

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
DEPARTAMENTO DE PRODUÇÃO DE MATÉRIA PRIMA
LABORATÓRIO DE PSICOFARMACOLOGIA EXPERIMENTAL

Efeito de *Hypericum caprifoliatum* Cham. & Schltdl. (Guttiferae) no modelo preditivo de depressão estresse crônico moderado e imprevisível, associado à natação forçada.

Mariana de Andrade Pranke da Silva

Porto Alegre, Junho de 2012.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
DEPARTAMENTO DE PRODUÇÃO DE MATÉRIA PRIMA
LABORATÓRIO DE PSICOFARMACOLOGIA EXPERIMENTAL

Efeito de *Hypericum caprifoliatum* Cham. & Schltdl. (Guttiferae) no modelo preditivo de depressão estresse crônico moderado e imprevisível, associado à natação forçada.

**Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
por Mariana de Andrade Pranke da Silva para
obtenção do título de Farmacêutico**

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

Co-orientador: Prof^a. Dr^a. Carla Dalmaz

Porto Alegre, Junho de 2012.

Não importa onde você parou,
em que momento da vida você cansou,
o que importa é que sempre é possível
e necessário "Recomeçar".
Recomeçar é dar uma nova
chance a si mesmo.
É renovar as esperanças na vida
e o mais importante:
acreditar em você de novo.

Carlos Drummond de Andrade

Agradecimentos

Primeiramente aos meus pais, pelo amor incondicional e apoio integral.

À minha querida avó materna e ao meu tio Renato, colega de profissão, por acreditarem no meu sucesso.

À minha avó paterna (*in memoriam*), formada nesta faculdade em 1948, que mesmo sem saber, me serviu de fonte de inspiração para a escolha da profissão e a minha tia Tita, pelo carinho e admiração.

Aos colegas que me ajudaram para a realização deste trabalho: Caroline, Cristie, Eveline, Satchie, Jéssica, Camilla, Liz, Andresa, Danusa, Rachel, André, Andréia, Maikon e em especial à Ana Cristina, pela amizade e dedicação.

À professora Gilsane Lino von Poser, pela coleta do material vegetal e apoio fitoquímico.

À professora Carla Dalmaz, pela oportunidade de ceder a estrutura e apoio para execução do trabalho.

À professora Ângela Wyse, pela parceria na análise bioquímica das amostras.

E, por último, mas não menos importante, meu agradecimento especial à professora Stela Rates, pela orientação e amizade durante os anos de iniciação científica e TCC.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas	6
Lista de Figuras	7
Resumo	8
1. Introdução	9
2. Objetivo	13
3. Materiais e métodos	13
3.1 Material vegetal	13
3.2 Preparação dos extratos	14
3.3 Caracterização química do extrato	14
3.4 Tratamento	14
3.5 Animais	15
3.6 Estresse Crônico Moderado e Imprevisível	16
3.7 Teste de Natação Forçada	17
3.8 Avaliação da atividade da Na ⁺ , K ⁺ - ATPase	18
3.8.1 Preparação das membranas	18
3.8.2 Avaliação da atividade	18
3.8.3 Determinação das proteínas	19
4. Resultados	19
4.1 Caracterização química do extrato	19
4.2 Avaliação do efeito do HCP na natação forçada em animais submetidos ou não ao estresse crônico moderado e imprevisível	20
4.2.1 Análise do Pré-Teste	20
4.2.2 Análise do Pré-Teste em 3 tempos	20
4.2.3 Análise do Teste	22
4.3 Atividade da Na ⁺ , K ⁺ - ATPase	23
4.4 Controle de Massa Corporal	24
5. Discussão	25
6. Conclusão	28
7. Fontes de financiamento	28
8. Referências	29

LISTA DE ABREVIATURAS

NF – Teste de Nado Forçado;

HCP - Extrato *n*-hexânico Purificado de *Hypericum caprifoliatum*

ECMI - Estresse Crônico Moderado e Imprevisível

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

ECH - Extrato *n*-hexânico de *Hypericum caprifoliatum*

UFRGS - Universidade Federal do Rio Grande do Sul

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química do hiperbrasilol	10
Figura 2 – Estrutura química da uliginosina B	10
Figura 3 – Desenho experimental	18
Figura 4 – Cromatograma uliginosina B 220nm	19
Figura 5 – Gráfico pré-teste (15 minutos)	20
Figura 6 – Gráfico pré-teste (3 tempos)	21
Figura 7 – Gráfico teste	22
Figura 8 – Gráfico atividade Na^+, K^+ - ATPase – hipocampo	23
Figura 9 – Gráfico atividade Na^+, K^+ - ATPase – córtex	24
Figura 10 – Gráfico massa corporal	25

RESUMO

O gênero *Hypericum* tem sido amplamente estudado e o nosso grupo tem demonstrado que espécies nativas do sul do Brasil têm apresentado atividade do tipo antidepressiva e antinociceptiva em roedores. *Hypericum caprifoliatum* mostrou resultados promissores no teste do nado forçado (NF). O estresse crônico tem sido proposto como um modelo de depressão em animais, induzindo um aumento no tempo de imobilidade no NF. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do tipo antidepressivo de um extrato *n*-hexânico purificado de *Hypericum caprifoliatum* (HCP) em ratos submetidos ao Estresse Crônico Moderado e Imprevisível (ECMI) seguido pelo nado forçado. A extração do material vegetal seco e triturado foi realizada com *n*-hexano por maceração durante 24 ou 48 horas, seguida de filtração e evaporação do solvente sob pressão reduzida à 45°C. Ratos Wistar, machos (280 g) foram submetidos ao estresse por 40 dias. Estressores foram aplicados em momentos diferentes do dia, sem seguir uma determinada sequência, tornando o teste imprevisível. Apenas um estressor foi usado cada dia. No 41º dia, 24h após a última sessão de estresse crônico, os animais foram expostos ao nado forçado durante 15 minutos (pré-teste). Imediatamente, o tratamento foi iniciado (180 mg/kg/dia durante 5 dias: 2 doses diárias de 90 mg/kg, pela via oral). No dia 46, os animais foram expostos ao NF durante 5 minutos (teste). O tempo de imobilidade foi registrado no pré-teste e teste. A atividade da enzima Na⁺,K⁺-ATPase foi medida em córtex e hipocampo. Os protocolos foram aprovados pela CEUA – UFRGS (projeto número 22091). O grupo Estresse (453,7±189,0, n=15) apresentou maior tempo de imobilidade no pré-teste comparado com o grupo controle (275,5±142,64, n=18) (p <0,01, Teste-t) demonstrando que foi induzido um comportamento do tipo depressivo. HCP reduziu a imobilidade apenas do grupo estresse (98,7±20,6, n=8) em comparação com animais tratados com veículo (184,1±65,2, n=7) (p <0,01, ANOVA de duas vias RM). Houve uma redução da atividade da Na⁺,K⁺-ATPase hipocampal dos animais que sofreram estresse e o tratamento com o extrato não foi capaz de reverter a situação. Podemos presumir que o efeito do HCP é mais pronunciado no contexto de um modelo de depressão onde a doença já está instalada. *H. caprifoliatum* apresenta efeito do tipo antidepressivo em um modelo que é suposto ter mais validade de construto do que o teste de natação forçada. Isso reforça a noção que *H. caprifoliatum* pode ser útil para desenvolver novos fármacos antidepressivos.

Palavras-chave: Antidepressivo, Estresse Crônico Moderado e Imprevisível, *Hypericum caprifoliatum*, Teste de Nado Forçado.

1. Introdução

Depressão é um transtorno psiquiátrico comum, de alta prevalência, sendo uma das maiores causas de incapacidade (Paykel, 2006). É caracterizada por humor melancólico, dificuldade de sentir prazer e perda de interesse nas atividades usuais (Li *et al.*, 2011). Muitos antidepressivos produzem efeitos adversos, como sedação, descoordenação motora e disfunção sexual (Kennedy, 2006; Rosen *et al.*, 2003). Desta forma a pesquisa de novos fármacos antidepressivos eficazes e com poucos efeitos adversos se faz necessária (Adell *et al.*, 2005). O gênero *Hypericum* é conhecido pela atividade antidepressiva da espécie *Hypericum perforatum* demonstrada em diversas metanálises e ensaios clínicos (Linde *et al.*, 2008; Rahimi *et al.*, 2009). O estudo das espécies de *Hypericum* nativas do sul do Brasil resultou no isolamento de benzopiranos das partes aéreas de *H. polyanthemum* Klotzsch ex Reichardt (Ferraz *et al.*, 2001) e de derivados de floroglucínóis diméricos em diferentes espécies (Nör *et al.*, 2004). Hiperbrasilol, um derivado de floroglucinol (Figura 1), foi isolado de *H. connatum* e *H. caprifoliatum* por Nör e colaboradores (2004). A caracterização de extratos *n*-hexânicos das flores de *H. myrianthum*, *H. polyanthemum* e *H. caprifoliatum*, por cromatografia líquida de alta eficiência apresentou picos de retenção similares aos picos de uliginosina B (Figura 2) (Nör *et al.*, 2008). Além disso, apresentam flavonóides, taninos (Dall’Agnol *et al.*, 2003) e óleos essenciais em sua composição (Ferraz *et al.*, 2002). A análise cromatográfica em placa e por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), não detectou a presença de hipericina em um extrato bruto metanólico e na fração *n*-hexânica de *H. caprifoliatum* (Ferraz *et al.*, 2002).

O estudo farmacológico de espécies do gênero *Hypericum* nativas do sul do Brasil tem demonstrado, em roedores, atividade do tipo antidepressiva e antinociceptiva (Daudt *et al.*, 2000; Gnerre *et al.*, 2001; Viana *et al.*, 2003, 2005, 2006, 2008; Haas *et al.*, 2011). Entre as espécies testadas, *Hypericum caprifoliatum* demonstrou resultados promissores no teste de natação forçada (Viana *et al.*, 2005), modelo animal utilizado para rastreamento de produtos com potencial

atividade antidepressiva (Porsolt *et al.*, 1977). A extração com solventes em ordem crescente de polaridade mostrou que somente a fração extraída com o solvente mais apolar apresentou atividade do tipo antidepressiva (Daudt *et al.*, 2000). O resultado mais promissor foi com a utilização de um extrato com éter de petróleo, rico em floroglucinóis. Experimentos subsequentes demonstraram toxicidade para este extrato, o que levou a preparação de outro extrato lipofílico, preparado com ciclohexano, foi utilizado e demonstrou atividade do tipo antidepressiva (Viana *et al.*, 2005).

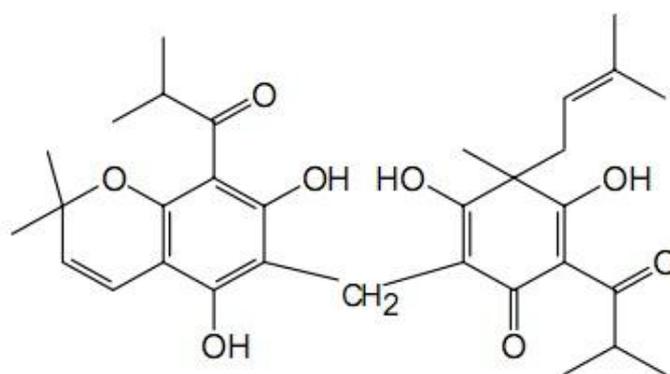


Figura 1 - Estrutura química do hiperbrasilol

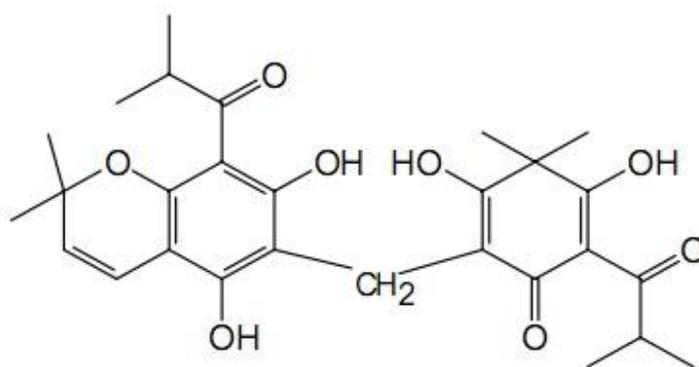


Figura 2 - Estrutura química da uliginosina B

Estudos realizados *in vivo* e *in vitro* demonstraram que *H. caprifoliatum* tem ação sobre a neurotransmissão monoaminérgica (Viana *et al.*, 2005). Em camundongos e ratos, foi demonstrado que o efeito anti-imobilidade de um extrato *n*-hexânico de *H. caprifoliatum* (ECH) no teste da natação forçada foi prevenido

pelo pré-tratamento com antagonistas dopaminérgicos: sulpirida (D_2 -like) e SCH23390 (D_1 -like) (Viana *et al.*, 2005). Este extrato inibiu a recaptação sinaptosomal de monoaminas, em particular, da dopamina (Viana *et al.*, 2005). Porém, não se ligou aos transportadores neuronais das monoaminas, o que sugere que o mecanismo de ação de *H. caprifoliatum* é diferente de outras classes de antidepressivos (Viana *et al.*, 2005).

Foi demonstrado que o tratamento de ratos por 5 dias com ECH levou a uma redução da ligação do [35 S] GTP γ S à subunidade alfa da proteína G quando esta foi ativada pela presença de dopamina, serotonina e noradrenalina (Viana *et al.*, 2007). Esta redução de ligação pode ser atribuída à dessensibilização induzida pelo aumento de monoaminas na fenda, sugerindo que ocorre uma redução do acoplamento da proteína G após o tratamento sub-crônico com o extrato de *H. caprifoliatum*. O efeito de ECH sobre a ligação de GTP γ S confirma a ação sobre o sistema monoaminérgico e é consistente com um potencial efeito antidepressivo (Viana *et al.*, 2007). A uliginosina B, um dos floroglucinóis diméricos presentes em *H. caprifoliatum*, apresentou um perfil de atividade antidepressiva igual ao de ECH e também potenciou o efeito de fármacos antidepressivos no teste da natação forçada (Stein *et al.*, 2011).

Viana e colaboradores (2008) investigaram a influência de ECH sobre os níveis de corticosterona no soro e no córtex pré-frontal de camundongos submetidos ou não ao estresse da natação forçada. Três dias de tratamento com um extrato de *H. caprifoliatum* reduziram significativamente o aumento do nível cortical de corticosterona, em camundongos, induzido pelo nado forçado, sem afetar o nível sérico, evidenciando que o tratamento repetido com o extrato afeta repostas hormonais ao estresse. Este é um dado importante, visto que muitos pacientes com transtorno depressivo apresentam alteração no funcionamento do eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal, como, por exemplo, concentrações elevadas do cortisol sérico (Holsboer, 2000).

Estudos sugerem que o estresse contribui para o desenvolvimento de depressão, induzindo alterações comportamentais e neuroquímicas em animais

similares as humanas (Anisman *et al.*, 1992, Charney *et al.*, 2004) e um grande número de modelos animais de depressão levam ao desenvolvimento de estresse. O modelo da natação forçada desenvolvido por Porsolt (1977, 1978) baseia-se na premissa de que o animal submetido a um estresse inescapável, como a natação forçada, desenvolve um comportamento denominado desespero comportamental, expresso pela redução do nado e tentativas de escape, medido como comportamento de imobilidade. Este modelo é bastante utilizado para triagem de produtos com potencial atividade antidepressiva, mas é considerado um modelo com baixa validade de face e de construto (McKinney & Bunney, 1969) entre outros motivos, por representar um estresse agudo (Willner, 1990).

Alguns modelos de estresse crônico moderado são propostos como modelos de depressão em animais (Crema *et al.*, 2010; Gamaro *et al.*, 2003; de Vasconcelos *et al.*, 2003, 2011; Pucilowski *et al.*, 1993). O modelo de estresse crônico moderado e imprevisível em roedores foi inicialmente proposto por Katz (1981, 1982) e tem três aspectos importantes que o fazem ser um atrativo modelo de depressão em animais: induz condições simulatórias às situações de estresse diárias; faz com que o animal tenha comportamento anedônico (situação núcleo da depressão); o longo tempo de experimento é ideal para investigação de tratamentos crônicos (Wu *et al.*, 2010). Foi demonstrado que os animais submetidos ao estresse crônico moderado (no qual os estressores são aplicados de forma variável, tornando-se imprevisíveis para o animal) apresentam aumento da imobilidade no teste do nado forçado, além de alterações neuroquímicas, como redução da atividade da Na⁺,K⁺-ATPase e alterações em receptores de adenosina (Crema *et al.*, 2010, Tagliari *et al.*, 2010).

Segundo Stein (2012), o fluxo dos íons Na⁺,K⁺ através da membrana é necessário para a manutenção da excitabilidade neuronal, regulação do balanço

osmótico, volume celular e transporte intracelular de moléculas ligadas ao co-transporte de Na^+ , como glicose, aminoácidos e neurotransmissores (Kaplan, 2002; Jorgensen *et al.*, 2003). A falha do funcionamento dessa bomba ou a sua inibição resulta em depleção intracelular de K^+ , e acúmulo de Na^+ intracelular, resultando em uma membrana plasmática despolarizada que prejudica a propagação do impulso nervoso, diminui a excitabilidade neuronal, podendo causar prejuízo no funcionamento normal do sistema nervoso central (Yu, 2003; Panayiotidis, 2006).

2. Objetivo

A proposta deste trabalho foi estudar o efeito de um extrato *n*-hexânico purificado das partes aéreas de *H. caprifoliatum* no modelo do Estresse Crônico Moderado e Imprevisível associado à Natação Forçada, buscando avaliar se o extrato seria capaz de alterar o comportamento do tipo depressivo após este já estar instalado e avaliar a atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase frente ao tratamento com HCP.

3. Materiais e métodos

3.1 Material vegetal

As partes aéreas de *H. caprifoliatum* foram coletadas na cidade de Guaíba, no estado do Rio Grande do Sul, Brasil, em Novembro de 2011. Exsicatas (Bordignon 1400) foram depositadas no Herbário do Departamento de Botânica - Instituto de Biociências - UFRGS. A coleta foi autorizada pelo CGEN/IBAMA: 003/2008 P 02000.001717/2008-60.

3.2 Preparação dos extratos

A extração do material vegetal seco e triturado (244,7g das partes aéreas) foi realizada com *n*-hexano (1:4 m/v) por maceração durante 24 ou 48 horas, seguida de filtração e evaporação do solvente sob pressão reduzida à 45°C, para obtenção do extrato bruto (aproximadamente 10g após 10 ciclos de extração). Para obter o extrato purificado, o ECH foi ressuspensionado em acetona, obtendo-se um resíduo lipofílico (10% m/m), eliminado em papel filtro (Viana *et al.*, 2005). O solvente foi evaporado resultando em HCP.

3.3 Caracterização química do extrato

A caracterização de HCP foi realizada por CLAE, utilizando metodologia previamente validada (Carginin *et al.*, 2010). Foram utilizados: Bomba Waters 600, Injetor automático Waters 717, Detector dual lambda Waters 2487, Coluna Waters Nova Pack C18 (3,9 mm x 150 mm e partícula de 4 µm), Pré-coluna Waters Nova Pack C18 60-A (3,9 mm x 20 mm), Fluxo: 1 mL/min, Software Empower 2.0, Sistema eluente: Acetonitrila:Água (95:5) + 0,01% Ácido Trifluoroacético.

3.4 Tratamentos

Todos os tratamentos foram administrados pela via oral (gavagem), num volume de 1 mL/kg de massa corporal. A solubilização das drogas e ressuspensão de HCP foram feitas com salina, polissorbato 80 (5% do volume final) e auxílio de ultrassom. A dose HCP utilizada neste estudo foi de 180mg/kg/dia (02 administrações diárias - 9:00 e 17:00 - de 90 mg/kg). A escolha da dose foi baseada em estudos anteriores do grupo (Viana *et al.*, 2007). Os grupos de tratamentos estão sumarizados na tabela 1.

3.5 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos (60 dias, pesando em média 280g) provenientes do Biotério do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Os animais foram mantidos em grupo de cinco, em caixa de plástico (65cm x 25cm x 15cm) com o fundo coberto por serragem. Os animais permaneceram em ciclo claro/escuro de 12h (luz acesa entre 7h e 19h), à temperatura constante de 22 ± 1 °C com livre acesso à água e ração padrão para roedores (exceto em momentos específicos, onde parte dos animais teve privação de ração). Foram utilizados 16 animais no grupo Estresse e 20 animais no grupo Não-Estresse. Após, esses grupos foram subdivididos em tratados com o extrato ou com veículo. Após o final dos experimentos, os animais foram mortos por decapitação, seus cérebros retirados e dissecados, sendo córtex e hipocampo as estruturas de interesse. As amostras ficaram em freezer -80 °C até serem analisadas. As carcaças foram descartadas em coletor de resíduos especial, até recolhimento por empresa especializada contratada pela UFRGS. O projeto foi aprovado pela comissão de ética no uso de animais (CEUA) desta universidade sob o número de aprovação 22091.

Tabela 1. Descrição do número de animais e tratamentos dos grupos experimentais.

Experimento	Grupos experimentais	Número de ratos
Estresse crônico moderado imprevisível e nado forçado	1. Não-Estresse - Controle negativo (veículo)	10
	2. Não-Estresse – HCP 180mg/kg/dia v.o.	8
	3. Estresse - Controle negativo (veículo)	8
	4. Estresse – HCP 180mg/kg v.o.	7
Número total de ratos		33

3.6 Estresse Crônico Moderado e Imprevisível

O regime de estresse foi de 40 dias (Crema *et al.*, 2010, Tagliari *et al.*, 2010) e está sumarizado na tabela 2. Utilizou-se apenas um agente estressor por dia: (1) 1-3h de serragem úmida; (2) luz acesa durante o ciclo escuro; (3) 3-6h de inclinação da caixa ângulo de 45°; (4) 2-5h de luz piscante (descrito posteriormente); (5) 2-3 dias de isolamento social; (6) 24h privação alimentar e (7) 1h de contenção (descrito posteriormente). O estresse foi aplicado em diferentes horários do dia, todos os dias e sem obedecer a uma sequência específica, com o objetivo de tornar o teste imprevisível. A exposição à luz piscante foi feita por uma lâmpada de 40W, piscando na frequência de 6 flashes/min. A contenção foi feita em aparato plástico medindo 25cm x 7cm ajustado com auxílio de fita colante de modo que o animal não conseguisse se mover. Uma abertura frontal de aproximadamente 1cm permitiu que o animal tivesse espaço para respirar.

Tabela 2. Agentes estressores

Dia	Estressor
1	Serragem
2	Luz acesa
3	Luz piscante
4	Contenção
5	Inclinação
6	Sem ração
7	Luz acesa
8	Luz Piscante
9	Serragem
10	Sem ração
11	Luz piscante
12	Isolamento
13	Isolamento
14	Isolamento
15	Inclinação
16	Luz piscante
17	Inclinação

18	Contenção
19	Isolamento
20	Isolamento
21	Isolamento
22	Inclinação
23	Luz acesa
24	Luz piscante
25	Sem ração
26	Inclinação
27	Serragem
28	Sem ração
29	Luz Piscante
30	Sem ração
31	Sem estresse
32	Luz acesa
33	Serragem
34	Inclinação
35	Serragem
36	Sem ração
37	Serragem
38	Sem estresse
39	Isolamento
40	Isolamento

Adaptado de Crema *et al.*, 2010

3.7 Teste de Natação Forçada

Após 24h da última sessão de exposição ao estresse crônico, os animais foram submetidos ao teste do nado forçado, conforme descrito por Porsolt (1978) com algumas modificações. O aparato consiste em um cilindro de PVC (com 50cm de altura e 20 cm de diâmetro) preenchido com água (40 cm) à temperatura de 22 ± 1 °C. No 41º dia foi realizada uma primeira exposição ao NF, onde foi avaliado o tempo de imobilidade por 15min (pré-teste). O tempo de imobilidade do pré-teste foi medido a cada 5 minutos, obtendo-se a medida de 3 tempos ao final dos 15 minutos. Imediatamente após, os animais foram tratados com extrato, resultando em um período de tratamento de 5 dias. No 46º dia, o tempo de imobilidade foi medido novamente, desta vez, por 5 minutos (teste). Considera-se imobilidade quando nenhuma atividade adicional

for observada, exceto os movimentos necessários para manter a cabeça dos ratos acima da água, (Porsolt *et al.*, 1978). Este experimento está esquematizado na figura 3.

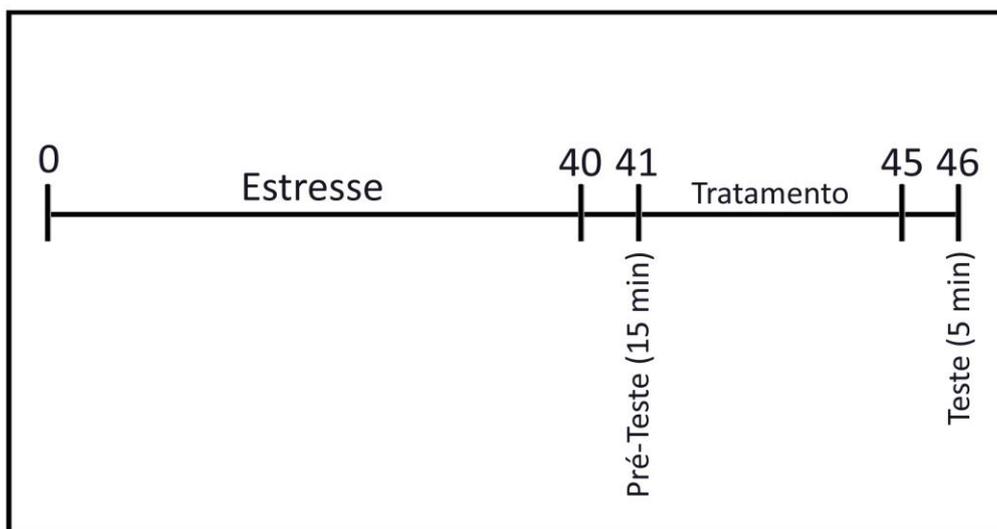


Figura 3. Desenho experimental

3.8 Avaliação da atividade da Na^+, K^+ - ATPase

3.8.1 Preparação das amostras

Após os sacrifício, as estruturas cerebrais (córtex e hipocampo) foram homogeneizadas em 10 volumes (1:10 m/v) de solução tampão sacarose 0.32 mM, contendo 5.0 mM HEPES e 1.0 mM de EDTA, com pH 7,5. Os homogeneizados foram submetidos à centrifugação a 1000 x g por 10 minutos e o sobrenadante foi obtido para a determinação da atividade da Na^+, K^+ - ATPase.

3.8.2 Avaliação da atividade

A reação de mistura para a determinação da atividade da enzima Na^+, K^+ - ATPase conteve: 5.0 mM MgCl_2 , 80.0 mM NaCl, 20.0mM KCl, e 40.0mM Tris-HCl (pH 7,4) em um volume final de 200 μL . Após 10 minutos de pré-incubação à 37 °C, a reação foi iniciada com a adição de ATP em uma concentração final de

3.0 mM, e incubado por 20 minutos. Os controles foram realizados sob as mesmas condições, com adição de 1.0 mM de ouabaína. A atividade de Na^+, K^+ -ATPase foi calculada através da diferença entre os dois ensaios, de acordo com Wyse e colaboradores (2000). A liberação do fosfato inorgânico foi medido através do método de Chan e colaboradores (1986). A atividade específica da enzima foi expressa em mmol de fosfato liberado por minuto por mg de proteína.

3.8.3 Determinação das proteínas

As proteínas foram medidas através do método de Bradford (1976) usando albumina de soro bovino como padrão.

4. Resultados

4.1 Caracterização química do extrato

Os tempos de retenção (t_r)¹: 9.40, 13.00, 17.87, 23.86 correspondem a HC1, japonicina A, uliginosina B e hiperbrasilol, respectivamente. A concentração de uliginosina B no extrato foi de 32,3% (Figura 4).

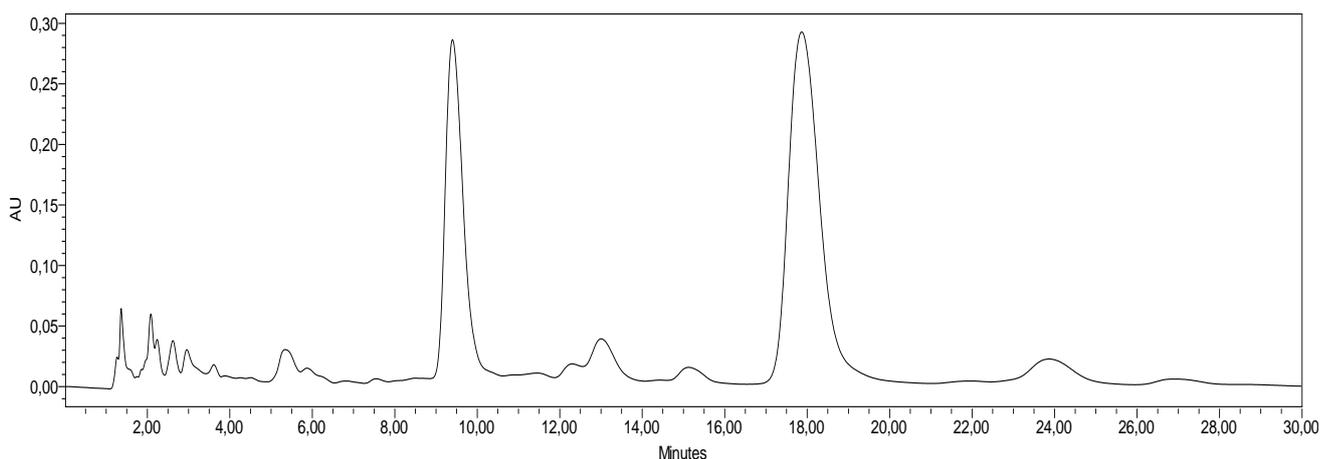


Figura 4. Cromatograma uliginosina B – 220nm

¹ Comunicação oral - Maikon de Barros Doutorando pelo PPG de Ciências Farmacêuticas em Junho 2012.

4.2 Avaliação do efeito do HCP na natação forçada em animais submetidos ou não ao estresse crônico moderado e imprevisível

4.2.1 Análise do Pré-teste

Analisando o pré-teste nos seus 15 minutos totais, podemos observar que o grupo Estresse teve maior tempo de imobilidade quando comparado ao grupo Não-Estresse (Figura 6).

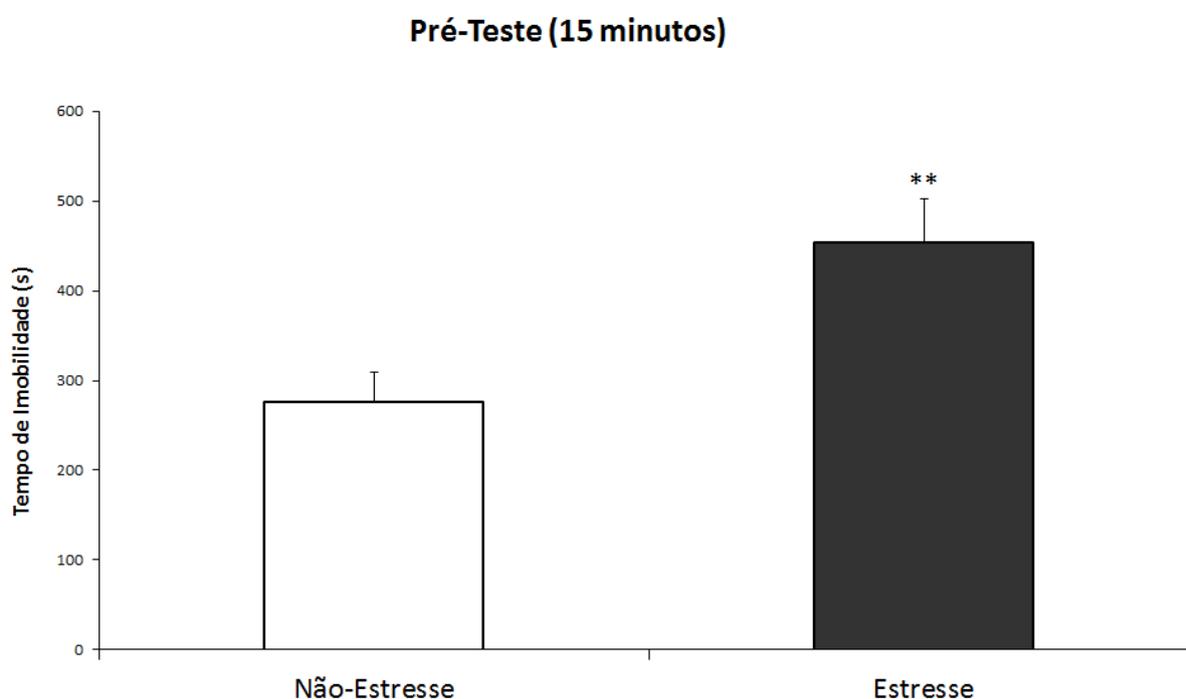


Figura 5. Efeito do estresse crônico moderado e imprevisível no nado forçado, em ratos Wistar. Valores expressos em média + SEM (n=15-18), Teste-t Student. ****P<0,01** comparado com seu respectivo controle (Não-Estresse)

4.2.2 Análise do Pré-Teste em 3 tempos

Os 15 minutos do pré-teste foram analisados em 3 tempos onde: T1 corresponde aos 5 minutos iniciais do pré-teste (0-5min), T2 (5-10min) e T3 (10-15min). Observa-se neste gráfico (Figura 7), que tanto o T2 quanto o T3 são diferentes do T1 em ambos os grupos (Estresse e Não-Estresse). Analisando os

tempos em separado, animais Estresse e Não-Estresse se comportam de forma diferente, tanto em T2 quanto em T3, onde o grupo Estresse mantém a imobilidade aumentada quando comparada ao grupo controle. Esta diferença não existe no tempo T1, embora haja uma tendência de aumento da imobilidade no grupo que sofreu estresse. Pode-se notar o perfil de aumento de imobilidade clássico para o teste de nado forçado, no qual o animal começa a desistir do teste após os 5 minutos iniciais. Observa-se que após este período inicial (T1), tende-se a um platô, tendo T2 e T3 um perfil de imobilidade muito semelhante.

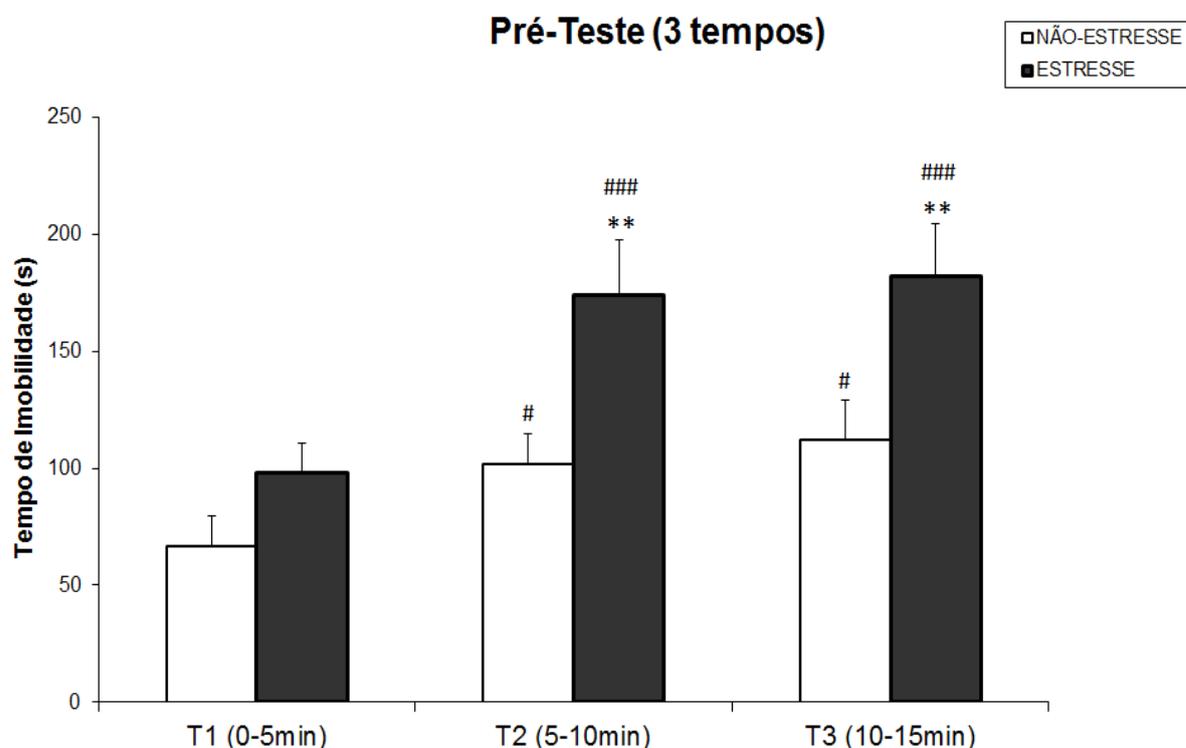


Figura 6. Efeito do estresse crônico moderado e imprevisível no nado forçado, em ratos Wistar. Valores expressos em média + SEM (n=15-18), ANOVA 2 Vias com Medidas Repetidas. $**P < 0,01$ comparado com seu grupo controle (Não-Estresse) no mesmo tempo ($F_{\text{estresse}}(1, 98) = 8,575$). # $P < 0,05$ ### $P < 0,001$ comparado ao T1 (0-5min) do seu mesmo grupo ($F_{\text{tempo}}(2, 98) = 16,686$).

4.2.3 Análise do Teste

No teste (Figura 8), comparamos os grupos Estresse e Não-Estresse com os tratamentos, veículo e extrato. O grupo Estresse, que havia demonstrado um maior tempo de imobilidade no pré-teste, teve esta imobilidade reduzida quando tratado com HCP em relação ao seu grupo controle (Estresse/Veículo). O tempo de imobilidade dos animais submetidos ao estresse e tratados com veículo não teve diferença significativa quando comparado ao seu respectivo controle (Não-Estresse/Veículo).

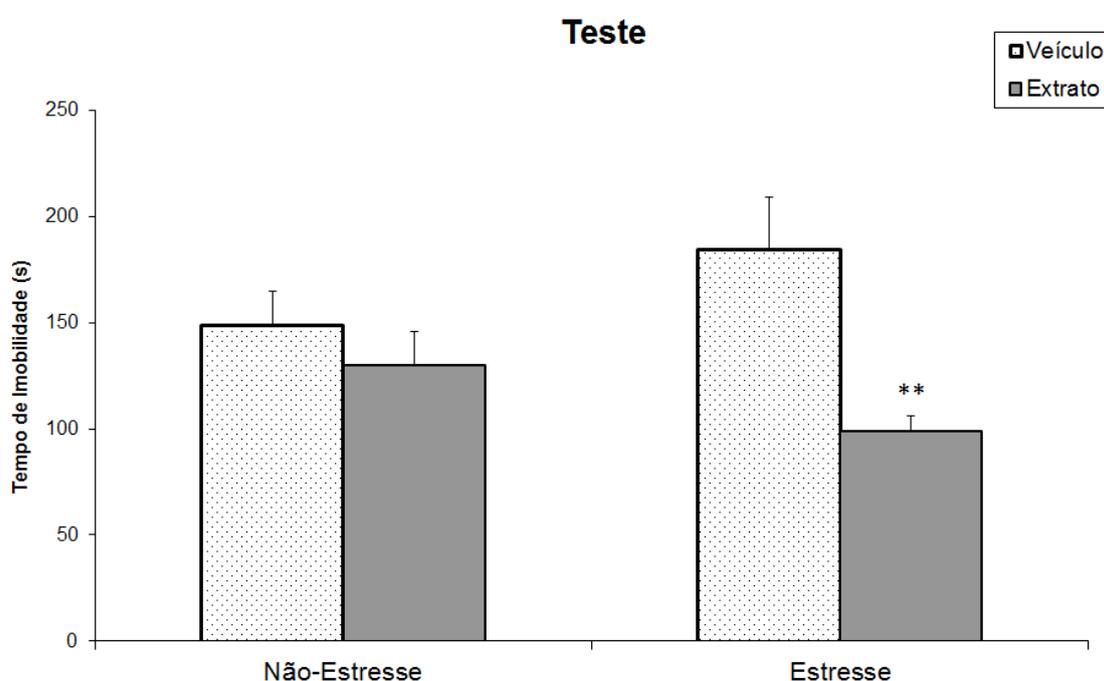


Figura 7. Efeito da administração repetida de extrato *n*-hexânico de *Hypericum caprifoliatum* no comportamento de ratos Wistar, submetidos ao estresse crônico moderado imprevisível, no nado forçado. Valores expressos em média + SEM (n=7-10), ANOVA 2 Vias. $**P < 0,01$ comparado com seu grupo controle (Estresse/Veículo) ($F_{\text{tratamento}} (1, 32) = 9,457$) ($F_{\text{interação}} (1, 32) = 3,393$ P = 0,057).

4.3 Atividade da Na⁺, K⁺ - ATPase

A enzima Na⁺, K⁺ - ATPase mostrou redução da atividade nos animais que sofreram o estresse, não sendo revertida pelo tratamento com o extrato (Figura 10). Na figura 11, podemos observar que não houve alteração da atividade da enzima no córtex dos animais submetidos ou não ao estresse, em ambos os tratamentos.

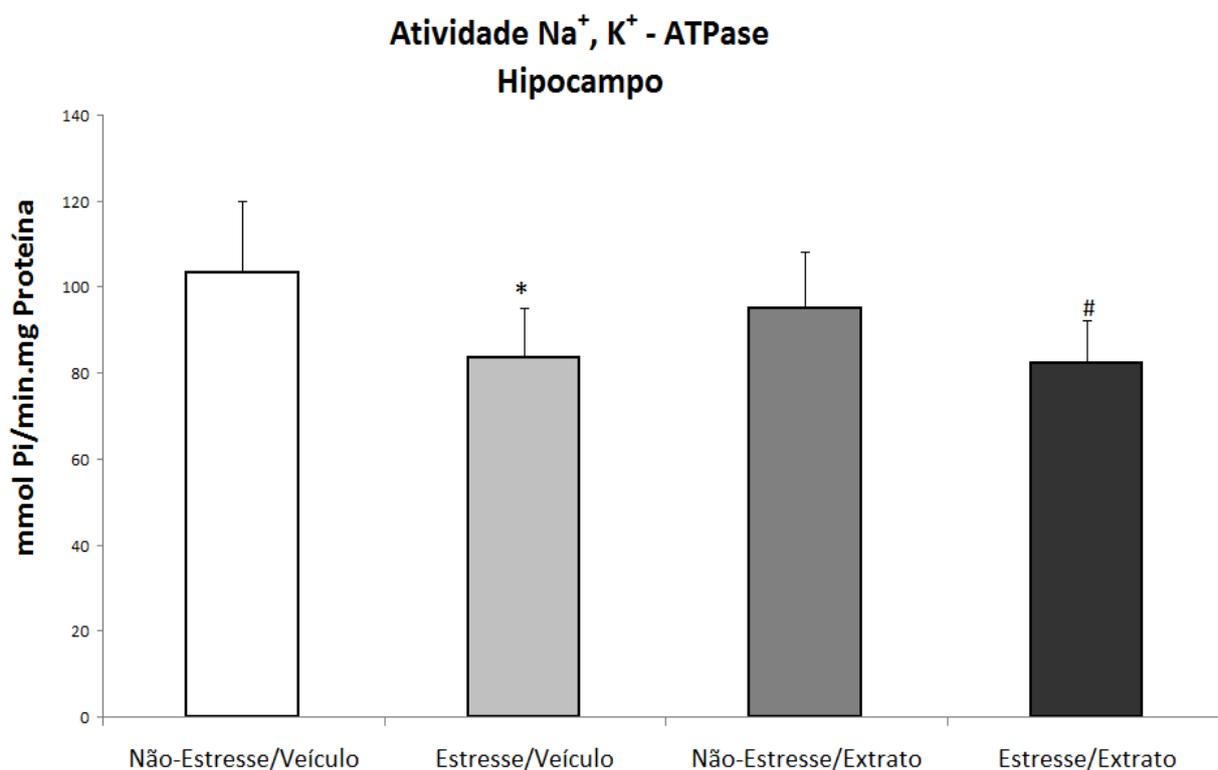


Figura 8. Efeito da administração repetida de extrato *n*-hexânico de *Hypericum caprifoliatum* na atividade da enzima Na⁺, K⁺ - ATPase em hipocampo de ratos. Valores expressos em média + SEM (n=7-10), ANOVA 2 Vias. **P*<0,05 comparado com o grupo Não-Estresse/Veículo. #*P*<0,05 comparado com o grupo Não-Estresse/Extrato.

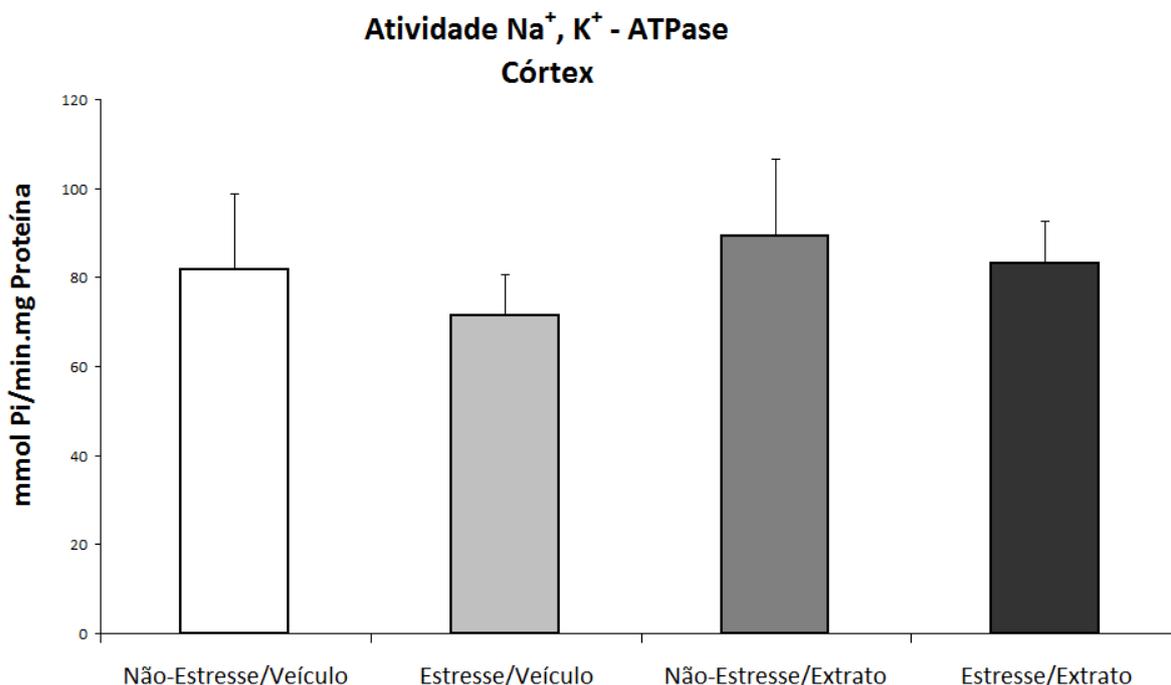


Figura 9. Efeito da administração repetida de extrato *n*-hexânico de *Hypericum caprifoliatum* na atividade da enzima Na⁺, K⁺ - ATPase em córtex de ratos Wistar, submetidos ao estresse crônico moderado imprevisível seguido de nado forçado. Valores expressos em média + SEM (n=7-10), ANOVA 2 Vias.

4.4 Controle de Massa Corporal

Analisando o peso dos animais semanalmente (Figura 9), não observamos diferença significativa entre os grupos até a 6ª semana de experimento. Após o tratamento com o extrato, os animais tratados com HCP, tanto do grupo Estresse quanto do grupo Não-Estresse, tiveram redução significativa no seu peso, quando comparados com os animais tratados com veículo.

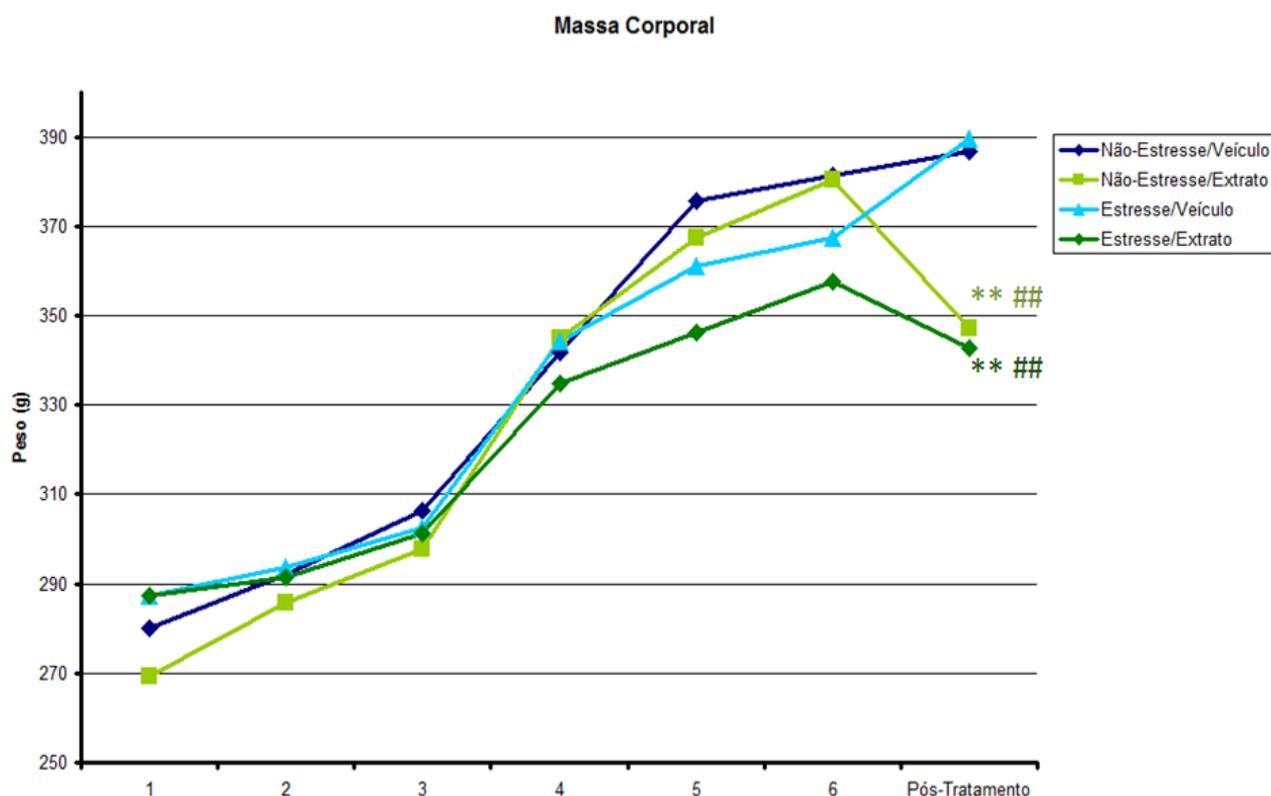


Figura 10. Efeito da administração repetida de extrato *n*-hexânico de *Hypericum caprifoliatum* em ratos no ganho de massa corporal. Valores expressos em média + SEM (n=7-10), ANOVA 2 Vias com Medidas Repetidas. ** $P < 0,01$ comparado com o grupo Não-Estresse/Veículo. ## $P < 0,01$ comparado com o grupo Estresse/Veículo ($F_{\text{tratamento}} (3, 230) = 1,015$) ($F_{\text{semana}} (6, 230) = 183,835$) ($F_{\text{interação}} (18, 230) = 3,671$)

5. Discussão

Neste trabalho, buscou-se demonstrar o efeito do tipo antidepressivo de um extrato *n*-hexânico de *Hypericum caprifoliatum* no modelo de natação forçada após um período crônico de estresse. O extrato foi caracterizado em uliginosina B, cuja estrutura é conhecida e a atividade do tipo antidepressiva foi demonstrada por Stein e colaboradores (2011). Avaliando o efeito do modelo de estresse crônico na imobilidade dos animais, observou-se que os animais submetidos aos 40 dias de estresse apresentaram um aumento de imobilidade, demonstrando que o modelo foi efetivo em produzir um comportamento do tipo depressivo. Este resultado está de acordo com o encontrado por Tagliari e

colaboradores (2010). Contudo, os autores demonstraram esta diferença de imobilidade no dia do teste (tempo de medida – 5 minutos). Avaliando o pré-teste em separado, em blocos de 5 minutos, o grupo Estresse apresentou maior imobilidade nos dois blocos finais. O perfil comportamental no pré-teste mostrou que os animais passaram a ter uma imobilidade em platô após T1, que pode estar associado à desistência do animal após o período inicial do pré-teste, uma vez que o mesmo aprende que não há escapatória (desamparo aprendido).

A avaliação da imobilidade dos animais após o tratamento com o extrato mostrou que houve uma redução da imobilidade nos animais que foram tratados com o extrato apenas nos animais que sofreram estresse, podendo-se inferir que o extrato terá realmente atividade em uma situação do tipo depressiva já instalada. Por outro lado, um extrato similar ao testado neste trabalho apresentou efeito anti-imobilidade em animais testados no nado forçado sem nenhum estresse prévio, após administração aguda, repetida e mesmo após três dias de retirada do tratamento repetido de 05 dias, com as mesmas doses usadas neste trabalho (Viana *et al.*, 2005, 2007). Esta não reprodução de dados pode ter relação com diferentes fatores externos como aparato, observador, manipulador, tempo de residência no biotério e também pode estar ligada a diferenças na constituição química dos extratos testados ou indicar um traço de resiliência dos animais. Os trabalhos de Viana e colaboradores utilizaram camundongos e ratos obtidos do biotério da FEPPS ou da colônia IFFA-CREDO Charles River – França, enquanto os ratos utilizados neste trabalho são oriundos do Biotério do Departamento de Bioquímica.

Outro aspecto importante a ser considerado é o fato de não haver diferença significativa no tempo de imobilidade dos grupos Não-Estresse/Veículo e Estresse/Veículo na sessão teste do nado forçado, diferente do observado na sessão pré-teste e do resultado de Tagliari e colaboradores (2010), que verificaram o efeito do estresse na sessão teste. Assim, nosso dado sugere que

o impacto do estresse sobre o nado forçado é reversível e demonstra que a manutenção do estresse durante o tratamento não foi necessária para a detecção do efeito do tipo antidepressivo do extrato. No entanto, é importante ressaltar que os outros estudos da literatura mantiveram o estresse variado durante o período de tratamento dos animais (Lu-Fan *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2008; Gamaro *et al.*, 2003). Diferentes protocolos de ECMI são publicados na literatura, a variação de agentes estressores, tempo de aplicação e período de tratamento dos animais torna difícil a comparação com dados publicados.

O padrão de ganho de peso foi homogêneo em todos os grupos até a 6ª semana. Não foi observada diferença significativa no ganho de peso entre os grupos Estresse e Não-Estresse, ao contrário do encontrado por Tagliari e colaboradores (2010). Após o início dos tratamentos, os dois grupos tratados com o extrato apresentaram uma queda significativa na massa corporal e sinais de toxicidade como piloereção e diarreia. Alguns trabalhos anteriores do grupo avaliaram a toxicidade de diferentes extratos de espécies de *Hypericum* nativas do RS. Viana e colaboradores (2006) relataram que ratos tratados com extrato de *H. caprifoliatum* obtido com éter de petróleo (270mg/kg, i.p), apresentaram sinais de toxicidade, o que não ocorreu com ratos e camundongos tratados pela via oral (dose 50-2000mg/kg) com extratos éter de petróleo e ciclohexano. Betti e colaboradores (2012) mostraram que um extrato lipofílico de *H. polyanthemum*, rico em uliginosina B, apresenta toxicidade aguda baixa, mas em doses repetidas (90 – 900mg/kg/dia) prejudicou a evolução ponderal dos animais. Houve uma redução na ingestão alimentar dos animais, inclusive do grupo tratado com veículo, podendo estar relacionada com algum desconforto orogástrico causado pelo tratamento contínuo por gavagem ou ainda com perda do apetite (Betti *et al.*, 2012). Desta forma, uma perspectiva de continuidade deste trabalho é o estudo de toxicidade de um extrato *n*-hexânico de *H. caprifoliatum*, com avaliação do comportamento alimentar.

A atividade da enzima Na^+ , K^+ - ATPase hipocampal teve redução nos animais que foram submetidos ao estresse crônico. Apesar do efeito sobre o comportamento, o extrato não reverteu o efeito sobre a atividade enzimática. Isso sugere que a redução na atividade da Na^+ , K^+ - ATPase já observada neste modelo de estresse crônico (Crema *et al.*, 2010; Gamaro *et al.*, 2003) não é necessária para a ocorrência do comportamento do tipo depressivo e que o efeito do extrato não passa por esse caminho, significando que o efeito do extrato sobre o comportamento deve se dar por outra via, que não a recuperação da atividade dessa enzima.

6. Conclusão

Visto que o estudo deste trabalho é inovador, pois não existem relatos de avaliação de extrato *n*-hexânico de *Hypericum caprifoliatum* na associação dos modelos de estresse crônico moderado e imprevisível e teste de natação forçada, entende-se que os resultados são promissores pois conseguiu-se demonstrar que o estresse aumenta a imobilidade dos animais e que o extrato consegue reverter este efeito provocado pelo estresse crônico. Tem-se como perspectiva a continuidade deste trabalho com a inclusão de grupos de controle positivo, avaliação da atividade locomotora bem como o estudo de toxicidade de doses repetidas e efeito sobre o comportamento alimentar.

7. Fontes de financiamento

CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico)

8. Referências

ADELL, A., CASTRO, E., CELADA, P., BORTOLOZZI, A., PAZOS, A., ARTIGAS, F., Strategies for producing faster acting antidepressants. *Drug Discov Today*, v. 10, p. 578-585, 2005.

ANISMAN, H., ZACHARKO, R. M. Depression as a consequence of inadequate neurochemical adaptation in response to stressors. *Br Journal Psychiatry*, p. 36-43, 1992.

BETTI, A. H., STEIN, A. C., DALLEGRAVE, E., WOUTERS, A. T. B., WATANABE. T. T. N., CRIEMEIER, D., BUFFON, A., RATES, S. M. K. Acute and repeated-doses (28 days) toxicity study of *Hypericum polyanthemum* Klotzsch ex Reichardt (Guttiferae) in mice. *Food and Chemical Toxicology*, Epub ahead of print, 2012.

BRADFORD, M. M.; A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein-die-binding. *Anal. Biochemistry*, v. 72, p. 248 – 254, 1976.

CARGININ, S.T., NUNES, J.M., HAAS, J.S., BALADÃO, L.F., CASSEL, E., VARGAS, R.F., RECH, S.B., VON POSER, G.L. Supercritical fluid extraction and high performance liquid chromatographic determination of benzopyrans and phloroglucinol derivative in *Hypericum polyanthemum*. *Journal of Chromatography*, v.878, p.83–87, 2010.

CHAN, K. M.; DELFERT, D.; JUNGER, K. D.; A direct colorimetric assay for Ca²⁺-stimulated activity. *Annal Biochemistry Journal*, v. 220, p. 375 – 380, 1986.

CHARNEY, D. S., MANJI, H. K., Life stress, genes, and depression: multiple pathways lead to increased risk and new opportunities for intervention. *Sci STKE*, re5, 2004

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

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

DAUDT, R., VON POSER, G.L., NEVES, G., RATES, S.M.K. Screening for the antidepressant activity of some species of *Hypericum* from South Brazil. *Phytotherapy Research*, v.14, p. 344-346, 2000.

DE VASCONCELLOS, A.P., TABAJARA, A.S., FERRARI, C., *et al.*, Effect of chronic stress on spatial memory in rats is attenuated by lithium treatment. *Physiol Behav*, v. 79, p. 143-149, 2003.

DE VASCONCELLOS, A.P., VENDITE, D.A., NASSIF, M., CREMA, L.M., FROZZA, R., THOMAZI, A.P., NIETO, F.B., WOFCHUK, S., SALBEGO, C., DA ROCHA, E.R., DALMAZ, C. Chronic stress and lithium treatments alter hippocampal glutamate uptake and release in the rat and potentiate necrotic cellular death after oxygen and glucose deprivation. *Neurochem Res*. v.36, n.5, p.793-800, 2011.

FERRAZ, A. B. F., BORDIGNON, S., STAATS, C., SCHIPSEMA, J., VON POSER, G. L. Benzopyrans from *Hypericum polyanthemum*. *Phytochemistry*. v. 57, p. 1227-1230, 2001.

FERRAZ, A. B. F., BORDIGNON, S., MANS, D., SCHIMITT, A., RAVAZZOLO, A. P. Screening for the presence of hypericins in southern Brazilian species of *Hypericum* (Gurriiferae). *Pharm. Biol.* v.40, p. 294-297, 2002.

GAMARO, G. D., STRECK, E.L., MATTÉ, C., *et al.*, Reduction of hippocampal Na⁺, K⁺ - ATPase activity in rats subjected to an experimental model of depression. *Neurochem Res.*, v. 28, p. 1339-1344, 2003.

GNERRE, C.; VON POSER, G.L.; FERRAZ, A.; VIANA, A.F.; TESTA, B.; RATES, S.M.K. Monoamine oxidase inhibitory activity of some *Hypericum* species native to South Brazil. *Journal of Pharmacy Pharmacology*, v.53, p.1273-1279, 2001.

HAAS, J.S., STOLZ, E.D., BETTI, A.H., STEIN, A.C., SCHIPSEMA, J., VON POSER, G.L., RATES, S.M. The anti-immobility effect of hyperoside on the forced swimming test in rats is mediated by the D2-like receptors activation. *Planta Med.*, v.77, n. 4, p.334-9, 2011.

HOLSBOER, F. Animal models of mood disorders. In: CHARNEY, D.S.; NESTLER, E.J.; BUNNEY, B.S. *Neurobiology of mental illness*. New York: Oxford University Press, 1999.

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

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

KATZ, R. J. Animal models and human depressive disorders. *Neurosci Biobehav Rev.* v. 5, p.231–246, 1981.

KATZ, R. J. Animal model of depression: pharmacological sensitivity of a hedonic deficit. *Pharmacol Biochem Behav.* v.16, p.965–968, 1982.

KENNEDY, S. H. A review of antidepressant treatments today. *Eur Neuropsychopharmacol*, v. 16, p. 619-623, 2006.

LI, L.F., LU, J., LI, X.M., XU, C.L., YANG, J., QU, R., MA, S.P. Antidepressant-like effects of the saponins extracted from Chaihu-jia-longgu-muli-tang in a rat unpredictable chronic mild stress model. *Fitoterapia.* v. 83, n. 1, p. 93-103, 2012.

LINDE, K., BERNER, M. M., KRISTON, L. St. John's wort for major depression. *Cochrane Database Syst Rev.* 4. CD000448, 2008.

McKINNEY, W. T. & BUNNEY, W. E., Animal model of depression: review of evidence and implications for research. *Archives of general Psychiatry.* v. 21, p. 240-248, 1969.

NÖR, C., ALBRING, D., FERRAZ, A.B.F., SCHRIPEMA, J., PIRES, V., SONNET, P., GUILLAUME, D., VON POSER, G. L. Phloroglucinol derivatives from four *Hypericum* species belonging to the Trigynobrathys section. *Biochemical Systematics and Ecology.* v. 32, p. 517-519, 2004.

NÖR, C., BERNARDI, A. P. M., HASS, J. S., SCHRIPEMA, J., RECH, S. B., VON POSER, G. L. Phenolic Constituents of *Hypericum* Flowers. Natural products communication, v. 3, p. 237-240, 2008.

PANAYIOTIDIS, M. D.; BORTNER, C. D.; CIDLOWSKI, J. A. On the mechanism of ionic regulation of apoptosis: would the Na^+, K^+ - ATPase please stand up? *Acta Physiologica*, v. 187, p. 205 – 215, 2006.

PAYKEL, E. S. Depression: major problem for public health. *Epidemiol Psychiatr Soc*, v. 15, p. 4-10, 2006.

PORSOLT, R. D., LePICHON, M., JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*, v.266, n.5604, p.730- 32, 1977.

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

PUCIŁOWSKI, O., OVERSTREET, D. H., REZVANI, A.H., *et al.*, Chronic mild stress-induced anhedonia: greater effect in a genetic rat model of depression. *Physiol Behav*, v. 54, p. 1215-1220, 1993.

RAHIMI, R., NIKFAR, S., ABDOLLAHI, M. Efficacy and tolerability of *Hypericum perforatum* in major depressive disorder in comparison with selective serotonin reuptake inhibitors: a meta-analysis. *Psychopharmacol. Biol. Psychiatry*, v. 33, p. 118-127, 2009.

ROSEN R. C., MARIN, H. Prevalence of antidepressant-associated erectile dysfunction. *J. Clin Psychiatry*, v., 64, p. 5-10, 2003.

STEIN, A.C., VIANA, A.F., MÜLLER, L.G., NUNES, J.M., STOLZ, E.D., DO REGO, J.C., COSTENTIN, J., VON POSER, G.L., RATES, S.M. Uliginosin B, a phloroglucinol derivative from *Hypericum polyanthemum*: a promising new molecular pattern for the development of antidepressant drugs. *Behav Brain Res.* v. 1, p. 66-73, 2011.

TAGLIARI, B., TAGLIARI, A.P., SCHMITZ, F., CUNHA, A.A., DALMAZ, C., WYSE, A.T.S. Chronic Variable Stress Alters Inflammatory and Cholinergic. *Neurochem Res.* v. 36, p.487-493, 2010.

VIANA, A.F., HECKLER, A.P., FENNER, R., RATES, S.M. Antinociceptive activity of *Hypericum caprifoliatum* and *Hypericum polyanthemum* (Guttiferae). *Braz J Med Biol Res.* v.36, n.5, p. 631-4, 2003.

VIANA, A., DO REGO, J.C., VON POSER G.L., FERRAZ, A., HECKLER, A.P., COSTENTIN, J., RATES, S.M.K. The antidepressant-like effect of *Hypericum caprifoliatum* Cham & Schlecht (Guttiferae) on forced swimming test results from an inhibition of neuronal monoamine uptake. *Neuropharmacology.* v.49, n.7, p.1042-52, 2005.

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

VIANA, A. Effect of *Hypericum caprifoliatum* and *Hypericum polyanthemum* cyclohexane extracts on monoamine and opioid receptor-stimulated [³⁵S]-GTPγS binding in rat brain membranes, Tese de Doutorado, 2007.

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

VON POSER, G. L., RECH, S. B., RATES, S.M.K. *Chemical and pharmacological aspects of southern Brazilian Hypericum species*. In: SILVA, J.A.T. (Org.). *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology: Advances and Topical Issues*. 1 ed. London, v. 4, p. 509-515, 2006.

WILNER, P. Animal models of depression: an overview. *Pharmacology Therapeutic*. v. 45, p. 425-455, 1990

WU, H. H., WANG, S. Strain differences in the chronic mild stress animal model of depression. *Behavioral Brain Research*. v. 213, p. 94–102, 2010.

WYSE, A. T. S.; STRECK, E. L.; WORM, P.; WAJNER, A.; RITTER, F.; NETTO, C. A. Precognition prevents the inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase activity after brain ischemia. *Neurochemical Research*, v. 25, n. 7, p. 917 – 975, 2000.

YU, S. P. Na⁺,K⁺-ATPase: the new face of an older player in the pathogenesis and apoptotic/hybrid cell death. *Biochemical Pharmacology*, v. 66, p. 1601 – 1609, 2003.

ZHAO, Z., WANG, W., GUO, H., ZHOU, D. Antidepressant-like effect of liquiritin from *Glycyrrhiza uralensis* in chronic variable stress induced depression model rats. *Behav Brain Res*. v. 1, p. 108-113, 2008.