association 2000 survey of individuals with bipolar disorder. *Journal of Clinical Psychiatry*, p.161-74, 2003.

JOELS, M., KARST, H., ALFAREZ, D., HEINE, V.M., QIN, Y., VAN RIEL, E. Effects of chronic stress on structure and cell function in rat hippocampus and hypothalamus. *Stress*, p.221-31, 2004.

KAPCZINSKI, F., DAL-PIZZOL, F., TEIXEIRA, A.L., MAGALHAES, P.V., KAUER-SANT'ANNA, M., KLAMT, F., MOREIRA, J.C., DE BITTENCOURT PASQUALI, M.A., FRIES, G.R., QUEVEDO, J., GAMA, C.S. Peripheral biomarkers and illness activity in bipolar disorder. *Journal Psychiatry Research*, p.156-61, 2011.

KARATSOREOS, I.N., MCEWEN, B.S. Psychobiological allostasis: resistance, resilience and vulnerability. *Trends Cognitive Science*, p.576-84, 2011.

KATALINIC, N., LAI, R., SOMOGYI, A., MITCHELL, P.B., GLUE, P., LOO, C.K. Ketamine as a new treatment for depression: a review of its efficacy and adverse effects. *Aust N Z J Psychiatry*, p. 710-727. 2013.

KATO, T., KUBOTA, M., KASAHARA, T. Animal models of bipolar disorder. *Neuroscience Biobehavior Review*, p.832-42, 2007.

KATZ, R.J., ROTH, K.A., SCHMALTZ, K. Amphetamine and tranlycypromine in an animal model of depression: pharmacological specificity of the reversal effect. *Neuroscience Biobehavioral Review*, p.259-64, 1981.

KESSLER, R.C., ZHAO, S., BLAZER, D.G., SWARTZ, M. Prevalence, correlates, and course of minor depression and major depression in the National Comorbidity Survey. *Journal Affective Disorder*, p.19-30, 1997.

KESSLER, R.C., WALTERS, E.E. Epidemiology of DSM-III-R major depression and minor depression among adolescents and young adults in the National Comorbidity Survey *Depress Anxiety*, p.3-14,1998.

KODYDKOVA, J., VAVROVA, L., ZEMAN, M., JIRAK, R., MACASEK, J., STANKOVA, B., TVRZICKA, E., ZAK, A. Antioxidative enzymes and increased oxidative stress in depressive women. *Clinical Biochemical*, p.1368-74, 2009.

KOTAN, V.O., SARANDOL, E., KIRHAN, E., OZKAYA, G., KIRLI, S. Effects of long-term antidepressant treatment on oxidative status in major depressive disorder: a 24-week follow-up study. *Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry*, p.1284-90, 2011.

KUBERA, M., MAES, M., HOLAN, V., BASTA-KAIM, A., ROMAN, A., SHANI, J. Prolonged desipramine treatment increases the production of interleukin-10, an anti-inflammatory cytokine, in C57BL/6 mice subjected to the chronic mild stress model of depression. *Journal Affective Disorder*, p.171-8, 2001.

KULKARNI, S.K., DHIR, A. An overview of curcumin in neurological disorders. *Indian Journal Pharmacology Science*, p.149-54, 2010.

KULOGLU, M., USTUNDAG, B., ATMACA, M., CANATAN, H., TEZCAN, A.E., CINKILINC, N. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme levels in patients with schizophrenia and bipolar disorder. *Cell Biochemistry and Function*, p.171-175, 2002.

LEMKE, M.R. Depressive symptoms in Parkinson's disease. *European Journal of neurology*, p. 15:21-25, 2008.

LIMA-LANDMAN, M.T., BORGES, A.C., CYSNEIROS, R.M., DE LIMA, T.C., SOUCCAR, C., LAPA, A.J. Antihypertensive effect of a standardized aqueous extract of *Cecropia glaziovii* Sneth in rats: an in vivo approach to the hypotensive mechanism. *Phytomedicine*, p.314-20, 2007.

LIN, J. K. Molecular targets of curcumin. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, p.227-43, 2007.

LIU, J., MOGHADDAM, B. Regulation of glutamate efflux by excitatory amino acid receptors: evidence for tonic inhibitory and phasic excitatory regulation. *The Journal of Pharmacology Experimental Therapy*, p.1209-15, 1995.

LOPRESTI, A.L., HOOD, S.D., DRUMMOND, P.D. Multiple antidepressant potential modes of action of curcumin: a review of its anti-inflammatory, monoaminergic, antioxidant, immune-modulating and neuroprotective effects. *Journal of Psychopharmacology*, p.1512-1524, 2012.

LOPRESTI, A.L., MAKER, G.L., HOOD, S.D., DRUMMOND, P.D. A review of peripheral biomarkers in major depression: The potential of inflammatory and oxidative stress biomarkers. *Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry*, p.102-111, 2013.

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal Biology Chemical*, p.265-75,1951.

LU, X.Y., KIM, C.S., FRAZER, A., ZHANG, W. Leptin: a potential novel antidepressant. *Proceedings of National Academic Science U S A*, p.1593-8, 2006.

MACHADO, D.G., BETTIO, L.E., CUNHA, M.P., CAPRA, J.C., DALMARCO, J.B., PIZZOLATTI, M.G., RODRIGUES, A.L. Antidepressant-like effect of the extract of *Rosmarinus officinalis* in mice: involvement of the monoaminergic system. *Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry*, p.642-50, 2009.

MACHADO-VIEIRA, R. Purinergic system in the treatment of bipolar disorder: uric acid levels as a screening test in mania. *Journal Clinical Psychopharmacology*, p.735-6, 2012.

MACHADO-VIEIRA, R., ANDREAZZA, A.C., VIALE, C.I., ZANATTO, V., CERESER, V., JR., DA SILVA VARGAS, R., KAPCZINSKI, F., PORTELA, L.V., SOUZA, D.O., SALVADOR, M., GENTIL, V. Oxidative stress parameters in unmedicated and treated bipolar subjects during initial manic episode: a possible role for lithium antioxidant effects. *Neuroscience Letters*, p.33-6, 2007.

MACHADO-VIEIRA, R., SOARES, J.C. Transtornos de humor refratários a tratamento. Revista Brasileira de Psiquiatria, 29 suppl 2 , 2007.

MACHADO-VIEIRA, R., SOARES, J.C., LARA, D.R., LUCKENBAUGH, D.A., BUSNELLO, J.V., MARCA, G., CUNHA, A., SOUZA, D.O., ZARATE, C.A., JR., KAPCZINSKI, F. A double-blind, randomized, placebo-controlled 4-week study on the efficacy and safety of the purinergic agents allopurinol and dipyridamole adjunctive to lithium in acute bipolar mania. Journal of Clinical Psychiatry, p.1237-1245.2008.

MAGALHAES, P.V., DEAN, O.M., BUSH, A.I., COPOLOV, D.L., MALHI, G.S., KOHLMANN, K., JEAUVONS, S., SCHAPKAITZ, I., ANDERSON-HUNT, M., BERK, M. N-acetyl cysteine add-on treatment for bipolar II disorder: a subgroup analysis of a randomized placebo-controlled trial.. Journal Affective Disorder, p. 317-20, 2010.

MAGALHAES, P.V., JANSEN, K., PINHEIRO, R.T., COLPO, G.D., DA MOTTA, L.L., KLAMT, F., DA SILVA, R.A., KAPCZINSKI, F. Peripheral oxidative damage in early-stage mood disorders: a nested population-based case-control study. International Journal Neuropsychopharmacology, p.1043-50, 2012.

MANNING, J.S., HAYKAL, R.F., CONNOR, P.D., AKISKAL, H.S. On the nature of depressive and anxious states in a family practice setting: the high prevalence of bipolar II and related disorders in a cohort followed longitudinally. Comprehensive Psychiatry, p.102-8, 1997.

MARKS, A.D., SMITH,C., LIEBERMAN, M. Bioquímica Médica Básica de Marks - Uma Abordagem Clínica. Editora Artmed , 2007.

MISRA, H.P., FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. Journal Biological Chemical.,p.3170-5, 1972.

MOGHADDAM, B., ADAMS, B., VERMA, A., DALY, D. Activation of glutamatergic neurotransmission by ketamine: a novel step in the pathway from NMDA receptor blockade to dopaminergic and cognitive disruptions associated with the prefrontal cortex. Journal of Neuroscience, p.2921-7, 1997.

MOLINA-JIJON, E., TAPIA, E., ZAZUETA, C., EL HAFIDI, M., ZATARAIN-BARRON, Z.L., HERNANDEZ-PANDO, R., MEDINA-CAMPOS, O.N., ZARCO-

MARQUEZ, G., TORRES, I., PEDRAZA-CHAVERRI, J. Curcumin prevents Cr(VI)-induced renal oxidant damage by a mitochondrial pathway. *Free Radical Biology & Medicine*, p.1543-57. 2011.

MONROY, A., LITHGOW, G.J., ALAVEZ, S. Curcumin and Neurodegenerative Diseases. *Bio Factors*. 2013. *In Press*.

NEMEROFF, C.B., OWENS, M.J. Treatment of mood disorders. *Nature Neuroscience*, p. 1068-70, 2002.

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

NG, F., BERK, M., DEAN, O., BUSH, A.I. Oxidative stress in psychiatric disorders: evidence base and therapeutic implications. *International Journal Neuropsychopharmacology*, p.851-76, 2008.

NINAHUAMAN, M.F., SOUCCAR, C., LAPA, A.J., LIMA-LANDMAN, M.T. ACE activity during the hypotension produced by standardized aqueous extract of *Cecropia glaziovii* Sneth: a comparative study to captopril effects in rats. *Phytomedicine*, p.321-7, 2007.

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

PATHAK, L., AGRAWAL, Y., DHIR, A. Natural polyphenols in the management of major depression. *Expert Opinion Investigation Drugs*, p.863-80, 2013.

PIATO, A.L., DETANICO, B.C., JESUS, J.F., LHULLIER, F.L., NUNES, D.S., ELISABETSKY, E. Effects of Marapuama in the chronic mild stress model: further indication of antidepressant properties. *Journal of Ethnopharmacology*, p.300-4, 2008.

PORSOLT, R.D., BERTIN, A., JALFRE, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Archives Internationales Pharmacodynamie Therapy*, p.327-36, 1977.

POST, R.M., FLEMING, J., KAPCZINSKI, F. Neurobiological correlates of illness progression in the recurrent affective disorders. *Journal Psychiatry Research*, p.561-73, 2012.

QURESHI, N.A., AL-BEDAH, A.M. Mood disorders and complementary and alternative medicine: a literature review. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, p.639-58. 2013.

RUSH, A.J. Toward an understanding of bipolar disorder and its origin. *Journal Clinical Psychiatry*, p.18-22, 2003.

RYBKA, J., KEDZIORA-KORNATOWSKA, K., BANAS-LEZANSKA, P., MAJSTEREK, I., CARVALHO, L.A., CATTANEO, A., ANACKER, C., KEDZIORA, J. Interplay between the pro-oxidant and antioxidant systems and proinflammatory cytokine levels, in relation to iron metabolism and the erythron in depression. *Free Radical Biology and Medicine*. p.187–94, 2013.

SANCHES, R.F., ASSUNÇÃO, S. HETEM. Impacto da comorbidade no diagnóstico e tratamento do transtorno bipolar. *Revista de. Psiquiatria. Clínica*, p. 71-77, 2005.

SANCHEZ-MATEO, C.C., BONKANKA, C.X., PRADO, B., RABANAL, R.M. Antidepressant activity of some *Hypericum reflexum* L. fil. extracts in the forced swimming test in mice. *Journal Ethnopharmacology*, p.115-21, 2007.

SELEK, S., SAVAS, H.A., GERGERLIOGLU, H.S., BULBUL, F., UZ, E., YUMRU, M. The course of nitric oxide and superoxide dismutase during treatment of bipolar depressive episode. *Journal Affective Disorder*, p.89-94, 2008.

SHAO, L., CUI, J., YOUNG, L.T., WANG, J.F. The effect of mood stabilizer lithium on expression and activity of glutathione S-transferase isoenzymes. *Neuroscience*, p. 518-524, 2008.

SHAO, L., SUN, X., XU, L., YOUNG, L.T., WANG, J.F. Mood stabilizing drug lithium increases expression of endoplasmic reticulum stress proteins in primary cultured rat cerebral cortical cells *Life Science*, p.1317-1323, 2006.

STEFANESCU C., CIOBICA A. The relevance of oxidative stress status in first episode and recurrent depression. *Journal Affective Disorder*, p.34–8, 2012.

TAN S. ET. AL. Chronic Ketamine Administration Modulates Midbrain Dopamine System in Mice. PLoS One, p. 439-47, 2012.

TANG V, WANG J-F. Oxidative Stress in Bipolar Disorder. Biochemistry and Analytical Biochemistry. 2012.

VALVASSORI, S.S., ELIAS, G., DE SOUZA, B., PETRONILHO, F., DAL-PIZZOL, F., KAPCZINSKI, F., TRZESNIAK, C., TUMAS, V., DURSUN, S., CHAGAS, M.H., HALLAK, J.E., ZUARDI, A.W., QUEVEDO, J., CRIPPA, J.A. Effects of cannabidiol on amphetamine-induced oxidative stress generation in an animal model of mania. Journal Psychopharmacology, p.274-80, 2012.

VALVASSORI, S.S., BUDNI, J., VARELA, R.B., QUEVEDO, J., Contributions of animal models to the study of mood disorders. Revista Brasileira de Psiquiatria, p.S121-31. 2013.

VELAZQUEZ, E., TOURNIER, H.A., MORDUJOVICH DE BUSCHIAZZO, P., SAAVEDRA, G., SCHINELLA, G.R. Antioxidant activity of Paraguayan plant extracts. Fitoterapia, p.91-7, 2003.

WANG, J.K., THUKRAL, V. Presynaptic NMDA receptors display physiological characteristics of homomeric complexes of NR1 subunits that contain the exon 5 insert in the N-terminal domain. Journal of Neurochemical, p.865-8, 1996.

WANG, Y.C., WANG, E.N., WANG, C.C., HUANG, C.L., HUANG, A.C. Effects of lithium and carbamazepine on spatial learning and depressive behavior in a rat model of bipolar disorder induced by ouabain. Pharmacology, Biochemistry and Behavior, 2013. *In Press*.

WEI, S., XU, H., XIA, D., ZHAO, R. Curcumin attenuates the effects of transport stress on serum cortisol concentration, hippocampal NO production, and BDNF expression in the pig. Domestic Animal Endocrinology, p.231-9, 2010.

WILLNER, P., MUSCAT, R., PAPP, M. Chronic mild stress-induced anhedonia: a realistic animal model of depression. Neuroscience Biobehavior Review, p.525-34, 1992.

WILLNER, P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. *Psychopharmacology*, p.319-29, 1997.

WONG, M.L., LICINIO, J. Research and treatment approaches to depression. *Nature Review Neuroscience*, p.343-51, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, Mental Health Disponível em: <[www.who.int/mental\\_health/mhgap/en/index.html](http://www.who.int/mental_health/mhgap/en/index.html)> Acesso em: 20/04/2013.

ZHANG, L., XU, T., WANG, S., YU, L., LIU, D., ZHAN, R., YU, S.Y. NMDA GluN2B receptors involved in the antidepressant effects of curcumin in the forced swim test. *Progress in Neuropsychopharmacology & Biological*, p.12-7, 2013.

ZHANG, X.Y., YAO, J.K. Oxidative stress and therapeutic implications in psychiatric disorders. *Progress in Neuropsychopharmacology & Biological*. 2013. *In Press*.

ZHANG, Z. J. Therapeutic effects of herbal extracts and constituents in animal models of psychiatric disorders. *Life Science*, p.1659-99, 2004.

ZUNZAIN, P.A., HOROWITZ, M.A., CATTANEO, A., LUPI, M.M., PARIANTE, C.M. Ketamine: synaptogenesis, immunomodulation and glycogen synthase kinase-3 as underlying mechanisms of its antidepressant properties. *Molecular Psychiatry*, p.1236-41, 2013.