

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Farmácia

Disciplinas de Trabalho de Conclusão de Curso I e II

**Avaliação dos efeitos do floroglucinol e derivados sobre o
comportamento e crises convulsivas em *zebrafish* (*Danio rerio*)**

Soraia Lunardelli

Porto Alegre, junho de 2012.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Farmácia

Disciplinas de Trabalho de Conclusão de Curso I e II

Avaliação dos efeitos do floroglucinol e derivados sobre o comportamento e crises convulsivas em *zebrafish* (*Danio rerio*)

Soraia Lunardelli

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para a obtenção do título de Farmacêutico, pelo curso de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Prof. Dra. Grace Gosmann

Co-orientador: Prof. Dr. Diogo Lösch de Oliveira

Porto Alegre, junho de 2012.

“O sucesso frequentemente está apenas a uma idéia de distância.”

(Frank Tyge)

Agradecimentos

A toda a minha família pelo apoio e amor irrestritos. Nada seria possível sem vocês.

À minha orientadora Grace, pela oportunidade e confiança durante todos esses anos de iniciação científica.

Ao meu co-orientador Dioguinho, por ter permitido essa parceria, a qual me proporcionou muito conhecimento e momentos incríveis.

À Kamila, grande inspiradora. Obrigada pela paciência, pelo aprendizado, pela companhia sempre divertida, por ter compartilhado comigo longos anos de graduação e pelo fortalecimento da nossa amizade durante este trabalho. Tenho certeza que seus passos na vida acadêmica vão seguir cada vez mais brilhantes.

À Mônica, que me conhece como poucos, por ter transmitido seus conhecimentos e ter sido uma doutoranda espetacular e única. É impossível dimensionar toda a admiração e gratidão que sinto. Embora a distância marota atrapalhe, será sempre a mamadi do meu coração.

Às amadas Lucimara e Cíntia, que me acolheram da melhor maneira no laboratório, minhas irmãzinhas de coração. Às queridíssimas Laura, Bruna, Bianca e Denise que ingressaram na família do 105 e me proporcionaram muitos momentos inesquecíveis. Obrigada a todas vocês pelos inúmeros ensinamentos, pelas experiências, pelas conversas, pela ajuda, pela diversão. Vocês são fantásticas!

A todas as colegas de laboratório, pela convivência e apoio.

Aos colegas da Farmácia Popular do Brasil, por terem tornado tão divertidos os dias de estágio curricular.

Aos meus verdadeiros amigos, pela cumplicidade e força.

Este trabalho foi escrito em formato de artigo científico, seguindo as normas para submissão de artigo da revista *Neuropharmacology*, as quais estão contidas no anexo 1.

**Avaliação dos efeitos do floroglucinol e derivados sobre o
comportamento e crises convulsivas em *zebrafish* (*Danio rerio*)**

Soraia Lunardelli¹, Kamila Zenki², Ben Hur Mussulini², Mônica Oliveira Duarte¹,
Diogo Lösch de Oliveira², Grace Gosmann¹

¹Laboratório de Fitoquímica e Síntese Orgânica, Faculdade de Farmácia,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 2752, 90610-000,
Porto Alegre, RS - Brasil.

²Laboratório 24, Departamento de Bioquímica, ICBS, Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos 2600 anexo, 90035-000, Porto
Alegre, RS – Brasil.

Autores correspondentes: Grace Gosmann / Diogo Lösch de Oliveira

Fone: (51) 33085526 / 33085555

E-mail: grace.gosmann@ufrgs.br / losch@ufrgs.br

Resumo

O floroglucinol é um composto fenólico precursor de diversas moléculas com atividades biológicas já descritas na literatura, com destaque para a antidepressiva. O modelo experimental com *zebrafish* tem sido bastante utilizado em várias linhas de pesquisa biológica, como, por exemplo, para avaliação da atividade anticonvulsivante. A partir de estudos que mostram uma correlação entre compostos antidepressivos e anticonvulsivantes, nosso grupo administrou floroglucinol e dois derivados sintéticos (Composto 4 e Composto 5) em *zebrafish* para observação da atividade locomotora e exploratória no “*open tank*” e, posteriormente, à avaliação através do modelo convulsivo induzido por pentilenotetrazol (PTZ). O comportamento dos animais não sofreu alteração em relação ao controle para nenhum dos compostos testados. O Composto 5 aumentou significativamente ($p < 0,001$) a latência para a convulsão além de demonstrar que os peixes se recuperam mais rápido da crise convulsiva ($p < 0,01$). Planeja-se, então, investigar mecanismos de ação para esta atividade, além de realizar a síntese de novos compostos.

Palavras-chave: floroglucinol; *zebrafish*; PTZ; “*open tank*”, anticonvulsivante; antidepressivo.

1. Introdução

Os compostos fenólicos compreendem um grupo heterogêneo de substâncias, umas com estruturas químicas relativamente simples e outras complexas. Esses compostos são vastamente utilizados em diversas áreas, como na produção de polímeros, explosivos, estabilizantes, sendo que muitos apresentam atividades biológicas importantes. O floroglucinol **1** (1,3,5-triidroxibenzeno) é um composto fenólico, precursor de diversas moléculas com atividades biológicas já descritas na literatura. Dentre as atividades mais importantes podemos destacar a antimicrobiana (Rocha *et al.*, 1996), antialérgica (Daikonya *et al.*, 2002), antiinflamatória (Ishii *et al.*, 2003), antioxidante (Lee *et al.*, 2003; Rosa *et al.*, 2007), antiviral (Fritz *et al.*, 2007), anticancerígena (Ito *et al.*, 2000; Kong *et al.*, 2010) e neuroprotetora contra a doença de Alzheimer (Griffith *et al.*, 2010). Entretanto, a atividade mais estudada para esta família de compostos é a atividade antidepressiva (Rego *et al.*, 2007; Franklin *et al.*, 2004; Stein *et al.*, 2012). Como exemplo destes derivados (figura 1), podemos citar alguns compostos extraídos de *Hypericum sp.*, como uliginosina B **2** (dose-resposta de 10 mg/kg no teste de natação forçada em roedores (Ferraz *et al.*, 2002), composto HC1 (Viana *et al.*, 2005) e a hiperforina **3** (dose-resposta de 4 mg/kg no teste de suspensão pela cauda em roedores (Chatterjee *et al.*, 1998; Müller *et al.*, 1998).

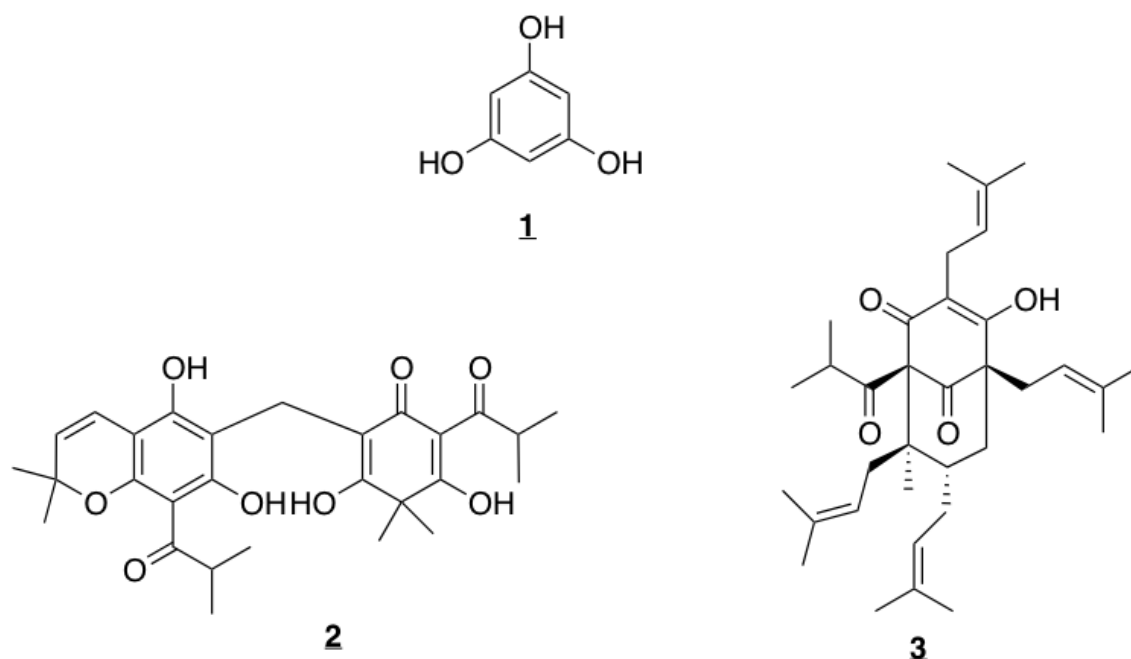


Figura 1: Floroglucinol **1** e derivados uliginosina B **2** e hiperforina **3**.

Durante alguns anos, estudos sugeriram que os medicamentos antidepressivos possuíam propriedades pró-convulsivas (Jobe *et al.*, 2005). Mais recentemente, houve evidências do papel anticonvulsivante para os antidepressivos mais seletivos, de nova geração (Kanner *et al.*, 2009; Clinckers *et al.*, 2005; Preskorn *et al.*, 199; Bagdy *et al.*, 2007).

A epilepsia é uma disfunção neurológica decorrente de um desequilíbrio dos processos excitatórios e inibitórios (Avoli *et al.*, 2005; Pitkanen *et al.*, 2009). Esta patologia atinge mais de 50 milhões de pessoas no mundo. A cada ano, ocorrem 2,4 milhões de novos casos de convulsão (WHO, 2012). Nesse sentido, cresce a importância da investigação de novos compostos capazes de minimizar os efeitos nocivos da convulsão, além da busca por novos modelos experimentais para o estudo desta patologia.

Fevale e colaboradores em 2003 e Specchio e colaboradores em 2004 descreveram que o citalopram, um antidepressivo comumente utilizado, diminui

cerca de 50% a remissão de crises convulsivas em 9 dos 11 pacientes avaliados com epilepsia refratária, mostrando-se tão eficaz como outros anticonvulsivos. Com base nesses dados, torna-se de grande interesse a pesquisa do potencial de atividade anticonvulsiva de compostos derivados do floroglucinol. Nove compostos foram sintetizados e avaliados previamente para a atividade antidepressiva através do teste de suspensão pela cauda apresentando mesma atividade em dose equimolar àquela da imipramina (Duarte *et al.*, 2012).

Para a realização dos testes, optou-se pela metodologia utilizando *zebrafish*. O *zebrafish*, ou “paulistinha”, é um pequeno teleósteo que mede de 3 a 4 cm, tem peso em torno de 0,35 g e pertence à família *Cyprinidae*. Como um vertebrado relativamente simples, o *zebrafish* possui muita similaridade fisiológica com os seres humanos, permitindo aos pesquisadores investigar os mecanismos relevantes para a patogênese humana, bem como novas estratégias de tratamento (Shin *et al.*, 2002). Atualmente o *zebrafish* tem sido aplicado como modelo em estudos de genética, biologia do desenvolvimento, teratologia, comportamento, toxicologia e neurociências (Vascotto, 1997). O pequeno espaço requerido para a manutenção dos animais, o baixo custo e a praticidade para *screening* em larga escala (Lieschke e Currie, 2007) são algumas das características que tornam o *zebrafish* atraente nas pesquisas biomédicas. Desta forma, pode-se acelerar a descoberta de novos compostos que possam servir como novas estratégias terapêuticas (Stern e Zon, 2003).

O pentilenotetrazol (PTZ) é um composto pró-convulsivante comumente utilizado em modelos experimentais crônicos e agudos de epilepsia. O mecanismo de ação do PTZ baseia-se na diminuição da função GABAérgica do

Sistema Nervoso Central (Corda *et al.*, 1992) atuando através do antagonismo do receptor GABA_A (Olson *et al.*, 1981).

Tendo em vista o que foi apresentado, este trabalho teve por objetivo avaliar o comportamento e alguns parâmetros da crise convulsiva induzida por PTZ em *zebrafish* submetidos ao pré-tratamento com o floroglucinol e dois diferentes derivados obtidos sinteticamente.

2. Materiais e métodos

1.1. Animais

Zebrafish adultos (3 a 6 meses de idade), machos e fêmeas, foram obtidos comercialmente (Delphis, RS) e aclimatizados por duas semanas antes dos experimentos. Os animais foram mantidos em aquário de 50 L, aerado, com temperatura controlada ($26\pm 2^{\circ}\text{C}$) e com um ciclo de 12 horas claro/escuro. Os peixes foram alimentados duas vezes por dia com comida comercial (*Alcon BASIC*, Brasil) em flocos e manipulados de acordo com o *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA), sob o número 22.214.

1.2. Química

O produto de partida floroglucinol foi adquirido comercialmente na forma anidra da marca Sigma Aldrich. A síntese dos compostos **4** e **5** foi monitorada através de cromatografia em camada delgada (CCD) em placas de sílica-gel 60 F₂₅₄ Merck, e os compostos foram visualizados através de luz ultravioleta em 254nm. Os compostos tiveram suas estruturas químicas elucidadas através

dos dados de ressonância magnética nuclear e espectroscopia de massas. Tais dados de elucidação estrutural não estão apresentados neste trabalho, pois ainda são confidenciais e estão sujeitos a patente.

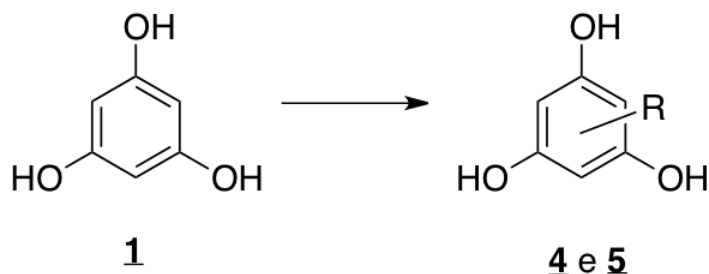


Figura 2: Floroglucinol **1** e derivados **4** e **5**.

2.2. *Preparação dos compostos*

Para a solubilização dos compostos utilizou-se água MilliQ e polissorbato 80 (Vetec) na concentração de 5%, com auxílio de ultrassom. Para cada composto, prepararam-se duas doses: 6,0 e 60 mg/kg. Para compor o controle do teste, utilizou-se uma solução contendo 5% de polissorbato 80.

2.3. *Aparatos e procedimento experimental*

Os animais foram aleatoriamente retirados do aquário e transferidos, individualmente, para um confinamento cilíndrico contendo triclaína (160 $\mu\text{g/mL}$), onde permaneceram por aproximadamente um minuto, para anestesia. Posteriormente, procedeu-se a administração de 10 μL de cada amostra via intraperitoneal (i.p.). Após 10 minutos de recuperação da anestesia em béquer com água, cada animal foi cuidadosamente levado até o “open tank”, um tanque trapezoidal de vidro (23,9 x 28,9 x 15,1 cm e 15,9 cm de diagonal), conforme a figura 3, contendo 1,5 L de água tratada com AquaSafe. Os perfis comportamentais de cada animal foram observados e filmados durante dez

minutos. As dimensões deste aparato são similares às previamente descritas para o teste de atividade locomotora e exploratória (Rosemberg *et al.*, 2011; Wong *et al.*, 2012; Cachat *et al.*, 2010; Grossman *et al.*, 2010).

O “*open tank*” foi virtualmente dividido em três áreas horizontais iguais (fundo, meio e topo) para avaliar a atividade exploratória vertical, como demonstra a figura 3 (B). Uma webcam (Microsoft LifeCam 1.1 com Auto-Focus) foi posicionada a 40 cm do “*open tank*” para monitorar a localização e o nado dos animais. A câmera é conectada a um computador para a gravação e análise dos vídeos, através do software ANY-Maze, aplicando a tecnologia de *video-tracking*. Para uniformizar o ambiente de análise e aumentar o contraste do animal em relação ao aparato de teste, este foi cercado com papel amarelo (Rosemberg *et al.*, 2011). Desta forma foi possível avaliar parâmetros como: distância percorrida, velocidade de nado, latência para entrada no topo, tempo de permanência no topo e tempo imóvel no aparato.

Passados os dez minutos de avaliação comportamental no “*open tank*”, o mesmo peixe foi transferido para um aquário contendo PTZ (10 mM; Sigma Aldrich) onde procedeu-se a indução da convulsão. Durante vinte minutos o *zebrafish* foi filmado e observado. Dessa forma obtivemos os dados de latência para a crise convulsiva. Posteriormente, os peixes foram transferidos para um béquer contendo 400 mL de água tratada (AquaSafe) e observados por três horas a fim de obter o tempo necessário para o peixe voltar ao comportamento de nado normal. Este é definido como o tempo em que o peixe se encontra em “escore 0” (nado curto, preferencialmente no fundo do aquário) e permanece deste modo até o final da observação.

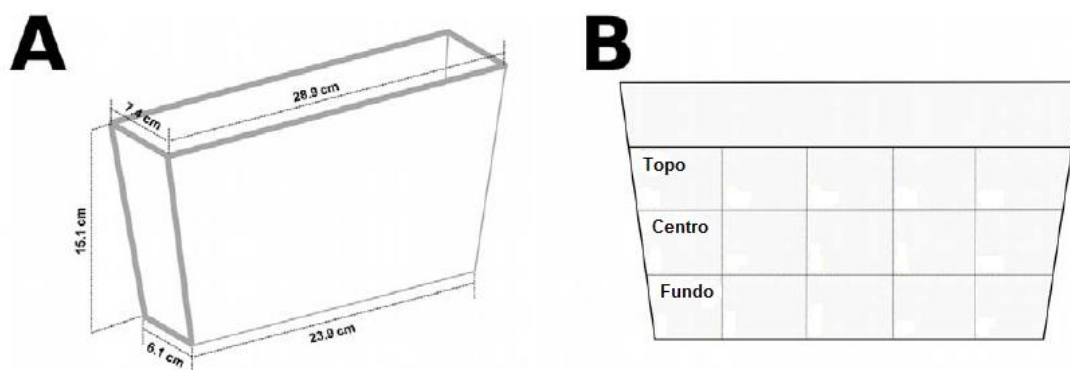


Figura 3: (A) Ilustração do tanque de vidro trapezoidal (“*open tank*”) e suas dimensões específicas. (B) Divisão virtual do tanque em três áreas (fundo, centro e topo).

2.4. Análise Estatística

Os dados foram expressos como médias \pm desvio padrão e analisados por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida por teste *Tukey*, de comparações múltiplas. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

3. Resultados

3.1. Efeito do floroglucinol e seus derivados sobre a atividade locomotora e exploratória

Considerando os dados de literatura que indicam que alguns compostos antidepressivos também apresentam ação anticonvulsivante, e considerando nossos resultados prévios, dois derivados do floroglucinol foram sintetizados e avaliados em modelo de PTZ em *zebrafish*.

Inicialmente, foi realizada a avaliação comportamental diante do pré-tratamento com floroglucinol, Composto **4** e Composto **5** administrados via i.p. em *zebrafish*, no aquário trapezoidal conforme descrito anteriormente. Não

houve diferença estatística em nenhum dos parâmetros e doses analisados (figura 4).

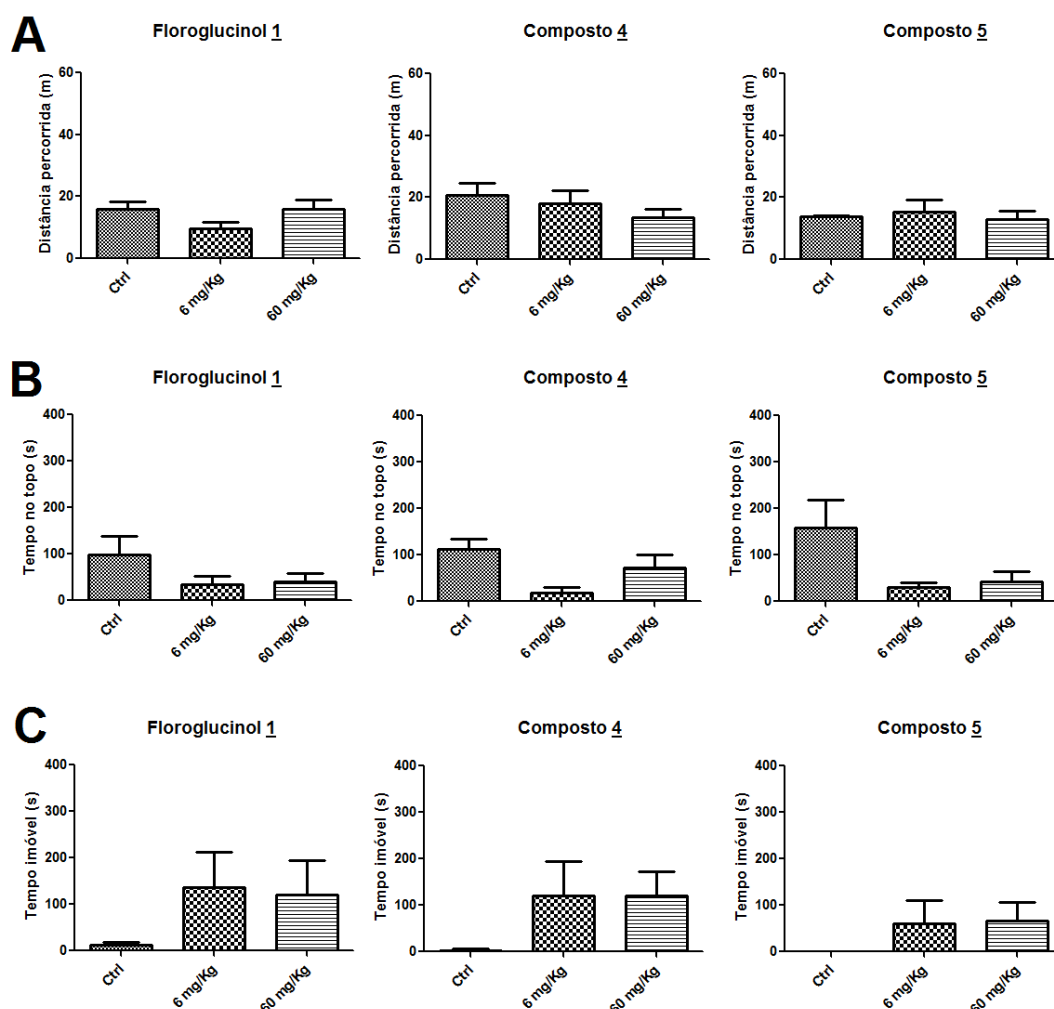


Figura 4: Efeitos comportamentais do tratamento i.p. com floroglucinol (n=9), Composto 4 (n=9) e Composto 5 (n=7) no aparato “open tank”. (A) Distância percorrida pelo animal (metros), (B) tempo no topo (s) e (C) tempo imóvel (s). Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão.

3.2. Efeitos do floroglucinol e seus derivados sobre crises convulsivas induzidas por PTZ

Para verificar os efeitos dos compostos na proteção da convulsão aguda induzida por PTZ em *zebrafish*, o tempo de latência da crise convulsiva e o

tempo necessário para o peixe retomar o seu nado normal (“escore 0”) foram mensurados. Visualizando a figura 5, percebe-se que o tratamento com floroglucinol não alterou significativamente a latência para a convulsão. Para o Composto 4 não foi observado efeito significativo. Já o Composto 5 apresentou uma alteração significativa para a dose de 60 mg/kg, aumentando o tempo para o início da crise convulsiva ($p < 0,001$).

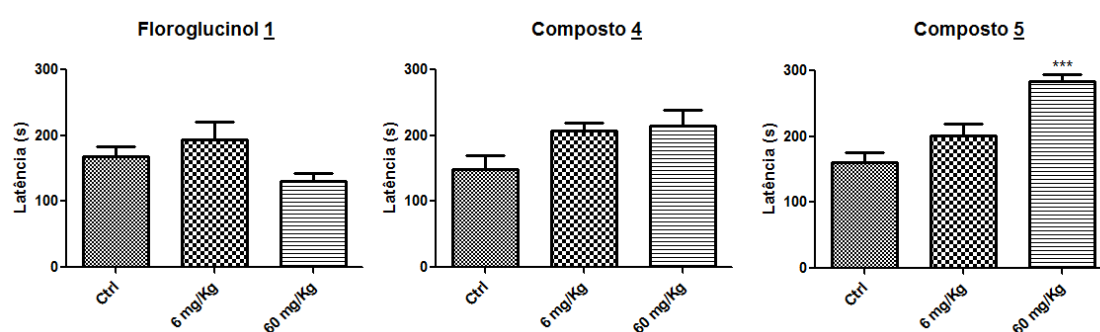


Figura 5: Efeitos do floroglucinol 1 (n=9), Composto 4 (n=9) e Composto 5 (n=7) sobre o tempo de latência (s) para a primeira crise convulsiva induzida por PTZ (10 mM) em *zebrafish*. *** $p < 0,001$. Teste estatístico: ANOVA de uma via seguida de teste comparativo de *Tukey*. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão

A figura 6 ilustra os dados referentes ao tempo necessário para o “escore 0”. Na dose de 60 mg/kg, o floroglucinol mostrou aumento do tempo necessário para os animais retornassem ao nado normal ($p < 0,05$). O Composto 4 não mostrou alteração significativa em nenhuma dose e o Composto 5, em 60 mg/kg, reduziu significativamente a latência ($p < 0,01$), mostrando que os animais atingem mais rapidamente as características de nado normal após a crise convulsiva.

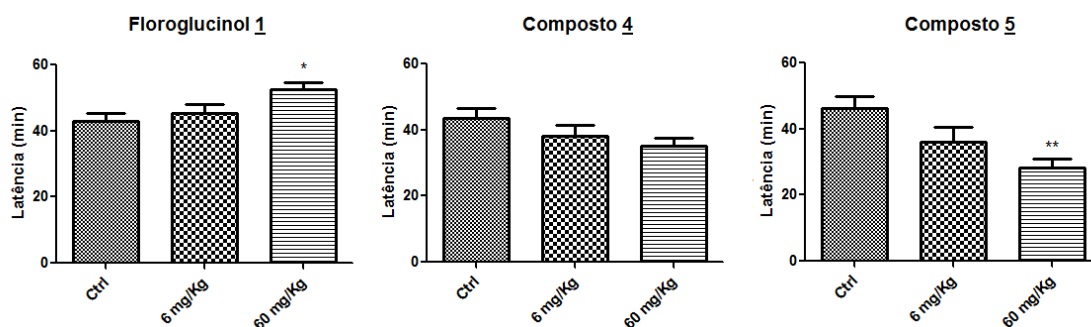


Figura 6: Latência (min) para o retorno ao nado normal após a indução convulsiva por PTZ em *zebrafish* tratados com floroglucinol **1** (n=9), Composto **4** (n=9), e Composto **5** (n=7) via i.p. *p<0,05, **p<0,01. Teste estatístico: ANOVA de uma via seguida de teste comparativo de *Tukey*. Os resultados estão expressos em média ± desvio padrão.

4. Discussão

Neste estudo buscamos avaliar os efeitos do floroglucinol e de dois derivados sintéticos no modelo de convulsão aguda induzida por PTZ, devido a atividade antidepressiva de seus derivados previamente demonstrada (Stein *et al.*, 2012; Duarte *et al.*, 2012), tendo em vista a correlação estabelecida pela literatura entre fármacos antidepressivos e ação anticonvulsivante (Vermoesen *et al.*, 2011). A fim de examinar possíveis implicações comportamentais, os animais foram submetidos ao “*open tank*”, que se assemelha ao campo aberto realizado em roedores (Rosemberg *et al.*, 2011) a fim de verificar atividade locomotora/exploratória, sendo um teste muito utilizado para o estudo da psicologia animal em ciências básicas por fornecer informações sobre o comportamento geral (Walsh *et al.*, 1976; Crawley, 1985). A locomoção ou atividade natatória é um importante parâmetro para verificação comportamental em peixes (Blaser *et al.*, 2010). As avaliações comportamentais feitas em *zebrafish* considerando a preferência do mesmo por determinado espaço do

aquário denotam alterações no perfil exibido pelo peixe em resposta ao composto testado. Esta análise pode levar ao conhecimento da atividade biológica de novos compostos (Barros *et al.*, 2008).

Nossos resultados demonstram que a distância total percorrida pelo animal não sofreu alteração significativa, comparada ao controle experimental, para nenhum dos tratamentos. Isto demonstra que o floroglucinol, o Composto **4** e o Composto **5** não afetaram a atividade locomotora e exploratória dos peixes nas doses testadas. Os dados de velocidade média (m/s) também foram mensurados (dados não mostrados), e corroboraram com os resultados de distância percorrida. Desta forma, podemos inferir que os compostos não causaram sedação ou hiper-locomoção nos animais.

Outra variável mensurada no teste do “*open tank*” é o tempo de permanência dos animais na porção superior do aquário. Em nossos resultados não foi observado alteração neste parâmetro. Para alguns autores, este dado seria equivalente ao tempo de permanência dos roedores no centro do campo aberto (Gerlai *et al.*, 2000; Levin *et al.*, 2007; Blaser *et al.*, 2009).

A busca de novos anticonvulsivantes requer modelos adequados para realizar o rastreamento de um grande número de compostos potencialmente ativos. Devido ao baixo custo e à possibilidade de testar um grande número de animais rapidamente, o *zebrafish* surge como um modelo convulsivo complementar, promissor para a descoberta de novos compostos nesse campo (Berghmans *et al.*, 2007).

Nossos resultados mostraram uma potencial atividade protetora da convulsão para o Composto **5**, o qual aumentou a latência para o animal atingir a primeira crise convulsiva e, além disso, diminuiu o tempo necessário para a

recuperação da crise retornando ao nado normal. Ainda referente ao Composto **5**, podemos sugerir que sua ação está envolvida com o sistema nervoso central e não periférico, visto que no teste comportamental do “*open tank*” os animais mantiveram as características normais de atividade locomotora e exploratória, sem comprometimento da função motora periférica.

Kondziella e colaboradores (2007) descreveram que há evidências de que a epilepsia e a depressão possuem mecanismos fisiopatológicos comuns, tais como déficits na neurotransmissão noradrenérgica e 5-serotoninérgica, hiperexcitabilidade, e metabolismo da glicose, além do funcionamento e perturbação do eixo hipotálamo-hipófise adrenal. O estudo de Smolders e colaboradores (2008) destacou a elevação dos neurotransmissores dopamina e serotonina no hipocampo como responsável pela relação entre antidepressivos e anticonvulsivantes. Entretanto ainda não é possível afirmar sobre qual mecanismo de neurotransmissão estaria envolvido na ação anticonvulsiva do Composto **5**. Para isso, estudos adicionais buscando um possível mecanismo de ação são necessários, além da realização de testes com outras moléculas sinteticamente derivadas do floroglucinol.

5. Conclusão

A síntese de compostos eficazes contra as crises convulsivas torna-se importante para a busca de medicamentos capazes de minimizar essa manifestação. O Composto **5** mostrou efeito anticonvulsivante no modelo da indução convulsiva por PTZ em *zebrafish* na dose de 60 mg/kg, sem alterar as características de locomoção e exploração no “*open tank*”, além de demonstrar

que os peixes tiveram recuperação pós-convulsão mais rápida nesta mesma dose.

Desta forma, nossos resultados contribuem para a busca de compostos potencialmente ativos frente a crises convulsivas induzidas por PTZ.

6. Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pelas agências brasileiras: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

7. Referências

Avoli, M., Louvel, J., Pumain, R., Köhling, R., 2005. Cellular and molecular mechanisms of epilepsy in the human brain, *Prog. Neurobiol.* 77 (3), 166-200.

Bagdy, G., Kecskemeti, V., Riba, P., Jakus, R., 2007. Serotonin and epilepsy. *J Neurochem.* 100, 857-873.

Barros, T.P., Alderton, W.K., Reynolds, H.M., Roach, A.G., Berghmans, S., 2008. Zebrafish: an emerging technology for in vivo pharmacological assessment to identify potential safety liabilities in early drug discovery. *Br J Pharmacol.* 154 (7), 1400-1413.

Berghmans, S., Hunt, J., Roach, A., Goldsmith, P., 2007. Zebrafish offer the potential for a primary screen to identify a wide variety of potential anticonvulsants. *Epilepsy Research.* 75 (1), 18-28.

Blaser, R.E., Chadwick, L., McGinnis, G.C., 2010. Behavioral measures of anxiety in zebrafish (*Danio rerio*). *Behavioural Brain Research.* 208 (1), 56-62.

Cachat, J., Stewart, A., Grossman, L., Gaikwad, S., Kadri, F., et al., 2010. Measuring behavioral and endocrine responses to novelty stress in adult zebrafish. *Nat Protoc.* 5, 1786-1799.

Chatterjee, S.S., Nöldner, M., Erdelmeier, C., 1998. Antidepressant activity of *Hypericum perforatum* and hiperforin: the neglected possibility. *Pharmacopsychiat.* 31, 7-15.

Clinckers, R., Smolders, I., Meurs, A., Ebinger, G., Michotte, Y., 2005. Hippocampal dopamine and serotonin elevations as pharmacodynamic markers for the anticonvulsant efficacy of oxcarbazepine and 10,11-dihydro-10-hydroxycarbamazepine. *Neurosci Lett.* 390, 48-53.

Corda, M. G., Orlandi, M., Lecca, D., Giorgi, O., 1992. Decrease in GABAergic function induced by pentylenetetrazol kindling in rats: antagonism by MK-801. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 262 (2), 792-800.

Crawley, J.N., 1985. Exploratory behavior models of anxiety in mice. *Neurosci Biobehav Rev.* 9, 37-44.

Daikonya, A., Katsuki S., Wu JB., Kitanaka S., 2002. Anti-allergic Agents from Natural Sources (4): Anti-allergic Activity of New Phloroglucinol Derivatives from *Mallotus philippensis* (Euphorbiaceae). *Pharmaceutical Bulletin.* 50 (12), 1566-1569.

Desmond, D., 2012. Assessing epilepsy-related behavioral phenotypes in adult zebrafish, in: A.V. Kalueff, A.M. Stewart (Eds.), *Zebrafish Protocols for Neurobehavioral Research*, Humana Press, New York.

Duarte, M.O., Lunardelli, S., Stein, A.C., Müller, L., Stolz, E., Rates, S.M.K., Gosmann, G., 2012. Antidepressant-like effect screening of phloroglucinol derivatives in a mice tail suspension test. *Em preparação.*

Favale, E., Audenino, D., Cocito, L., Albano, C., 2003. The anticonvulsant effect of citalopram as an indirect evidence of serotonergic impairment in human epileptogenesis. *Seizure.* 12, 316-318.

Ferraz, A.B.F., Schripsema, J., Pohlmann, A.R., Von Poser, G.L., 2002. Uliginosin B from *Hypericum myrianthum* *Biochemical Systematics and Ecology.* 30 (10), 989-991.

Franklin, M., Reed, A., Murck, H., 2004. Sub-chronic treatment with an extract of *Hypericum perforatum* (St John's wort) significantly reduces cortisol and corticosterone in the rat brain. *European Neuropsychopharmacology.* 14 (1), 7-10.

Fritz D., Venturi C. R., Cargnin S., Schripsema J., Roehe P. M., Montanha J. A., von Poser G. L., 2007. Herpes virus inhibitory substances from *Hypericum connatum* Lam., a plant used in southern Brazil to treat oral lesions. *Journal of Ethnopharmacology.* 113 (3), 517-520.

Gerlai, R., Lahav, M., Guo, S., Rosenthal, A., 2000. Drinks like a fish: zebra fish (*Danio rerio*) as a behavior genetic model to study alcohol effects. *Pharmacol Biochem Behav.* 67 (4), 773-782.

Griffith, T. N.; Varela-Nallar, L.; Dinamarca, M. C.; Inestrosa, N. C., 2010. Neurobiological Effects of Hyperforin and its Potential in Alzheimer's Disease Therapy. *Current Medicinal Chemistry*. 17 (5), 391-406.

Grossman, L., Utterback, E., Stewart, A., Gaikwad, S., Chung, K.M., et al., 2010. Characterization of behavioral and endocrine effects of LSD on zebrafish. *Behav Brain Res*. 214, 277–284.

Ishii, R., Horie, M., Saito, K., Arisawa, M., Kitanaka, S., 2003. Inhibition Of Lipopolysaccharide-Induced Pro-Inflammatory Cytokine Expression Via Suppression Of Nuclear Factor- κ B Activation By *Mallotus Japonicus* Phloroglucinol Derivatives. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 1620, 108-118.

Ito, H., Mukanaka, T., Mori, K., Jin, Z.-X., Tokuda, H., Nishino, H., Yoshida, T., 2000. Ichthyotoxic phloroglucinol derivatives from *Dryopteris fragrans* and their anti-tumor promoting activity. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 48 (8), 1190-1195.

Jobe, P.C., Browning, R.A., 2005. The serotonergic and noradrenergic effects of antidepressant drugs are anticonvulsant, not proconvulsant. *Epilepsy Behavior*. 7, 602–619.

Kanner, A.M., 2009. Depression and epilepsy: a review of multiple facets of their close relation. *Neurol Clin*. 27, 865–880.

Kondziella, D., Alvestad, S., Vaaler, A., Sonnewald, U., 2007. Which clinical and experimental data link temporal lobe epilepsy with depression? *J. Neurochem*. 103, 2136-2152.

Kong, C.-S., Kim, J.-A., Ahn, B.-N., Vo, T. S., Yoon N.-Y., Kim, S.-K., 2010. 1-(3',5'-dihydroxyphenoxy)-7-(2'',4'',6-trihydroxyphenoxy)-2,4,9-trihydroxydibenzo-1,4-dioxin Inhibits Adipocyte Differentiation of 3T3-L1 Fibroblasts. *Marine Biotechnology*. 12, (3), 299-307.

Lee, S.-M., Na, M.-K., An, R.-Bo, Byung-Sun, M., Lee, H.-K., 2003. Antioxidant Activity of Two Phloroglucinol Derivatives from *Dryopteris crassirhizom*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 26 (9), 1354-1356.

Levin, E.D., Bencan, Z., Cerutti, D.T., 2007. Anxiolytic effects of nicotine in zebrafish. *Physiol Behav*. 90 (1), 54-58.

Lieschke, G.J., Currie, P.D., 2007. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat Rev Genet*. 8, 353-367.

Müller, W.E., Singer, A., Wonnemann, M., Hafner, U., Rolli, M., Schäfer, C. 1998. Hyperforin represents the neurotransmitter reuptake inhibiting constituent of *Hypericum* extract. *Pharmacopsychiat*. 31, 16-21.

Olsen, R.W., 1981. The GABA postsynaptic membrane receptor-ionophore complex : Site of action of convulsant and anticonvulsant drugs. *Molecular And Cellular Biochemistry*. 39 (1), 261-279.

Pitkanen, A., Lukasiuk, K., 2009. Molecular and cellular basis of epileptogenesis in symptomatic epilepsy. *Epilepsy Behavior*. 14 (1), 16–25.

Preskorn, S.H., Fast, G.A., 1992. Tricyclic antidepressant-induced seizures and plasma drug concentration. *J Clin Psychiatry*. 53, 160–162.

Rego, J.C., Benkik, N., Chosson, E., Kabouche, K., Seguin, E., Costentin, J., 2007. Antidepressant-like effect of hyperfoliatin, a polyisoprenylated phloroglucinol derivative from *Hypericum perforatum* (Clusiaceae) is associated with an inhibition of neuronal monoamines uptake. *European Journal of Pharmacology*. 569 (3), 197-203.

Rocha, L. Marston, A., Potterad, O., Kaplan, M., Hostettmann, K., 1996. More phloroglucinols from *Hypericum brasiliense*. *Phytochemistry*. 42 (1), 185–188.

Rosa, A., Deiana, M., Atzeri, A., Corona, G., Incani, A., Melis, P., Dessi, A., Appendino, G. (2007) Evaluation of the antioxidant and cytotoxic activity of arzanol, a prenylated α -pyrone–phloroglucinol etherodimer from *Helichrysum italicum* subsp. *microphyllum*. *Chemico-Biological Interactions*. 165 (2), 117-126.

Rosemberg, D.B., Rico, E.P., Mussulini, B.H.M., Piato, A.L., Calcagnotto, M.E., Bonan, C.D., Dias, R.D., Blaser, R.E., Souza, D.O., Oliveira, D.L., 2011. Differences in spatio-temporal behavior of *zebrafish* in the open tank paradigm after a short-period confinement into dark and bright environments. *Plos One*. 6 (5), 60-70.

Shin, J.T., Fishman, M.C., 2002. From Zebrafish to human: modular medical models. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 3, 311–340.

Smolders M, Laurant M, van Rijswijk E, Mulder J, Braspenning J, Verhaak P, Wensing M, Grol R, 2008. Depressed and a co-morbid condition: more psychotropics prescribed! *Eur J Gen Pract*. 14 (1), 10-18.

Specchio, L.M., Iudice, A., Specchio, N., et al., 2004. Citalopram as treatment of depression in patients with epilepsy. *Clin Neuropharmacol*. 27, 133-136.

Stein, A.C., Viana, A.F., Müller, L.G., Nunes, J.M., Stolz, E.D., do Rego, J.C., Costentin, J., Von Poser, G.L., Rates, S.M.K., 2012. Uliginosin B, a phloroglucinol derivative from *Hypericum polyanthemum*: A promising new molecular pattern for the development of antidepressant drugs. *Behavioural Brain Research*. 228, 66-73.

Stern, M., Zon, L.I., Howard, M., 2003. Cancer genetics and drug discovery in the zebrafish. *Nature Reviews Cancer*. 3, 533-539.

Stewart, A. M., Desmond D., Kyzar E., Gaikwad S., Roth A., Riehl R., Collins C., Monnig L., Green J., Kalueff, A. V., 2011. Perspectives of zebrafish models of epilepsy: What, how and where next. *Brain Research*. 87 (2-3), 135-143.

Vascotto, S.G., Beckham, Y. Kelly, G.M., 1997. The zebrafish's swim to fame as an experimental model in biology. *Biochem Cell Biol*. 75 (5), 479-485.

Vermoesen, K., Serruys, A.-S.K., Loyens, E., Afrikanova, T., Massie, A. Schallier, A., Michotte, Y., Crawford, A.D., Esguerra, C.V., Witte, P.A.M., Smolders, I., Clinckers, R. 2011. Assessment of the convulsant liability of antidepressants using zebrafish and mouse seizure models. *Epilepsy & Behavior*. 22, 450-460.

Viana, A., do Rego, J.-C., von Poser, G., Ferraz, A., Heckler, J.C., Rates, S.M.K., 2005. The antidepressant-like effect of *Hypericum caprifoliatum* Cham & Schlecht (Guttiferae) on forced swimming test results from an inhibition of neuronal monoamine uptake. *Neuropharmacology*. 49 (7), 1042-1052.

Walsh, R.N., Cummins, R.A., 1976. The Open-Field Test: a critical review. *Psychol Bull*. 83, 482–504.

Wong, K., Stewart, A., Gilder, T., Wu, N., Frank, K., Gaikwad, S., Suci, C., DiLeo, J., Utterback, E., Chang, K., Grossman, L., Cachat, J., Kalueff, A. V., 2010. Modeling seizure related behavioral and endocrine phenotypes in adult zebrafish. *Brain Research*. 1348, 209-215.

WHO – www.who.int – Acessado em junho de 2012.