

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

FRANCIELE DONATO

**ESTUDO DOS MECANISMOS ASSOCIADOS AO EFEITO TIPO
ANTIDEPRESSIVO DOS POLIFENÓIS HESPERIDINA E MANGIFERINA EM
CAMUNDONGOS**

Uruguaiiana, RS, Brasil.

2017

FRANCIELE DONATO

**ESTUDO DOS MECANISMOS ASSOCIADOS AO EFEITO TIPO
ANTIDEPRESSIVO DOS POLIFENÓIS HESPERIDINA E MANGIFERINA EM
CAMUNDONGOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Cristiano Ricardo Jesse

Uruguaiana, RS, Brasil.

2017

FRANCIELE DONATO

**ESTUDO DOS MECANISMOS ASSOCIADOS AO EFEITO TIPO
ANTIDEPRESSIVO DOS POLIFENÓIS HESPERIDINA E MANGIFERINA EM
CAMUNDONGOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Cristiano Ricardo Jesse

Área de concentração: Bioquímica Farmacêutica e Toxicológica

Tese defendida e aprovada em: 11 de março de 2017.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Cristiano Ricardo Jesse
Orientador (UNIPAMPA)

Prof. Dr^a. Sandra Elisa Hass (UNIPAMPA)

Prof. Dr^a. Silvane Souza Roman (URI)

Prof. Dr André Ricardo Fajardo (UFPEL)

Prof. Dr^a. Cristiane Luchese (UFPEL)

Uruguaiana, RS, Brasil.

2017

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida e inspiração.

Aos meus queridos pais, Osvaldo e Ieda por todo amor, dedicação, apoio e por todos os ensinamentos de vida, enfim, não tenho palavras para agradecer tudo que vocês já fizeram e fazem por mim. Sei que por muitas vezes vocês abriram mão dos seus sonhos para que os meus fossem realizados; e principalmente, pelo suporte emocional e educação. Também agradeço aos meus irmãos, Vitor e Daniel, pela amizade, carinho e por partilhar com a minhas discussões um pouco malucas. Amo vocês!!

Agradeço ao Giovani, meu amor, pelo carinho, amor incondicional, por estar sempre ao meu lado desde o início da graduação, sempre me incentivando e principalmente acreditando em mim! Obrigada pela compreensão nos momentos mais difíceis ou de ausência. Te amo muito!

Ao meu orientador, Cristiano, agradeço imensamente a oportunidade de realizar o doutorado sob sua orientação; e principalmente pelo aprendizado, tempo dedicado, sugestões, conselhos, amizade, compreensão, sabedoria e amor à ciência. Enfim, muito obrigada pela orientação!

Aos membros da banca, pelo aceite e disponibilidade a avaliar esse trabalho.

Aos colegas e amigos do LaftamBio Pampa pela amizade, colaboração, discussões e por proporcionarem dias super agradáveis no laboratório, é muito bom trabalhar com vocês.

Às professoras Marina Prigol e Silvana Boeira, pelas contribuições na execução deste trabalho.

Aos Amigos, que fora do laboratório me acompanharam neste percurso, agradeço as palavras de incentivo e de amizade, e também aos momentos de descontração. Adoro vocês!

À Universidade Federal do Pampa e ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica pela possibilidade de realização desse curso.

Aos demais professores do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, que contribuíram de alguma forma para minha formação.

Aos animais utilizados, todo o meu respeito, pois sem eles não teria sido possível a realização deste trabalho.

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

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

O transtorno depressivo é um dos mais prevalentes dos transtornos mentais graves que contribuem para uma porção significativa da incapacidade relacionada à doença em todo o mundo. Considerando as promissoras propriedades farmacológicas dos polifenóis, este estudo tem por objetivo a investigação do efeito tipo antidepressivo dos polifenóis hesperidina e mangiferina, bem como os mecanismos envolvidos em camundongos. Obtiveram-se os seguintes resultados: (i) hesperidina e hesperetina produziram um efeito tipo antidepressivo semelhante no teste de suspensão da cauda (TSC) no tratamento crônico. Além disso, o pré-tratamento com L-arginina, sildenafil ou com SNAP foram capazes de reverter o efeito antidepressivo da hesperidina no TSC. Uma dose subefetiva de L-NNA, 7-NI, MB ou ODQ em combinação com uma dose subefetiva de hesperidina produziram efeito tipo antidepressivo. Além disso, os níveis de nitrato/nitrito diminuíram no hipocampo em tratamentos agudo e crônico com hesperidina. O tratamento crônico com hesperidina aumentou os níveis do fator neurotrófico derivado do cérebro do hipocampo. A hesperidina inibiu a via L-arginina-NO-GMPc; (ii) a administração de TEA, glibenclamida, caribdotoxina ou apamina combinada com uma dose subefetiva de hesperidina foram capazes de produzir um efeito tipo antidepressivo sinérgico em TSC. Além disso, o efeito tipo antidepressivo provocado por uma dose efetiva de hesperidina no TSC foi abolido pelo tratamento com cromacalim ou minoxidil. Estes resultados sugerem que o efeito antidepressivo da hesperidina na TSC pode envolver, pelo menos em parte, a modulação da excitabilidade neuronal através da inibição dos canais de K⁺ e pode atuar através de um mecanismo dependente da inibição da via L-arginina-NO; (iii) mangiferina produziu um efeito tipo antidepressivo no teste do nado forçado (TNF) e TSC. O pré-tratamento com PCPA aboliu completamente o efeito tipo antidepressivo induzido pela mangiferina. O pré-tratamento com WAY100635, mas não com SB 224289, ritanserina, MDL 72222, GR 125487 ou SB 269970 preveniu o efeito tipo antidepressivo da mangiferina no TSC. O tratamento combinado de mangiferina com paroxetina ou sertralina demonstrou efeito tipo antidepressivo. Também aumentou os níveis de 5-HT hipocampal, enquanto os níveis de 5-HIAA diminuíram no córtex cerebral. A razão 5-HIAA/5-HT reduziu significativamente no hipocampo e córtex cerebral. Além disso, a mangiferina inibiu significativamente a captação sinaptossomal de [³H] 5-HT. Tomados em conjunto, a mangiferina demonstrou que o efeito tipo antidepressivo foi mediado pelos receptores 5-HT_{1A}, provavelmente devido a alterações na modulação do sistema serotoninérgico, diminuindo o "turnover" de 5-HT e bloqueando a recaptação de 5-HT; (iv) o pré-tratamento com sulpirida, mas não com SCH23390 ou

haloperidol, preveniu o efeito tipo antidepressivo da mangiferina no TSC. Um efeito tipo antidepressivo combinatório na co-administração de doses subefetivas de mangiferina com apomorfina, mas não com SKF 38393. Efeito tipo antidepressivo sinérgico da administração combinada de doses sub-efetivas de bupropiona com mangiferina. Além disso, uma tendência para aumentar os níveis de dopamina, associado a uma diminuição nos níveis de DOPAC e HVA no córtex cerebral, hipocampo e estriado, enquanto reduções significativas, foram observadas apenas em níveis de DOPAC no hipocampo. Verificou-se também uma diminuição significativa no "turnover" de dopamina no hipocampo e estriado. Estes resultados indicam que o efeito antidepressivo da mangiferina depende da modulação do sistema dopaminérgico, mediado pelos receptores D₂ da dopamina. Portanto os resultados sugerem que estes polifenóis podem ser uma nova estratégia terapêutica para o tratamento da depressão, assim como a sua associação com antidepressivos convencionais, que poderia ser usado para reduzir a dose destes fármacos.

Palavras-chave: Tipo antidepressivo. Polifenóis. Flavonoides. Xantonas. Hesperidina. Mangiferina.

ABSTRACT

Depressive disorder is one of the most prevalent of serious mental disorders that contribute to a significant portion of illness-related disability across the world. Considering the promising pharmacological properties of polyphenols, this study aims the investigation the antidepressant-like effect of polyphenols hesperidin and mangiferin, as well as the mechanisms involved in this effect in mice. The following results were obtained: (i) hesperidin and hesperetin produced similar antidepressant-like effect in tail suspension test (TST) in chronic treatment. Besides, the pretreatment with L-arginine, sildenafil or with SNAP were able to reverse the antidepressant-like effect of hesperidin in the TST. A subeffective dose of L-NNA, 7-NI, MB, or ODQ in combination with subeffective dose of hesperidin produced an antidepressant-like effect. Further, nitrate/nitrite levels decreased in the hippocampus in acute and chronic treatments with hesperidin. Chronic treatment with hesperidin increased in the levels hippocampal brain-derived neurotrophic factor. The hesperidin inhibited L-arginine-NO-cGMP pathway; (ii) the administration of TEA, glibenclamide, charybdotoxin, or apamin combined with a subeffective dose of hesperidin were able to produce a synergistic antidepressant-like effect in TST. Moreover, the antidepressant-like effect elicited by an effective dose of hesperidin in TST was abolished by the treatment with cromakalim or minoxidil. These results suggest that the antidepressant-like effect of hesperidin in TST may involve, at least in part, the modulation of neuronal excitability through inhibition of K⁺ channels and may act through a mechanism dependent on the inhibition of L-arginine-NO pathway; (iii) mangiferin produced an antidepressant-like effect in the forced swimming test (FST) and TST. Pretreatment with PCPA completely abolished the antidepressant-like effect induced by mangiferin. Pretreatment with WAY100635, but not with SB 224289, ritanserin, MDL 72222, GR 125487 or SB 269970 prevented the antidepressant-like effect of mangiferin in the TST. Combined treatment of mangiferin with paroxetine or sertraline demonstrated antidepressant-like effect. Also increased the hippocampal 5-HT levels, whereas 5-HIAA levels decreased in the cerebral cortex. The ratio of 5-HIAA/5-HT reduced significantly in the hippocampus and in cerebral cortex. Furthermore, mangiferin inhibited significantly synaptosomal [³H] 5-HT uptake. Taken together, mangiferin demonstrated that the antidepressant-like effect was mediated by 5-HT_{1A} receptors, probably due to alterations in the modulation of serotonergic system, decreasing the 5-HT turnover and blocking 5-HT reuptake; (iv) pretreatment with sulpiride, but not with SCH23390 or haloperidol prevented the antidepressant-like effect of mangiferin in the TST. A combinatory antidepressant-like effect in co-administration of subeffective doses of mangiferin

with apomorphine, but not with SKF 38393. Synergistic antidepressant-like effect of the combined administration of a subeffective doses of bupropion with mangiferin. In addition, tendency to increase the dopamine levels, associated with a decrease in DOPAC and HVA levels in the cerebral cortex, hippocampus and striatum, while significant reductions, were only observed in levels of DOPAC metabolite in the hippocampus. We also found a significant decrease in the dopamine turnover in the hippocampus and striatum. These results indicate that antidepressant-like the effect of mangiferin depends of the dopaminergic system modulation, mediated by dopamine D₂ receptors. Therefore, altogether the results suggest that these polyphenols may be a novel therapeutic strategy for the treatment of depression, as well as its association with conventional antidepressants, which could be used to reduce the dose of these drugs.

Keywords: Antidepressant-like. Polyphenols. Flavonoids. Xanthones. Hesperidin. Mangiferin.

LISTA DE FIGURAS

Revisão Bibliográfica

Figura 1: Desenvolvimento de drogas antidepressivas	26
Figura 2: Estrutura química básica dos flavonoides	30
Figura 3: Estruturas químicas de hesperidina e hesperetina. Hesperidina: R = rutinose (ramnose + glicose); Hesperetina: R = H	31
Figura 4: Estrutura química básica das xantonas	33
Figura 5. Estrutura química da mangiferina (1,3,6,7-tetrahidroxixantona-C2-beta-D-glicosada)	34
Figura 6. <i>Mangifera indica</i> L. (mangueira)	35

Manuscrito 1

Figure 1. Effect of the administration of mangiferin, fluoxetine and imipramine on immobility time in the TST and in the FST in mice. Time-course curve of the antidepressant-like effect caused by mangiferin (25 mg/kg, p.o.) administered 1, 2, 4, 6, 8 and 12 hours before the TST (panel A). Dose-response curve of mangiferin (0.2, 1, 5, 25 mg/kg, p.o.) administered 1 hour before the TST (panel B) and FST (panel C). Fluoxetine (32 mg/kg, p.o.) and imipramine (15 mg/kg, p.o.), were used as positive controls and they were administered 30 min before the TST or FST	26
Figure 2. Effect of pretreatment with PCPA (100 mg/kg; i.p. once a day per 4 consecutive days) on mangiferin-induced reduction in the immobility time in the mice TST. Mangiferin (5 mg/kg, p.o.) was administered 24 h after the last PCPA administration and 1 hour before the test	30
Figure 3. Effect of pretreatment with WAY100635 (0.1 mg/kg, s.c.; a selective 5-HT _{1A} receptor antagonist - panel A), SB 224289 (0.1 mg/kg, i.p., a 5-HT _{1B} receptor antagonist - panel B), ritanserin (1 mg/kg, i.p., a 5-HT _{2A/2C} receptor antagonist - panel C), MDL 72222 (0.1 mg/kg,	

i.p., a 5-HT ₃ receptor antagonist - panel D), GR 125487 (10 mg/kg, i.p., a 5-HT ₄ receptor antagonist - panel E) and SB 269970 (1 mg/kg, i.p., a 5-HT ₇ receptor antagonist - panel F) on mangiferin-induced reduction in the immobility time in the mice TST. Mangiferin (5 mg/kg, p.o.) was administered 30 min after antagonists and 1 hour before the test.....	31
Figure 4. Effects of the administration of a subeffective dose of mangiferin (1 mg/kg, p.o.) and subeffective dose of paroxetine (0.1 mg/kg, p.o.; panel A) or sertraline (1 mg/kg, p.o.; panel B) in the immobility time in the TST	33
Figure 5. Effect of administration of mangiferin (0.2 - 25 mg/kg, p.o.), diazepam (1mg/kg, s.c.) or vehicle (10mL/kg, p.o.) on anxiety-related behavior in the plus-maze test in mice. (A) Percentage of time spent in open arms. (B) Percentage of open arm entries	34
Figure 6. Effect of the administration of mangiferin (25 mg/kg, p.o.) and fluoxetine (10 mg/kg, p.o.) on synaptosomal [³ H]5-HT uptake in the cerebral cortex, hippocampus and striatum of mice	35
Graphical Abstract	79
Highlights	80

Manuscrito 2

Figure 1. Effect of pretreatment of mice with SCH23390 (0.05 mg/kg, s.c., a dopamine D ₁ receptor antagonist - panel A), sulpiride (50 mg/kg, i.p., a dopamine D ₂ receptor antagonist - panel B), haloperidol (0.2 mg/kg, i.p., a nonselective dopaminergic receptor antagonist - panel C) and treatment with mangiferin (5 mg/kg, p.o.) on the immobility time in the TST	101
Figure 2. Effect of co-administration of mice with subeffective doses of SKF38393 (0.1 mg/kg, s.c., a selective dopamine D ₁ receptor agonist - panel A) or apomorphine (0.5 mg/kg, i.p., preferential agonist of dopamine D ₂ receptor - panel B) with subeffective dose of mangiferin (1 mg/kg, p.o.) on the immobility time in the TST	103
Figure 3. Effect of pretreatment of mice with AMPT (100 mg/kg; i.p., an inhibitor of tyrosine hydroxylase, a critical enzyme for the synthesis of DA and NE - panel A), prazosin (1 mg/kg, i.p., an α_1 -adrenoceptor antagonist - panel B), yohimbine (1 mg/kg, i.p., an α_2 -adrenoceptor antagonist - panel C), propranolol (2 mg/kg, i.p., a β -adrenoceptor antagonist - panel D) and treatment with mangiferin (5 mg/kg, p.o.) on the immobility time in the TST	104

Figure 4. Effect of co-administration of mice with subeffective doses of antidepressants bupropion (1 mg/kg, p.o., a DA reuptake inhibitor with subtle activity on NE reuptake - panel A) or reboxetine (2 mg/kg, p.o., a selective NE reuptake inhibitor - panel B) with subeffective dose of mangiferin (1 mg/kg, p.o.) on the immobility time in the TST 106

Highlights 110

LISTA DE TABELAS

Revisão Bibliográfica

Tabela 1: Critérios diagnósticos da depressão maior de acordo com o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais, quinta edição (DSM-V)	22
Tabela 2: Transtorno depressivo maior categorizado em características melancólicas e atípicas de acordo com o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais, quinta edição (DSM-V)	23

Manuscrito 1

Table 1. Effect of treatment with mangiferin on levels of the 5-HT and 5-HIAA in the cerebral cortex, hippocampus and striatum of mice	78
---	----

Manuscrito 2

Table 1. Effect of treatment with mangiferin on levels of the DA, DOPAC and HVA in the cerebral cortex, hippocampus and striatum of mice	107
Table 2. Effect of treatment with mangiferin on levels of the NE and MHPG in the cerebral cortex, hippocampus and striatum of mice	109

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5'-AMP - Monofosfato de adenosina

5-HIAA - Ácido 5-hidroxiindoleacético (do inglês, *hydroxyindole acetic acid*)

5-HT – Serotonina

5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{2A/2C}, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT₇- Subtipos de receptores serotoninérgicos

6-OHDA - 6-hidroxidopamina

7-NI - 7-nitroindazole

ADTC - Antidepressivo tricíclico

AMPc - Adenosina-5'-monofosfato cíclico

AMPT - (do inglês, *α-methyl-ρ-tyrosine*)

ATP - Trifosfato de adenosina

BDNF - Fator neurotrófico derivado do cérebro (do inglês, *brain-derived neurotrophic factor*)

Ca²⁺ - Íon cálcio

D₁ e D₂ - Subtipos de receptores dopaminérgicos

DA – Dopamina

DAT - Transportador de dopamina

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DOPAC - 3,4-di-hidroxifenilacético (do inglês, *3,4-dihydroxyphenylacetic acid*)

DSM-V - Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais – quinta edição (do inglês, *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders Manual – Fifth Edition*)

FDA – (do inglês, *Food and Drug Administration*)

GCs - Guanilato ciclase solúvel

GLUT-4 - Transportador de glicose-4

GMPc - Guanosina 3',5'-monofosfato cíclica

GR125487 - (do inglês, *(1-[2-[methyl sulphonyl]-amino]ethyl)-4-piperidinyl-methyl 5-fluoro-2-methoxy-1H-indole-3-carboxylate*)

GTP - Guanosina 5'-trifosfato

HIV - Vírus da imunodeficiência humana

HVA - Ácido homovalínico

HVA - Ácido homovanílico (do inglês, *homovanillic acid*)

IMAO - Inibidores da monoamina oxidase

IRND - Inibidor da recaptação dopamina

IRSN - Inibidor da recaptação de serotonina e noradrenalina

ISRS - Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina (do inglês, *selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs)*)

K⁺ - íon potássio

LCE - Labirinto em cruz elevado (do inglês, *elevated plus-maze (EPM)*)

L-NNA - NG-nitro-L-arginina

LPS - Lipopolissacarídeo

MAO – Monoamina oxidase

MAO-A – Monoamina oxidase tipo A

MAO-B – Monoamina oxidase tipo B

MB - Azul de metileno

MDL 72222 - (do inglês, *3-tropanyl-3,5-dichlorobenzoate*)

MHPG - 3-metoxi-4-hidroxifeniletlenoglicol (do inglês: *4-hydroxy-3-methoxyphenylglycol*)

NE – Norepinefrina

NET - Transportador da norepinefrina

NF-κβ - Fator nuclear kappa β

NO - Óxido nítrico

NOS - Óxido nítrico sintase

NO_x - Nitrato/nitrito

ODQ - 1H-[1,2,4]Oxadiazol[4,3-a]quinoxalin-1-ona]

OMS - Organização Mundial de Saúde (do inglês, *World Health Organization - WHO*)

PCPA - (do inglês, *p-chlorophenylalanine methyl ester*)

PDE - Fosfodiesterase

PPAR-gama - Proliferadores de peroxissoma gama

SB 224289 - (do inglês, *1'-methyl-5-[2'-methyl-4'-(5-methyl-1,2,4-oxadiazol-3-yl)-biphenyl-4-ylcarbonyl]-2,3,6,7-tetra-hydro-5H-spiro[furo[2,3-f]indole-3,4'-piperidine*)

SB269970 - (do inglês, *((2R)-1-[(3-hydroxyphenyl)sulfonyl]-2-[2-(4-methyl-1-piperidinyl)ethyl]pyrrolidine hydrochloride)*)

SCH23390 - (do inglês, *R-(p)-7-chloro-8-hydroxy-3 methyl-1-phenyl-2,3,4,5-tetrahydro-1H-3-benzazepine hydrochloride*)

SERT – Transportador de serotonina

SKF38393 - (do inglês, *(7)-1-phenyl-2,3,4,5-tetrahydro-1H-3-benzazepine-7,8-diol hydrochloride*)

SNAP - S-nitroso-N-acetil-penicilamina

SNC - Sistema nervoso central

TEA – Tetraetilamônio

TNF - Teste do nado forçado (do inglês: *Forced swimming test - FST*)

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

TSC - Testes de suspensão da cauda (do inglês, *Tail suspension test - TST*)

WAY100635 - (do inglês, *N-N-(2-pyridinyl) cyclohexanecarboxamide*)

SUMÁRIO

RESUMO	iv
ABSTRACT	vi
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xii
1 INTRODUÇÃO.....	18
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 Depressão.....	20
2.1.1 Epidemiologia da depressão.....	20
2.1.2 Fatores de Risco	20
2.1.3 Características Diagnósticas.....	21
2.1.4 Terapia para o tratamento da depressão	24
2.2 POLIFENÓIS NA TERAPIA DA DEPRESSÃO	29
2.2.1 Flavonoides	30
2.2.1.1 Hesperidina.....	31
2.2.2 Xantonas.....	32
2.2.2.1 Mangiferina	33
2.3 MODELOS ANIMAIS	37
3 OBJETIVOS.....	38

3.1 Objetivos Gerais	38
3.2 Objetivos Específicos	39
4 RESULTADOS	40
4.1 Artigo Científico 1	41
4.2 Artigo Científico 2	43
4.3 Manuscrito 1	44
4.4 Manuscrito 2	81
5 DISCUSSÃO GERAL.....	111
6 CONCLUSÕES	122
REFERÊNCIAS	123
ANEXOS	140

APRESENTAÇÃO

A presente tese foi dividida em três partes principais. Na **parte I** encontram-se a **INTRODUÇÃO, REFERENCIAL TEÓRICO e OBJETIVOS**. Os resultados que fazem parte desta tese estão apresentados sob a forma de dois artigos científicos e dois manuscritos, os quais se encontram na **parte II** deste trabalho. As seções materiais e métodos, resultados, discussão dos resultados e referências bibliográficas, encontram-se nos próprios artigos científicos e manuscritos e representam a íntegra deste estudo. Os itens **DISCUSSÃO GERAL** e **CONCLUSÃO** encontram-se na **parte III** desta tese, apresentam interpretações e comentários gerais sobre os resultados apresentados nos artigos científicos e manuscritos desta tese. O item **REFERÊNCIAS** refere-se somente às citações que aparecem nos itens introdução, referencial teórico, discussão geral e conclusão desta tese. No item **PERSPECTIVAS**, estão expostos os possíveis estudos para dar continuidade a este trabalho.

PARTE I

1 INTRODUÇÃO

A depressão tornou-se alvo de grandes discussões em saúde mental na contemporaneidade por ser uma das condições neuropsiquiátricas mais comuns (Association of American Psychiatry, 2013). Levantamentos estatísticos realizados pela Organização Mundial de Saúde (World Health Organization – WHO 2015) estimam que 400 milhões de pessoas em todo mundo sejam afetadas pela depressão. Além disso, tais levantamentos revelaram que nos dias atuais a depressão representa uma das principais causas de incapacitação dos indivíduos para realizarem seus afazeres profissionais, bem como de vivenciarem sua existência nas dimensões sociais e coletivas, isto devido à introspecção e ao isolamento que tais estados afetivos implicam (WHO, 2015). Em vista disso, é relevante ressaltar a importância exercida pelos modelos animais para depressão que apresentam validade fenomenológica além da validade preditiva (Nestler & Hyman, 2010). Estes modelos se tornam cada vez mais imprescindíveis, sendo sensíveis aos fármacos utilizados clinicamente e ainda mimetizam em animais sintomas ou efeitos neurobiológicos associados à depressão (Kaffman & Krystal, 2012). Desta maneira, podendo propiciar uma ampliação nas possibilidades de busca de novas moléculas farmacologicamente ativas, contribuindo assim, para o futuro desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas.

Na última década tem progredido significativamente a nível mundial o interesse em identificar, pesquisar e desenvolver cientificamente moléculas derivadas de espécies de origem natural, que são potentes farmacologicamente e que possuam baixos ou nenhum efeito colateral para uso no tratamento de patologias que acometem invariavelmente a população, como em doenças psiquiátricas, incluindo a depressão (Zhang, 2004; Newman & Cragg, 2012). Alguns fatores têm contribuído para este aumento de interesse e entre eles está a grande eficácia clínica, já que as plantas produzem quantidade significativa de moléculas que são consideradas potencialmente ativas, não apenas pela utilização direta de seus constituintes como agentes terapêuticos, mas como precursores na síntese de novas drogas e compostos farmacologicamente ativos (Pan et al., 2013). Deste modo, estas moléculas podem representar uma fonte potencial de novos compostos com atividade biológica para síntese de novos fitomedicamentos (Newman & Cragg, 2012).

Dentre as substâncias biologicamente ativas isoladas das plantas estão os polifenóis, naturalmente presentes como metabólitos secundários e concentram diversos efeitos biológicos que ilustram o seu papel promissor como agentes terapêuticos em várias doenças agudas e crônicas (Quideau et al., 2011; Pathak et al., 2013). Estudos de neuroquímica mostraram que alguns desses polifenóis modulam vários neurotransmissores no cérebro que estão envolvidos na fisiopatologia de várias doenças neuropsiquiátricas e neurodegenerativas (Ebrahimi & Schluesener, 2012).

Neste contexto destacam-se dois polifenóis que vêm recebendo cada vez mais atenção no meio científico como importantes compostos biologicamente ativos utilizados na medicina tradicional devido à versatilidade de atividades biológicas que apresentam, surgindo como uma importante alternativa terapêutica, que estimula testes bioquímicos e/ou farmacológicos, já que estudos têm demonstrado seus efeitos (Jyotshna et al., 2016; Roohbakhsh et al., 2014). A hesperidina (3',5,7-tri-hidroxi-4'-metoxi-flavanona-7-ramnoglicosídeo), um flavonoide da subclasse flavanona, polifenól encontrado principalmente em frutos cítricos (Yang et al., 2012) e a mangiferina (1,3,6,7-tetrahidroxixantona-C2-beta-D-glicosada), uma xantona glicosilada – um composto bioativo da manga encontrado na casca, frutas, raízes e folhas de *Mangifera indica* Linn (Martin & Qian, 2008).

Considerando o exposto, a importância deste estudo se justifica tendo em vista a elevada incidência de depressão, a necessidade de melhorar a compreensão dos mecanismos moleculares e da fisiopatologia deste transtorno e o desenvolvimento de terapias alternativas utilizando moléculas que possam aumentar a eficácia clínica para o tratamento desta doença. Deste modo, este trabalho buscará fornecer uma possível alternativa terapêutica bem como investigar os mecanismos bioquímicos e farmacológicos envolvidos no efeito tipo antidepressivo da hesperidina e da mangiferina em camundongos. No estudo pré-clínico da depressão, os modelos animais têm se mostrado ferramentas indispensáveis na identificação de compostos com possível efeito farmacológico, bem como na elucidação sobre as bases neurobiológicas envolvidas nestas patologias. Assim sendo, o estudo do efeito tipo antidepressivo e dos mecanismos envolvidos no efeito farmacológico da hesperidina e da mangiferina em modelos animais, poderá em longo prazo, auxiliar no desenvolvimento de um composto de baixo custo e fácil acesso pela população, o qual poderá auxiliar na terapêutica convencional da depressão.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Depressão

2.1.1 Epidemiologia da depressão

A depressão é um dos transtornos mentais mais prevalentes e uma das principais causas de incapacidade em todo o mundo. Globalmente, cerca de 400 milhões de pessoas de todas as idades sofrem de depressão (WHO, 2015). A Organização Mundial da Saúde (World Health Organization - WHO) descreve a depressão como um dos principais contribuintes para a carga global de doenças. A depressão é diferente das flutuações de humor habituais em respostas emocionais de curta duração para os desafios na vida cotidiana. Devido aos seus sintomas, acarretam muito sofrimento e conseqüentemente acomete a vida do indivíduo tanto no trabalho ou escola, como na família. O transtorno depressivo está relacionado com alta mortalidade, em boa parte contabilizada com o suicídio; entretanto não é a única causa. Resultados suicidas estão estimados em um número de 1 milhão de mortes todos os anos (WHO, 2015). O transtorno depressivo é caracterizado por episódios envolvendo alterações nítidas no afeto, na cognição e em funções neurovegetativas com remissões interepisódicas (Association of American Psychiatry, 2013). Esses fatores isolados ou combinados induzem um estado de vulnerabilidade no indivíduo (Davidson, 2011).

2.1.2 Fatores de Risco

Causas externas foram os principais fatores de risco relatados para promover o início do transtorno depressivo maior, especialmente os temperamentais associados com a afetividade negativa (neuroticismo), assim como os ambientais, através de experiências adversas na infância (trauma no início da vida, maus tratos), particularmente quando existem múltiplas experiências de tipos diversos, constituem um conjunto de fatores de risco potenciais para

transtorno depressivo maior. Desta forma, os eventos estressantes na vida (estressores psicossociais) são bem reconhecidos como precipitantes de episódios depressivos maiores. Ainda existem os modificadores de curso que se desenvolvem no contexto de outro transtorno, ansiedade, ao uso de medicamentos e condições médicas crônicas. Doenças prevalentes como diabetes, obesidade mórbida e doença cardiovascular são frequentemente complicadas por episódios depressivos, e esses episódios têm mais probabilidade de se tornarem crônicos do que os episódios depressivos em indivíduos saudáveis (Association of American Psychiatry, 2013). No entanto, existem também os riscos relativos a fatores genéticos e fisiológicos que predisõem uma pessoa tornar-se depressiva. Os familiares de primeiro grau de indivíduos com transtorno depressivo maior têm risco 2 a 4 vezes mais elevado de desenvolver a doença que a população em geral. Os riscos relativos parecem ser mais altos para as formas de início precoce e recorrente. A herdabilidade é de aproximadamente 40%, e o traço de personalidade neuroticismo representa uma parte substancial dessa propensão genética (Association of American Psychiatry, 2013).

2.1.3 Características Diagnósticas

De acordo com o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, DSM-V, 2013) (**Tabela 1**), a pessoa diagnosticada com depressão quando cinco (ou mais) dos seguintes sintomas listados abaixo estiverem presentes durante o período de duas semanas, sendo pelo menos um dos sintomas humor deprimido ou perda de interesse ou prazer.

A condição clínica observada nos pacientes com depressão causa sofrimento clinicamente significativo ou prejuízo no funcionamento social, profissional ou em outras áreas importantes da vida do indivíduo (Association of American Psychiatry, 2013).

Embora exista ampla literatura descrevendo correlatos neuroanatômicos, neuroendócrinos e neurofisiológicos do transtorno depressivo maior, nenhum teste laboratorial produziu resultados de sensibilidade e especificidade suficientes para serem usados como ferramenta diagnóstica para esse transtorno (Association of American Psychiatry, 2013). No DSM-V especificadores diferentes são utilizados para diagnosticar as subcategorias específicas de diferentes tipos de depressão maior, incluindo "com características atípicas", "com características melancólicas", "com sintomas ansiosos", "com características mistas", "com

características psicóticas", "com catatonia", "com início do periparto", e "com padrão sazonal". Além disso, são descritos os critérios para severidade e cronicidade.

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

-
- (1) Humor deprimido na maior parte do dia, quase todos os dias, conforme indicado por relato subjetivo (p. ex., sente-se triste, vazio, sem esperança) ou por observação feita por outras pessoas (p. ex., parece choroso);
- (2) Acentuada diminuição do interesse ou prazer em todas ou quase todas as atividades na maior parte do dia, quase todos os dias (indicada por relato subjetivo ou observação feita por outras pessoas);
-
- (3) Perda ou ganho significativo de peso sem estar fazendo dieta (p. ex., uma alteração de mais de 5% do peso corporal em um mês), ou redução ou aumento do apetite quase todos os dias.
- (4) Insônia ou hipersonia quase todos os dias;
- (5) Agitação ou retardo psicomotor quase todos os dias (observáveis por outras pessoas, não meramente sensações subjetivas de inquietação ou de estar mais lento);
- (6) Fadiga ou perda de energia quase todos os dias;
- (7) Sentimentos de inutilidade ou culpa excessiva ou inapropriada (que podem ser delirantes) quase todos os dias (não meramente autorrecriinação ou culpa por estar doente);
- (8) Capacidade diminuída para pensar ou se concentrar, ou indecisão, quase todos os dias (por relato subjetivo ou observação feita por outras pessoas);
- (9) Pensamentos recorrentes de morte (não somente medo de morrer), ideação suicida recorrente sem um plano específico, uma tentativa de suicídio ou plano específico para cometer suicídio.
-

Fonte: Manual Diagnóstico e Estatístico dos Distúrbios Mentais (American Psychiatric Association, 2013).

Notavelmente, alguns sintomas na descrição do DSM-V da depressão maior são extremos opostos um do outro e levam a diferentes subcategorias de depressão maior (Korte et al., 2015), estes sintomas opostos fortemente sugerem diferenças na neuropsicopatologia subjacente. Um resumo pode ser observado na (**Tabela 2**), na quale o transtorno depressivo maior foi categorizado em características melancólicas e atípicas de acordo com o DSM-V.

Tabela 2. Transtorno depressivo maior categorizado em características melancólicas e atípicas de acordo com o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais, quinta edição (DSM-V).

Características atípicas	Características melancólicas
Anedonia paradoxal (prazer à curto prazo)	Anedonia (nenhum prazer na maioria das atividades)
Reatividade do humor (i.e., o humor melhora em resposta a eventos positivos reais ou potenciais)	Falta de reatividade à estímulos em geral prazerosos
Ganho de peso ou aumento do apetite significativos (alimentação conforta)	Humor depressivo caracterizado por prostração profunda
Sono ou sonolência excessiva (hipersonia)	Perda de peso ou diminuição do apetite
Fadiga e perda de energia	Despertar muito cedo pela manhã, pelo menos 2 horas antes do habitual (hiposonia)
Sensação de peso nos braços e pernas: paralisia "de chumbo"	Acentuada agitação ou retardo psicomotor
Apatia (e/ou letargia)	Culpa excessiva ou inadequada
Hipersensibilidade à rejeição interpessoal, que resulta em significativo prejuízo social ou profissional significativo	Ansiedade generalizada
Fobia social	

Fonte: Manual Diagnóstico e Estatístico dos Distúrbios Mentais (American Psychiatric Association, 2013).

Pacientes melancólicos experimentam a perda de apetite, acompanhado da perda de peso, insônia e agitação psicomotora, enquanto que, em contraste, a depressão atípica está associada com o aumento do apetite, ganho de peso, fadiga, hipersonia e atraso psicomotor. A depressão melancólica é, além disso, associada com o aumento da ansiedade generalizada, menor capacidade de resposta aos estímulos ambientais. Depressão atípica, por outro lado, está associada com letargia, aumento da reatividade aos estímulos ambientais (isto é, humor deprimido pode levantar durante a fase depressiva, embora apenas temporariamente) (Association of American Psychiatry, 2013).

2.1.4 Terapia para o tratamento da depressão

A farmacoterapia para depressão foi introduzida na década de 50 com os inibidores da monoamina oxidase (IMAO), sendo que o primeiro antidepressivo descoberto foi a iproniazida em 1952, atuando através da inibição da enzima monoamina oxidase (MAO), enzima mitocondrial responsável pela degradação das monoaminas como dopamina, noradrenalina e serotonina e está localizada nos terminais nervosos de neurônios (Zeller & Barsky, 1952; Yamada & Yasuhara, 2004), contribuindo para uma melhor compreensão da etiologia da depressão, passando a valorizar as alterações biológicas, nos neurotransmissores e nos respectivos receptores. Conseqüentemente, após essa descoberta, foi postulado que a depressão maior está associada com uma diminuição da atividade sináptica de conexões neurais que empregam neurotransmissores de monoamina e concomitante diminuição nos níveis de neurotransmissores de monoamina no cérebro, conhecido como hipótese monoaminérgica (Schildkraut, 1965). Embora o primeiro IMAO tenha sido muito eficaz, também foi problemático devido as estritas dietas que eram necessárias para evitar conseqüências tóxicas e outros efeitos colaterais da droga. Também foram desenvolvidos inibidores seletivos e reversíveis da MAO, já que os primeiros causavam inibição irreversível da enzima MAO-A e MAO-B, como a selegilina. Os recentes avanços na tecnologia, no entanto, puderam aliviar alguns destes problemas de segurança, através da administração de IMAO (por exemplo, a selegilina) transdérmica (Stahl & Felker, 2008).

A imipramina foi o primeiro antidepressivo tricíclico (ADT), porém os ADTs também foram descritos por ter muitos efeitos colaterais adversos, além de serem facilmente passíveis de overdose, com possíveis conseqüências fatais. Os antidepressivos tricíclicos (ADTs) haviam se tornado a droga mais recomendada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para depressão maior no início de 1970. A busca por compostos relacionados quimicamente com a imipramina resultou na criação de vários análogos, como a desipramina, amitriptilina e nortriptilina. O desenvolvimento dos inibidores seletivos da recaptção de serotonina (ISRSs) mudou drasticamente o panorama da psicofarmacoterapia da depressão maior. Os ISRSs aumentam a concentração extracelular de serotonina (5-HT) ao inibir a sua recaptção pelo neurônio pré-sináptico, aumentando o nível de 5-HT disponível para se ligar ao receptor pós-sináptico (Chavez-Leon et al., 2008). O primeiro antidepressivo ISRSs utilizado foi o Fevarin® (fluvoxamina), no ano de 1983, e ainda é usado para depressão maior e transtorno obsessivo-

compulsivo. Em 1984, ele apareceu pela primeira vez no mercado na Suíça seguido por outros países da Europa em 1985 e 1986. Foi apenas em 1988 que o Prozac® (fluoxetina) apareceu nos EUA como um antidepressivo. Por causa da estratégia de marketing muito eficaz, Prozac® se tornou o número um dos antidepressivos. Muitos outros ISRSs surgiram, tais como paroxetina, sertralina, citalopram e escitalopram (o S-enantiómero do citalopram). Desta maneira os ISRSs substituíram os ADTCs, tornaram-se os medicamentos mais prescritos para o tratamento da depressão e distúrbios relacionados devido ao perfil de segurança e tolerabilidade em relação ao ADTC e IMAO (Rosenzweig-Lipson et al., 2007). Em 2006, no entanto, uma meta-análise feita pelo FDA mostrou um efeito colateral dos ISRS relacionado com a idade, indicando um maior risco de comportamento suicida entre adultos com idade inferior a 25 anos (Henry & Demotes-Mainard, 2006). Desde 2004, após os avisos de segurança da FDA e ampla cobertura da mídia, o uso de antidepressivos ISRS drasticamente diminuiu, também em pessoas jovens. Ao mesmo tempo, houve um aumento nas tentativas de suicídio entre os jovens (Lu et al., 2014). Os inibidores da recaptação de serotonina e noradrenalina (IRSN), como: venlafaxina, duloxetina e desvenlafaxina foram comercializados desde o início de 1990; descritos como sendo mais eficazes na depressão resistente aos tratamentos e também reduzem a recaída quando administrados à longo prazo após um episódio depressivo (Bauer et al., 2008). Embora estes compostos sejam eficazes em muitos pacientes que sofrem de depressão severa, um grande número de pacientes não responde à terapia, outro grupo de pacientes encontra sintomas residuais, tais como motivação e prazer prejudicados (Prins et al., 2011). Portanto, o papel da dopamina no tratamento da depressão tem sido postulado. Curiosamente, quando o sistema dopaminérgico é co-alvo, o tratamento antidepressivo parece ser mais eficaz (Prins et al., 2011).

A combinação do efeito de um antidepressivo com outro antidepressivo que tem um mecanismo de ação diferente tem sido uma abordagem para o tratamento de depressão resistente depois de uma falha de todas as outras estratégias, conforme resumido na Figura 1. A justificativa para esta abordagem é que a combinação de várias ações farmacológicas que afetam múltiplos alvos de monoamina produzem maior eficácia (Cascade et al., 2007). Muitos dos antidepressivos mais novos e mais eficazes já combinam múltiplos mecanismos de ação, os antidepressivos atípicos, aqueles cujo mecanismo de ação não compartilha características com os outros grupos citados anteriormente e atuam de diferentes formas. Por exemplo, bupropiona (um inibidor da recaptação de dopamina com uma fraca recaptação de noradrenalina - IRND); mirtazapina (antagonista de receptores α 2-adrenérgico / antagonista de receptores 5-HT_{2A}, 5-HT_{2C}/ antagonista de receptores histamínicos H₁); trazodona (antagonista

de receptores 5-HT₂ e inibidor da recaptação de 5-HT); e tianeptina, que tem um mecanismo de ação predominantemente serotoninérgico (Lucki & O'leary, 2004).

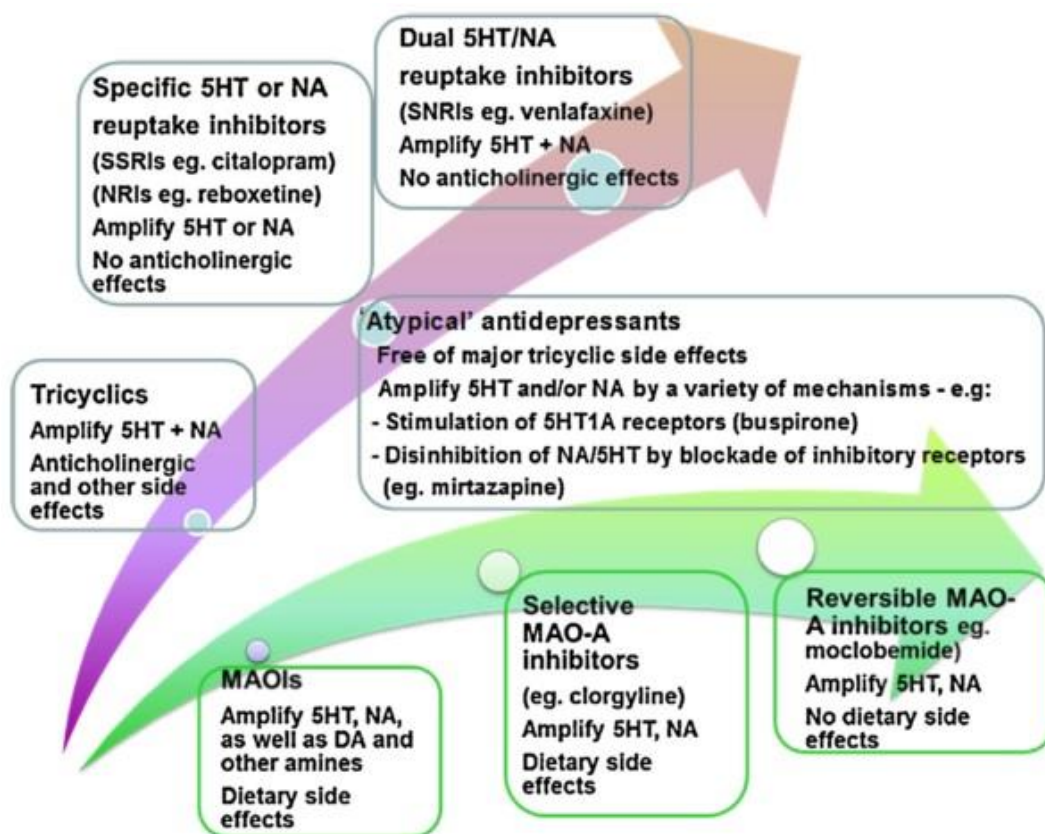


Figura 1. Desenvolvimento de drogas antidepressivas: vinho novo em velhas garrafas. A figura resume as maneiras pelas quais as cinco principais classes mais recentes de drogas antidepressivas representam melhorias do mecanismo introduzindo mecanismos nas classes originais, os antidepressivos tricíclicos e inibidores da monoamina oxidase. Fonte: (Willner, Scheel-Krüger & Belzung, 2013)

Apenas metade a três quartos dos pacientes mostram uma resposta clínica (50% de redução na intensidade dos sintomas depressivos) com sua primeira tentativa de tratamento antidepressivo (Rush et al., 2006; Trivedi et al., 2006). Assim, muitos pacientes permanecem com apenas uma resposta parcial ou nenhuma melhoria nos sintomas. Tradicionalmente, os médicos utilizam várias estratégias quando um paciente não responde ao tratamento inicial: rever o diagnóstico; o aumentar dose de antidepressivo; mudar para outro antidepressivo; aumentar o efeito de um antidepressivo com medicamentos de outros grupos. O padrão atual

de tratamento é de substituição de drogas, com ou sem um período de interrupção. No entanto, o tratamento antidepressivo deve durar pelo menos seis semanas, duas tentativas consecutivas, com diferentes medicações exigiria cerca de 3 meses. Da mesma forma, a estratégia de adicionar uma segunda medicação para um tratamento antidepressivo em curso requer a conclusão de um primeiro tratamento, considerando que a resposta atrasa na maioria dos pacientes e estes atrasos são significativos porque cerca de metade de todos os pacientes para de tomar seus antidepressivos nos primeiros meses (Bull et al., 2002).

Recentemente, o termo "multi-modal" foi descrito para compostos que contêm pelo menos dois modos distintos de efeitos farmacológicos que se complementam entre si em termos de eficácia ou tolerabilidade (Chang & Fava, 2010). A justificativa farmacológica para o uso de drogas multimodais no tratamento da depressão é clara. Em primeiro lugar, não existe uma causa única da depressão e uma série de fatores são pensados para afetar o humor e provocar transtornos afetivos. Por outro lado, numerosas redes neurais e, por conseguinte, neurotransmissores, foram implicadas no seu desenvolvimento (Maletic et al., 2007; Drevets et al., 2008). Estas redes envolvem o córtex pré-frontal e áreas afins no córtex, amígdala, hipocampo e gânglios basais. Em segundo lugar, as vias serotoninérgicas, noradrenérgicas, dopaminérgicas, gabaérgicas e glutamatérgicas têm sido implicados no desenvolvimento da depressão (Maletic et al., 2007). Como tal, estas estratégias de tratamento aplicadas na depressão são mais propensas para serem eficazes na maioria dos pacientes do que os agentes altamente seletivos (Maletic et al., 2007). Em terceiro lugar, os pacientes com depressão sofrem frequentemente uma vasta gama de sintomas relacionados tal como a disfunção cognitiva. Agentes com componentes de ação complementares têm uma maior chance de controlar tanto os distúrbios do humor da depressão e outros sintomas associados (Millan, 2009).

Nesse sentido, estas descobertas conduziram ao desenvolvimento dos inibidores triplos da recaptação de monoaminas (Chepenik et al., 2009), que bloqueiam simultaneamente o transportador de 5-HT (O'Connor et al., 2009), o transportador da norepinefrina (NET) e o transportador de dopamina (DAT) (Prins et al., 2011). Neste sentido, muitos antidepressivos estão atualmente em desenvolvimento clínico ou foram recentemente aprovados para depressão. Destes, existem atualmente dois que estão na classe dos chamados inibidores triplos da recaptação ou inibidores da recaptação de serotonina-noradrenalina-dopamina ou seja, os três neurotransmissores mais estreitamente ligados à depressão (Liang & Richelson, 2008). A amitifadine (anteriormente DOV 21.947) e DOV 216.303 (uma mistura racêmica de amitifadine que é um dos enantiômeros). Dessa potencialmente nova classe de medicamentos, amitifadine e DOV 216.303 são os mais avançados em desenvolvimento e são atualmente os únicos a

mostrar eficácia clínica na depressão. Ensaios com outros inibidores da recaptação tripla: SEP225289 (Sepracor Inc., 2009) e GSK372475 (Learned et al., 2012), não tiveram êxito e levaram a muitos questionamentos quanto a eficácia dos inibidores triplos na depressão. Amitifadine é um inibidor da recaptação triplo, com preferência para serotonina e com menor afinidade para transportadores de dopamina, além disso, foi relatado por ser bem tolerado, sem nenhum efeito sobre a função sexual e nenhum evento adverso sério (Tran et al., 2012).

Nos últimos anos, foram descritos outros três compostos multimodais com atividade antidepressiva clinicamente comprovada: vilazodone, aprovado para uso clínico nos EUA, vortioxetine (Lu AA21004), e que estão passando por revisão regulamentar e OPC-34712, que está em processo de desenvolvimento (Richelson, 2013; Pehrson & Sanchez, 2014). Vilazodone é um novo antidepressivo aprovado nos EUA para o tratamento da depressão pela Food and Drug Administration (FDA) (Laughren et al., 2011). O seu mecanismo de ação combina a inibição de recaptação de serotonina e agonismo parcial de receptores 5-HT_{1A}. Além disso, também é descrito o potencial do vilazodone em interagir com a neurotransmissão glutamatérgica (Richelson, 2013). O perfil de tolerabilidade é semelhante ao observado com os ISRSs; eventos adversos emergentes do tratamento notificados incluem diarreia, náuseas e sonolência (Laughren et al., 2011).

Vortioxetina é um antidepressivo multimodal experimental que também atua como um agonista parcial do receptor 5-HT_{1A}, antagonista de receptores 5-HT₃, 5-HT₇ e 5-HT_{1D}, bem como um inibidor de SERT. Neste caso, a inibição SERT é importante para a atividade antidepressiva e ansiolítica (Mørk et al., 2012). O seu perfil farmacológico indica potencial para transmissão de glutamato através dos receptores de 5-HT (Westrich et al., 2012). Adicionalmente, vortioxetine tem efeitos antagonistas nos receptores 5-HT₇ associados com o sono, ritmo circadiano e humor. As taxas de abandono devido aos efeitos adversos em pacientes tratados com vortioxetina também indicou um perfil de capacidade de melhor tolerância comparada com a venlafaxina (Mørk et al., 2012).

Brexpiprazol ou OPC-34712, é um novo composto atualmente sendo desenvolvido para depressão. É um análogo estrutural do aripiprazol e compartilha algumas de suas propriedades farmacológicas. Como para o aripiprazol, que é aprovado pelo FDA como terapia adjuvante para depressão, o brexpiprazol também está sendo desenvolvido como terapia adjuvante. De acordo com seus desenvolvedores Otsuka e Lundbeck, ele tem: "ampla atividade através de múltiplos sistemas monoamina e pela atividade agonista parcial de receptores de dopamina D₂ e maior afinidade para os receptores específicos de serotonina (por exemplo, 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} e 5-HT₇). Os resultados de fase 2 para brexpiprazol como um tratamento adjunto a outros

antidepressivos foi apresentada em pacientes que foram provados ter uma resposta inadequada aos antidepressivos (uma das seguintes opções: a desvenlafaxina, escitalopram, fluoxetina, paroxetina, sertralina; venlafaxina) dentro do mesmo episódio, tratamento adjunto com brexpiprazol melhorou significativamente o quadro (Otsuka Ltd, 2011).

2.2 POLIFENÓIS NA TERAPIA DA DEPRESSÃO

Os polifenóis representam uma classe de moléculas biologicamente ativas, que compreendem taninos, flavonoides, ácidos fenólicos, xantonas, ligninas e lignanas e suas variantes estruturais, distribuídos em plantas como metabólitos secundários (Perron & Brumaghim, 2009).

Essas substâncias ocorrem naturalmente em algumas frutas e bebidas (suco de fruta, vinho, chá, café, chocolate e cerveja) e, em menor quantidade, em vegetais, legumes secos e cereais (Han et al., 2007). Além disso, fornecem cor e sabor a diferentes partes das plantas e também desempenham um papel importante na resistência contra vários agentes patogênicos e protegem contra a radiação ultravioleta e toxinas (Han et al., 2007).

Numerosos estudos têm demonstrado o envolvimento destes polifenóis na regulação das funções cerebrais (Arora et al., 2011; Park et al., 2010; Yoshimura et al., 2003). Estes micronutrientes, por exemplo, estão envolvidos no processo de aprendizagem e de memória, prevenindo a neuroinflamação, além de apresentarem um potencial antioxidante (Kulkarni et al., 2008; Mei et al., 2011; Sanmukhani et al., 2011). A estimativa neuroquímica mostrou que alguns desses polifenóis modulam vários neurotransmissores no cérebro que estão envolvidos na fisiopatologia de várias doenças neuropsiquiátricas e neurodegenerativas (Ebrahimi & Schluesener, 2012). Por exemplo, a curcumina encontrada na *Curcuma longa*, modula a neurotransmissão serotoninérgica e dopaminérgica no cérebro e, portanto, pode ser útil como um agente antidepressivo (Kulkarni et al., 2008).

Além disso, muitos estudos têm se concentrado nos diversos efeitos biológicos que vão além do envolvimento do sistema nervoso central (SNC), ilustrando seu papel promissor em várias doenças agudas e crônicas, tais como distúrbios cardiovasculares e metabólicos (Agouni et al., 2009; Visioli et al., 1998), inflamação e câncer (Middleton et al., 2000), estresse oxidativo (Urquiaga & Leighton, 2000), isquemia cerebral (Simonyi et al., 2005) e obesidade (Scalbert et al., 2005; Tian, 2006).

Desse modo, com base nas promissoras propriedades farmacológicas apresentadas por esta classe de compostos e tendo em vista o importante papel na regulação das funções cerebrais observadas, há uma perspectiva emocionante na descoberta de polifenóis naturais como possíveis agentes terapêuticos para o tratamento da depressão.

2.2.1 Flavonoides

Os flavonoides compõem um grupo de polifenóis que tem atraído interesse como agentes terapêuticos potenciais, devido aos inúmeros efeitos farmacológicos em que estão envolvidos (Kamboh et al., 2015). A estrutura básica dos flavonoides é formada por $C_6-C_3-C_6$, a qual consiste de dois anéis aromáticos (A e B) unidos por três carbonos, formando um anel pirano (C) (Figura 2).

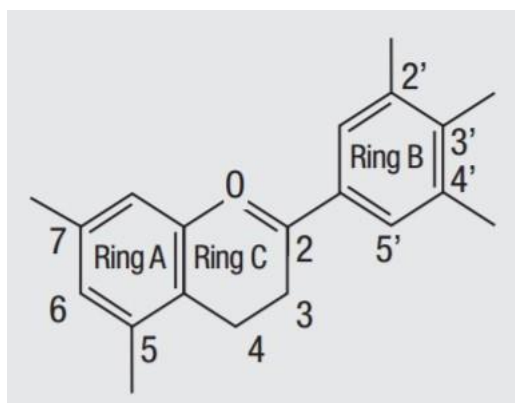


Figura 2: Estrutura química básica dos flavonoides. (Fonte: D'Archivio et al., 2007)

De acordo com o estado de oxidação do anel pirano os flavonoides são divididos em seis subclasses: flavonóis, flavonas, flavanonas, isoflavonas, antocianidinas, flavanóis (Jaganatah & Crozier, 2010). Mais de 4.000 flavonoides já foram identificados (D'Archivio et al, 2007).

A distribuição das flavanonas nos alimentos é limitada, ocorrendo teores elevados nas frutas cítricas e seus sucos, principalmente em diversas variedades de laranjas, porém sendo encontradas poucas quantidades em tomates e algumas plantas aromáticas como a hortelã. Em frutas cítricas, as flavanonas são responsáveis por aproximadamente 95% do conteúdo total de

flavonoides (Peterson et al, 2006). Desta forma, indivíduos que consomem alimentos cítricos regularmente, apresentam uma exposição relativamente alta a esta classe de flavonoides (Pandey & Rizvi, 2009).

2.2.1.1 Hesperidina

A hesperidina (3',5,7-tri-hidroxi-4'-metoxi-flavanona-7-ramnoglicosídeo), um flavonoide da subclasse flavanona, é encontrada principalmente em frutos cítricos (Yang et al., 2012). Sua forma aglicona é chamada hesperetina. A hesperetina acoplada com o dissacarídeo rutinose é o composto hesperidina em si (Figura 3). O dissacarídeo é composto por uma molécula de ramnose e uma molécula de glicose (Garg et al, 2001).

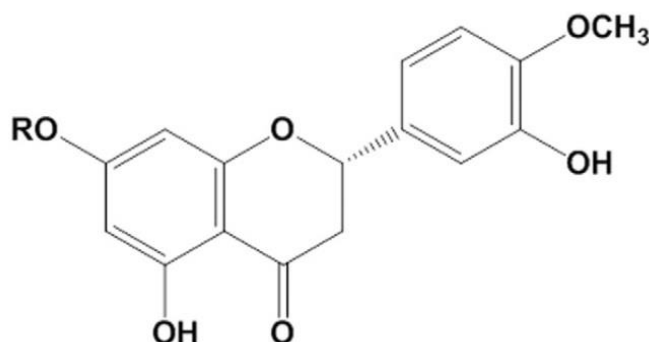


Figura 3: Estruturas químicas de hesperidina e hesperetina. Hesperidina: R = rutinose (ramnose + glicose); Hesperetina: R = H. (Fonte: Iranshahi et al., 2015).

A hesperidina é comumente utilizada na medicina tradicional como um produto combinado, associação de 50 mg de hesperidina e 450 mg de diosmin, é o Daflon – 500 mg[®]. Diosmin é outro flavonoide, diferindo da hesperidina apenas pela insaturação entre o C₂ e C₃, sendo dessa forma uma flavona, enquanto a hesperidina é uma flavonona, que não possui essa insaturação (Guillot et. al, 1989; Hnátek L., 2015).

Daflon – 500 mg[®] tem demonstrado uma grande variedade de atividades farmacológicas incluindo efeitos benéficos em humanos com insuficiência venosa crônica, indicado principalmente para anormalidades circulatórias que envolvem o aumento da

permeabilidade dos vasos, que resultam em hematomas e varizes. Duzentas e cinquenta mulheres utilizaram dois tablets da droga por dia durante um ano. Os resultados obtidos demonstraram a eficácia da droga no alívio dos sintomas como cólicas noturnas e edemas (Garg et al., 2001).

Além do seu efeito na permeabilidade vascular, a hesperidina exibe atividade antioxidante e anti-inflamatória (Ahmad et al., 2012; Hirata et al., 2005; Parhiz et al., 2015; Yang et al., 2012). Também já foi descrita como efeitos anti-neoplásicos (Lee et al., 2010) e neuroprotetores (Hwang & Yen, 2008). A eficácia neuroprotetora da hesperidina é atribuída à sua capacidade de inibir NOS em processos neurodegenerativos incluindo a doença de Huntington, disfunção de memória induzida por isquemia/reperfusão cerebral e danos cerebrais induzidos por acidente vascular cerebral (Ikemura et al., 2012; Kumar & Kumar, 2010; Raza et al., 2011).

Os polifenóis são alvo de estudos do nosso grupo de pesquisa, que tem se dedicado em investigar as propriedades farmacológicas e toxicológicas desses compostos. A crisina, um membro importante da família dos flavonoides, mostrou prevenir o declínio cognitivo relacionado com a idade, através da atenuação do estresse oxidativo e da modulação dos níveis do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), no cérebro de camundongos idosos (Souza et al., 2015). Já a hesperidina, demonstrou um efeito protetor na neurotoxicidade induzida por 6-hidroxidopamina (6-OHDA) em camundongos idosos, indicando que poderia ser útil como uma terapia para o tratamento da doença de Parkinson (Antunes et al., 2014).

Dentre os polifenóis estudados pelo nosso grupo de pesquisa, com grande relevância destaca-se o flavonoide hesperidina. Em estudos envolvendo modelos experimentais de depressão, este flavonoide apresenta efeito tipo antidepressivo através da modulação de receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A} e opióides kappa em camundongos no TSC (Filho et al., 2013; Souza et al., 2013). Além disso, nosso grupo também mostrou que o efeito tipo antidepressivo observado após tratamento com hesperidina no modelo de bulbectomia olfatória, está relacionado com a modulação de citocinas pró-inflamatórias, em que estas ajudariam a manter a plasticidade cerebral, e com a regulação da atividade da acetilcolinesterase observada após alterações induzidas por bulbectomia olfatória, em camundongos (Antunes et al., 2016).

2.2.2 Xantonas

Xantonas são polifenóis naturais presentes em plantas superiores, fungos e líquens (Vieira & Kijjoa, 2005). Elas são metabólitos secundários derivados da dibenzo- γ -pirona. Podem ser classificadas em cinco grandes grupos: xantonas simples oxigenadas, xantonas glicosiladas, xantonas preniladas e seus derivados, xantonolignoides, e xantonas variadas (Jiang et al., 2004).

Na estrutura básica das xantonas podemos observar um composto heterocíclico oxigenado, em que os carbonos numerados de 1-4 e de 5-8 são os dos carbonos que podem ser substituídas, resultando em uma variedade de derivados xantônicos que podem ser obtidos por meios naturais (Vieira & Kijjoa, 2005) ou por rotas sintéticas (Sousa & Pinto, 2005), já as demais posições não estão susceptíveis a introdução de nenhum grupamento químico, pois já são completamente substituídas (Figura 4).

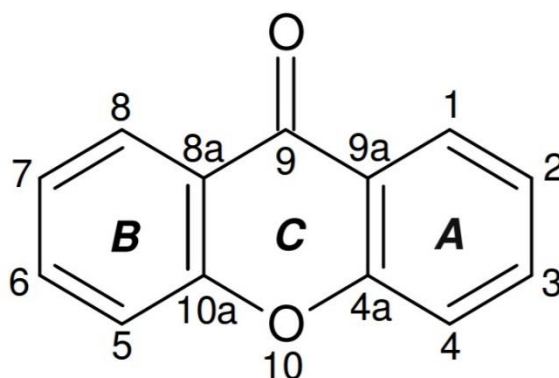


Figura 4: Estrutura química básica das xantonas. (Fonte: Kuster et al., 2003).

As bioatividades destes compostos dependem do seu núcleo tricíclico, bem como da natureza e/ou posição dos seus diversos substituintes, tornando-os uma "estrutura privilegiada" susceptível à ligação de uma variedade de alvos (Lesch & Bräse, 2004; Vieira & Kijjoa, 2005). Deste modo, mais de 250 deles mostraram apresentar diversas atividades biológicas, incluindo atividades antimicrobianas, antioxidantes e citotóxicas (El-Seedi et al., 2010).

2.2.2.1 Mangiferina

A mangiferina (2-C-β-D- glicopiranosil-1,3,6,7-tetrahidroxixantona), é uma xantona glicosilada presente na mangueira (Figura 5), podendo ser detectada nas folhas, casca do caule, fruto e raízes como um dos constituintes fenólicos majoritários (Richardson, 1983), porém, além desta substância, os extratos contêm uma mistura de componentes terpenóides, esteróides, ácidos graxos e microelementos (Garrido et al., 2004).

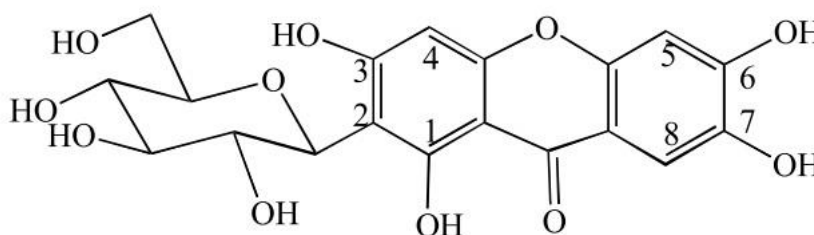


Figura 5. Estrutura química da mangiferina (1,3,6,7-tetrahidroxixantona-C2-beta-D-glicosada). (Fonte: Benard & Chi, 2015)

Além disso, este composto bioativo da manga - a mangiferina, é um composto muito estável, altamente resistente a hidrólise ácida e enzimática, representando 6,9% na *Mangifera indica* L. de acordo com Scartezzini & Speroni (2000). Quanto a composição química de partes diferenciadas da mangueira, a mangiferina é o composto fenólico mais abundante da casca do caule e das folhas jovens, o segundo maior componente nas folhas velhas, e o terceiro mais abundante da casca do fruto e do caroço; no fruto, o conteúdo de mangiferina varia com o estágio de maturação, havendo decréscimo à medida que a manga amadurece (Barreto et al., 2008). Todas as partes da planta *Mangifera indica* a partir de sementes e flores até cascas do caule e folhas são usados na medicina tradicional do sul da Ásia, mas os frutos são mais importantes, sendo utilizados na forma de extratos aquosos de diferentes tipos (maceração, percolação, decocção e infusão), fazendo parte da cultura popular de mais de 30 países. As cascas do caule de *Mangifera indica* é descrita por ser utilizada por diversos países para o tratamento de menorragia, diarreia, sífilis, diabetes, escabiose, infecções cutâneas e anemia, sob a forma de extrato aquoso, obtido por decocção como relatado no Napralert Database (Scartezzini & Speroni, 2000).



Figura 6. *Mangifera indica* L. (mangueira). Fonte: Canutto (2009).

O seu uso na medicina tradicional do sul da Ásia motivou estudos que foram realizados em Cuba, com o extrato aquoso das cascas de *Mangifera indica*, que resultaram em uma formulação farmacêutica com nome fantasia de Vimang® (Núñez-Sellés et al., 2007). O principal componente deste extrato é a xantona glicosilada mangiferina. Porém, além desta substância, o extrato contém também uma mistura de componentes já mencionados anteriormente, terpenóides, esteróides, ácidos graxos e microelementos (Correia et al., 2006). Encontra-se descrito na literatura que Vimang® apresenta atividades imunoestimulante (Makare et al., 2001), antiinflamatória (Garrido et al., 2004), antioxidante (Sanchez et al., 2000; Muruganandan et al., 2002), citotóxica e antineoplásica (Beltrán et al., 2004). Estudos realizados com Vimang® demonstraram que ele é um poderoso sequestrador de radicais hidroxil e ácido hipocloroso, exercendo efeito inibitório sobre a peroxidação de fosfolipídios em cérebro de ratos e inibição de danos ao ácido desoxirribonucléico (DNA). Além destes, apresenta propriedades de proteção contra a produção de espécies reativas de oxigênio, sendo mais ativo que as vitaminas C e E, e β -caroteno. Também mostrou proteção dos tecidos hepático e cerebral de camundongos contra a indução de estresse oxidativo (Sánchez et al., 2000). Este extrato revelou efeito inibitório sobre a produção de radicais livres em macrófagos de ratos,

mostrando-se interessante para o tratamento de doenças de origem imunopatológica, especificamente em certas desordens auto-imunes (García et al., 2003).

A mangiferina possui um amplo espectro de atividades farmacológicas, sua estrutura xantonóide, com ligação C-glicosil e componente hidroxil, compõem o mecanismo que está relacionado com a capacidade de eliminação de radicais livres, levando a um potente efeito antioxidante (Pardo-Andreu et al., 2005; 2006a; 2006b; 2008; Vyas et al., 2012). Testes com a mangiferina isolada provou que esta tem as mesmas propriedades dos extratos, devido à sua habilidade de capturar radicais livres envolvidos na iniciação da peroxidação lipídica, uma atividade evidenciada por propriedades redox (Sánchez et al., 2000). Através de sua ação removedora de radicais livres, a mangiferina demonstra propriedades farmacológicas em diferentes órgãos e tecidos, exercendo efeito preventivo e terapêutico contra uma considerável gama de doenças relacionadas ao estresse oxidativo (Canuto, 2009). Inflamação, os mecanismos incluem o equilíbrio entre as citocinas anti-inflamatórias e pró-inflamatórias, inibição da ativação de células inflamatórias, regulação na expressão de genes inflamatórios e melhorias da resistência celular contra lesões inflamatórias (Sánchez et al., 2000; Garrido et al., 2004; Carvalho et al., 2009; Bhatia et al., 2008; Deng et al., 2007); tumores, os mecanismos incluem a ação antígeno-tóxica, inibição da telomerase, reforço da celular apoptose (Viswanadh, Rao & Rao, 2010; Cheng et al., 2007; Peng et al., 2007; Han & Chin, 2011); agente antiviral, do vírus da herpes simples (Zhu et al., 1993), do vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Guha, Ghosal & Chattopadhyay, 1996), vírus da hepatite B (Deng et al., 2007) e vírus da influenza devido ao efeito inibitório sobre a enzima neuraminidase (Ryu et al., 2009); na regulação metabólica da hiperglicemia, na síndrome metabólica com ambos, hiperglicemia e dislipidemia, e também no efeito antidiabético, o mecanismo metabólico está relacionado com a inibição de enzimas relacionadas com os carboidratos, tais como sacarase, isomaltase, e aldose redutase e no seu efeito anti-diabético, pelo aumento da expressão do transportador de glicose-4 (GLUT-4) e translocação nas células musculares que foi mediada provavelmente através de duas vias independentes, que estão relacionados com a proteína quinase ativada por adenosina monofosfato (5'-AMP) e de receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PPAR-gama) e no efeito antidiabético foi pensado para ser parte do mecanismo de ação, a estimulação das células beta pancreáticas para libertação de insulina (Girón et al., 2009; Wilkinson et al., 2008; Ojewole, 2005); imunoterapêuticos, atuam como imunoestimulantes através da estimulação das vias antioxidantes que melhoram o estresse oxidativo celular no sistema imunitário, ou seja, causando uma inibição do estresse oxidativo induzido por intermédio reativo em imunócitos, tais como linfócitos, neutrófilos e macrófagos (Deng et al., 2007;

Muruganandan, Lai & Gupta, 2005); e com atividade imunomodulatória, os mecanismos podem estar relacionados com a inibição da morte de células T induzida pela ativação (Hernandez et al., 2007; De & Chattopadhyay, 2009).

Esses efeitos podem ser mediados pela supressão na ativação do fator nuclear kappa β (NF- $\kappa\beta$) induzida por agente inflamatórios, incluindo o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e pela inibição da produção de IgE (Leiro et al., 2003; Rivera et al., 2006); também demonstrou outros efeitos, atividade radioprotetora (Jagetia & Baliga, 2005; Menkovic et al, 2010); efeito antialérgico (Lee et al., 2009); impediu a osteoporose (Ang et al., 2011). Em adição a estes efeitos farmacológicos, a mangiferina tem demonstrado atuar no sistema nervoso central, como através da atividade neuroprotetora (Gottlieb et al., 2006; Satish, Scree Devi & Nageshwar, 2009), os déficits de aprendizagem induzidos por escopolamina foram melhorados (Jung et al., 2009), melhorou a memória de reconhecimento de objetos a longo prazo (Pardo-Andreu et al., 2010); também demonstrou que pode reverter a depressão induzida por lipopolissacáridos (Jangra et al., 2014); no modelo animal da doença de Alzheimer, reverteu a amnésia induzida pela escopolamina (Sethiya & Mishra, 2014); em neurônios cultivados, mostrou proteção contra neurotoxicidade induzida pela β -amilóide (Sethiya & Mishra, 2014). Estes efeitos protetores poderiam ser atribuídos à inibição de prostaglandinas sintetizadas por ciclooxigenases e leucotrienos sintetizados por lipoxigenases (Bhatia et al., 2008; Sethiya & Mishra, 2014).

Considerando os diversos efeitos biológicos da mangiferina e o seu potencial como um agente neuroprotetor, é importante investigar seus possíveis efeitos sobre o sistema nervoso central, como na depressão - avaliando seu potencial em modelos animais com validade preditiva, e apontando os mecanismos de ação subjacentes aos seus efeitos.

2.3 MODELOS ANIMAIS

A base neurobiológica da depressão tem sido extensivamente estudada também através de modelos relacionados com o estresse (Krishnan & Nestler, 2008). Os modelos animais mimetizam aspectos da condição humana e fornecem informações preditivas sobre como uma droga irá agir em seres humanos (Duman, 2010). Considerando a etiologia e fisiopatologia complexa da depressão, modelos animais com alta validade preditiva ainda estão sendo estudados (Nestler & Hyman, 2010). Entretanto, algumas espécies animais podem exibir alterações de comportamento do tipo depressivo (do inglês, *depressive-like*), ou seja, parecido

com alguns comportamentos apresentados pelos humanos (Stewart & Kalueff, 2013). Comportamentos traduzíveis através da reformulação de fenótipos depressivos em sintomatologias definidas, usando parâmetros comportamentais e/ou neurobiológicos quantificáveis e objetivos para fazer a ligação entre os fenômenos clínicos da depressão e os modelos animais (Kaffman & Krystal, 2012).

Em geral, os animais são expostos a um evento estressante inescapável e o comportamento deste animal frente a esse evento é avaliado (Willner, 1984). Paradigmas que empregam a exposição ao estresse agudo ou subcrônico incluem o desamparo aprendido, o teste da suspensão da cauda (TSC) e o teste do nado forçado (TNF), que empregam a exposição à curto prazo ao estresse inevitável e incontrolável e podem prever a resposta dos animais a uma droga antidepressiva (Steru et al., 1985; Porsolt et al., 1977). Dentre os modelos à curto prazo amplamente utilizado no estudo da depressão em roedores, o TSC (apenas camundongos) e o TNF (ratos e camundongos) são os mais empregados e compartilham a característica de "desespero comportamental" quando apresentam imobilidade (Steru et al., 1985; Porsolt et al., 1977). Uma das hipóteses, e a mais aceita, 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). Além disso, estes testes são descritos por apresentarem alto valor preditivo devido à resposta aos medicamentos antidepressivos utilizados na terapia da depressão, pois revertem esse quadro diminuindo assim o tempo de imobilidade fazendo com que o animal não desista de escapar das situações impostas a ele. Os critérios para validação desses modelos são adotados quanto à previsibilidade, semelhança e homologia (Cryan et al., 2002).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

Investigar os efeitos farmacológicos dos polifenóis hesperidina e mangiferina, através do estudo das alterações neurocomportamentais e neuroquímicas em estruturas cerebrais de camundongos.

3.2 Objetivos Específicos

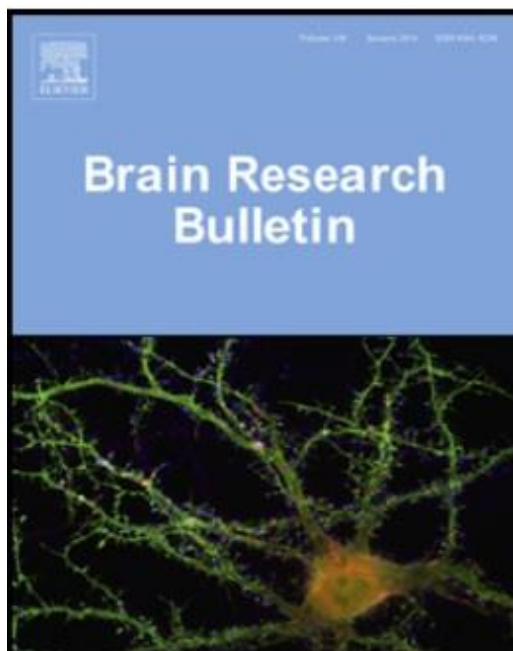
- Avaliar o efeito tipo antidepressivo da hesperidina e sua aglicona hesperitina, após o tratamento crônico, no teste de suspensão da cauda (TSC);
- Investigar a participação da via L-arginina-NO-cGMP no efeito tipo-antidepressivo da hesperidina no TSC;
- Analisar os níveis de nitratos/nitritos (NO_x), após os tratamentos agudo e crônico com hesperidina;
- Determinar os níveis do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), após tratamento crônico com hesperidina;
- Avaliar se o efeito tipo antidepressivo da hesperidina pode envolver canais de potássio no TSC;
- Investigar o efeito tipo antidepressivo da mangiferina no tratamento agudo através do TSC e teste do nado forçado (TNF);
- Estudar a possível contribuição dos sistemas serotoninérgico, dopaminérgico e noradrenérgico nos efeitos neurocomportamentais induzidos pela mangiferina; incluindo o papel dos seus respectivos receptores, através da administração de antagonistas e agonistas específicos, bem como, pelo efeito do tratamento combinado de doses subefetivas de mangiferina com antidepressivos clássicos;
- Estudar as alterações neuroquímicas através da determinação dos níveis das monoaminas e seus metabólitos;
- Investigar o efeito da mangiferina sobre a captação de 5-HT sinaptossomal;
- Verificar o efeito tipo ansiolítico após tratamento agudo com a mangiferina através do teste do labirinto em cruz elevado;

PARTE II

4 RESULTADOS

4.1 Artigo Científico 1:

Artigo científico apresentado na tese apenas a primeira página. O conteúdo completo encontra-se publicado no periódico Brain Research Bulletin 104 (2014) 19–26.



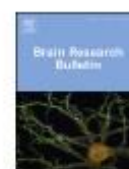
4.1 Artigo Científico 1

Brain Research Bulletin 104 (2014) 19–26



Contents lists available at ScienceDirect

Brain Research Bulletin

journal homepage: www.elsevier.com/locate/brainresbull

Research report

Hesperidin exerts antidepressant-like effects in acute and chronic treatments in mice: Possible role of L-arginine-NO-cGMP pathway and BDNF levels



Franciele Donato^{a,b,1}, Marcelo Gomes de Gomes^{b,1}, André Tiago Rossito Goes^{a,b,1}, Carlos Borges Filho^{a,b,1}, Lucian Del Fabbro^{a,b,1}, Michelle S. Antunes^{a,b,1}, Leandro Cattelan Souza^{a,b,1}, Silvana Peterini Boeira^{b,1}, Cristiano Ricardo Jesse^{b,+}

^a Programa de Pós-graduação em Bioquímica (PPGBioq), Universidade Federal do Pampa (Unipampa), Campus Uruguiana, BR 472 KM 582, Caixa Postal 118, CEP 97500-970, RS, Brazil

^b Laboratório de Avaliações Farmacológicas e Toxicológicas Aplicadas às Moléculas Bioativas (LafamBio Pampa), Universidade Federal do Pampa (Unipampa), Rua Luiz Joaquim de Sá Brito, s/n, Campus Itaqui, CEP 97650-000, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 December 2013

Received in revised form 4 March 2014

Accepted 31 March 2014

Available online 5 April 2014

Keywords:

Depression

Brain diseases

Flavonoid

Mechanisms

Neurotrophic factors

ABSTRACT

Hesperidin (4'-methoxy-7-O-rutinosyl-3',5'-dihydroxyflavone), a naturally occurring flavanone glycoside, was previously shown to produce an antidepressant-like effect with modulation of the serotonergic 5-HT_{1A} and kappa-opioid receptors. In this study, the signaling mechanisms underlying their antidepressant-like effects were further evaluated by investigating in acute and chronic treatments. Results showed that chronic treatment of hesperidin or hesperitin (0.1, 0.3 and 1 mg/kg, intraperitoneal, i.p.) have an antidepressant-like effect in the mouse tail suspension test (TST) without modified the locomotor activity in the open field test. Pretreatment with L-arginine (a nitric oxide (NO) precursor), sildenafil (a phosphodiesterase 5 inhibitor) or S-nitroso-N-acetyl-penicillamine (a NO donor) significantly reversed the reduction in immobility time elicited by acute treatment with hesperidin (0.3 mg/kg) in the TST. Hesperidin (0.01 mg/kg, a sub-effective dose in acute treatment) produced an additive antidepressant-like effect with N^G-nitro-L-arginine (an inhibitor of nitric oxide synthase (NOS)) or 7-nitroindazole (a neuronal NOS inhibitor) in the TST. Pretreatment of animals with methylene blue (an inhibitor of NOS/soluble guanylate cyclase (sGC)) or ODQ (a specific inhibitor sGS) caused an additive effect with hesperidin in the TST. Hesperidin in the acute (1 mg/kg) and chronic (0.1, 0.3 and 1 mg/kg) treatments caused a significant decrease in nitrate/nitrite (NO_x) levels in the hippocampus of mice. Chronic treatment with hesperidin (0.3 and 1 mg/kg) also resulted in an increase in hippocampal brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels. These results demonstrated that the antidepressant-like effect of hesperidin is likely mediated by inhibition of L-arginine-NO-cGMP pathway and by increased of the BDNF levels in hippocampus.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Depression is a common, chronic, recurrent and life debilitating illness with severe morbidity and mortality (Kiecolt-Glaser and Glaser, 2002). The mechanisms and brain areas underlying the pathophysiology of this disorder are not yet well understood. Clinical studies showed elevated plasma nitrate levels and increased nitric oxide synthase (NOS) expression in the hippocampus of

depressed patients (Chrapko et al., 2006; Galecki et al., 2010). Recently, the involvement of brain-derived neurotrophic factor (BDNF), in the regulation of mood disorders and antidepressant effects also has been under intense investigation (Sem et al., 2008; Yu and Chen, 2011).

Nitric oxide (NO), which is an important neurotransmitter in the central nervous system (CNS) (Baranano et al., 2001) is synthesized from L-arginine amino acid by the NOS enzyme (Schuman and Madison, 1994). It plays an important role in regulating many behavioral, cognitive and emotional processes such as learning, aggression, locomotion, anxiety and depression (Harkin et al., 1999; Wiley et al., 1995). In recent studies, inhibition of NOS enzyme elicited antidepressant-like behavioral effects in several animal

* Corresponding author. Tel.: +55 55 34331669; fax: +55 55 34331669.

E-mail address: cristianoricardojesse@yahoo.com.br (C.R. Jesse).

¹ These authors contributed equally to this work.

4.2 Artigo Científico 2:

Artigo científico apresentado na tese apenas a primeira página. O conteúdo completo encontra-se publicado no periódico Journal of Medicinal Food 18 (2015) 818-23.



4.2 Artigo Científico 2

JOURNAL OF MEDICINAL FOOD
J Med Food 18 (7) 2015, 818–823
 © Mary Ann Liebert, Inc., and Korean Society of Food Science and Nutrition
 DOI: 10.1089/jmf.2014.0074

Evidence for the Involvement of Potassium Channel Inhibition in the Antidepressant-Like Effects of Hesperidin in the Tail Suspension Test in Mice

Franciele Donato, Carlos Borges Filho, Renata Giacomeli, Elza Eliza Tenório Alvaer, Lucian Del Fabbro, Michele da Silva Antunes, Marcelo Gomes de Gomes, André Tiago Rossito Goes, Leandro Cattelan Souza, Silvana Peterini Boeira, and Cristiano Ricardo Jesse

Laboratory of Pharmacological and Toxicological Assessments Applied to Bioactive Molecules, Laftamblo Pampa, Federal University of Pampa, Itaqui, Rio Grande do Sul, Brazil.

ABSTRACT The administration of hesperidin elicits an antidepressant-like effect in mice by a mechanism dependent on an interaction with the L-arginine-nitric oxide (NO)-cyclic guanosine monophosphate (cGMP) pathway, whose stimulation is associated with the activation of potassium (K⁺) channels. Thus, this study investigated the involvement of different types of K⁺ channels in the antidepressant-like effect of hesperidin in the mice tail suspension test (TST). The intracerebroventricular administration of tetraethylammonium (TEA, a nonspecific blocker of K⁺ channels), glibenclamide (an ATP-sensitive K⁺ channel blocker), charybdotoxin (a large- and intermediate-conductance calcium-activated K⁺ channel blocker) or apamin (a small-conductance calcium-activated K⁺ channel blocker) combined with a subeffective dose of hesperidin (0.01 mg/kg, intraperitoneally [i.p.]) was able to produce a synergistic antidepressant-like effect in the mice TST. Moreover, the antidepressant-like effect elicited by an effective dose of hesperidin (0.3 mg/kg, i.p.) in TST was abolished by the treatment of mice with pharmacological compounds K⁺ channel openers (cromakalim and minoxidil). Results showed that the antidepressant-like effect of hesperidin in TST may involve, at least in part, the modulation of neuronal excitability through inhibition of K⁺ channels and may act through a mechanism dependent on the inhibition of L-arginine-NO pathway.

KEY WORDS: • depression • flavonoid • mechanisms of action • nitric oxide • serotonin

INTRODUCTION

DEPRESSION HAS BECOME one of the most common neuropsychiatric disorders in the modern world. It is the most disabling medical condition, in terms of years lost to disability. It has also been projected that by 2030, depression will be the foremost contributor to the worldwide burden of disease.¹ In recent years, herbal medicines with antidepressant effects and high safety margins have become a novel pharmacotherapy in the treatment of depression.²

Hesperidin (4'-methoxy-7-O-rutinosyl-3',5-dihydroxyflavanone), a naturally occurring flavanone glycoside, is predominant in citrus fruits³ and exerts a variety of pharmacological effects, including antioxidant³ and neuroprotective activities.⁴ The potential therapeutic value of hesperidin for depression has been increasingly demonstrated by our initial research; it has exhibited antidepressant-like effect in mice, possibly dependent on the interaction with the serotonergic 5-HT_{1A} and kappa-opioid receptors.^{5,6} Furthermore, our

recent findings suggest that acute and chronic treatment with hesperidin produces an antidepressant-like effect by a mechanism that modulates the inhibition of the L-arginine-nitric oxide (NO)-cyclic guanosine monophosphate (cGMP) pathway. This effect may also be partially mediated through the increase of hippocampal brain-derived neurotrophic factor levels.⁷

Potassium (K⁺) channels are a key component of this electrical circuit and are controlled either by an electrical impulse or through signaling molecules.⁸ The association of K⁺ channels in the modulation of depression has been suggested by several preclinical studies. The administration of different K⁺ channel inhibitors such as tetraethylammonium (TEA), glibenclamide and glibenclamide, charybdotoxin and apamin decreases the duration of immobility in the forced swimming test (FST) in mice, which is an indicative of an antidepressant-like effect.^{9,10} On the other hand, K⁺ channel openers, such as minoxidil or cromakalim, increase the immobility time, which is an indicative of a depressive-like effect.^{9,10}

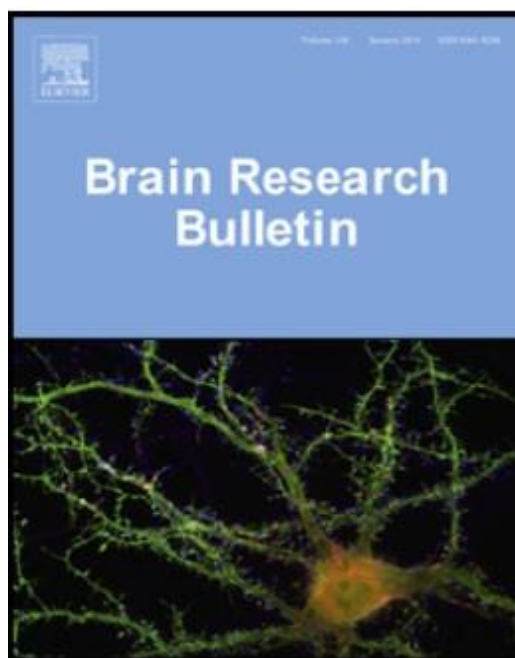
NO exerts its neural effects through several mechanisms, including modulation of ionic conductance.¹¹ K⁺ channels have been shown to be targets of NO signaling.¹² It has also been reported that both NO and cGMP, produced through the activation of nitric oxide synthase (NOS) and soluble

Manuscript received 2 May 2014. Revision accepted 4 November 2014.

Address correspondence to: Dr. Cristiano Ricardo Jesse, Laboratório de Análises Farmacológicas e Toxicológicas Aplicadas de Moléculas Bioativas, Laftamblo Pampa, Universidade Federal de Pampa, Itaqui, RS CEP 97630-000, Brazil. E-mail: cristiano.riocardojesse@ufp.br

4.3 Manuscrito 1

Manuscrito apresentado na tese de acordo com as recomendações do periódico científico no qual o mesmo foi submetido "Brain Research Bulletin".



4.3 Manuscrito 1

Involvement of the serotonergic system in the antidepressant-like effect of mangiferin in mice

Franciele Donato¹, Cristiano R. Jesse^{1*}, Renata Giacomeli¹, Nathalie Savedra Gomes¹, Lucian Del Fabbro¹, Michele da Silva Antunes¹, Marcelo Gomes de Gomes¹, André Tiago Rossito Goes¹, Leandro Cattelan Souza¹, Silvana Peterini Boeira¹

¹Laboratório de Avaliações Farmacológicas e Toxicológicas Aplicadas às Moléculas Bioativas (LaftamBio), Universidade Federal do Pampa (Unipampa), Rua Luiz Joaquim de Sá Britto, s/n, Campus Itaqui, CEP 97650-000, RS, Brazil.

*Correspondence should be sent to:

Cristiano Ricardo Jesse

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

Phone and FAX number: +55-55-34331669

E-mail: cristianoricardojesse@yahoo.com.br

Abstract

Research with bioactive compounds have become very interesting, mainly by the fact that herbal therapies may act as novel pharmacotherapy for central disorders, including depression. In this study, we aimed to verify the antidepressant-like effect of mangiferin (1,3,6,7-tetrahydroxy-xanthone-C2-b-D-glucoside), a polyphenol xanthone - bioactive compounds of mango fruits (*Mangifera indica*), in the forced swimming test (FST) and tail suspension test (TST) in mice and explore specifically the role of serotonergic system through mechanisms underlying its effect. Mangiferin (5 - 25 mg/kg, p.o.) produced an antidepressant-like effect in the FST and TST. Data demonstrated that the serotonin (5-HT) depleting agent (PCPA) completely abolished the antidepressant-like effect induced by mangiferin. Pretreatment of mice with WAY100635 (selective 5-HT_{1A} receptor antagonist), but not with SB 224289 (5-HT_{1B} receptor antagonist), ritanserin (5-HT_{2A/2C} receptor antagonist), MDL 72222 (5-HT₃ receptor antagonist), GR 125487 (5-HT₄ receptor antagonist) or SB 269970 (5-HT₇ receptor antagonist) prevented the antidepressant-like effect of mangiferin in the TST. A combinatory antidepressant-like effect was observed when mice received the co-administration of sub-effective doses of mangiferin (1 mg/kg) with paroxetine (0.1 mg/kg) or sertraline (1 mg/kg). Mangiferin increased hippocampal 5-HT levels, whereas 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) levels decreased in the cerebral cortex. Mangiferin significantly reduced the ratio of 5-HIAA/5-HT in the hippocampus and cerebral cortex, suggesting a slowdown of 5-HT metabolism. Furthermore, mangiferin inhibited significantly synaptosomal [³H] 5-HT uptake. Taken together, mangiferin demonstrated that the antidepressant-like effect was mediated by 5-HT_{1A} receptors, probably due to alterations in the modulation of serotonergic system, decreasing the 5-HT turnover and blocking 5-HT reuptake.

Keywords: antidepressant-like, polyphenols, serotonergic neurotransmission, 5-HT_{1A} receptors, reuptake

1. Introduction

Depression is the most predominant mental disorder among the neurological disorders with substance use (Collins et al., 2011). According to the World Health Organization, depression is currently the leading cause of disability worldwide, and is a major contributor to the global burden of disease (WHO, 2015) and has been estimated to be the second most common contributor to years lived with disability (Vos et al., 2013).

Serotonin, or 5-hydroxytryptamine (5-HT), plays a pivotal role in the cognitive function, a disturbance in central 5-HT activity is a key factor at explaining the neurobiology of depression (Hamon and Blier, 2013). The clinical efficacy of selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs), the first-line treatment of depression, constitutes the leading argument for the crucial role of 5-HT neurotransmission in depression (Bauer et al., 2013; Kupfer et al., 2012). 5-HT mediates its wide range of physiological functions through interactions with multiple receptors, and to date seven families of 5-HT receptors have been identified (5-HT₁–5-HT₇) (Artigas, 2013). Effects on 5-HT receptors, 5-HT receptor agonists/antagonist are widely used to determine via which 5-HT receptor an SSRI effect is caused (Kroeze et al., 2012).

Bioactive compounds have become very important in the food and pharmaceutical markets, mainly by interests in research seeking herbal therapies may be effective alternatives in the treatment of depression and the search for novel pharmacotherapy from medicinal plants for psychiatric illnesses, including depression (Pan et al., 2013; Ramawat et al., 2009). In this sense, it can be highlighted mangiferin (1,3,6,7-tetrahydroxy-xanthone-C2-b-D-glucoside), a natural occurring glucosyl xanthone - bioactive compound of mango fruits are predominantly found in the bark, fruits, roots, and leaves of *Mangifera indica* Linn. Several studies have been conducted showing that mangiferin plays an important role in various biological activities, mainly by involvement in some basic pathological processes (Benard and Chi, 2015; Saha et al., 2016). Mangiferin also demonstrated neuroprotective action by improves long-term object recognition memory in rats (Pardo Andreu et al., 2010), protection against β -amyloid induced neurotoxicity in cultured neurons (Sethiya et al., 2014), reversed the amnesia induced by scopolamine in animal model of Alzheimer's disease (Sethiya et al., 2014), protective effects on cerebral ischemia–reperfusion injury effective against brain ischemia (Yang et al., 2016).

In view of the above considerations, in the present study we tested the antidepressant-like effect of mangiferin by using behavioural despair models: tail suspension test (TST) and forced swimming test (FST). As the serotonergic system plays a crucial role in pathophysiology and therapy of depression, the possible contribution of this system in the

antidepressant-like effect of mangiferin was also explored through of modulation with 5-HT receptor subtypes. In addition, to further explore specifically the role of serotonergic system, mangiferin were examined on the levels of the 5-HT neurotransmitter and their metabolite 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) and 5-HT uptake in cerebral cortex, hippocampus and striatum. Moreover, we investigated whether the anxiolytic-like effect of mangiferin, employing the elevated plus-maze (EPM) test.

2. Materials and methods

2.1. Animals

The experiments were conducted using male C57BL/6J mice (25–30 g) maintained at 22–25 °C with free access to water and food, under a 12:12 h light/dark cycle (lights on at 07:00 h). All manipulations were carried out between 09:00 a.m. and 04:00 p.m., with each animal used only once. All procedures in this study were performed in accordance with the National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. The experiments were performed after approval of the protocol by the Institutional Ethics Committee (CEUA/UNIPAMPA) under number 023/2013, and all efforts were made to minimize animals suffering and to reduce the number of animals used in the experiments.

2.2. Chemicals

The following drugs were used: mangiferin (catalogue no. M 3547; $\geq 98\%$ purity), p-chlorophenylalanine methyl ester (PCPA), N-N-(2-pyridynyl) cyclohexanecarboxamide (WAY100635), ritanserin (Sigma Chemical Co., USA), fluoxetine hydrochloride, sertraline hydrochloride, paroxetine hydrochloride, imipramine (Pfizer, Brazil), diazepam (Compaz®, Cristália, Brazil), 3-tropanyl-3,5-dichlorobenzoate (MDL 72222), ((2R)-1-[(3-hydroxyphenyl)sulfonyl]-2-[2-(4-methyl-1-piperidinyl)ethyl]pyrrolidine hydrochloride) (SB269970), 1'-methyl-5-[2'-methyl-4'-(5-methyl-1,2,4-oxadiazol-3-yl)-biphenyl-4-ylcarbonyl]-2,3,6,7-tetra-hydro-5H-spiro[furo[2,3- f]indole-3,4'-piperidine (SB 224289), (1-[2-[methyl sulphonyl]-amino]ethyl]-4-piperidinyl-methyl 5-fluro-2-methoxy-1H-indole-3-carboxylate (GR125487) (Tocris Cookson Ltd., Bristol, UK). All drugs were dissolved in saline, except fluoxetine, sertraline, paroxetine, imipramine which were dissolved in distilled water. The chemical standards used in high-performance liquid chromatography (HPLC)

including 5-HT and its metabolite 5-HIAA, were purchased from Sigma-Aldrich Corporation (St. Louis, MO, USA) and were dissolved in the mobile phase. [³H]5-Hydroxytryptamine (5-HT) creatinine sulfate (specific activity 23 Ci/mmol) was purchased from LabEx Inc. (Hinsdale, IL, USA).

2.3. Behavioral tests

2.3.1. Tail suspension test (TST)

The antidepressant-like effect of mangiferin was measured using the TST, according to the methods described by Steru et al. (1985). Briefly, each mouse was suspended by its tail using adhesive tape placed approximately 1 cm from the tip of the tail approximately 50 cm above the floor. The immobility time was recorded during the 6-min period. Mice were considered immobile only when they hung passively and were completely motionless.

2.3.2. Forced swimming test (FST)

To confirm the antidepressant-like effect of mangiferin the FST was used. In this test, mice were individually placed into an open acrylic cylinder (diameter 18 cm, height 50 cm), containing 8 liters of water (29 cm depth) maintained at 25±1 °C. The total duration of immobility during the 6-min test was scored as described previously (Porsolt et al., 1977). Each mouse was judged to be immobile when it ceased struggling and remained floating motionless in the water, making only those movements necessary to keep its head above water.

2.3.3. Open field test (OFT)

The animals were tested for locomotor activity using the open field paradigm in an automated systems apparatus (EP-149 IR, Insight[®], Brazil). The apparatus is a clear acrylic plastic box (50×48×50 cm) with a removable plastic lid perforated with holes for ventilation. The monitor contains photocell beams and detectors that are mounted on opposite walls (2 cm above the chamber floor). General locomotor activity and the mice's position in the chamber are detected by infrared beams, which are recorded by a computer. Animals were placed in the center of the apparatus and allowed to freely explore the arena. The evaluation of locomotor

activity was performed through of the total distance traveled (mm) for a 5 minutes period. The open field was thoroughly cleaned with 70% ethanol between different animals.

2.3.4. Rota-rod test

To evaluate the effect of mangiferin on motor coordination, the activity was evaluated using the rota-rod test (Godoy et al., 2004). The apparatus consisted of a rotatory bar (5.0 cm in diameter) divided into 4 separate compartments, placed at a 40 cm height and rotating at a fixed velocity of 8 rpm. Twenty-four hours before testing, all animals were submitted to a training session until they could remain in the apparatus for 60 s without falling. The cut-off time was 120 s. On the test day, mice received a single administration of mangiferin (0.2 - 25 mg/kg, *per oral*, p.o.) or vehicle 1 h before testing. During the test session, the latency for the first fall and the total number of falls were evaluated during a 4 min period was observed by an automatic system (EFF 412, Insight[®], Brazil).

2.3.5. Elevated plus-maze test (EPM)

The mice were subjected to the behavioural assessment in an elevated plus-maze to measure anxiety-related behavior (Lister, 1987). The apparatus consists of two open arms (50×5 cm) and two enclosed arms (50×5×15 cm) positioned 40 cm above the floor. The junction of the four arms forms a central square platform (5×5 cm). Mice received a single administration of mangiferin (0.2 - 25 mg/kg, p.o.) or vehicle 1 h before testing. As a positive control, diazepam (1 mg/kg, subcutaneous (s.c.) was administered to mice 30 min before testing (Naderi et al., 2008). Each animal was placed at the center square of the maze facing one of the open arms and was allowed to explore freely for 5 min by an automatic system (EP 151, Insight[®], Brazil). The behavior parameters observed were the number of entries into the open or closed arms and the average time spent by the mice in each of the arms. The maze was cleaned with 70% ethanol after each test to prevent influences of the previously tested mice. The percentage of the time spent on the open arms and the percentage of the entries into the open arms were calculated as follows: time spent or number of entries into the open arms/total time or total number of the entries into closed and open arms ×100, respectively.

2.3.6. Experimental design

In order to investigate the antidepressant-like effect produced by an oral administration of mangiferin, firstly, it was performed a time–course curve. For this, mice were submitted to the TST at different times (1, 2, 4, 6, 8 e 12 hours) after the single administration of mangiferin (25 mg/kg, p.o.) or the vehicle. To obtain the dose-response curve, mice were treated with mangiferin (0.2, 1, 5, 25 mg/kg, p.o.) or vehicle 1 h before the TST or FST. Fluoxetine (32 mg/kg, p.o.) and imipramine (15 mg/kg, p.o.), were used as positive controls and were administered 30 minutes before the TST or FST. Animals were also evaluated in the OFT in order to rule out any interference of locomotion in the TST or FST.

To assess a possible contribution of serotonergic system in the antidepressant-effect of mangiferin, distinct groups of animals were treated with different classes of drugs. For this purpose, mice were pretreated with PCPA (100 mg/kg, intraperitoneal (i.p.), an inhibitor of 5-HT synthesis) or vehicle, once a day, for four consecutive days (Cunha et al., 2013). Then, 24 h after the last PCPA or vehicle treatment, animals were treated with mangiferin (5 mg/kg, p.o.) or vehicle and they were tested in the TST and OFT 60 min later.

In a separate series of experiments, the possible participation of the 5-HT receptor subtypes in the antidepressant-like effect of mangiferin in the TST was evaluated by the pretreatment of mice with WAY100635 (0.1 mg/kg, s.c.; a selective 5-HT_{1A} receptor antagonist), SB 224289 (0.1 mg/kg, i.p., a 5-HT_{1B} receptor antagonist), ritanserin (1 mg/kg, i.p., a 5-HT_{2A/2C} receptor antagonist), MDL 72222 (0.1 mg/kg, i.p., a 5-HT₃ receptor antagonist), GR 125487 (10 mg/kg, i.p., a 5-HT₄ receptor antagonist) or SB 269970 (1 mg/kg, i.p., a 5-HT₇ receptor antagonist) or vehicle (10 mL/kg), thirty minutes before of administration mangiferin (5 mg/kg, p.o.) or vehicle, 1 hour later the mice were submitted to the TST and OFT.

In another set of experiments, we also assessed the ability of the mangiferin to potentiate the antidepressant-like effect of conventional antidepressants. For this, investigated the synergistic effect of a subeffective dose of mangiferin (1 mg/kg, p.o.) or vehicle with a subeffective dose of selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs), paroxetine (0.1 mg/kg, p.o.) or sertraline (1 mg/kg, p.o.). Mangiferin or vehicle was administered immediately after the treatment with SSRIs. An hour after the co-administrations the TST and OFT were carried out. The doses of the serotonergic agents and the selective serotonin reuptake inhibitors were selected on the basis of previous study from our laboratory and literature data (Pałucha-Poniewiera et al., 2014; Cunha et al., 2013; Ohno et al., 2011).

In order to evaluate a putative effect of mangiferin on levels of the monoamine 5-HT and their metabolite 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) in the cerebral cortex, hippocampus

and striatum. Animals received mangiferin (0.2 - 25 mg/kg, p.o.) or vehicle (10 ml/kg, p.o.), and two hours after the treatment, mice were euthanized by cervical dislocation.

To test the hypothesis that the antidepressant-like effect of mangiferin was mediated through an inhibition of 5-HT uptake, mice were pretreated with mangiferin (25 mg/kg, p.o.), fluoxetine (10 mg/kg, p.o.) or vehicle. Fluoxetine was used as a positive control in order to evaluate the effect of classical SSRI antidepressant administered acutely. After 1h, animals were euthanized by cervical dislocation and the cerebral cortex, hippocampus and striatum were removed.

2.4. Ex vivo assay

2.4.1. Monoamine neurotransmitter and metabolite levels

Mice were euthanized by cervical dislocation 2 h after the administration of mangiferin (0.2 - 25 mg/kg, p.o.) or vehicle (10 ml/kg, p.o.). The brains were excised, and the cerebral cortex, hippocampus and striatum were immediately separated and stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analyzed by HPLC. The levels of the monoamine 5-HT and their metabolite 5-HIAA were assayed as described by Ferraz et al. (2002), using HPLC with electrochemical detection. The mobile phase, used at a flow rate of 0.8 ml/min, consisted of 0.02 M phosphate/citrate buffer and 90/10 methanol (v/v), 0.12 mM Na_2EDTA , and 0.0556% heptane sulphonic acid as ion pair. The pH was adjusted to 2.64 with H_3PO_4 at $22\text{ }^{\circ}\text{C}$. A 5- μm (220×4.6) Spheri-5 RP-18 column from Brownlee Laboratory was used. Electrochemical detection of monoamines was performed with a Shimadzu L-ECD-6A electrochemical detector with a potential of 0.75 V. The peak area of the internal standard (DHBA) was used to quantify the sample peaks. The tissue levels were expressed in ng/g tissue.

2.4.2. Synaptosomal [^3H]5-HT uptake

Crude synaptosomes were obtained as previously described (Gray and Whittaker, 1962). The cerebral cortex, hippocampus and striatum were placed into ice-cold sucrose solution (0.32 M, pH 7.4), cut into small pieces and homogenized using a glass Potter-Elvehjem tube with a Teflon pestle (10 up and down strokes). The homogenate solution was centrifuged at $1000 \times g$ at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 10 min in a refrigerated centrifuge. The pellets were discarded and the supernatants were subsequently centrifuged at $12,000 \times g$ at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 20 min. The final pellets of this

centrifugation were suspended in ten volumes of ice-cold sucrose solution (0.32M, pH7.4) and then used as a crude synaptosomes preparation in the [³H]5-HT uptake assays. [³H]5-HT uptake into synaptosomes were carried out as previously reported (Gay et al., 2010; Rocha et al., 2007). Results were expressed as fmol of [³H]5-HT uptake per milligram of protein per minute.

2.5. Statistical analysis

The data analyses were performed using GraphPad Prism 5.0, commercially available software. All experimental results are given as the mean (s) ± S.E.M, except for fall number (rota-rod test) were expressed as medians followed by their 25th and 75th percentiles. Differences between groups were evaluated for significance using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Student–Newman–Keuls test or two-way ANOVA followed by Bonferroni's. A value of $p < 0.05$ was considered to be significant.

3. Results

3.1. Behavioral tests

3.1.1. Effect of the mangiferin on the immobility time in the tail suspension test (TST), forced swimming test (FST) and locomotor activity in the open field test (OFT)

In order to investigate the interval time that the mangiferin achieves the best performance in TST, a time–course curve was accomplished. Fig. 1A illustrates the immobility time after the administration of the mangiferin (25 mg/kg, p.o.), that was able to produce an antidepressant-like effect in the TST. One-way ANOVA revealed a significant effect of the mangiferin in the TST [$F(8,48) = 13.30$; $p < 0.001$] Moreover, post hoc analyses showed that the mangiferin exhibits a similar performance in the time intervals (1, 2 and 4 hours), and the antidepressant-like effect remained significant up to 8 hours, however this effect was abolished 12 hours after treatment.

The results obtained in dose-response curve illustrated in Fig. 1B show a pronounced effect on the immobility time in mice TST was observed in mangiferin treatment group as compared to vehicle treated group [$F(4,30) = 12.33$; $p < 0.001$]. Further, post-hoc analysis revealed that mangiferin at the doses of 5 and 25 mg/kg (p.o.) significantly decreased the immobility time ($p < 0.001$ vs. vehicle for the dose of 5 and 25 mg/kg). Similarly, fluoxetine

(32 mg/kg, p.o., a 5-HT reuptake inhibitor) or imipramine (15 mg/kg, p.o., a tricyclic antidepressant), the positive control used in this study, significantly reduced the immobility time in mice during TST.

In the same way, in dose-response curve in FST (Fig. 1C), the immobility time also was decreased significantly in mangiferin treated group as compared to vehicle group [$F(4,30) = 13.55$; $p < 0.001$]. Further, post hoc analysis revealed a dose dependent decrease in immobility time after mangiferin treatment ($p < 0.05$ vs. vehicle for the dose of 5 mg/kg and $p < 0.001$ vs. vehicle for the dose of 25 mg/kg). In FST, fluoxetine and imipramine also reduced the immobility time significantly.

Considering the time-course curve, all experiments were performed using 1 hour as interval time. Furthermore, according results obtained in dose-response in TST, the lowest dose of mangiferin required to exert antidepressant-like effect was 5 mg/kg. Thus, this dose was chosen to investigate the mechanism of action of mangiferin. In the 5-HT uptake assay and anxiolytic-like effect, the highest dose tested with antidepressant-like effect (25 mg/kg) was chosen. Also, subeffective dose (1 mg/kg) of mangiferin was selected on the basis in dose-response curve to be employed in combination with antidepressant subeffective doses in the TST.

Treatment with mangiferin, fluoxetine, imipramine, paroxetine and sertraline at all doses tested did not produce any significant alterations in the locomotor ability of the animals, as evaluated by total distance traveled (mm) in the OFT, when compared to vehicle group (data not shown). In addition, treatments did not affect integrity of motor system, as evaluated by rota rod test, wherein similar fall latencies and total number of falls, when compared to control groups (data not shown).

3.1.2. Effect of pretreatment with p-chlorophenylalanine methyl ester (PCPA) on the antidepressant-like effect of mangiferin in the tail suspension test (TST) and on locomotor activity in the open field test (OFT)

The results depicted in Fig. 2 show that the pretreatment of mice with PCPA (100 mg/kg, i.p., an inhibitor of 5-HT synthesis), was able to completely abolish the antidepressant-like effect of mangiferin (5 mg/kg, p.o.) in the TST. Two-way ANOVA revealed significant differences of treatment with mangiferin ($F(1, 19) = 35.26$; $p < 0.001$), pretreatment with PCPA ($F(1,19) = 35.26$; $p < 0.001$) and pretreatment \times treatment interaction (PCPA \times mangiferin) ($F(1,19) = 11.60$; $p < 0.01$). Regarding locomotor activity, PCPA administration alone or in

combination with mangiferin did not produce any change in the locomotor activity of mice in the OFT, since the two-way ANOVA did not show significant differences for mangiferin [$F(1,19) = 0.56$; $p = 0.43$], PCPA [$F(1,19) = 0.27$; $p = 0.61$] and mangiferin \times PCPA interaction [$F(1,19) = 0.04$; $p = 0.85$] (data not shown).

3.1.3. Interaction of mangiferin with 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{2A/2C}, 5-HT₃, 5-HT₄ and 5-HT₇ receptors in the tail suspension test (TST) and on locomotor activity in the open field test (OFT)

Fig. 3A show that the pretreatment of mice with WAY100635 (0.1 mg/kg, s.c.; a selective 5-HT_{1A} receptor antagonist), was able to reverse the antidepressant-like effect of mangiferin (5 mg/kg, p.o.) in the TST. Two-way ANOVA revealed significant differences of treatment with mangiferin ($F(1,19) = 32.27$; $p < 0.001$), pretreatment with WAY100635 ($F(1,19) = 30.61$; $p < 0.001$) and mangiferin \times WAY100635 interaction ($F(1,19) = 12.79$; $p < 0.05$). The administration of WAY100635 alone or in combination with mangiferin did not affect the locomotor activity of mice in the OFT, since the two-way ANOVA did not show significant differences for mangiferin [$F(1,19) = 0.28$; $p = 0.60$], WAY100635 [$F(1,19) = 2.20$; $p = 0.15$] and mangiferin \times WAY100635 interaction [$F(1,19) = 0.01$; $p = 0.97$] (data not shown).

Fig. 3B show that the pretreatment of mice with SB 224289 (0.1 mg/kg, i.p., a 5-HT_{1B} receptor antagonist), did not antagonize the reduction in immobility time elicited by mangiferin (5 mg/kg, p.o.) in the TST. Two-way ANOVA revealed a main effect of treatment with mangiferin ($F(1,19) = 63.83$; $p < 0.001$), but not of the pretreatment with SB 224289 ($F(1,19) = 0.01$; $p = 0.99$) and pretreatment \times treatment interaction (SB 224289 \times mangiferin) ($F(1,19) = 0.01$; $p = 0.99$). In addition, the administration of SB 224289 alone or in combination with mangiferin did not affect the locomotion of mice in the OFT, since the two-way ANOVA did not show significant differences for mangiferin [$F(1,19) = 0.03$; $p = 0.87$], SB 224289 [$F(1,19) = 0.00$; $p = 0.98$] and mangiferin \times SB 224289 interaction [$F(1,19) = 0.52$; $p = 0.48$] (data not shown).

Fig. 3C show that the pretreatment of mice with ritanserin (1 mg/kg, i.p., a 5-HT_{2A/2C} receptor antagonist), did not reverse the reduction in immobility time elicited by mangiferin (5 mg/kg, p.o.) in the TST. Two-way ANOVA revealed a main effect of treatment mangiferin ($F(1,19) = 113.86$; $p < 0.001$), but not of the pretreatment with ritanserin ($F(1,19) = 1.40$; $p = 0.25$) and pretreatment \times treatment interaction (ritanserin \times mangiferin) ($F(1,19) = 2.87$; $p = 0.11$). The administration of ritanserin alone or in combination with mangiferin did not change

the locomotor activity of mice in the OFT, since the two-way ANOVA did not show significant differences for mangiferin [$F(1,19) = 0.05$; $p = 0.83$], ritanserin [$F(1,19) = 0.07$; $p = 0.79$] and mangiferin×ritanserin interaction [$F(1,19) = 0.11$; $p = 0.75$] (data not shown).

Fig. 3D show that the pretreatment of mice with MDL 72222 (0.1 mg/kg, i.p., a 5-HT₃ receptor antagonist), did not block the reduction in immobility time elicited by mangiferin (5 mg/kg, p.o.) in the TST. Two-way ANOVA revealed a main effect of treatment with mangiferin ($F(1,19) = 94.83$; $p < 0.001$), but not of the pretreatment with MDL 72222 ($F(1,19) = 1.25$; $p = 0.28$) and pretreatment × treatment interaction (MDL 72222 × mangiferin) ($F(1,19) = 2.89$; $p = 0.11$). Additionally, MDL 72222 administration alone or in combination with mangiferin did not modify the locomotor activity of mice in the OFT, since the two-way ANOVA did not show significant differences for mangiferin [$F(1,19) = 0.55$; $p = 0.47$], MDL 72222 [$F(1,19) = 0.25$; $p = 0.62$] and mangiferin×MDL 72222 interaction [$F(1,19) = 1.63$; $p = 0.21$] (data not shown).

Fig. 3E show that the pretreatment of mice with GR 125487 (10 mg/kg, i.p., a 5-HT₄ receptor antagonist), did not abolish the reduction in immobility time elicited by mangiferin (5 mg/kg, p.o.) in the TST. Two-way ANOVA revealed a main effect of treatment with mangiferin ($F(1,19) = 49.47$; $p < 0.001$), but not of the pretreatment with GR 125487 ($F(1,19) = 0.00$; $p = 0.9849$) and pretreatment × treatment interaction (GR 125487 × mangiferin) ($F(1,19) = 1.79$; $p = 0.2091$). Regarding locomotor activity, GR 125487 administration alone or in combination with mangiferin did not produce any change in the locomotor activity of mice in the OFT, since the two-way ANOVA did not show significant differences for mangiferin [$F(1,19) = 0.29$; $p = 0.60$], GR 125487 [$F(1,19) = 0.17$; $p = 0.68$] and mangiferin×GR 125487 interaction [$F(1,19) = 0.01$; $p = 0.99$] (data not shown).

Fig. 3F show that the pretreatment of mice with SB 269970 (1 mg/kg, i.p., a 5-HT₇ receptor antagonist), did not prevent the reduction in immobility time elicited by mangiferin (5 mg/kg, p.o.) in the TST. Two-way ANOVA revealed a main effect of treatment with mangiferin ($F(1,19) = 119.55$; $p < 0.001$), but not of the pretreatment with SB 269970 ($F(1,19) = 0.96$; $p = 0.34$) and pretreatment × treatment interaction (SB 269970 × mangiferin) ($F(1,19) = 4.19$; $p = 0.06$). The administration of SB 269970 alone or in combination with mangiferin did not cause any changes in the locomotor activity of mice in the OFT, since the two-way ANOVA did not show significant differences for mangiferin [$F(1,19) = 0.04$; $p = 0.84$], SB 269970 [$F(1,19) = 0.03$; $p = 0.85$] and mangiferin × SB 269970 interaction [$F(1,19) = 0.54$; $p = 0.47$] (data not shown).

3.1.4. Effect of the interaction of mangiferin with SSRIs on the immobility in the tail suspension test (TST) and on locomotor activity in the open field test (OFT)

Paroxetine administered at a sub-effective dose (0.1 mg/kg, p.o.) produced an antidepressant-like effect when combined with a sub-effective dose of mangiferin (1 mg/kg, p.o.) in the TST as compared with control or either drug alone (Fig. 4A). A two-way ANOVA showed significant differences for mangiferin treatment ($F(1,19) = 12.97$; $p < 0.01$), paroxetine treatment ($F(1,19) = 21.62$; $p < 0.001$), and paroxetine \times mangiferin interaction ($F(1,19) = 9.64$; $p < 0.01$). The administration of paroxetine alone or in combination with mangiferin did not cause any changes in the locomotor activity of mice in the OFT, since the two-way ANOVA did not show significant differences for mangiferin [$F(1,19) = 0.01$; $p = 0.95$], paroxetine [$F(1,19) = 0.01$; $p = 0.10$] and mangiferin \times paroxetine interaction [$F(1,19) = 0.36$; $p = 0.53$] (data not shown).

Sertraline administered at a sub-effective dose (1 mg/kg, p.o.) likewise exhibited an antidepressant-like effect when combined with a sub-effective dose of mangiferin (1 mg/kg, p.o.) in the TST as compared with the control or either drug alone (Fig. 4B). Two-way ANOVA showed significant differences for mangiferin treatment ($F(1,19) = 21.00$; $p < 0.001$), sertraline treatment ($F(1,19) = 9.08$; $p < 0.01$) and sertraline \times mangiferin interaction ($F(1,19) = 9.93$; $p < 0.01$). The administration of sertraline alone or in combination with mangiferin did not produce any changes in the locomotor activity of mice in the OFT, since the two-way ANOVA did not show significant differences for mangiferin [$F(1,19) = 0.11$; $p = 0.75$], sertraline [$F(1,19) = 0.34$; $p = 0.57$] and mangiferin \times sertraline interaction [$F(1,19) = 0.65$; $p = 0.42$] (data not shown).

3.1.5. Effect of mangiferin on the elevated plus-maze (EPM)

In order to assess the anxiety-like behavior, mice were subjected to EPM test 1 h after the oral administration of mangiferin. As shown in Fig. 5, mangiferin (25 mg/kg, p.o., 1 h before testing) did not cause any changes in the percentage of time (Fig. 5A) [$F(4,36) = 1.54$; $p < 0.22$] or percentage of entries (Fig. 5B) [$F(4,36) = 2.11$; $p < 0.11$] into the open arms compared to vehicle-treated mice. Diazepam (1 mg/kg, s.c.), used as positive control in this test, significantly increased the percentage of time and percentage of entries in the open arms compared to vehicle-treated mice.

3.2. *Ex vivo* assay

3.2.1. Effect of mangiferin on 5-HT and their metabolite 5-HIAA levels in the cerebral cortex, hippocampus and striatum

We showed in Table 1 that the higher dose of mangiferin (25 mg/kg) induced a significant increase in hippocampal 5-HT levels, whereas 5-HIAA levels were significantly decreased in the cerebral cortex. However, 5-HT levels in cerebral cortex and 5-HIAA levels did not alter in hippocampus. Furthermore, the 5-HT turnover, as represented by 5-HIAA/5-HT ratio, decreased with mangiferin treatment in cerebral cortex (1, 5 or 25 mg/kg) and in hippocampus (5 and 25 mg/kg). In the striatum, statistical analysis did not reveal alteration of 5-HT and 5-HIAA following treatment.

3.2.2. Effect of mangiferin on [³H] 5-HT uptake

Fig. 6 shows the effect of mangiferin (25 mg/kg) and fluoxetine (10 mg/kg), given by p.o. route, on the synaptosomal [³H]5-HT uptake in cerebral cortex, hippocampus and striatum of mice. The statistical analysis revealed that treatment of mice with mangiferin and fluoxetine inhibited significantly [³H] 5-HT uptake by synaptosomes in cerebral cortex (47.68%, $p < 0.01$; 47.68%, $p < 0.01$), hippocampus (54.99%, $p < 0.01$; 42.50%, $p < 0.01$) and striatum (57.13%, $p < 0.05$; 34.03%, $p < 0.01$), respectively, when compared to the control group.

4. Discussion

The results of this study indicated that mangiferin showed antidepressant-like effect in both tests of behavioral despair, TST and FST. Additionally, the involvement of the serotonergic system in the antidepressant-like effect of mangiferin was evidenced in TST, dependent on an interaction with the serotonergic 5-HT_{1A} receptors. In this work none of the treatments caused change in locomotor activity and impairment in motor coordination of mice, indicating that to any nonspecific motor changes can be discarded in the antidepressant-like effect of mangiferin observed in the TST and FST. The results of the behavioral studies were confirmed by the neurochemical data, by decrease of 5-HT turnover, as represented by 5-HIAA/5-HT ratio. Furthermore, its effect also can be associated with 5-HT reuptake inhibition. These results suggest that the mechanisms behind antidepressant-like effect of mangiferin may involve the modulation of serotonergic system.

It has been reported that mangiferin possesses a wide spectrum of pharmacological activities including effects in central nervous system (Benard and Chi, 2015). In a mammalian organism (rats, pigs, humans), mangiferin is metabolized by intestinal bacterium, *Bacteroides* sp., in a typical manner for plant polyphenols, could transform mangiferin to norathyriol (Sanugul et al., 2005). Besides norathyriol, an additional 30 - 40 metabolites of mangiferin have been reported (Liu et al., 2012; Liu et al., 2011). The biotransformation pathways of mangiferin involve deglycosylation, dehydroxylation, methylation, glycosylation, glucuronidation and sulfation (Liu et al., 2011). Mangiferin and its metabolites are detectable in serum and urine of rats in 1 hour after a single dose of oral administration (Liu et al., 2011; Han et al., 2010). Orally administered mangiferin can also be detected in several major organs including heart, small intestine, stomach, liver, lung spleen and brain (Kammalla et al., 2015; Liu et al., 2011). These results indicate that mangiferin can be absorbed very rapidly in rats. Worth of mentioning is the ability of mangiferin to cross the blood-brain barrier, albeit in a very little amount, makes it especially interesting for prevention of neurodegenerative diseases (Li et al., 2008). The complex nature of polyphenol metabolism involving the liver and extra-hepatic organs, such as the lungs, kidneys and gastrointestinal mucosa, will create a delicate balance of conjugated and deconjugated metabolites that will likely contribute to the beneficial biological properties of mangiferin (Van der Merwe et al., 2012).

As some antidepressants with serotonergic modulatory activity, such as escitalopram and fluoxetine have shown to be effective in both depression as associated anxiety disorders (David et al., 2009; Pedersen, 2005), we investigated the anxiolytic-like effect of mangiferin in EPM test. Results showed that mangiferin did not alter the percentage of time or the percentage of entries into the open arms compared to the control. These data suggest that a single administration of mangiferin did not presented anxiolytic properties. A recent study demonstrated the protective effect of mangiferin in LPS-evoked anxiety-like behaviour in mice, after 14 days of mangiferin (20 and 40 mg/kg, p.o.) pretreatment (Jangra et al., 2014).

Several studies indicate that a disturbance in central 5-HT system have been pointed as a key factor linked in pathophysiology of depression (Hamon and Blier, 2013; Artigas, 2013). To investigate the role of the serotonergic system in the antidepressant-like effects of mangiferin was used the method of 5-HT depletion, namely pharmacological depletion by administration of PCPA, an inhibitor of enzyme tryptophan hydroxylase. Its administration for four consecutive days causes a temporary depletion the endogenous stores of 5-HT by 77% (Pałucha-Poniewiera et al., 2010). Our results show that the reversal of the effect of mangiferin

by the depletion of 5-HT elicited by PCPA suggests that the antidepressant-like effect of mangiferin is dependent on the bioavailability of 5-HT in the synaptic cleft.

The 5-HT_{1A} receptor has been increasingly associated with alterations in mood and emotion and has opposing functions as a pre-synaptic somatodendritic autoreceptor and a post-synaptic heteroreceptor (Albert, 2012). Recent studies have revealed that it has been of considerable interest to evaluate potential antidepressants that incorporate an action at 5-HT_{1A} receptors into their mechanism of action. In this context, two medications have recently been approved for treatment of major depressive disorder [vilazodone, approved in 2011; and vortioxetine (Lu AA21004), approved in 2013] inhibit 5-HT reuptake and show partial agonism at 5-HT_{1A} receptors (Zhang et al., 2014; Mork et al., 2012; Page et al., 2002). The present results indicate an involvement of 5-HT_{1A} receptors in the antidepressant-like effect of mangiferin in the TST. This evidence is supported by one of the findings of our present pharmacological manipulation study that the 5-HT_{1A} antagonist WAY100635 abolished immobility time reduced by mangiferin. However, the 5-HT_{1B} antagonist, some receptor subtypes tested (5-HT_{2A/2C}, 5-HT₃, 5-HT₃, 5-HT₄ and 5-HT₇), did not reverse this antidepressant-like effect by mangiferin. Therefore, there is a possibility that antidepressant-like effect of mangiferin may due to the modulation via 5-HT_{1A} receptor.

This work also showed that the mangiferin was able to produce a synergistic antidepressant-like effect with a combined treatment with SSRIs (paroxetine and sertraline), all at sub-effective doses in the TST. The synergistic antidepressant-like effect obtained using this experimental protocol corroborated with the hypothesis that the serotonergic neurotransmission is directly involved in the antidepressant-like effect of mangiferin. One possibility that account for the potentiation of the effect of a sub-effective dose of mangiferin in the TST is that this compound, similarly to paroxetine and sertraline, may increase the 5-HT levels in the synaptic cleft, at least in part, by inhibiting the 5-HT reuptake. This study suggests a new therapeutic implication with the synergistic antidepressant-like responses elicited by mangiferin in combination with paroxetine and sertraline. The combination strategy, used in the treatment of depression, offers a series of potential advantages. The main advantage of this approach is decreased doses of antidepressants prescribed and consequently the adverse side effects, including less withdrawal syndrome and a more rapid or effective clinical response than that obtained by antidepressant replacing (Rubio et al. 2004; Lam et al. 2002). Thus, this xanthone should improve the effectiveness of these conventional antidepressants and it is helpful in the treatment of depression.

Decreased brain levels of 5-HT and its major metabolite 5-HIAA have commonly been observed in patients with depression (Roy et al., 1989). Interestingly, mangiferin affects 5-HT levels and its metabolite HIAA in mice brain regions investigated in this study. The treatment of mangiferin was associated with the increase in 5-HT levels in the hippocampus, whereas 5-HIAA levels were significantly decreased in the cerebral cortex. In addition, the treatment with mangiferin seems to act through 5-HT reuptake inhibition in the brain regions (cerebral cortex, hippocampus and striatum). On the other hand, mangiferin treatment significantly decreased the ratio of 5-HIAA/5-HT, a usual indicator of serotonergic activity, in the two brain regions (hippocampus and cerebral cortex). As the ratio of neurotransmitter compared to its metabolites (turnover) can be used as an index of neurotransmitter metabolism (Kitanaka et al., 2006) and the reduction in metabolites/neurotransmitters suggests a slowdown in the metabolism of neurotransmitter. In this meaning, the cerebral cortex and hippocampus have been reported to play significant roles in affective states in human and are therefore targets for treatment of mood disorders, both act involved critically in the regulation of depression related emotion, motivation, learning and memory (Mao et al., 2011; Mallo et al. 2008). Abnormal 5-HT levels in these brain regions may be relevant to clinical investigations of the depressed state and evaluation on the effect of mangiferin.

The possible effect of mangiferin in the 5-HT reuptake at nerve terminals by synaptosomes prepared from cerebral cortex, hippocampus and striatum of mice was carried out. The 5-HT uptake by synaptosomes was inhibited significantly in the mangiferin group, as well as by fluoxetine treatment (positive control), suggesting an increase of 5-HT concentrations in the synaptic cleft, which can be associated with blocking the 5-HT transporter located on presynaptic nerve terminals (Ceglia et al., 2004; Bel and Artigas, 1993), although the degree of selectivity for 5-HT transporter is variable. Fluoxetine, paroxetine or sertraline act on 5-HT transporter, however paroxetine and sertraline have higher affinity for 5-HT transporter (Carrasco and Sandner, 2005). The process of 5-HT uptake is a mechanism well-described, responsible for regulating 5-HT levels at synaptic cleft, and is involved on the action mechanism of the most antidepressant drugs (Millan, 2006).

Herbal therapies currently have been introduced for the treatment of depression and provide prospective alternative/complementary strategies, with advantages in terms of safety, tolerability and patient compliance (Meeks et al., 2007; Thachil et al., 2007). Particularly, in experiments involving blood peripheral lymphocytes and hepatocytes of rats, mangiferin did not induce cytotoxicity, genotoxicity or mutagenicity (Rodeiro et al., 2014).

Summing up our results, we have demonstrated for the first time that mangiferin exhibits a pronounced antidepressant-like effect in the TST and FST in mice, dependent on the availability of 5-HT in the synaptic cleft and seems to be mediated by a modulation of the 5-HT_{1A} receptors. Furthermore, the neurochemical changes in the serotonergic system should be resulted of the 5-HT reuptake inhibition in the brain regions induced by mangiferin. Therefore, mangiferin could be a promising candidate for development of a drug to treatment of depression, as well as its association with conventional antidepressants, could be used to reduce the dose of these drugs.

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. and F.D. are recipients of FAPERGS, CAPES or UNIPAMPA fellowships.

References

- Albert, P.R. (2012). Transcriptional regulation of the 5-HT_{1A} receptor: implications for mental illness. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 367, 2402–2415.
- Artigas, F. (2013). Serotonin receptors involved in antidepressant effects. *Pharmacol. Ther.* 137, 119–131.
- Bauer, M., Pfennig, A., Severus, E., Whybrow, P.C., Angst, J., Möller, H.J. (2013). World Federation of Societies of Biological Psychiatry (WFSBP) guidelines for biological treatment of unipolar depressive disorders, part 1: update 2013 on the acute and continuation treatment of unipolar depressive disorders. *World. J. Biol. Psychiatry.* 14, 334–385.
- Bel, N., Artigas, F. (1993). Chronic treatment with fluvoxamine increases extracellular serotonin in frontal cortex but not in raphe nuclei. *Synapse* 3, 243–5.
- Benard, O., Chi, Y. (2015). Medicinal properties of mangiferin, structural features, derivative synthesis, pharmacokinetics and biological activities. *Mini Rev. Med. Chem.* 15, 582–594.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Analytical Biochem.* 72, 248–254.

- Carrasco, J.L., Sandner, C. (2005). Clinical effects of pharmacological variations in selective serotonin reuptake inhibitors: an overview. *Int. J. Clin. Pract.* 59, 1428–34.
- Ceglia, I., Acconcia, S., Fracasso, C., Colovic, M., Caccia, S., Invernizzi, R.W. (2004). Effects of chronic treatment with escitalopram or citalopram on extracellular 5-HT in the prefrontal cortex of rats: role of 5-HT_{1A} receptors. *Br. J. Pharmacol.* 142, 469–78.
- Collins, P.Y., Patel, V., Joestl, S.S., March, D., Insel, T.R., Daar, A.S. (2011). Grand challenges in global mental health. *Nature* 475, 27–30.
- Cunha, M.P., Pazini, F.L., Oliveira, A., Machado, D.G., Rodrigues, A.L.S. (2013). Evidence for the involvement of 5-HT_{1A} receptor in the acute antidepressant-like effect of creatine in mice. *Brain Res. Bull.* 95, 61–69.
- David, D.J., Samuels, B.A., Rainer, Q., Wang, J.W., Marsteller, D., Mendez, I., Drew, M., Craig, D.A., Guiard, B.P., Guiloux, J.P. (2009). Neurogenesis-dependent and-independent effects of fluoxetine in an animal model of anxiety/depression. *Neuron* 62, 479–493.
- Ferraz, A.C., Anselmo-Franci, J.A., Perosa, S.R., Castro-Neto, E.F., Bellissimo, M.I., Oliveira, B.H., Cavalheiro, E.A., Naffah-Mazzacoratti, Mda G., Da Cunha, C. (2002). Aminoacid and monoamine alterations in the cerebral cortex and hippocampus of mice submitted to ricinine-induced seizures. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 72, 779–86.
- Fiske, C.H., Subbarow, Y.J. (1925). The calorimetric determination of phosphorus. *Biol. Chem.* 66, 375–81.
- Gay, B.M., Prigol, M., Stein, A.L., Nogueira, C.W. (2010). Antidepressant-like pharmacological profile of 3-(4-fluorophenylselenyl)-2,5-diphenylselenophene: Involvement of serotonergic system. *Neuropharmacology* 59, 172–179.
- Godoy, M.C., Figuera, M.R., Souza, F.R., Flores, A.E., Rubin, M.A., Oliveira, M.R., Zanatta, N., Martins, M.A., Bonacorso, H.G., Mello, C.F., et al. (2004). Alpha 2- adrenoceptors and 5-HT receptors mediate the antinociceptive effect of new pyrazolines, but not of dipyrone. *Eur. J. Pharmacol.* 496, 93–7.
- Gray, E.G., Whittaker, V.P. (1962). The isolation of nerve endings from brain: an electron-microscopic study of cell fragments derived by homogenization and centrifugation. *J. Anat.* 96, 79–88.
- Hamon, M., Blier, P. (2013). Monoamine neurocircuitry in depression and strategies for new treatments. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 45C, 54–63.
- Han, D., Chen, C., Zhang, C., Zhang, Y., Tang, X. (2010). Determination of mangiferin in rat plasma by liquid-liquid extraction with UPLC-MS/MS. *J. Pharmaceut. Biomed. Analysis*, 51, 260-263.

- Jangra, A., Likhi, M.M., Sulakhiya, K., Baruah, C.C., Lahkar, M. (2014). Protective effect of mangiferin against lipopolysaccharide-induced depressive and anxiety-like behavior in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 740, 337-345.
- Kammalla, A.K., Ramasamy, M.K., Inampudi, J., Dubey, G.P., Agrawal, A., Kaliappan, I. (2015). Comparative Pharmacokinetic Study of Mangiferin After Oral Administration of Pure Mangiferin and US Patented Polyherbal Formulation to Rats. *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, 16, 250-258.
- Kitanaka, N., Kitanaka, J., Takemura, M. (2006). Modification of morphine-induced hyperlocomotion and antinociception in mice by clorgyline, a monoamine oxidase-A inhibitor. *Neurochem. Res.* 31, 829–37.
- Krajl, M. (1965). A rapid microfluorimetric determination of monoamine oxidase. *Biochem. Pharmacol.* 14, 1683–5.
- Kroeze, Y., Zhou, H., Homberg, J.R. (2012). The genetics of selective serotonin reuptake inhibitors. *Pharmacol. Ther.* 136, 375-400.
- Kupfer, D.J., Frank, E., Phillips, M.L. (2012). Major depressive disorder: new clinical, neurobiological, and treatment perspectives. *Lancet* 379, 1045–1055.
- Lam, R.W., Wan, D.D., Cohen, N.L., Kennedy, S.H. (2002). Combining antidepressants for treatment resistant depression: a review. *J. Clin. Psychiatry.* 63, 685–93.
- Lister, R.G. (1987). The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology* 92, 180–5.
- Liu, H., Wang, K., Tang, Y., Sun, Z., Jian, L., Li, Z., Wu, B., Huang, C. (2011). Structure elucidation of in vivo and in vitro metabolites of mangiferin. *J. Pharmaceut. Biomed. Analysis*, 2011, 55 (5), 1075-1082.
- Liu, H., Wu, B., Pan, G., He, L., Li, Z., Fan, M., Jian, L., Chen, M., Wang, K., Huang, C. (2012). Metabolism and pharmacokinetics of mangiferin in conventional rats, pseudo-germ-free rats, and streptozotocin-induced diabetic rats. *Drug Metab. Dispos.*, 40, 2109-2018;
- Li, Y.J., Sui, Y.J., Dai, Y.H., Deng, Y.L. (2008). LC determination and pharmacokinetics study of mangiferin in rat plasma and tissues. *Chromatographia*, 67, 957-960.
- Mallo, T., Kõiv, K., Koppel, I., Raudkivi, K., Uustare, A., Rincken, A., Timmusk, T., Harro, J. (2008). Regulation of extracellular serotonin levels and brain-derived neurotrophic factor in rats with high and low exploratory activity. *Brain. Res.* 1194, 110–117.
- Mao, Q.Q., Xian, Y.F, Ip, S.P, Che, C.T. (2011). Involvement of serotonergic system in the antidepressant-like effect of piperine. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 35, 1144-7.

- Meeks, T.W., Wetherell, J.L., Irwin, M.R., Redwine, L.S., Jeste, D.V. (2007). Complementary and alternative treatments for late-life depression, anxiety, and sleep disturbance: a review of randomized controlled trials. *J. Clin. Psychiatry* 68, 1461–1471.
- Millan, M.J. (2006). Multi-target strategies for the improved treatment of depressive states: conceptual foundations and neuronal substrates, drug discovery and therapeutic application. *Pharmacol. Ther.* 110, 135–370.
- Mork, A., Pehrson, A., Brennum, L.T., Moller Nielsen, S.M., Zhong, H., Lassen, A.B., Miller, S., Westrich, L., Boyle, N.J., Sanchez, C., et al., (2012). Pharmacological Effects of Lu AA21004: A Novel Multimodal Compound for the Treatment of Major Depressive Disorder. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 340, 666-75.
- Naderi, N., Haghparast, A., Saber-Tehrani, A., Rezaii, N., Alizadeh, A.M., Khani, A., Motamedi F. (2008). Interaction between cannabinoid compounds and diazepam on anxiety-like behaviour of mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 89, 64–75.
- Ohno, Y., Imaki, J., Mae, Y., Takahashi, T., Tatara, A. (2011). Serotonergic modulation of extrapyramidal motor disorders in mice and rats: Role of striatal 5-HT₃ and 5-HT₆ receptors. *Neuropharmacol.* 60, 201-208.
- Page, M.E., Cryan, J.F., Sullivan, A., Dalvi, A., Saucy, B., Manning, D.R., Lucki, I. (2002). Behavioral and neurochemical effects of 5-{4-[4(5-cyano-3-indolyl)-butyl]-butyl}-1-piperizinyll}-benzofuran-2-carboxamide (EMD 68843): a combined selective inhibitor of serotonin reuptake and 5-hydroxytryptamine 1A receptor partial agonist. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 302, 1220-8.
- Pałucha-Poniewiera, A., Brański, P., Lenda, T., Pilc, A. (2010). The antidepressant-like action of metabotropic glutamate 7 receptor agonist N,N'-bis(diphenylmethyl)-1,2-ethanediamine (AMN082) is serotonin-dependent. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 334, 1066–1074.
- Pałucha-Poniewiera, A., Brański, P., Wierońska, J.M., Stachowicz, K., Sławińska, A., Pilc, A., (2014). The antidepressant-like action of mGlu5 receptor antagonist, MTEP, in the tail suspension test in mice is serotonin dependent. *Psychopharmacol.* 231, 97-107.
- Pan, S., Zhou, S., Gao, S., Yu, Z., Zhang, S., Tang, M., Sun, J., Ma, D., Han, Y., Fong, W., et al., (2013). New Perspectives on How to Discover Drugs from Herbal Medicines: CAM's Outstanding Contribution to Modern Therapeutics. *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.* 627375.
- Pardo Andreu, G.L., Maurmann, N., Reolon, G.K., de Farias, C.B., Schwartzmann, G., Delgado, R., Roesler, R. (2010). Mangiferin, a naturally occurring glucoxilxanthone improves long-term object recognition memory in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 635, 124-128.

- Pedersen, A.G. (2005). Escitalopram and suicidality in adult depression and anxiety. *Int. Clin. Psychopharmacol.* 20, 139–143.
- Porsolt, R.D., Bertin, A., Jalfre, M. (1977). Behavioural despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch. Internat. Pharmacodynamie Therap.* 229, 327-336.
- Ramawat, K.G., Dass, S., Meeta, Mathur. (2009). The chemical diversity of bioactive molecules and therapeutic potential of medicinal plants. *Herbal Drugs* 7–32.
- Rocha, F.F., Lima-Landman, M.T., Souccar, C., Tanae, M.M., De Lima, T.C., Lapa, A.J. (2007). Antidepressant-like effect of *Cecropia glazoui* Sneth and its constituents—in vivo and in vitro characterization of the underlying mechanism. *Phytomedicine* 14, 396–402
- Rodeiro, I., Delgado, R., Garrido, G. (2014). Effects of a *Mangifera indica* L. stem bark extract and mangiferin on radiation-induced DNA damage in human lymphocytes and lymphoblastoid cells. *Cell Prolif.* 47, 48–55.
- Roy, A., De Jong, J., Linnoila, M. (1989). Cerebrospinal fluid monoamine metabolites and suicidal behavior in depressed patients. A 5-year follow-up study. *Arch. Gen. Psychiatry.* 46, 609-12.
- Rubio, G., San, L., López-Muñoz, F., Alamo, C. (2004). Reboxetine adjunct for partial or nonresponders to antidepressant treatment. *J. Affect Disord.* 81, 67–72.
- Saha, S., Sadhukhan, P., Sil, P.C. 2016. Mangiferin: A xanthonoid with multipotent anti-inflammatory potential. *Biofactors*. doi: 10.1002/biof.1292
- Sanugul, K., Akao, T., Li, Y., Kakiuchi, N., Nakamura, N., Hattori, M. (2005). Isolation of a human intestinal bacterium that transforms mangiferin to norathyriol and inducibility of the enzyme that cleaves a C-glucosyl bond. *Biol. Pharm. Bull.* 28, 1672-1678.
- Sethiya, N.K., Mishra, S. (2014). Investigation of mangiferin, as a promising natural polyphenol xanthone on multiple targets of Alzheimer's disease. *Journal of Biol. Active Prod. Nat.* 4, 111–119.
- Soto-Otero, R., Mendez-Alvarez, E., Hermida-Ameijeiras, A., Sanchez-Sellero, I., Cruz-Landeira, A., Lamas, M.L. (2001). Inhibition of brain monoamine oxidase activity by the generation of hydroxyl radicals: potential implications in relation to oxidative stress. *Life Sci.* 69, 879–89.
- Steru, L., Chermat, R., Thierry, B., Simon, P. (1985). The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology* 85, 367-70.
- Thachil, A.F., Mohan, R., Bhugra, D. (2007). The evidence base of complementary and alternative therapies in depression. *J. Affect. Disord.* 97, 23–35.

Van der Merwe, J.D., Joubert, E., Manley, M., de Beer, D., Malherbe, C.J., Gelderblom, W.C. (2012). Mangiferin glucuronidation: important hepatic modulation of antioxidant activity. *Food Chem. Toxicol.* 50, 808-815.

Vos, T., Flaxman, A.D., Naghavi, M., Lozano, R., Michaud, C., Ezzati, M., Shibuya, K., Salomon, J.A., Abdalla, S., Aboyans, V., et al., (2013). Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* 380, 2163–2196.

WHO (2015) Depression. World Health Organization. [cited 2015 Apr 12] Available from http://www.who.int/mental_health/management/depression/definition/en

Zhang, B.P., Zhao, J., Li, S.S., Yang, L.J., Zeng, L.L., Chen, Y., Fang, J. (2014). Mangiferin activates Nrf2-antioxidant response element signaling without reducing the sensitivity to etoposide of human myeloid leukemia cells in vitro. *APS* 35, 257–266.

Yang, Z., Weian, C., Susu, H., Hanmin, W. (2016) Protective effects of mangiferin on cerebral ischemia–reperfusion injury and its mechanisms. *Eur. J. Pharmacol.* 771, 145–151.

Legends of figures

Figure 1. Effect of the administration of mangiferin, fluoxetine and imipramine on immobility time in the TST and in the FST in mice. Time-course curve of the antidepressant-like effect caused by mangiferin (25 mg/kg, p.o.) administered 1, 2, 4, 6, 8 and 12 hours before the TST (panel A). Dose-response curve of mangiferin (0.2, 1, 5, 25 mg/kg, p.o.) administered 1 hour before the TST (panel B) and FST (panel C). Fluoxetine (32 mg/kg, p.o.) and imipramine (15 mg/kg, p.o.), were used as positive controls and they were administered 30 min before the TST or FST. The values were analyzed by one-way ANOVA, followed by the Newman–Keuls. Values are expressed as the means \pm S.E.M. ($n = 6$ –8 mice in each group). Asterisks denote the significant effect (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$) as compared to respective control group.

Figure 2. Effect of pretreatment with PCPA (100 mg/kg; i.p. once a day per 4 consecutive days) on mangiferin-induced reduction in the immobility time in the mice TST. Mangiferin (5 mg/kg, p.o.) was administered 24 h after the last PCPA administration and 1 hour before the test. The values were analyzed by two-way ANOVA followed by Bonferroni's test, each value is expressed as the means \pm S.E.M. (n = 6–8 mice in each group). Asterisks represent significant effect (***) $p < 0.001$ as compared with the respective vehicle-treated control. (# $p < 0.01$) as compared with the same group pretreated with vehicle and mangiferin.

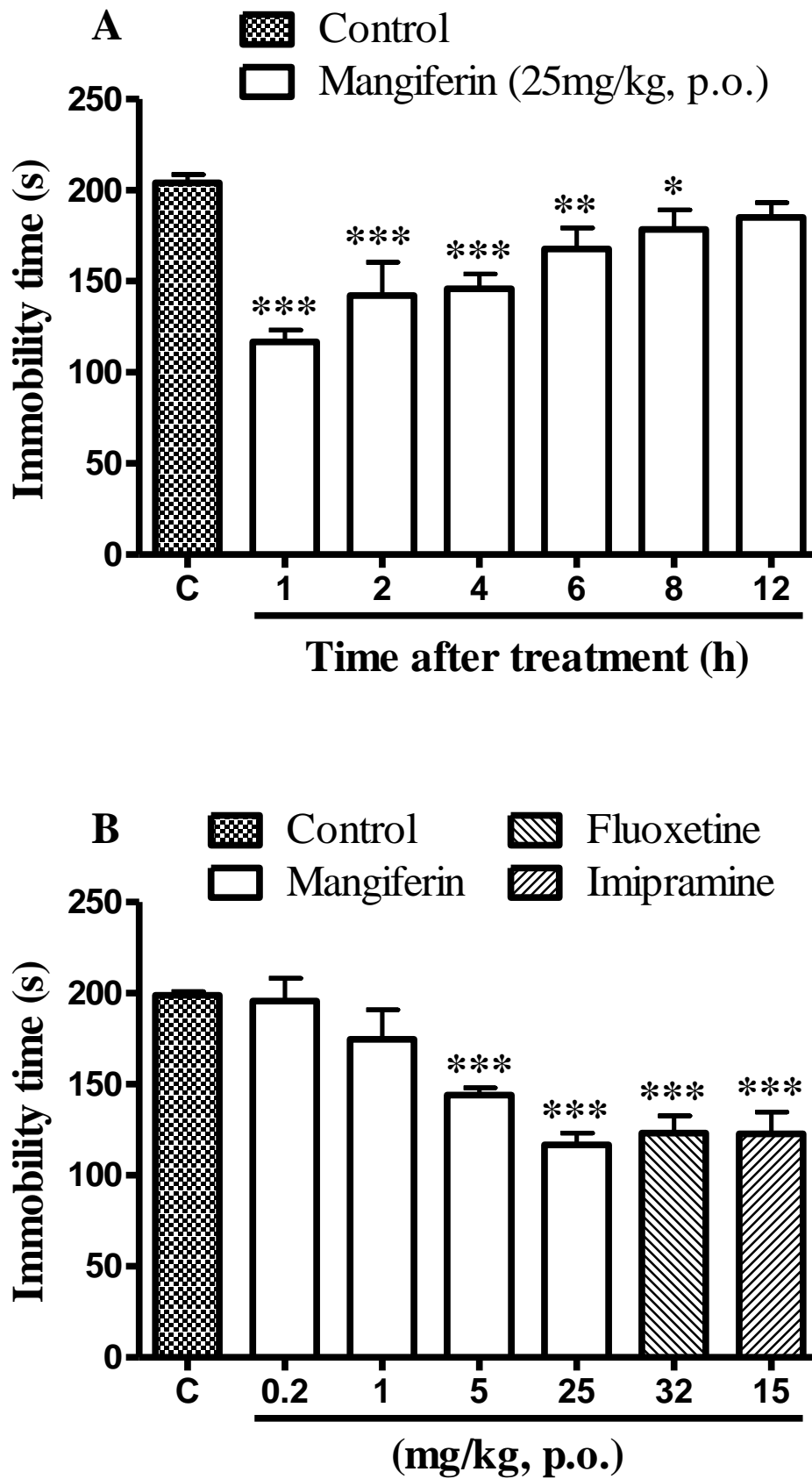
Figure 3. Effect of pretreatment with WAY100635 (0.1 mg/kg, s.c.; a selective 5-HT_{1A} receptor antagonist - panel A), SB 224289 (0.1 mg/kg, i.p., a 5-HT_{1B} receptor antagonist - panel B), ritanserin (1 mg/kg, i.p., a 5-HT_{2A/2C} receptor antagonist - panel C), MDL 72222 (0.1 mg/kg, i.p., a 5-HT₃ receptor antagonist - panel D), GR 125487 (10 mg/kg, i.p., a 5-HT₄ receptor antagonist - panel E) and SB 269970 (1 mg/kg, i.p., a 5-HT₇ receptor antagonist - panel F) on mangiferin-induced reduction in the immobility time in the mice TST. Mangiferin (5 mg/kg, p.o.) was administered 30 min after antagonists and 1 hour before the test. The values were analyzed by two-way ANOVA followed by Bonferroni's test, each value is expressed as the means \pm S.E.M. (n = 6–8 mice in each group). Asterisks represent significant effect (***) $p < 0.001$ as compared with the respective vehicle-treated control. (# $p < 0.01$) as compared with the same group pretreated with vehicle and mangiferin.

Figure 4. Effects of the administration of a subeffective dose of mangiferin (1 mg/kg, p.o.) and subeffective dose of paroxetine (0.1 mg/kg, p.o.; panel A) or sertraline (1 mg/kg, p.o.; panel B) in the immobility time in the TST. The values were analyzed by two-way ANOVA followed by Bonferroni's test, each value is expressed as the means \pm S.E.M. (n = 6–8 mice in each group). Asterisks represent significant effect (** $p < 0.01$) as compared with the respective vehicle-treated control.

Figure 5. Effect of administration of mangiferin (0.2 - 25 mg/kg, p.o.), diazepam (1mg/kg, s.c.) or vehicle (10mL/kg, p.o.) on anxiety-related behavior in the plus-maze test in mice. (A) Percentage of time spent in open arms. (B) Percentage of open arm entries. The values were analyzed by one-way ANOVA, followed by Newman-Keuls, each value was expressed as the means \pm SEM. (n= 6-8 mice in each group). Asterisks denote the significant effect (* $p < 0.05$) as compared with the respective vehicle-treated control group.

Figure 6. Effect of the administration of mangiferin (25 mg/kg, p.o.) and fluoxetine (10 mg/kg, p.o.) on synaptosomal [³H]5-HT uptake in the cerebral cortex, hippocampus and striatum of mice. The values were analyzed by one-way ANOVA, followed by Newman-Keuls, each value was expressed as the means \pm SEM. (n= 6 mice in each group). Asterisks denote the significant levels (*p < 0.05; **p < 0.01) as compared with the respective vehicle-treated control group.

Figure 1



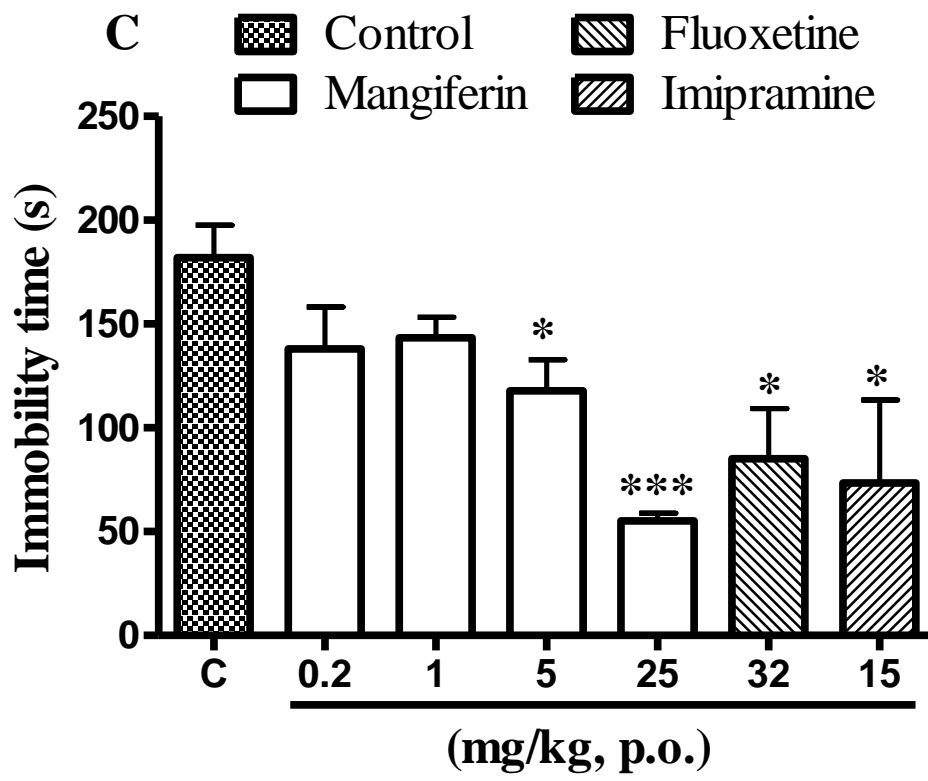


Figure 2

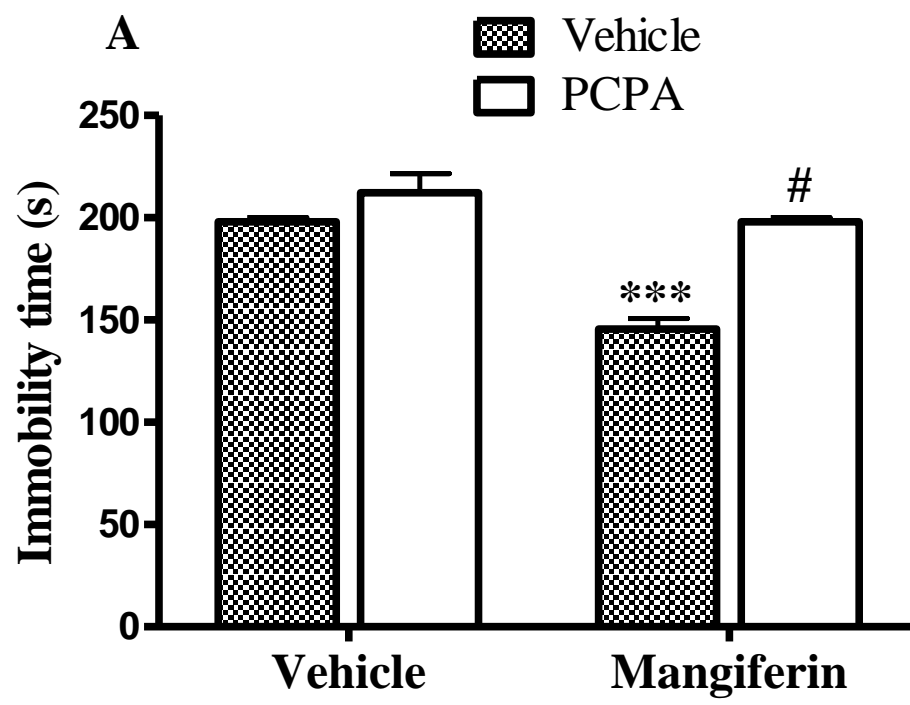


Figure 3

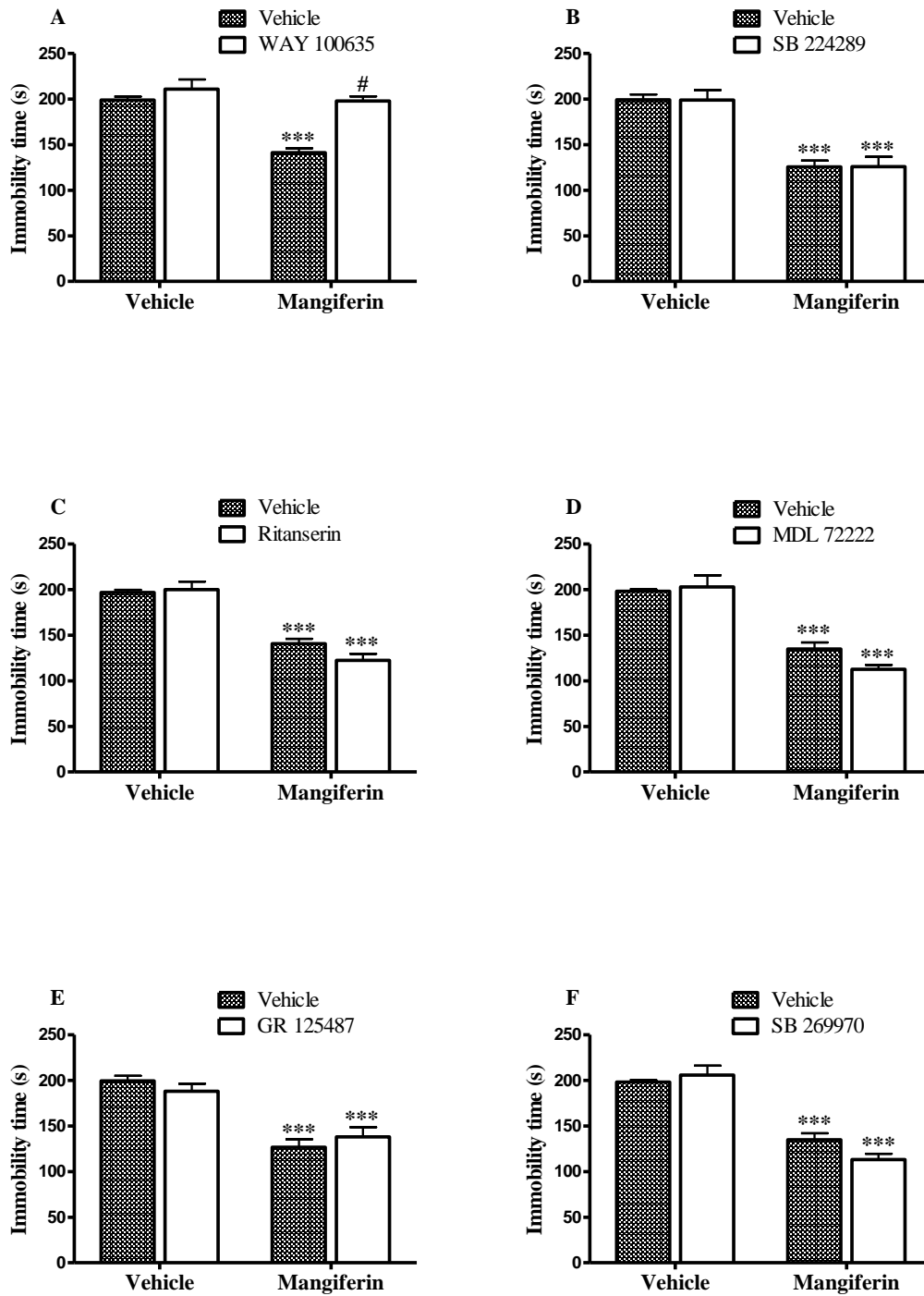
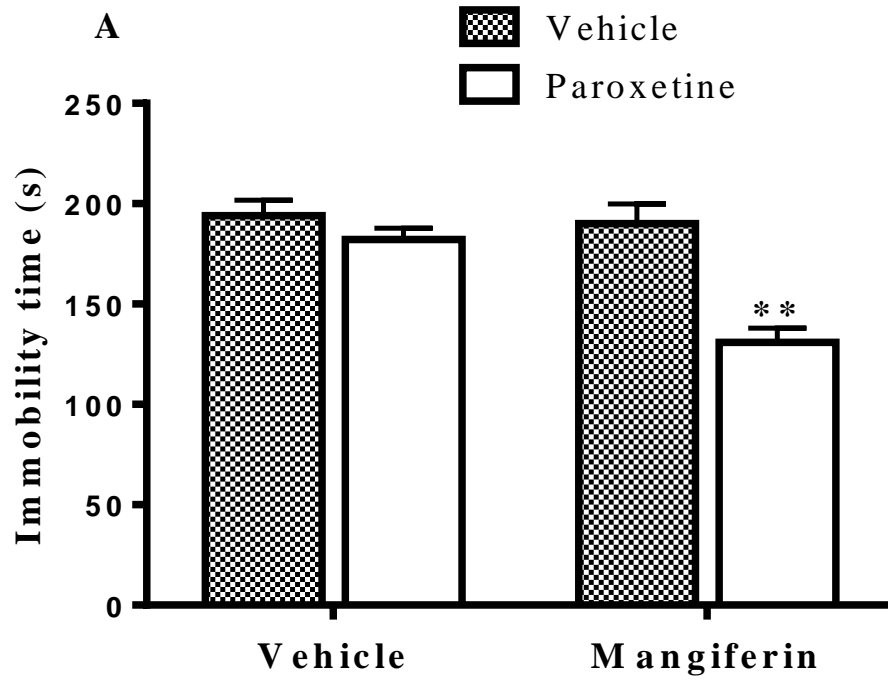


Figure 4



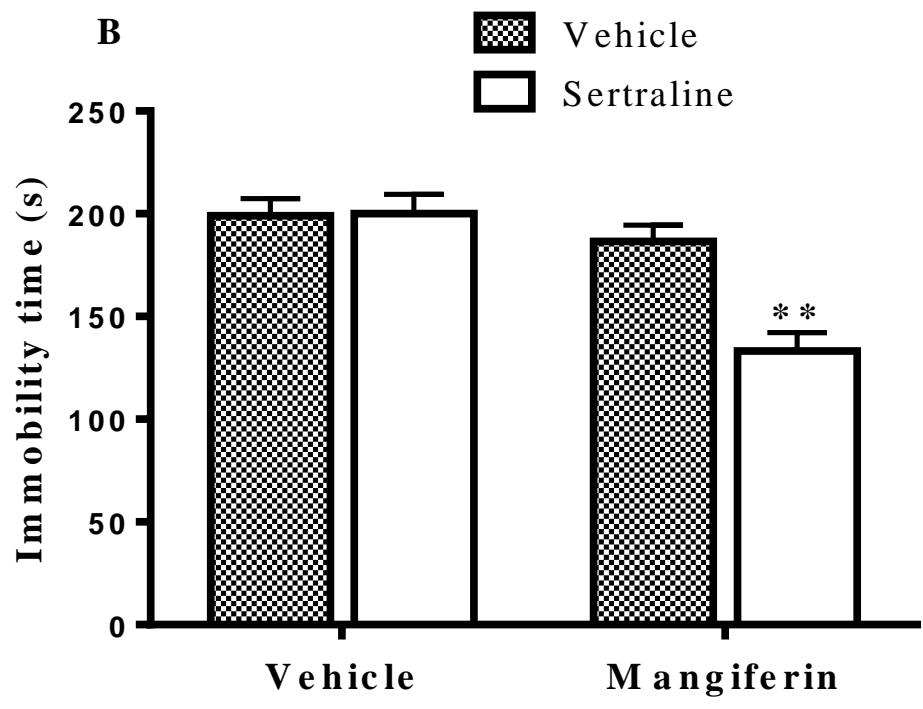


Figure 5

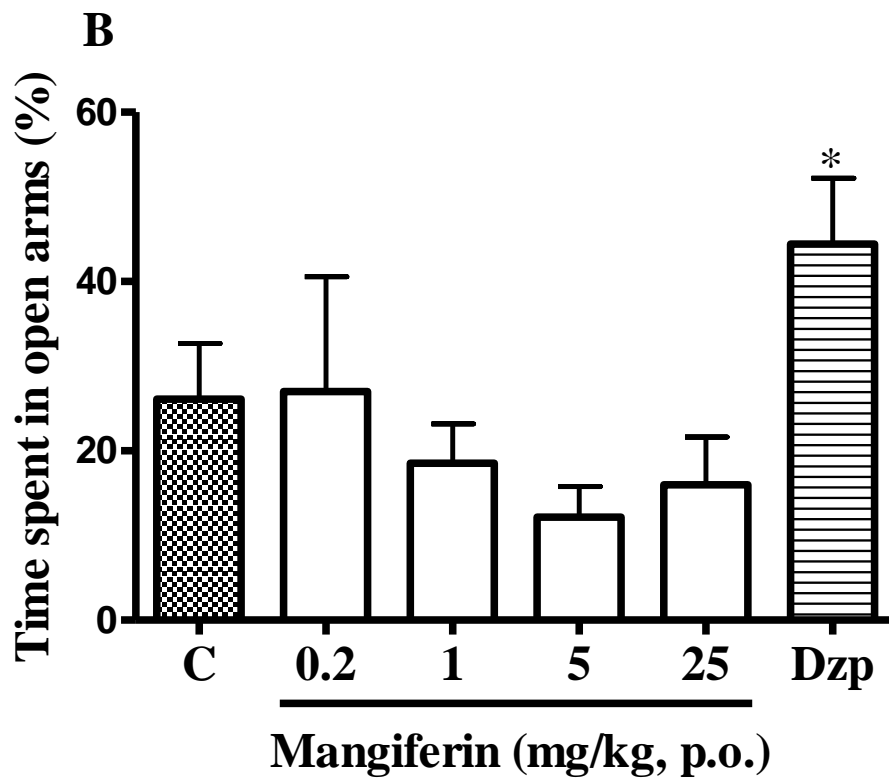
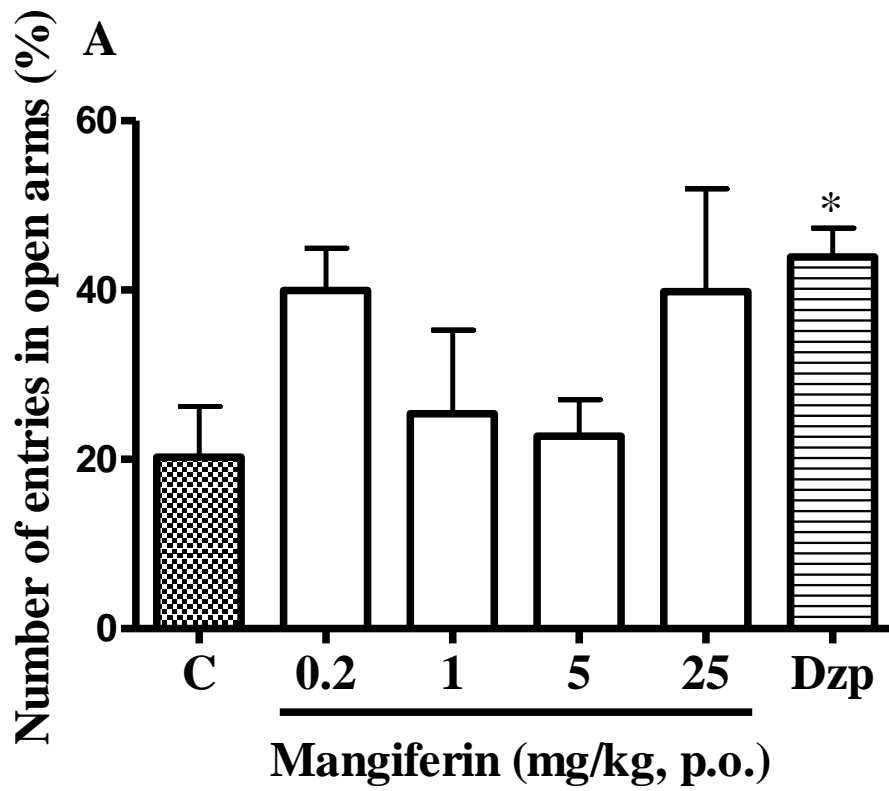


Figure 6

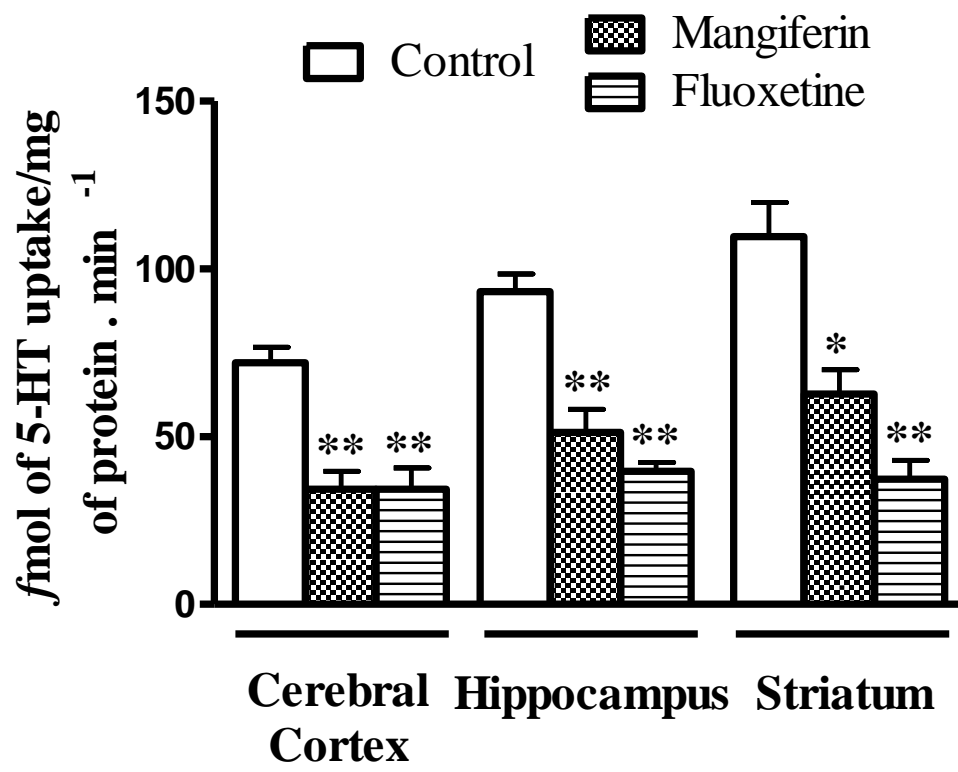
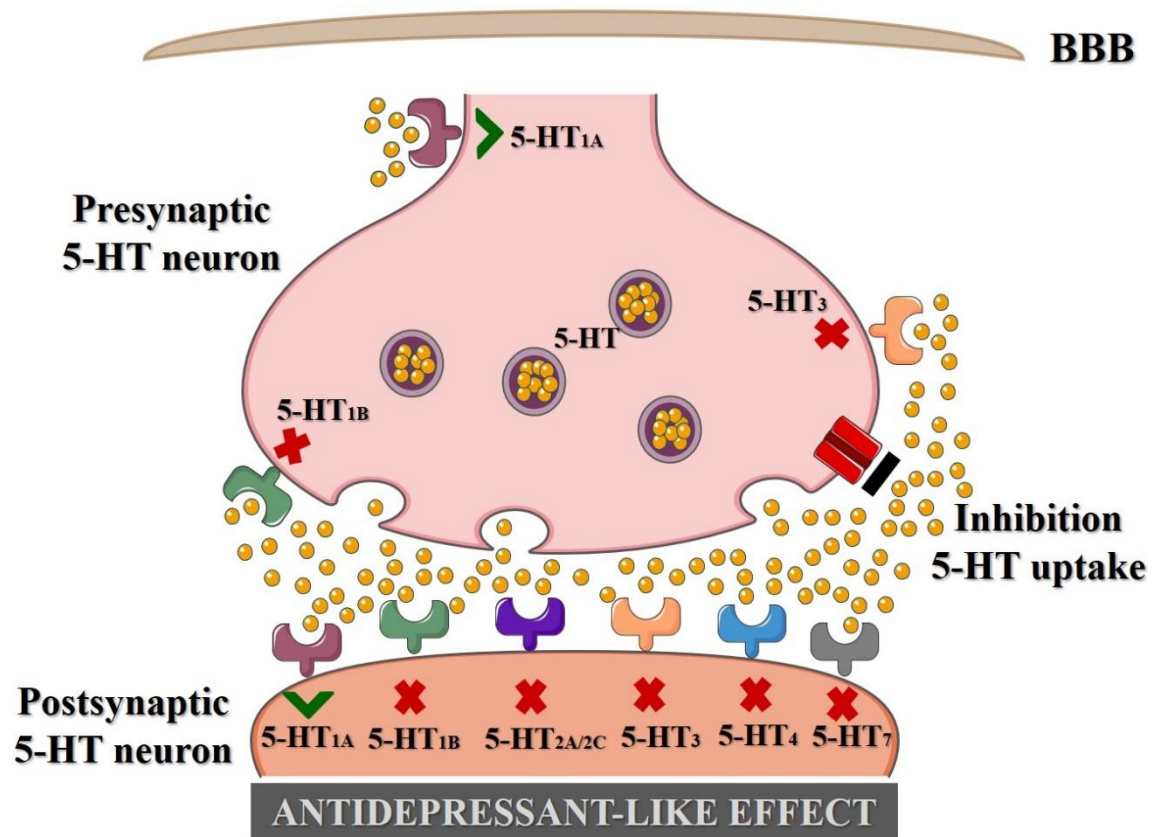


Table 1. Effect of treatment with mangiferin on levels of the 5-HT and 5-HIAA in the cerebral cortex, hippocampus and striatum of mice

	Groups	Control	0.2 mg/kg	1 mg/kg	5 mg/kg	25 mg/kg
Cerebral Cortex	5-HT	446.0 ± 32.6	428.3 ± 36.2	552.8 ± 28.5	578.5 ± 28.8	600.3 ± 39.1
	5-HIAA	471.8 ± 32.9	471.5 ± 36.6	436.5 ± 29.4	350.3 ± 28.9	310.0 ± 10.2*
	5-HIAA/5-HT	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1	0.8 ± 0.1*	0.6 ± 0.1***	0.5 ± 0.1***
Hippocampus	5-HT	472.3 ± 19.0	470.3 ± 33.5	516.0 ± 49.4	614.0 ± 14.2	647.8 ± 42.5*
	5-HIAA	380.3 ± 35.2	401.3 ± 27.4	355.0 ± 22.5	304.8 ± 19.9	308.0 ± 9.3
	5-HIAA/5-HT	0.8 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.5 ± 0.1*	0.5 ± 0.1*
Striatum	5-HT	412.0 ± 32.1	406.5 ± 44.6	427.3 ± 24.6	425.0 ± 58.6	541.8 ± 64.1
	5-HIAA	480.8 ± 36.8	454.3 ± 26.0	460.5 ± 33.0	444.0 ± 25.1	427.5 ± 25.9
	5-HIAA/5-HT	1.2 ± 0.1	1.2 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1	0.8 ± 0.1

The values were analyzed by one-way ANOVA, followed by the Newman–Keuls. Concentrations were expressed as ng/g. Values are expressed as the mean ± S.E.M (n = 6). Asterisks denote significant effect (*p < 0.05; ***p < 0.001) as compared to respective control group.

Graphical Abstract



Highlights

Mangiferin exerts antidepressant-like effect in mice models of despair tests

The 5-HT_{1A} receptors are related to antidepressant-like effect of mangiferin

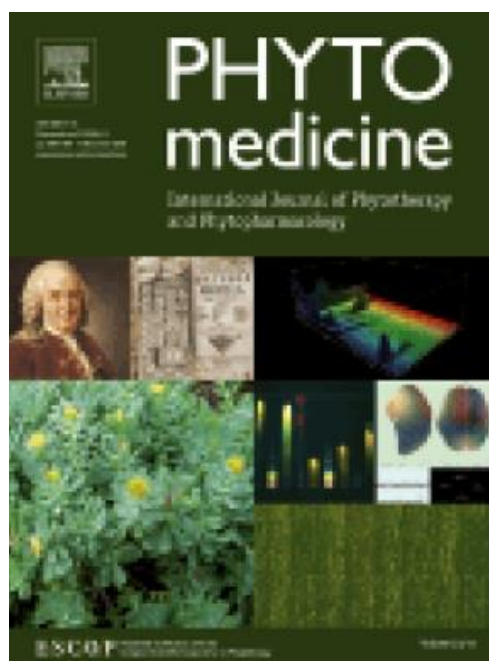
Mangiferin produced synergistic effect with paroxetine and sertraline in the TST

Ratio of 5-HIAA/5-HT decreased, suggesting a slowdown 5-HT metabolism

Mangiferin inhibited significantly [³H] 5-HT uptake by synaptosomes

4.4 Manuscrito 2

Manuscrito apresentado na tese de acordo com as recomendações do periódico científico no qual o mesmo foi submetido "Phytomedicine".



4.4 Manuscrito 2

Influence of dopaminergic system on mangiferin-induced antidepressant-like effect in mice

Franciele Donato, Cristiano Ricardo Jesse*, Renata Giacomeli, Jossana Ruff, Dieniffer de Oliveira Espinosa, Nathalie Savedra Gomes, Silvana Peterini Boeira

¹Laboratório de Avaliações Farmacológicas e Toxicológicas Aplicadas às Moléculas Bioativas (LaftamBio), Universidade Federal do Pampa (Unipampa), Rua Luiz Joaquim de Sá Britto, s/n, Campus Itaqui, CEP 97650-000, RS, Brazil.

*Correspondence should be sent to:

Cristiano Ricardo Jesse

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

Phone and FAX number:+55-55-34331669

E-mail: cristianoricardojesse@yahoo.com.br

Abstract

Background: Depression is one of the most prevalent mental disorders, affecting about 121 million people worldwide and is among the leading causes of disability. Here we describe a potential therapeutic agent for this disease, mangiferin (1,3,6,7-tetrahydroxy-xanthone-C2-b-D-glucoside), a natural occurring glucosyl xanthone - bioactive compound of mango fruits, and the mechanisms underlying the antidepressant-like effect.

Hypothesis: Here we hypothesized that dopaminergic and noradrenergic systems mediate the antidepressant-like effect of mangiferin.

Study Design: The mechanisms underlying the antidepressant-like effect of mangiferin were investigated through behavioral test and was assessed by neurochemical quantification of neurotransmitters and metabolites.

Methods: Male C57BL/6J mice were pretreated with different dopaminergic and noradrenergic modulators. We also assessed the ability of the mangiferin to potentiate the antidepressant-like effect of conventional antidepressants. The behavioral tests carried were tail suspension test (TST) and open field test (OFT). Moreover, it was evaluated an effect of mangiferin on levels of the neurotransmitters and metabolites quantification of dopamine (DA) and norepinephrine (NE).

Results: In the current study, we showed the following: (i) pretreatment with sulpiride, but not with SCH23390 or haloperidol, prevented the antidepressant-like effect of mangiferin in the TST, demonstrating a dopamine D₂ receptor activation; (ii) a combinatory antidepressant-like effect when mice received the co-administration of subeffective doses of mangiferin with apomorphine, but not with SKF 38393, highlighting the involvement of dopamine D₂ receptors; (iii) synergistic antidepressant-like effect of the combined administration of a subeffective doses of bupropion with mangiferin, reinforcing the participation of the dopaminergic system; (iv) tendency to increase the DA levels, associated with a decrease in 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) and homovallinic acid (HVA) levels in the cerebral cortex, hippocampus and striatum, while significant reductions, were only observed in levels of DOPAC metabolite in the hippocampus. We also found a significant decrease in the DA turnover in the hippocampus and striatum.

Conclusion: Taken together, these results indicate that antidepressant-like the effect of mangiferin depends of the dopaminergic system modulation.

Keywords: Antidepressant-like; polyphenol; xanthone; dopaminergic system.

Abbreviations: 5-HIAA, 5-hydroxyindoleacetic acid; 5-HT, serotonin/5-hydroxytryptamine; DA, dopamine; DMSO, dimethylsulfoxide; DOPAC, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid; HVA, homovallinic acid; MHPG, 4-hydroxy-3-methoxyphenylglycol; NE, norepinephrine; OFT, open field test; SKF38393, (7)-1-phenyl-2,3,4,5-tetrahydro-1H-3- benzazepine-7,8-diol hydrochloride; AMPT, α -methyl- ρ -tyrosine; TST, tail suspension test;

1. Introduction

Depression is a serious widespread psychiatric disorder that erodes quality of life, productivity in the workplace and fulfillment of social and familial roles. Low self-esteem, anhedonia (reduction in pleasure), alteration in sleeping habits and appetite, loss of libido, difficulties in concentration, and increase in suicidal thoughts are several depression symptoms (Krishnan and Nestler, 2008).

Recently, the search for novel pharmacotherapy from medicinal plants for depression has increased markedly (Zhang, 2004; Sarris et al., 2011). There is a growing abundance of preclinical and clinical studies which reveal a range of complex psychotropic activity from herbal medicines potentially beneficial for treating certain psychiatric conditions, most notably depression (Sarris et al., 2011).

Numerous studies have shown that natural polyphenols play an important role in proper functioning of the brain (Arora et al., 2011; Park et al., 2010; Yashimura et al., 2003). The natural polyphenol, mangiferin (1,3,6,7-tetrahydroxy-xanthone-C2-b-D-glucoside), is extensively distributed in different plants all over the world, but the principal and easiest source of it is the mango tree (Barreto et al., 2008). Traditionally mangiferin has been used as folk medicines in different parts of the world for the treatment of different pathophysiological conditions due to the versatility of biological activities (Saha et al., 2016). Mangiferin possesses a wide range of pharmacological potentials including antioxidant, anti-inflammation, antidiabetic, antihyperlipidemic (Saha et al., 2016). Further, literature reports that mangiferin is also treat neurodegenerative disorders (Jangra et al., 2014; Lemus-Molina et al., 2009; Sethiya et al., 2014; Yang et al., 2016).

Dopaminergic and noradrenergic systems are suggested to be implicated in the regulation of mood (Willner et al., 2005). In depressive patients, abnormalities in neurotransmitter systems are observed frequently (Leonard, 2014). In particular, alterations in dopaminergic function with dopamine (DA) and their two metabolites, homovallinic acid (HVA) and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) levels are typically decreased in depression, indicating a diminished DA turnover (Mitani et al., 2006; Yadid and Friedman, 2008). In fact, currently, there are several evidences regarding the efficacy of antidepressants with dopaminergic effects in the treatment of depression (Papakostas, 2006). Alterations in noradrenergic neurotransmission also are classically implicated in the pathophysiology of depression. Norepinephrine (NE) is released by terminals of neurons that originate in the locus

coeruleus, a nucleus that is thought to be sensitized in major depression, and normalized by antidepressant treatment (Chandley et al., 2014).

Taking into account the interest in research effective therapies in the treatment of psychiatric illnesses, the present investigation sought to verify the mechanisms underlying the antidepressant-like effect of mangiferin through the possible involvement of the dopaminergic and noradrenergic systems.

2. Experimental Procedures

2.1. Animals

The experiments were conducted using male C57BL/6J mice (25–30 g) maintained at 22–25 °C with free access to water and food, under a 12:12 h light/dark cycle (lights on at 07:00 h). All manipulations were carried out between 09:00 a.m. and 04:00 p.m., with each animal used only once. All procedures in this study were performed in accordance with the National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. The experiments were performed after approval of the protocol by the Institutional Ethics Committee (CEUA/UNIPAMPA) under number 023/2013, and all efforts were made to minimize animals suffering and to reduce the number of animals used in the experiments.

2.2. Chemicals

The following drugs were used: mangiferin, R-(p)-7-chloro-8-hydroxy-3 methyl-1-phenyl-2,3,4,5-tetrahydro-1H-3-benzazepine hydrochloride (SCH23390), sulpiride, haloperidol, (7)-1-phenyl-2,3,4,5-tetrahydro-1H-3- benzazepine-7,8-diol hydrochloride (SKF38393), bupropion, apomorphine, prazosin, yohimbine, α -methyl- ρ -tyrosine (AMPT), propranolol (Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo, U.S.A) and reboxetine mesylate (Pfizer, SP, Brazil). Reboxetine and bupropion were dissolved in distilled water, AMPT was dissolved in saline with 10% Tween 80 and sulpiride that was diluted in saline with 5% dimethylsulfoxide (DMSO), whereas all the other drugs were dissolved in isotonic saline solution (NaCl 0.9%).

2.3. Behavioral tests

2.3.1. Tail suspension test (TST)

The TST was performed using mice as previously described by Steru et al. (1985). Briefly, each mice was suspended for 6 min by its tail using adhesive tape placed approximately 1 cm from the tip of the tail approximately 50 cm above the floor. The immobility time was recorded during this period. Mice were considered immobile only when they hung passively and were completely motionless.

2.3.2. Open field test (OFT)

To assess the possible effects of mangiferin and the other drugs used in the present study on locomotor activity, an independent group of mice were tested for locomotor activity using the open field paradigm in an automated systems apparatus (EP-149 IR, Insight®, Brazil). The apparatus is a clear acrylic plastic box (50×48×50 cm) with a removable plastic lid perforated with holes for ventilation. The monitor contains photocell beams and detectors that are mounted on opposite walls (2 cm above the chamber floor). General locomotor activity and the mice's position in the chamber are detected by infrared beams, which are recorded by a computer. Animals were placed in the center of the apparatus and allowed to freely explore the arena. The evaluation of locomotor activity was performed through of the total distance traveled (mm) for a 5 minutes period. The open field was thoroughly cleaned with 70% ethanol between different animals (Rodrigues et al., 2002).

2.3.3. Experimental design

In the experiments designed to verify the possible involvement of dopaminergic and noradrenergic systems in the mechanisms underlying the antidepressant-like effect of mangiferin in the TST, mice were pretreated with different dopaminergic and noradrenergic modulators.

To investigate a possible involvement of the dopaminergic system in the antidepressant-like effect of mangiferin, mice were pretreated with SCH23390 (0.05 mg/kg, subcutaneous (s.c.) a dopamine D₁ receptor antagonist), sulpiride (50 mg/kg, intraperitoneal (i.p.) a dopamine D₂ receptor antagonist), haloperidol (0.2 mg/kg, i.p., a nonselective dopaminergic receptor antagonist) or vehicle and 30 min later they received vehicle or mangiferin (5 mg/kg, per oral

(p.o.)). After 60 min, the OFT and TST were carried out (Machado et al., 2009; Binfaré et al., 2010).

We also investigated the possible synergistic effect between of mangiferin and dopaminergic agonists, through of the combined administration of subeffective dose of mangiferin (1 mg/kg, p.o.) with a subeffective dose of SKF38393 (0.1 mg/kg, s.c., a selective dopamine D₁ receptor agonist), apomorphine (0.5 mg/kg, i.p., preferential agonist of dopamine D₂ receptor). Mangiferin or vehicle was administered 30 min before these agonists. A further 60 min was allowed to elapse before the animals were tested in the OFT and TST (Binfaré et al., 2009).

In another experiment, the effect of the combined administration of a subeffective dose of the mangiferin (1 mg/kg) with subeffective dose of antidepressants bupropion (1 mg/kg, p.o., a dopamine reuptake inhibitor with subtle activity on noradrenergic reuptake), in the TST or OFT was investigated. To this end, mice received mangiferin or vehicle and immediately after, the antidepressant or vehicle was administered. Sixty minutes later, the behavioral tests were carried out (Cunha et al., 2008).

To assess a possible contribution of noradrenergic system in the antidepressant-effect of mangiferin, mice were pretreated with AMPT (100 mg/kg, i.p., an inhibitor of tyrosine hydroxylase, a critical enzyme for the synthesis of noradrenaline and DA), or vehicle 4 h before mangiferin administration (5 mg/kg, p.o., an effective dose in the TST). After 60 min, the behavioral tests were carried out. In a separate series of experiments, the possible participation of the NE receptor subtypes in the antidepressant-like effect of mangiferin in the TST was evaluated by the pretreatment of mice with prazosin (1 mg/kg, i.p., an α_1 -adrenoceptor antagonist), yohimbine (1 mg/kg, an α_2 -adrenoceptor antagonist), propranolol (2 mg/kg, i.p., a β -adrenoceptor antagonist) or vehicle (10 ml/kg), thirty minutes before of administration mangiferin (5 mg/kg, p.o.) or vehicle, 60 min later the mice were submitted to the TST and OFT. In order to investigate a possible synergistic effect, in another set of experiments, the effect of the administration of mangiferin (1 mg/kg, p.o., a subeffective dose in the TST), followed by the administration of a subeffective dose of reboxetine (2 mg/kg, p.o., a selective noradrenaline reuptake inhibitor), was investigated after 60 min in the behavioral tests (Colla et al., 2014).

The mangiferin doses were chosen on the basis of previous results obtained by our research group (unpublished data). According results obtained in dose-response in TST, the subeffective dose (1 mg/kg) of mangiferin was selected and the lowest dose of mangiferin required to exert antidepressant-like effect was 5 mg/kg, it was considered effective dose.

2.3.4. Monoamine neurotransmitter and metabolite levels

In order to evaluate a putative effect of mangiferin on levels of the monoamines DA and NE and their metabolites DOPAC, HVA and 4-hydroxy-3-methoxyphenylglycol (MHPG) in the cerebral cortex, hippocampus and striatum, mice received mangiferin (0.2 - 25 mg/kg, p.o.) or vehicle (10 ml/kg, p.o.), and two hours after the treatment, were euthanized by cervical dislocation. The brains were excised, and the cerebral cortex, hippocampus and striatum were immediately separated and stored at -80°C until the neurochemical quantification. The method used for neurotransmitters and metabolites quantification is in accordance with Ferraz et al. (2002). The tissue levels were expressed in ng/g tissue.

2.4. Statistical analysis

The data analyses were performed using GraphPad Prism 5.0, commercially available software. All experimental results are given as the mean (s) \pm S.E.M. Differences between groups were evaluated for significance using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Student–Newman–Keuls test or two-way ANOVA followed by Bonferroni's. A value of $p < 0.05$ was considered to be significant.

3. Results

3.1. Behavioral tests

3.1.1. Involvement of the dopaminergic system

Pretreatment of mice with SCH23390 (0.05 mg/kg, s.c., a dopamine D_1 receptor antagonist) did not prevent the antidepressant-like effect of mangiferin (5 mg/kg, p.o.) in the TST (treatment: $F(1,18) = 93.10$, $p < 0.001$; pretreatment: $F(1,18) = 0.07$, $p = 0.795$; pretreatment \times treatment interaction: $F(1,18) = 0.69$, $p = 0.416$), as shown in Fig. 1A.

Fig. 1B shows that the pretreatment of mice with sulpiride (50 mg/kg, i.p., a dopamine D_2 receptor antagonist) was able to block the antidepressant-like effect of mangiferin (5 mg/kg, p.o.) in the TST (treatment: $F(1,18) = 24.07$, $p = 0.001$; pretreatment: $F(1,18) = 9.65$, $p = 0.006$; pretreatment \times treatment interaction: $F(1,18) = 18.27$, $p = 0.001$).

Pretreatment of mice with haloperidol (0.2 mg/kg, i.p., a nonselective dopaminergic receptor antagonist) was also able to prevent the antidepressant-like effect of mangiferin (5 mg/kg, p.o.) in the TST (treatment: $F(1,18) = 30.58$, $p < 0.001$; pretreatment: $F(1,18) = 14.68$, $p = 0.001$; pretreatment \times treatment interaction: $F(1,18) = 15.56$, $p = 0.001$), as shown in Fig. 1C.

3.1.1.1. Interaction of the subeffective doses of mangiferin with subeffective doses of dopaminergic agonists in antidepressant-like effect in the TST

The results illustrated in Fig. 2A show that treatment with a subeffective dose of SKF 38393 (0.1 mg/kg, s.c., a dopamine D₁ receptor agonist) did not potentiate an antidepressant-like effect when combined with a subeffective dose of mangiferin (1 mg/kg, p.o.) in the TST (treatment: $F(1,16) = 17.87$, $p < 0.001$; pretreatment: $F(1,16) = 1.12$, $p = 0.306$; pretreatment \times treatment interaction: $F(1,16) = 2.47$, $p = 0.135$).

The results presented in Fig. 2B show that treatment with a subeffective dose of apomorphine (0.5 mg/kg, i.p., preferential agonist of dopamine D₂ receptor) produced a synergistic antidepressant-like effect when combined with a subeffective dose of mangiferin (1 mg/kg, p.o.) in the TST (treatment: $F(1,16) = 34.65$, $p < 0.001$; pretreatment: $F(1,16) = 9.47$, $p = 0.007$; pretreatment \times treatment interaction: $F(1,16) = 6.33$, $p = 0.023$).

3.1.2. Involvement of the noradrenergic system

In order to observe the DA and NE dependence for the antidepressant-like effect elicited by the administration of mangiferin, mice were pretreated with AMPT (100 mg/kg, i.p., an inhibitor of tyrosine hydroxylase, a critical enzyme for the synthesis of DA and NE). AMPT was not able to abolish the antidepressant-like effect of mangiferin (5 mg/kg, p.o.) in the TST, as depicted in Fig. 3A, (treatment: $F(1,16) = 123.87$, $p < 0.001$; pretreatment: $F(1,16) = 3.28$, $p = 0.0430$; pretreatment \times treatment interaction: $F(1,16) = 4.49$, $p = 0.051$).

The results depicted in Fig. 3B show that the pretreatment of mice with prazosin (1 mg/kg, an α_1 -adrenoceptor antagonist) did not reverse the antidepressant-like effect of mangiferin (5 mg/kg, p.o.) in the TST (treatment: $F(1,18) = 135.56$, $p < 0.001$; pretreatment: $F(1,18) = 0.20$, $p = 0.205$; pretreatment \times treatment interaction: $F(1,18) = 0.25$, $p = 0.2484$).

Fig. 3C shows that the pretreatment of mice with yohimbine (1 mg/kg, an α_2 -adrenoceptor antagonist) did not antagonize the antidepressant-like effect of mangiferin (5

mg/kg, p.o.) in the TST (treatment: $F(1,18) = 148.46$, $p < 0.001$; pretreatment: $F(1,18) = 2.35$, $p = 0.143$; pretreatment \times treatment interaction: $F(1,18) = 4.28$, $p = 0.053$).

Pretreatment of mice with propranolol (2 mg/kg, i.p., a β -adrenoceptor antagonist) did not abolish the antidepressant-like effect of mangiferin (5 mg/kg, p.o.) in the TST (treatment: $F(1,18) = 120.36$, $p < 0.001$; pretreatment: $F(1,18) = 2.29$, $p = 148$; pretreatment \times treatment interaction: $F(1,18) = 3.95$, $p = 0.062$), as shown in Fig. 3D.

3.1.3. Interaction of the subeffective doses of mangiferin with subeffective doses of conventional antidepressants in antidepressant-like effect in the TST

The effect of combined administration of a subeffective dose of the conventional antidepressant bupropion (1 mg/kg, p.o., a DA reuptake inhibitor with subtle activity on NE reuptake) produced a synergistic antidepressant-like effect when combined with a subeffective dose of mangiferin (1 mg/kg, p.o.) in the TST (treatment: $F(1,16) = 27.70$, $p < 0.001$; pretreatment: $F(1,16) = 6.96$, $p = 0.018$; pretreatment \times treatment interaction: $F(1,16) = 9.23$, $p = 0.008$), as shown in Fig. 4A.

The selective NE reuptake inhibitor reboxetine, administered at a subeffective dose (2 mg/kg, p.o.), did not exhibit an antidepressant-like effect when combined with a subeffective dose of mangiferin (1 mg/kg, p.o.) in the TST (treatment: $F(1,15) = 3.31$, $p = 0.089$; pretreatment: $F(1,15) = 0.15$, $p = 0.707$; pretreatment \times treatment interaction: $F(1,15) = 0.02$, $p = 0.887$), as shown in Fig. 4B.

Treatment with mangiferin, bupropion, reboxetine or any of the antagonists and agonist, at all doses tested, did not produce any change on locomotor activity in the mice OFT, indicating that a confounding locomotor can be discarded in the antidepressant-like effect observed in the TST (data not shown).

3.2. Quantification of cerebral cortical, hippocampal and striatal of neurotransmitters and metabolites

Surprisingly, mangiferin at all doses (0.2, 1, 5 and 25 mg/kg) did not significantly increase the levels of the DA in the cerebral cortex, hippocampus and striatum. However, in all structures analyzed, there was a tendency which appears to be increased a dose-dependent manner. Mangiferin also exhibited a tendency to decreased DOPAC and HVA levels among these structures. Moreover, significant reductions were only observed in the levels of the

DOPAC metabolite, when mangiferin was administered at doses of the 5 and 25 mg/kg (hippocampus). We also found a decreased DA turnover (DOPAC/DA) following the administration of mangiferin (5 and 25 mg/kg) in hippocampus, while at in striatum only in higher dose (25 mg/kg) (Table 1). As shown in Table 2, did not significant changes on levels of NE or its metabolite MHPG in the cerebral cortex, hippocampus and striatum after administration of mangiferin.

4. Discussion

In this study, we showed the interaction with the dopaminergic system, through dopamine D₂ receptor activation. In line with this hypothesis, our results showed the synergistic antidepressant-like effect of the combined administration of a subeffective dose of the conventional antidepressant bupropion with mangiferin, reinforcing the participation of the dopaminergic system. Furthermore, results of the behavioral studies were also confirmed by the neurochemical data, by tendency to increase in the DA levels, associated with a decrease HVA levels in the cerebral cortex, hippocampus and striatum, while significant reductions, were only observed in the levels DOPAC metabolite in hippocampus. We also found a significant decrease DA turnover (DOPAC/DA) in the hippocampus and striatum. Finally, we found that hypothesis the participation of noradrenergic system was not supported, indicating that the antidepressant-like effect may be explained by other mechanism.

The results presented herein suggest clearly that the antidepressant-like effect of mangiferin in the TST is dependent, at least in part, on an interaction with the dopaminergic system, through dopamine D₂ receptor activation. According to our result, the pretreatment of mice with haloperidol (a nonselective dopaminergic receptor antagonist) or sulpiride (a dopamine D₂ receptor antagonist), but not SCH23390 (a dopamine D₁ receptor antagonist) prevent the antidepressant-like effect of mangiferin in the TST, suggesting that pharmacological propriety is mediated via interaction with dopamine D₂ receptors. Consistent with this finding, the antidepressant-like effect of a subeffective dose of mangiferin was significantly potentiated by administration of a subeffective dose apomorphine (0.5 mg/kg, i.p., preferential agonist of dopamine D₂ receptor), but not with a subeffective dose of SKF 38393 (a dopamine D₁ receptor agonist), suggesting a synergistic effect of mangiferin involvement of dopamine D₂ receptors in the TST. Therefore, this result provided additional evidence supporting our conclusion that dopamine D₂ receptors are implicated in the antidepressant-like effects of mangiferin.

Addressing more about dopaminergic system, we evaluated the levels of monoamine DA and their metabolites DOPAC and HVA in brain after mangiferin treatment. Three brain regions were studied: the cerebral cortex, hippocampus and striatum, which are involved in the cognitive and behavioral response patterns, such as emotion, motivation and learning and memory (Drevets et al., 2008). Interestingly, the treatment with mangiferin generates only a tendency to increase the DA levels in the cerebral cortex, hippocampus and striatum, which are in accordance to the antidepressant effect observed by the D₂ antagonist. In addition, considering that the ratio of the major metabolite to the corresponding monoamine is commonly used as an index of monoamine turnover (Kitanaka et al., 2005), our results showed that mangiferin induced a significant decrease in DA turnover (DOPAC/DA) in the hippocampus and striatum. In this way, these results indicated that DA metabolism was diminished, and consequently, elevating the availability of this neurotransmitter in specific regions of the brain, that could also enlighten the antidepressant-like effect.

In addition, the synergistic antidepressant-like effect in the TST, obtained using the experimental protocol of the combined administration of a subeffective dose of the conventional antidepressant bupropion with a subeffective dose of mangiferin, reinforcing the participation of the dopaminergic system in the antidepressant-like effect of mangiferin. Some authors have been considering the adjuvant use of herbal medicines valuable to enhance the response and improve efficacy of synthetic antidepressants and decrease their side-effects by allowing lower doses to be prescribed (Sarris et al., 2010). The main advantage of this approach is decreased doses of antidepressants prescribed and consequently the adverse side effects.

The noradrenergic system is classically implicated in the pathophysiology of depression and has been extensively utilized in clinical practice (Hamon and Blier, 2013). However, in the present study, the pretreatment of mice with AMPT, an inhibitor of tyrosine hydroxylase, a critical enzyme for the synthesis of DA and NE, was not able to abolish the antidepressant-like effect of mangiferin in the TST. The approach used depletes both NE and DA (Pizzagalli, 2014). Mayorga et al. (2001) demonstrated that AMPT reduces DA and NE levels (57% and 53%, respectively) in mice, without affecting the levels of 5-HT. This result shows that although there is a reduction in the availability of NE and/or DA brain levels the antidepressant-like effect remains, indicating the participation of other mechanisms in the antidepressant-like effect of mangiferin.

In our study, the pretreatment of mice with prazosin (an α_1 -adrenoceptor antagonist), yohimbine (an α_2 -adrenoceptor antagonist) or propranolol (a β -adrenoceptor antagonist) was ineffective in reversing the antidepressant-like effect of mangiferin in the TST. These findings provide evidence that the antidepressant-like effect of mangiferin did not associate with to the

modulation of noradrenergic function. Reinforcing this hypothesis, the co-administration of subeffective doses of mangiferin in combination with a subeffective dose of reboxetine (a selective NE reuptake inhibitor) was ineffective to potentiate the antidepressant-like effect. Consistent with this finding, results presented in neurochemical quantification showed that levels of the NE and its metabolite MHPG in the cerebral cortex, hippocampus and striatum was not modified after treatment with mangiferin. Thus, it should be pointed out that the antidepressant-like effect of mangiferin in the TST does not seem to be associated with noradrenergic neurotransmission.

In this study, we showed involvement of dopaminergic system through dopamine D₂ receptors and decrease in DA turnover. Of note, the results obtained for mechanisms underlying the antidepressant-like effect of mangiferin, suggests that mangiferin acts decreasing DA turnover, suggest slow metabolism of DA neurotransmitter and on the interaction with dopamine D₂ receptors. Moreover, our data showed the antidepressant-like effect exerted by the combination of mangiferin with bupropion. It is expected that this polyphenolic xanthone, could be prescribed as an adjuvant therapy with already existing antidepressant molecules in the treatment of depression.

Conflict of interest

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

Acknowledgement

The authors are grateful for financial support by CNPQ and FAPERGS Research Grant #474397/2013-0 and # 2297-2551/14-0, respectively. C.R.J., J.R. and F.D. are recipients of CNPQ fellowships. D.O.E. and N.S.G. are recipients of FAPERGS, CAPES or UNIPAMPA fellowships.

Contributors

Author Donato contributed to the performance of behavioural tests, neurochemical quantification, research design, data analysis, and manuscript writing. Authors, Renata

Giacomeli, Jossana Ruff, Dieniffer de Oliveira Espinosa, Nathalie Savedra Gomes and Silvana Peterini Boeira contributed to the performance of behavioural tests and the neurochemical quantification. Author Jesse contributed to the performance of behavioural tests, neurochemical quantification, research design, data analysis and manuscript revision. All authors contributed to and have approved the final manuscript.

References

- Arora, V., Kuhad, A., Tiwari, V., et al., 2011. Curcumin ameliorates reserpine-induced pain-depression dyad: behavioural, biochemical, neurochemical and molecular evidences. *Psychoneuroendocrinol.* 36, 1570-81.
- Barreto, J.C., Trevisan, M.T., Hull, W.E., Erben, G., de Brito, E.S, et al., 2008. Characterization and quantitation of polyphenolic compounds in bark, kernel, leaves, and peel of mango (*Mangifera indica* L.). *J. Agric. Food Chem.* 56, 5599–5610.
- Binfaré, R.W., Mantovani, M., Budni, J., Santos, A.R.S., Rodrigues, A.L.S., 2010. Involvement of dopamine receptors in the antidepressant-like effect of melatonin in the tail suspension test. *Eur. J. Pharmacol.* 638, 78–83.
- Binfaré, R.W., Rosa, A.O., Lobato, K.R., Santos, A.R.S., Rodrigues, A.L.S., 2009. Ascorbic acid administration produces an antidepressant-like effect: evidence for the involvement of monoaminergic neurotransmission. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 33, 530–40.
- Chandley, M.J., Szebeni, A., Szebeni, K., Crawford, J.D., Stockmeier, C.A., Turecki, G., Kostrzewa, R.M., Ordway, G.A., 2014. Elevated gene expression of glutamate receptors in noradrenergic neurons from the locus coeruleus in major depression. *Int J Neuropsychopharmacol.* 13, 1–10.
- Colla, A.R.S., Oliveira, A., Pazini, F.L., Rosa, J.M., Manosso, L.M., Cunha, M.P., Rodrigues, A.L.S., 2014. Serotonergic and noradrenergic systems are implicated in the antidepressant-like effect of ursolic acid in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 124, 108–116.
- Cunha, M.P., Machado, D.G., Bettio, L.E.B., et al., 2008. Interaction of zinc with antidepressants in the tail suspension test. *Prog Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 32, 1913–1920.

- Drevets, W.C., Price, J.L., Furey, M.L., 2008. Brain structural and functional abnormalities in mood disorders: implications for neurocircuitry models of depression. *Brain Struct. Funct.* 213, 93–118.
- Ferraz, A.C., Anselmo-Franci, J.A., Perosa, S.R., Castro-Neto, E.F., Bellissimo, M.I., Oliveira, B.H., Cavalheiro, E.A., Naffah-Mazzacoratti, Mda G., Da Cunha, C., 2002. Aminoacid and monoamine alterations in the cerebral cortex and hippocampus of mice submitted to ricinine-induced seizures. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 72, 779–86.
- Hamon, M., Blier, P., 2013. Monoamine neurocircuitry in depression and strategies for new treatments. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 45, 54–63.
- Jangra, A., Likhi, M.M., Sulakhiya, K., Baruah, C.C., Lahkar, M., 2014. Protective effect of mangiferin against lipopolysaccharide-induced depressive and anxiety-like behavior in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 740, 337-345.
- Kitanaka, N., Kitanaka, J., Takemura, M., 2005. Inhibition of methamphetamine-induced hyperlocomotion in mice by clorgyline, a monoamine oxidase-a inhibitor, through alteration of the 5-hydroxytryptamine turnover in the striatum. *Neuroscience* 130, 295–308.
- Krishnan, V., Nestler, E.J., 2008. The molecular neurobiology of depression. *Nature* 455, 894–902.
- Lemus-Molina, Y., Sanchez-Gomez, M. V., Delgado-Hernandez, R., and Matute, C., 2009. *Mangifera indica* L. extract attenuates glutamate-induced neurotoxicity on rat cortical neurons. *Neurotoxicology*, 30, 1053–1058.
- Leonard, B.E., 2014 . Impact of inflammation on neurotransmitter changes in major depression: an insight into the action of antidepressants. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 48, 261–267
- Machado, D.G., Bettio, L.E.B., Cunha, M.P., Capra, J.C., Dalmarco, J.B., Pizzolatti, M.G., et al., 2009. Antidepressant-like effect of the extract of *Rosmarinus officinalis* in mice: involvement of the monoaminergic system. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 33, 642–50.
- Mayorga, A.J., Dalvi, A., Page, M.E., Zimov-Levinson, S., Hen, R., Lucki, I., 2001. Antidepressant-like behavioral effects in 5-hydroxytryptamine (1A) and 5-hydroxytryptamine (1B) receptor mutant mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 298, 1101–7.

- Mitani, H., Shirayama, Y., Yamada, T., Kawahara, R., 2006. Plasma levels of homovanillic acid, 5-hydroxyindoleacetic acid and cortisol, and serotonin turnover in depressed patients. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 30, 531–534.
- Papakostas, G.I., 2006. Dopaminergic-based pharmacotherapies for depression. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 16, 391–402.
- Park, S., Sim, Y., Han, P., Lee, J., Suh, H., 2010. Antidepressant-like effect of chlorogenic acid isolated from *Artemisia capillaris* Thunb. *Animal Cells Syst.* 14 253-259.
- Pizzagalli, D.A., 2014. Depression, stress, and anhedonia: Toward a synthesis and integrated model. *Annu. Rev. Clin. Psychol.* 10, 393-423.
- Rodrigues, A.L.S., da Silva, G.L., Mateussi, A.S., Fernandes, E.S., Miguel, O.G., Yunes, R.A., Calixto, J.B., Santos, A.R., 2002. Involvement of monoaminergic system in the antidepressant-like effect of the hydroalcoholic extract of *Siphocampylus verticillatus*. *Life Sciences* 70, 1347–1358.
- Saha, S., Sadhukhan, P., Sil, P.C., 2016. Mangiferin: A xanthone with multipotent anti-inflammatory potential. *Biofactors.* 10, 459-474.
- Sarris, J., Kavanagh, D.J., Byrne, G., 2010. Adjuvant use of nutritional and herbal medicines with antidepressants, mood stabilizers and benzodiazepines. *J. Psychiatr. Res.* 44, 32–41.
- Sarris, J., Panossian, A., Schweitzer, I., Stough, C., Scholey, A., 2011. Herbal medicine for depression, anxiety and insomnia: a review of psychopharmacology and clinical evidence. *Eur. Neuropsych.* 21, 841–860.
- Sethiya, N.K., Mishra, S., 2014. Investigation of mangiferin, as a promising natural polyphenol xanthone on multiple targets of Alzheimer's disease. *Journal of Biol. Active Prod. Nat.* 4, 111–119.
- Steru, L., Chermat, R., Thierry, B., Simon, P., 1985. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacol.* 85, 367–370.
- Willner, P., Hale, A.S., Argyropoulos, S., 2005. Dopaminergic mechanism of antidepressant action in depressed patients. *J. Affect. Dis.* 86, 37–45.
- Yadid, G., Friedman, A., 2008. Dynamics of the Dopaminergic System as a Key Component to the Understanding of Depression. *Prog. Brain Res.* 172, 265–286.
- Yang, Z., Weian, C., Susu, H., Hanmin, W., 2016. Protective effects of mangiferin on cerebral ischemia–reperfusion injury and its mechanisms. *Eur. J. Pharmacol.* 771, 145–151.
- Yoshimura, Y., Nakazawa, H., Yamaguchi, F., 2003. Evaluation of the NO scavenging activity of procyanidin in grape seed by use of the TMA-PTIO/NOC 7 ESR system. *J. Agric. Food Chem.* 51, 6409-12.

Zhang, Z.J., 2004. Therapeutic effects of herbal extracts and constituents in animal models of psychiatric disorders. *Life Sci.* 75, 1659–1699.

Legends of figures

Figure 1. Effect of pretreatment of mice with SCH23390 (0.05 mg/kg, s.c., a dopamine D₁ receptor antagonist - panel A), sulpiride (50 mg/kg, i.p., a dopamine D₂ receptor antagonist - panel B), haloperidol (0.2 mg/kg, i.p., a nonselective dopaminergic receptor antagonist - panel C) and treatment with mangiferin (5 mg/kg, p.o.) on the immobility time in the TST. The values were analyzed by two-way ANOVA followed by Bonferroni's test, each value is expressed as the means \pm S.E.M. (n = 8 mice in each group). Asterisks represent significant effect (***p < 0.001) as compared with the respective vehicle-treated control. (#p < 0.01; ##p < 0.001) as compared with the same group pretreated with vehicle and mangiferin.

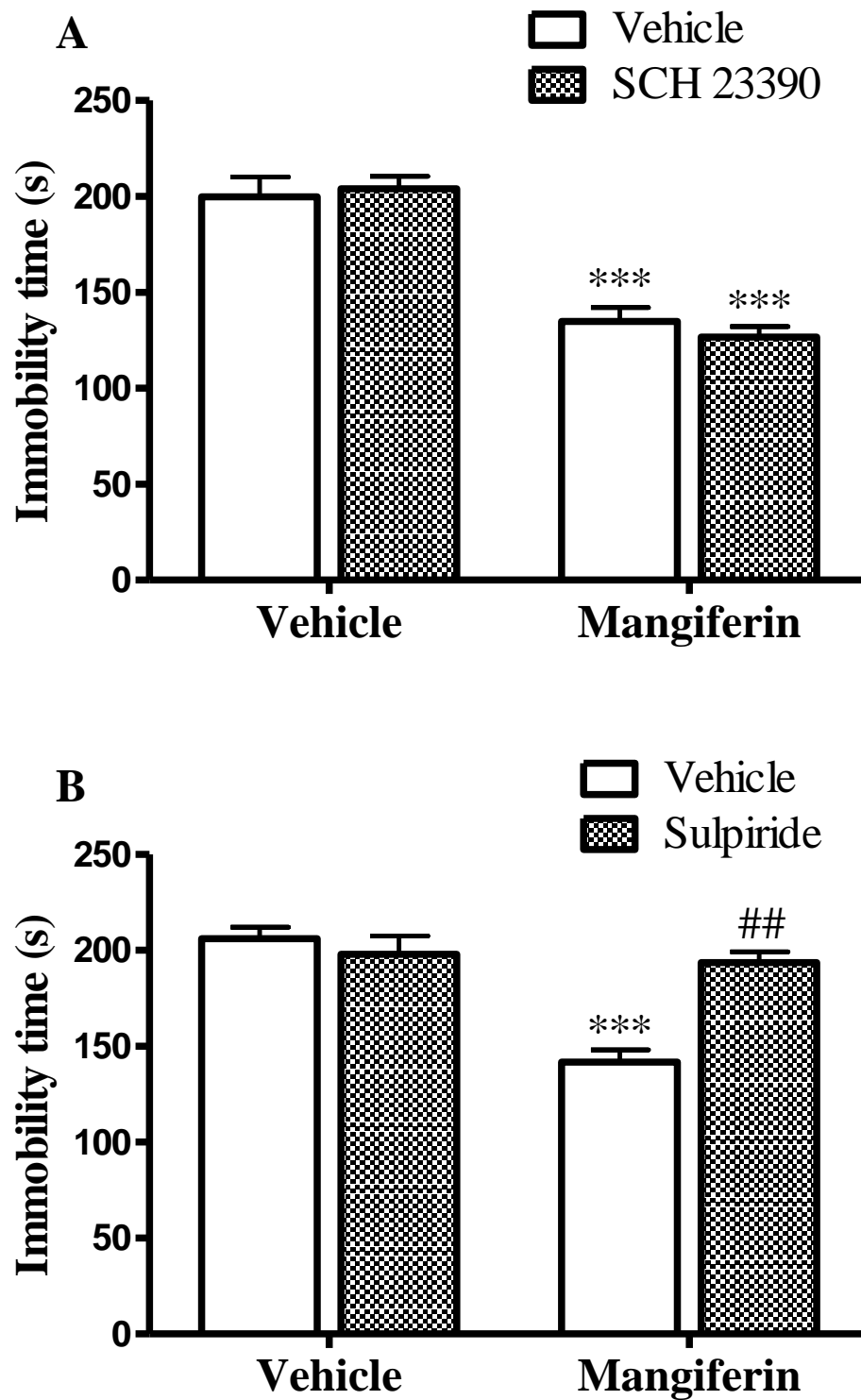
Figure 2. Effect of co-administration of mice with subeffective doses of SKF38393 (0.1 mg/kg, s.c., a selective dopamine D₁ receptor agonist - panel A) or apomorphine (0.5 mg/kg, i.p., preferential agonist of dopamine D₂ receptor - panel B) with subeffective dose of mangiferin (1 mg/kg, p.o.) on the immobility time in the TST. The values were analyzed by two-way ANOVA followed by Bonferroni's test, each value is expressed as the means \pm S.E.M. (n = 8 mice in each group). Asterisks represent significant effect (***p < 0.001) as compared with the respective vehicle-treated control. (#p < 0.01; ##p < 0.001) as compared with the same group pretreated with vehicle and mangiferin.

Figure 3. Effect of pretreatment of mice with AMPT (100 mg/kg; i.p., an inhibitor of tyrosine hydroxylase, a critical enzyme for the synthesis of DA and NE - panel A), prazosin (1 mg/kg, i.p., an α_1 -adrenoceptor antagonist - panel B), yohimbine (1 mg/kg, i.p., an α_2 -adrenoceptor antagonist - panel C), propranolol (2 mg/kg, i.p., a β -adrenoceptor antagonist - panel D) and treatment with mangiferin (5 mg/kg, p.o.) on the immobility time in the TST. The values were analyzed by two-way ANOVA followed by Bonferroni's test, each value is expressed as the means \pm S.E.M. (n = 8 mice in each group). Asterisks represent significant effect (***p < 0.001) as compared with the respective vehicle-treated control. (#p < 0.01; ##p < 0.001) as compared with the same group pretreated with vehicle and mangiferin.

Figure 4. Effect of co-administration of mice with subeffective doses of antidepressants bupropion (1 mg/kg, p.o., a DA reuptake inhibitor with subtle activity on NE reuptake - panel

A) or reboxetine (2 mg/kg, p.o., a selective NE reuptake inhibitor - panel B) with subeffective dose of mangiferin (1 mg/kg, p.o.) on the immobility time in the TST. The values were analyzed by two-way ANOVA followed by Bonferroni's test, each value is expressed as the means \pm S.E.M. (n = 8 mice in each group). Asterisks represent significant effect (**p < 0.01; ***p < 0.001) as compared with the respective vehicle-treated control. (#p < 0.05; ##p < 0.01) as compared with the same group pretreated with vehicle and mangiferin.

Figure 1



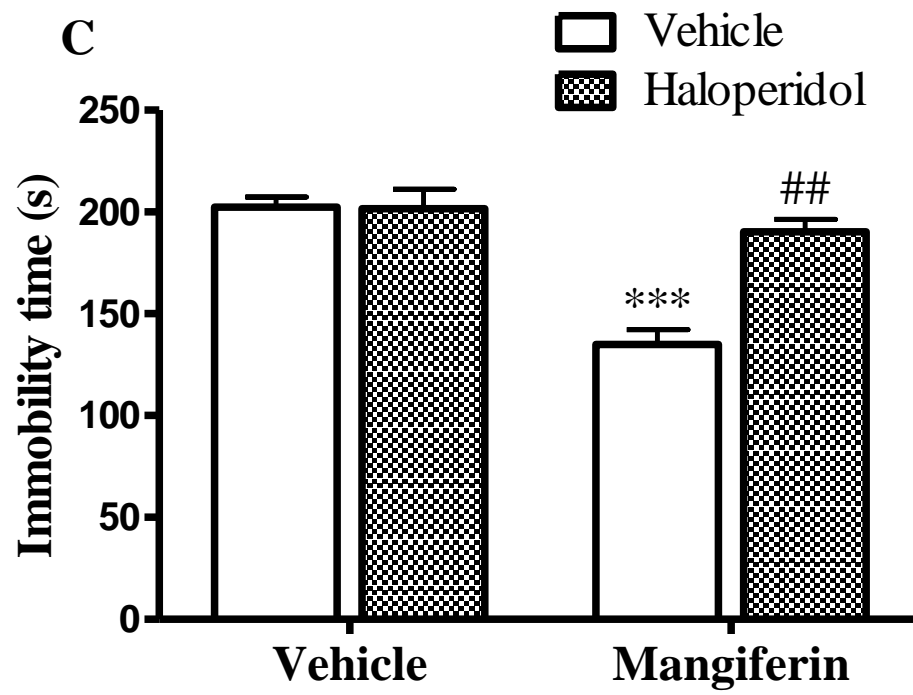


Figure 2

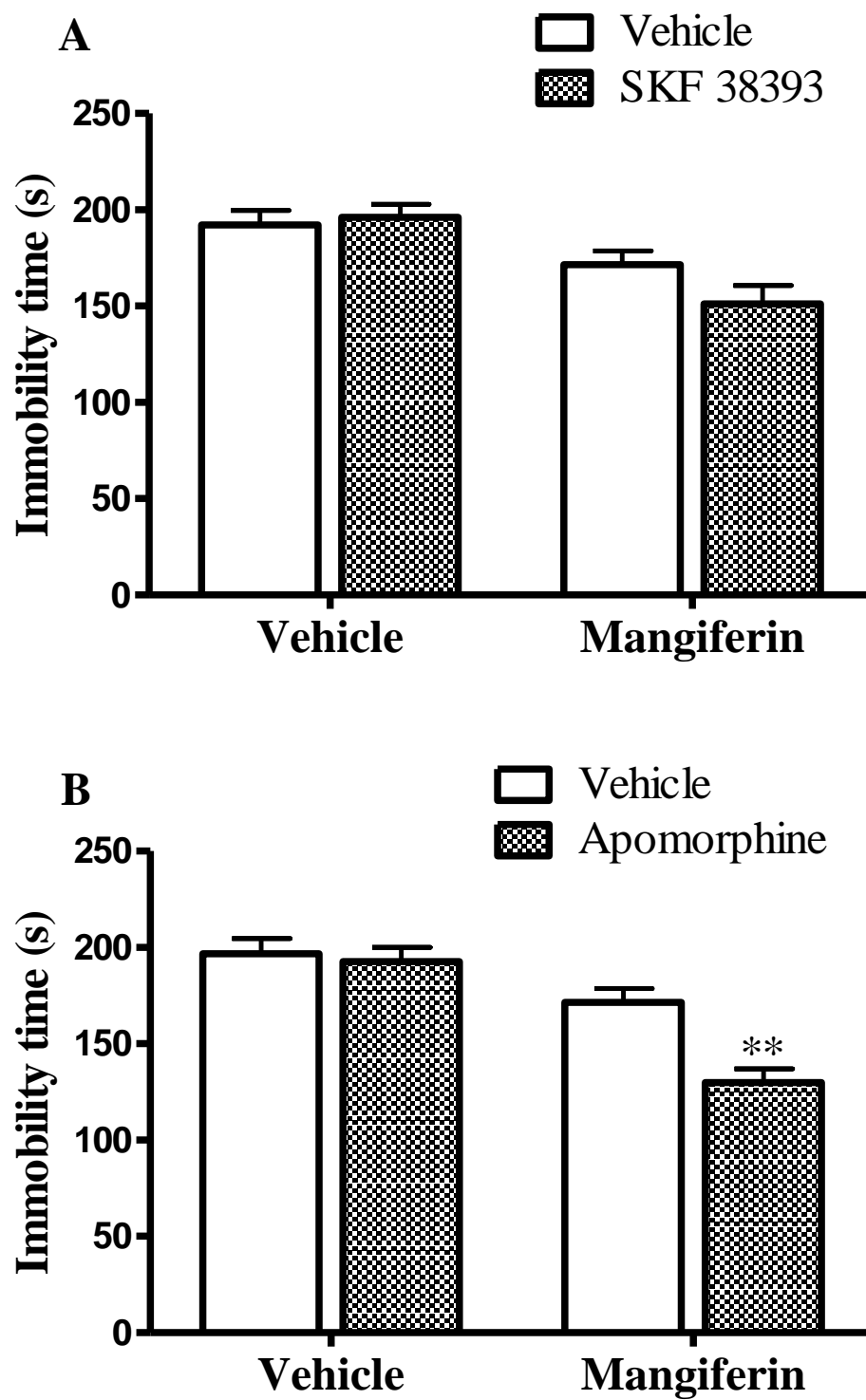
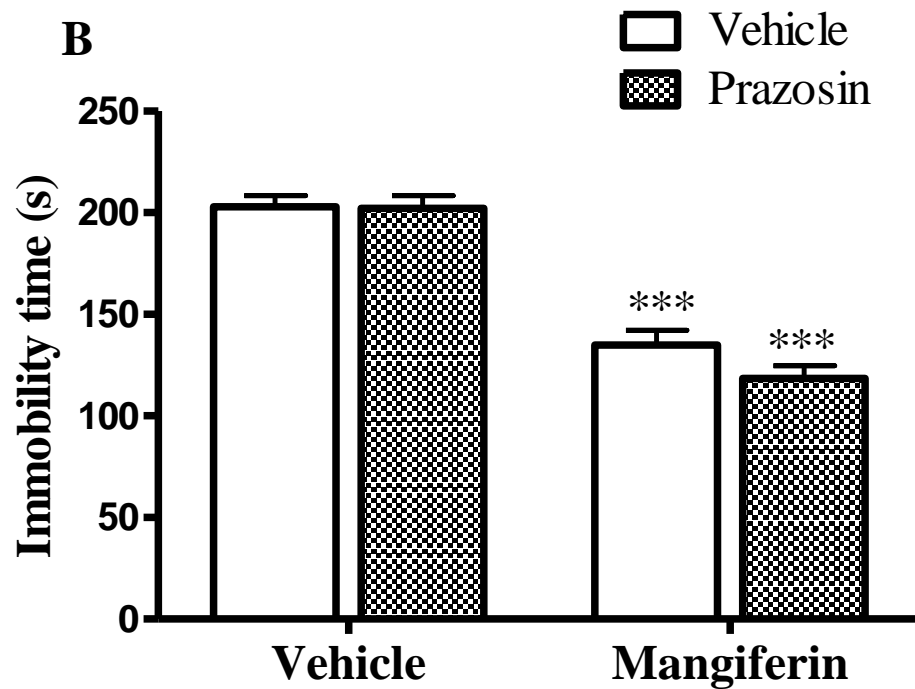
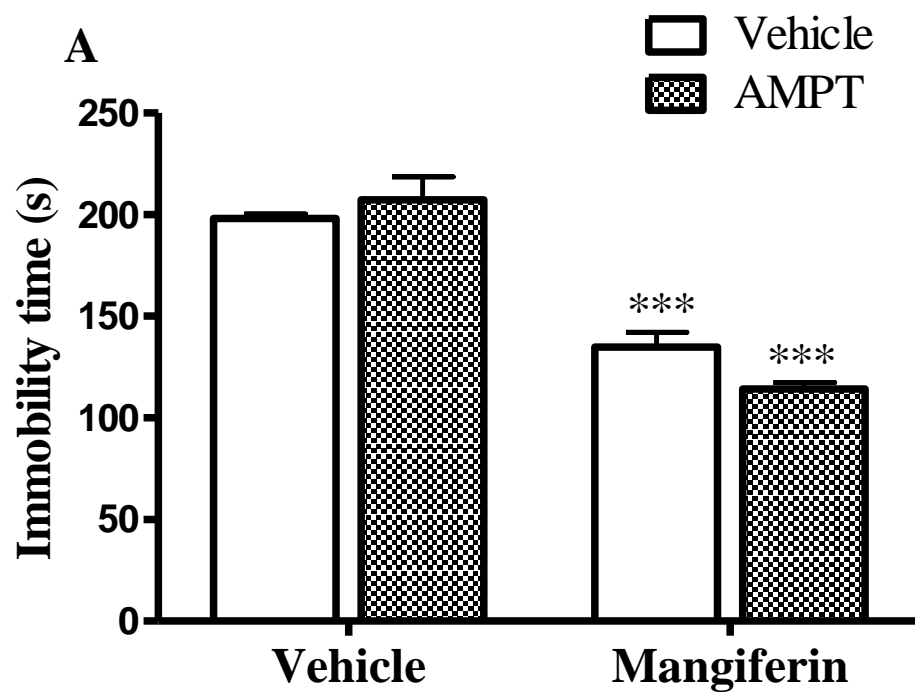


Figure 3



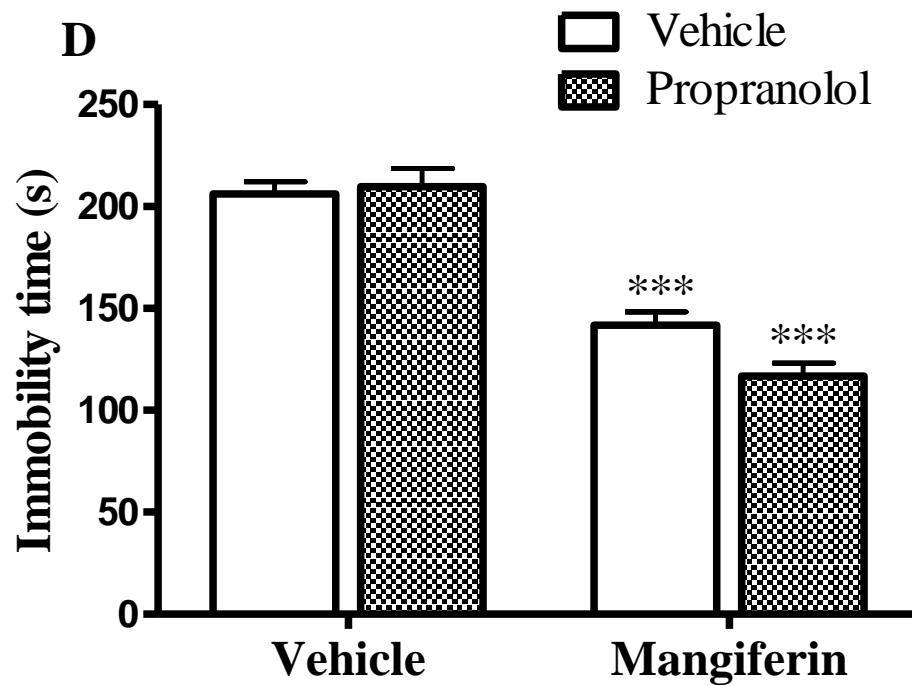
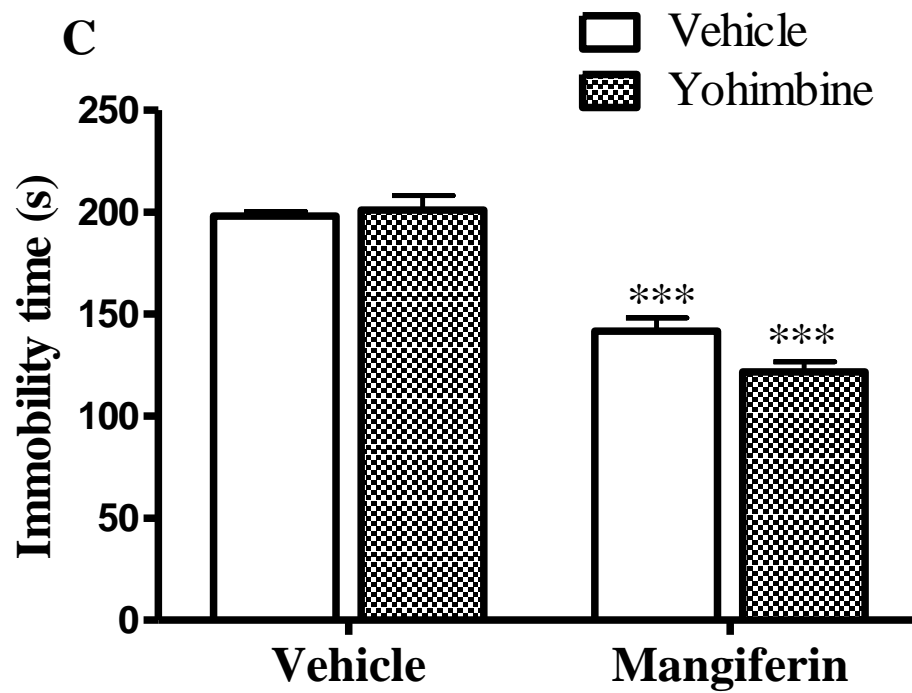


Figure 4

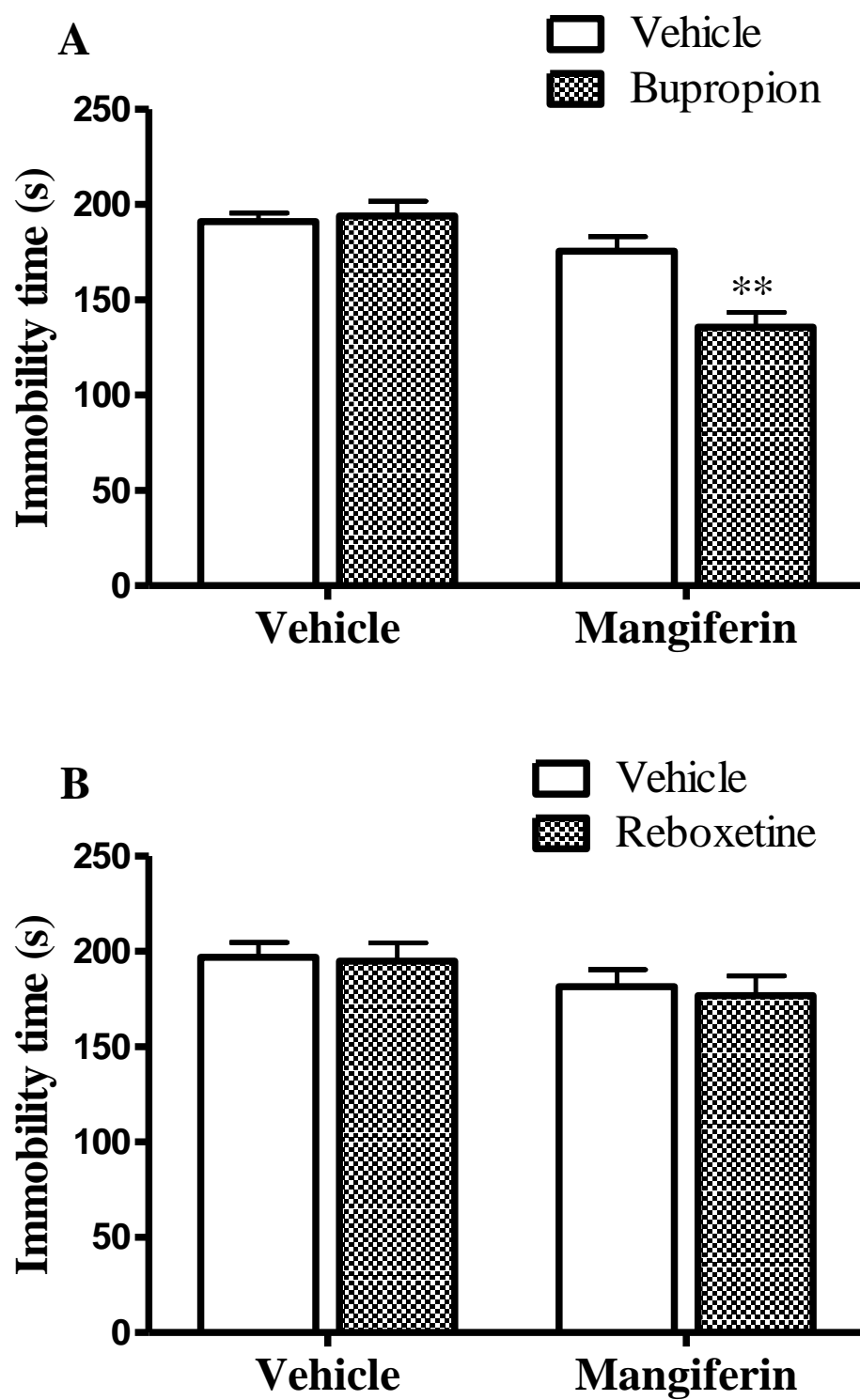


Table 1. Effect of treatment with mangiferin on levels of the DA, DOPAC and HVA in the cerebral cortex, hippocampus and striatum of mice

	Groups	Control	0.2 mg/kg	1 mg/kg	5 mg/kg	25 mg/kg
Cerebral Cortex	DA	539.5 ± 27.2	538.0 ± 23.5	524.3 ± 26.1	604.0 ± 35.9	640.8 ± 77.5
	DOPAC	357.5 ± 25.4	324.5 ± 14.4	327.8 ± 19.5	295.5 ± 20.9	286.8 ± 15.1
	HVA	77.2 ± 10.2	79.5 ± 8.3	60.5 ± 7.3	62.2 ± 4.3	64.7 ± 8.4
	DOPAC/DA	0.7 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1
	HVA/DA	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1
Hippocampus	DA	569.0 ± 35.6	541.0 ± 48.2	555.3 ± 26.4	633.5 ± 31.1	641.3 ± 28.9
	DOPAC	439.8 ± 26.3	402.5 ± 30.1	358.0 ± 22.2	304.0 ± 23.6*	294.0 ± 13.1**
	HVA	320.5 ± 12.5	284.0 ± 20.9	274.0 ± 10.2	268.0 ± 15.7	251.0 ± 13.9
	DOPAC/DA	0.8 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.5 ± 0.1*	0.5 ± 0.1*
	HVA/DA	0.6 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.1

Striatum	DA	543.5 ± 21.6	535.8 ± 23.3	578.0 ± 26.8	645.3 ± 27.2	649.0 ± 24.5
	DOPAC	320.5 ± 12.5	284.0 ± 20.9	274.0 ± 10.2	268.0 ± 15.7	251.0 ± 13.9
	HVA	99.7 ± 5.8	95.0 ± 3.6	92.5 ± 13.0	73.5 ± 7.0	76.5 ± 7.7
	DOPAC/DA	0.6 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.1*
	HVA/DA	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1

The values were analyzed by one-way ANOVA, followed by the Newman–Keuls. Concentrations were expressed as ng/g. Values are expressed as the mean ± S.E.M (n = 6). Asterisks denote significant effect (*p < 0.05; **p < 0.01) as compared to respective control group.

Table 2. Effect of treatment with mangiferin on levels of the NE and MHPG in the cerebral cortex, hippocampus and striatum of mice

Groups		Control	0.2mg/kg	1mg/kg	5mg/kg	25mg/kg
Cerebral Cortex	NE	410.0 ± 16.8	432.3 ± 31.7	385.5 ± 16.4	438.8 ± 37.1	433.3 ± 28.7
	MHPG	336.0 ± 19.4	309.5 ± 22.4	332.3 ± 25.5	338.3 ± 33.3	314.3 ± 18.0
	MHPG/NE	0.8 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.7 ± 0.1
Hippocampus	NE	564.8 ± 24.3	568.3 ± 34.9	540.8 ± 24.9	554.3 ± 48.2	557.5 ± 47.8
	MHPG	266.0 ± 17.7	274.8 ± 15.8	275.8 ± 16.1	285.5 ± 18.3	285.5 ± 21.2
	MHPG/NE	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1
Striatum	NE	427.0 ± 30.4	387.8 ± 32.2	397.5 ± 18.3	419.5 ± 35.1	405.8 ± 25.0
	MHPG	332.5 ± 18.3	322.3 ± 33.5	323.5 ± 21.1	324.5 ± 30.4	322.3 ± 23.0
	MHPG/NE	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.1

The values were analyzed by one-way ANOVA, followed by the Newman–Keuls. Concentrations were expressed as ng/g. Values are expressed as the mean ± S.E.M (n = 6).

Highlights

Mangiferin exerts antidepressant-like effect through the dopaminergic system

The activation of dopamine D₂ receptors are directly related to this effect

Decreased DA turnover (DOPAC/DA), suggesting a slowdown of the DA metabolism

Noradrenergic system did not modulate the antidepressant-like effect of mangiferin

PARTE III

5 DISCUSSÃO GERAL

Os polifenóis representam uma classe de fitoquímicos, naturalmente presentes em plantas como metabólitos secundários e concentram diversos efeitos biológicos (Quideau et al., 2011; Pathak et al., 2013), dentre os quais, se destacam o envolvimento na fisiopatologia de várias doenças neuropsiquiátricas e neurodegenerativas (Ebrahimi & Schluesener, 2012).

Alguns trabalhos recentemente publicados pelo nosso grupo, demonstraram pela primeira vez o efeito tipo antidepressivo de um composto pertencente a esta classe, o flavonoide hesperidina, que é dependente da sua interação com os receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A} (Souza et al., 2013), bem como, através do envolvimento dos receptores opióides kappa (Filho et al., 2013). De fato, estes estudos prévios já demonstraram o efeito tipo antidepressivo da hesperidina em camundongos e a modulação de alguns receptores, o que ajuda entender os mecanismos envolvidos no efeito tipo antidepressivo demonstrado pela hesperidina. No entanto, mais estudos são necessários para melhor elucidar os mecanismos envolvidos neste efeito.

Baseado nas considerações acima, os trabalhos que fazem parte da primeira fase deste estudo têm o objetivo de aprofundar a investigação quanto aos mecanismos pelos quais a hesperidina exerce efeito tipo antidepressivo. Na parte inicial deste estudo (**Artigo 1**), investigamos o efeito do tratamento crônico com hesperidina e hesperetina (forma aglicona), nas mesmas doses (0,01; 0,1; 0,3 e 1 mg/kg (i.p., 21 dias de tratamento), no TSC em camundongos. Observou-se que o efeito tipo antidepressivo é muito semelhante entre a hesperidina e a sua forma aglicona, hesperetina. A administração crônica destes compostos promoveu uma redução significativa no tempo de imobilidade no TSC em camundongos nas doses de 0,1; 0,3 e 1 mg/kg, sem causar qualquer alteração na atividade locomotora e exploratória. Estes dados confirmam o efeito tipo antidepressivo da hesperidina e sua aglicona, e este parece não ser devido a um efeito psicoestimulante.

O óxido nítrico desempenha um papel neuromodulador significativo no SNC e a manipulação farmacológica da via L-arginina-NO-cGMP pode constituir uma nova abordagem

terapêutica para o tratamento da depressão (Heiberg et al., 2002, Jesse et al., 2008, Dhir & Kulkarni, 2007). Nesse sentido, o próximo passo do **Artigo 1**, foi investigar o envolvimento da via L -arginina-NO-cGMP no efeito tipo antidepressivo da hesperidina no TSC em camundongos. Os resultados demonstraram que o pré-tratamento com L -arginina (substrato da NOS) ou com SNAP (doador de NO), inibiu significativamente o efeito anti-imobilidade causado pelo tratamento agudo com hesperidina.

Também foi demonstrado um efeito tipo antidepressivo quando a hesperidina foi administrada com L-NNA (inibidor da NOS). Além disso, um efeito semelhante ao efeito tipo antidepressivo foi produzido quando a hesperidina foi administrada com 7-NI, um inibidor seletivo de NOS neuronal. Assim, estes resultados indicam que a inibição da NOS pode estar relacionada à redução no tempo de imobilidade no TSC demonstrada pela hesperidina.

O NO sintetizado a partir da L -arginina é um potente estimulador da enzima GCs, que por sua vez catalisa a conversão de guanosina 5'-trifosfato (GTP) em guanosina 3',5'-monofosfato cíclica (GMPc), um mediador de muitos efeitos do NO (Snyder, 1992; Denninger & Marletta, 1999). No presente trabalho, mostramos que doses subefetivas de azul de metileno (inibidor da NOS e da GC) ou ODQ (inibidor da GCs) potencializou o efeito anti-imobilidade de uma dose subefetiva de hesperidina no TSC, sugerindo que a inibição da produção de GMPc e dos eventos por ele mediados posteriormente, estão envolvidos no efeito tipo antidepressivo da hesperidina.

A concentração intracelular de GMPc também pode ser regulada pela fosfodiesterase (PDE), que por sua vez catalisa a hidrólise dos segundo mensageiros adenosina-5'-monofosfato cíclico (AMPc) e GMPc. Sildenafil é um inibidor seletivo da PDE-5, o que faz com que ocorra um aumento nos níveis de GMPc nos tecidos-alvos (Beavo, 1995). A reversão do efeito tipo antidepressivo da hesperidina no TSC através do pré-tratamento com sildenafil (um inibidor seletivo de fosfodiesterase tipo 5) reforça a ideia de que a administração de hesperidina produziu redução nos níveis de GMPc e que este alvo pode ser importante para seu efeito tipo antidepressivo. Nós também demonstramos que o tratamento agudo (1 mg/kg) e crônico (0,1, 0,3 e 1 mg / kg) com hesperidina foram capazes de diminuir significativamente os níveis de NO_x no hipocampo de camundongos, indicando que uma diminuição do NO local poderia favorecer a neuroproteção.

BDNF é um fator neurotrófico que tem múltiplos efeitos sobre a sustentação e evocação de elementos de plasticidade cerebral (Jin et al., 2002). Levando-se em conta sua importância

na depressão, o próximo passo do **Artigo 1** foi avaliar os níveis de BDNF, após tratamento crônico com hesperidina no hipocampo. Os resultados mostraram que a hesperidina e fluoxetina administrada cronicamente, aumentaram os níveis de BDNF no hipocampo em camundongos. Por outro lado, o antidepressivo clássico imipramina não foi capaz de alterar os níveis de BDNF. Réus et al., (2010) também mostraram que a imipramina não afetou significativamente os níveis de BDNF, em ambos os tratamentos, agudo e crônico. Considerando que o BDNF está diretamente implicado na sobrevivência celular, neurogênese (First et al., 2011) e em alterações na neurogênese hipocampal (Banar et al., 2011), pode sugerir-se que pelo menos em parte, o efeito tipo antidepressivo da hesperidina pode ser mediado através da neurogênese no hipocampo.

NO exerce seus efeitos neurais através de vários mecanismos, incluindo a modulação da condutância iônica (Garthwaite, 2008). Os canais de K^+ mostraram-se alvos da sinalização de NO (Steinert et al., 2008). Foi também relatado que tanto o NO como o GMPc, produzidos através da ativação da óxido nítrico sintase (NOS) e GCs, respectivamente, podem ativar diferentes tipos de canais de K^+ em vários tecidos (Freitas et al., 2013). Sabendo-se que existe uma forte associação entre o NO e os canais de K^+ , a modulação farmacológica destes canais pode potencialmente representar uma forma poderosa de controlar distúrbios do sistema nervoso central, incluindo a depressão (Kaster et al., 2007). Com base nessas considerações, o objetivo do **Artigo 2** foi investigar se diferentes tipos de canais de K^+ estão envolvidos no efeito tipo antidepressivo da hesperidina no TSC em camundongos. Deste modo, colaborando na compreensão dos mecanismos relacionados ao efeito tipo antidepressivo da hesperidina, que ainda não estão totalmente estabelecidos.

Os canais de K^+ desempenham um papel importante na manutenção do potencial de repouso da membrana, causando repolarização da membrana depois do disparo neuronal e medeiam a ação de vários neurotransmissores, como a serotonina (Wickenden, 2002; Honoré, 2007). O tratamento dos camundongos com doses subefetivas de bloqueadores de diferentes canais de K^+ , como tetraetilamônio (TEA), bloqueador não seletivo de canais de K^+ dependentes de voltagem (Halliwell, 1990), apamina, bloqueador de canais de K^+ de baixa condutância ativados por Ca^{2+} (Hugues et al., 1982), caribdotoxina, bloqueador de canais de K^+ de alta condutância ativados por Ca^{2+} (Gehlert & Gackenheim, 1993), glibenclamida, bloqueador não específico de canais de K^+ sensíveis ao trifosfato de adenosina (ATP) (Gehlert & Gackenheim, 1993) foram capazes de causar um efeito sinérgico com uma dose subefetiva

de hesperidina no TSC. Os resultados do presente estudo indicam que as propriedades tipo antidepressivas da hesperidina podem se dar, pelo menos em parte, por uma inibição dos canais de K^+ sensíveis ao ATP e ativados por Ca^{2+} , provavelmente por inibir a hiperpolarização e assim induzir um aumento na resposta excitatória dos neurônios (Galeotti et al., 1999).

Em muitos neurônios centrais, a 5-HT atua através de receptores $5-HT_{1A}$, que são acoplados à proteína G, ativando os canais de K^+ , levando à hiperpolarização da membrana (Takigawa & Alzheimer, 1999, Jeong et al., 2001). Além disso, foi relatado que a inibição dos canais de K^+ aumentou a liberação espontânea basal de [3H] 5-HT em fatias do hipocampo de ratos (Schechter, 1997). Em concordância, existem evidências substanciais que indicam uma associação entre canais de K^+ e o mecanismo de ação de alguns antidepressivos, especialmente relacionados ao sistema serotoninérgico (Bortolatto et al., 2010; Choi et al., 2004). Os fármacos antidepressivos como a fluoxetina, sertralina, venlafaxina e duloxetina, atuam modulando a excitabilidade neuronal, inibindo canais de K^+ (Choi et al., 2004; Bortolatto et al., 2010). Portanto, o efeito sinérgico entre os bloqueadores de canais de K^+ e a hesperidina no TSC pode ser dependente da ativação do sistema serotoninérgico, particularmente por uma interação com os receptores $5-HT_{1A}$. Esta hipótese está de acordo com os dados apresentados anteriormente pelo nosso grupo, em que o efeito tipo antidepressivo da hesperidina é dependente, pelo menos em parte, da sua interação com os receptores serotoninérgicos $5-HT_{1A}$ (Souza et al., 2013).

Além disso, para reforçar nossa hipótese de que o efeito antidepressivo da hesperidina é dependente, pelo menos em parte, da inibição de diferentes tipos de canais de K^+ , foi demonstrado que a ativação de canais de K^+ provocada por cromacalim ou minoxidil foi capaz de abolir o efeito tipo antidepressivo induzido por uma dose efetiva de hesperidina no TSC. Corroborando com os nossos resultados, o tratamento de animais com cromacalim foi capaz de antagonizar o efeito anti-imobilidade de vários antidepressivos, tais como imipramina, amitriptilina, desipramina e paroxetina (Cryan et al., 2002).

Tem sido sugerido que a via L -arginina-NO-cGMP está implicada na neurobiologia da depressão (Freitas et al., 2013). A diminuição dos níveis de NO ou o bloqueio da síntese de NO (bloqueio de NOS) no cérebro pode induzir efeito tipo antidepressivo, assim sugerindo o papel do NO hipocampal endógeno na fisiopatologia da depressão (Joca & Guimaraes, 2006). Além disso, alguns estudos têm relatado que o NO e o GMPc são moduladores importantes de alguns canais de K^+ no nível central e a inibição desses canais podem representar um papel importante nos mecanismos envolvidos com o transtorno depressivo (Fujino et al., 1991; Kaster

et al., 2007). Corroborando com essas evidências, no **Artigo 1**, demonstramos que a hesperidina produz um efeito tipo antidepressivo no TSC pelo mecanismo que modula a inibição da via L-arginina-NO-GMPc (Donato et al., 2014).

No **Artigo 2**, o efeito tipo antidepressivo da administração combinada de doses subefetivas de bloqueadores de canais de K^+ e hesperidina no TSC foram revertidos pelo pré-tratamento com o precursor de NO, L-arginina. Estes resultados reforçam a ideia de que a inibição da via L-arginina-NO-cGMP impede a ativação dos canais de K^+ e estes mecanismos estão envolvidos no efeito tipo antidepressivo da hesperidina.

Conforme demonstrado no **Artigo 2**, estendemos os achados anteriores (**Artigo 1**), sugerindo que o efeito antidepressivo da hesperidina no TSC poderia estar relacionado a uma regulação da modulação da excitabilidade neuronal dos canais de K^+ . Embora não seja possível excluir outros mecanismos de efeito subjacentes, em conjunto os resultados apresentados aqui sugerem um bloqueio indireto dos canais de K^+ pela hesperidina através da via L-arginina-NO-GMPc, resultados que poderiam explicar os efeitos comportamentais observados por este flavonoide.

As alterações induzidas pela administração de hesperidina foram reproduzidas pelos experimentos que fazem parte do **Artigo 1 e 2**. Os dados presentes nesta primeira parte da tese estendem as descobertas anteriores do nosso grupo sobre os mecanismos ligados ao efeito tipo antidepressivo do flavonoide hesperidina.

Além disso, estendemos os nossos estudos a outro polifenól que tem se destacado no meio científico devido ao seu amplo espectro de atividades farmacológicas, a mangiferina, uma xantona glicosilada presente na mangueira (Wei et al., 2011). Para esta segunda parte da tese, o presente estudo buscou avaliar o efeito tipo antidepressivo da mangiferina após exposição ao estresse agudo, o TNF e TSC e os possíveis mecanismos que modulam este efeito, sendo os resultados descritos na foram de dois manuscritos.

Como primeira etapa neste estudo, foi investigado o efeito tipo antidepressivo produzido pela administração oral de mangiferina, através de uma curva tempo-resposta no TSC (**Manuscrito 1**). Os resultados indicaram que a administração da mangiferina (25 mg/kg, p.o.) exibiu efeito tipo antidepressivo semelhante nos intervalos de tempo (1, 2 e 4 horas), sendo significativo até 8 horas, porém este efeito foi abolido 12 horas após o tratamento. Também foi realizada a curva dose-resposta, em que o tratamento com mangiferina (0,2, 1, 5, 25 mg/kg, p.o.) foi realizado 1 h antes da TSC ou TNF. A mangiferina nas doses de 5 e 25 mg/kg

diminuíram significativamente o tempo de imobilidade, demonstrando efeito tipo antidepressivo em ambos os testes comportamentais, TSC e TNF. Do mesmo modo, a fluoxetina (32 mg/kg, p.o., um inibidor da recaptção de 5-HT) ou imipramina (15 mg/kg, p.o., um antidepressivo tricíclico), utilizados como controles positivos, também reduziram significativamente o tempo de imobilidade no TSC em camundongos.

Vários estudos indicam que um distúrbio central no sistema serotoninérgico tem sido apontado como um fator chave ligado à patofisiologia da depressão (Hamon & Blier, 2013; Artigas, 2013). Nesse sentido, o próximo passo do **Manuscrito 1** foi investigar a possível contribuição deste sistema no efeito tipo antidepressivo da mangiferina em camundongos. Para investigar o papel do sistema serotoninérgico no efeito tipo antidepressivo da mangiferina utilizou-se o método de depleção de 5-HT, através da administração de paraclorofenilalanina (PCPA), um inibidor da enzima triptofano-hidroxilase. Nossos resultados mostram que a reversão no efeito da mangiferina pela depleção de 5-HT induzida pela PCPA sugere que o efeito antidepressivo da mangiferina depende da biodisponibilidade de 5-HT na fenda sináptica.

O receptor 5-HT_{1A} tem sido cada vez mais associado a alterações no humor e emoção e tem funções opostas como um autorreceptor somatodendrítico pré-sináptico e um heterorreceptor pós-sináptico (Albert, 2012). Estudos recentes revelaram que tem sido de grande interesse avaliar potenciais antidepressivos que incorporem um efeito nos receptores 5-HT_{1A} no seu mecanismo de ação (Page et al., 2002). Neste contexto, dois medicamentos foram recentemente aprovados para o tratamento do transtorno depressivo maior [vilazodona, aprovado em 2011; e vortioxetina (Lu AA21004), aprovado em 2013] inibem a reabsorção de 5-HT e mostram agonismo parcial nos receptores 5-HT_{1A} (Zhang et al., 2014; Mork et al., 2012). Os resultados deste trabalho indicam um envolvimento dos receptores 5-HT_{1A} no efeito antidepressivo da mangiferina no TSC (**Manuscrito 1**). Esta evidência é apoiada por um dos achados deste estudo, em que a diminuição do tempo de imobilidade produzido pela mangiferina foi abolida pelo pré-tratamento dos camundongos com o antagonista seletivo do receptor 5-HT_{1A}, WAY100635, sugerindo que este receptor é importante para o efeito tipo antidepressivo da mangiferina. No entanto, o antagonista 5-HT_{1B} e alguns subtipos de receptores testados (5-HT_{2A/2C}, 5-HT₃, 5-HT₃, 5-HT₄ e 5-HT₇) não reverteram o efeito tipo antidepressivo da mangiferina. Portanto, o envolvimento do sistema serotoninérgico no efeito tipo antidepressivo da mangiferina é dependente da modulação via receptor 5-HT_{1A}.

Adicionalmente, os resultados também mostraram que a mangiferina é capaz de produzir um efeito tipo antidepressivo sinérgico com o tratamento combinado com ISRSs (paroxetina e sertralina), todos em doses subefetivas no TSC. Este efeito sinérgico corroborou com a hipótese de que a neurotransmissão serotoninérgica está diretamente envolvida no efeito tipo antidepressivo da mangiferina. Uma possibilidade que explica a potenciação do efeito de uma dose subefetiva de mangiferina no TSC é que este composto de forma semelhante a paroxetina e sertralina, pode aumentar os níveis de 5-HT na fenda sináptica, pelo menos em parte, por inibição da recaptação de 5-HT. Este estudo sugere uma nova aplicação terapêutica com as respostas sinérgicas tipo antidepressivas provocadas pela mangiferina em associação com paroxetina e sertralina. A estratégia de combinação, usada no tratamento da depressão, oferece uma série de vantagens potenciais. A principal vantagem desta abordagem é a diminuição das doses dos antidepressivos prescritos e conseqüentemente os efeitos colaterais adversos, incluindo menor síndrome de abstinência e uma resposta clínica mais rápida ou efetiva do que a obtida com a reposição de antidepressivos (Rubio et al., 2004, Lam et al., 2002). Assim, esta xantona deve melhorar a eficácia destes antidepressivos convencionais e pode ser útil no tratamento da depressão.

O córtex cerebral e o hipocampo têm desempenhado papéis significativos nos estados afetivos do ser humano e são, portanto, alvos para o tratamento de distúrbios do humor, ambos envolvidos criticamente na regulação da emoção relacionada à depressão, motivação, aprendizado e memória (Mao et al., 2011; Mallo et al., 2008). A diminuição dos níveis cerebrais de 5-HT e do seu principal metabolito 5-HIAA tem sido comumente observada em pacientes com depressão (Roy et al., 1989). Neste contexto, os níveis anormais de 5-HT nestas regiões cerebrais são relevantes para investigações clínicas do estado depressivo e a avaliação do efeito da mangiferina. Curiosamente, a mangiferina afeta os níveis de 5-HT e seu metabolito 5-HIAA em regiões do cérebro de camundongos investigadas neste estudo. O tratamento da mangiferina foi associado com o aumento dos níveis de 5-HT no hipocampo, enquanto os níveis de 5-HIAA foram significativamente diminuídos no córtex cerebral. Por outro lado, o tratamento com mangiferina diminuiu significativamente a razão de 5-HIAA/5-HT, um indicador usual de atividade serotoninérgica, nas duas regiões cerebrais (hipocampo e córtex cerebral). A razão do neurotransmissor em relação aos seus metabólitos “turnover”, pode ser utilizada como um índice do metabolismo dos neurotransmissores (Kitanaka et al., 2006). Deste modo, a redução

da razão metabólitos/neurotransmissores sugere um abrandamento no metabolismo do neurotransmissor.

O processo de captação de 5-HT é um mecanismo bem descrito, responsável pela regulação dos níveis de 5-HT na fenda sináptica e está envolvido no mecanismo de ação dos medicamentos antidepressivos mais utilizados (Millan, 2006). Desta forma, o nossos resultados mostraram que a captação de 5-HT nos terminais nervosos por sinaptossomas preparados a partir de córtex cerebral, hipocampo e estriado de camundongos foi inibida significativamente através do tratamento com mangiferina, bem como pelo tratamento com fluoxetina (controle positivo), sugerindo um aumento das concentrações de 5-HT na fenda sináptica, o que pode ser associado ao bloqueio do transportador 5-HT localizados em terminais nervosos pré-sinápticos (Ceglia et al., 2004, Bel & Artigas, 1993), embora o grau de seletividade para o transportador 5-HT seja variável. Estes resultados sugerem que a mangiferina produziu um efeito tipo antidepressivo nos camundongos e este efeito parece ser mediado por uma interação com o sistema serotoninérgico, particularmente pela inibição da recaptação de 5-HT.

Alguns antidepressivos com atividade modulatória serotoninérgica, como o escitalopram e fluoxetina têm se mostrado eficazes em ambos, depressão como em distúrbios associados à ansiedade (David et al., 2009; Pedersen, 2005). Neste contexto, investigamos o efeito tipo ansiolítico da mangiferina no teste do labirinto em cruz elevado (LCE). Os resultados mostraram que a mangiferina não alterou a percentagem de tempo ou a percentagem de entradas nos braços abertos comparados com o controle. Estes dados sugerem que uma única administração de mangiferina não apresentou propriedades ansiolíticas. No entanto, um estudo recente de Jangra et al. (2014), demonstraram o efeito protetor da mangiferina no comportamento tipo ansioso induzido pelo lipopolissacarídeo (LPS) em camundongos, após 14 dias de pré-tratamento com mangiferina (20 e 40 mg / kg, p.o.).

O **Manuscrito 2**, contempla os dados referentes as investigações direcionadas para verificar os mecanismos subjacentes ao efeito antidepressivo da mangiferina através do possível envolvimento dos sistemas dopaminérgico e noradrenérgico.

Os resultados apresentados aqui sugerem claramente que o efeito antidepressivo da mangiferina no TSC é dependente, pelo menos em parte, de uma interação com o sistema dopaminérgico, através da ativação dos receptores D₂ de dopamina. De acordo com os nossos resultados, o pré-tratamento dos camundongos com haloperidol (antagonista não seletivo de receptores dopaminérgicos) ou sulpirida (antagonista do receptor D₂), mas não com SCH23390

(antagonista do receptor D₁) evitou o efeito tipo antidepressivo da mangiferina no TSC, sugerindo que a propriedade farmacológica é mediada via interação com receptores dopaminérgicos D₂. De acordo com este achado, o efeito tipo antidepressivo de uma dose subefetiva de mangiferina foi significativamente potenciado pela administração de uma dose subefetiva de apomorfina (0,5 mg/kg, i.p., agonista preferencial do receptor D₂ de dopamina), mas não com uma dose subefetiva de SKF 38393 (agonista do receptor da dopamina D₁), sugerindo um efeito sinérgico do envolvimento da mangiferina dos receptores D₂ de dopamina no TSC. Portanto, este resultado forneceu evidências adicionais que sustentam nossa conclusão de que os receptores D₂ de dopamina estão implicados nos efeitos tipo antidepressivos da mangiferina.

Abordando mais sobre o sistema dopaminérgico, avaliamos os níveis de monoamina DA e seus metabolitos DOPAC e HVA no cérebro após tratamento com mangiferina. Foram estudadas três regiões cerebrais: o córtex cerebral, hipocampo e estriado, estas envolvidas nos padrões de resposta cognitiva e comportamental, como emoção, motivação e aprendizagem e memória (Drevets et al., 2008). Curiosamente, o tratamento com mangiferina gera apenas uma tendência em aumentar os níveis de DA no córtex cerebral, hipocampo e estriado, que estão de acordo com o efeito tipo antidepressivo observado pelo antagonista D₂. Além disso, considerando que a razão entre o principal metabólito e a monoamina correspondente é comumente utilizada como índice de do metabolismo do neurotransmissão "turnover" (Kitanaka et al., 2005), nossos resultados mostraram que a mangiferina induziu uma diminuição significativa no turnover de DA (DOPAC/DA) no hipocampo e estriado. Desta forma, estes resultados indicaram que o metabolismo DA foi diminuído e, conseqüentemente, elevou a disponibilidade deste neurotransmissor em regiões específicas do cérebro, que também poderia esclarecer o efeito tipo antidepressivo.

Adicionalmente, o efeito tipo antidepressivo sinérgico no TSC, obtido utilizando o protocolo experimental da administração combinada de uma dose subefetiva do antidepressivo convencional bupropiona com uma dose subefetiva de mangiferina, reforçando a participação do sistema dopaminérgico no efeito tipo antidepressivo da mangiferina. Alguns autores têm considerado o uso adjuvante de fitoterápicos valioso para melhorar a resposta e a eficácia dos antidepressivos sintéticos, além de diminuir seus efeitos colaterais, permitindo que doses mais baixas sejam prescritas (Sarris et al., 2010). Adicionalmente, o efeito tipo antidepressivo sinérgico no TSC, obtido utilizando o protocolo experimental da administração combinada de

uma dose subefetiva do antidepressivo convencional bupropiona com uma dose subefetiva de mangiferina, reforçando a participação do sistema dopaminérgico no efeito tipo antidepressivo da mangiferina. Alguns autores têm considerado o uso adjuvante de fitoterápicos valioso para melhorar a resposta e a eficácia dos antidepressivos sintéticos, além de diminuir seus efeitos colaterais, permitindo que doses mais baixas sejam prescritas (Sarris et al., 2010). A principal vantagem desta abordagem é a diminuição das doses de antidepressivos prescritos e consequentemente os efeitos adversos secundários.

O sistema noradrenérgico está clinicamente implicado na fisiopatologia da depressão e tem sido amplamente utilizado na prática clínica (Hamon & Blier, 2013). Contudo, no presente estudo, o pré-tratamento dos camundongos com AMPT, um inibidor da tirosina hidroxilase, uma enzima crítica para a síntese de DA e NE, não foi capaz de abolir o efeito antidepressivo da mangiferina no TSC. A abordagem utilizada esgota tanto NE como DA (Pizzagalli, 2014). Mayorga et al. (2001) demonstraram que a AMPT reduz os níveis de DA e NE (57% e 53%, respectivamente) em camundongos, sem afetar os níveis de 5-HT. Este resultado mostra que apesar de terem redução na disponibilidade dos níveis cerebrais de NE e/ou DA, o efeito antidepressivo permanece, indicando a participação de outros mecanismos no efeito antidepressivo da mangiferina. Isso pode ser explicado pelos resultados encontrados no **Manuscrito 1**, mostrando um efeito tipo antidepressivo através da modulação do sistema serotoninérgico. Em nosso estudo (**Manuscrito 2**), o pré-tratamento dos camundongos com prazosin (antagonista de receptor α_1 -adrenérgico), ioimbina (antagonista de receptor α_2 -adrenérgico) ou propranolol (antagonista de receptor β -adrenérgico) foi ineficaz na reversão do efeito tipo antidepressivo da mangiferina no TSC. Estes achados fornecem evidências de que o efeito tipo antidepressivo da mangiferina não se associou à modulação da função noradrenérgica. Reforçando esta hipótese, a co-administração de mangiferina em dose subefetiva em combinação com uma dose subefetiva de reboxetina (inibidor seletivo da recaptação de NE) foi inefetiva para potenciar o efeito tipo antidepressivo. Em concordância com este achado, os resultados apresentados na quantificação neuroquímica mostraram que os níveis de NE e seu metabolito MHPG no córtex cerebral, hipocampo e estriado não foram modificados após tratamento com mangiferina. Assim, deve ser salientado que o efeito antidepressivo da mangiferina no TSC não parece estar associado à neurotransmissão noradrenérgica.

Neste estudo, nós demonstramos o envolvimento do sistema dopaminérgico através dos receptores de dopamina D₂ e diminuição no “turnover” da dopamina. Vale ressaltar, que os resultados obtidos para os mecanismos subjacentes ao efeito antidepressivo da mangiferina sugerem que a mangiferina atua diminuindo o “turnover” da dopamina, sugerindo diminuição no metabolismo do neurotransmissor dopamina e a interação com os receptores D₂ de dopamina. Além disso, nossos resultados mostraram o efeito tipo antidepressivo exercido pela combinação da mangiferina com bupropiona. O **Manuscrito 1 e 2**, demonstraram que os efeitos antidepressivos da mangiferina resultam da modulação dos sistemas serotoninérgicos e dopaminérgicos. Corroborando com essa conclusão, foi postulado que quando o sistema dopaminérgico é co-alvo, o tratamento com antidepressivos parece ser mais eficaz (Prins et al., 2011). Além disso, também foi relatado que a modelagem de multi-sistemas com funcionamento no cérebro, moléculas agindo em diversos sistemas de monoaminas podem mais eficazmente restaurar redes disfuncionais em doenças mais graves e/ou crônicas (Millan, 2009). Espera-se que esta xantona polifenólica, possa ser prescrita como uma terapia adjuvante com moléculas antidepressivas já existentes no tratamento da depressão.

As terapias à base de moléculas oriundas de plantas foram introduzidas recentemente no tratamento da depressão e oferecem perspectivas de estratégias alternativas/complementares, com vantagens em termos de segurança, tolerabilidade e adesão dos pacientes (Thachil et al., 2007). Neste contexto, em experimentos envolvendo linfócitos periféricos de sangue e hepatócitos de ratos, a mangiferina não induz citotoxicidade, genotoxicidade ou mutagenicidade (Rodeiro et al., 2014). Deste modo, espera-se que esta xantona polifenólica, possa ser prescrita como uma terapia adjuvante com moléculas antidepressivas já existentes no tratamento da depressão.

6 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados nesta tese, podemos concluir e/ou inferir o seguinte:

- A administração aguda e crônica do flavonoide hesperidina e sua aglicona, hesperetina, produziram efeito tipo antidepressivo no TSC em camundongos;

- A hesperidina inibe a via L -arginina-NO-cGMP;

- Houve um aumento dos níveis de BDNF no hipocampo, sugerindo um possível envolvimento da neurogênese, e isto pode estar correlacionado com a ação neuroprotetora da hesperidina relacionada à viabilidade neural.

- A hesperidina modulou a excitabilidade neuronal através da inibição dos canais de K^+ ;

- A inibição da via L -arginina-NO-cGMP impede a ativação dos canais de K^+ e estes mecanismos estão envolvidos no efeito tipo antidepressivo da hesperidina;

- A mangiferina, uma xantona glicosilada, exibiu um pronunciado efeito tipo antidepressivo no TSC e TNF, mediado através da modulação dos receptores $5-HT_{1A}$;

- A mangiferina demonstrou efeito sinérgico com a paroxetina e sertralina, confirmando a hipótese do envolvimento do sistema serotoninérgico;

- A razão de 5-HIAA/5-HT diminuiu significativamente no hipocampo e córtex cerebral, sugerindo um abrandamento do metabolismo da 5-HT;

- A inibição da recaptação de 5-HT nas regiões cerebrais, sugere um aumento da sua disponibilidade na fenda sináptica.

- Ainda para mangiferina, demonstramos o envolvimento do sistema dopaminérgico através interação com os receptores D_2 de dopamina;

- Houve uma diminuição na razão DOPAC/DA no hipocampo e estriado, sugerindo diminuição no metabolismo da dopamina;

- O efeito tipo antidepressivo da mangiferina no TSC, não parece estar associado à neurotransmissão noradrenérgica.

Finalmente, os resultados presentes neste estudo reforçam a hipótese de que estes dois compostos fenólicos, hesperidina e mangiferina, podem apresentar-se como candidatos promissores para o desenvolvimento de moléculas para o tratamento da depressão, bem como as suas associações com antidepressivos convencionais poderiam ser utilizadas para reduzir a dose na terapia convencional.

REFERÊNCIAS

AGOUNI, A.; LAGRUE-LAK-HAL, A. H.; MOSTEFAI, H. A.; et al. Red wine polyphenols prevent metabolic and cardiovascular alterations associated with obesity in Zucker fatty rats (Fa/Fa). *PLoS One*, 4:5557, 2009.

AHMAD, S. T.; ARJUMAND, W.; NAFEES, S.; SETH, A.; ALI, N.; RASHID, S.; SULTANA, S. Hesperidin alleviates acetaminophen induced toxicity in Wistar rats by abrogation of oxidative stress, apoptosis and inflammation. *Toxicol. Lett.* 205:149–161, 2012.

ALBERT, P. R. Transcriptional regulation of the 5-HT_{1A} receptor: implications for mental illness. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 367, 2402–2415, 2012.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, (DSM-5)*. Arlington, VA: Am. J. Psychiatry, 2013.

ANG, E.; LIU, Q.; QI, M.; LIU, H. G.; YANG, X.; CHEN, H.; et al. Mangiferin attenuates osteoclastogenesis, bone resorption and RANKL-induced activation of NF-kappaB and ERK. *J. Cell. Biochem.* 112:89-97, 2011.

ANTUNES, M. S.; GOES, A. T.; BOEIRA, S. P.; PRIGOL, M.; JESSE, C. R. Protective effect of hesperidin in a model of Parkinson's disease induced by 6-hydroxydopamine in aged mice. *Nutrition*. 30:1415-22, 2014.

ANTUNES, M. S.; JESSE, C. R.; RUFF, J. R.; DE OLIVEIRA ESPINOSA, D.; GOMES, N. S.; ALTVATER, E. E. T.; et al. Hesperidin reverses cognitive and depressive disturbances induced by olfactory bulbectomy in mice by modulating hippocampal neurotrophins and cytokine levels and acetylcholinesterase activity. *Eur. J. Pharmacol.* 789:411–420, 2016.

ARORA, V.; KUHAD, A.; TIWARI, V.; et al. Curcumin ameliorates reserpine-induced pain-depression dyad: behavioural, biochemical, neurochemical and molecular evidences. *Psychoneuroendocrinol.* 36, 1570-81, 2011.

ARTIGAS, F. Serotonin receptors involved in antidepressant effects. *Pharmacol. Ther.* 137, 119–131, 2013.

BANASR, M.; DUMAN, R. S. Glial loss in the prefrontal cortex is sufficient to induce depressive-like behaviors. *Biol. Psychiatry*, 64:863–870, 2008.

BARRETO, J. C.; TREVISAN, M. T. S.; HULL, W. E.; ERBEN, G.; DE BRITO, E. S.; PFUNDSTEIN, B.; et al. Characterization and quantitation of polyphenolic compounds in bark,

kernel, leaves, and peel of mango (*Mangifera indica* L.). J. Agric. Food Chem. 56:5599-5610, 2008.

BAUER, M.; MONZ, B. U.; MONTEJO, A. L.; QUAIL, D.; DANTCHEV, N.; DEMYTTENAERE, K.; et al. Prescribing patterns of antidepressants in Europe: results from the factors influencing depression endpoints research (FINDER) study. Eur. Psychiatry, 23:66–73, 2008.

BEAVO J. A. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. Physiol. Rev. 75:725-748, 1995.

BEL, N.; ARTIGAS, F. Chronic treatment with fluvoxamine increases extracellular serotonin in frontal cortex but not in raphe nuclei., Synapse 3;243–5, 1993.

BELTRÁN, A. E.; ALVAREZ, Y.; XAVIER, F. E.; HERRANZ, R.; RODRÍGUEZ, J.; NÚÑEZ, A. J.; et al. European Journal of Pharmacology, 499:297-297, 2004.

BENARD, O.; CHI, Y. Medicinal Properties of Mangiferin, Structural Features, Derivative Synthesis, Pharmacokinetics and Biological Activities. Mini Rev. Med. Chem. 15:582-594, 2015.

BHATIA, H. S.; CANDELARIO-JALIL, E.; DE OLIVEIRA, A. C.; OLAJIDE, O. A.; MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, G.; FIEBICH, B. L. Mangiferin inhibits cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 production in activated rat microglial cells. Arch. Biochem. Biophys. 477:253-258, 2008.

BORTOLATTO, C. F.; JESSE, C. R.; WILHELM, E. A.; et al. Involvement of potassium channels in the antidepressant-like effect of venlafaxine in mice. Life Sci. 86:372–376, 2010.

BULL, S. A.; HUNKELER, E. M.; LEE, J. Y.; ROWLAND, C. R.; WILLIAMSON, T. E.; SCHWAB, J. R.; HURT, S. W. Discontinuing or switching selective serotonin-reuptake inhibitors. J. Clin. Psychiatry 36:578–584, 2002.

CANUTTO, K. M.; Propriedades químicas e farmacológicas de mangiferina: um composto bioativo de manga (*Mangifera indica* L). Embrapa Semi-Árido Documentos. 27, 2009.

CARVALHO, R. R.; PELLIZZON, C. H.; JUSTULIN, L.; FELISBINO, S. L.; VILEGAS, W.; BRUNI, F.; et al. Effect of mangiferin on the development of periodontal disease: involvement of lipoxin A4, anti-chemotactic action in leukocyte rolling. Chem. Biol. Interact., 179:344-350, 2009.

CASCADE, E. F.; KALALI, A. H.; BLIER, P. Treatment of depression: antidepressant monotherapy and combination therapy. Psychiatry (Edgmont), 4:25–27, 2007.

- CEGLIA, I.; ACCONCIA, S.; FRACASSO, C.; COLOVIC, M.; CACCIA, S.; INVERNIZZI, R. W. Effects of chronic treatment with escitalopram or citalopram on extracellular 5-HT in the prefrontal cortex of rats: role of 5-HT_{1A} receptors. *Br. J. Pharmacol.* 142, 469–78, 2004.
- CHANG, T.; FAVA, M. The future of psychopharmacology of depression. *J. Clin. Psychiatry* 71:971–975, 2010.
- CHAVEZ-LEON, E.; URIBE, M. P. O.; GOMEZ, C. S. Selective serotonin reuptake inhibitors antidepressants (SSRIs). *Salud Mental* 31:307-319, 2008.
- CHENG, P.; PENG, Z. G.; YANG, J.; SONG, S. J. The effect of mangiferin on telomerase activity and apoptosis in leukemic K562 cells. *J. Chin. Med. Mater.* 30:306-309, 2007.
- CHEPENIK, L. G.; FREDERICKS, C.; PAPADEMETRIS, X.; SPENCER, L.; LACADIE, C.; WANG, F.; et al. Effects of the brain-derived neurotrophic growth factor val66met variation on hippocampus morphology in bipolar disorder. *Neuropsychopharmacol.* 34:944–951, 2009.
- CHOI, J. S.; CHOI, B. H.; AHN, H. S.; et al. Fluoxetine inhibits A-type potassium currents in primary cultured rat hippocampal neurons. *Brain Res.* 1018:201–207, 2004.
- CORREIA, S. J.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M. Metabólitos Secundários de Espécies de Anacardiaceae. *Quim. Nova.* 29:1287-1300, 2006.
- CRYAN, J. F.; HOLMES, A. The ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety. *Nat. Rev. Drug Discov.* 4:775-790, 2005.
- CRYAN, J. F.; MARKOU, A.; LUCKI, I. Assessing antidepressant activity in rodents: Recent developments and future needs. *Trends Pharmacol. Sci.* 23:238–245, 2002.
- D'ARCHIVIO, M.; FILESI, C.; DI BENEDETTO, R.; GARGIULO, R.; GIOVANNINI, C.; MASELLA, R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*, 43:348-61, 2007.
- DAVID, D. J.; SAMUELS, B. A.; RAINER, Q.; WANG, J. W.; MARSTELLER, D.; MENDEZ, I.; DREW, M.; CRAIG, D. A.; GUIARD, B. P.; GUILOUX, J. P. Neurogenesis-dependent and-independent effects of fluoxetine in an animal model of anxiety/depression. *Neuron* 62:479–493, 2009.
- DAVIDSON, M. D.; ECHEVERRY, D. Collaborative care for depression and chronic illness. *N. Engl. J. Med.* 364:1278, 2011.
- DE, A.; CHATTOPADHYAY, S. The variation in cytoplasmic distribution of mouse peritoneal macrophage during phagocytosis modulated by mangiferin, an immunomodulator. *Immunobiol.* 214:367-376, 2009.

- DENG, J. G.; YANG, K.; ZHENG, Z. W.; ZHOU, X. X. Inhibitory effect of mangiferin on duck hepatitis B virus (DHBV) DNA in vivo. *J. Guangxi. Tradit. Chin. Med. Univ.* 10:1-3, 2007.
- DENNINGER, J. W., MARLETTA, M. A. Guanylate cyclase and the •NO/cGMP signaling pathway. *BiochimBiophys Acta* 1411: 334-350, 1999.
- DHIR, A.; KULKARNI, S. K. Involvement of l-arginine–nitric oxide–cyclic guano-sine monophosphate pathway in the antidepressant-like effect of venlafaxine in mice. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 31:921–925, 2007.
- DONATO, F.; GOMES, M. G.; GOES, A. T. R., et al. Hesperidin exerts antidepressant-like effects in acute and chronic treatments in mice: Possible role of L-arginine-NO-cGMP pathway and BDNF levels. *Brain Res. Bull.* 104:19–26, 2014.
- DREVETS, W. C.; PRICE, J. L.; FUREY, M. L. Brain structural and functional abnormalities in mood disorders: implications for neurocircuitry models of depression. *Brain Struct. Funct.* 213:93–118, 2008.
- DUMAN, C. H. Models of Depression. *Hormones of the Limbic System Book Series: Vitam. Horm.*, 82:1-21, 2010.
- EBRAHIMI, A.; SCHLUESENER, H. Natural polyphenols against neurodegenerative disorders: potentials and pitfalls. *Ageing Res. Rev.* 11:329-45, 2012.
- EL-SEEDI, H.; EL-BARBARY, M.; EL-GHORAB, D.; BOHLIN, L.; BORG-KARLSON, A. K.; GORANSSON, U.; VERPOORTE, R. Recent insights into the biosynthesis and biological activities of natural xanthenes. *Curr. Med. Chem.* 17:854–901, 2010.
- FILHO, C. B.; FABBRO, L. D.; DE GOMES, M. G.; et al. Kappa-opioid receptors mediate the antidepressant-like activity of hesperidin in the mouse forced swimming test. *Eur. J. Pharmacol.* 698:286-291, 2013.
- FIRST, M.; GIL-AD, I.; TALER, M.; TARASENKO, I.; NOVAK, N.; WEIZMAN, A. The effects of fluoxetine treatment in a chronic mild stress rat model on depression-related behavior, brain neurotrophins and ERK expression. *J. Mol. Neurosci.* 45:246–255, 2011.
- FREITAS, A. E.; MORETTI, M.; BUDNI, J.; et al. NMDA receptors and the L-arginine nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway are implicated in the antidepressant-like action of the ethanolic extract from *Tabebuia avellanedae* in mice. *J. Med. Food* 16:1060–1038, 2013.

- FUJINO, K.; NAKAYA, S.; WAKATSUKI, T.; et al. Effects of nitroglycerin on ATP-induced Ca^{++} -mobilization, Ca^{++} -activated K channels and contraction of cultured smooth muscle cells of porcine coronary artery. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 256:371–377, 1991.
- GALEOTTI, N.; GHELARDINI, C.; CALDARI, B.; BARTOLINI, A. Effect of potassium channel modulators in mouse forced swimming test. *Br. J. Pharmacol.* 126: 1653-1659, 1999.
- GARCÍA, D.; LEIRO, J.; DELGADO, R.; SANMARTIN, M. L.; UBEIRA, F. M., *Mangifera indica* L. extract (Vimang) and mangiferin modulate mouse humoral immune responses. *Phytother. Res.* 17:1182-1187, 2003.
- GARG, A.; GARG, S.; ZANEVELD, L. J.; SINGLA, A. K. Chemistry and Pharmacology of The Citrus Bioflavonoid Hesperidin. *Phytother. Res.* 15:655-669, 2001.
- GARRIDO, G.; GONZALEZ, D.; LEMUS, Y.; GARCIA, D.; LODEIRO, L.; QUINTERO, G.; et al. In vivo and in vitro anti-inflammatory activity of *Mangifera indica* L. extract (Vimang®). *Pharmacological Research*, 50:143-149, 2004.
- GARTHWAITE, J. Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission. *Eur. J. Neurosci.* 27:2783–2802, 2008.
- GEHLERT, D. R.; GACKENHEIMER, S. L. Comparison of the distribution of binding sites for the potassium channel ligands [^{125}I]apamin, [^{125}I]charybdotoxin and [^{125}I]iodoglyburide in the rat brain. *Neurosci.* 52:191–205, 1993.
- GOTTLIEB, M.; LEAL-CAMPANARIO, R.; CAMPOS-ESPARZA, M. R.; SÁNCHEZ-GÓMEZ, M. V.; ALBERDI, E.; ARRANZ, A.; et al. Neuroprotection by two polyphenols following excitotoxicity and experimental ischemia. *Neurobiol. Dis.* 23:374-386, 2006.
- GUHA, S.; GHOSAL, S.; CHATTOPADHYAY, U. Antitumor, immunomodulatory and anti-HIV effect of mangiferin a naturally occurring glucosylxanthone. *Chemotherapy.* 42:443-451, 1996.
- GUILLOT, B. et. al. A long term treatment with venotropic drug: Results on efficacy and safety of Daflon-500 mg in chronic venous insufficiency. *Int. Angiol.* 8:67-71, 1989.
- HALLIWELL, J. V. K^+ channels in the central nervous system. In: *Potassium Channels: Structure, Classification, Function and Therapeutic Potential* (Cook NS, ed.). Ellis Horwood, Chichester, United Kingdom. 348–381, 1990.
- HAMON, M.; BLIER, P. Monoamine neurocircuitry in depression and strategies for new treatments. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 45:54–63, 2013.

HAN, S. Y.; CHIN, Y. W. A FLT3-inhibitory constituent from the rhizomes of *Anemarrhenaasphodeloides*. *J. Enzyme. Inhib. Med. Chem.* 26:445-448, 2011.

Heiberg, I. L.; Wegener, G.; Rosenberg, R. Reduction of cGMP and nitric oxide has antidepressant-like effects in the forced swimming test in rats. *Behav. Brain Res.* 134:479–484, 2002.

HENRY, C.; DEMOTES-MAINARD, J. SSRIs, suicide and violent behavior: is there a need for a better definition of the depressive state? *Curr. Drug Saf.*, 1:59–62, 2006.

HERNANDEZ, P.; RODRIGUEZ, P.C.; DELGADO, R.; WALCZAK, H. Protective effect of *Mangifera indica* L. polyphenols on human T lymphocytes against activation-induced cell death. *Pharm. Res.* 55:167-173, 2007.

HIRATA, A.; MURAKAMI, Y.; SHOJI, M.; et al. Kinetics of radical-scavenging activity of hesperetin and hesperidin and their inhibitory activity on COX-2 expression. *Anticancer Res.* 25:3367-74, 2005.

HNÁTEK, L. Therapeutic potential of micronized purified flavonoid fraction (MPFF) of diosmin and hesperidin in treatment chronic venous disorder. *VnitrLek.* 61:807–814, 2015.

HONORÉ, E. The neuronal background K_{2P} channels: focus on TREK₁. *Nat. Rev. Neurosci.* 8: 251-261, 2007.

HUGUES, M.; ROMEY, G.; DUVAL, D.; et al. Apamin as a selective blocker of the calcium-dependent potassium channel in neuroblastoma cells: Voltage-clamp and biochemical characterization of the toxin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79:1308–1312, 1982.

HWANG, S. L.; YEN, G. C. Neuroprotective effects of the citrus flavanones against H₂O₂-induced cytotoxicity in PC12 cells. *J. Agric. Food Chem.* 56:859–864, 2008.

IKEMURA, M.; SASAKI, Y.; GIDDINGS, J. C.; YAMAMOTO, J. Preventive effects of hesperidin, glucosyl hesperidin and naringin on hypertension and cerebral thrombosis in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Phytother. Res.* 26:1272–1277, 2012.

IRANSHAHI, M.; REZAEI, R.; PARHIZ, H.; ROOHBAKHSH, A.; SOLTANI, F. Protective effects of flavonoids against microbes and toxins: The cases of hesperidin and hesperetin. *Life Sci.* 137:125–132, 2015.

JAGANATAH, I. B.; CROZIER, A. Dietary flavonoids and phenolic compounds in: *Plant Phenolics and Human Health*, Fraga, C.G. (Ed.). In: Fraga, C.G. (Ed.). John Wiley & Sons Inc., Hoboken, NJ. 1–50, 2010.

- JAGETIA, G. C.; BALIGA, M.S. Radioprotection by mangiferin in DBAxC57BL mice: a preliminary study. *Phytomedicine* 12:209-215, 2005.
- JANGRA, A.; LUKHI, M. M.; SULAKHIYA, K.; BARUAH, C. C.; LAHKAR, M. Protective effect of mangiferin against lipopolysaccharide-induced depressive and anxiety-like behaviour in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 740:337–345, 2014.
- JEONG, H. J.; HAN, S. H.; MIN, B. I.; et al.; 5-HT_{1A} receptor-mediated activation of G-protein-gated inwardly rectifying K⁺ current in rat periaqueductal gray neurons. *Neuropharmacol.* 41: 175–185, 2001.
- JESSE, C. R.; BORTOLATTO, C. F.; SAVEGNAGO, L.; ROCHA, J. B.; NOGUEIRA, C. W. Involvement of l-arginine–nitric oxide–cyclic guanosine monophosphate pathway in the antidepressant-like effect of tramadol in the rat forced swimming test. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 32:1838–1843, 2008.
- JIANG, D. J.; DAI, Z.; LI, Y. J. Pharmacological effects of xanthenes as cardiovascular protective agents. *Cardiovascular Drug Rev.* 22:91-102, 2004.
- JIN, Y.; FISCHER, I.; TESSLER, A.; JOULE, J.D. Transplants of fibroblasts genetically modified to express BDNF promote axonal regeneration from supraspinal neurons following chronic spinal cord injury. *Exp. Neurol.* 1:265–275, 2002.
- JUNG, K.; LEE, B.; HAN, S. J.; RYU, J. H.; KIM, D. H. Mangiferin ameliorates scopolamine-induced learning deficits in mice. *Biol. Pharm. Bull.* 32:242-246, 2009.
- JYOTSHNA.; KHARE, P.; SHANKER, K. Mangiferin: A review of sources and interventions for biological activities. *Biofactors.* 42:504-514, 2016.
- KAFFMAN, A.; KRYSTAL, J. H. New frontiers in animal research of psychiatric illness. *Methods Mol. Biol.* 829:3–30, 2012.
- KAMBOH, A. A.; ARAIN, M. A.; MUGHAL, M. J.; ZAMAN, A.; ARAIN, Z. M; SOOMRO, A. H. Flavonoids: health promoting phytochemicals for animal production – a review. *J. Anim. Health Prod.* 3:6–13, 2015.
- KASTER, M. P.; BUDNI, J.; BINFARÉ, R. W.; et al. The inhibition of different types of potassium channels underlies the antidepressant-like effect of adenosine in the mouse forced swimming test. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 13:690–696, 2007.
- KITANAKA, N.; KITANAKA, J.; TAKEMURA, M. Inhibition of methamphetamine-induced hyperlocomotion in mice by clorgyline, a monoamine oxidase-a inhibitor, through alteration of the 5-hydroxytryptamine turnover in the striatum. *Neuroscience* 130:295–308, 2005.

- KITANAKA, N.; KITANAKA, J.; TAKEMURA, M. Modification of morphine-induced hyperlocomotion and antinociception in mice by clorgyline, a monoamine oxidase-A inhibitor. *Neurochem. Res.* 31:829–37, 2006.
- KRISHNAN, V.; NESTLER, E. J. The molecular neurobiology of depression. *Nature*, 455:894–902, 2008.
- KULKARNI, S. K.; BHUTANI, M. K.; BISHNOI, M. Antidepressant activity of curcumin: involvement of serotonin and dopamine system. *Psychopharmacol.* 201:435–42, 2008.
- KUMAR, P.; KUMAR, A. Protective effect of hesperidin and naringin against 3- nitropropionic acid induced Huntington's like symptoms in rats: possible role of nitric oxide. *Behav. Brain Res.* 206:38–46, 2010.
- LAM, R. W.; WAN, D. D.; COHEN, N. L.; KENNEDY, S. H. Combining antidepressants for treatment resistant depression: a review. *J. Clin. Psychiatry* 63:685–93, 2002.
- LAUGHREN, T. P, et al. Vilazodone: clinical basis for the US Food and Drug Administration's approval of a new antidepressant. *J. Clin. Psychiatry* 72:1166–1173, 2011.
- LEARNED, S.; GRAFF, O.; ROYCHOWDHURY, S.; MOATE, R.; KRISHNAN, K. R.; ARCHER, G. M; MODELL, J. G.; et al. Efficacy, safety, and tolerability of a triple reuptake inhibitor GSK372475 in the treatment of patients with major depressive disorder: two randomized, placebo- and active-controlled clinical trials. *J. Psychopharmacol.* 26:653–662, 2012.
- LEE, B.; TRUNG, TRINH, H.; BAE, E. A.; JUNG, K.; KIM, D. H. Mangiferin inhibits passive cutaneous anaphylaxis reaction and pruritus in mice. *Planta Med.* 75:1415–1417, 2009.
- LEE, K. H.; YEH, M. H.; KAO, S. T.; HUNG, C. M.; YEH, C. C. The inhibitory effect of hesperidin on tumor cell invasiveness occurs via suppression of activator protein 1 and nuclear factor- κ B in human hepatocellular carcinoma cells. *Toxicol. Lett.* 194:42–49, 2010.
- LEIRO, J. M.; ALVAREZ, E.; ARRANZ, J. A.; SISO, I. G.; ORALLO, F. In vitro effects of mangiferin on superoxide concentrations and expression of the inducible nitric oxide synthase, tumour necrosis factor- α and transforming growth factor- β genes. *Biochem. Pharmacol.* 65:1361–1371, 2003.
- LESCH, B.; BRÄSE, S. A Short, Atom-Economical Entry to Tetrahydroxanthenones. *Angew. Chem. Int. Ed.* 43:115–118, 2004.
- LIANG, Y.; RICHELSON, E. Triple reuptake inhibitors: next-generation antidepressants. *Prim. Psychiatry* 15:50–56, 2008.

- LU, M.; YANG, J. Z.; GENG, F.; DING, J. H.; HU, G. Iptakalim confers an antidepressant effect in a chronic mild stress model of depression through regulating neuro-inflammation and neurogenesis. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 17:1501–1510, 2014.
- LUCKI, I.; O'LEARY, O. F. Distinguishing roles for norepinephrine and serotonin in the behavioral effects of antidepressant drugs. *J. Clin. Psychiatry* 65:11-24, 2004.
- MAKARE, N.; BODHANKAR, S.; RANGARI, V. J. *Ethnopharmacol.* 78:133-133, 2001.
- MALETIC, V.; ROBINSON, M.; OAKES, T.; IYENGAR, S.; BALL, S. G.; RUSSELL, J. Neurobiology of depression: an integrated view of key findings. *Int. J. Clin. Pract.* 61:2030–2040, 2007.
- MALLO, T.; KÕIV, K.; KOPPEL, I.; RAUDKIVI, K.; UUSTARE, A.; RINKEN, A.; TIMMUSK, T.; HARRO, J. Regulation of extracellular serotonin levels and brain-derived neurotrophic factor in rats with high and low exploratory activity. *Brain. Res.* 1194:110–117, 2008.
- MAO, Q. Q.; XIAN, Y. F.; IP, S. P.; CHE, C. T. Involvement of serotonergic system in the antidepressant-like effect of piperine. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 35:1144–7, 2011.
- MARTIN, M.; QIAN, H. Major mango polyphenols and their potential significance to human health. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 7:309–319, 2008.
- MAYORGA, A. J.; DALVI, A.; PAGE, M. E.; ZIMOV-LEVINSON, S.; HEN, R.; LUCKI, I. Antidepressant-like behavioral effects in 5-hydroxytryptamine (1A) and 5-hydroxytryptamine (1B) receptor mutant mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 298:1101–7, 2001.
- MEI, X.; XU, D.; XU, S., et al. Gastroprotective and antidepressant effects of a new zinc(II)-curcumin complex in rodent models of gastric ulcer and depression induced by stresses. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 99:66-74, 2011.
- MENKOVIC, N.; JURANIC, Z.; STANOJKOVIC, T.; RAONIC-STEVANOVIC, T.; SAVIKIN, K.; ZDUNIĆ, G.; et al. Radioprotective activity of Gentianalutea extract and mangiferin. *Phytother. Res.* 24:1693-1696, 2010.
- MIDDLETON, E. JR.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T. C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol. Rev.* 52:673-751, 2000.
- MILLAN, M. J. Dual- and triple-acting agents for treating core and co-morbid symptoms of major depression: novel concepts, new drugs. *Neurother.*, 6:53–77, 2009.

- MILLAN, M. J. Multi-target strategies for the improved treatment of depressive states: conceptual foundations and neuronal substrates, drug discovery and therapeutic application. *Pharmacol. Ther.* 110:135–370, 2006.
- MORK, A.; PEHRSON, A.; BRENNUM, L. T.; MOLLER NIELSEN, S. M.; ZHONG, H.; LASSEN, A. B.; MILLER, S.; WESTRICH, L.; BOYLE, N. J.; SANCHEZ, C.; et al. Pharmacological Effects of Lu AA21004: A Novel Multimodal Compound for the Treatment of Major Depressive Disorder. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 340:666-75, 2012.
- MURUGANANDAN, S.; LAL, J.; GUPTA, P. K. Immunotherapeutic effects of mangiferin mediated by the inhibition of oxidative stress to activated lymphocytes, neutrophils and macrophages. *Toxicology*, 215:57-68, 2015.
- NESTLER, E. J.; HYMAN S. E. Animal models of neuropsychiatric disorders. *Nat. Neurosci.* 13:1161–1169, 2010.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. *J. Nat. Prod.* 75:311–335, 2012.
- NÚÑEZ-SELLÉS, A. J.; DELGADO-HERNÁNDEZ, R.; GARRIDO-GARRIDO, G.; GARCÍA-RIVERA, D.; GUEVARA-GARCÍA, M.; PARDO-ANDREU, G. L. The paradox of natural products as pharmaceuticals. Experimental evidences of a mango stem bark extract. *Pharmacol. Res.* 55:351-358, 2007.
- O’CONNOR, J. C.; ANDRE, C.; WANG, Y.; LAWSON, M. A.; SZEGEDI, S. S.; LESTAGE, J.; et al. Interferon-gamma and tumor necrosis factor- alpha mediate the upregulation of indoleamine 2,3-dioxygenase and the induction of depressive-like behavior in mice in response to bacillus Calmette-Guerin. *J. Neurosci.*, 29:4200–4209, 2009.
- OJEWOLE, J. A.; Anti-inflammatory, analgesic and hypoglycemic effects of *Mangifera indica* Linn. (Anacardiaceae) stem-bark aqueous extract. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 27:547-554, 2005.
- OTSUKA PHARMACEUTICAL CO LTD. Press release: Otsuka Pharmaceutical Co Ltd announces results from a Phase 2 study of investigational product OPC-34712 as adjunctive therapy in adults with major depressive disorder. Tokyo, Japan: Otsuka Pharmaceutical. Co. Ltd., 2011.
- PAGE, M. E.; CRYAN, J. F., SULLIVAN, A.; DALVI, A.; SAUCY, B.; MANNING, D. R.; LUCKI, I. Behavioral and neurochemical effects of 5-{4-[4(5-cyano-3-indolyl)-butyl]-butyl}-1-piperiziny]-benzofuran-2-carboxamide (EMD 68843): a combined selective inhibitor of

serotonin reuptake and 5-hydroxytryptamine _{1A} receptor partial agonist. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 302:1220-8, 2002.

PAN, S.; ZHOU, S.; GAO, S.; YU, Z.; ZHANG, S.; TANG, M.; et al. New Perspectives on How to Discover Drugs from Herbal Medicines: CAM's Outstanding Contribution to Modern Therapeutics. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, Article ID 627375:25 pages, 2013.

PANDEY, K. B.; RIZVI, S. I. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxi. Med. Cell. Longevity* 2:270–278, 2009.

PARDO-ANDREU, G. L.; DELGADO, R.; NÚÑEZ-SELLÉS, A. J.; VERCESI, A. E. Dual mechanism of mangiferin protection against iron- induced damage to 2- deoxyribose and ascorbate oxidation. *Pharmacol. Res.* 53:253–260, 2006a.

PARDO-ANDREU, G. L.; MAURMANN, N.; REOLON, G. K.; DEFARIAS, C. B.; SCHWARTSMANN, G.; DELGADO, R.; et al. Mangiferin, a naturally occurring glucoxilxanthone improves long-term object recognition memory in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 635:124-128, 2010.

PARDO-ANDREU, G. L.; PAIM, B. A.; CASTILHO, R. F.; VELHO, J. A.; DELGADO, R.; VERCESI, A. E.; OLIVEIRA, H. C. *Mangifera indica* L. extract (Vimang®) and its main polyphenol mangiferin prevent mitochondrial oxidative stress in atherosclerosis-prone hypercholesterolemic mouse. *Pharmacol. Res.* 57:332–338, 2008.

PARDO-ANDREU, G.; DELGADO, R.; VELHO, J.; INADA, N. M.; CURTI, C.; VERCESI, A. E. *Mangifera indica* L. extract (Vimang) inhibits Fe²⁺-citrate- induced lipoperoxidation in isolated rat liver mitochondria. *Pharmacol Res.* 51:427–435, 2005.

PARDO-ANDREU, G.; SÁNCHEZ-BALDOQUÍN, C.; ÁVILA-GONZÁLEZ, R.; DELGADO, R.; NAAL, Z.; CURTI, C. Fe(III) improves antioxidant and cytoprotecting activities of mangiferin. *Eur. J. Pharmacol.* 547:31–36, 2006b.

PARHIZ, H.; ROOHBAKHSH, A.; SOLTANI, F.; REZAEI, R.; IRANSHAHI, M. Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties of the Citrus Flavonoids Hesperidin and Hesperetin: An Updated Review of their Molecular Mechanisms and Experimental Models. *Phytother. Res.* 29:323–331, 2015.

PARK, S.; SIM, Y.; HAN, P.; LEE, J.; SUH, H. Antidepressant-like effect of chlorogenic acid isolated from *Artemisia capillaris* Thunb. *Animal Cells Syst.* 14:253-259, 2010.

PATHAK, L.; AGRAWAL, Y.; DHIR, A. Natural polyphenols in the management of major depression *Expert. Opin. Investig. Drugs* 7:863-80, 2013.

- PEDERSEN, A. G. Escitalopram and suicidality in adult depression and anxiety. *Int. Clin. Psychopharmacol* 20:139–143, 2005.
- PEHRSON, A. L.; SANCHEZ, C. Serotonergic modulation of glutamate neurotransmission as a strategy for treating depression and cognitive dysfunction. *CNS Spectrums* 19:121–133, 2014.
- PERRON, N. R.; BRUMAGHIM, J. L. A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell Biochem. Biophys.* 53:75-100, 2009.
- PETERSON, J. J.; DWYER, J. T.; BEECHER, G. R.; BHAGWAT, S. A.; GEBHARDT, S. E.; HAYTOWITZ, D. B.; HOLDEN, J. M. Flavanones in oranges, tangerines (mandarins), tangors, and tangelos: a compilation and review of the data from the analytical literature. *J. Food Comp. Anal.* 19:66–73, 2006.
- PIZZAGALLI, D. A. Depression, stress, and anhedonia: Toward a synthesis and integrated model. *Annu. Rev. Clin. Psychol.* 10:393-423, 2014.
- PORSOLT, R. D.; BERTIN, A.; JALFRE, M. Behavioural despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch. Internat. Pharmacodynamie Therap.* 229:327-336, 1977.
- PRINS, J.; WESTPHAL, K. G.; KORTE-BOUWS, G. A.; QUINTON, M. S.; SCHREIBER, R.; OLIVIER, B.; et al. The potential and limitations of DOV 216,303 as a triple reuptake inhibitor for the treatment of major depression: a microdialysis study in olfactory bulbectomized rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 97:444–452, 2011.
- QUIDEAU, S.; DEFFIEUX, D. C.; POUYSEGU, L. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 50:586–621, 2011.
- RAZA, S. S.; KHAN, M. M.; AHMAD, A.; ASHAFAQ, M.; KHUWAJA, G.; TABASSUM, R.; JAVED, H.; SIDDIQUI, M. S.; SAFHI, M. M.; ISLAM, F. Hesperidin ameliorates functional and histological outcome and reduces neuroinflammation in experimental stroke. *Brain Res.* 1420:93–105, 2011.
- RÉUS, G. Z.; STRINGARI, R. B.; KIRSCH, T. R.; FRIES, G. R.; KAPCZINSKI, F.; ROESLER, R.; QUEVEDO, J. Neurochemical and behavioural effects of acute and chronic memantine administration in rats: further support for NMDA as a new pharmacological target for the treatment of depression? *Brain Res. Bull.* 81:585–589, 2010.
- RICHARDSON, P. M. The taxonomic significance of C-glycosylxanthenes in flowering plants. *Biochem. Syst. Ecol.* 11:371-375, 1983.
- RICHELSON, E. Multi-modality: a new approach for the treatment of major depressive disorder. *International Journal of Neuropsychopharmacol.* 16:1433–1442, 2013.

- RIVERA, D. G.; BALMASEDA, I. H.; LEON, A. A.; HERNANDEZ, B. C.; MONTIEL, L. M.; GARRIDO, G. G.; et al. Anti-allergic properties of *Mangifera indica* L. extract (Vimang) and contribution of its glucosylxanthone mangiferin. *Journal of Pharma. and Pharmacol.* 58:385-392, 2006.
- RODEIRO, I.; DELGADO, R.; GARRIDO, G. Effects of a *Mangifera indica* L. stem bark extract and mangiferin on radiation-induced DNA damage in human lymphocytes and lymphoblastoid cells. *Cell. Prolif.* 47:48–55, 2014.
- ROOHBAKHSH, A.; PARHIZ, H.; SOLTANI, F.; REZAEI, R.; IRANSHAHI, M. Neuropharmacological properties and pharmacokinetics of the citrus flavonoids hesperidin and hesperetin. *Life Sci.* 113:1–6, 2014.
- ROSENZWEIG-LIPSON, S.; BEYER, C. E.; HUGHES, Z. A.; KHAWAJA, X.; RARARAP, S. J.; MALBERG, J. E.; RAHMAN, Z.; RING, R. H.; SCHECHTER, L. E. Differentiating antidepressants of the future: efficacy and safety. *Pharmacol. Ther.*, 113:134–153, 2007.
- ROY, A.; DE JONG, J.; LINNOILA, M. Cerebrospinal fluid monoamine metabolites and suicidal behavior in depressed patients. A 5-year follow-up study. *Arch. Gen. Psychiatry.* 46:609-12, 1989.
- RUBIO, G.; SAN, L.; LÓPEZ-MUÑOZ, F.; ALAMO, C. Reboxetine adjunct for partial or nonresponders to antidepressant treatment. *J. Affect Disord.* 81:67–72, 2004.
- RUSH, A.; TRIVEDI, M.; WISNIEWSKI, S.; NIERENBERG, A.; STEWART, J.; WARDEN, D. Acute and longer-term outcomes in depressed outpatients requiring one or several treatment steps: a STAR* report. *Am. J. Psychiatry* 163:1905–1917, 2006.
- RYU, Y. B.; CURTIS-LONG, M. J.; LEE, J. W.; KIM, J. H.; KIM, J. Y.; KANG, K. Y. Characteristic of neuraminidase inhibitory xanthenes from *Cudrania trichocarpa*. *Bioorg. Med. Chem.* 17:2744-2750, 2009.
- SÁNCHEZ, G. M.; RE, L.; GIULIANI, A.; NUNEZ-SELLES, A. J.; DAVISON, G. P.; LEON-FERNANDEZ, O. S., Protective effects of *Mangifera indica* L. extract, mangiferin and selected antioxidants against TPA-induced biomolecules oxidation and peritoneal macrophage activation in mice. *Pharmacol. Res.* 42:565-573, 2000.
- SANMUKHANI, J.; ANOVADIYA, A.; TRIPATHI, C. B. Evaluation of antidepressant like activity of curcumin and its combination with fluoxetine and imipramine: an acute and chronic study. *Acta Pol. Pharm.* 68:769-75, 2011.

- SARRIS, J.; KAVANAGH, D. J.; BYRNE, G. Adjuvant use of nutritional and herbal medicines with antidepressants, mood stabilizers and benzodiazepines. *J. Psychiatr. Res.* 44:32–41, 2010.
- SATISH, R. B. S.; SREEDEVI, M. V.; NAGESHWAR, R. B. Cytoprotective and antigenotoxic potential of mangiferin, a glucosylxanthone against cadmium chloride induced toxicity in HepG2 cells. *Food Chem. Toxicol.* 47:592-600, 2009.
- SCALBERT, A.; MANACH, C.; MORAND, C.; et al. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 45:287-306, 2005.
- SCARTEZZINI, P., SPERONI, E. Review on some plants of Indian traditional medicine with antioxidant activity. *J. Ethnopharmacol.* 71:23–43, 2000.
- SCHECHTER, L. E. The potassium channel blockers 4-aminopyridine and tetraethylammonium increase the spontaneous basal release of [³H]5-hydroxytryptamine in rat hippocampal slices. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 282:262–270, 1997.
- SCHILDKRAUT, J. J. The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *Am. J. Psychiatry* 122:509–522, 1965.
- SEPRACOR INC. Sepracor press release Update on clinical trials for SEP-225289 and LUNESTA pediatrics. Marlborough, MA: Sunovion Pharmaceuticals, 2009.
- SETHIYA, N. K.; MISHRA, S. H. Investigation of mangiferin, as a promising natural polyphenol xanthone on multiple targets of Alzheimer's disease. *J. Biologically Active Products from Nature* 4:111-9, 2014.
- SIMONYI, A.; WANG, Q.; MILLER, R.; et al. Polyphenols in cerebral ischemia: novel targets for neuroprotection. *Mol. Neurobiol.* 31:135-47, 2005.
- SOUSA, M. E.; PINTO, M. M. Synthesis of xanthenes: an overview. *Curr. Med. Chem.* 12:2447-2479.
- SOUZA, L. C.; ANTUNES, M. S.; FILHO, C. B.; DEL FABBRO, L.; DE GOMES, M. G.; GOES, A. T.; DONATO, F.; PRIGOL, M.; BOEIRA, S. P.; JESSE, C. R. Flavonoid Chrysin prevents age-related cognitive decline via attenuation of oxidative stress and modulation of BDNF levels in aged mouse brain. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 134:22-30, 2015.
- SOUZA, L. C.; DE GOMES, M. G.; GOES, A. T. R.; DEL FABBRO, L.; FILHO, C. B.; BOEIRA, S. P., JESSE, C. R. Evidence for the involvement of the serotonergic 5-HT_{1A} receptors in the antidepressant-like effect caused by hesperidin in mice. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 40:103–109, 2013.

- STAHL, S. M.; FELKER, A. Monoamine oxidase inhibitors: a modern guide to an unrequited class of antidepressants. *CNS Spectr.*, 13:855–870, 2008.
- STEINERT, J. R.; KOPP-SCHEINPFLUG, C.; BAKER, C.; et al. Nitric oxide is a volume transmitter regulating postsynaptic excitability at a glutamatergic synapse. *Neuron*. 60:642–656, 2008.
- STERU, L.; CHERMAT, R.; THIERRY, B.; SIMON, P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacol.*, 85:367-370, 1985.
- TAKIGAWA, T, ALZHEIMER, C. G protein-activated inwardly rectifying K⁺ (GIRK) currents in dendrites of rat neocortical pyramidal cells. *J. Physiol*. 517:385–390, 1999.
- THACHIL, A. F.; MOHAN, R.; BHUGRA, D. The evidence base of complementary and alternative therapies in depression. *J. Affect. Disord*. 97:23–35, 2007.
- THIERRY, B.; STERU, L.; CHERMAT, R.; SIMON, P. Searching-waiting strategy: a candidate for an evolutionary model of depression? *Behav. Neural. Biol*. 41:180-189, 1984.
- TIAN, W. X. Inhibition of fatty acid synthase by polyphenols. *Curr. Med. Chem*. 13:967-77, 2006.
- TRAN, P.; SKOLNICK, P.; CZOBOR, P.; HUANG, N. Y.; BRADSHAWM.; MCKINNEY, A.; et al. Efficacy and tolerability of the novel triple reuptake inhibitor amitifadine in the treatment of patients with major depressive disorder: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J. Psychiatr. Res*. 46:64–71, 2012.
- TRIVEDI, M. H.; RUSH, A. J.; WISNIEWSKI, S. R.; NIERENBERG, A. A.; WARDEN, D.; RITZ, L.; et al. STAR*D Study Team. 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.
- URQUIAGA, I.; LEIGHTON, F. Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. *Biol. Res*. 33:55-64, 2000.
- VIEIRA, L. M.; KIJJOA, A. Naturally-occurring xanthenes: recent developments. *Curr. Med. Chem*. 12:2413-2446, 2005.
- VISIOLI, F.; GALLI, C. The effect of minor constituents of olive oil on cardiovascular disease: new findings. *Nutr. Rev*. 56:142-7, 1998.
- VISWANADH, E. K.; RAO, B. N.; RAO, B. S. Antigenotoxic effect of mangiferin and changes in anti-oxidant enzyme levels of Swiss albino mice treated with cadmium chloride. *Hum. Exp. Toxicol*. 29:409-418, 2010.

- VYAS, A.; SYEDA, K.; AHMAD, A.; PADHYE, S.; SARKAR, F, H. Perspectives on medicinal properties of mangiferin. *Mini Rev. Med. Chem.* 12:412–25, 2012.
- WEI, Z. Q.; DENG, J. G.; YAN, L. Pharmacological Effects of Mangiferin. *Chinese Herbal Medicines.* 3:266-271, 2011.
- WESTRICH, L, PEHRSON, A, ZHONG, H.; et al. In vitro and in vivo effects of the multimodal antidepressant vortioxetine (Lu AA21004) at human and rat targets. *Int. J. Psychiatry Clin. Pract.* 5:47–47, 2012.
- WHO. Mental disorders. World Health Organization., [cited 2015 Sept 22] Available from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs396/en/>
- WICKENDEN, A. K⁺ channels as therapeutic drug targets. *Pharmacol. Ther.* 94:157-182, 2002.
- WILKINSON, A. S.; MONTEITH, G. R.; SHAW, P. N.; LIN, C. N.; GIDLEY, M. J.; ROBERTS-THOMSON, S. J. Effects of the mango components mangiferin and quercetin and the putative mangiferin metabolite norathyriol on the transactivation of peroxisome proliferator- activated receptor isoforms. *J. Agric. Food Chem.* 56:3037-3042, 2008.
- YAMADA, M.; YASUHARA, H. Clinical pharmacology of MAO inhibitors: safety and future. *Neurotoxicol.* 25:215-221, 2004.
- YANG, H. L.; CHEN, S. C.; KUMAR, K. J. S.; YU, K. N.; CHAO, D. L.; TSAI, S. Y.; HOU, Y. C.; HSE, Y. C. Antioxidant and anti-inflammatory potential of hesperetin metabolites obtained from Hesperitin-administered rat serum: Na ex vivo approach. *J. Agric. Food Chem.* 60:522–532, 2012.
- YOSHIMURA, Y.; NAKAZAWA, H.; YAMAGUCHI, F. Evaluation of the NO scavenging activity of procyanidin in grape seed by use of the TMA-PTIO/ NOC 7 ESR system. *J. Agric. Food Chem.* 51:6409-12, 2003.
- ZELLER, E. A.; BARSKY, J. In vivo inhibition of liver and brain monoamine oxidase by 1-Isonicotinyl-2-isopropyl hydrazine. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 81:459–461,1952.
- ZHANG, B. P.; ZHAO, J.; LI, S. S.; YANG, L. J.; ZENG, L. L.; CHEN, Y.; FANG, J. Mangiferin activates Nrf2-antioxidant response element signaling without reducing the sensitivity to etoposide of human myeloid leukemia cells in vitro. *APS* 35:257–266, 2014.
- ZHANG, Z. J. Therapeutic effects of herbal extracts and constituents in animal models of psychiatric disorders. *Life Sci.*, 75:1659-1699, 2004.

ZHU, X. M.; SONG, J. X.; HUANG, Z. Z.; WU, Y. M.; YU M. J. Antiviral activity of mangiferin against herpes simplex virus type 2 in vitro. *Acta. Pharmacol. Sin.* 14:452-454, 1993.

ANEXOS

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

Data: 22 de Março de 2013

PROTOCOLO N° 002/2013

Pesquisador: CRISTIANO RICARDO JESSE

Campus: Itaqui

Telefone: (55) 3433-1669

Título: AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NOS EFEITOS TIPO ANTIDEPRESSIVO E ANTI-HIPERALGÉSICO CAUSADO PELA HESPERIDINA EM CAMUNDONGOS

E-mail: cristianoricardojesse@yahoo.com.br

Após a análise detalhada do projeto de pesquisa a relatoria do CEUA-Unipampa emite parecer **FAVORÁVEL** para o cadastro do protocolo e execução do referido projeto.

**ANEXO B – 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: 023/2013

Título: **AVALIAÇÃO DOS EFEITOS E MECANISMOS DA MANGIFERINA EM
MODELOS ANIMAIS DE DEPRESSÃO**

Data da aprovação: 07/11/2013

Período de vigência do projeto: De: 11/2013 Até: 11/2016

Pesquisador: **CRISTIANO RICARDO JESSE**

Campus: **ITAQUI**

Telefone: (55) 3433-1669

E-mail: cristianoricardojesse@yahoo.com.br