

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE DO FLAVONÓIDE CRISINA
EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO
ESTRESSE CRÔNICO MODERADO E IMPREVISÍVEL

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Carlos Borges Filho

Itaqui, RS, Brasil.

2014

**AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE DO FLAVONÓIDE CRISINA
EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO
ESTRESSE CRÔNICO MODERADO E IMPREVISÍVEL**

por

Carlos Borges Filho

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Bioquímica, da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Bioquímica**

Orientador: Prof. Dr. Cristiano Ricardo Jesse

Coorientadora: Prof^a Dr^a Marina Prigol

Itaqui, RS, Brasil.

2014

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos
pelo (a) autor (a) através do Módulo de Biblioteca do
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais).

B732a Borges Filho, Carlos
Avaliação da bioatividade do flavonóide crisina em
camundongos submetidos ao estresse crônico moderado e
imprevisível / Carlos Borges Filho.
113 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Pampa, MESTRADO EM BIOQUÍMICA, 2014.
"Orientação: Cristiano Ricardo Jesse".

1. Depressão. 2. Estresse. 3. Flavonóides. 4.
Crisina. 5. Neurotrofinas.

Universidade Federal do Pampa
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

A Comissão Examinadora, abaixo nominada, aprova a
Dissertação de Mestrado

**AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE DO FLAVONÓIDE CRISINA
EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO
ESTRESSE CRÔNICO MODERADO E IMPREVISÍVEL**

Elaborada por

Carlos Borges Filho

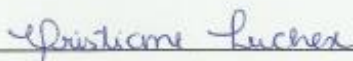
como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Bioquímica

COMISSÃO EXAMINADORA:

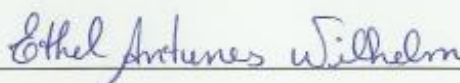


Prof. Dr. Cristiano Ricardo Jesse (Unipampa)

(Presidente, orientador)



Prof. Dr^a Cristiane Luchese (UFPel)



Prof^a Dr^a Ethel Antunes Wilhelm (UFPel)

Itaqui, RS, Brasil.

2014

DEDICATÓRIA

Humildemente, dedico este trabalho a Deus, meu Criador, Salvador, Guia, Mantenedor, Consolador, Companheiro, Fiel Amigo, e Pai.

...DEDICATÓRIA

À minha amada esposa, Marianne. Que desde o princípio desta caminhada tem estado ao meu lado em amor, auxiliando-me em tudo e complementando-me emocional e espiritualmente.

...DEDICATÓRIA

Aos meus amados pais, Carlos e Ireni. Aos meus irmãos, Noli, Vera, Dirnamara e Carla, e a toda a minha família, meus exemplos e maiores incentivadores e fontes inesgotáveis de inspiração, amor e compreensão.

...DEDICATÓRIA

Ao meu orientador, Dr. Cristiano Ricardo Jesse, instrumento de transmissão de valiosos aprendizados de cunho científico e pessoal, e a todos os colegas do LaftamBio Pampa, pelo imenso auxílio, pelos ensinamentos, e pelos indescritíveis momentos de alegria.

AGRADECIMENTOS

A Deus Pai, Filho e Espírito Santo que me capacitou, guardou e me concedeu chegar até aqui.
À minha amada esposa Marianne. Minha amiga, companheira, incentivadora, fonte de paz e calma, e minha auxiliadora (principalmente com o inglês, hehehe), durante todo este período.
Aos meus pais, Carlos e Ireni, que me deram todo apoio e incentivo fundamentais para a conclusão desta jornada.

De uma forma muito especial, à minha irmã Carla, que quando a insegurança fez com que nem eu mesmo acreditasse que chegaria até aqui, me deu o necessário incentivo e aconselhamento que até hoje são guardados.

À minha irmã Dirnamara, constante motivadora durante todo este período.

À Prof. Dr^a Ana Flávia Furian, que me inseriu no fascinante ramo da pesquisa, acreditando desde o princípio em meu potencial.

Ao Prof. Dr. Cristiano Ricardo Jesse, pela orientação, pelo companheirismo, pelo incentivo, por acreditar em minha capacidade, e pela imensa compreensão e cumplicidade aliados a contínuos ensinamentos de cunho científico e pessoal.

Aos colegas de laboratório, Lucian Del Fabbro, Marcelo Gomes, André Goes, Leandro Cattelan, Franciele Donato, Silvana Peterini Boeira, Michelle Antunes e Renata Giacomeli, por todo o auxílio, companheirismo, compreensão e ensinamentos.

A todos os colegas de Pós-Graduação e professores pelo convívio e pelos momentos de amizade e aprendizado.

À Unipampa, que me oportunizou a concretização deste projeto.

À professora Marina Prigol, pelas contribuições na execução do projeto.

Às professoras Ethel Antunes Wilhelm e Cristiane Luchese por aceitarem avaliar e contribuir com este trabalho.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste sonho.

EPÍGRAFE

“...Pois desde a criação do mundo os atributos invisíveis de Deus, seu eterno poder e sua natureza divina, têm sido vistos claramente, sendo compreendidos por meio das coisas criadas, de forma que tais homens são indesculpáveis; porque, tendo conhecido a Deus, não o glorificaram como Deus, nem lhe renderam graças, mas os seus pensamentos tornaram-se fúteis e o coração insensato deles obscureceu-se. Dizendo-se sábios, tornaram-se loucos. E trocaram a glória do Deus imortal por imagens feitas segundo a semelhança do homem mortal, bem como de pássaros, quadrúpedes e répteis. Trocaram a verdade de Deus pela mentira, e adoraram e serviram a coisas e seres criados, em lugar do Criador, que é bendito para sempre. Amém...”

(Carta de Paulo aos Romanos, 1:19-23, 25)

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica
Universidade Federal do Pampa

AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE DO FLAVONÓIDE CRISINA EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO ESTRESSE CRÔNICO MODERADO E IMPREVISÍVEL

Autor: Carlos Borges Filho
Orientador: Cristiano Ricardo Jesse
Coorientadora: Marina Prigol

Local e Data da defesa: Itaqui, 9 de agosto de 2014.

A relação entre o estresse e a depressão tem sido alvo de intensas pesquisas comportamentais e fisiopatológicas. Dentro deste contexto, estudos postulam que a hipersecreção de cortisol e o desenvolvimento de um quadro de estresse oxidativo são fatores responsáveis pela ocorrência da depressão em indivíduos estressados. Como mecanismo recente de estudo, também está sendo sugerido o papel das neurotrofinas e da enzima Na^+, K^+ -ATPase na fisiopatologia da depressão. Embora vários antidepressivos já estejam disponíveis no mercado, a falta de eficácia na totalidade dos pacientes e a vasta ocorrência de efeitos colaterais adversos constituem uma problemática no tratamento da depressão. Assim, pesquisas têm buscado compostos, principalmente naturais, que possam melhor satisfazer as exigências clínicas sem ocasionar alterações fisiológicas indesejáveis. A crisina é um flavonóide natural abundante no, localmente denominado, maracujá do mato (*Passiflora coerulea*), e seus efeitos terapêuticos já têm sido explorados em modelos de estresse oxidativo, hiperlipidemia, inflamação, hipertensão e neoplasia, mas seu efeito na depressão ainda é desconhecido. Com isso, objetivou-se neste trabalho analisar o efeito do tratamento oral com o flavonóide crisina por 28 dias em camundongos submetidos ao estresse crônico moderado e imprevisível (CUMS), em parâmetros comportamentais, bioquímicos e neurotróficos, comparando com o efeito da fluoxetina (controle positivo). O CUMS aplicado por 28 dias reduziu os níveis de BDNF (Fator neurotrófico derivado do cérebro) e NGF (Fator de crescimento do nervo) e ocasionou a inibição da atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase no hipocampo e córtex pré-frontal de camundongos. O tratamento com crisina (5 ou 20mg/kg) não só protegeu contra estas mudanças, mas a dose de 20mg/kg ainda elevou o BDNF e o NGF a níveis acima do grupo controle em animais não estressados e em animais submetidos ao CUMS. O CUMS induziu a redução na preferência por sacarose, o aumento no tempo de imobilidade no teste de nado forçado (FST) e o aumento nos níveis plasmáticos de corticosterona. Além do tratamento com crisina (5 ou 20mg/kg) prevenir contra estas alterações nos animais estressados, também se observou o efeito antidepressivo da crisina no FST nos animais não estressados. Os dados acima citados mostram o efeito antidepressivo da crisina em animais não estressados e estressados, de forma equivalente à fluoxetina, sugerindo o possível envolvimento do BDNF e do NGF no efeito antidepressivo da crisina. O protocolo do CUMS reduziu os níveis de tióis não-protéicos (NPSH) e elevou os níveis de espécies reativas (RS) no hipocampo e córtex pré-frontal de camundongos. Como possível mecanismo de resposta a estas mudanças, foi verificada a elevação da atividade das enzimas glutatona redutase (GR), glutatona peroxidase (GPx) e catalase (CAT) no hipocampo e córtex pré-frontal dos camundongos submetidos ao CUMS. O tratamento com crisina (5 ou 20mg/kg) protegeu

frente a estas modificações, mostrando o envolvimento da ação antioxidante no efeito antidepressivo da crisina em animais estressados. Em conclusão, estes dados demonstram o efeito antidepressivo da crisina em parâmetros comportamentais e fisiopatológicos em animais não estressados e em animais estressados, e sugerem o possível envolvimento do BDNF e do NGF no efeito antidepressivo da crisina. Ainda, este trabalho expõe o maracujá do mato como um importante alvo para o estudo dos produtos naturais no combate à depressão e outras doenças do sistema nervoso central, mostrando a fundamentalidade da investigação da funcionalidade e constituição bioativa desta e outras plantas desta região.

Palavras-chave: Depressão, Na^+, K^+ -ATPase, neurotrofinas, corticosterona, estresse oxidativo.

ABSTRACT

Dissertation of Master
Program of Post-Graduation in Biochemistry
Federal University of Pampa

**EVALUATION OF THE BIOACTIVITY OF THE FLAVONOID CHRYSIN
IN MICE SUBJECTED TO
CHRONIC UNPREDICTABLE MILD STRESS**

Author: Carlos Borges Filho
Advisor: Cristiano Ricardo Jesse
Co-advisor: Marina Prigol

Site and Date of Defence: Itaqui, august 9th, 2014.

The relationship between stress and depression has been subject of the intense behavioral and pathophysiological research. Within this context, studies have postulated that the hypersecretion of cortisol and the development of a framework of oxidative stress are factors responsible for the occurrence of depression in stressed individuals. As a recent study of mechanism, has also been suggested the role of the neurotrophins and of the enzyme Na^+, K^+ -ATPase in the pathophysiology of depression. Although various antidepressants are already available on the market, the lack of efficacy in whole of patients and the wide occurrence of adverse side effects are a problematic in the treatment of depression. Thus, studies have investigated compounds, mainly natural, which can better meet the clinical requirements without causing undesirable physiological changes. Chrysin is a flavonoid abundant in natural, locally called, the bush passionfruit (*Passiflora coerulea*), and its therapeutic effects have been explored in models of oxidative stress, hyperlipidemia, inflammation, hypertension and cancer, but its effect on depression is still unknown. Thus, this study aimed to analyze the effect of oral treatment with the flavonoid chrysin for 28 days in non-stressed mice and mice subjected to chronic unpredictable mild stress (CUMS) in behavioral, biochemical and neurotrophic parameters, compared with the effect of fluoxetine (positive control). The CUMS applied for 28 days decreased the levels of BDNF and NGF and caused the inhibition of the Na^+, K^+ -ATPase activity in the hippocampus and prefrontal cortex of mice. Treatment with chrysin (5 or 20mg/kg) not only protected against these changes, but still 20mg/kg increased BDNF and NGF levels above the control group in non-stressed animals and in animals subjected to CUMS. The CUMS induced the reduction in the preference for sucrose, the increase in immobility time in forced swim test (FST) and the increase in plasma corticosterone levels. Besides chrysin treatment (5 or 20mg/kg) prevent against these changes in stressed animals, also observed the antidepressant effect of chrysin in the FST in non-stressed animals. The aforementioned data show the effect of antidepressant of chrysin in non-stressed and stressed animals, equivalently to fluoxetine, suggesting a possible involvement of NGF and BDNF in the antidepressant effect of chrysin. The protocol CUMS reduced levels of non-protein thiols (NPSH) and raised levels of reactive species (RS) in the hippocampus and prefrontal cortex of mice. As a possible mechanism of response to these changes, we observed

the increase in the activity of enzymes glutathione reductase (GR), glutathione peroxidase (GPx) and catalase (CAT) in the hippocampus and prefrontal cortex of mice subjected to CUMS. Treatment with chrysin (5 or 20mg/kg) protected against these changes, showing the involvement of antioxidant action in the antidepressant effect of chrysin in stressed animals. In conclusion, these data demonstrate the antidepressant effect of chrysin on behavioral and pathophysiological parameters in non-stressed and stressed animals, suggesting a possible involvement of BDNF and NGF in the antidepressant effect of chrysin. Still, this work exposes the passion fruit bush as an important target for the study of natural products in the combat of depression and other diseases of the central nervous system, showing the fundamentality of research of functionality and bioactive constitution these and other plants of this region.

Keywords: Depression, Na⁺,K⁺-ATPase, neurotrophins, corticosterone, oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

Revisão Bibliográfica

Figura 1: Estrutura química do flavonóide crisina.....3

Figura 2: Teoria monoaminérgica da depressão.....6

Figura 3: Modelo simplificado descrevendo os papéis opostos do estresse e da terapia antidepressiva sobre a expressão de BDNF no hipocampo, a função do hipocampo, e o humor.....9

Figura 4: Formação das RS e ação das defesas antioxidantes.....13

Figura 5: Fisiologia do estresse..... 15

Figura 6. Esquema da absorção de flavonóides no intestino humano.....20

Manuscrito

Figure 1: Chemical structure of chrysin.....66

Figure 2: Experimental design.....67

Figure 3: Effect of chrysin and fluoxetine administration on SPT in mice exposed to CUMS. The test was realized one day before the beginning(baseline, Fig. A), and on 28th day (Fig. B) of CUMS protocol. ^aIndicates $p < 0.05$ compared to control group (No stress + vehicle). ^bIndicates $p < 0.05$ compared to stress group (Stress + vehicle).....68

Figure 4: Effect of chrysin or fluoxetine treatment on distance traveled on OFT in mice exposed to CUMS. The test was realized 24h after finishing CUMS protocol.....69

Figure 5: Effect of chrysin or fluoxetine administration on immobility time on FST in mice exposed to CUMS. The test was realized immediately after the OFT. ^a Indicates $p < 0.05$ compared to control group (No stress + vehicle). ^b Indicates $p < 0.05$ compared to stress group (Stress + vehicle).....70

Figure 6: Results of treatment with chrysin or fluoxetine on corticosterone levels in mice subjected to CUMS. The blood collection was realized 24h after FST. ^aIndicates $p < 0.05$ compared to non-stressed control group (No stress + vehicle). ^bIndicates $p < 0.05$ compared to stress group (Stress + vehicle).....71

Figure 7: Effect of chrysin or fluoxetine treatment in the Na^+, K^+ -ATPase activity in the hippocampus (Fig. A) and prefrontal cortex (Fig. B) of mice subjected to CUMS. The brain structures were dissected immediately after blood collection. ^aIndicates $p < 0.05$ compared to control group (No stress + vehicle). ^bIndicates $p < 0.05$ compared to stress group (Stress + vehicle).....72

Figure 8: Results of treatment with chrysin or fluoxetine on BDNF content in the hippocampus (Fig. A) and prefrontal cortex (Fig. B) of mice exposed to CUMS. The brain structures were dissected immediately after blood collection. ^aIndicates $p < 0.05$ compared to control group (No stress + vehicle). ^bIndicates $p < 0.05$ compared to stress group (Stress + vehicle).....73

Figure 9: Effect of chrysin or fluoxetine administration on NGF levels in the hippocampus (Fig. A) and prefrontal cortex (Fig. B) of mice subjected to CUMS. The brain structures were dissected immediately after blood collection. ^aIndicates $p < 0.05$ compared to control group (No stress + vehicle). ^bIndicates $p < 0.05$ compared to stress group (Stress + vehicle).....74

LISTA DE TABELAS

Revisão Bibliográfica

Tabela 1. Critérios diagnósticos da depressão de acordo com o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais, quarta edição (DSM-IV)	5
--	---

Manuscrito

Table 1. Effect of treatment with chrysin or fluoxetine in NPSH and RS levels, and GR, GPx, GST and CAT activities in the hippocampus of mice subjected to CUMS.....	75
---	----

Table 2. Effect of chrysin or fluoxetine treatment in NPSH and RS levels, and GR, GPx, GST and CAT activities in the prefrontal cortex of mice exposed to CUMS.....	76
--	----

Table 3. Effect of chrysin or fluoxetine administration in AST and ALT activities and urea levels in plasma of mice exposed to CUMS.....	77
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT, Serotonina; ACTH, Hormônio adrenocorticotrófico (do inglês *adrenocorticotropic hormone*); ATP, Adenosina trifosfato; BDNF, Fator neurotrófico derivado do cérebro (do inglês *Brain-derived neurotrophic factor*); CMS, Estresse crônico moderado (do inglês *Chronic Mild Stress*); CRH, Hormônio liberador de corticotrofina (do inglês *corticotropin-releasing hormone*); CUMS, Estresse crônico moderado e imprevisível (do inglês *Chronic unpredictable mild stress*); DA, Dopamina; DNA, Ácido desoxiribonucléico (do inglês *deoxyribonucleic acid*); DSM, Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (do inglês *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*); FST, Teste de nado forçado (do inglês *Forced swimming test*), HPA, Hipotálamo-pituitária-adrenal; IL-1, Interleucina 1; IL-6, Interleucina 6; ISRS, Inibidores seletivos da recaptação de serotonina; NE, Norepinefrina; NGF, Fator de crescimento do nervo (do inglês *Nerve growth factor*); OFT, Teste de campo aberto (do inglês *Open field test*); ReMC, Receptores de mineralocorticóides; ReGC, Receptores de glicocorticóides; RS, Espécies reativas (do inglês *reactive species*); SNA, Sistema nervoso autônomo; SNC, Sistema nervoso central; SPT, Teste de preferência por sacarose (do inglês *Sucrose preference test*); TNF- α , Fator de necrose tumoral α (do inglês *Tumor necrosis factor α*); TST, Teste de suspensão de cauda (do inglês *Tail suspension test*); WHO, Organização mundial da saúde (do inglês *World Health Organization*).

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	iv
AGRADECIMENTOS	viii
EPÍGRAFE	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xii
LISTA DE FIGURAS	xiv
LISTA DE TABELAS	xvi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xvii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 Depressão: Panorama e Características	4
2.2 Fisiopatologia da Depressão.....	5
2.3 Testes Comportamentais para o Estudo da Depressão.....	9
2.3.1 Teste de Suspensão de Cauda (TST).....	10
2.3.2 Teste de Nado Forçado (FST).....	10
2.3.3 Teste de Campo Aberto (OFT).....	11
2.3.4 Teste de Preferência por Sacarose (SPT).....	11
2.4 Estresse Oxidativo e a Depressão.....	12
2.5 Fisiologia do Estresse.....	14
2.6 Estresse e a Depressão.....	15
2.7 Modelos Animais de Estresse no Estudo da Depressão.....	17
2.7.1 Estresse Crônico Moderado e Imprevisível (CUMS).....	17
2.8 Compostos Fenólicos Naturais na Terapia da Depressão.....	18
2.8.1 Crisina.....	19
2.8.1.1 Bioatividade da Crisina.....	19
2.8.1.2 Biodistribuição, Metabolismo e Eliminação da Crisina.....	20
3 OBJETIVOS	22
3.1 Objetivos Gerais.....	22
2.1 Objetivos Específicos	22
4 MANUSCRITO	23

Abstract	25
Abbreviations	26
1 Introduction	27
2 Materials and methods	29
2.1 Animals	29
2.2 Drug solutions and administrations.....	30
2.3 Experimental design and Chronic Unpredictable Mild Stress (CUMS).....	30
2.4 Behavioral assessment	31
2.4.1 Sucrose preference test (SPT).....	31
2.4.2 Open-field test (OFT).....	32
2.4.3 Forced swimming test (FST).....	32
2.5 Blood and tissue preparation	32
2.6 Biochemical Determinations.....	33
2.6.1 Non-protein thiols (NPSH) content.....	33
2.6.2 Reactive species (RS) levels.....	33
2.6.3 Glutathione reductase (GR) activity.....	34
2.6.4 Glutathione peroxidase (GPx) activity.....	34
2.6.5 Glutathione S-transferase (GST) activity.....	34
2.6.6 Catalase (CAT) activity.....	35
2.6.7 Corticosterone levels.....	35
2.6.8 Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase activity.....	35
2.6.9 Aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and urea levels.....	36
2.6.10 Protein quantification.....	37
2.7 Neurotropic factors determinations.....	37
2.7.1 Brain-derived neurotropic factor (BDNF) and Nerve growth factor (NGF) levels.....	37
2.8 Statistical analysis	37
3 Results	38
3.1 SPT.....	38
3.2 OFT.....	38
3.3 FST.....	38
3.4 NPSH content.....	39
3.5 RS levels.....	39

3.6 GR activity	40
3.7 GPx activity.....	41
3.8 GST activity.....	41
3.9 CAT activity.....	42
3.10 Corticosterone levels	42
3.11 Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase activity	43
3.12 AST, ALT and urea levels	43
3.13 BDNF levels.....	44
3.14 NGF levels	45
4 Discussion.....	46
5 Conclusion.....	52
Conflict of interest.....	52
Acknowledgement.....	52
6 References.....	53
Legends.....	64
Figures.....	66
Tables.....	75
5 CONCLUSÕES.....	78
6 PERSPECTIVAS.....	79
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80
ANEXO A - Protocolo de aprovação do projeto pela CEUA-UNIPAMPA.....	92

1 INTRODUÇÃO

O estresse atualmente é um dos principais fatores que têm sido associados com a ocorrência de depressão. Com base nesta observação, o modelo animal de estresse crônico moderado e imprevisível (CUMS – do inglês *Chronic unpredictable mild stress*) foi desenvolvido para simular o desenvolvimento e o progresso da depressão clínica em seres humanos, bem como para avaliar a eficácia de compostos candidatos a antidepressivos (Liu et al, 2014; Willner et al , 2005). Estudos sugerem que o CUMS pode induzir mudanças comportamentais e fisiológicas que se assemelham a sintomas da depressão clínica (Liu et al, 2014, Willner et al , 2005) e que o modelo animal do CUMS pode ser utilizado para avaliar a eficácia de compostos candidatos a antidepressivos através de testes comportamentais, como o teste de preferência por sacarose (SPT - do inglês *Sucrose preference test*) e o teste de nado forçado (FST- do inglês *Forced swimming test*) (Mao et al, 2009; Tõnissaar et al, 2008; Willner et al, 2005; Zhou et al, 2007) .

A depressão é uma das formas mais comuns de psicopatologia, afligindo cerca de 300 milhões de indivíduos em todo o mundo, sendo 20 a 25% entre as mulheres e 10 a 17% entre os homens (Levinson, 2006). Estima-se que a depressão ocasione aproximadamente 1 milhão de suicídios a cada ano, causando grandes transtornos para a sociedade. A relação entre o estresse e a depressão passa pela hipersecreção de cortisol (corticosterona em roedores) ocasionada por situações estressantes, a qual é responsável pela atrofia em estruturas cerebrais, principalmente hipocampo e córtex pré-frontal (Stockmeier et al., 2004). O dano oxidativo induzido pelo estresse também tem sido correlacionado com a fisiopatologia da depressão. Sabe-se que as espécies reativas (RS – do inglês *reactive species*) e a glutatona reduzida (GSH) podem desempenhar um papel determinante em algumas doenças neuropsiquiátricas, como a depressão. Há algumas evidências de que a ativação de processos de desestruturação de lipídios de membrana, ácido desoxirribonucleico (DNA – do inglês *deoxy ribonucleic acid*), e proteínas funcionais, ocasionados por anormalidades nos níveis celulares de RS e GSH e na atividade de enzimas antioxidantes são fatores cruciais no desenvolvimento da depressão (Bilicic et al., 2001; Kumar et al., 2011).

Pesquisas concernentes ao estresse e a depressão têm também postulado a hipótese do envolvimento das neurotrofinas na depressão, que sugere a associação da deficiência do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF - do inglês *Brain-derived neurotrophic factor*) com a ocorrência da depressão, e que antidepressivos atuam via restauração dos níveis de BDNF (Liu et al., 2014; Mao et al., 2014). A hipótese da relação entre a depressão e as neurotrofinas

é sustentada basicamente pelos seguintes fatores: I. A depressão está associada com a redução das concentrações sanguíneas e cerebrais de neurotrofinas; II. Tratamentos com antidepressivos aumentam a expressão de neurotrofinas; III. Glicocorticóides podem suprimir a síntese de neurotrofinas (Vaidya e Duman, 2001; Shiet al., 2010; Liu et al., 2014; Mao et al., 2014). O fator de crescimento do nervo (NGF- do inglês *Nerve growth factor*) é uma neurotrofina responsável por promover o desenvolvimento e a diferenciação de células nervosas (Scaccianoce et al., 2000). Além desta ação trófica, o NGF está envolvido, de forma pouco elucidada, com a atividade do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) (Scaccianoce et al., 2000), e tem sido apresentado como um efetivo antidepressivo intranasal em roedores (Shi et al., 2010). Entretanto, o papel do NGF na fisiopatologia da depressão não está suficientemente esclarecido.

A Na^+,K^+ -ATPase é uma enzima responsável pelo transporte de íons Na^+ e K^+ no sistema nervoso central, mantendo o gradiente necessário para a excitabilidade neuronal e para a regulação do volume celular (Gamaro et al., 2003). Como uma consequência, a inibição da atividade da Na^+,K^+ -ATPase afeta diretamente a transmissão da sinalização nervosa, a atividade neuronal, bem como o comportamento animal (Oliveira et al., 2009). Assim, a inibição da Na^+,K^+ -ATPase pode ser observada em pacientes com transtornos de bipolaridade e epilepsia (Grisar et al., 1992; Mynett-Johnson et al., 1998). Além disso, alguns autores têm sugerido que a inibição da Na^+,K^+ -ATPase cerebral está associada com a ocorrência de transtornos depressivos em ratos (Gamaro et al., 2003; Acker et al., 2009). No entanto, esta hipótese precisa ser mais bem estudada.

Embora vários antidepressivos estejam disponíveis há décadas, a maioria deles não é completamente eficaz, pois estima-se que 33% dos pacientes depressivos não sejam sensíveis à medicação antidepressiva (Trivedi et al., 2006), além destes medicamentos estarem associados a muitos efeitos adversos (ex: alteração do sono e apetite, alterações gastrintestinais (diarréia ou obstipação intestinal), retenção urinária, alergias de pele, sudorese, diminuição da libido ou retardo da ejaculação, aumento ou diminuição de peso, náusea, tontura, tremores). Com isso, pesquisas recentes concentram-se na possibilidade do uso de produtos naturais, especialmente flavonóides, para o desenvolvimento de medicamentos antidepressivos, ou como uma alternativa complementar para o tratamento da depressão (Borges Filho et al., 2013; Liu et al., 2014; Mao et al., 2014). A Crisina (5,7-Dihidroxi-flavona, Fig.1) pertence à classe flavona de flavonóides e é encontrada naturalmente em mel, própolis e várias espécies de plantas, incluindo o localmente denominado maracujá do mato (*Passiflora coerulea*) (Pichichero et al., 2010 e Medic-Saric, 2011). A crisina já tem sido apresentada como tendo

efeitos antioxidantes (Pushpavalli et al., 2010), anti-inflamatórios, (Bae et al., 2011), antineoplásicos (Pichichero et al., 2011) e anti-hiperlipidêmicos (Zarzecki et al., 2014). No entanto, em doenças do SNC, como a depressão, este flavonóide ainda carece de ser explorado.

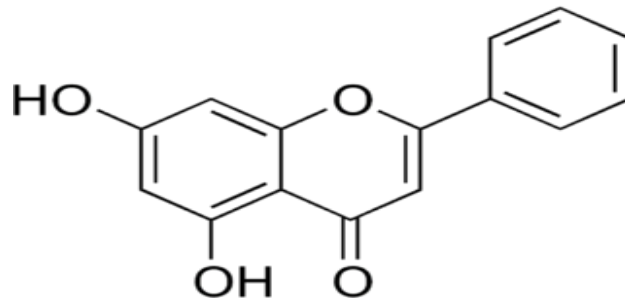


Figura 1. Estrutura química do flavonóide crisina.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Depressão: Panorama e Características

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) a depressão deve se tornar o maior transtorno incapacitante nos próximos 20 anos. Além disso, ela será a doença que mais gerará custos econômicos e sociais para os governos, devido aos gastos com tratamento e às perdas de produção (Alencastro, 2013).

Dentre os transtornos de humor, a depressão destaca-se por ser uma das doenças neuropsiquiátricas mais frequentes no mundo ocidental, com aproximadamente 300 milhões de pessoas afetadas, o que reflete uma prevalência de 17% na população (Nestler et al., 2002). Estima-se que no Brasil existam aproximadamente 54 milhões de pessoas que em algum momento de suas vidas desenvolverão algum tipo de depressão, sendo que 7,5 milhões terão episódios agudos e graves, muitas com risco de suicídio (Nardi, 2000).

A depressão acomete pessoas de todas as idades, etnias e classes socioeconômicas (Brhlikova et al., 2011), trazendo prejuízos na qualidade das relações interpessoais e pode apresentar comorbidade com outras doenças psiquiátricas e neurológicas, como ansiedade e doença de Parkinson, entre outros diversos distúrbios somáticos, os quais limitam atividades normais (Gotlib e Joormann, 2010).

O diagnóstico da depressão baseia-se na observação clínica dos sintomas enumerados na Tabela 1, que são altamente variáveis e muitas vezes contrastantes. Para o indivíduo preencher os critérios para o diagnóstico 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 (American Psychiatric Association, 1994).

De acordo com a natureza dos sintomas, é possível diagnosticar subtipos de depressão: não-melancólica e melancólica. A depressão não-melancólica é o tipo mais comum de depressão, também referida como "depressão maior" e caracterizada pelos seguintes sintomas: baixa auto-estima, elevada auto-crítica, humor deprimido, alterações no apetite e distúrbios do sono (Alencastro, 2013). A depressão melancólica se caracteriza pela presença de distúrbio psicomotor marcante, expresso como agitação espontânea ou retardo psicomotor (Parker e Brotchie, 1992). Além das alterações no movimento, a literatura tem documentado déficits

cognitivos na depressão melancólica, com prejuízos na formação de conceitos, flexibilidade mental e aquisição de memórias (Alencastro, 2013).

A terapia disponível para o tratamento da depressão está frequentemente associada a vários efeitos colaterais indesejáveis, e a sua eficácia só alcança uma porção da população (Perović et al., 2010). A heterogeneidade da resposta clínica aos antidepressivos e susceptibilidade aos efeitos adversos são os principais problemas clínicos da terapia antidepressiva, disto surge a importância da investigação de novos agentes terapêuticos para tratar a depressão.

Tabela 1. Critérios diagnósticos da depressão de acordo com o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais, quarta edição (DSM-IV).

-
1. Humor deprimido
 2. Anedonia
 3. Falta de esperança, desespero, sentimento de culpa ou desvalia
 4. Perda de peso e apetite/ ganho de peso ou apetite
 5. Agitação psicomotora/ letargia
 6. Fadiga ou falta de energia
 7. Pensamentos recorrentes de morte ou suicídio
 8. Dificuldade de concentração
 9. Insônia/hipersônia
-

Fonte: Manual Diagnóstico e Estatístico dos Distúrbios Mentais (American Psychiatric Association, 1994).

2.2 Fisiopatologia da Depressão

Apesar da etiologia da depressão ainda não ser bem esclarecida, sabe-se que a doença resulta, em parte, de uma deficiência na atividade monoaminérgica no cérebro (Elhwuegi, 2004). A hipótese monoaminérgica da depressão surgiu em 1965 e postula que o maior processo neuroquímico envolvido na depressão é a disfunção na neurotransmissão monoaminérgica e concomitante diminuição das monoaminas (norepinefrina(NE) e/ou serotonina (5-HT)) na fenda sináptica, e também pode ser estendida para dopamina (DA) (Figura 2). Desta maneira a concentração de monoaminas pode ser alterada através de uma perturbação na síntese, armazenamento ou liberação, ou estes podem manter-se inalterados, mas as atividades dos receptores e/ou mensageiros intracelulares podem estar alteradas. Esta

hipótese é sustentada principalmente pelo fato de a maioria dos antidepressivos utilizados na clínica aumentarem os níveis de monoaminas no cérebro através da inibição da recaptação de 5-HT, NE ou DA e/ou ainda pela inibição da enzima monoamina oxidase, enzima que biotransforma as monoaminas (Nemeroff, 2007). Estudos neurobiológicos também estão de acordo com a hipótese monoaminérgica e indicam que importantes alterações nos sistemas serotoninérgico e noradrenérgico estão relacionadas com o sucesso do tratamento antidepressivo (Elhwuegi, 2004).

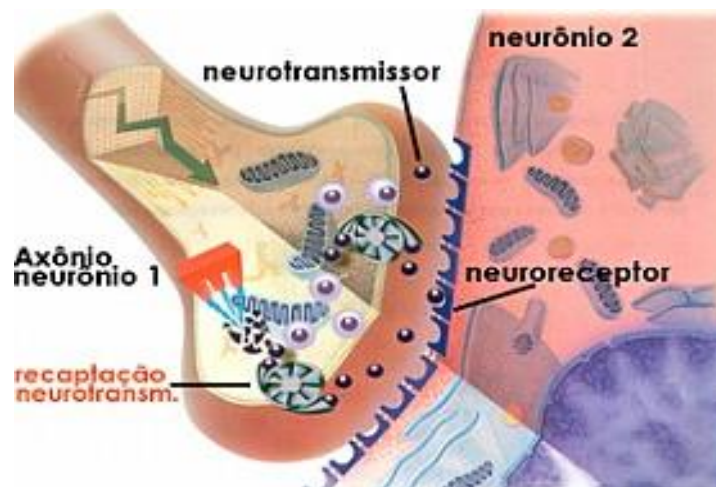


Figura 2. Teoria monoaminérgica da depressão. A depressão é caracterizada por baixos níveis de neurotransmissores (5-HT, NE ou DA) nas fendas sinápticas. A partir disto, a maioria dos antidepressivos utilizados hoje atuam na inibição da recepção dos neurotransmissores, principalmente 5-HT.

Fonte: <http://www.jornallivre.com.br/262239/bases-biologicas-da-depressao.html>

Vários estudos também têm sugerido o envolvimento da desregulação imunológica na fisiopatologia da depressão (Dantzer e Kelley, 2007; Kim et al, 2007; Leonard e Maes, 2012). A hipótese apresentada por Smith (1991) indica que as citocinas pró-inflamatórias, as quais são produzidas por macrófagos ativados, contribuem para muitos dos sintomas da depressão. O papel das citocinas na depressão é suportado pelo alto índice de depressão clínica visto durante o tratamento com citocinas (ex: interferon gama, usado no combate a infecções e alguns tipos de câncer) que conduz ao modelo de depressão induzida por citocinas (Raison et al, 2005). Além disso, Dahl et al.(2014) verificaram o aumento nos níveis de uma gama de citocinas (ex: IL-1, IL-6, TNF- α) em homens e mulheres depressivas, sendo restaurados aos níveis do controle após 12 semanas de terapia antidepressiva.

Outros dois mecanismos que têm sido apresentados como possíveis responsáveis pelo desenvolvimento da depressão, e que são alvos deste estudo, são as neurotrofinas e a enzima Na^+, K^+ -ATPase.

Neurotrofinas ou fatores neurotróficos são conhecidos por serem potentes reguladores da plasticidade e sobrevivência de células neurais e gliais adultas. Assim, a hipótese neurotrófica sugere que a diminuição dos níveis de fatores neurotróficos contribui para o déficit na função hipocampal durante o desenvolvimento da síndrome depressiva, sendo esta condição, revertida pelo tratamento antidepressivo (Vaidya e Duman, 2001). Além disso, a normalização dos níveis de neurotrofinas se dá por volta de 15 dias após o início da terapia com um antidepressivo, coincidindo com o tempo necessário para a ação terapêutica do fármaco (Vaidya e Duman, 2001; Shiet al., 2010). Esta hipótese tem dado maior enfoque ao BDNF (Fig. 3), um dos principais fatores neurotróficos no encéfalo (Nestler et al., 2002), o qual apresenta níveis de concentração diminuída no soro e no hipocampo de pacientes que apresentaram estados depressivos, como anedonia. Adicionalmente, foi demonstrada a diminuição dos níveis de BDNF no cérebro de roedores submetidos ao CUMS (Liu et al., 2014; Mao et al., 2014), além de já ter sido sugerido que neurônios expostos a altos níveis de glicocorticóides (desencadeado por situações estressantes) sofrem distúrbios na maturação sináptica mediada pelo BDNF (Kumamaru et al., 2008). Outra neurotrofina recentemente sugerida como sendo envolvida na depressão é o NGF (Shi et al., 2010). O NGF foi o primeiro fator neurotrófico descoberto a pelo menos 4 décadas. O NGF tem a capacidade de estimular uma variedade de células inflamatórias, podendo ser produzido por uma variedade de tipos de células estruturais e inflamatórias como neurônios, células endoteliais, células epiteliais, fibroblastos, linfócitos B e T, eosinófilos, basófilos, monócitos/macrófagos e mastócitos. Além disso, o NGF parece estar envolvido em fenômenos relacionados à atividade do eixo HPA. No entanto, a relação existente entre a desregulação do eixo HPA em situações de estresse com a alteração nos níveis cerebrais de NGF não está claramente elucidada. Tem sido demonstrado que eventos psicossociais estressantes podem alterar os níveis de NGF no SNC, principalmente no hipocampo e hipotálamo (Aloe et al., 2002). Estudos em animais e humanos têm também revelado que a concentração de NGF plasmático é elevada como resultado do comportamento de ansiedade (Aloe et al., 2002), e após estresse emocional induzido pelo pára-queda (Aloe et al., 1994). Assim, o NGF parece ser um bom candidato para mediar os efeitos agudos e crônicos das experiências estressantes sobre a funcionalidade e sobrevivência neuronal (Rush et al., 1997). Manni et al. (2007) demonstraram a alteração nos níveis de NGF no hipotálamo e tálamo de ratos submetidos a

estresse por imobilização por 1h por dia durante 10 dias. Scaccianoce et al. (2000) verificaram o efeito de diferentes modelos de estresse repetido nos níveis de NGF no hipocampo de ratos. Além disso, Shiet al. (2010) observaram o efeito antidepressivo da administração intranasal de NGF em camundongos e ratos. Entretanto, achados correlacionando o NGF com a depressão induzida pelo CUMS ainda são raros.

A enzima Na^+, K^+ -ATPase ou bomba Na^+, K^+ pertence à classe de ATPases do tipo-P, a qual hidrolisa o ATP, gerando energia para o transporte iônico pela membrana plasmática. Esta enzima exporta íons Na^+ da célula e importa íons K^+ desse modo permitindo a geração e a manutenção da alta concentração de Na^+ extracelular e alta concentração de K^+ intracelular (Oliveira et al., 2009). A manutenção desses gradientes iônicos é fundamental para diversas funções celulares, incluindo a regulação do potencial de repouso e excitabilidade celular. O gradiente de Na^+ gerado pela Na^+, K^+ -ATPase é utilizado para múltiplos sistemas de transporte secundário, incluindo o transporte de glicose e aminoácidos, liberação de Ca^{2+} e H^+ via canais iônicos que trocam $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ e Na^+/H^+ . Dada a importância desta enzima, a redução na atividade da Na^+, K^+ -ATPase afeta diretamente a transmissão da sinalização nervosa, a atividade neuronal, bem como o comportamento animal (Oliveira et al., 2009). Assim, a inibição da Na^+, K^+ -ATPase pode ser observada em pacientes com transtornos de bipolaridade e epilepsia (Grisar et al., 1992; Mynett-Johnson et al., 1998). Além disso, alguns autores têm sugerido que a inibição da Na^+, K^+ -ATPase cerebral está associada com a ocorrência de transtornos depressivos em ratos (Gamaro et al., 2003; Acker et al., 2009). Contudo, há poucos relatos que se relacionem a atividade da Na^+, K^+ -ATPase cerebral com modelos de depressão induzida pelo CUMS.

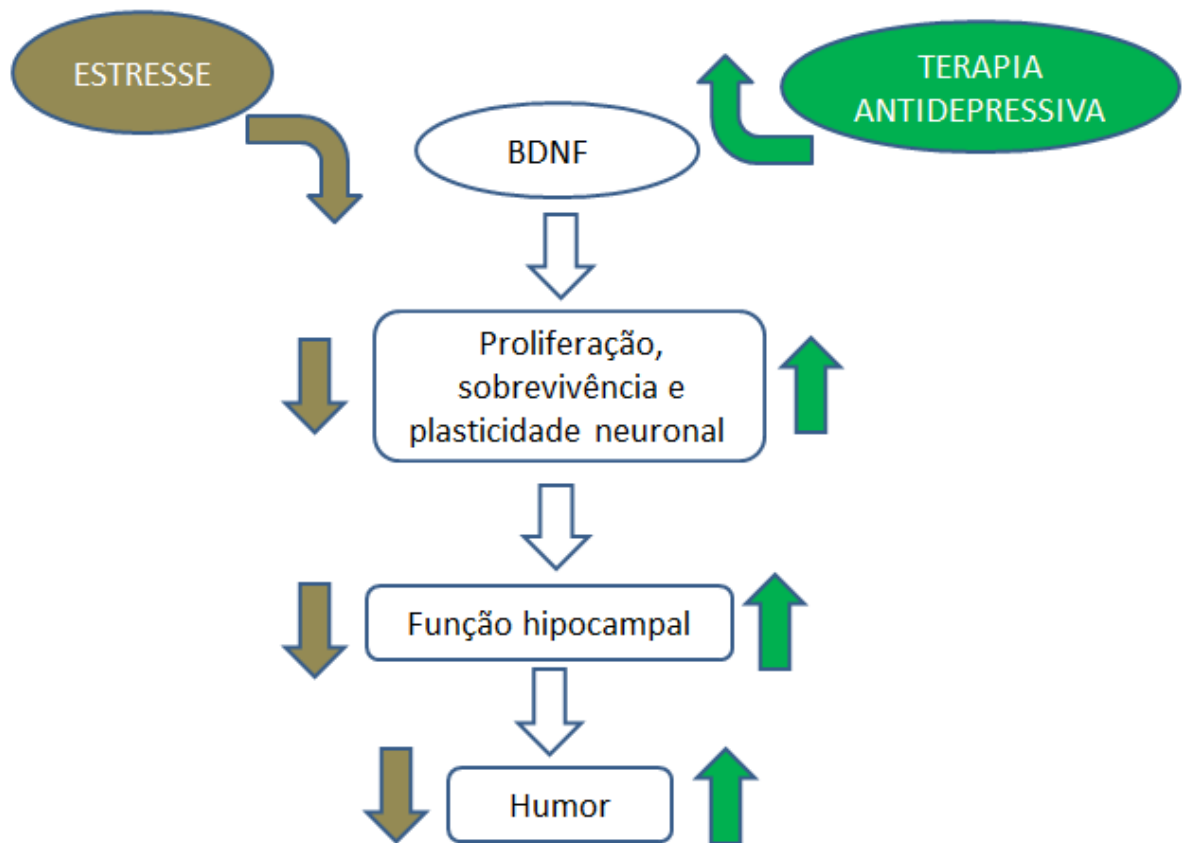


Figura 3. Modelo simplificado descrevendo os papéis opostos do estresse e da terapia antidepressiva sobre a expressão de BDNF no hipocampo, a função do hipocampo, e o humor (Adaptado de Groves, 2007).

2.3 Testes Comportamentais para o Estudo da Depressão

Os modelos animais experimentais de depressão representam uma valiosa ferramenta de estudo dos aspectos neurobiológicos da depressão, como também para a pesquisa de novas alternativas terapêuticas (fármacos antidepressivos) para o uso na depressão e ainda, os mecanismos de ação pelos quais exercem seus efeitos. Estes modelos devem representar diversos aspectos da depressão nas espécies pesquisadas, comumente roedores (ratos e camundongos) (Willner, 1997).

Embora humanos e roedores apresentem diferenças marcantes na anatomia encefálica, diversos circuitos que regem respostas comportamentais e fisiológicas, estão conservados entre estas espécies (Cryan e Holmes, 2005). Por meio de inferências baseadas em achados provenientes de modelos animais, pode-se elucidar comportamentos, vias neurais e fatores

genéticos relacionados ao transtorno depressivo e aperfeiçoar o entendimento do comportamento humano frente à doença.

Existe uma hipótese de que algumas espécies de animais podem, através dos testes, exibir alterações de comportamento do tipo depressivo (do inglês *depressive-like*), ou seja, parecido com alguns comportamentos apresentados pelos humanos. Em geral, nos testes os animais são expostos a um evento estressante inescapável e o comportamento deste animal frente a esse evento é avaliado. Paradigmas que empregam a exposição ao estresse agudo ou subcrônico incluem o teste de suspensão de cauda (TST – do inglês *Tail suspension test*) e o FST, que empregam a exposição em curto prazo ao estresse inevitável e incontrollável e podem prever a resposta dos animais a uma droga antidepressiva. Dentre os modelos em curto prazo amplamente utilizados no estudo da depressão em roedores, o TST e o FST são os mais empregados.

2.3.1 Teste de Suspensão de Cauda (TST)

O TST foi apresentado em 1985 por Steru e colaboradores. O TST é um dos modelos mais tradicionais para o estudo da depressão em animais de laboratório, por apresentar alto valor preditivo devido à resposta aos medicamentos antidepressivos existentes. Neste teste, os roedores são pendurados pela cauda e após um período de movimentos de tentativas de fuga, estes desenvolvem uma postura de imobilidade, o que é resultado de uma situação estressante e inescapável. Esta imobilidade é observada durante um tempo total de teste de 6 minutos. No entanto, diferentemente do FST, apenas camundongos podem ser avaliados no TST.

2.3.2 Teste de Nado Forçado (FST)

O FST apresenta um princípio semelhante ao do TST. Esse teste possui alto valor preditivo para o efeito tipo antidepressivo e também constitui um teste comum para o estudo de novas drogas. Proposto por Porsolt e colaboradores, em 1977, neste teste os roedores são expostos a uma situação aversiva, nadar em um tanque cilíndrico com água, onde eles não podem tocar o fundo do cilindro ou fugir (escape). Assim como no TST, o FST geralmente tem duração de 6 minutos onde se observa o tempo total de imobilidade apresentado pelos animais. Tanto ratos como camundongos podem ser usados para o estudo do efeito do tipo antidepressivo de drogas através do FST.

A hipótese que justifica o comportamento animal no TST e no FST é baseada na ideia de que o animal “perde a esperança de escapar” de tal situação, em outras palavras a falta de persistência em escapar é percebida como uma desistência e refletida em tempo de imobilidade descrito como um estado depressivo (Thierry et al.,1984). As substâncias antidepressivas revertem esse quadro diminuindo assim o tempo de imobilidade fazendo com que o animal não desista de escapar das situações impostas a ele, dessa maneira os antidepressivos clássicos empregados na clínica, como a imipramina e a fluoxetina são utilizados como controles positivos nestes testes.

2.3.3 Teste de Campo Aberto (OFT)

O OFT (do inglês *Open field test*) é utilizado para verificar os efeitos de substâncias ou determinados procedimentos sobre o sistema motor dos animais, a fim de excluir a possibilidade de que a diminuição do tempo de imobilidade exibida nos testes preditivos de efeito tipo antidepressivo, como no TST ou no FST, seja devido a uma estimulação motora. Substâncias estimulantes do SNC tendem a aumentar os parâmetros comportamentais registrados no modelo enquanto que substâncias depressoras tendem a diminuí-los. Este teste, em geral, é realizado em uma caixa medindo 45 x 45 x 30 cm, com o chão dividido em 9 quadrantes iguais. Durante a sessão de teste, o número de quadrantes cruzados com todas as patas e elevações em um período de 6 minutos são utilizados como parâmetro para a avaliação da atividade locomotora e exploratória dos animais (Walsh e Cummins, 1976).

2.3.4 Teste de Preferência por Sacarose (SPT)

O SPT explora o componente da anedonia relacionado com a depressão. Entre os pacientes depressivos é muito comum o sentimento de anedonia, em que os indivíduos se mostram desinteressados por atividades anteriormente prazerosas. A metodologia do teste é variável, mas consiste basicamente em colocar os animais em caixas individuais com água e solução de sacarose à disposição e medir a preferência por solução doce em relação ao total da ingestão de líquido. Animais anedônicos não apresentam preferência por nenhuma das garrafas, sendo a preferência resgatada por tratamento crônico, mas não agudo, com antidepressivos. A similaridade da latência para o efeito do tratamento e o componente anedônico a ser comparável ao ser humano tornam o modelo de preferência por sacarose bastante válido (Peng et al., 2012).

2.4 Estresse Oxidativo e a Depressão

As RS são produzidas durante o metabolismo basal das células aeróbicas e incluem moléculas radicalares, como o ânion superóxido e o radical hidroxila, ou não-radicalares como o peróxido de hidrogênio. Para detoxificar estas espécies reativas, o organismo possui um sistema de defesas antioxidantes formado por agentes capazes de, em baixas concentrações, retardar ou inibir significativamente a injúria de um substrato oxidável (Halliwell, 2001). Estes agentes antioxidantes podem ser classificados em enzimáticos, dentre os quais se destacam a enzima superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione redutase (GR) e glutathione peroxidase (GPx), e não enzimáticos, como a GSH (Sies, 1993) (Figura 4). Quando a produção de espécies reativas está em desequilíbrio com os níveis de defesas antioxidantes tem-se o estado denominado de estresse oxidativo.

Comparado a outros tecidos, o tecido central é particularmente vulnerável aos danos oxidativos uma vez que consome altas quantidades de oxigênio; é relativamente carente de defesas antioxidantes; é um tecido rico em lipídeos com ácidos graxos insaturados, substratos passíveis de oxidação; contém metais como ferro e cobre, que catalizam reações de oxidação e neurotransmissores com potencial oxidante (Halliwell, 2006). A ação central das espécies reativas leva à destruição oxidativa dos neurônios e à neurodegeneração que, por sua vez, está associada a transtornos psiquiátricos (Freitas et al., 2014). Neste contexto, estudos mostram que os parâmetros de avaliação de estresse oxidativo estão alterados na depressão. Pesquisas têm demonstrado que a depressão é caracterizada por alterações na atividade das enzimas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas (Bilici et al., 2001; Ozcan et al., 2004; Kumar et al., 2011). Adicionalmente, Freitas et al. (2014) mostraram a correlação positiva entre o aumento dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS – do inglês *Thiobarbituric acid reactive substances*) no hipocampo e o aumento no tempo de imobilidade no FST em camundongos. Além disso, estudos pré-clínicos sugerem que os antidepressivos clássicos (ex: fluoxetina) apresentam propriedades antioxidantes (Bilici et al., 2001). Considerando que o estresse oxidativo apresenta importante papel sobre diversas patologias neurológicas, é conveniente ressaltar a importância exercida por compostos que apresentam atividade antioxidante, pois estes podem representar uma alternativa para o tratamento de inúmeras patologias. Em vista disso, tem sido alvo de interesse de muitos pesquisadores a busca por novos compostos que possuam atividade biológica antioxidante com o mínimo de toxicidade e efeitos adversos, de modo que a atividade antioxidante contribua no efeito antidepressivo do composto (Kumar et al., 2011; Freitas et al., 2014). Assim, a intervenção

terapêutica antidepressiva pode estar associada com a normalização dos processos oxidativos críticos, juntamente com o alívio dos sintomas depressivos. Desse modo, alguns trabalhos fornecem evidências de que os efeitos cumulativos antioxidantes promovidos por diferentes classes de antidepressivos representam um mecanismo universal de ação antidepressiva (Li et al., 2000; Kolla et al., 2005).

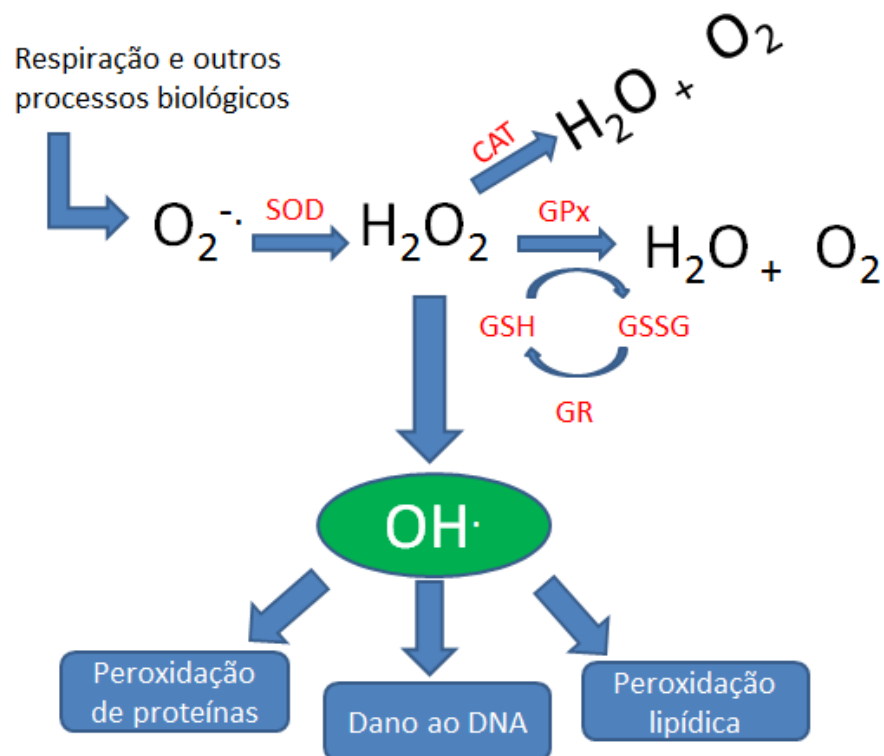


Figura 4: Formação das RS e ação das defesas antioxidantes. O ânion superóxido, proveniente da respiração celular e outros processos biológicos, é convertido a peróxido de hidrogênio pela ação da SOD. As enzimas CAT e GPx detoxificam o peróxido de hidrogênio, que se não neutralizado pode formar radicais hidroxila altamente reativos, levando a danos na estrutura celular. A GR atua restaurando os níveis de GSH, que como cofator da GPx é oxidada a glutatona oxidada (GSSG) (Adaptado de Lobato et al., 2009).

2.5 Fisiologia do Estresse

As respostas ao estresse são mediadas pelo sistema nervoso autônomo (SNA) e pelo eixo HPA, com ações complementares através de todo o organismo. O SNA é o responsável pela resposta mais imediata à exposição ao estressor. Suas duas partes, simpático e parassimpático, provocam alterações rápidas nos estados fisiológicos através da inervação dos órgãos alvos. Por exemplo, a inervação simpática pode rapidamente (em segundos) aumentar a frequência cardíaca e a pressão arterial através da liberação de noradrenalina, primariamente nas terminações dos nervos simpáticos e adrenalina pela estimulação simpática das células da medula da glândula adrenal (Figura 4). Essa excitação do SNA diminui rapidamente em razão do reflexo parassimpático, resultando em respostas de curta duração (Ulrich-Laiet al., 2009).

Por outro lado, o estresse ativa também o eixo HPA, que resulta na elevação dos níveis de glicocorticóides circulantes. A exposição ao estressor ativa os neurônios do núcleo paraventricular do hipotálamo que secretam hormônios liberadores, como o hormônio liberador de corticotrofina (CRH - do inglês *corticotropin-releasing hormone*), secretado nos terminais de neurônios hipotalâmicos próximos da circulação porta da eminência média da hipófise, mas podendo, também, exercer seus efeitos em várias áreas cerebrais, como amígdala e hipocampo. Esse hormônio vai agir na hipófise anterior promovendo a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH – do inglês *adrenocorticotropic hormone*), que por sua vez vai atuar no córtex da glândula adrenal iniciando a síntese e liberação de glicocorticóides, como, por exemplo, do cortisol em humanos e do corticosterona em roedores (Figura 5). O pico dos níveis plasmáticos de glicocorticóides ocorre dezenas de minutos após o início do estresse. O mecanismo, com vários níveis de secreção hormonal do eixo HPA, é lento em relação à latência dos mecanismos de transmissão sináptica que ocorrem no SNA (Ulrich-Laiet al., 2009). Os glicocorticóides são secretados de uma forma pulsátil, seguindo um ritmo circadiano, sobre o qual se sobrepõe uma explosão secretória por ocasião do estresse. Esses hormônios atuam primariamente em dois tipos de receptores: mineralocorticóides (ReMC) e glicocorticóides (ReGC). Os primeiros têm grande afinidade pelos corticosteróides, sendo ocupados mesmo quando os níveis são baixos e os segundos, com uma afinidade dez vezes menor, que são ocupados em situações de grande aumento, por exemplo, durante o estresse. A ligação dos corticosteróides com seu receptor promove seu transporte para o núcleo das células, onde atuam na transcrição gênica. Assim, influenciam a taxa de secreção de proteínas específicas, que diferem dependendo do tipo de célula (Joels et al., 2009). Os glicocorticóides circulantes promovem a mobilização da energia armazenada e

potencializam numerosos efeitos mediados pelo sistema nervoso simpático. Desempenham, também, um papel chave no controle da atividade do eixo HPA e na finalização da resposta ao estresse, através de uma realimentação inibitória em áreas cerebrais (Joels et al., 2009).

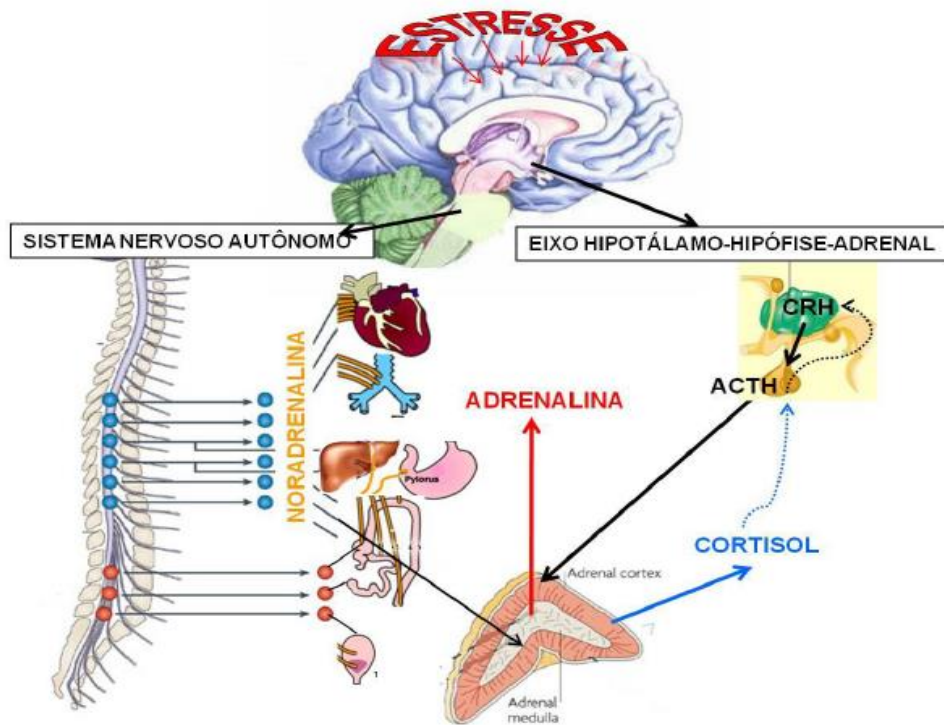


Figura 5. Fisiologia do estresse. Sistema nervoso autônomo (SNA) e eixo hipotálamo-hipófise-adrenal ou hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), sistemas responsáveis pela resposta ao estresse.

Fonte: <http://rnp.fmrp.usp.br/~psicmed/doc/Fisiologia%20do%20estresse.pdf>

2.6 Estresse e a Depressão

Estudos de imagens cerebrais de pacientes deprimidos indicam uma significativa redução do volume do hipocampo em comparação com indivíduos saudáveis e ainda mostram que o estresse pode resultar em atrofia e morte de neurônios hipocâmpais (Sapolsky, 1996). Além disso, o estresse diminui a neurogênese de neurônios granulares do giro denteado do hipocampo de animais adultos (Gould et al., 1997). Estudos de ressonância magnética mostram consistentemente que o córtex pré-frontal e o hipocampo são reduzidos em tamanho

em pacientes adultos com transtorno depressivo maior, em comparação com controles saudáveis (Onguret al., 1998; MacQueen et al., 2003).

O hipocampo e o córtex pré-frontal participam de funções de alta ordem como memória, aprendizado, atenção e impulsos, tomada de decisões, bem como desempenham um papel chave na modulação autonômica e endócrina de resposta ao estresse. Nesse sentido, sugere-se que estas estruturas cerebrais podem mediar aspectos cognitivos da depressão decorrente do estresse, tais como deficiências de memória e sentimentos de culpa, desesperança e suicídio (Czeh et al., 2008). Além disso, alterações funcionais nestas áreas parecem favorecer o desenvolvimento de transtornos mentais, como ansiedade e depressão (Drevets, 2000; Musazzi et al., 2010).

Em pacientes depressivos, a concentração de glicocorticóides está frequentemente elevada, a qual caracteriza a disfunção no eixo HPA (Nestler et al., 2002). Isto também leva à hiperatividade do sistema nervoso simpático e a hipertrofia das adrenais. Esses prejuízos causam um típico perfil caracterizado pela diminuição nos níveis de catecolaminas, como a noradrenalina, adrenalina e dopamina na corrente sanguínea, e aumento dos níveis plasmáticos de cortisol.

A hiperatividade do HPA em conjunto com a ativação da amígdala, leva ao aumento do tónus do simpático, que promove a liberação de citocinas a partir de macrófagos. Sintomaticamente, perturbações resultantes de citocinas pró-inflamatórias incluem fadiga, perda de apetite e libido, bem como a hipersensibilidade à dor (Tsigos et al., 2002). Citocinas pró-inflamatórias também podem diminuir o suporte neurotrófico e a neurotransmissão monoaminérgica que pode levar à apoptose neuronal. O estresse e a depressão e a consequente desregulação imune periférica leva à ativação da micróglia, que, em seguida, contribui para a liberação adicional de citocinas inflamatórias. O envolvimento do BDNF também tem sido postulado em modelos de depressão induzida por estresse. Tem sido mostrado que o estresse ao elevar os níveis de glicocorticóides altera a plasticidade celular pela redução da expressão do BDNF e pelas mudanças na sensibilidade de receptores de BDNF (Duman e Monteggia, 2006). A redução nos níveis de fatores neuroróficis, tais como BDNF, tem um impacto negativo sobre processos estruturais e funcionais no do sistema límbico, especialmente para o hipocampo. A partir desta hipótese, o sucesso da terapia antidepressiva estaria dependente da normalização dos processos inflamatórios e da regulação da sinalização monoaminérgica e neurotrófica, fatores estes que são alterados pelo estresse.

2.7 Modelos Animais de Estresse no Estudo da Depressão

A depressão é fortemente influenciada por eventos estressantes e traumáticos ao longo da vida, sugerindo que pacientes deprimidos devam ter prejuízos em estratégias de lidar com situações aversivas (de Kloet et al., 2005). Devido a isso, a maioria dos modelos depressivos são baseados na exposição do animal a uma variedade de estressores.

Atualmente, modelos de estresse estão baseados em estresses fortes, moderados ou a combinação dos dois, além de estresses repetidos ou variados (imprevisíveis). Os modelos de estresse crônico parecem serem mais apropriados para modelos de depressão comparado a outros modelos. Além disso, estresse crônico e frustração crônica comumente induzem alterações neurobiológicas, as quais podem levar à depressão (Willner, 1997).

2.7.1 Estresse Crônico Moderado e Imprevisível (CUMS)

Willner e colaboradores desenvolveram em 1987 o paradigma do estresse crônico moderado, o qual incluía uma variedade de estressores moderados aplicados por um longo período (Willner et al., 1987). A apresentação de diferentes tipos de estressores é essencial para o modelo, ao invés de aplicar um único estressor de forma repetida que frequentemente induziria uma habituação comportamental (Muscat e Willner, 1992). Os estressores utilizados foram: maravalha suja, inclinação da caixa de moradia, alterações no ciclo claro/escuro, períodos de privação de água e comida e agrupamento (Willner et al., 1987). Este modelo parece simular melhor a condição do ambiente humano, principalmente pela exposição do indivíduo a estressores diários moderados e variados do que a eventos traumáticos. Algumas das anormalidades vistas no CMS (do inglês *Chronic Mild Stress*), designado neste trabalho como CUMS (do inglês *Chronic Unpredictable Mild Stress*) apresentaram sintomas do tipo depressivos observados em humanos.

Os roedores, como a maioria dos humanos, normalmente preferem consumir soluções doces (Willner et al., 1987) em relação à água normal. Willner e colaboradores demonstraram que o CMS pode induzir significativa redução na preferência pelo consumo de sacarose, comportamento designado como anedonia, um dos principais sintomas do transtorno depressivo (Willner, 1987). O comportamento depressivo neste experimento foi revertido através de terapia com antidepressivos tricíclicos (Willner et al., 1987). Além disso, o modelo acima citado diminui comportamentos de agressividade, sexuais e de atividade locomotora em ratos durante a fase ativa (Yan et al., 2010). Alterações circadianas e do ritmo diurno (Gorka

et al., 1996), distúrbios do sono, como mudanças no padrão de sono (Cheeta et al.,1997) foram também observados, além de perda de peso (Willner e Jones, 1996), distúrbios na regulação simpática das funções cardíacas (Grippe et al.,2003), aumento dos níveis séricos de citocinas, como o fator de necrose tumoral α (TNF- α) (Kumar et al., 2011) e aumento da atividade do eixo HPA (Muscat e Willner, 1992). Assim, o CUMS é um modelo com grande aplicabilidade e valia no estudo da fisiopatologia da depressão e na avaliação de compostos candidatos a antidepressivos.

2.8 Compostos Fenólicos Naturais na Terapia da Depressão

Compostos fenólicos derivados de plantas são divididos em diversas categorias, como fenóis simples, ácidos fenólicos, cumarinas, flavonóides, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas (Naczki e Shahidi, 2004). Os flavonóides são compostos polifenólicos presentes em alimentos e bebidas de origem vegetal e que têm despertado interesse em decorrência da bioatividade destes compostos (Sequeto et al., 2012). Nesse contexto, flavonoides isolados de plantas, como luteolina, hesperidina, apigenina, crisina, rutina, e quercetina têm demonstrado efeitos protetores em doenças cardíacas, renais, hepáticas, cerebrais, e neoplásicas (Pietta, 2000; Sequeto et al., 2012).

Um ensaio clínico revelou que a administração crônica e subcrônica de compostos fenólicos leva a uma menor prevalência de sintomas depressivos em indivíduos idosos japoneses (Niu et al., 2009). Zhu et al. (2012) observaram a menor incidência dos sintomas da depressão sob parâmetros comportamentais e bioquímicos em camundongos que foram administrados com polifenóis do chá verde. A atividade biológica dos compostos fenólicos em doenças neurodegenerativas, inflamação, câncer e doenças cardiovasculares envolve a regulação do crescimento celular e a proliferação, a atividade enzimática, e a modulação da sinalização celular (Pandey et al., 2009; Darvesh et al., 2010).

Embora vários antidepressivos estejam disponíveis há décadas, a maioria deles não é completamente eficaz, pois se estima que 33% dos pacientes depressivos não sejam sensíveis à medicação antidepressiva (Trivedi et al., 2006), além destes medicamentos estarem associados a muitos efeitos adversos graves (ex: alteração do sono e apetite, alterações gastrintestinais (diarréia ou obstipação intestinal), retenção urinária, alergias de pele, sudorese, diminuição da libido ou retardo da ejaculação, aumento ou diminuição de peso, náusea, tontura e tremores). Assim, pesquisas recentes concentram-se na possibilidade do uso de produtos naturais, especialmente flavonóides, para o desenvolvimento de medicamentos

antidepressivos, ou como uma alternativa complementar para o tratamento da depressão (Kumar et al., 2011; Borges Filho et al., 2013; Liu et al., 2014, Mao et al., 2014).

2.8.1 Crisina

A Crisina (5,7-Dihidroxi-flavona, Fig.1) pertence à classe flavona de flavonóides. É encontrada naturalmente em mel, própolis, e várias espécies de plantas, incluindo espécies do gênero *Pelargonium*, *Passiflora* e da família *Pinaceae* (Pichichero et al., 2010; Medic-Saric, 2011). A principal fonte natural de crisina é a planta *Passiflora coerulea* (regionalmente conhecida como maracujá do mato), da qual foi isolada em 1990 por Medina e colaboradores e apresentada como um composto com propriedades anticonvulsivantes (Medina et al., 1990).

2.8.1.1 Bioatividade da Crisina

A crisina é um flavonóide antioxidante com propriedades complexantes, devido principalmente à presença de um grupo hidroxila no carbono 5 (Pushpavalli et al., 2010). Estudos sobre a atividade antioxidante de flavonóides sugerem a relação da presença de hidroxilas na bioatividade destes compostos (Pushpavalli et al., 2010). Mais especificamente, a capacidade antioxidante de um flavonóide geralmente está relacionada principalmente com a hidroxilação do anel B. No entanto, as hidroxilas presentes nos carbonos 5 e 7 do anel A da crisina desempenham uma função significativa na atividade antioxidante deste composto (Torel et al., 1986).

Além da função antioxidante (Pushpavalli et al., 2010), a crisina já tem sido apresentada como tendo anticonvulsivantes (Medina et al., 1990), anti-hipertensivos (Vilar et al., 2002), anti-inflamatórios (Bae et al., 2011), antineoplásicos (Pichichero et al., 2011) e anti-hiperlipidêmicos (Zarzecki et al., 2014). Também há relatos que sugerem que a crisina aumenta os níveis de testosterona pela inibição da enzima aromatase (Kao et al., 1998), que converte a testosterona em estradiol, e em decorrência disso, a crisina já está disponível no mercado como um suplemento dietético (500 mg por cápsula) (iHerbInc., Monrovia, Califórnia; VitaDigest, Walnut, Califórnia).

Embora, como exposto, o efeito da crisina já tenha sido explorado em uma vasta gama de patologias, estudos avaliando a bioatividade deste composto em doenças do SNC, como por exemplo, a depressão, ainda são consideravelmente escassos.

2.8.1.2 Biodistribuição, Metabolismo e Eliminação da Crisina

A característica fundamental dos flavonoides quanto à farmacocinética são os grupos hidroxila livres, que são rapidamente e eficientemente metabolizados via glucuronidação e sulfatação (Griffiths e Barrow, 1972; Bokkenheuser et al., 1987).

Os flavonóides, em geral, apresentam-se em duas formas, a forma glicosilada (conjugados com açúcares) e a forma agliconada (livre). De um modo geral, assume-se que os flavonóides glicosilados são absorvidos na forma agliconada após passar por hidrólise no trato digestivo. Na forma agliconada, nos enterócitos, as principais transformações que ocorrem com os flavonóides incluem reações de glucuronidação e sulfatação, que podem ser seguidas de efluxo, culminando na eliminação via fezes, urina e dióxido de carbono (mediada por bactérias do trato intestinal), ou absorção e distribuição para os tecidos via sistema circulatório (Fig. 6).

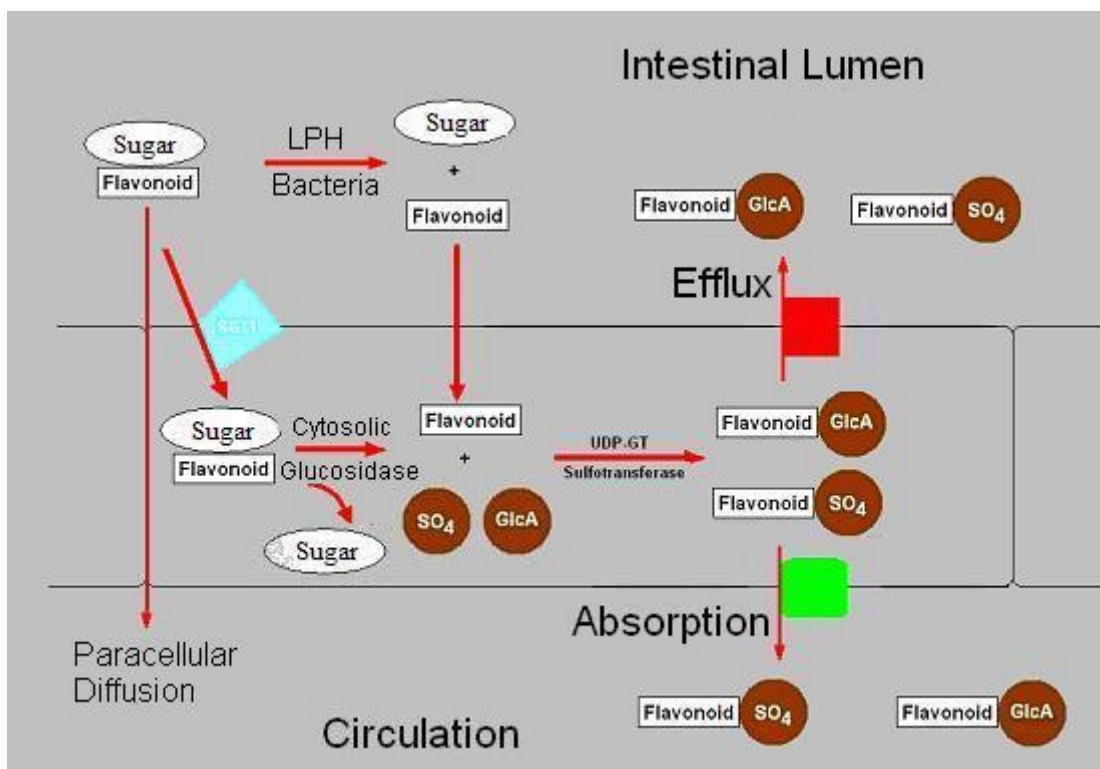


Figura 6. Esquema da absorção de flavonóides no intestino humano. Os flavonóides podem ser absorvidos na forma glicosilada ou agliconada. Ambas as formas podem ser absorvidas diretamente, no entanto, a forma glicosilada deverá ser clivada no enterócito por glicosidasas citosólicas. Uma outra alternativa é a clivagem realizada pela lactase-florizina hidrolase (LPH) ou por bactérias intestinais no lúmen. Nos enterócitos, os flavonóides são rapidamente

conjugados com o ácido glucurônico ou sulfatos, via UDP-glucuronosiltransferase ou sulfotransferase, respectivamente. Alguns flavonóides também podem ser absorvidos por difusão paracelular.

Fonte: <http://www.robertbarrington.net/flavonoid-absorption/>

A crisina é um flavonóide agliconado que, como a maioria dos flavonóides, é considerada um composto de relativamente baixa taxa de absorção oral (Walle, 2004). Tsuji et al. (2006) avaliaram a acumulação da crisina em peixes após 8h de exposição, verificando, em ordem decrescente, maiores concentrações em fígado, intestino, pele e cérebro. Quanto ao metabolismo, o mesmo grupo de pesquisadores observou que a crisina sofre glucuronidação após a absorção, presumivelmente nos carbonos 5 e 7 e é secretada na bile. Walle et al. (2001) monitoraram os níveis de crisina e dos metabólitos crisina sulfatada e crisina glucuronada em sangue, urina e fezes de humanos saudáveis durante 48h após a administração de 400 mg de crisina via oral. Nas análises sanguíneas, foram verificadas baixas concentrações de crisina livre, com picos de em média 6 ng/ml após 6 horas. Já para a crisina conjugada com sulfato, o pico foi de 200 ng/ml (cerca de 30 vezes maior em relação à crisina livre) e se deu aproximadamente 6h após a ingestão. Para a crisina glucuronada, não foram encontrados níveis plasmáticos suficientes para uma detecção precisa. No que se refere à eliminação via urina, Walle et al. (2001) demonstraram que a excreção de crisina livre na urina se deu entre 0,2 e 3,1mg. Já para a crisina glucuronada foram encontradas concentrações entre 2 e 26 mg na urina. Para a crisina sulfatada foram verificados apenas traços não detectáveis de forma precisa. Ainda, observou-se que a taxa de eliminação de crisina e seus metabólitos via urina é baixa, entre 1 e 7%. Quanto à eliminação via fezes, verificou-se que a taxa de eliminação de crisina e metabólitos chegou a até cerca de 98% da crisina administrada, com valores que variaram entre 40 e 390 mg. A partir disso, com base nas análises plasmáticas, observa-se que as possíveis formas nas quais a crisina exerce a sua constatada bioatividade seriam a forma livre e, talvez principalmente, a forma sulfatada. Já a forma glucuronada é a forma predominante de eliminação.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a bioatividade do flavonóide crisina em camundongos submetidos ao CUMS.

3.2 Objetivos Específicos

- Investigar parâmetros comportamentais;
- Avaliar parâmetros neurotróficos (NGF e BDNF) no hipocampo e córtex pré-frontal;
- Analisar parâmetros oxidativos e a atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase em hipocampo e córtex pré-frontal;
- Estudar os níveis plasmáticos de corticosterona e de marcadores de função hepática e renal;
- Comparar o efeito do flavonóide crisina com o efeito da fluoxetina (controle positivo).

4. MANUSCRITO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de manuscrito. Os itens Introdução, Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências encontram-se no próprio manuscrito e representam a íntegra deste estudo. O manuscrito está disposto da mesma forma que foi submetido para a Revista “Neuroscience”.

CUMS decreases NGF levels and Na⁺,K⁺-ATPase activity in the hippocampus and prefrontal cortex of female mice: Antidepressant effect of chrysin

Carlos Borges Filho¹, Franciele Donato¹, Renata Giacomeli¹, Paulo Souza¹, Lucian Del Fabbro¹, Michelle da Silva Antunes¹, Marcelo Gomes de Gomes¹, André Tiago Rossito Goes¹, Silvana Peterini Boeira¹, Leandro Cattelan Souza¹, Marina Prigol¹, Cristiano R. Jesse^{1*}

¹ Laboratório de Avaliações Farmacológicas e Toxicológicas Aplicadas às Moléculas Bioativas – LaftamBio Pampa – Universidade Federal do Pampa, CEP 97650-000, Itaqui, RS, Brazil.

Cristiano R. Jesse E-mail: cristianoricardojesse@yahoo.com.br

Laboratório de Avaliações Farmacológicas e Toxicológicas Aplicadas às Moléculas Bioativas – *LaftamBio* Pampa – Universidade Federal do Pampa, CEP 97650-000, Itaqui, RS, Brazil.

Phone: +55-55-34331669

FAX: +55-55-34331669

Abstract

We aimed to evaluate the effect of chronic unpredictable mild stress (CUMS) in nerve growth factor (NGF) levels and Na^+, K^+ -ATPase activity in the hippocampus and prefrontal cortex of female mice. We also aimed to examine the effect of 28-day treatment with chrysin in mice subjected to CUMS. CUMS applied for 28 days induced a decrease in NGF levels and in Na^+, K^+ -ATPase activity. CUMS also occasioned the decrease in the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in the hippocampus and prefrontal cortex and promoted a depressive status in the swimming forced test (FST), in the sucrose preference test, and in the corticosterone levels. Chrysin (5 or 20 mg/kg) treatment prevented against these alterations. Chrysin (20 mg/kg) yet occasioned the up-regulation of BDNF and NGF levels in non-stressed mice and in mice subjected to CUMS. CUMS decreased non-protein thiols (NPSH) levels and increased reactive species (RS) levels. In response to these changes, the glutathione reductase (GR), glutathione peroxidase (GPx) and catalase (CAT) activities were increased in mice exposed to CUMS. Chrysin treatment (5 or 20 mg/kg) protected against all these alterations, suggesting the involvement of antioxidant action in the antidepressant effect of chrysin. In conclusion, CUMS decreased NGF levels and Na^+, K^+ -ATPase activity in mice. Chrysin presented antidepressant effect in stressed mice in behavioural, biochemical and neurotrophic parameters. Furthermore, we suggest that one possible mechanism involved in the antidepressant effect of chrysin in female mice is the up-regulation of BDNF and NGF levels.

Keywords: Depression, chronic stress, flavonoid, corticosterone, oxidative stress.

Abbreviations: ALT, Alanine aminotransferase; ANOVA, Analysis of variance; AST, Aspartate aminotransferase; Adenosine triphosphate; AU, arbitrary unit; BDNF, Brain-derived neurotrophic factor; CAT, Catalase; CDNB, 1-chloro-2,4-dinitrobenzene; CUMS, Chronic unpredictable mild stress; DCF, dichlorofluorescein; DCHF-DA, 2',7'-dichlorofluorescein diacetate; DTNB, 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid); EDTA, Ethylene diamine tetraacetic acid; ELISA, enzyme-linked immune sorbent assay; FST, Forced swim test; GSSG, Glutathione disulfide; GPx, Glutathione peroxidase; GR, Glutathione reductase; GSH, reduced glutathione; GST, Glutathione S-transferase; H₂O₂, Hydrogen peroxide; HCl, Hydrochloric acid; HPA, Hypothalamic-pituitary-adrenal; KCl, Potassium chloride; KH₂PO₄, Potassium dihydrogen phosphate; MgCl₂, Magnesium chloride; NaCl, Sodium chloride; NADPH, Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; NGF, Nerve growth factor; NPSH, Non-protein thiols; OFT, Open field test; Pi, Inorganic phosphate; ROS, Reactive oxygen species; S1, Supernatant fraction; SPT, Sucrose preference test.

1 Introduction

Chronic unpredictable mild stress (CUMS) animal model was developed to mimic the initiation and progress of clinical depression in humans (Willner et al., 2005). Studies suggest that CUMS can induce behavioral and physiological changes resembling symptoms of human depression (Willner et al., 2005; Liu et al., 2014a), and that CUMS can be used for evaluating the efficacy of antidepressant candidates through behavioral and biochemical tests in animals (Zhou et al., 2007; Tönissaar et al., 2008; Mao et al., 2009).

Stress promotes deleterious effects on several cellular functions, as evidenced by defective plasma antioxidant defenses in conjunction with enhanced lipid peroxidation in depressive patients (Bilici et al., 2001), suggesting that oxidative stress is an important mechanism involved in the pathophysiology of depression in rodents and humans (Kumar et al., 2011; Maes et al., 2011; Freitas et al., 2014). Several studies have reported that stress promotes changes in reactive species (RS) and glutathione reduced (GSH) levels and in the activity of antioxidant enzymes in brain regions (Kumar et al., 2011; Freitas et al., 2014), including the prefrontal cortex and hippocampus, two structures related to the pathophysiology of depression (Duman and Voleti, 2012).

Research concerning to stress and depression still have postulated the “neurotrophin hypothesis of depression”, that suggest the association of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) deficiencies with the occurrence of depression, and that antidepressants act via restoration of central BDNF levels (Duman and Monteggia, 2006; Wolkowitz et al., 2011; Liu et al., 2014a; Mao et al., 2014). The association between stress/depression and neurotrophic factors is sustained basically for these factors: I. depression is associated with a decrease in blood or brain concentrations of neurotrophins; II. antidepressant treatments increase the expression of neurotrophins; III. glucocorticoids may suppress neurotrophins synthesis

(Vaidya and Duman, 2001; Shi et al., 2010). Nerve growth factor (NGF) is a neurotrophin capable of promoting the development and differentiation of sympathetic and embryonic sensory nerve cells (Scaccianoce et al., 2000). Apart from this trophic action, NGF seems to be involved in phenomena related to hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis activity (Scaccianoce et al., 2000) and has been presented as an effective antidepressant (Shi et al., 2010). Meanwhile, the role from NGF in the occurrence and treatment of depression is not sufficiently clarified.

Na^+, K^+ -ATPase is an enzyme responsible for the transport of Na^+ and K^+ ions in the nervous system, maintaining the ionic gradient necessary for neuronal excitability and regulation of neuronal cell volume (Gamaro et al., 2003). As a consequence, a decrease of Na^+, K^+ -ATPase activity directly affects neurotransmitter signaling, neural activity, as well as animal behavior (Oliveira et al., 2009). Thus, decrease in the Na^+, K^+ -ATPase activity is observed in patients with bipolar affective disorder and epilepsy (Grisar et al., 1992; Mynett-Johnson et al., 1998). In addition, some authors have introduced the hypothesis that the inhibition of Na^+, K^+ -ATPase activity in brain is associated with depressive disorders in rats (Gamaro et al., 2003; Acker et al., 2009). However, this hypothesis needs to be better elucidated.

Recent studies aimed at the development of antidepressants from natural products (Zhu et al., 2012; Liu et al., 2014a; Mao et al., 2014). Natural products, especially plant polyphenols, have attracted progressively more attention as supplemental interventions to treat diseases (Mancuso et al., 2007; Stevenson and Hurst, 2007). Chrysin (5,7-dihydroxyflavone, Fig. 1) is a natural flavonoid which is found in bee propolis, honey and various plants (Barbaric et al., 2011). Research has shown that chrysin has multiple biological activities, such as anti-inflammatory, antineoplastic, hypolipidemic and antioxidant

(Lapidot et al., 2002; Cho et al., 2004; Zarzecki et al., 2014). Nevertheless, little is known about the effect of chrysin on depression.

Thus, this study had two objectives: I. To evaluate NGF levels and Na⁺,K⁺-ATPase activity in hippocampus and prefrontal cortex of female mice subjected to CUMS; II. To evaluate the effect of chronic treatment with chrysin in female mice subjected to CUMS under behavioral, biochemical and neurotrophic parameters, compared with the effect of fluoxetine.

2 Materials and methods

2.1 Animals

Experiments were realized with female C57B/6J mice (20–25g, 90 days old). Animals were maintained at 22–25 °C, with free access to water and food, under a 12:12-h light/dark cycle (except when the stressful activity involved continuous light during 24h), with lights on at 7:00 a.m. The procedures of this study were conducted according to the guidelines of the Committee on the Care and Use of Experimental Animal Resources and with the approval of the Ethics Commission for Animal Use (CEUA protocol # 035/2013). It is important to clarify that this work was realized in female mice because women are more susceptible to development of depressive disorder followed to lifetime stress events than men (Mazure and Maciejewski, 2003).

2.2 Drug solutions and administrations

Chrysin, ATP, ouabain, fluoxetine, reduced glutathione (GSH), 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB), trizma base, were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). All other chemicals used were obtained from standard commercial suppliers.

Chrysin was dissolved in a saline/propyleneglycol solution (80:20). Fluoxetine was dissolved in saline solution. Both drugs were administered per oral (p.o.) in the volume of 10ml/kg. Mice were treated with chrysin at doses of 5 or 20mg/kg, corresponding to a low dose and a high dose, respectively (Zarzecki et al., 2014), or fluoxetine at the dose of 10mg/kg (Kumar et al., 2011). Both drugs were daily administered for 28 days, 30min before the stressful activity.

2.3 Experimental design and Chronic Unpredictable Mild Stress (CUMS)

The mice were divided into eight groups ($n = 4-7$): [1] Control (Non stress + vehicle) {V}, [2] Fluoxetine 10mg/kg (No stress + fluoxetine 10mg/kg) {F10}, [3] Chrysin 5mg/kg (No stress + chrysin 5 mg/kg) {C5}, [4] Chrysin 20mg/kg (No stress + chrysin 20mg/kg) {C20}, [5] Stress (Stress + vehicle) {V}, [6] Stress + fluoxetine 10mg/kg {F10}, [7] Stress + Chrysin 5mg/kg {C5} and [8] Stress + Chrysin 20mg/kg {C20}. The CUMS regimen was based on the procedures described by other researchers, with minor modifications (Grippe et al., 2008; Peng et al., 2012; Zhang et al., 2012). The mice were housed in separate cages. Briefly, CUMS-exposed mice were subjected to various stressors in a chronic and unpredictable way according to a random schedule for 28 days. The stressors were: damp bedding for 12 h; 45° cage tilting for 12 to 18h; continuous light during 24h; water and food deprivation for 12 to 18h; strong level shaking for 5 minutes; electric shock foot (2 min;

0,5mA, 3s duration, average 1 shock/min) in an electrified grid; 2min in the electrified grid, but without shock foot; 45°C oven for 5 minutes; physically restraint for 2h. Aleatory stressors were applied at random times in order to be completely unpredictable. All mice in the stress group were exposed to the same single stressor simultaneously in 1 day. None of stressful procedures was applied on two consecutive days. During the whole process of stress, each stressor was applied two to four times. On the 29th day, 24 hours after the end of CUMS, the animals were subjected to behavioral tests and after 24h were anesthetized and blood was collected by cardiac puncture and the mice were euthanized by decapitation and the hippocampus and prefrontal cortex were dissected (Fig. 2).

2.4 Behavioral assessment

2.4.1 Sucrose preference test (SPT)

Anhedonia was measured by preference for a sucrose solution over water, using a two-bottle free choice method (Grippe et al., 2007). Each animal was presented simultaneously to two bottles, one containing 1% sucrose solution (w/v), and the other containing tap water. Blunted sucrose intake, in this test, is proposed to reflect impaired sensitivity to reward and model anhedonia, a core symptom of major depression (Tiziana et al., 2008). Tap water and 1% sucrose solution were placed in premeasured bottles in the cages, and fluid intake was monitored for 24h. Before the start of the protocol the mice were exposed only to a 1% sucrose solution for 24h aiming the adaptation to sucrose solution. Mice were private food and water for about 20h before each sucrose preference test. On day 0 (baseline) and on day 28 of the experiment the animals were exposed to the SPT. Sucrose preference was evaluated via the sucrose uptake rate, namely, the ratio of volume of sucrose consumption to the volume

of sucrose consumption plus tap water consumption (sucrose preference = sucrose consumption/(sucrose consumption + water consumption) \times 100%).

2.4.2 Open-field test (OFT)

On the subsequent day after the last sucrose preference test, the locomotor activity of mice was tested by a digital actophotometer. Each mouse was placed in the center of the actophotometer apparatus, and the locomotor activity was assessed on day 29, 24h after the end of the CUMS protocol. Total distance traveled (mm) was evaluated in the 5-min test period to evaluate locomotor activity (Prut and Belzung, 2003).

2.4.3 Forced swimming test (FST)

FST was performed as described previously. In summary, each mouse was placed individually in a transparent cylindrical polypropylene tank (45 cm height \times 35 cm diameter) containing 40 cm of water at $25 \pm 1^\circ\text{C}$, without the possibility of escaping, and were forced to swim. The total amount of time each animal remained immobile during a 6-min session was recorded (in seconds) as immobility time. This immobile posture reflects a state of behavioral despair or helplessness (Porsolt et al., 1977).

2.5 Plasma and tissue preparation

24h after the FST, blood was collected by cardiac puncture into tubes containing heparin (1 UI/ μl). Plasma was obtained by centrifuging of the blood at $2,400 \times g$ for 10 minutes.

After the blood collection, mice were euthanized for decapitation and hippocampus and prefrontal cortex were dissected and homogenized (1:10) in Tris-HCl 50mM, pH 7.5. The homogenate was centrifuged at 2,400 x g for 5 min and supernatant fraction (S1) was used for the analysis of biochemical and neurotropic parameters.

2.6 Biochemical Determinations

2.6.1 Non-protein thiols (NPSH) content

Reduced glutathione (GSH) levels in the hippocampus and prefrontal cortex were measured as non-protein thiols (NPSH), based on the protocol developed by Ellman (1959). In this protocol, 500 μ L of S1 was precipitated with 500 μ L of 10% trichloroacetic acid. The samples were centrifuged at 2,400 x g for 10 min. An aliquot (100 μ L) of supernatant was added in a system containing 1M potassium phosphate buffer (850 μ L), pH 7.4, and 10mM 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) (50 μ L), in a final volume of 1mL. The color reaction was measured at 412nm. NPSH levels were expressed as nmol GSH/g tissue.

2.6.2 Reactive species (RS) levels

To determine RS levels in the hippocampus and prefrontal cortex, 40 μ L of S1 were diluted (1:50) in 10mM Tris-HCl (pH 7.4) and incubated with 10 μ L of 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCHF-DA; 1mM), at 37°C for 30 minutes. The RS levels were determined by a spectrofluorimetric method described by Loetchutinat et al. (2005). In summary, DCHF-DA is enzymatically hydrolyzed by intracellular esterases to form nonfluorescent, which is then rapidly oxidized to form highly fluorescent 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) in the presence of RS. The DCF fluorescence intensity emission

was recorded at 520nm (with 480nm excitation) 30 minutes after the addition of DCHF-DA. The RS levels were expressed as arbitrary unit (AU).

2.6.3 Glutathione reductase (GR) activity

GR activity in the hippocampus and prefrontal cortex was determined based on the protocol developed by Carlberg and Mannervik (1985). In this protocol, GSSG is reduced by GR at the expense of NADPH consumption, which was followed at 340nm. GR activity is proportional to NADPH decay. An aliquot of S1 was added in the system containing 0.15M potassium phosphate buffer (pH 7.0), 1.5mM EDTA, and 0.15Mm NADPH. After the basal reading, the substrate (GSSG 20mM) was added. The GR activity was expressed as nmol NADPH/min/mg protein.

2.6.4 Glutathione peroxidase (GPx) activity

GPx activity in the hippocampus and prefrontal cortex was determined based on the protocol developed by Wendel (1981), by indirectly measuring the consumption of NADPH at 340 nm. The GPx uses GSH to reduce the tert-butyl hydroperoxide, producing GSSG, which is readily reduced to GSH by GR using NADPH as a reducing equivalent donor. The enzymatic activity of GPx was expressed as nmolNADPH/min/mg protein.

2.6.5 Glutathione S-transferase (GST) activity

GST activity, an important phase II enzyme with antioxidant function, was assayed in the hippocampus and prefrontal cortex of mice through the conjugation of GSH with CDNB as described by Habig and Jakoby (1981). An aliquot of 50 μ L of S1 was added in a

medium containing 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.4), with 10 μ L of 100mMCDNB, as substrate, and 10 μ L of 100mMGSH, in a final volume of 1mL. Changes in absorbance were recorded at 340 nm in a spectrophotometer for 120 seconds. The enzymatic activity of GST was expressed as nmol CDNB conjugated/min/mg protein.

2.6.6 Catalase (CAT) activity

CAT activity in hippocampus and prefrontal cortex of mice was assayed spectrophotometrically by the method proposed by Aebi (1984), which involves monitoring the disappearance of 0.3M hydrogen peroxide in the presence of 50mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) and S1. Changes in absorbance were recorded at 240 nm in a thermostated (37°C) spectrophotometer for 120 seconds. CAT specific activity was expressed as first-order rate constant k, per mg of protein. Appropriate controls for non-enzymatic decomposition of hydrogen peroxide were included in the assays. The CAT activity was expressed as Units/mg of protein.

2.6.7 Corticosterone levels

Plasma levels of corticosterone were determined using commercially available enzyme immunoassay Kit (Chemicon International, Temecula, CA), according to the manufacturer instructions. Corticosterone plasma levels were expressed as ng/ml.

2.6.8 Na⁺,K⁺-ATPase activity

Na⁺,K⁺-ATPase activity in the hippocampus and prefrontal cortex was measured according by Wyse et al. (2000), with modifications. Briefly, the assay medium consisted of

50mM Tris-HCl buffer, pH 7.4; 125mM NaCl, 20mM KCl, 3mM MgCl₂ and 50µl of S1 in the presence or absence of ouabain (0,1mM), in a final volume of 450µL. The reaction was started by the addition of adenosine triphosphate (ATP) to a final concentration of 30mM. After 30 min at 37°C, the reaction was stopped by the addition of 250µL of 10% (w/v) trichloroacetic acid. Resulting solution was centrifugated at 2,400 x g for 5 min. An aliquot (500µL) of supernatant was removed and used for the quantification of inorganic phosphate (Pi). Appropriate controls were included in the assays for non-enzymatic hydrolysis of ATP. The amount of Pi released was quantified by the colorimetric method described by Fiske and Subbarow (1925). Specific Na⁺,K⁺ -ATPase activity was calculated by subtracting the ouabain-insensitive activity from the overall activity (in the absence of ouabain) and expressed in nmol Pi/mg protein/min.

2.6.9 Aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) activities and urea levels

Aiming to evaluate a possible hepatic or renal toxicity of chronic treatment with chrysin, we evaluated AST and ALT activities and urea levels in plasma of mice exposed to high dose of chrysin (20 mg/kg). AST, ALT and urea were assayed spectrophotometrically using commercial kits (LABTEST, Diagnostica S.A., Minas Gerais, Brazil), according to the manufacturer instructions. AST and ALT activities were expressed as unit/L (U/L). Urea levels were expressed as mg/dl.

2.6.10 Protein quantification

Protein concentration in hippocampus and prefrontal cortex was measured by the method of Bradford (1976), using bovine serum albumin as the standard.

2.7 Neurotropic factors determinations

2.7.1 Brain-derived neurotropic factor (BDNF) and Nerve growth factor (NGF) levels

Protein levels of BDNF and NGF were measured using a commercially available sandwich enzyme-linked immune sorbent assay (ELISA) kit (Chemicon International, Temecula, CA) according to the manufacturer's instructions. The BDNF and NGF levels were evaluated in S1 of hippocampus and prefrontal cortex. The BDNF and NGF levels were expressed as ng/g and pg/mg wet weight of tissue, respectively.

2.8 Statistical analysis

The data were expressed as mean \pm S.D.M. and were analyzed by two-way ANOVA followed by the Newman–Keuls test when appropriate. Results of statistical tests with $p < 0.05$ were considered significant.

3Results

3.1 SPT

No significant interactions were observed in SPT one day before the beginning of CUMS protocol (Fig. 3A).

In the test realized on the 28th day, Two-way ANOVA indicated significant interactions (stress X fluoxetine) [F (2,44) = 10.57, $p < 0.001$] (stress X chrysin) [F (2,44) = 16.37, $p < 0.001$] on sucrose preference. Results revealed that after the CUMS exposition the animals presented a significant decrease on sucrose preference when compared to control group (No stress + vehicle) ($p < 0.001$). The administration of chrysin (5 or 20 mg/kg) or fluoxetine prevented the reduction in SPT when compared to stress group (stress + vehicle) (Fig. 3B).

3.2 OFT

No significant interactions were observed in the OFT (Fig. 4).

3.3 FST

Two-way ANOVA showed significant interactions (stress X fluoxetine) [F (2,44) = 4.92, $p < 0.05$] (stress X chrysin) [F (2,44) = 9.33, $p < 0.001$] in the immobility time in the FST. Results demonstrated that the treatment with chrysin (5 or 20 mg/kg) or fluoxetine (10mg/kg) occasioned a decrease in immobility time when compared to control group (No stress + vehicle). Results indicated that after the CUMS exposition the animals displayed a

significant increase in the immobility time when compared to control animals (No stress + vehicle). The administration of chrysin (5 or 20 mg/kg) or fluoxetine (10 mg/kg) prevented the increase in the immobility time compared to stress group (Stress + vehicle). Furthermore, chrysin (5 or 20 mg/kg) or fluoxetine (10 mg/kg) administration reduced the immobility time in mice exposed to CUMS when compared to control group (No stress + vehicle) (Fig. 5).

3.4 NPSH content

Two-way ANOVA revealed significant interactions (stress X fluoxetine) [$F(2,44) = 6.47, p < 0.02$] (stress X chrysin) [$F(2,44) = 5.39, p < 0.03$] in NPSH levels in the hippocampus of mice. Results showed that animals exposed to CUMS presented a significant decrease in NPSH content when compared to control group (No stress + vehicle) [$p < 0.05$]. Treatment with chrysin (5 or 20 mg/kg) or fluoxetine (10 mg/kg) prevented the reduction in NPSH levels when compared to stress group (Stress + vehicle) (Table 1).

Two-way ANOVA showed significant interactions (stress X fluoxetine) [$F(2,44) = 8.75, p < 0.01$] (stress X chrysin) [$F(2,44) = 6.51, p < 0.02$] in NPSH levels in the prefrontal cortex of mice. Results showed that after the CUMS exposition the animals presented a significant decrease in NPSH levels when compared to control group (No stress + vehicle) [$p < 0.05$]. The administration of chrysin (5 or 20 mg/kg) or fluoxetine (10 mg/kg) prevented the reduction in NPSH content when compared to stress group (Stress + vehicle) (Table 2).

3.5 RS levels

Two-way ANOVA demonstrated significant interactions (stress X fluoxetine) [$F(2,44) = 8.90, p < 0.001$] (stress X chrysin) [$F(2,44) = 5.93, p < 0.009$] in RS levels in the

hippocampus of mice. Results indicated that animals exposed to CUMS presented a significant increase in RS content when compared to control group (No stress + vehicle) [$p < 0.05$]. Administration of chrysin (20 mg/kg) or fluoxetine (10 mg/kg) prevented the increase in RS levels when compared to stress group (Stress + vehicle) (Table 1).

Two-way ANOVA revealed significant interactions (stress X fluoxetine) [$F(2,44) = 15.31, p < 0.001$] (stress X chrysin) [$F(2,44) = 8.60, p < 0.001$] in RS levels in the prefrontal cortex of mice. Results showed that after the CUMS exposition the animals presented a significant increase in RS content when compared to control group (No stress + vehicle) [$p < 0.001$]. The administration of chrysin (5 or 20 mg/kg) or fluoxetine (10 mg/kg) protected against the increase in RS levels when compared to stress group (Stress + vehicle) (Table 2).

3.6 GR activity

Two-way ANOVA revealed significant interactions (stress X fluoxetine) [$F(2,44) = 22.26, p < 0.001$] (stress X chrysin) [$F(2,44) = 5.04, p < 0.04$] in the GR activity in the hippocampus of mice. Results showed that animals exposed to CUMS presented a significant increase in the GR activity when compared to control group (No stress + vehicle) [$p < 0.001$]. Administration of chrysin (5 or 20 mg/kg) or fluoxetine (10 mg/kg) prevented the elevation in the GR activity when compared to stress group (Stress + vehicle) (Table 1).

Two-way ANOVA showed significant interactions (stress X fluoxetine) [$F(2,44) = 6.76, p < 0.02$] (stress X chrysin) [$F(2,44) = 7.08, p < 0.01$] in the GR activity in the prefrontal cortex of mice. Results showed that after the CUMS exposition the animals presented a significant increase in the GR activity when compared to control group (No stress + vehicle) [$p < 0.001$]. Administration of chrysin (5 or 20 mg/kg) or fluoxetine (10 mg/kg)

prevented the elevation in the GR activity when compared to stress group (Stress + vehicle) (Table 2).

3.7 GPx activity

Two-way ANOVA demonstrated significant interactions (stress X fluoxetine) [$F(2,44) = 8.40, p < 0.01$] (stress X chrysin) [$F(2,44) = 3.51, p < 0.04$] in the GPx activity in the hippocampus of mice. The results showed that after the CUMS exposition the animals presented a significant increase in the GPx activity when compared to control group (No stress + vehicle) [$p < 0.01$]. Treatment with chrysin (5 or 20 mg/kg) or fluoxetine (10 mg/kg) protected against the elevation in the GPx activity when compared to stress group (Stress + vehicle) (Table 1).

Two-way ANOVA showed significant interactions (stress X fluoxetine) [$F(2,44) = 10.81, p < 0.005$] (stress X chrysin) [$F(2,44) = 7.35, p < 0.01$] in the GPx activity in the prefrontal cortex of mice. Results showed that after the CUMS exposition the animals presented a significant increase in the GPx activity when compared to control group (No stress + vehicle) [$p < 0.001$]. Administration of chrysin (5 or 20 mg/kg) or fluoxetine (10mg/kg) prevented the elevation in the GPx activity when compared to stress group (Stress + vehicle) (Table 2).

3.8 GST activity

No significant interactions were observed in the GST activity in the hippocampus (Table 1) and in the prefrontal cortex (Table 2) of mice.

3.9 CAT activity

Two-way ANOVA showed significant interactions (stress X fluoxetine) [$F(2,44) = 8.15, p < 0.01$] (stress X chrysin) [$F(2,44) = 7.59, p < 0.003$] in the CAT activity in the hippocampus of mice. The results indicated that after the CUMS exposition the animals presented a significant increase in CAT activity when compared to control group (No stress + vehicle) [$p < 0.05$]. The administration of chrysin (5 or 20 mg/kg) or fluoxetine (10 mg/kg) prevented the elevation in the CAT activity when compared to stress group (Stress + vehicle) (Table 1).

Two-way ANOVA showed significant interactions (stress X fluoxetine) [$F(2,44) = 2.73, p < 0.12$] (stress X chrysin) [$F(2,44) = 2.77, p < 0.12$] in the CAT activity in the prefrontal cortex of mice. The results demonstrated that animals subjected to CUMS presented a significant increase in CAT activity when compared to control group (No stress + vehicle) [$p < 0.001$]. The administration of chrysin (5 or 20 mg/kg) or fluoxetine (10 mg/kg) prevented the elevation in the CAT activity when compared to stress group (Stress + vehicle) (Table 2).

3.10 Corticosterone levels

Two-way ANOVA showed significant interactions (stress X fluoxetine) [$F(2,44) = 7.64, p < 0.01$] (stress X chrysin) [$F(2,44) = 9.64, p < 0.001$] in corticosterone levels. Results showed that animals subjected to CUMS presented a significant increase in corticosterone levels when compared to control group (No stress + vehicle) [$p < 0.001$]. Administration of chrysin (5 or 20 mg/kg) or fluoxetine (10 mg/kg) prevented the elevation in corticosterone levels when compared to stress group (Stress + vehicle) (Fig. 6).

3.11 Na⁺,K⁺-ATPase activity

Two-way ANOVA revealed significant interactions (stress X fluoxetine) [F (2,44) = 3.88, $p < 0.07$] (stress X chrysin) [F (2,44) = 1.59, $p < 0.22$] in the Na⁺,K⁺-ATPase activity in the hippocampus of mice. Results showed that after the CUMS exposition the animals presented a significant inhibition in Na⁺,K⁺-ATPase activity when compared to control group (No stress + vehicle) [$p < 0.05$]. The administration of chrysin (5 or 20 mg/kg) or fluoxetine (10 mg/kg) prevented the inhibition in Na⁺,K⁺-ATPase activity when compared to stress group (Stress + vehicle) (Fig. 7A).

Two-way ANOVA showed significant interactions (stress X fluoxetine) [F (2,44) = 8.34, $p < 0.01$] (stress X chrysin) [F (2,44) = 3.92, $p < 0.03$] in Na⁺,K⁺-ATPase activity in the prefrontal cortex of mice. Results showed that animals exposed to CUMS presented a significant inhibition in Na⁺,K⁺-ATPase activity when compared to control group (No stress + vehicle) [$p < 0.05$]. The treatment with chrysin (5 or 20mg/kg) prevented the inhibition in Na⁺,K⁺-ATPase activity when compared to stress group (Stress + vehicle) (Fig. 7B).

3.12 AST and ALT activities and urea levels

No significant interactions were observed in the AST and ALT activities and urea levels (Table 3).

3.13 BDNF levels

Two-way ANOVA revealed significant interactions (stress X fluoxetine) [$F(2,44) = 10.28, p < 0.007$] (stress X chrysin) [$F(2,44) = 20.03, p < 0.001$] in BDNF levels in the hippocampus of mice. Results demonstrated that chrysin administration (20 mg/kg) or fluoxetine (10 mg/kg) occasioned an elevation in BDNF levels when compared to control group (No stress + vehicle). Results showed that after the CUMS exposition the animals displayed a significant decrease in BDNF levels when compared to control group (No stress + vehicle) [$p < 0.01$]. Administration of chrysin (5 or 20 mg/kg) or fluoxetine (10 mg/kg) prevented the decrease in BDNF levels compared to stress group (Stress + vehicle). Moreover, chrysin (20 mg/kg) administration elevated the BDNF contents in mice exposed to CUMS when compared to control group (No stress + vehicle) (Fig. 8A).

Two-way ANOVA revealed significant interactions (stress X fluoxetine) [$F(2,44) = 4.79, p < 0.05$] (stress X chrysin) [$F(2,44) = 14.64, p < 0.001$] in BDNF levels in the prefrontal cortex of mice. Results demonstrated that chrysin administration (20 mg/kg) or fluoxetine (10 mg/kg) occasioned an elevation in BDNF levels when compared to control group (No stress + vehicle). Results showed that animals subjected to CUMS displayed a significant decrease in BDNF levels when compared to control group (No stress + vehicle) [$p < 0.05$]. Administration of chrysin (5 or 20 mg/kg) or fluoxetine (10 mg/kg) prevented the decrease in BDNF levels compared to stress group (Stress + vehicle). In addition, chrysin (20 mg/kg) administration elevated the BDNF contents in mice exposed to CUMS when compared to control group (No stress + vehicle) (Fig. 8B).

3.14 NGF levels

Two-way ANOVA revealed significant interactions (stress X fluoxetine) [$F(2,44) = 16.80, p < 0.001$] (stress X chrysin) [$F(2,44) = 7.45, p < 0.01$] in the NGF levels in the hippocampus of mice. Results demonstrate that chrysin administration (20 mg/kg) or fluoxetine (10 mg/kg) occasioned an elevation in NGF levels when compared to control group (No stress + vehicle). The results showed that after the CUMS exposition the animals displayed a significant decrease in NGF levels when compared to control group (No stress + vehicle) [$p < 0.01$]. The treatment with chrysin (5 or 20 mg/kg) or fluoxetine (10 mg/kg) prevented the decrease in NGF levels compared to stress group (Stress + vehicle). Furthermore, chrysin (20 mg/kg) or fluoxetine (10 mg/kg) administration elevated the NGF contents in mice exposed to CUMS when compared to control group (No stress + vehicle) (Fig.9A).

Two-way ANOVA revealed significant interactions (stress X fluoxetine) [$F(2,44) = 6.74, p < 0.02$] (stress X chrysin) [$F(2,44) = 12.49, p < 0.002$] in NGF levels in the prefrontal cortex of mice. Results demonstrate that chrysin administration (20 mg/kg) or fluoxetine (10 mg/kg) occasioned an elevation in NGF levels when compared to control group (No stress + vehicle). Results showed that animals exposed to CUMS displayed a significant decrease in NGF levels when compared to control group (No stress + vehicle) [$p < 0.01$]. Administration of chrysin (5 or 20 mg/kg) or fluoxetine (10 mg/kg) prevented the decrease in NGF levels compared to stress group (Stress + vehicle). Moreover, chrysin (20 mg/kg) or fluoxetine (10 mg/kg) administration elevated the NGF contents in mice exposed to CUMS when compared to control group (No stress + vehicle) (Fig.9B).

4 Discussion

In the present study, we observed the effect of CUMS in NGF levels and Na^+, K^+ -ATPase in the hippocampus and prefrontal cortex of female mice. Moreover, the effect of chrysin in mice exposed to CUMS was examined. Results showed that CUMS decrease NGF levels and Na^+, K^+ -ATPase activity in mice. Results also demonstrate that 28 days of CUMS induced a depressive state, which was characterized by decreased sucrose preference and increased immobility time in FST. These indices of depression were accompanied by elevation in ROS levels and in GR, GPx and CAT activities; by decreased BDNF and NPSH levels in the hippocampus and prefrontal cortex of mice; and by hyperactivity of the HPA axis (increased corticosterone levels). Chrysin treatment significantly ameliorated all these alterations associated with CUMS-induced depression. Furthermore, chrysin treatment presented antidepressant effect in non stressed mice in FST. Chrysin treatment also promoted the elevation in BDNF and NGF levels in the hippocampus and prefrontal cortex of non-stressed and stressed mice when compared to control group. Such results were similar to that obtained with treatment of the established antidepressant, fluoxetine. The used doses of chrysin did not present any toxicity in hepatic and renal parameters. Thus, in non toxic doses, chrysin presented antidepressant effect in behavioural parameters in stressed and non-stressed mice. Accompanying the behavioral effect, was observed the effect in the regulation of antioxidant system, of corticosterone levels, of Na^+, K^+ -ATPase activity, and in the up-regulation of BDNF and NGF levels.

SPT is regarded as useful and valid behavioral marker of chronic stress in an animal paradigm. Sucrose preference is regarded as an indicator of a key symptom of depression, i.e., anhedonia, indicating loss of interest or pleasure (Kumar et al., 2011). FST is used in the study of antidepressant candidates (Borges Filho et al., 2013), and the reduction in

immobility time is considered indicative of antidepressant activity (Mao et al., 2014). Numerous studies have reported that rodents (mice and rats) exposed to stress exhibit depressive like-behavior, evidenced by increase in immobility time, particularly in the FST, and by reduction on sucrose preference in SPT (Souza et al., 2013; Liu et al., 2014b; Mao et al., 2014). These behavioral alterations in mice are comparable to the depressed mood in humans. Corroborating with these studies, our results indicate that CUMS induced an increase of immobility time in the FST and a decrease on preference sucrose in SPT in the 28th day in mice. We observed a protective effect of chrysin (5 or 20 mg/kg) against these changes, as well as the preventive effect of fluoxetine. Confirming the antidepressant effect of chrysin, chrysin (5 or 20 mg/kg) or fluoxetine (10 mg/kg) treatment reduced the immobility time in FST in non-stressed mice when compared to control group. Additionally, the fact that no significant difference in OFT was observed among any of the experimental groups indicates that behavioral changes in the FST are not related to psychomotor-stimulant action.

Oxidative stress in mouse brain structures may play a role in the pathogenesis of depression (Eren et al. 2007a; Kumar et al., 2011). In this study, an increase in ROS levels and a decrease in NPSH levels (corresponding to more than 90% of reduced glutathione (GSH) in the animal organism) in the hippocampus and prefrontal cortex of mice exposed to CUMS were observed. The alteration in the levels of these substances is indicative of oxidative stress induced by CUMS. Oxidative damages to macromolecules such as lipid, protein and nucleic acids by excessive ROS levels (Zhao et al., 2008) leads to neuronal dysfunction, which is associated with the development of depression disorders (Atmaca et al., 2004; Ng et al., 2008). GSH, an intracellular non-enzymatic thiol antioxidant system, is widely involved in the occurrence of depression, mainly by regulation of ROS levels. The finding of this investigation is in line with others, showing that stressed mice have lower brain GSH levels, indicating an alteration in antioxidant brain defenses in CUMS model of depression (Eren et

al., 2007a; Eren et al., 2007b). Confirming the role of GSH in the occurrence of depression, Rosa et al. (2013) demonstrate the antidepressant effect of GSH in mice. The enzymatic antioxidant system also plays a key role in the depressive disorders (Kumar et al., 2011; Rosa et al., 2013; Freitas et al., 2014). As a mechanism of response to changes in the RS and GSH levels, we observed an increase in the GR, GPx and CAT activities in the hippocampus and prefrontal cortex of mice. Similarly, Freitas et al. (2014) demonstrate an increased in GR and GPx activity in the hippocampus of stressed mice. Depressive patients presents higher levels of plasma GR and erythrocyte GPx (Bilici et al., 2001), and increased in GPx activity was found in depressive women (Kodytková et al., 2009). Furthermore, Cline et al. (2014) showed the elevation in the CAT activity in the prefrontal cortex of mice exposed to acute stress. The administration of chrysin (5 or 20 mg/kg) or fluoxetine protected against all these modifications, showing the antioxidant activity of chrysin and the involvement of this function in the antidepressant effect of chrysin in mice exposed to CUMS.

Hyperactivity of HPA axis is one of the key biological abnormalities associated with major depressive disorder (Holsboer et al., 2006; Tanti et al., 2010). The HPA dysregulation occasioned by stress is characterized by elevated levels of circulating glucocorticoids and impaired glucocorticoid receptor-mediated negative feedback on the function of HPA axis (Watson et al., 2007). Corroborating this data, the plasma corticosterone levels were increased in mice subjected to CUMS compared to the control group. Furthermore, the results exposed showed that the groups treated with chrysin (5 or 20 mg/kg) or fluoxetine (10 mg/kg) presented normal levels of corticosterone, which points that the antidepressant effect of chrysin is associated with the regulation of the HPA axis in stressed mice. Confirming the involvement of HPA with the depression, studies showed that prolonged exposure to glucocorticoids produces neurotoxic effects in several brain regions related to depression, such as hippocampus and prefrontal cortex (Anacker et al.,

2011, Liu et al., 2014b). Moreover, Kumamaru et al. (2008) suggested that BDNF-mediated synaptic maturation is disturbed after neurons are exposed to high-level glucocorticoid in their development stage.

Postmortem analyses have revealed lower levels of BDNF in patients with major depression, while BDNF infusion into the brain has been found to produce antidepressant-like action (Mao et al., 2014). Antidepressant treatment seems to be able to normalize BDNF levels (Mao et al., 2014). Increases in cerebral and serum BDNF levels with antidepressant treatment have been reported in multiple human and preclinical studies, but the mechanistic and therapeutic significance of this is uncertain (Wolkowitz et al., 2011). Confirming these data, the treatment with chrysin (20 mg/kg) and fluoxetine (10 mg/kg) occasioned an elevation in BDNF content in the hippocampus and prefrontal cortex when compared to control group. Furthermore, we observed a reduction in BDNF levels in mice subjected to CUMS compared to control group. Recent clinical studies of depression have paid special attention to the hippocampus and frontal cortex, which are brain regions structurally and functionally affected by stress responses and critically involved in the regulation of mood and learning/memory function (Mao et al., 2014). A causal relationship has been found between the incidence of major depressive disorders and neuronal atrophy/destruction in the hippocampus and frontal cortex. BDNF, which modulates neuronal plasticity, inhibits cell death cascades and increases the cell survival proteins that are responsible for the proliferation and maintenance of central nervous system neurons; hence, it may be an important factor in the development and treatment of depression. In experimental studies, it has been found that a decrease in BDNF expression in the hippocampus and frontal cortex among animals exposed to chronic stress can be reversed by antidepressant treatment (Mao et al., 2014). Similarly, reduction in NGF levels has been reported in several animal models of depression (Song et al., 2009). Up-regulation of NGF occurs in response to chronic

but not acute antidepressant treatment, consistent with the time course for the therapeutic action of antidepressants (Shi et al., 2010). Chronic stress, chronic HPA axis hyperactivity and hypercortisolism in pathological conditions such as depression seem to be associated with the atrophy in the hippocampus and prefrontal cortex. This atrophy results in a long term down regulation in NGF synthesis and levels (Aisa et al., 2009). The lower NGF levels set point could reflect in neuronal stress-adaptation deficit in depressed patients (Martino et al., 2013). The treatment with chrysin (20 mg/kg) or fluoxetine (10 mg/kg) occasioned an elevation in NGF levels in the hippocampus and prefrontal cortex in non-stressed and stressed mice when compared to control animals. Moreover, we observed a diminution in NGF levels in the hippocampus and prefrontal cortex of mice exposed to CUMS. There are few reports associating NGF levels with models of depression induced by CUMS. However, Manni et al. (2007) demonstrated a change in NGF levels in hypothalamus and thalamus of mice subjected to stress by immobilization for 1h every day for 10 days. Scaccianoce et al. (2000) observed the effect of different models of non-unpredictable stress in the NGF levels in hippocampus and basal forebrain of rats. In addition, Shi et al. (2010) related the antidepressant effect of intranasal administration of NGF in mice and rats. The chrysin (5 or 20 mg/kg) and fluoxetine administration prevents against the alterations verified in BDNF and NGF levels occasioned by CUMS. Chrysin (5 or 20 mg/kg) or fluoxetine (10mg/kg) also increased the BDNF and NGF levels in stressed mice when compared to control group. These results suggest the role of the up-regulation of BDNF and NGF levels in the antidepressant effect of chrysin in non-stressed and stressed mice.

In our study, the Na^+, K^+ -ATPase activity was significantly reduced in the hippocampus and prefrontal cortex of the stress group when compared to control group. The reduction in Na^+, K^+ -ATPase activity is a sign of a damaged cell membrane and is primarily caused by free radicals (Figtree et al., 2009; White et al., 2010). Thus, a possible

damage caused by increase of RS levels in hippocampus and prefrontal cortex may be related to the diminution of Na^+, K^+ -ATPase activity in these structures. In addition, depression, particularly stress-associated cases, may result from the atrophy of pyramidal neurons in the hippocampus (Gamaro et al., 2003). This atrophy, with reduction in the number of synapses, may be involved in several repeated stress effects, including the inhibition of Na^+, K^+ -ATPase activity (Yamamoto and Quinton, 2007). The inhibition of Na^+, K^+ -ATPase activity in the cerebral cortex and hippocampus also occurs due to the direct influence of high concentrations of stress hormones (Balk et al., 2011). Due to the fact that Na^+, K^+ -ATPase is crucial for maintaining ionic gradients in neurons (Xiong and Stringer, 2000), it is accepted that a reduction in the activity of this enzyme may affect neural activity (Stangherlin et al., 2008). Considering that the maintenance of Na^+, K^+ -ATPase activity is essential for brain function and the inhibition of this enzyme is associated with excitotoxicity and neuronal damage, we suggest that the inhibition of Na^+, K^+ -ATPase activity in hippocampus and prefrontal cortex induced by CUMS can be associated with the development of depression in mice exposed to CUMS. There are few reports that relate brain Na^+, K^+ -ATPase activity with depression induced by CUMS. Meanwhile, Cui et al. (2014) observed a reduction in Na^+, K^+ -ATPase activity in muscle sample of rats exposed to CUMS. Acker et al. (2009) showed a decrease in Na^+, K^+ -ATPase activity in cerebral cortex of rats with depression induced by malathion. In addition, Balk et al. (2011) observed an inhibition in Na^+, K^+ -ATPase activity in the hippocampus, cerebral cortex and striatum of rats exposed to repeated restraint stress. The treatment with chrysin (5 or 20 mg/kg), equivalently to fluoxetine (10 mg/kg), protected against the inhibition in the Na^+, K^+ -ATPase activity, showing that this enzyme may be involved in the antidepressant effect of chrysin in mice exposed to CUMS.

5 Conclusion

In conclusion, we showed that 28 days of CUMS protocol decreased NGF levels and Na^+, K^+ -ATPase activity in the hippocampus and prefrontal cortex of female mice. Chronic treatment with chrysin presented antidepressant effect in non-stressed mice and in mice exposed to CUMS in non-toxic doses, equivalently to fluoxetine. Besides the protection against changes in the neurotrophins levels, Na^+, K^+ -ATPase activity and in behavior occasioned by CUMS, chrysin yet prevented the alterations in corticosterone levels and in the antioxidant system. Moreover, high dose of chrysin culminated in the up-regulation of BDNF and NGF levels. Thus, although more studies be required, we suggest that the up-regulation of BDNF and NGF levels in the hippocampus and prefrontal cortex of female mice can be associated with the antidepressant effect of chrysin.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest in the present work.

Acknowledgement

The financial support by CNPQ Research Grant #474397/2013-0. C.R.J. are recipients of CNPQ fellowships. L.D.F., A.T.R.G., M.G.G., L.C.S., F.D. and M.S.A. are recipients of FAPERGS, CAPES or UNIPAMPA fellowships.

6 References

Acker CI, Luchese C, Prigol M, Nogueira CW (2009) Antidepressant-like effect of diphenyldiselenide on rats exposed to malathion: Involvement of Na⁺K⁺ATPase activity. *Neurosci Lett* 455:168–72.

Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105:121–126.

Aisa B, Gil-Bea FJ, Marcos B, Tordera R, Lasheras B, Del Rio J, Ramirez MJ (2009) Neonatal stress affects vulnerability of cholinergic neurons and cognition in the rat: involvement of the HPA axis. *Psychoneuroendocrinology* 34:1495–505.

Anacker C, Zunszain PA, Carvalho LA, Pariante CM (2011) The glucocorticoid receptor: pivot of depression and of antidepressant treatment? *Psychoneuroendocrinology* 36:415–25.

Atmaca M, Tezca E, Kuloglu M, Ustundag B, Tunckol H (2004) Antioxidant enzyme and malondialdehyde values in social phobia before and after citalopram treatment. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 254:231–5.

Balk RS, Silva MH, Bridi C, Carvalho NR, Portella RL, Dobrachinski F, Amaral GP, Barcelos R, Dias GRM, Rocha JBT, Barbosa NBV, Soares FAZ (2011) Effect of repeated restraint stress and clomipramine on Na⁺/K⁺-ATPase activity and behavior in rats. *Int J Dev Neurosci* 29:909–16.

Barbaric M, Miskovic K, Bojic M, Loncar MB, Smolic-Bubalo A, Debeljak Z, Medic-Saric M (2011) Chemical composition of the ethanolic propolis extracts and its effect on HeLa cells. *J Ethnopharmacol* 135:772–8.

Bhattacharya SK, Muruganandam AV (2003) Adaptogenic activity of *Withania somnifera*: an experimental study using a rat model of chronic stress. *Pharmacol Biochem Behav* 75:547–55.

Bilici M, Efe H, Koroglu MA, Uydu HA, Bekaroglu M, Deger O (2001) Antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in major depression: alterations by antidepressant treatments. *J Affect Disord* 64:43–51.

Borges Filho C, Del Fabbro L, De Gomes MG, Goes ATR, Souza LC, Boeira SP, Jesse CR (2013) Kappa-opioid receptors mediate the antidepressant-like activity of hesperidin in the mouse forced swimming test. *Eur J Pharmacol* 698:286–91.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 72:248–54.

Carlberg I, Mannervik B (1985) Glutathione reductase. *Methods Enzymol* 113:484–90.

Cho H, Yun CW, Park WK, Kong JY, Kim KS, Park Y, Lee S, Kim BK (2004) Modulation of the activity of pro-inflammatory enzymes, COX-2 and iNOS, by chrysin derivatives. *Pharmacol Res* 49:37–43.

Cline BH, Anthony DC, Lysko A, Dolgov O, Anokhin A, Schroeter C, Malin D, Kubatiev A, Steinbusch HW, Lesch KP, Strekalova T (2014) Lasting down regulation of the lipid

peroxidation enzymes in the prefrontal cortex of mice susceptible to stress-induced anhedonia. *Behav Brain Res* doi: 10.1016/j.bbr.2014.04.037.

Cui M, Li Q, Zhang M, Zhao Y, Huang F, Chen Y (2014) Long-term curcumin treatment antagonizes masseter muscle alterations induced by chronic unpredictable mild stress in rats. *Arch Oral Biol* 59:258–67.

Dhawan K, Kumar S, Sharma A (2002) Beneficial effects of chrysin and benzoflavone on virility in 2-year-old male rats. *J Med Food* 5:43–8.

Duman RS, Monteggia LM (2006) The neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biol Psychiatry* 59:1116–27.

Duman RS, Voleti B (2012) Signaling pathways underlying the pathophysiology and treatment of depression: novel mechanisms for rapid-acting agents. *Trends Neurosci* 35: 47–56.

Ellman GL (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 82:70–7.

Eren I, Naziroglu M, Demirdas A, Celik O, Uguz AC, Altunbasak A, Ozmen Uz E (2007a) Venlafaxine modulates depression-induced oxidative stress in brain and medulla of rat. *Neurochem Res* 32:497–505.

Eren I, Naziroglu M, Demirdas A (2007b) Protective effects of lamotrigine, aripiprazole and escitalopram on depression-induced oxidative stress in rat brain. *Neurochem Res* 32:1188–95.

Figtree GA, Liu CC, Bibert S, Hamilton EJ, Garcia A, White CN, Chia KK, Cornelius F, Geering K, Rasmussen HH (2009) Reversible oxidative modification: a key mechanism of Na^+ - K^+ pump regulation. *Circ Res* 105:185–93.

Fiske CH, Subbarow Y (1925) The colorimetric determination of phosphorus. *J Biol Chem* 66:375–400.

Freitas AE, Bettio LEB, Neis VB, Santos DB, Ribeiro CM, Rosa PB, Farina M, Rodrigues ALS (2014) Agmatine abolishes restraint stress-induced depressive-like behavior and hippocampal antioxidant imbalance in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 50:143–50.

Gamaro GD, Streck EL, Matté C, Prediger ME, Wyse AT, Dalmaz C (2003) Reduction of Hippocampal Na^+ , K^+ ATPase Activity in Rats Subjected to an Experimental Model of Depression. *Neurochem Res* 28:1339–44.

Grippe AJ, Cushing BS, Carter CS (2007) Depression-like behavior and stressor-induced neuroendocrine activation in female prairie voles exposed to chronic social isolation. *Psychosom Med* 69:149–57.

Grippe AJ, Moffitt JA, Johnson AK (2008) Evaluation of baroreceptor reflex function in the chronic mild stress rodent model of depression. *Psychosom Med* 70:435–43.

Grisar T, Guillaume D, Delgado-Escueta AV (1992) Contribution of Na^+ , K^+ -ATPase to focal epilepsy: a brief review. *Epilepsy Res* 12:141–9.

Habig WH, Jakoby WB (1981) GlutathioneS-transferases (rat andhuman). *Methods Enzymol* 77:218–31.

Holsboer F, Barden N (1996) Antidepressants and hypothalamic–pituitary–adrenocortical regulation. *Endocr Rev* 17:187–205.

Kodydková J, Vávrová L, Zeman M, Jiráček R, Macásek J, Stanková B, Tvrzická E, Zák A (2009) Antioxidative enzymes and increased oxidative stress in depressive women. *Clin Biochem* 42:1368–74.

Kumamaru E, Numakawa T, Adachi N, Yagasaki Y, Izumi A, Niyaz M, Kudo M, Kunigi H (2008) Glucocorticoid prevents brain-derived neurotrophic factor mediated maturation of synaptic function in developing hippocampal neurons through reduction in activity of mitogen-activated protein kinase. *Mol Endocrinol* 22:546–58.

Kumar B, Kuhad A, Chopra K (2011) Neuropsychopharmacological effect of sesamol in unpredictable chronic mild stress model of depression: behavioral and biochemical evidences. *Psychopharmacology* 214:819–28.

Lapidot T, Walker MD, Kanner J (2002) Antioxidant and prooxidant effects of phenolics on pancreatic beta-cells in vitro. *J Agric Food Chem* 50:7220–5.

Liu D, Xie K, Yang X, Gu J, Ge L, Wang X, Wang Z (2014a) Resveratrol reverses the effects of chronic unpredictable mild stress on behavior, serum corticosterone levels and BDNF expression in rats. *Behav Brain Res* 264: 9–16.

Liu D, Zhang Q, Gu J, Wang X, Xie K, Xian X, Wang J, Jiang H, Wang Z (2014b) Resveratrol prevents impaired cognition induced by chronic unpredictable mild stress in rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 49:21–9.

Loetchutinat C, Kothan S, Dechsupa S, Meesungnoen J, Jay-Gerin J, Mankhetkorn S (2005) Spectrofluorometric determination of intracellular levels of reactive oxygen species in drug-sensitive and drug-resistant cancer cells using the 2',7'-dichlorofluorescein diacetate assay. *Radiat Phys Chem* 72:323–31.

Maes M, Galecki P, Chang YS, Berk M (2011) A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro)degenerative processes in that illness. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 35:676–92.

Mancuso C, Bates TE, Butterfield DA, Calafato S, Cornelius C, De Lorenzo A, Dinkova Kostova AT, Calabrese V (2007) Natural antioxidants in Alzheimer's disease. *Expert Opin Investig Drugs* 16:1921–31.

Manni L, Di Fausto V, Chaldakov GN, Aloe L (2007) Brain leptin and nerve growth factor are differently affected by stress in male and female mice: Possible neuroendocrine and cardio-metabolic implications. *Neurosci Lett* 426:39–44.

Mao QQ, Huang Z, Zhong X, Xian X, Ip S (2014) Brain-derived neurotrophic factor signalling mediates the antidepressant-like effect of piperine in chronically stressed mice. *Behav Brain Res* 26:140–5.

Mao QQ, Ip SP, Ko KM, Tsai SH, Che CT (2009) Peony glycosides produce antidepressant-like action in mice exposed to chronic unpredictable mild stress: effects on hypothalamic-pituitary-adrenal function and brain-derived neurotrophic factor. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 33:1211–6.

Martino M, Rocchi G, Escelsior A, Contini P, Colicchio S, Berardis D, Amore M, Fornaro P, Fornaro M (2013) NGF serum levels variations in major depressed patients receiving duloxetine. *Psychoneuroendocrinology* 38:1824–8.

Mazure CM, Maciejewski PK (2003) The interplay of stress, gender and cognitive style in depressive onset. *Arch Womens Ment Health* 6:5–8.

Mynett-Johnson L, Murphy V, McCormack J, Shields DC, Claffey E, Manley P, McKeon P (1998) Evidence for an allelic association between bipolar disorder and a Na, K adenosine triphosphatase alpha subunit gene (ATP1A3). *Biol Psych* 44:47–51.

Ng F, Berk M, Dean O, Bush AI (2008) Oxidative stress in psychiatric disorders: evidence base and therapeutic implications. *Int J Neuropsychopharmacol* 11:1851–76.

Oliveira MS, Furian AF, Rambo LM, Rinbeiro LR, Royes LFF, Ferreira F, Calixto JB, Otalora LFP, Garrido-Sanabria ER, Mello CF (2009) Prostaglandin E2 modulates Na⁺,K⁺-ATPase activity in rat hippocampus. Implication for neurological diseases. *J Neurochem* 109:416–26.

Peng Y, Liu Y, Liu L, Wang X, Jiang C, Wang Y (2012) Inducible nitric oxide synthase is involved in the modulation of depressive behaviors induced by unpredictable chronic mild stress. *J Neuroinflammation* 9:75–86.

Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M (1977) Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 266:730–2.

Prut L, Belzung C (2003) The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol* 463:3–33.

Rosa JM, Dafre AL, Rodrigues AL (2013) Antidepressant-like responses in the forced swimming test elicited by glutathione and redox modulation. *Behav Brain Res* 253:165–72.

Scaccianoce S, Lombardo K, Angelucci L (2000) Nerve growth factor brain concentration and stress: changes depend on type of stressor and age. *Int J Devl Neuroscience* 18:469–79.

Shi C, Wang L, Wu Y, Wang P, Gan Z, Lin K, Jiang L, Xu Z, Fan M (2010) Intranasal Administration of Nerve Growth Factor Produces Antidepressant-Like Effects in Animals. *Neurochem Res* 35:1302–14.

Song C, Zhang XY, Manku M (2009) Increased phospholipase A2 activity and inflammatory response but decreased nerve growth factor expression in the olfactory bulbectomized rat model of depression: effects of chronic ethyl-eicosapentaenoate treatment. *J Neurosci* 29:14–22.

Souza LC, Borges Filho C, Del Fabbro L, de Gomes MG, Goes ATR, Jesse CR (2013) Depressive-like behaviour induced by an intracerebroventricular injection of streptozotocin in mice: the protective effect of fluoxetine, antitumour necrosis factor- α and thalidomide therapies. *Behav Pharmacol* 24:79–86.

Stangherlin EC, Luchese C, Pinton S, Rocha JB, Nogueira CW (2008) Sub-chronical exposure to diphenyldiselenide enhances acquisition and retention of spatial memory in rats. *Brain Res* 1201:106–13.

Stevenson DE, Hurst RD (2007) Polyphenolic phytochemicals—just antioxidants or much more? *Cell Mol Life Sci* 64:2900–16.

Tanti A, Belzung C (2010) Open questions in current models of antidepressant action. *Br J Pharmacol* 159:1187–200.

Tiziana R, Daniela V, Natalia R, Cinzia G, Daniela B, Valeria C, Chiara C, Francesca C, Patrizia R, Sanzio C, Mariaelvina S, Daniela P (2008) Chronic Δ^9 -tetrahydrocannabinol during adolescence provokes sex-dependent changes in the emotional profile in adult rats: behavioral and biochemical correlates. *Neuropsychopharmacology* 33:2760–71.

Tõnissaar M, Mällo T, Eller M, Häidkind R, Kõiv K, Harro J (2008) Rat behavior after chronic variable stress and partial lesioning of 5-HT-ergic neurotransmission: effects of citalopram. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 32:164–77.

Vaidya VA, Duman RS (2001) Depression—emerging insights from neurobiology. *Br Med Bull* 57:61–79.

Watson S, Mackin P (2007) HPA axis function in mood disorders. *Psychiatry* 5:166–70.

Wendel A (1981) Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 177:325–33.

White CN, Liu CC, Garcia A, Hamilton EJ, Chia KK, Figtree GA, Rasmussen HH (2010) Activation of cAMP-dependent signaling induces oxidative modification of the cardiac Na⁺-K⁺ pump and inhibits its activity. *J Biol Chem* 285:13712–20.

Willner P (2005) Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural neurobiological concordance in the effects of CMS. *Neuropsychobiology* 52:90–110.

Wolkowitz OM, Wolf a J, Shelly W, Rosser R, Burke HM, Lerner GK, Reus VI, Nelson IC, Epel ES, Mellon SH (2011) Serum BDNF levels before treatment predict SSRI response in depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 35:1623–30.

Wyse AT, Streck EL, Barros SV, Brusque AM, Zugno AI, Wajner M (2000) Methylmalonate administration decreases Na⁺,K⁺-ATPase activity in cerebral cortex of rats. *Neuroreport* 11:2331–4.

Xiong ZQ, Stringer JL (2000) Sodium pump activity, not glial spatial buffering, clears potassium after epileptiform activity induced in the dentate gyrus. *J Neurophysiol* 83:1443–51.

Yamamoto BK, Quinton MS (2007) Neurotoxic effects of chronic restraint stress in the striatum of methamphetamine-exposed rats. *Psychopharmacology* 193:341–50.

Zarzecki MS, Araujo SM, Bortolotto VC, de Paula MT, Jesse CR, Prigol M (2014) Hypolipidemic action of chrysin on Triton WR-1339-induced hyperlipidemia in female C57BL/6 mice. *Toxicol Reports* 1:200–8.

Zhang WY, Liu S, Li HD, Cai HL (2012) Chronic unpredictable mild stress affects myocardial metabolic profiling of SD rats. *J Pharm Biomed Anal* 70:534–8.

Zhao C, Deng W, Gage H (2008) Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell* 132:645–60.

Zhou QG, Hu Y, Hua Y, Hu M, Luo CX, Han X, Zhu XJ, Wang B, Xu JS, Zhu DY (2007) Neuronal nitric oxide synthase contributes to chronic stress-induced depression by suppressing hippocampal neurogenesis. *J Neurochem* 103: 1843–54.

Zhu W, Shi H, Wei Y, Wang S, Sun CM, Ding Z, Lu L (2012) Green teapolyphenols produce antidepressant-like effects in adult mice. *Pharmacol Res* 65:74–80.

Legends

Figure 1: Chemical structure of chrysin.

Figure 2: Experimental design.

Figure 3: Effect of chrysin and fluoxetine administration on SPT in mice exposed to CUMS.

The test was realized one day before the beginning (baseline, Fig. A), and on 28th day (Fig. B) of CUMS protocol. ^aIndicates $p < 0.05$ compared to control group (No stress + vehicle).

^bIndicates $p < 0.05$ compared to stress group (Stress + vehicle).

Figure 4: Effect of chrysin or fluoxetine treatment on distance traveled on OFT in mice exposed to CUMS. The test was realized 24h after finishing CUMS protocol.

Figure 5: Effect of chrysin or fluoxetine administration on immobility time on FST in mice exposed to CUMS. The test was realized immediately after the OFT. ^aIndicates $p < 0.05$ compared to control group (No stress + vehicle). ^bIndicates $p < 0.05$ compared to stress group (Stress + vehicle).

Figure 6: Results of treatment with chrysin or fluoxetine on corticosterone levels in mice subjected to CUMS. The blood collection was realized 24h after FST. ^aIndicates $p < 0.05$ compared to non-stressed control group (No stress + vehicle). ^bIndicates $p < 0.05$ compared to stress group (Stress + vehicle).

Figure 7: Effect of chrysin or fluoxetine treatment in the Na⁺,K⁺-ATPase activity in the hippocampus (Fig. A) and prefrontal cortex (Fig. B) of mice subjected to CUMS. The brain structures were dissected immediately after blood collection. ^aIndicates p<0.05 compared to control group (No stress + vehicle). ^bIndicates p<0.05 compared to stress group (Stress + vehicle).

Figure 8: Results of treatment with chrysin or fluoxetine on BDNF content in the hippocampus (Fig. A) and prefrontal cortex (Fig. B) of mice exposed to CUMS. The brain structures were dissected immediately after blood collection. ^aIndicates p<0.05 compared to control group (No stress + vehicle). ^bIndicates p<0.05 compared to stress group (Stress + vehicle).

Figure 9: Effect of chrysin or fluoxetine administration on NGF levels in the hippocampus (Fig. A) and prefrontal cortex (Fig. B) of mice subjected to CUMS. The brain structures were dissected immediately after blood collection. ^aIndicates p<0.05 compared to control group (No stress + vehicle). ^bIndicates p<0.05 compared to stress group (Stress + vehicle).

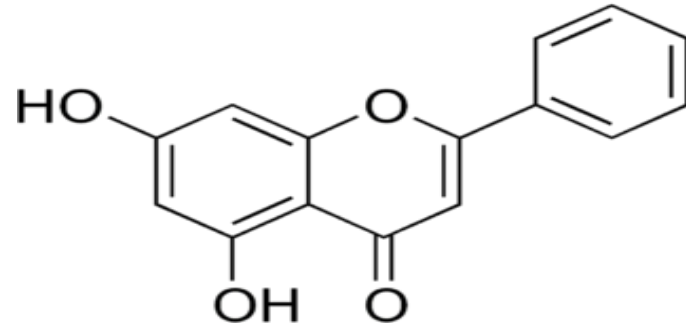


Figure 1

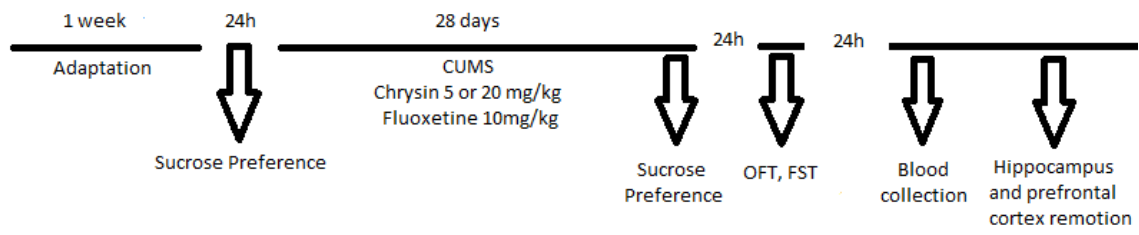


Figure 2

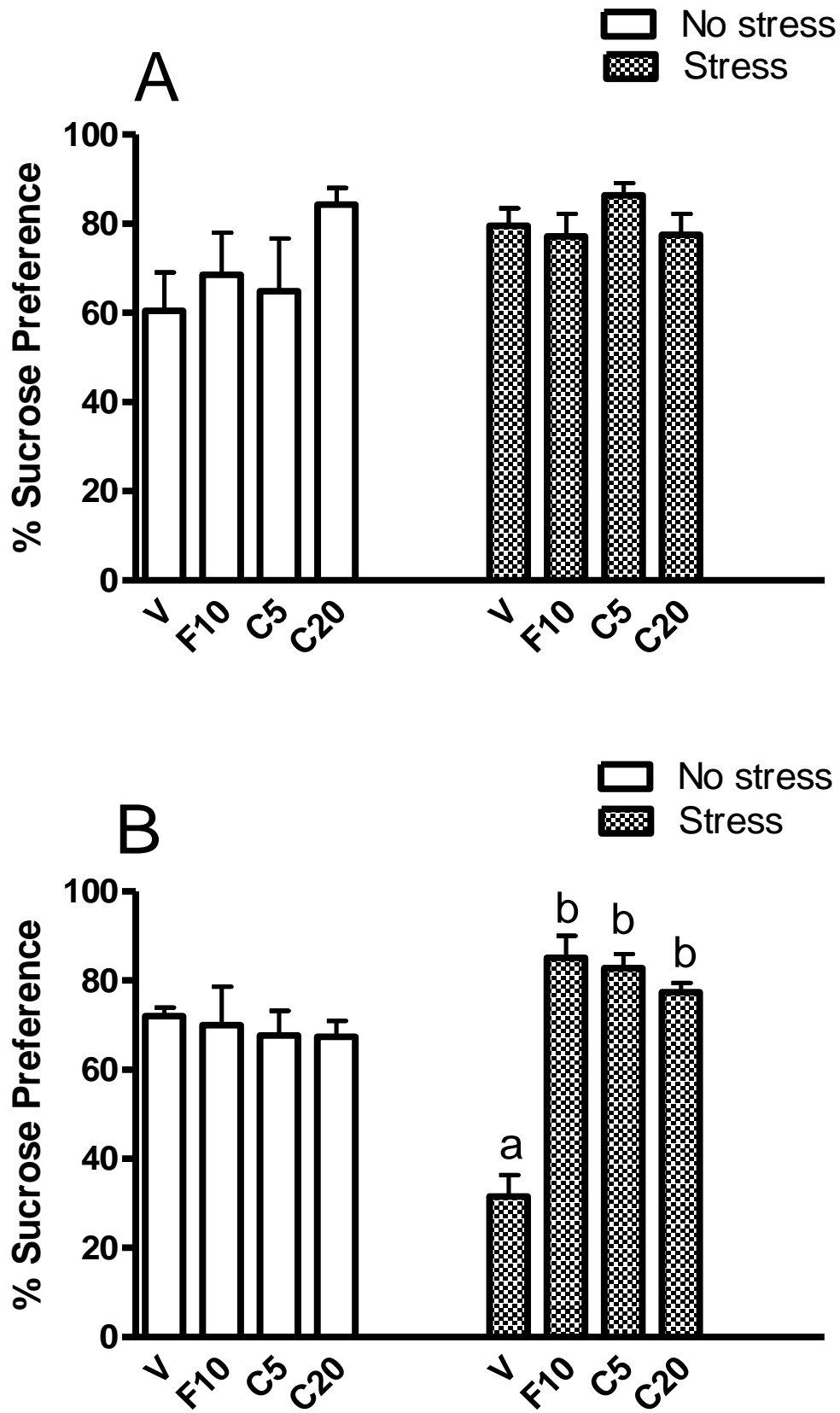


Figure 3

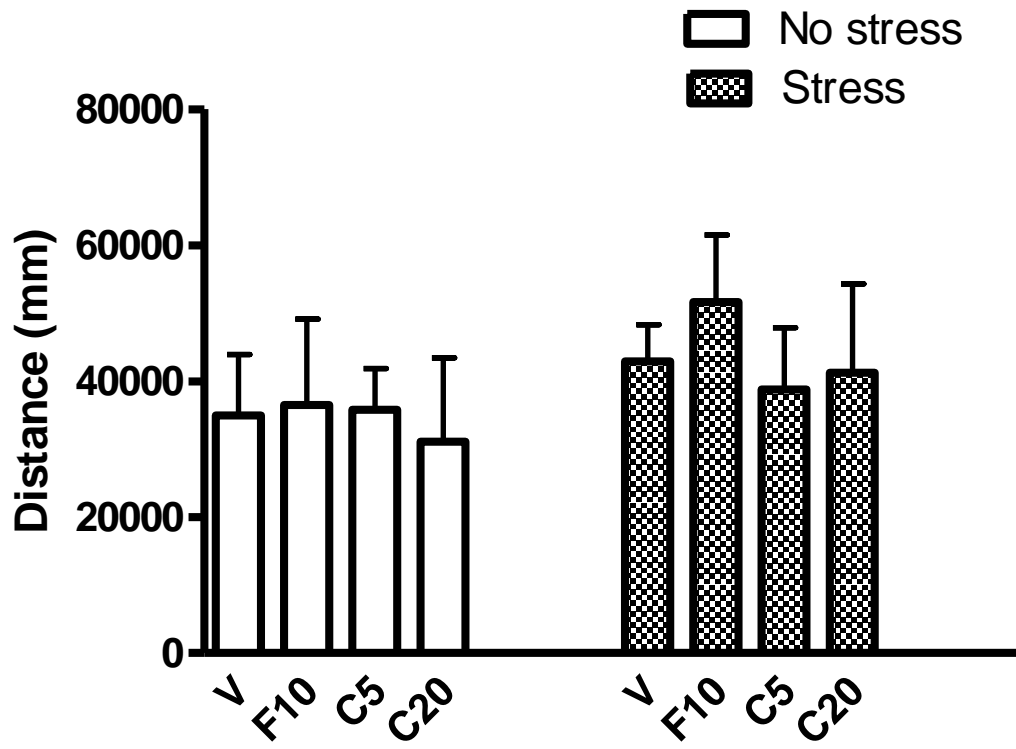


Figure 4

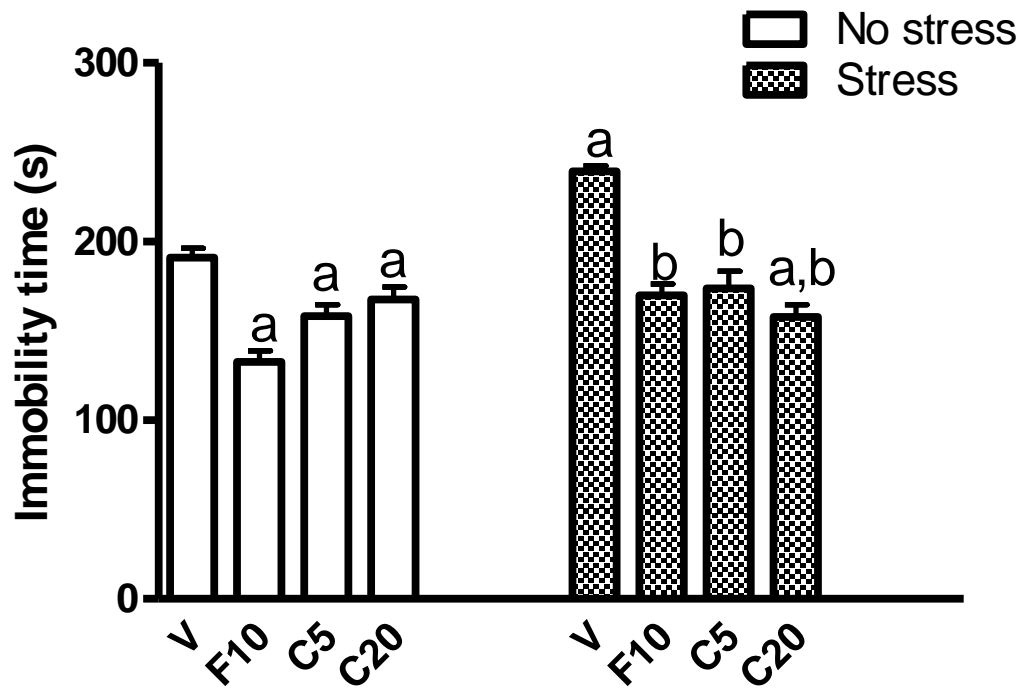


Figure 5

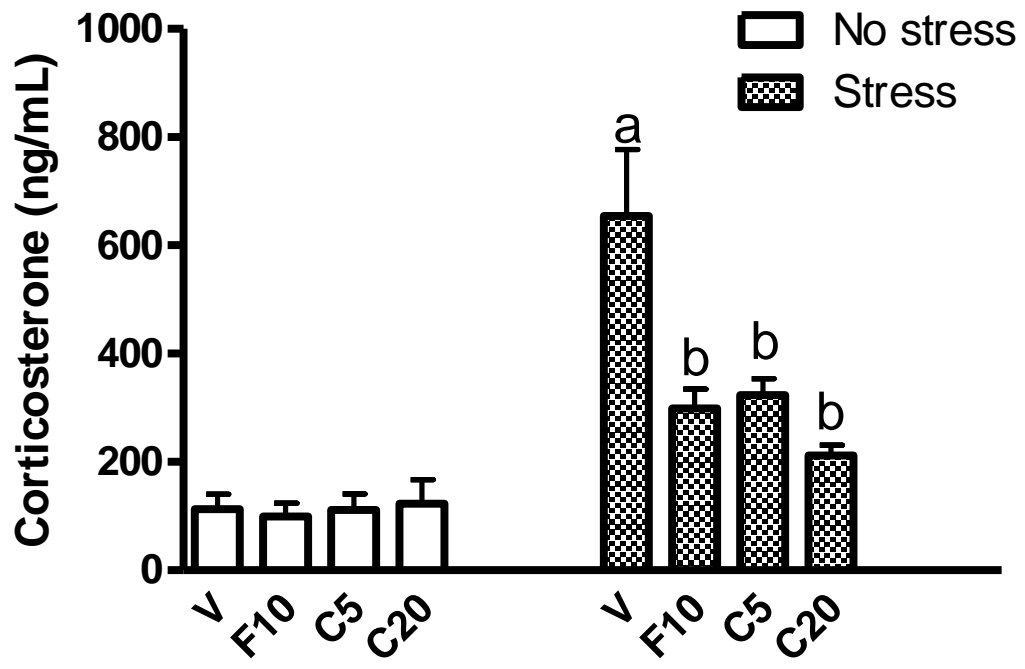


Figure 6

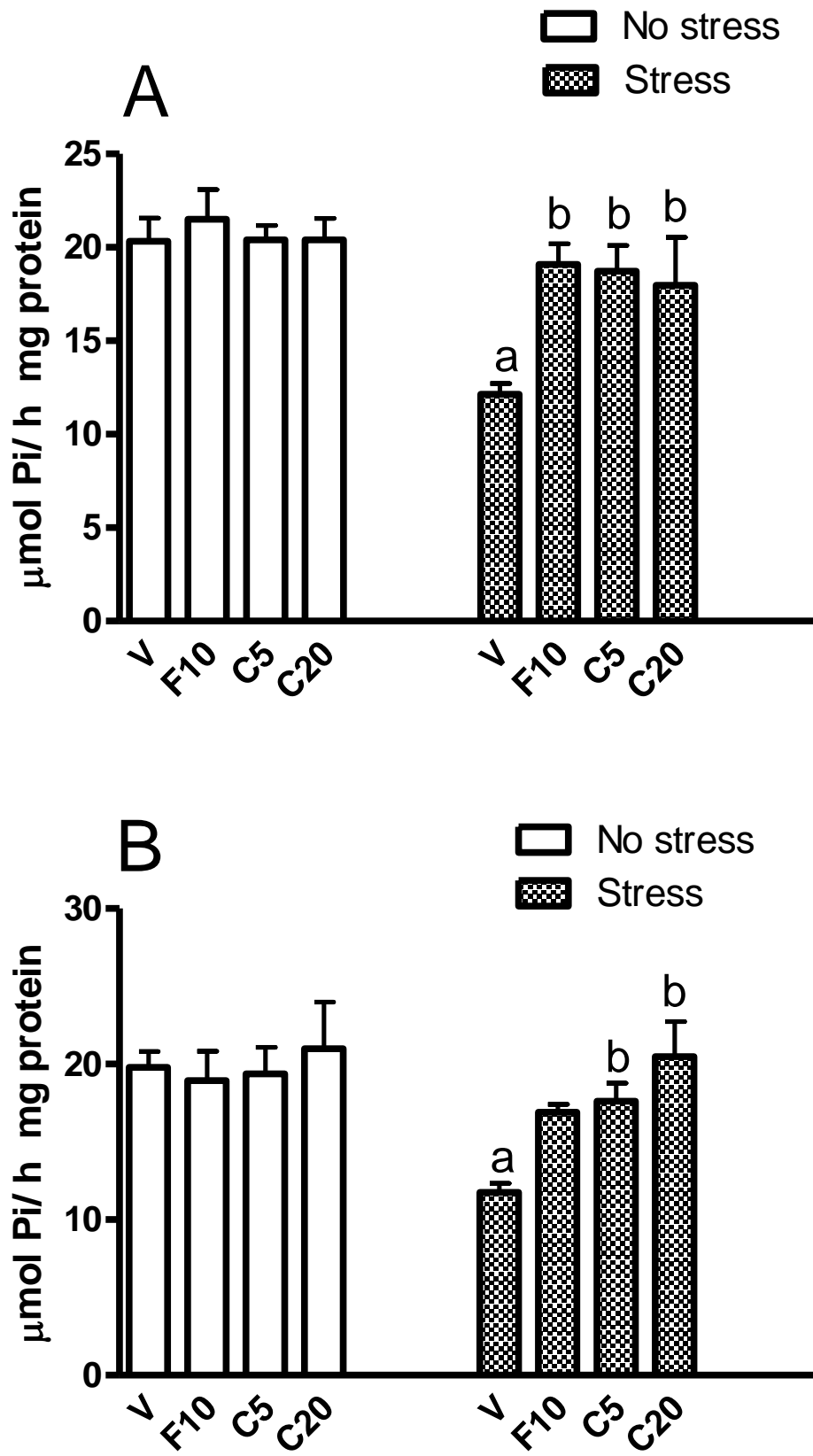


Figure 7

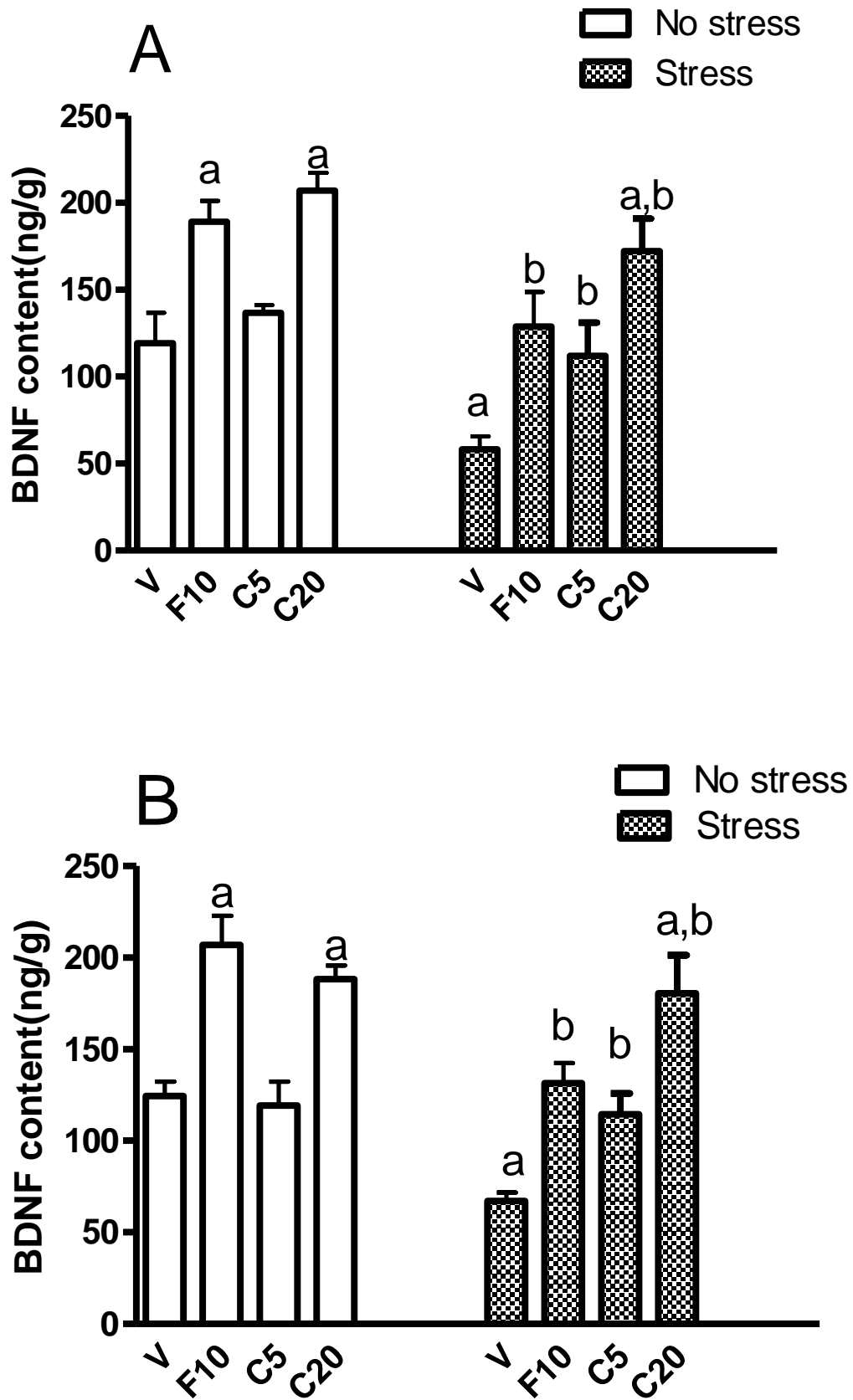


Figure 8

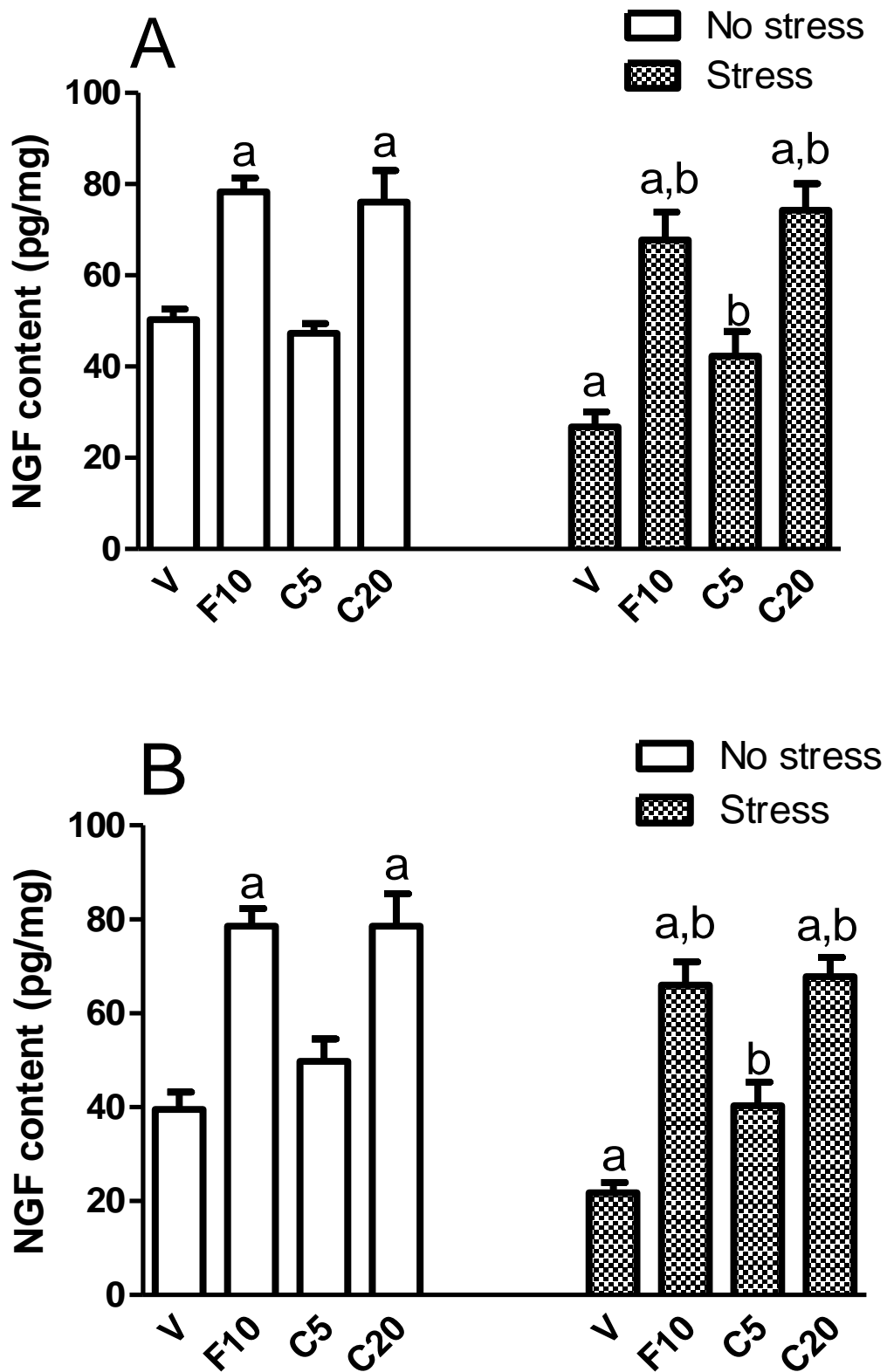


Figure 9

Table 1. Effect of treatment with chrysin or fluoxetine in NPSH and RS levels, and GR, GPx, GST and CAT activities in the hippocampus of mice subjected to CUMS

Groups	NPSH (nmol GSH/g tissue)	RS (RS levels (AU))	GR (nmolNADPH/min/mg protein)	GPx (mmolNADPH/min/mg protein)	GST (nmolCDNB/min/mg protein)	CAT (Units/mg protein)
No stress + vehicle	21.75 ± 4.11	120.8 ± 19.62	36.25 ± 5.12	25.50 ± 5.20	176.0 ± 19.98	6.75± 1.45
No stress + fluoxetine10	22.25 ± 7.09	123.0 ± 25.36	41.50 ± 9.54	24.75 ± 6.02	173.8 ± 47.77	6.15 ± 1.64
No stress + chrysin5	20.50 ± 4.65	121.4 ± 25.99	36.25 ± 10.05	24.25 ± 6.90	168.8 ± 37.85	7.02± 1.62
No stress + chrysin20	25.75 ± 4.57	133.0 ± 35.86	38.50 ± 7.94	26.00 ± 7.16	195.3 ± 24.55	7.50± 0.66
Stress + vehicle	11.60 ± 2.07 ^a	232.0 ± 67.9 ^a	65.00 ± 6.04 ^a	51.20 ± 8.14 ^a	176.2 ± 18.39	10.76 ± 2.04 ^a
Stress + fluoxetine10	22.60 ± 4.98 ^b	129.2 ± 58.61 ^b	44.60 ± 7.27 ^b	31.00 ± 7.84 ^b	191.4 ± 24.46	7.06± 1.04 ^b
Stress + chrysin5	20.60 ± 4.39 ^b	183.8 ± 13.48	41.60 ± 4.51 ^b	35.60 ± 12.34 ^b	186.8 ± 53.59	7.10 ± 1.91 ^b
Stress + chrysin20	24.40 ± 5.13 ^b	139.0 ± 53.74 ^b	49.20 ± 14.79 ^b	30.20 ± 9.26 ^b	170.0 ± 30.85	5.70± 1.36 ^b

Data are expressed as means ± S.D.M of 4-7 animals per group. ^aDenoted $p < 0.05$ compared to the control group (No stress + vehicle). ^bDenoted $p < 0.05$ compared to the stress group (Stress + vehicle)

Table 2. Effect of chrysin or fluoxetine treatment in NPSH and RS levels, and GR, GPx, GST and CAT activities in the prefrontal cortex of mice exposed to CUMS

Groups	NPSH (nmolGSH/gtissue)	RS (RS levels(AU))	GR (nmolNADPH/min/mg protein)	GPx (mmolNADPH/min/mg protein)	GST (nmolCDNB/min/mg protein)	CAT (Units/mg protein)
No stress + vehicle	21.25± 3.86	72.25± 31.57	35.25± 7.80	24.75 ± 4.57	176.8± 29.97	6.55± 0.68
No stress + fluoxetine10	22.75± 7.50	89.25± 35.14	35.50± 11.68	23.25± 7.85	198.8± 15.71	6.27± 1.16
No stress + chrysin5	22.50± 2.38	90.00± 38.08	34.00± 5.35	24.75± 8.06	170.3± 24.90	6.22± 0.81
No stress + chrysin20	27.75± 4.57	57.67± 33.69	38.50± 6.76	27.00± 6.32	174.8± 24.25	6.45± 1.10
Stress + vehicle	11.20± 2.77 ^a	247.7± 69.30 ^a	64.80± 7.22 ^a	48.60± 2.61 ^a	194.4± 20.85	11.44± 2.39 ^a
Stress + fluoxetine10	20.40± 2.70 ^b	124.4± 13.69 ^b	43.20± 7.88 ^b	33.00± 6.04 ^b	189.2± 44.73	8.57± 1.58 ^b
Stress + chrysin5	18.60± 5.59 ^b	156.4± 52.58 ^b	42.60± 9.07 ^b	35.40± 7.40 ^b	199.8± 30.25	8.96± 1.90 ^b
Stress + chrysin20	26.60± 5.13 ^b	116.8± 21.27 ^b	39.80± 13.37 ^b	29.40± 2.88 ^b	195.6± 21.80	6.14± 1.13 ^b

Data are expressed as means ± S.D.M of 4-7 animals per group. ^aDenoted $p < 0.05$ compared to the control group (No stress + vehicle). ^bDenoted $p < 0.05$ compared to the stress group (Stress + vehicle)

Table 3. Effect of chrysin or fluoxetine administration in AST and ALT activities and urea levels in plasma of mice exposed to CUMS

Groups	AST (U/L)	ALT (U/L)	Urea (mg/dl)
No stress + vehicle	122.0 ± 27.07	130.0 ± 60.0	24.50 ± 9.5
No stress + chrysin20	166.7 ± 25.79	180.0 ± 40.0	19.00 ± 3.00
Stress + vehicle	117.5 ± 21.21	88.0 ± 17.89	21.00 ± 6.50
Stress + chrysin20	156.5 ± 28.92	136.0 ± 92.09	20.83 ± 2.25

Data are expressed as means ± S.D.M. of 4-7 animals per group.

5 CONCLUSÕES

- O CUMS reduziu os níveis de NGF e a atividade da Na^+, K^+ -ATPase no hipocampo e córtex pré-frontal de camundongos fêmeas;
- O flavonóide crisina promoveu, em doses não tóxicas, o comportamento antidepressivo em camundongos não estressados e em camundongos submetidos ao CUMS;
- A dose alta de crisina elevou BDNF e NGF a níveis acima do grupo controle em camundongos não estressados e em camundongos submetidos ao CUMS;
- Além das modificações no comportamento e nos níveis de fatores neurotróficos, a crisina também preveniu as alterações oxidativas, hormonais, e a inibição da enzima Na^+, K^+ -ATPase ocasionadas pelo CUMS;
- A partir destes dados, embora mais estudos sejam necessários, sugere-se que um dos possíveis mecanismos envolvidos na atividade antidepressiva da crisina é a elevação do BDNF e do NGF a níveis acima do grupo controle em hipocampo e córtex pré-frontal;
- Ainda, este trabalho expõe o maracujá do mato como um importante alvo para o estudo dos produtos naturais no combate à depressão e outras doenças do sistema nervoso central, mostrando a fundamentalidade da investigação da funcionalidade e constituição bioativa desta e outras plantas desta região.

6 PERSPECTIVAS

- Através da administração de bloqueadores de receptores de BDNF e NGF, buscar mostrar a confirmação do possível envolvimento destas neurotrofinas no efeito antidepressivo da crisina;
- Estender a abrangência deste estudo de modo a avaliar as possíveis alterações nos níveis cerebrais e sanguíneos de citocinas, principalmente IL-1, IL-6 e TNF- α ;
- Avaliar o efeito da crisina em outros modelos de depressão, como depressão induzida por corticosterona, depressão induzida por ovariectomia e depressão induzida por citocinas;
- Por meio da análise da crisina e seus metabólitos em estruturas cerebrais, tentar elucidar a taxa de absorção cerebral e as concentrações cerebrais necessárias para a observação do efeito antidepressivo, bem como tentar mostrar qual a forma (crisina ou metabólito) mais efetivamente envolvida no efeito farmacológico.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACKER, C. I.; LUCHESE, C.; PRIGOL, M.; NOGUEIRA, C. W. Antidepressant-like effect of diphenyldiselenide on rats exposed to malathion: Involvement of Na⁺K⁺ATPase activity. *Neurosci Lett*, 455:168-72, 2009.

ALENCASTRO, L. da S. Relações entre narrativa, prosódia e movimento na depressão e seus subtipos melancólica e não melancólica. Tese (Doutorado em Psicologia). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 87p, 2012.

ALOE, L.; ALLEVA, E.; FIORE, M. Stress and nerve growth factor: findings in animal models and humans, *Pharmacol Biochem Behav*, 73:159-66, 2002.

ALOE, L.; BRACCI-LAUDIERO, L.; ALLEVA, E.; LAMBIASE, A.; MICERA, A.; TIRASSA, P. Emotional stress induced by parachute jumping enhances blood nerve growth factor levels and the distribution of nerve growth factor receptors in lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 91:10440-4, 1994.

AMERICAN PSYCHIATRY ASSOCIATION. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. Washington, DC, 4th ed., 1994.

BAE, Y.; LEE, S.; KIM, S. H. Chrysin suppresses mast cell-mediated allergic inflammation: Involvement of calcium, caspase-1 and nuclear factor-kappaB. *Toxicol Appl Pharmacol*, 254:56-64, 2011.

BILICI, M.; EFE, H.; KOROGLU, M. A.; UYDU, H. A.; BEKAROGLU, M.; DEGER, O. Antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in major depression: alterations by antidepressant treatments. *J Affect Disord*, 64:43-51, 2001.

BOKKENHEUSER, V. D.; SHACKLETON, C. H. L.; WINTER, J. Hydrolysis of dietary flavonoid glycosides by strains of intestinal Bacteroides from humans. *Biochem J*, 248:953-6, 1987.

BORGES FILHO, C.; DEL FABBRO, L.; DE GOMES, M. G.; GOES, A. T. R.; SOUZA, L. C.; BOEIRA, S. P. et al. Kappa-opioid receptors mediate the antidepressant-like activity of hesperidin in the mouse forced swimming test. *Eur J Pharmacol*, 698:286-91, 2013.

BRHLIKOVA, P.; POLLOCK, A. M.; MANNERS, R. Global Burden of Disease estimates of depression how reliable is the epidemiological evidence? *J R Soc Med*, 104:25-34, 2011.

CHEETA, S.; RUIGT, G.; VAN PROOSDIJ, J.; WILLNER, P. Changes in sleep architecture following chronic mild stress. *Biol Psychiatry*, 41:419-27, 1997.

CHO, H.; YUN, C. W.; PARK, W. K.; KONG, J. Y.; KIM, K. S.; PARK, Y. et al. Modulation of the activity of pro-inflammatory enzymes, COX-2 and iNOS, by chrysin derivatives. *Pharmacol Res*, 49:37-43, 2004.

CRYAN, J. F.; HOLMES, A. The ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety. *Nat Rev Drug Discov*, 4:775-90, 2005.

CZECH, B.; PEREZ-CRUZ, C.; FUCHS, E.; FLUGGE, G. Chronic stress-induced cellular changes in the media pré-frontal córtex and their potential clinical implications: does hemisphere location matter? *Behav Brain Res*, 190:1-13, 2008.

DAH, J.; ORMSTAD, H.; AASS, H. C.; MAT, U. F.; BENDZ, L. T.; SANDVIK, L., et al. The plasma levels of various cytokines are increased during ongoing depression and are reduced to normal levels after recovery. *Psychoneuroendocrinology*, 45:77-86, 2014.

DANTZER, R.; KELLEY, K. W. Twenty years of research on cytokine- induced sickness behavior. *Brain Behav Immun*, 21, 153-160, 2007.

DARVESH, A. S.; CARROL, R. T.; BISHAYEE, A.; GELDENHUYS, W. J.; VAN DER, SCHYF, C. J. Oxidative stress and Alzheimer's disease: dietary polyphenols as potential therapeutic agents. *Expert Rev Neurother*, 10:729-45, 2010.

DAVIDSON, M. D.; ECHEVERRY, D. Collaborative care for depression and chronic illness. *N Engl J Med*, 364:1278-79, 2011.

DE KLOET, E. R.; JOELS, M.; HOLSBOER, F. Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci*, 6:463-75, 2005.

DREVETS, W. C. Neuroimaging studies of mood disorders. *Biol Psychiatry*, 48:813-29, 2000.

DUMAN, R. S.; MONTEGGIA, L. A neurotrophic model for stress related mood disorders. *Biol Psychiatry*, 59:1116-27, 2006.

ELHWUEGI, A. S. Central monoamines and their role in major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 28:435-51, 2004.

FREITAS, A. E.; BETTIO, L. E. B.; NEIS, V. B.; SANTOS, D. B.; RIBEIRO, C. M.; ROSA, P. B. et al. Agmatine abolishes restraint stress-induced depressive-like behavior and hippocampal antioxidant imbalance in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 50:143-50, 2014.

GAMARO, G. D.; STRECK, E. L.; MATTÉ, C.; PREDIGER, M. E.; WYSE, A. T.; DALMAZ, C. Reduction of Hippocampal Na⁺, K⁺ ATPase Activity in Rats Subjected to an Experimental Model of Depression. *Neurochem Res*, 28:1339-44, 2003.

GORKA, Z.; MORYL, E.; PAPP, M. Effect of chronic mild stress on circadian rhythms in the locomotor activity in rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 54: 229-34, 1996.

GOULD, E.; MCEWEN, B. S.; TANAPAT, P.; GALEA, L. A. M.; FUCHS, E. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. *J Neurosci*, 17:2492-8, 1997.

GOTLIB, I. H.; JOORMAN, J. Cognition and depression: current status and future directions. *Annu Rev Clin Psychol*, 27:285-312, 2010.

GRIFFITHS, L. A.; BARROW, A. Metabolism of flavonoid compounds in germ-free rats. *Biochem J*, 130:1161-2, 1972.

GRIPPO, A. J.; BELTZ, T. G.; JOHNSON, A. K. Behavioral and cardiovascular changes in the chronic mild stress model of depression. *Physiol Behav*, 78:703-10, 2003.

GRISAR, T.; GUILLAUME, D.; DELGADO-ESCUETA, A. V. Contribution of Na(+),K(+)-ATPase to focal epilepsy: a brief review. *Epilepsy Res*, 12:141-9, 1992.

GROVES, J. O. Is it time to reassess the BDNF hypothesis of depression? *Molecular Psychiatry*, 12:1079-88, 2007.

HALLIWELL, B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging*, 18:685-716, 2001.

HALLIWELL, B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem*, 97:1634-58, 2006.

JOELS, M.; BARAM, T. The neuro-symphony of estress. *Nat Rev Neurosci*, 10:459-66, 2009.

KAO, Y. C.; ZHOU, C.; SHERMAN, M.; LAUGHTON, C. A.; CHEN, S. Molecular basis of the inhibition of human aromatase (estrogen synthetase) by flavone and isoflavone phytoestrogens: a site-directed mutagenesis study. *Environ Health Perspect*, 106:85-92, 1998.

KHAN, R.; KHAN, A. Q.; QAMAR, W.; LATTEF, A.; TAHIR, M.; REHMAN, M. U.; ALI, F.; SULTANA, S. Chrysin protects against cisplatin-induced colon. toxicity via amelioration of oxidative stress and apoptosis: Probable role of p38MAPK and p53. *Toxicol Appl Pharmacol*, 258:315-29, 2012.

KIM, Y. K.; NA, K. S.; SHIN, K. H.; JUNG, H. Y.; CHOI, S. H., KIM, J. B. Cytokine imbalance in the pathophysiology of major depressive disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 31:1044-53, 2007.

KOLLA, N.; WEI, Z.; RICHARDSON, J. S.; LI, X. M. Amitriptyline and fluoxetine protect PC12 cells from cell death induced by hydrogen peroxide. *J Psychiatry Neurosci*, 30:196-201, 2005.

KUMAMARU, E.; NUMAKAWA, T.; ADACHI, N.; YAGASAKI, Y.; IZUMI, A.; NIYAZ, M. et al. Glucocorticoid prevents brain-derived neurotrophic factor mediated maturation of synaptic function in developing hippocampal neurons through reduction in activity of mitogen-activated protein kinase. *Mol Endocrinol*, 22:546-58, 2008.

KUMAR, B.; KUHAD, A.; CHOPRA, K. Neuropsychopharmacological effect of sesamol in unpredictable chronic mild stress model of depression: behavioral and biochemical evidences. *Psychopharmacology*, 214:819-28, 2011.

LEONARD, B.; MAES, M. Mechanistic explanations how cell mediated immune activation, inflammation and oxidative and nitrosative stress pathways and their sequels and concomitants play a role in the pathophysiology of unipolar depression. *Neurosci Biobehav Rev*, 36:764-85, 2012.

LEVINSON, D. F. The genetics of depression: A review. *Biological Psychiatry*, 60:84-92, 2006.

LI, XM, CHLAN-FOURNEY, J.; JUORIO, A. V.; BENNET, V. L.; SHRIKHANDE, S.; BOWEN, R. C. Antidepressants upregulate messenger RNA levels of the neuroprotective enzyme superoxide dismutase (SOD1). *J Psychiatry Neurosci*, 25:43-7, 2000.

LIU, D.; XIE, K.; YANG, X.; GU, J.; GE, L.; WANG, X. et al. Resveratrol reverses the effects of chronic unpredictable mild stress on behavior, serum corticosterone levels and BDNF expression in rats. *Behav Brain Res*, 264: 9-16, 2014.

LOBATO, K. R. Avaliação do efeito antidepressivo da vitamina E em modelos animais. Dissertação (Mestrado em Neurociências). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 108p, 2009.

MACQUEEN, G. M.; CAMPBELL, S.; MCEWEN, B. S.; MACDONALD, K.; AMANO, S.; JOFFE, R. T. et al. Course of illness, hippocampal function, and hippocampal volume in major depression. *Proc Natl Acad Sci*, 100:1387-92, 2003.

MANCUSO, C.; BATES, T. E.; BUTTERFIELD, D. A.; CALAFATO, S.; CORNELIUS, C.; LORENZO, A.; et al. Natural antioxidants in Alzheimer's disease. *Expert Opin Investig Drugs*, 16:1921-31, 2007.

MANNI, L.; DI FAUSTO, V.; CHALDAKOV, G. N.; ALOE, L. Brain leptin and nerve growth factor are differently affected by stress in male and female mice: Possible neuroendocrine and cardio-metabolic implications. *Neurosci Lett*, 426:39-44, 2007.

MAO, Q. Q.; IP, S. P.; KO, K. M.; TSAI, S. H.; CHE, C. T. Peony glycosides produce antidepressant-like action in mice exposed to chronic unpredictable mild stress: effects on hypothalamic-pituitary-adrenal function and brain-derived neurotrophic factor. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 33:1211-6, 2009.

MAO, Q. Q.; HUANG, Z.; ZHONG, X.; XIAN, X.; IP, S. Brain-derived neurotrophic factor signalling mediates the antidepressant-like effect of piperine in chronically stressed mice. *Behav Brain Res*, 26:140-5, 2014.

MEDIC-SARIC, M. Chemical composition of the ethanolic propolis extracts and its effect on HeLa cells. *J Ethnopharmacol*, 135:772-8, 2011.

MISAZZI, L.; MILANESE, M.; FARISELO, P.; ZAPPETTINI, S.; TARDITO, D.; BARBIERO, B. S. et al. Acute stress increases depolarization-evoked glutamate release in the rat prefrontal/frontal cortex: the dampening action of antidepressants. *PLoS One*, 5:e8566, 2010.

MEDINA, J. H.; PALADINI, A. C.; WOLFMAN, C.; STEIN, M. L. DE; CALVO, D.; DIAZ, L. E. et al. Chrysin (5,7-Di-OH-Flavone), a naturally-occurring ligand for benzodiazepine receptors, with anticonvulsivant properties. *Biochem pharmacol*, 40:2227-31, 1990.

MUSCAT, R.; WILLNER, P. Suppression of sucrose drinking by chronic mild unpredictable stress: a methodological analysis. *Neurosci Biobehav Rev*, 16:507-17, 1992.

MYNETT-JOHNSON, L.; MURPHY, V.; MCCORMACK, J.; SHIELDS, D. C.; CLAFFEY, E.; MANLEY, P. et al. Evidence for an allelic association between bipolar disorder and a Na, K adenosine triphosphatase alpha subunit gene (ATP1A3). *Biol Psych*, 44:47-51, 1998.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. *J Chromatogr A*, 1054:95-111, 2004.

NARDI, A. E. Depressão no Ciclo da Vida. *Rev Bras Psiquiatr*, 22: 151-2, 2000.

NEMEROFF, C. B. The burden of severe depression: A review of diagnostic challenges and treatment alternatives. *J Psychiatr Res*, 41:189-206, 2007.

NESTLER, E. J.; BARROT, M.; DILEONE, R. J.; EISCH, A. J.; GOLD, S. J.; MONTEGGIA, L. M. Neurobiology of depression. *Neuron*, 34:13-25, 2002.

NIU, K.; HOZAWA, A.; KURIYAMA, S.; EBINARA, S.; GUO, H.; NAKAYA, N. et al. Green tea consumption is associated with depressive symptoms in the elderly. *Am J Clin Nutr*, 90:1615-22, 2009.

OLIVEIRA, M. S.; FURIAN, A. F.; RAMBO, L. M.; RINBEIRO, R. L.; ROYES, L. F. F.; FERREIRA, F. et al. Prostaglandin E2 modulates Na⁺,K⁺-ATPase activity in rat hippocampus. Implication for neurological diseases. *J Neurochem*, 109:416-26, 2009.

ONGUR, D.; DREVETS, W. C.; PRICE, J. L. Glial reduction in the subgenual prefrontal cortex in mood disorders. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 95:13290-5, 1998.

OZCAN, M. E.; GULEC, M.; OZEROL, E.; POLAT, R.; AHYOL, O. Antioxidant enzyme activities and oxidative stress in affective disorders. *Int Clin Psychopharmacol*, 19:89-95, 2004.

PANDEY, K. B.; RIZVI, S. I. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev*, 2:270-8, 2009.

PARKER, G.; BROTCHE, H. Psychomotor change as a feature of depressive disorders: an historical overview. *Aust N Z J Psychiatry*, 26:146-55, 1992.

PENG, Y.; LIU, Y.; WANG, X.; JIANG, C.; WANG, Y. Inducible nitric oxide synthase is involved in the modulation of depressive behaviors induced by unpredictable chronic mild stress. *J Neuroinflammation*, 9:75-86, 2012.

PEROVIC, B.; JOVANOVIC, M.; MILJKOVIC, B.; VEZMAR, S. Getting the balance right: Established and emerging therapies for major depressive disorders. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 6:343-64, 2010.

PICHICHERO, E.; CICCONI, R.; MATTEI, M.; CANINI, A. Chrysin-induced apoptosis is mediated through p38 and Bax activation in B16-F1 and A375 melanoma cells. *Int J Oncol*, 38:473-83, 2011.

PIETTA, P. Flavonoids as Antioxidants. *J Nat Prod*, 63:1035-42, 2000.

PORSOLT, R. D.; LE PICHON, M.; JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*, 266:730-2, 1977.

PUSHPAVALLI, G.; KALAIARASI, P.; VEERAMANI, C.; PUGALENDI, K. V. Effect of chrysin on hepatoprotective and antioxidant status in D-galactosamine-induced hepatitis in rats. *Eur J Pharmacol*, 631:36-41, 2010.

RAISON, C. L.; BORISOV, A. S.; BROADWELL, S. D.; CAPURON, L.; WOOLWINE, B. J.; JACOBSON, I. M. et al. Depression during pegylated interferon-alpha plus ribavirin therapy: prevalence and prediction. *J Clin Psychiatry*, 66:41-48, 2005.

RUSH, R. A.; CHIE, E.; LIU, D.; TAFRESHI, A.; ZETTLER, C.; ZHOU, X. F. Neurotrophic factors are required by mature sympathetic neurons for survival, transmission and connectivity. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 24:549-55, 1997.

SAPLOSKY, R. M. Stress, glucocorticoids, and damage to the nervous system: The current state of confusion. *Stress*, 1:1-19, 1996.

SCACCIANOCE, S.; LOMBARDO, K.; ANGELUCCI, L. Nerve growth factor brain concentration and stress: changes depend on type of stressor and age. *Int J Devl Neuroscience*, 18:469-479, 2000.

SEQUETO, P. L. Efeitos dos flavonoides naringina, crisina e hesperidina e do extrato hidroalcoólico de *Helianthus Annuus* na carcinogênese experimental do cólon. Tese (Doutorado em Bioquímica Agrícola). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 185p, 2012.

SHI, C.; WANG, L.; WU, Y.; WANG, P.; GAN, Z.; LIN, K. et al. Intranasal Administration of Nerve Growth Factor Produces Antidepressant-Like Effects in Animals. *Neurochem Res*, 35:1302-14, 2010.

SIES, H. Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem*, 215:213-9, 1993.

SMITH, R. S. The macrophage theory of depression. *Med Hypotheses*, 35:298-306, 1991.

STERU, L.; CHERMAT, R.; THIERRY, B.; SIMON, P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacol*, 85:367-70, 1985.

STOCKMEIER, C. A.; MAHAJAN, G. J.; KONICK, L. C.; OVERHOLSER, J. C.; JURJUS, G. C.; MELTZER, H. Y. et al. Cellular changes in the postmortem hippocampus in major depression. *Biol Psychiatry*, 56:640-50, 2004.

THIERRY, B.; STERU, L.; CHERMAT, R.; SIMON, P. Searching-waiting strategy: a candidate for an evolutionary model of depression? *Behav Neural Biol*, 41:180-9, 1984.

TOREL, J.; CILLARD, J.; CILLARD, P. Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radical. *Phytochemistry*, 25:283-5, 1986.

TSIGOS, C.; CHROUSOS, G. P. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors, and stress. *J Psychosom Res*, 53:865-71, 2002.

TSUJI, P. A.; WINM, R. N.; WALLE, T. Accumulation and metabolism of the anticancer flavonoid 5,7-dimethoxyflavone compared to its unmethylated analog chrysin in the Atlantic killifish. *Chem Biol Interact*, 164:85-92, 2006.

TRIVEDI, M. H.; RUSH, A. J.; WISNIEWSKI, S. R.; NIERENBERG, A. A.; WARDEN, D.; RITZ, L. Evaluation of outcomes with citalopram for depression using measurement based care in STAR*D: implications for clinical practice. *Am J Psychiatry*, 163:28-40, 2006.

TÕNISSAR, M.; MÄLLO, T.; ELLER, M.; HÄIDKIND, R.; KÕIV, K.; HARRO, J. Rat behavior after chronic variable stress and partial lesioning of 5-HT-ergic neurotransmission: effects of citalopram. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 32:164-77, 2008.

ULRICH-LAI, Y. M.; HERMAN, J. Neural regulation of endocrine and autonomic stress response. *Nat Rev Neurosci*, 10:307-409, 2009.

VAIDYA, V. A.; DUMAN, R. S. Depression—emerging insights from neurobiology. *Br Med Bull*, 57:61-79, 2001.

VILLAR, I. C.; JIMENOZ, R.; GALISTEO, M.; GARCIO-SAURA, M. F.; ZARZUELO, A.; LUARTE, J. Effect of chronic chrysin treatment in spontaneously hypertensive rats. *Planta Med*, 68:845-7, 2002.

- WALLE, T. Absorption and metabolism of flavonoids. *Free Rad Biol Med*, 36:829-37, 2004.
- WALLE, T.; OTAKE, Y.; BRUBAKER, J. A.; WALLE, U. K.; HALUSHKA, P. V. Disposition and metabolism of the flavonoid chrysin in normal volunteers. *Br J Clin Pharmacol*, 51:143-6, 2001.
- WALSH, R. N.; CUMMINS, R. A. The open-field test: a critical review. *Psychol Bull*, 83:482-504, 1976.
- WILLNER, P.; JONES, C. Effects of mood manipulation on subjective and behavioural measures of cigarette craving. *Behav Pharmacol*, 7:355-63, 1996.
- WILLNER, P.; TOWELL, A.; SAMPSON, D.; SOPHOKLEOUS, S.; MUSCAT, R. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. *Psychopharmacol (Berl)*, 93:358-64, 1987.
- WILLNER, P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. *Psychopharmacology (Berl)*, 134:319-29, 1997.
- WILLNER, P. Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural neurobiological concordance in the effects of CMS. *Neuropsychobiology*, 52:90-110, 2005.
- YAN, H. C.; CAO, X.; DAS, M.; ZHU, X. H.; GAO, T. M. Behavioral animal models of depression. *Neurosci Bull*, 26:327-37, 2010.
- ZARZECKI, M. S.; ARAUJO, S. M.; BORTOLOTTI, V. C.; DE PAULA, M. T.; JESSE, C. R.; PRIGOL, M. Hypolipidemic action of chrysin on Triton WR-1339-induced hyperlipidemia in female C57BL/6 mice. *Toxicol Reports*, 1:200-8, 2014.
- ZHOU, Q. G.; HU, Y.; HUA, Y.; HU, M.; LUO, C. X.; HAN, X. Neuronal nitric oxide synthase contributes to chronic stress-induced depression by suppressing hippocampal neurogenesis. *J Neurochem*, 103:1843-54, 2007.

ZHU, W. L.; SHI, H. S.; WEY, Y. M.; WANG, S. J.; SUN, C. Y.; DING, Z. B. et al. Green tea polyphenols produce antidepressant-like effects in adult mice. *Pharmacol Res*, 65:74-80, 2012.

**ANEXO A –Protocolo de aprovação do projeto pela Comissão de ética no uso de animais
(CEUA-UNIPAMPA)**



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
(Lei nº 11.640, de 11 de janeiro de 2008)

Pró-Reitoria de Pesquisa

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

Fone: (55) 3413 4321, E-mail: ceua@unipampa.edu.br

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DE PROTOCOLO PARA USO
DE ANIMAIS EM PESQUISA**

Número de protocolo da CEUA: **035/2013**

Título: **AVALIAÇÃO DO EFEITO DO FLAVONÓIDE CRISINA EM CAMUNDONGOS
SUBMETIDOS AO ESTRESSE CRÔNICO IMPREVISÍVEL**

Data da aprovação: **20/12/2013**

Período de vigência do projeto: De: **12/2013** Até: **12/2016**

Pesquisador: **CRISTIANO RICARDO JESSE**

Campus: **ITAQUI**

Telefone: **(55) 3433-1669**

E-mail: cristianoricardojesse@yahoo.com.br

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Alessandra S. K. Tamajusuku Neis'.

Alessandra S. K. Tamajusuku Neis
Professor Adjunto
Coordenadora da CEUA/UNIPAMPA