

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LEONARDO DE CASTRO E SOUZA

**ALTERAÇÃO DO RITMO CIRCADIANO LOCOMOTOR E
COMPORTAMENTO TIPO-DEPRESSIVO EM MODELO DE DOENÇA DE
PARKINSON: AUSÊNCIA DE EFEITO DA AGOMELATINA**

CURITIBA

2017

LEONARDO DE CASTRO E SOUZA

**ALTERAÇÃO DO RITMO CIRCADIANO LOCOMOTOR E
COMPORTAMENTO TIPO-DEPRESSIVO EM MODELO DE DOENÇA DE
PARKINSON: AUSÊNCIA DE EFEITO DA AGOMELATINA**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Farmacologia. Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria A. B. F. Vital

CURITIBA

2017



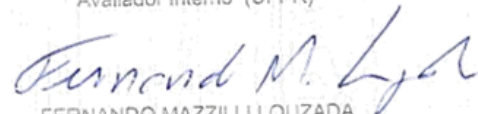
ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE MESTRADO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM FARMACOLOGIA

No dia vinte e sete de Março de dois mil e dezessete às 09:00 horas, na sala 107 - Anfiteatro, Anexo I do Setor de Ciências Biológicas - Farmacologia, foram instalados os trabalhos de arguição do mestrando LEONARDO DE CASTRO E SOUZA para a Defesa Pública de sua Dissertação intitulada AGOMELATINA NÃO PREVINE PERTURBAÇÕES NO RITMO CIRCADIANO DA ATIVIDADE LOCOMOTORA E COMPORTAMENTO TIPO-DEPRESSIVO APÓS A INFUSÃO DE 6-HIDROXIDOPAMINA NA SUBSTÂNCIA NEGRA COMO MODELO DE DOENÇA DE PARKINSON EM RATOS. A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná, foi constituída pelos seguintes Membros: MARIA APARECIDA BARBATO FRAZÃO VITAL (UFPR), ROBERTO ANDREATINI (UFPR), FERNANDO MAZZILLI LOUZADA (UFPR). Dando início à sessão, a presidência passou a palavra ao discente, para que o mesmo expusesse seu trabalho aos presentes. Em seguida, a presidência passou a palavra a cada um dos Examinadores, para suas respectivas arguições. O aluno respondeu a cada um dos arguidores. A presidência retomou a palavra para suas considerações finais e, depois, solicitou que os presentes e o mestrando deixassem a sala. A Banca Examinadora, então, reuniu-se sigilosamente e, após a discussão de suas avaliações, decidiu-se pela APROVADO do aluno. O mestrando foi convidado a ingressar novamente na sala, bem como os demais assistentes, após o que a presidência fez a leitura do Parecer da Banca Examinadora. Nada mais havendo a tratar a presidência deu por encerrada a sessão, da qual eu, MARIA APARECIDA BARBATO FRAZÃO VITAL, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos membros da Comissão Examinadora.

Curitiba, 27 de Março de 2017.


MARIA APARECIDA BARBATO FRAZÃO VITAL
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)


ROBERTO ANDREATINI
Avaliador Interno (UFPR)


FERNANDO MAZZILLI LOUZADA
Avaliador Externo (UFPR)



TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de LEONARDO DE CASTRO E SOUZA intitulada: AGOMELATINA NÃO PREVINE PERTURBAÇÕES NO RITMO CIRCADIANO DA ATIVIDADE LOCOMOTORA E COMPORTAMENTO TIPO-DEPRESSIVO APÓS A INFUSÃO DE 6-HIDROXIDOPAMINA NA SUBSTÂNCIA NEGRA COMO MODELO DE DOENÇA DE PARKINSON EM RATOS, após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO

Curitiba, 27 de Março de 2017.


MARIA APARECIDA BARRETO FRAZÃO VITAL
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)


ROBERTO ANDREATINI
Avaliador Interno (UFPR)


FERNANDO MAZZILLI LOUZADA
Avaliador Externo (UFPR)

Aos meus pais, Cássia e Sidenei, e aos meus avós, Creonice e Mário por todo o amor e afeto incondicionais, pelas lições, apoio e incentivo que me trouxeram até aqui.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof.^a Dra. Maria A. B. F. Vital, por todo o conhecimento compartilhado, pelos conselhos, amizade e compreensão.

Aos membros da banca pelo aceite e disponibilidade.

Aos funcionários e professores do departamento de Farmacologia da UFPR pelo apoio técnico e acadêmico.

Aos Professores Dr. Roberto Andreatini e Dr. Bruno Martynhak, pelas substanciais contribuições e sugestões no trabalho.

Aos amigos e colegas da Farmacologia, em especial os companheiros de laboratório Taysa B. Bassani, Joelle de M. Turnes, Meira M. Machado e Eric Moura, pelo auxílio indispensável em todas as etapas do trabalho, pelos ensinamentos e conversas, e pelo companheirismo e amizade.

À toda a minha família, especialmente aos meus pais, Cássia e Sidenei, aos meus avós, Creonice, Mário e Rosa, e a todos os meus tios e primos, por serem minhas raízes, e pelo afeto, companheirismo, apoio, sabedoria, e todos os momentos de dedicação e torcida, que tornaram a caminhada mais recompensadora.

À minha companheira amada Vitória, pelo amor, compreensão, dedicação, incentivo, lealdade, e por me apoiar incondicionalmente em todos os momentos.

Aos amigos mais próximos pelo amor fraternal e companheirismo, pelas risadas e momentos de alegria.

A cada um dos animais utilizados nos experimentos.

Ao CNPq e CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

A doença de Parkinson (DP) é uma desordem neurodegenerativa mais conhecida como uma doença motora, a DP é caracterizada pela degeneração progressiva de neurônios dopaminérgicos na substância negra parte compacta (SNpc) e consequente redução do conteúdo de dopamina (DA) no estriado. Entretanto, a neurodegeneração também causa sintomas não-motores, como alterações do ciclo sono-vigília e depressão, frequentemente relatados por pacientes com DP. Sabe-se que modelos animais da DP induzidos por toxinas podem induzir alterações dos ritmos circadianos e comportamento tipo-depressivo. Primeiro investigamos as possíveis perturbações nos ritmos circadianos da atividade locomotora em um modelo 6-hidroxidopamina (6-OHDA) intranigral da DP. Ratos apresentaram prejuízo na robustez do ritmo e acrofase na primeira semana após a infusão da toxina, e um decréscimo da amplitude do ritmo na semana 3 pós-lesão. Então, testamos a hipótese de que a agomelatina, um antidepressivo com propriedades melatonérgicas e potencial de resincronização de ritmos, poderia prevenir as alterações rítmicas observadas no modelo da 6-OHDA. A agomelatina é um agonista de receptores melatonérgicos MT₁/MT₂ e antagonista de receptores serotoninérgicos 5-HT_{2c} que representa uma abordagem inovadora para o tratamento da depressão. Porém, a agomelatina (50 mg/kg) administrada por 22 dias em ratos, piorou a robustez do ritmo e não induziu mudanças significativas nos outros parâmetros circadianos em ambos os grupos Sham e 6-OHDA que receberam o tratamento. Por fim, examinamos os efeitos da agomelatina em ratos infundidos com 6-OHDA intranigral no comportamento tipo-depressivo avaliado pelo teste de preferência por sacarose. Os animais lesados com 6-OHDA mostraram uma queda na preferência por sacarose, entretanto, a agomelatina não foi capaz de eliciar alterações significativas. Portanto, o grupo 6-OHDA tratado com agomelatina teve uma preferência por sacarose similar em comparação com o grupo 6-OHDA que recebeu veículo. Nossos resultados indicam que a agomelatina causou prejuízo nos ritmos circadianos da atividade locomotora e não diminuiu o comportamento tipo-depressivo de ratos no modelo de DP induzido por 6-OHDA intranigral.

Palavras-chave: Parkinson; Ritmos Circadianos; Atividade Locomotora; 6-OHDA; Agomelatina; Depressão.

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder mainly considered as a motor disorder, PD is characterized by the progressive degeneration of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta (SNpc) and consequent reduction in dopamine (DA) content in striatum. However, the neurodegeneration also causes a set of non-motor symptoms that are frequently reported by PD patients, such as sleep-circadian rhythm alterations and depression. It is known that toxin-based animal models of PD can induce circadian rhythms alterations and depressive-like behavior. We first investigated the possible disturbances on circadian rhythms of locomotor activity in a 6-hydroxydopamine (6-OHDA) intranigral rat model of DP. Rats showed an impairment in the robustness of the rhythm and acrophase on the first week after the toxin infusion, and a decrease in rhythm amplitude in week 3 following the lesion. Then we hypothesized agomelatine, an antidepressant with melatonergic properties and potential to resynchronize disturbed rhythms, could prevent the observed rhythm alterations in the 6-OHDA model. Agomelatine is a melatonin MT1/MT2 receptor agonist and a serotonin 5-HT_{2c} receptor antagonist that represents an innovative approach to treating depression. However, agomelatine (50mg/kg) administered for 22 days in rats worsened the rhythm robustness and did not induce significant changes in the other circadian parameters in both Sham and 6-OHDA groups that received the treatment. Finally, we examined the effects of agomelatine in rats infused with 6-OHDA intranigral on depressive-like behavior evaluated by the sucrose preference test. The animals lesioned with 6-OHDA showed a decrease in sucrose preference, however, agomelatine was not capable of elicit significant alterations. Thus, the group infused with 6-OHDA and treated with agomelatine had a similar sucrose preference in comparison with the group infused with 6-OHDA that receive vehicle. Our findings indicate that agomelatine worsened circadian locomotor rhythm and was not able to reverse the depressive-like behavior of rats in the PD model induced by 6-OHDA intranigral.

Key-words: Parkinson; Circadian Rhythm; Locomotor Activity; 6-OHDA; Agomelatine; Depression.

LISTA DE ABREVIATURAS

6-OHDA - 6-hidroxidopamina
5-HT – Serotonina
AC - Adenilil ciclase
ATP - Adenosina trifosfato
BDNF - Fator neurotrófico derivado do cérebro
CF - Córtex frontal
CPF - Córtex pré-frontal
DA – Dopamina
DAT - Transportador de dopamina
DP- Doença de Parkinson
GSH – Glutathiona reduzida
HC - Hipocampo
MAO - Monoamina oxidase
MPP⁺ - 1-metil-4-fenilpiridina
MPTP - 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
NA - Noradrenalina
NET - Transportador de noradrenalina
NSQ - Núcleo supraquiasmático
PET - Tomografia por emissão de pósitrons
REM - Movimento rápido dos olhos
RNS - Espécies reativas de nitrogênio
ROS - reativas de oxigênio
SERT - Transportador de serotonina
SN - Substância negra
SNpc - Substância negra parte compacta
TH - Tirosina hidroxilase (TH)
UPS - Ubiquitina-Proteassoma
VTA - Área tegmental ventral

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO À DOENÇA DE PARKINSON	7
1.1 PATOLOGIA DA DP.....	7
1.2 MECANISMOS DE NEURODEGENERAÇÃO.....	8
1.3 SINTOMAS NÃO MOTORES DA DP	10
1.4 RITMOS CIRCADIANOS E DP	11
1.5 DEPRESSÃO E DP.....	15
1.6 MELATONINA.....	16
1.7 AGOMELATINA	19
1.8 MODELOS DA DP 6-OHDA	22
2 OBJETIVOS	24
2.1 OBJETIVO GERAL	24
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
3 ARTIGO CIENTÍFICO	24
4 CONCLUSÕES	59
4.1 CONCLUSÃO GERAL.....	59
4.2 CONCLUSÕES ESPECÍFICAS.....	59
REFERÊNCIAS	60

1 INTRODUÇÃO À DOENÇA DE PARKINSON

A doença de Parkinson (DP) é a segunda doença neurodegenerativa mais comum mundialmente, afetando aproximadamente 1% da população com mais de 65 anos (GROVER et al., 2015). Prejuízo nas funções motoras é a característica pela qual a DP é mais conhecida. Os sintomas principais são bradicinesia, rigidez, tremor, e instabilidade postural com início assimétrico (DEXTER; JENNER, 2013). Entretanto, um grande número de pacientes sofre também de sintomas de caráter não-motor, como distúrbios do ciclo sono-vigília, desordens psiquiátricas, e disfunções autonômicas, que são causas importantes de incapacitação na população com DP, tendo um impacto negativo significativo na qualidade de vida dos pacientes e cuidadores (VIDENOVIC; GOLOMBEK, 2013).

Atualmente, a DP permanece incurável, e os tratamentos continuam sintomáticos. Ainda que as terapias utilizadas para os distúrbios motores ofereçam várias abordagens farmacológicas e não-farmacológicas bastante efetivas, os tratamentos dos sintomas não-motores são desafiadores e muito pouco estabelecidos. O primeiro e mais efetivo tratamento sintomático para o déficit dopaminérgico é a levodopa (OERTEL; SCHULZ, 2016).

1.1 PATOLOGIA DA DP

A perda de neurônios dopaminérgicos na substância negra parte compacta (SNpc) e a subsequente perda do conteúdo de dopamina (DA) no estriado (caudado e putâmen) são responsáveis pelos distúrbios dos movimentos corporais voluntários. O diagnóstico neuropatológico da DP requer a detecção da diminuição marcante de neurônios dopaminérgicos da via nigroestriatal e a presença de Corpos de Lewy, inclusões citoplasmáticas proteicas intraneurais. O papel dos Corpos de Lewy na patogênese continua desconhecida, mas sabe-se que seu maior componente são moléculas da proteína α -sinucleína com conformação errática (DEXTER; JENNER, 2013).

A sintomatologia motora tem início quando já ocorreu cerca de 80% de depleção da DA no putâmen, e 60% dos neurônios da SNpc foram perdidos. Os

neurônios dopaminérgicos da via mesolímbica, cujos corpos celulares estão na área tegmental ventral (VTA), que é adjacente à SNpc, são muito menos afetados na DP. Como a via mesolímbica projeta os seus axônios para o caudado, há muito menos depleção de DA neste núcleo (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003). Além do sistema dopaminérgico, outras áreas podem ser afetadas na DP, por exemplo, neurônios noradrenérgicos no locus coeruleus, neurônios serotoninérgicos no núcleo da rafe, e em estágios mais avançados partes do córtex límbico e neocórtex também são atingidas (TRUONG et al., 2008; SCHINTU et al., 2012).

A causa da DP na maioria dos pacientes é imprecisa ou desconhecida. (TANNER, 2010). A DP geralmente se desenvolve sem causas genéticas, sendo chamada de esporádica ou idiopática, e são poucas as causas ambientais conhecidas que podem desencadear a doença. Em casos mais raros a DP é hereditária, e algumas mutações genéticas envolvidas são conhecidas (LEES et al., 2009).

1.2 MECANISMOS DE NEURODEGENERAÇÃO

Qualquer que seja o dano inicial que provoca a neurodegeneração, duas hipóteses quanto a patogênese da DP tem destaque. Uma delas postula que mudanças na conformação e agregação de proteínas contribuem para a morte dos neurônios dopaminérgicos na SNpc, enquanto a outra propõe que a razão para a morte neuronal é a disfunção mitocondrial e o consequente estresse oxidativo, incluindo espécies dopaminérgicas oxidadas. Esses fatores patogênicos não são mutuamente exclusivos, e podem interagir (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003); como exemplo, dados de sistemas de modelos celulares e estudos bioquímicos *in vitro* mostram que é provável que processos oxidativos e nitrativos estabilizem a formação de agregados de α -sinucleína de uma maneira resistente à proteólise, assim permitindo a formação de agregados proteicos altamente insolúveis (ISCHIROPOULOS; BECKMAN, 2003).

Diversos estudos com tecido cerebral *post-mortem* de pacientes com DP corroboram a hipótese de que o estresse oxidativo e nitrativo estão envolvidos com a neurodegeneração de neurônios dopaminérgicos. O que se observa são níveis menores de glutatona reduzida (GSH) na substância negra (SN), além de

um aumento de peroxidação lipídica e oxidação proteica (DANIELSON; ANDERSEN, 2008). Essa neurodegeneração seletiva na DP parece indicar que os neurônios dopaminérgicos da SNpc são mais vulneráveis às espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS), mas a razão para tal vulnerabilidade ainda não é muito clara. Uma explicação possível é a oxidação da dopamina. A DA é usada como neurotransmissor nesses neurônios, e é gerado peróxido de hidrogênio (H_2O_2) como subproduto do catabolismo de DA pela monoamina oxidase (MAO). Além disso, a oxidação da DA pode resultar na formação de dopamina quinona, que pode modificar proteínas diretamente. Entretanto, vários neurônios dopaminérgicos em outras áreas como a VTA não são afetados na DP, sugerindo que a degeneração dos neurônios dopaminérgicos na SNpc pode envolver fatores que não estão relacionados ao metabolismo da DA. Todavia, o mecanismo que explica o aumento do estresse oxidativo em pacientes da DP e eventualmente leva à degeneração dos neurônios dopaminérgicos ainda não é conclusivo (TSANG; CHUNG, 2009)

As evidências do papel da disfunção mitocondrial na degeneração dopaminérgica na DP se apresentam através de estudos bioquímicas e histológicas, onde foi demonstrado que na SNpc de pacientes com DP existe um defeito no complexo I da cadeia respiratória (OLANOW, 2007). A descoberta da neurotoxicidade da 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) através do seu metabólito, o íon 1-metil-4-fenilpiridina (MPP^+), identificou um papel da inibição do complexo I na patogênese que é compartilhado por outras substâncias tóxicas aos neurônios dopaminérgicos, incluindo o pesticida rotenona. A ligação do MPP^+ interrompe o fluxo de elétrons na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, levando à formação de ROS, principalmente de radicais superóxido (PRZEDBORSKI, 2005). Essa inibição do complexo I leva, além do aumento de ROS, a uma diminuição da produção de adenosina trifosfato (ATP), conseqüentemente impedindo a sobrevivência celular (DANIELSON; ANDERSEN, 2008). Porém, essa disfunção mitocondrial ocorre em menos de 40% dos pacientes com DP (OLANOW, 2007).

A exata função da α -sinucleína e o mecanismo pelo qual ela se agrega para formar oligômeros solúveis, protofibrilas solúveis e fibrilas insolúveis (a forma contida nos Corpos de Lewy) é desconhecido. Ainda é controverso se as fibrilas contribuem para a patologia da doença ou se essa forma da proteína age

como um dissipador para eliminar os oligômeros e/ou protofibrilas solúveis. Rotenona, paraquat e agentes de nitração têm demonstrado causar um aumento da agregação de α -sinucleína (DANIELSON; ANDERSEN, 2008).

Existem vias celulares que protegem a célula contra defeitos e agregação de proteínas. Por exemplo, proteínas danificadas são degradadas via Sistema Ubiquitina-Proteassoma (UPS) ou via degradação lisossomal (autofagia). Além disso, existem diferentes chaperonas como a HSP70 que ajudam no conserto de proteínas mal dobradas. Estudos têm indicado que o estresse oxidativo, além de induzir a agregação proteica, pode também prejudicar os sistemas celulares que protegem contra o mal dobramento e a agregação de proteínas (TSANG; CHUNG, 2009).

Outros mecanismos patogênicos da DP também são conhecidos. A inflamação é um desses mecanismos, e estudos imunohistoquímicos têm mostrado micróglia ativada, aumento da expressão de citocinas, e *up-regulation* de fatores inflamatórios associados no estriado e fluido cérebro-espinhal de pacientes com DP (OLANOW, 2007). Agentes que promovem a formação de citocinas podem induzir a morte de células dopaminérgicas tanto em culturas de tecido como em sistemas de modelos in vivo, e agentes anti-inflamatórios podem proteger neurônios dopaminérgicos dos efeitos tóxicos do MPTP, rotenona e 6-hidroxidopamina (6-OHDA) em roedores (GRADOWSKI et al., 2014; SANTIAGO et al., 2015). Também são implicados no processo de neurodegeneração da DP mecanismos como a apoptose, e excitotoxicidade (TSANG; CHUNG, 2009).

1.3 SINTOMAS NÃO MOTORES DA DP

Os sintomas de caráter não-motor da DP são sub-reconhecidos e, conseqüentemente sub-tratados, mesmo com uma alta prevalência. Alguns dos sintomas não-motores podem preceder a expressão dos sintomas motores em mais de uma década (CHAUDHURI; SCHAPIRA, 2009). São descritos sintomas neuropsiquiátricos (e.g., depressão, demência), distúrbios do sono (e.g., problemas no sono REM - movimento rápido dos olhos), sintomas autonômicos (e.g., problemas urinários), gastrointestinais (e.g., constipação), sensoriais (e.g., dor), entre outros. Sintomas como disfunção do sono, depressão e ansiedade são mais comuns em pacientes com DP comparado com controles de mesma

idade, e estão presentes durante todos os estágios da doença, mas a frequência aumenta com a progressão da doença (MUZERENGI et al., 2007).

É sugerido que os sintomas não-motores tenham uma patogênese comum com a DP ou possivelmente ocorram devido aos medicamentos usados para o tratamento da DP, ou ainda que sejam uma reação à parte física da doença e suas consequências. Na maioria dos casos é mais comum que a origem seja multifatorial. Em termos de patogênese comum, hipóteses envolvendo vários neurotransmissores como dopamina, serotonina e acetilcolina/noradrenalina têm sido reportadas em várias desordens psiquiátricas, por exemplo (GROVER et al., 2015).

Sugere-se que a deposição dos Corpos de Lewy e a disfunção neuronal (mas não a morte) começa no bulbo olfatório e na parte inferior do tronco encefálico (CHAUDHURI; SCHAPIRA, 2009). Desde o início da DP, o dano à substância negra é consistentemente acompanhado por uma patologia extranigral. Essas lesões extranigrais resultam em um prejuízo do sistema límbico, de funções corticais telencefálicas, e mecanismos regulatórios autonômicos. Portanto, não é exclusividade dos neurônios dopaminérgicos as mudanças patológicas. Ao invés disso, um número significativo de outras células nervosas, entre elas neurônios glutamatérgicos, colinérgicos, triptaminérgicos, GABAérgicos, noradrenérgicos, e adrenérgicos apresentam sérios danos ao citoesqueleto (BRAAK; BRAAK, 2000).

Entretanto, é preciso ressaltar o fato de que sintomas não-motores não são necessariamente sinônimos de sintomas não-dopaminérgicos (CHAUDHURI; SCHAPIRA, 2009). Como exemplo, alguns estudos têm sugerido que agonistas dopaminérgicos, como o antiparkinsoniano pramipexol, são efetivos no tratamento da depressão na DP (AARSLAND et al., 2011)

1.4 RITMOS CIRCADIANOS E DP

Disfunções do sono, inicialmente reconhecidas por James Parkinson em sua monografia "*An Essay on the Shaking Palsy*", são uma das mais comuns e notáveis manifestações não motoras da DP, acometendo cerca de 90% dos pacientes (WILLISON et al., 2013), que podem desenvolver, entre outros

sintomas, sonolência excessiva durante o dia, insônia, prejuízo no sono REM (LIMA, 2013).

Os distúrbios de sono em pacientes com DP ocorrem devido à uma série de fatores, incluindo manifestações motoras da doença durante o sono, depressão, ansiedade, perturbações do sono relacionadas a idade, efeitos adversos de drogas usadas para o tratamento dos sintomas motores, possivelmente disfunção circadiana, e de forma mais importante a neurodegeneração que ocorre em função da própria doença (TARGA et al., 2016).

O ciclo sono-vigília é um exemplo de processo com ritmo circadiano. Os ritmos circadianos são ciclos fisiológicos e comportamentais com aproximadamente 24 h de periodicidade. Em humanos e outros mamíferos, o sistema circadiano é composto por uma rede de osciladores coordenados pelo relógio biológico endógeno no núcleo supraquiasmático (NSQ), localizado no hipotálamo (VIDENOVIC; WILLIS, 2016).

Os ritmos circadianos são gerados primariamente a nível celular, porém, eles precisam ser pareados a sistemas multicelulares osciladores mais estáveis (HARDELAND et al., 2011). Neurônios no NSQ recebem informação luminosa de células ganglionares fotossensíveis da retina que expressam o fotopigmento, melanopsina. Os axônios dessas células ganglionares fazem uma conexão sináptica direta com células do NSQ. Esses neurônios no NSQ integram a informação fótica com outras pistas temporais para gerar oscilações circadianas robustas que são sincronizadas com o ambiente. As projeções do NSQ vão principalmente para outras regiões hipotalâmicas, que formam um núcleo de retransmissão. Esse núcleo, por sua vez, se projeta ao longo do sistema nervoso e do sistema endócrino, proporcionando múltiplas vias, pelas quais as projeções do NSQ transmitem informações temporais sobre o ambiente para o resto do cérebro e do corpo (WILLISON et al., 2013).

Apesar do ciclo sono-vigília representar o ritmo circadiano mais aparente, outros processos como a temperatura corporal, secreção de hormônios, performance cognitiva, função cardiometabólica e o humor, também são reguladas pelo NSQ (VIDENOVIC et al., 2014).

Quase todos os comportamentos naturais em que a dopamina está envolvida exibem ritmicidade diária ou circadiana (e.g., alimentação, ciclo sono-

vigília, locomoção, motivação). Portanto, variações dia-noite na neurotransmissão dopaminérgica provavelmente estão envolvidas com esses comportamentos (MENDOZA; CHALLET, 2014).

Estudos têm demonstrado o envolvimento da neurotransmissão dopaminérgica em vários níveis da biologia relacionada aos ritmos circadianos, a começar pela via de absorção fóptica até o relógio endógeno. Na retina, a dopamina tem um papel importante na adaptação à luz, e também regula a expressão rítmica de melanopsina nas células ganglionares fotossensíveis da retina. Determinadas células dopaminérgicas da retina expressam ritmos circadianos em genes “*clock*”, que são componentes centrais do relógio molecular, como os genes *Per*, *Cry*, *Clock* e *Bmal1*, que ajudam a antecipar mudanças na iluminação do ambiente e adaptar o tecido para uma resposta fóptica ótima (DORENBOS et al., 2007). A DA também afeta parâmetros circadianos de certos genes “*clock*”, provavelmente pela ação de receptores dopaminérgicos D1 na retina (RUAN et al., 2008).

Um corpo de evidências sugere que os genes “*clock*” têm um papel no metabolismo dopaminérgico. O gene *Clock* regula a atividade dopaminérgica na VTA, e flutuações circadianas nos níveis de DA extracelular têm sido reportadas no estriado e no núcleo accumbens. De forma recíproca, a dopamina (atuando via receptores D1 e D2) regula a expressão de genes “*clock*” no estriado dorsal (HOOD et al., 2010). A atividade e o metabolismo dopaminérgico podem ser considerados um *output* do relógio circadiano (VIDENOVIC; GOLOMBEK, 2013).

Ritmicidade na neurotransmissão dopaminérgica tem sido descrita em várias regiões do cérebro, incluindo estruturas mesolímbicas. Uma evidência adicional para o papel da DA no sistema circadiano, vem de lesões neuroquímicas com injeções 6-hidroxidopamina (6-OHDA), que perturba os padrões circadianos normais do comportamento e expressão de *Per2*, outro gene “*clock*” importante; e essas alterações podem ser parcialmente revertidas com a administração de L-DOPA (GRAVOTTA et al., 2011). Em particular, o metabolismo de DA exhibe um ritmo diurno em regiões estriatais, relacionado a variações cíclicas na expressão do transportador de dopamina (DAT), de receptores dopaminérgicos e da enzima tirosina hidroxilase (enzima passo limitante na produção de dopamina) (MCCLUNG, 2007a).

Apesar de ter-se que as funções de promoção da vigília são independentes do sistema nigroestriatal, células dopaminérgicas originadas na SN, e na VTA, interagem com diversas regiões cerebrais envolvidas com a regulação do ciclo sono-vigília, incluindo o núcleo da rafe, o locus coeruleus, o hipotálamo, o prosencéfalo basal, além do tálamo (VIDENOVIC; GOLOMBEK, 2013), regiões afetadas na DP (TARGA et al., 2016).

De fato, são observados comumente em pacientes com DP ciclos de atividade-reposo perturbados, mudanças nos ritmos de pressão sanguínea e frequência cardíaca, problemas no sono e vigília, e oscilações de humor e comportamento (FIGURA 1). Além disso, a intensidade e frequência de vários sintomas motores e não-motores da DP exibem oscilações diárias. Da mesma forma, resposta às drogas antiparkinsonianas, performance visual, disfunções autonômicas, e o padrão de secreção de hormônios endócrinos variam durante o dia (LI et al., 2017).

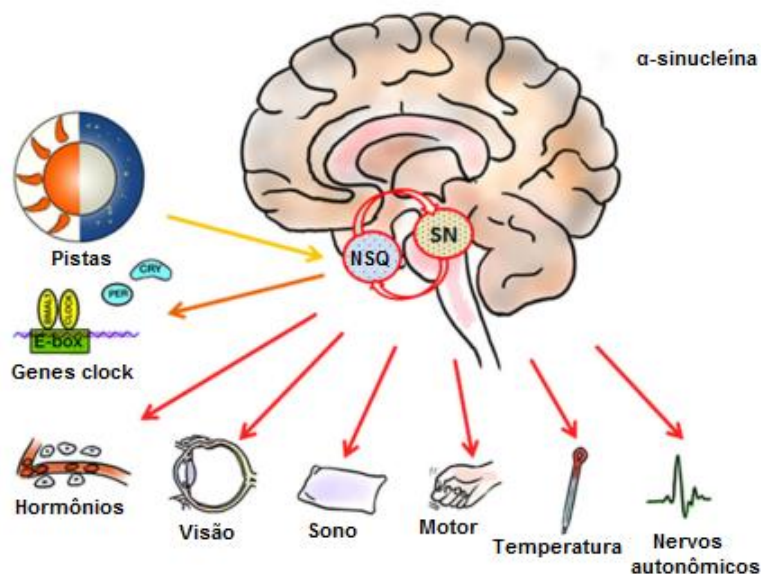


FIGURA 1 – Esquema simplificado do sistema circadiano perturbado na DP. Pistas reduzidas são obtidas do ambiente em pacientes com DP, devido a acuidade visual e habilidade motora prejudicadas. Simultaneamente, os sinais do NSQ estão deturpados em função da deposição de α -sinucleína. Como resultado, os ritmos perturbados dos genes *clock* no NSQ prejudicam a modulação de outros osciladores centrais e periféricos, o que pode ter consequências negativas em funções fisiológicas e comportamentais. NSQ, núcleo supraquiasmático; SN, substância negra. Adaptado de: LI et al. (2017).

1.5 DEPRESSÃO E DP

Distúrbios nos ritmos circadianos têm sido associados com transtornos de humor (MARTYNHAK et al., 2011). Alguns dos principais sintomas da depressão maior apresentam perturbação do ritmo circadiano em sua expressão clínica, como o humor diurno e outras variações sintomáticas (BERARDIS et al., 2011). Além disso, a depressão é frequentemente acompanhada por alterações nos ritmos circadianos de comportamento, sono, temperatura corporal e de secreção de cortisol e outros hormônios (DE BODINAT et al., 2010; NORMAN, 2010).

Na doença de Parkinson, a depressão é outro sintoma não-motor comum, e se apresenta em aproximadamente 30-50% dos pacientes, os incapacitando de forma importante (OSSOWSKA; LORENC-KOCI, 2013). De fato, a relação entre depressão e DP segue um ciclo vicioso, sendo que uma aumenta o risco de desenvolver a outra. Pacientes com DP têm mais risco de desenvolver depressão do que a população em geral. E pacientes depressivos têm 3,24 vezes mais chances de desenvolver DP em comparação a pacientes controle (GROVER et al., 2015). Estudos mostram uma correlação fraca entre a depressão e a severidade da DP, o que sugere que a depressão não é uma reação psicológica à DP, mas sim parte da DP. Além disso, a relativa ausência do sentimento de culpa, vergonha, ou tristeza também indicariam que a depressão não é uma reação psicológica direta (LIEBERMAN, 2006).

Mecanismos que estão envolvidos com a depressão maior são tradicionalmente relacionados a distúrbios na transmissão de noradrenalina (NA), serotonina (5-HT) e DA em estruturas límbicas e corticais. Já os mecanismos neurais relacionados à depressão na DP são menos claros. Como dito, as alterações patológicas na DP não afetam somente estruturas envolvidas nas funções motoras, mas também áreas límbicas, e regiões corticais interconectadas com essas áreas, que regulam processos emocionais e de memória. Os neurônios noradrenérgicos no locus coeruleus, e os serotonérgicos na rafe se degeneram ao longo do curso da DP, o que leva à diminuição dos níveis de 5-HT e NA em regiões inervadas por essas estruturas. Além disso, na DP não apenas os neurônios dopaminérgicos são afetados, mas também, em

um grau menos, os neurônios da VTA (origem das vias mesolímbica/mesocortical) (OSSOWSKA; LORENC-KOCI, 2013).

Em um estudo de autópsia, pacientes com DP e depressão no momento de seu falecimento mostraram uma perda maior de neurônios serotoninérgicos no núcleo da rafe em comparação aos pacientes com DP não depressivos. Ainda, estudos post-mortem de amostras de tecido cerebral de pacientes com DP mostraram que os níveis estriatais de ambos 5-HT e seu transportador SERT estavam diminuídos em 30% e 66% respectivamente, em pacientes com DP comparados a controles saudáveis (AARSLAND et al., 2011). Investigações usando técnicas funcionais de imagem com tomografia por emissão de pósitrons (PET) realizadas na fase motora da DP mostrou uma correlação entre a deficiência na neurotransmissão de DA e NA em estruturas límbicas e a severidade da depressão. Esse estudo ainda mostrou decréscimos nos níveis de transportadores de DA e NA (DAT e NET) no locus coeruleus e várias regiões do sistema límbico (OSSOWSKA; LORENC-KOCI, 2013).

Ainda que terapias antidepressivas sejam comumente usadas na DP, não existem dados suficientes de eficácia e segurança. Além disso, alguns pesquisadores têm reportado um aumento dos sintomas parkinsonianos após o tratamento com antidepressivos em pacientes com DP deprimidos, enquanto outros reportam uma melhora de ambos os sintomas motores e depressivos (AVILA et al., 2015). Em função da ligação entre depressão e distúrbios nos ritmos circadianos existe o interesse em desenvolver um antidepressivo que possua propriedades cronobióticas. Como o neuro-hormônio melatonina exerce esses efeitos cronobióticos, foram feitos esforços nos últimos anos para estudar as propriedades dessa molécula endógena, bem como agonistas de receptores melatonérgicos (BERARDIS et al., 2011).

1.6 MELATONINA

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) é um neuro-hormônio secretado principalmente pela glândula pineal, a partir do aminoácido triptofano, e possui grande importância nos ritmos biológicos dos vertebrados. O ritmo circadiano de alta amplitude, e pico noturno da melatonina pineal, que é liberada na circulação e no cérebro, é a base para os efeitos cronobióticos desse neuro-

hormônio. O seu ritmo circadiano funciona como uma mensagem codificada para a duração da fase escura nos mamíferos. Essa mensagem não é apenas transmitida para várias funções neuronais e vegetativas “*downstream*”, mas também participa dos mecanismos de restabelecimento que sincronizam o NSQ com o ritmo externo (ambiental) de 24 horas (HARDELAND et al., 2011).

A melatonina apresenta diferentes consequências funcionais dependendo da espécie, ela está associada com atividade física e despertar em animais noturnos; e com sono e repouso em animais diurnos. Em consequência, a administração de melatonina promove o sono em humanos, mas não em ratos e camundongos (PANDI-PERUMAL et al., 2008).

Esse neuro-hormônio tem ação altamente pleiotrópica. As principais funções fisiológicas da melatonina envolvem o controle da ritmicidade circadiana e sazonal (HARDELAND et al., 2011). Há evidências demonstrando o complexo papel da melatonina em modular um grande número de outros processos fisiológicos, incluindo a iniciação do sono, ações anti-excitatórias, o controle da reprodução sazonal, fisiologia da retina, oncogênese e crescimento de tumores, controle vaso motor, função adrenal, imunomodulação incluindo propriedades antiinflamatórias, antioxidantes e metabolismo energético, influenciando o fluxo mitocondrial de elétrons, a biogênese e homeostase mitocondrial (LEON et al., 2004; HARDELAND et al., 2011).

Os receptores melatonérgicos foram identificados em vários tecidos com diferentes perfis de expressão. Em relação ao sistema nervoso central (SNC), além das áreas de maior expressão, o NSQ e a pars tuberalis da glândula pineal, receptores MT1 e MT2 foram encontrados, tanto em roedores como em humanos, no córtex pré-frontal (CPF) e no córtex frontal (CF), córtex cerebelar, hipocampo (HC), gânglios da base, substância negra, VTA, núcleo accumbens, retina e tálamo (TARDITO et al., 2012).

A busca por novos fármacos para o tratamento da depressão levou a diversos ensaios pré-clínicos com a melatonina, pois como citado, acredita-se que a dessincronização dos ritmos circadianos também está envolvida na patofisiologia da depressão. Em modelos animais a melatonina vem demonstrando de forma significativa um efeito tipo-antidepressivo. Em humanos, porém, o tratamento com o hormônio parece melhorar o sono mas tem efeitos modestos nos sintomas depressivos (LIU et al., 2016). Uma explicação possível

é que a melatonina possui uma meia-vida muito curta, aproximadamente 45 minutos. Quando apenas o efeito cronobiótico é desejado, a melatonina geralmente é totalmente efetiva. Entretanto, se a restituição de um pico noturno completo for desejado, o resultado clínico ainda é relativamente pobre (CAROCCI et al., 2014).

Foi demonstrado que ocorre uma diminuição dos receptores melatonérgicos na amígdala e na substância negra de pacientes com DP, e essa redução coexiste com os distúrbios de sono associados à DP (SRINIVASAN et al., 2011). Ao mesmo tempo, vários resultados promissores suportam o papel protetor da melatonina em diversas doenças relacionadas ao estresse oxidativo, como a doença de Alzheimer e a própria DP. Essas ações neuroprotetoras são atribuídas às propriedades antioxidantes diretas e indiretas (CAROCCI et al., 2014). Muitos modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* têm contribuído para demonstrar o papel da melatonina como um eficiente protetor contra várias ROS, por exemplo, o radical hidroxila, o ânion peroxinitrito, o ânion superóxido, e oxigênio singlete (POEGGELER et al., 1994). A melatonina também mostrou aumentar a produção e a atividade de várias enzimas antioxidantes, incluindo a superóxido dismutase, glutatona peroxidase, glutatona redutase, catalase e glicose-6-fosfato desidrogenase (CAROCCI et al., 2014).

A melatonina tem demonstrado diminuir a dificuldade para iniciar o sono e a atividade durante a noite em idosos. Em um estudo recente com 40 pacientes com DP e perturbação do sono, a administração de 5 mg ou 50 mg de melatonina diariamente por duas semanas resultou em uma melhora similar nos distúrbios de sono subjetivo, qualidade do sono e sonolência diurna. Ramelteon, um novo agente hipnótico aprovado para a insônia relacionada à iniciação do sono, que possui um novo mecanismo de ação via receptores de melatonina, pode ser benéfico na DP mas ainda não foi formalmente estudado (VIDENOVIC; GOLOMBEK, 2013).

Um trabalho recente do nosso grupo investigou os efeitos de um tratamento prolongado com melatonina em ratos previamente expostos à rotenona. Os animais foram tratados por 10 dias com rotenona (2,5 mg/kg), 24 horas depois, foram tratados com melatonina (10 mg/kg) durante 28 dias. No último dia a rotenona mostrou comportamento tipo-depressivo no teste de natação forçada, diminuição de dopamina (DA) estriatal e reduziu a

imunoreatividade à tirosina hidroxilase (TH) na SNpc. Verificou-se que o tratamento prolongado com melatonina após a lesão dopaminérgica produziu efeito tipo-antidepressivo, restabeleceu os níveis de DA estriatal e parcialmente restabeleceu a imunoreatividade à TH dos neurônios nigrais (BASSANI et al., 2014).

1.7 AGOMELATINA

Nesse contexto, os estudos e dados promissores motivaram o desenvolvimento do primeiro antidepressivo que interage com receptores de melatonina, a agomelatina (DE BODINAT et al., 2010). A agomelatina é uma molécula análoga à melatonina, e seus efeitos têm sido extensivamente investigados. A agomelatina (N(2-(7-metoxi-1-naftil)etil) acetamida) demonstra uma grande afinidade pelos subtipos de receptores melatonérgicos MT1 e MT2 clonados de humanos, afinidade comparável com a da melatonina. Ao passo que a afinidade pelos receptores 5-HT_{2c} é moderada (RACAGNI et al., 2011). Sua meia-vida é de 2 a 3h (GUARDIOLA-LEMAITRE et al., 2014).

Os receptores 5-HT_{2c} são expressos exclusivamente no SNC, e tem uma ampla distribuição: o RNA mensageiro (RNAm) para o receptor 5-HT_{2c} foi encontrado no córtex frontal, hipocampo, núcleo hipotalâmico, VTA, substância negra, bem como no estriado e no núcleo accumbens. A maior parte desses receptores são localizados pós-sinapticamente nos terminais serotoninérgicos sobre neurônios GABAérgicos, glutamatérgicos e dopaminérgicos, onde agem como heteroreceptores somatodendríticos. Além disso, receptores 5-HT_{2c} são expressos por interneurônios GABAérgicos no núcleo da rafe e nas vias de DA e NA ascendentes. Por conseguinte, a liberação tônica de serotonina excita neurônios GABAérgicos no tronco encefálico, causando inibição tônica tanto de DA como NA no córtex pré-frontal através de receptores 5-HT_{2c} (TARDITO et al., 2012).

Vários agentes antidepressivos clinicamente ativos, como a mianserina, mirtazapina, e amitriptilina, se comportam como antagonistas 5-HT_{2c}, enquanto que a administração prolongada de inibidores seletivos da recaptção de 5-HT resulta na *down-regulation* desses receptores (MILLAN et al., 2003). Dados clínicos suportam a hipótese de que os antidepressivos aliviam a depressão em

parte através de uma redução na sinalização dos receptores 5-HT_{2c}. De forma mais geral, mudanças adaptativas da neurotransmissão da 5-HT parecem desempenhar papéis fundamentais dentre as ações centrais das drogas antidepressivas (HANOUN et al., 2004)

A agomelatina se afasta da hipótese tradicional monoaminérgica da farmacologia da depressão. Seu perfil farmacológico lhe dá a habilidade de resincronizar ritmos circadianos alterados experimentalmente em roedores e também em humanos; essa ação cronobiótica é mediada pelos receptores de melatonina (ZUPANCIC; GUILLEMINAULT, 2006). Redman et al. (1995) estudaram o efeito da agomelatina em um modelo de avanço de fase em ratos, e observaram que os animais arrastaram o ritmo circadiano de forma similar a melatonina (REDMAN et al., 1995). Martinet et al. (1996) demonstraram que a agomelatina causa o arrastamento dos ritmos circadianos de ratos em livre-curso em um grau parecido ao da melatonina (MARTINET et al., 1996). Van Reeth et al. (1997) mostraram que a droga melhorou a habilidade de hamsters de idade avançada para o deslocamento de ritmo em comparação a animais controle (VAN REETH et al., 1997). Mairesse et al. (2013) observaram que a agomelatina levou a uma correção da arquitetura do sono, e restauração da homeostase circadiana em um modelo de restrição pré-natal em ratos adultos (MAIRESSE et al., 2013).

A agomelatina já demonstrou eficácia antidepressiva e ansiolítica em estudos pré-clínicos e clínicos (DEMYTTENAERE, 2011). Em roedores, a agomelatina apresentou efeito tipo-antidepressivo significativo em modelos de depressão como o teste do nado forçado, estresse crônico moderado, desamparo aprendido, e também em um modelo que induz o fenótipo depressivo a partir de um tratamento com corticosterona (PAPP et al., 2003; BOURIN et al., 2004; DAGYTE et al., 2011; RACAGNI et al., 2011; RAINER et al., 2011). Em humanos, um estudo observou uma eficácia da agomelatina igual ou maior que inibidores seletivos da recaptção de 5-HT e inibidores seletivos da recaptção de NA, além de uma maior aceitabilidade em pacientes com depressão maior (HUANG et al., 2014).

Possíveis alvos para a atividade de antidepressivos são moléculas neuroplásticas que modulam a habilidade para responder e se adaptar aos estímulos externos. Entre outros, a neurotrofina fator neurotrófico derivado do

cérebro (BDNF), parece ter um papel essencial na etiologia dos transtornos de humor, bem como nos mecanismos neuroplásticos associados com as terapias antidepressivas. De forma similar a outros antidepressivos, o tratamento crônico com agomelatina pode elevar a expressão de BDNF no hipocampo e no córtex pré-frontal (RACAGNI et al., 2011).

A agomelatina apresenta propriedades como indução de proliferação celular e neurogênese no giro denteado ventral do hipocampo, um região muito implicada com as emoções (BANASR et al., 2006). E ainda, bloqueio do aumento de glutamato induzido por estresse em áreas corticais, efeito típico de antidepressivos. Esse bloqueio não é reproduzido pela melatonina ou por antagonistas 5-HT_{2c} sozinhos, assim como o aumento de BDNF e de neurogênese, sugerindo uma ação sinérgica para esses efeitos (FIGURA 2) (RACAGNI et al., 2011).

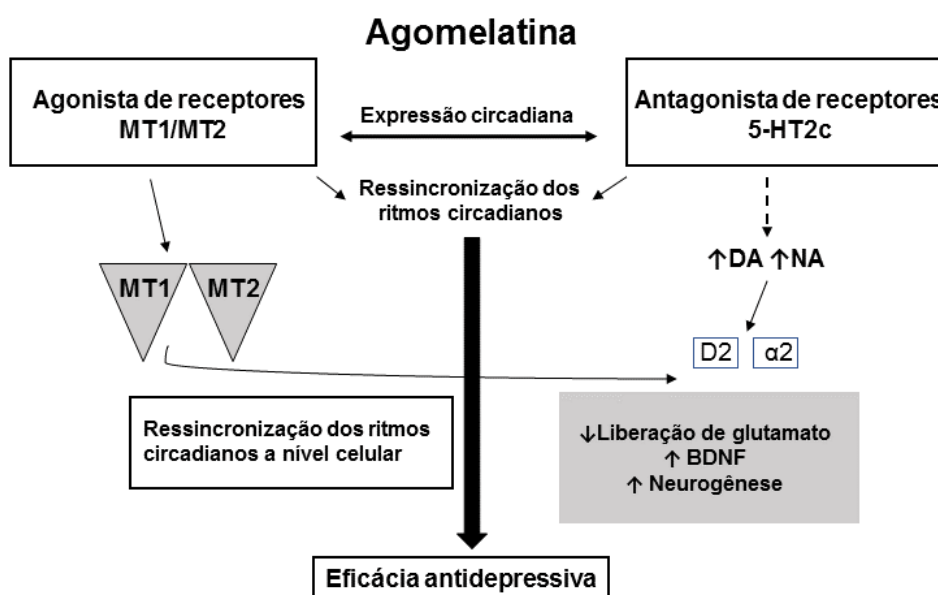


FIGURA 2 – Hipótese do mecanismo de ação da agomelatina. Agomelatina se liga aos receptores melatonérgicos e 5-HT_{2c}, e ambos os tipos de receptores são necessários para a eficácia antidepressiva, pois nenhum tratamento com apenas melatonina ou antagonistas 5-HT_{2c} seletivos foi capaz de reproduzir os efeitos celulares/moleculares da agomelatina (neurogênese, liberação de BDNF e bloqueio da liberação de glutamato). Adaptado de: Racagni et al. (2011).

Agonistas de receptores melatonérgicos têm mostrado uma proteção direta aos radicais livres, e uma atividade antioxidante indireta via ações estimulatórias no sistema antioxidante (GUPTA; SHARMA, 2014). Aguiar et al. (2013) observaram que a agomelatina em doses de 25 mg/kg e 50 mg/kg

apresentou propriedades antioxidantes (diminuição de peroxidação lipídica e do conteúdo de nitrito) no cérebro de camundongos submetidos a dois modelos de convulsão induzida quimicamente; e no estudo de Gupta et al. (2015), o tratamento com agomelatina (2 e 4 mg/kg) em camundongos atenuou o dano tecidual e a redução de enzimas antioxidantes em um modelo de demência vascular induzida por hipoperfusão cerebral crônica (AGUIAR et al., 2013; GUPTA et al., 2015).

Em um estudo de 2015, Avila et al., trataram pacientes com DP e depressão com agomelatina por 6 meses, e observaram melhoras em escalas de depressão, de sono na DP, e ainda em uma subescala motora da DP. Movimentos dos membros e despertar periódicos medidos por polissonografia também melhoraram (AVILA et al., 2015). Entretanto esse estudo apresenta algumas limitações, começando pelo fato de ser um estudo aberto.

1.8 MODELOS DA DP 6-OHDA

O uso de modelos animais induzidos por toxinas tem sido crucial para a elucidação da patofisiologia da DP e para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas para o tratamento dos seus sintomas. A 6-OHDA é uma neurotoxina catecolaminérgica específica, essa especificidade está associada à sua semelhança com as catecolaminas, resultando na captação e acumulação devido à sua alta afinidade com os transportadores de DA e NA (BOVÉ; PERIER, 2012).

Existe um consenso de que o efeito deletério da 6-OHDA ocorre devido ao estresse oxidativo desencadeado pela produção de ROS após entrar no neurônio via transportador de DA. Parece que a auto-oxidação provavelmente contribui para a geração de ROS, sabendo-se que em condições fisiológicas a 6-OHDA é levada a uma rápida auto-oxidação não enzimática que gera espécies tóxicas como as quinonas, peróxido de hidrogênio, radicais superóxido, e radicais hidroxila. Entretanto, também foi sugerido que o ferro via reação de Fenton pode contribuir para esse processo, já que quelantes de ferro previnem o efeito tóxico da 6-OHDA (SOTO-OTERO et al., 2000).

A 6-OHDA não é capaz de cruzar a barreira hematoencefálica, portanto, precisa ser administrada por injeção estereotáxica na SNpc ou estriado, por

exemplo, para atingir a via nigroestriatal. Quando a injeção de 6-OHDA é feita na SNpc, os neurônios dopaminérgicos começam a degenerar dentro de 24h, e morrem sem morfologia apoptótica (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003).

6-OHDA já foi encontrada no núcleo caudado humano e na urina de pacientes com DP tratados com levodopa. Especula-se que a 6-OHDA pode ter um papel na patogênese da DP como um metabólito endógeno hidroxilado da dopamina (BOVÉ; PERIER, 2012).

Esses modelos resultam em uma neurodegeneração nigroestriatal parcial a completa, fornecendo paradigmas apropriados para modelar diversos parâmetros, desde marcadores moleculares até sintomas motores finos na DP. Recentemente esse modelo tem sido usado para estudar comportamentos tipo-depressivo na DP. Neste tipo de modelo, foi demonstrado que os roedores desenvolvem tanto anedonia, medida pelo consumo de sacarose, quanto desespero comportamental no teste do nado forçado; e a atividade locomotora não é prejudicada (SCHINTU et al., 2012). Alguns trabalhos também têm utilizado modelos com 6-OHDA na investigação dos distúrbios de sono e dos ritmos circadianos relacionados a DP (BAIER et al., 2006).

Com base nas evidências presentes na literatura, no presente estudo, nós avaliamos a possível perturbação da ritmicidade circadiana da atividade locomotora de ratos em um modelo de DP 6-OHDA intranigral, e se o tratamento prolongado com agomelatina é eficaz na prevenção dessa perturbação, bem como do comportamento tipo-depressivo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito preventivo e tipo-antidepressivo da agomelatina em um modelo de DP induzido pela infusão intranigral de 6-OHDA em ratos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar o padrão de atividade locomotora espontânea em ratos lesados com 6-OHDA na substância negra, e ratos sham (falso operados);
- Analisar possíveis alterações do ciclo circadiano da atividade locomotora dos animais;
- Investigar os efeitos de um tratamento com agomelatina sobre as possíveis alterações do ciclo circadiano da atividade locomotora dos animais;
- Quantificar a extensão da perda de neurônios dopaminérgicos na SNpc dos animais e analisar os efeitos da agomelatina sobre a lesão;
- Avaliar o provável efeito tipo-antidepressivo da administração prolongada de agomelatina nos animais tornados parkinsonianos com 6-OHDA no Teste de Preferência por Sacarose.

3 ARTIGO CIENTÍFICO

Os materiais e métodos, resultados e discussão do trabalho encontram-se no artigo científico em anexo que foi submetido à revista *Chronobiology International*

**Circadian locomotor rhythm alteration and depressive-like behavior in a
Parkinson's disease model: Agomelatine's lack of effect**

**Leonardo C. Souza¹, Bruno J. Martynhak², Taysa B. Bassani¹, Joelle de M.
Turnes¹, Meira M. Machado¹, Eric Moura¹, Roberto Andreatini¹, Maria
A.B.F. Vital¹**

¹Pharmacology Department, Federal University of Paraná, Brazil.

²Physiology Department, Federal University of Paraná, Brazil.

Corresponding author:

Maria Aparecida Barbatto Frazão Vital

Departamento de Farmacologia

Universidade Federal do Paraná

Tel: +55 41 3361 1717

Fax: +55 41 3266-2042

Email: vital@ufpr.br

Abstract

Parkinson's disease (PD) presents a set of non-motor symptoms that are frequently reported by PD patients, such as sleep-circadian rhythm alterations and depression. It is known that toxin-based animal models of PD can induce circadian rhythms alterations and depressive-like behavior. Here, we first investigated the possible disturbances on circadian rhythms of locomotor activity in a 6-hydroxydopamine (6-OHDA) intranigral model. Rats showed an impairment in the robustness of the rhythm and acrophase on the first week after the toxin infusion, and a decrease in rhythm amplitude in week 3 following the lesion. Then we hypothesized agomelatine, an antidepressant with melatonergic properties and potential to resynchronize disturbed rhythms, could prevent the observed rhythm alterations in the 6-OHDA model. However, agomelatine (50 mg/kg) administered for 22 days in rats worsened the rhythm robustness and did not induce significant changes in the other circadian parameters in both Sham and 6-OHDA groups that received the treatment. Finally, we examined the effects of agomelatine in rats infused with 6-OHDA intranigral on depressive-like behavior evaluated by the sucrose preference test. The animals lesioned with 6-OHDA showed a decrease in sucrose preference, however, agomelatine was not capable of elicit significant alterations. Thus, the group infused with 6-OHDA and treated with agomelatine had a similar sucrose preference in comparison with the group infused with 6-OHDA that receive only vehicle. Our findings indicate that agomelatine worsened circadian locomotor rhythm and was not able to reverse the depressive-like behavior of rats in the PD model induced by 6-OHDA intranigral.

Keywords: Parkinson; Circadian Rhythm; Locomotor Activity; 6-OHDA; Agomelatine; Depression.

1. Introduction

Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disorder, affecting approximately 1% of the population over 65 years of age (GROVER et al., 2015). Mainly considered as a motor disorder, PD is characterized by the progressive degeneration of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta (SNpc) and consequent reduction in dopamine (DA) content in striatum, which leads patients to suffer from clinical features as asymmetric onset of bradykinesia, rigidity, resting tremor, and disturbances in balance (DEXTER; JENNER, 2013). However, the neurodegeneration also causes non-motor symptoms such as impairment of the sleep–wake cycle, psychiatric disorders, and autonomic dysfunction, that can precede classical motor features, and are notable causes of disability in the PD population (TOLOSA et al., 2007; VIDENOVIC; GOLOMBEK, 2013).

Disturbed rest-activity cycles, changes in blood pressure and heart rate rhythms, impaired sleep and alertness, and oscillations in mood and behavior are common symptoms in PD patients. Furthermore, the intensity and frequency of many motor and nonmotor symptoms of PD exhibit diurnal oscillations. Likewise, responsiveness to antiparkinsonian drugs, visual performance, autonomic dysfunction, and secretion pattern of endocrine hormone vary throughout the day. All these factors imply that the circadian rhythms are disrupted in PD (LI et al., 2017).

Circadian rhythms are physiological and behavioral processes that occur with a periodicity of approximately 24 hours (VERWEY et al., 2016). Almost all natural behaviors, in which DA tone is implicated, exhibit daily or circadian rhythmicity (e.g., feeding, sleep–wake cycle, locomotion, motivation). Thus, day–night variations in DA neurotransmission are likely implicated in the regulation of these behaviors (MENDOZA; CHALLET, 2014).

Disturbances in circadian rhythm have been associated with mood disorders (MARTYNHAK et al., 2011). Blunted or abnormal circadian rhythms in a variety of bodily functions including body temperature, plasma cortisol, noradrenaline, thyroid stimulating hormone, blood pressure, pulse, and melatonin have been found in depressed and bipolar patients (MCCLUNG, 2007b). Depression are other common non-motor symptom of PD, and are present in approximately 30–50% of PD patients (OSSOWSKA; LORENC-KOCI, 2013).

Different reports suggest that the pathophysiology underlying mood disorders in PD could be different from the mechanisms that account for the behavioral symptoms observed in the general population (LIEBERMAN, 2006).

Neuroanatomical and neuropharmacological research suggests that catecholamine (noradrenaline and/or dopamine) dysfunction, in particular dopamine deficiency in the frontal and subcortical regions and changes in the noradrenaline pathways, might contribute to depression in PD (FRISINA et al., 2009). These distinct mechanisms may explain the insufficient data on effectiveness and safety for common antidepressant therapies, such as selective serotonin reuptake inhibitor, used in PD (AARSLAND et al., 2011). Moreover, some investigators have reported an increase of the parkinsonian symptoms after antidepressant therapy in depressed PD patients, whereas others reported improvement on both depression and motor features (AVILA et al., 2015).

Agomelatine is a melatonin MT1/MT2 receptor agonist and a 5-HT_{2c} receptor antagonist that represents an innovative approach to treating depression, which incorporates a non-monoaminergic mechanism (SAN; ARRANZ, 2008; DE BODINAT et al., 2010; GUARDIOLA-LEMAITRE et al., 2014). Besides the well-known antidepressant profile established with several pre-clinical and clinical trials, the pharmacological properties gives to agomelatine the ability to resynchronize experimentally altered circadian rhythms in rodents as well as in humans (TARDITO et al., 2012). Moreover, as well as melatonin, agomelatine have antioxidant and neuroprotective properties (AGUIAR et al., 2013; GUPTA et al., 2015).

Studies adopting the neurotoxin-induced animal models of PD, specifically intra-nigral injections of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) or 6-hydroxydopamine (6-OHDA), have demonstrated motor, cognitive, emotional, neurochemical, molecular, and sleep-related disruptions in animals (FERRO et al., 2005; LIMA et al., 2007; TADAIESKY et al., 2008; SANTIAGO et al., 2010).

Therefore, based on the fact that agomelatine has proven to be effective as antidepressant in patients with major depressive disorders and to improve disturbed sleep-wake cycles, which also represents significant comorbidity in PD patients, in the present study, we aimed to evaluate the possible disruption of circadian rhythmicity of locomotor activity and depressive-like behavior in a 6-

OHDA intranigral rat model of PD, and whether agomelatine is efficacious for the reduction of these disturbances.

2. Materials and Methods

2.1 Animals

Male Wistar rats, 75 days old at the beginning of the experiments (280-320g; $n=78$), from our breeding were used. The rats were allowed 1 week to acclimate to the environment before beginning any experimentation. In the first and second experiments, the animals were housed individually in polypropylene cages with wood shavings as bedding and maintained in a temperature-controlled room ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) with a 12:12-h light/dark cycle (lights on at 7:00 AM). Food and water were available “ad libitum”. For the third experiment, the animals were housed in groups of five and maintained in the same room and light conditions. The studies were performed in accordance with the guidelines of the Committee on the Care and Use of Laboratory Animals, United States National Institutes of Health. The protocol complied with the recommendations of Universidade Federal do Paraná and was approved by the University Ethics Committee (protocol no. 906).

2.2 6-OHDA lesions

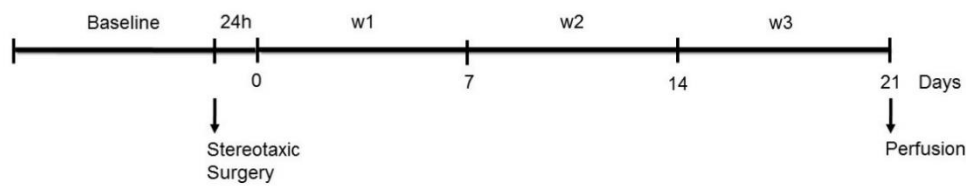
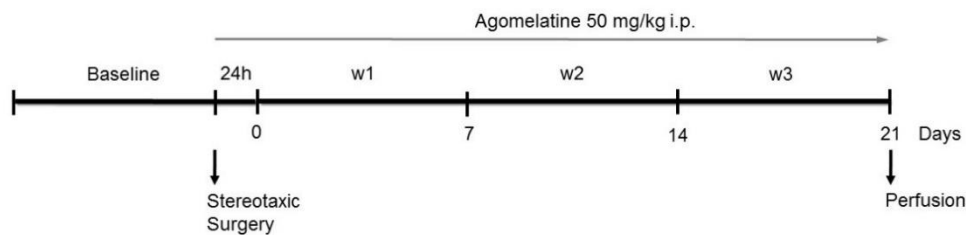
The neurotoxin 6-OHDA (6 μg in 1 μL of artificial cerebrospinal fluid, supplemented with 0.2% ascorbic acid; Sigma ChemicalCo., USA) was infused into the SNpc during stereotaxic surgery (SANTIAGO et al., 2010, 2015). All the animals were anesthetized with equitesin (0.3 ml/kg, intraperitoneal), and 6-OHDA was bilaterally infused in total volume of 1 μL in the intranigral area of the brain using a 27-gauge needle attached to a 10 μl syringe (Hamilton, USA). The following coordinates were used for the SNpc: anterior/posterior, -5.0 mm from bregma; medial/lateral, ± 2.1 mm from the midline; dorsal/ventral, 8 mm from the skull (PAXINOS; WATSON, 2007). The flow of the injections was controlled by an electronic pump (Insight, Ribeirão Preto, SP, Brazil) at a rate of 0.33 $\mu\text{L}/\text{min}$ for 3 min. The injection needle was left in the injection side for an additional 2 min to avoid reflux. The sham groups also underwent the same procedure but received artificial cerebrospinal fluid instead of 6-OHDA.

2.3 Experimental Design

For experiment 1, the animals were randomly divided into two groups (Sham, $n = 12$; and 6-OHDA, $n = 11$) and maintained in individual cages. The rats had their locomotor activity continuously monitored for 10 days before stereotaxic surgery was performed, of which the last 7 days were used as baseline. All the animals underwent stereotaxic surgery. After the intervention, the circadian locomotor activity recording continued for 21 days. The day after surgery was not included in the analysis to avoid influence of anesthesia on locomotor activity (Fig 1A).

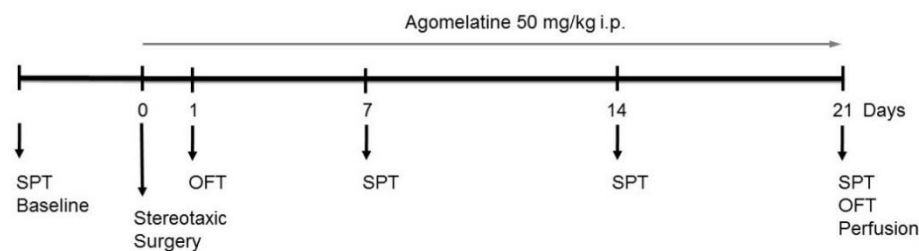
In the second experiment, the animals were randomly divided into four groups (Sham+veh, $n = 6$; Sham+ago, $n = 3$; 6-OHDA+veh, $n = 5$; and 6-OHDA+ago, $n = 5$) and maintained in individual cages. The same procedures of experiment 1 for recording locomotor activity baseline were performed. All the animals underwent stereotaxic surgery. After surgery, on the same day at 5 p.m., the animals were treated intraperitoneally (i.p.) with agomelatine at a dose of 50 mg/kg (Valdoxan, Servier SAS, France) suspended in carboxymethylcellulose 0,25% (CMC, vehicle), or vehicle (CMC). The treatment went on once daily for 21 days and was performed every day at 5 p.m. (i.e. two hours before the onset of the dark phase). The circadian locomotor activity recording continued for 21 days. The day after surgery was not included in the analysis to avoid the influence of anesthesia on locomotor activity (Fig. 1B). The agomelatine dose was used for achieving both melatonin agonist and 5-HT_{2c} antagonist activities (RACAGNI et al., 2011), ie to achieve chronobiotic and antidepressant-like effects.

For the third experiment, the rats were randomly divided into four groups: Sham+veh, Sham+ago, 6-OHDA+veh, and 6-OHDA+ago ($n = 12$ /group). On the 0 day, all the animals underwent stereotaxic surgery, in which the experimental groups received bilateral infusions of 6-OHDA in the SNpc and the sham groups received bilateral infusions of cerebrospinal fluid. On the same day at 5 p.m., the animals were treated with 50 mg/kg agomelatine or vehicle (CMC) and the treatment went on once daily for 21 days. The animals were tested once a week for sucrose preference until day 21 (Fig 1C). The open-field test was conducted on days 1 and 21. The dose and hour of administration of agomelatine were based on previous studies that described its antidepressant-like effects (PAPP et al., 2003; BOURIN et al., 2004; MORLEY-FLETCHER et al., 2011).

(A) Experiment 1**(B) Experiment 2**

Baseline (10 days)

w1: First week after stereotaxic surgery
 w2: Second week after stereotaxic surgery
 w3: Third week after stereotaxic surgery

(C) Experiment 3

SPT: Sucrose Preference Test
 OFT: Open Field Test

Fig. 1. Experimental design. (A) Experiment 1, (B) experiment 2, and (C) experiment 3.

2.4 Assessing circadian locomotor activity rhythms

Circadian rhythms were assessed by monitoring locomotor activity, that was continuously recorded in 5 min intervals throughout the first and second experiments of the study using passive infrared motion detectors mounted above each animal's cage. The motion captors were connected to a USB data acquisition module (iUSBDAQ-U120816, HYTEK Automation, Inc.) and the circadian locomotor activity were registered using a computer software named SAP, kindly provided, and developed by Dr. Marconi Camara (UFRN). Locomotor activity was expressed in terms of activity counts, corresponding to the number of detector activations.

2.5 Tyrosine hydroxylase immunohistochemistry

The rats were deeply anesthetized with equitesin (0.3 ml/kg, i.p.) immediately after the first and second experiments and intracardially perfused with saline, followed by the fixative solution (4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4). The brains were removed and immersed in the fixative solution for 24 h at 4 °C. After, the brains were placed in a 30% sucrose solution for at least 72 h until they sank, and then stored at -70 °C. Four series of 30 µm sections were cut in a cryostat in the frontal plane and collected from the caudal diencephalon to caudal midbrain, according to Paxinos & Watson (2007). Then cuts were collected in the SNpc and placed on plates containing an antifreezing solution. The tissue slices were incubated with primary anti-tyrosine hydroxylase (TH) anti-body (1:2000; Chemicon, Temecula, CA, USA) and diluted in phosphate-buffered saline (PBS) that contained 0.3% Triton X-100 overnight at room temperature. The slices were then incubated with the biotin-conjugated secondary antibody (1:300; Sigma Aldrich, St Louis, MO) for 2 h at room temperature. The antibody complex was detected using a modification of the ABC system (Vectastain ABC Elite kit, Vector Laboratories), followed by reaction with 3,30-diamino- benzidine (Vector Laboratories DAB Substrate Kit for Peroxidase). The tissue slices were placed on gelatin-coated slides, air dried, dehydrated in ascending ethanol concentrations, cleared in xylene and coverslipped (CAPITELLI et al., 2008; BASSANI et al., 2014). The bilateral SNpc of each slide was digitized under 10x magnification with a DP71 Olympus Optical digital camera using a BX50 Olympus microscope. Unbiased quantification of TH-labeled neurons in the SNpc was performed using ImageJ 1.51f (NIH, Bethesda, MD, EUA) software based on optical density.

2.6 Sucrose Preference Test

Sucrose preference is frequently used as measure of anhedonia in rodents (PAPP et al., 1991; WANG et al., 2009; SANTIAGO et al., 2010). The animals were transferred into single housing cages with free access to food. Each rat was provided with two bottles of water, pre-weighed, on the extreme sides of the cage during the 24 h training phase to adapt the rats to drink from two bottles. After training, one bottle was randomly switched to contain 0,5% sucrose solution, as described previously, and 24 h later, the bottles were reversed to avoid

perseveration effects (SANTIAGO et al., 2015). The sum of water consumption and sucrose consumption was defined as the total intake. The percentage of sucrose intake was calculated by using the following equation ($\% \text{ sucrose preference} = \text{sucrose intake} \times 100/\text{total intake}$). The animals with less than 65% of sucrose preference in the baseline were not included into analysis. All the tests were carried out weekly, beginning one week prior to the neurotoxins exposure (to provide baseline values) and finishing 21 days after that. After the sucrose preference test, all the rats received free access to food and water.

2.7 Open Field Test

The open field test was used in the third experiment of the study to determine motor alterations in animals as previously described (GRADOWSKI et al., 2013). The apparatus consists of a circular arena (97 cm diameter, 42 cm wall height) divided into three concentric circles and subdivided into 19 quadrants. The animals were gently placed in the center of the open field and allowed to freely explore the area for 5 min. Locomotion frequency (i.e., the number of crossings from one quadrant to another) and rearing frequency (i.e., the number of times the animals stood on their hind paws) were determined. The open field apparatus was washed with a 5% water-alcohol solution before and between behavioral testing to eliminate possible bias caused by odors left by previous rats.

2.8 Statistics

Circadian rhythms parameters, sucrose preference test, and open field test were analyzed using two-way analysis of variance (ANOVA), followed, by Newman-Keuls post hoc test. The histological data was analyzed by means of the two-tailed unpaired Student's t-test. The level of significance was $p < 0.05$. Results are expressed as mean \pm Standard Error of the Mean (SEM). The analysis was performed with the software GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, Inc).

Rhythm robustness (index to describe how regular a circadian rhythm is) was considered as the Q_p values from qui-squared periodogram analysis (REFINETTI, 2004). Locomotor activity amplitude (half the extent of variation of an oscillatory process) and time of the activity peak (acrophase) data was first normalized by Z-score, then a Fourier harmonic curve was fitted using the CircWave v1.4 software (provided by Dr. Roelof Hut, University of Groningen)

and the method of peak and trough was applied. The actograms were plotted with the plugin ActogramJ (SCHMID et al., 2011) from the software ImageJ 1.51f (NIH, Bethesda, MD, EUA).

3. Results

3.1 Effects of 6-OHDA intranigral infusion on locomotor activity rhythm

3.1.1 Total Activity

After the stereotaxic procedure, both Sham and 6-OHDA animals showed individual fluctuations in total activity counts over the weeks as evidenced in figure 2A and 2B, and as indicated by time effect [$F(3, 60) = 2.773, p = 0.0491$]; but there was no difference between groups elicited by lesion [$F(1, 20) = 0.075, p = 0.7856$], or time x lesion interaction [$F(3, 60) = 2.336, p = 0.0827$] (Fig. 3A). When separated by light phase (Fig. 3B), activity in dark was not different regarding lesion [$F(1, 20) = 0.075, p = 0.7863$] and time effect [$F(3, 60) = 1.671, p = 0.1827$], however there was an interaction between lesion and time [$F(3, 60) = 2.798, p = 0.0476$]; activity in light increased significantly in the 6-OHDA group on the first week after surgery in comparison with baseline ($p < 0.01$) as indicated by time effect [$F(3, 60) = 7.195, p = 0.0003$] and time x lesion interaction [$F(3, 60) = 2.953, p = 0.0396$], but not by lesion [$F(1, 20) = 0.065, p = 0.8005$], on weeks 2 and 3 the activity in light phase returned to basal levels; there was no difference over time in the Sham group.

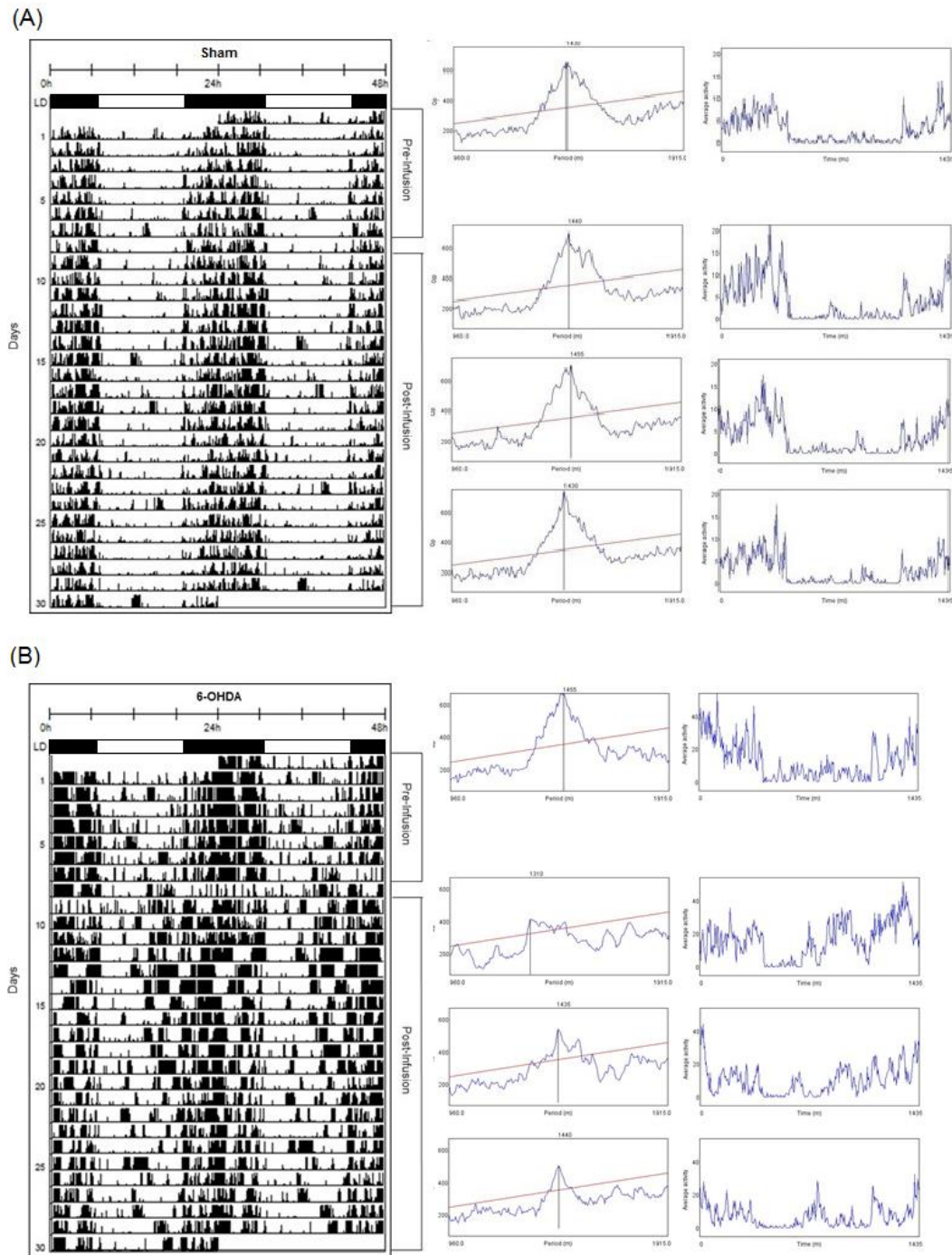


Fig. 2. Representative locomotor activity actograms (left panels), periodograms (middle panels), and mean waveforms (right panels) for a Sham animal (A), and an animal infused with 6-OHDA (B) exposed to a 12:12 light-dark cycle. The upper part of actogram represents the baseline, as well as the upper periodogram and waveform; below, the weeks after surgery. White and dark bars represent light and dark schedules, respectively.

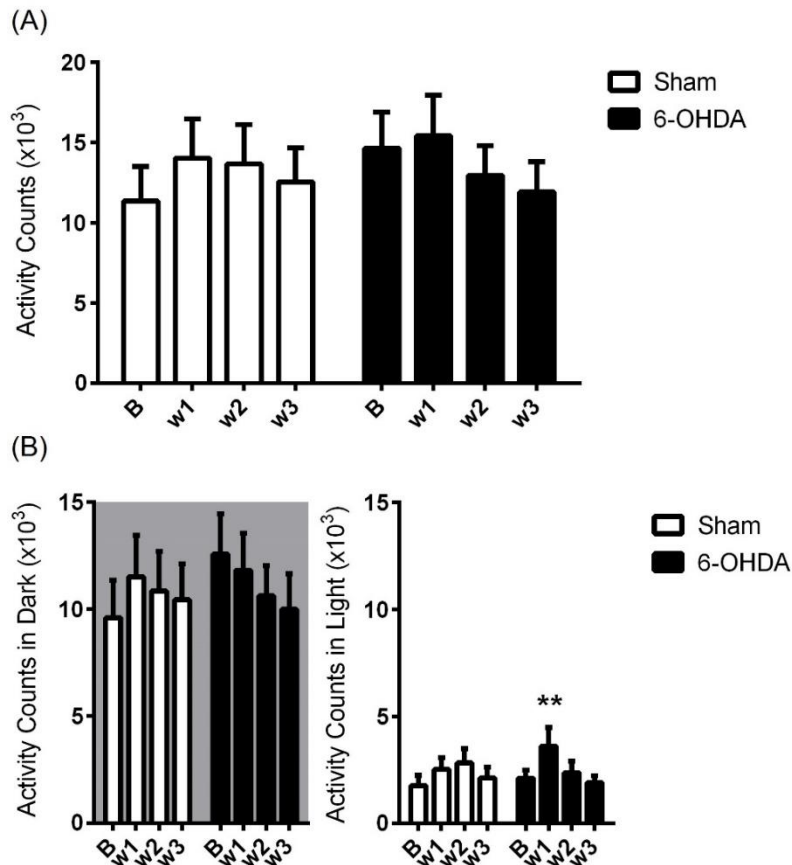


Fig. 3. Total activity counts of the animals infused with vehicle or 6-OHDA intranigral (A). Total activity counts during light phase (B) and dark phase (C) of the animals infused with vehicle or 6-OHDA intranigral. Weekly counting interval (baseline (B) - week before the stereotaxic surgery; w1 - first week immediately after the day of the surgery; w2 - second week after the surgery; w3 - third week after the surgery). Values are expressed as mean \pm SEM (Sham, $n = 12$; 6-OHDA, $n = 11$); ** $p < 0.01$, in comparison with the baseline of the same group (Two-way ANOVA followed by Newman-Keuls test).

3.1.2 Rhythm Robustness, Amplitude and Acrophase

The chi-squared periodogram analysis revealed that the 6-OHDA group had the robustness of the circadian locomotor rhythm on the first week after surgery significantly decreased ($p < 0.05$; Fig. 4A) in comparison with baseline as showed by time effect [$F(3, 60) = 5.534$, $p = 0.0020$], but not by lesion [$F(1, 20) = 0.321$, $p = 0.5769$] and time \times lesion interaction [$F(3, 60) = 1.151$, $p = 0.3357$]. The 6-OHDA group had a significant decrease in the rhythm amplitude in the third week after toxin infusion in comparison with Sham group ($p < 0.05$; Fig. 4B) as indicated by lesion effect [$F(1, 20) = 9.910$, $p = 0.0051$], and time \times lesion interaction [$F(3, 60) = 3.583$, $p = 0.0188$], but not by time effect [$F(3, 60) = 0.2285$, $p = 0.8762$]. The acrophase of 6-OHDA group had a significant phase-

advance on the first week in comparison with baseline ($p < 0.001$; Fig. 4C) and in comparison with the Sham group ($p < 0.01$) as indicated by time effect [$F(3, 60) = 10.17$, $p < 0.0001$], and time \times lesion interaction [$F(3, 60) = 4.194$, $p = 0.0092$], but not by lesion effect [$F(1, 20) = 3.884$, $p = 0.0627$]; and on the second and third week the difference was not significant.

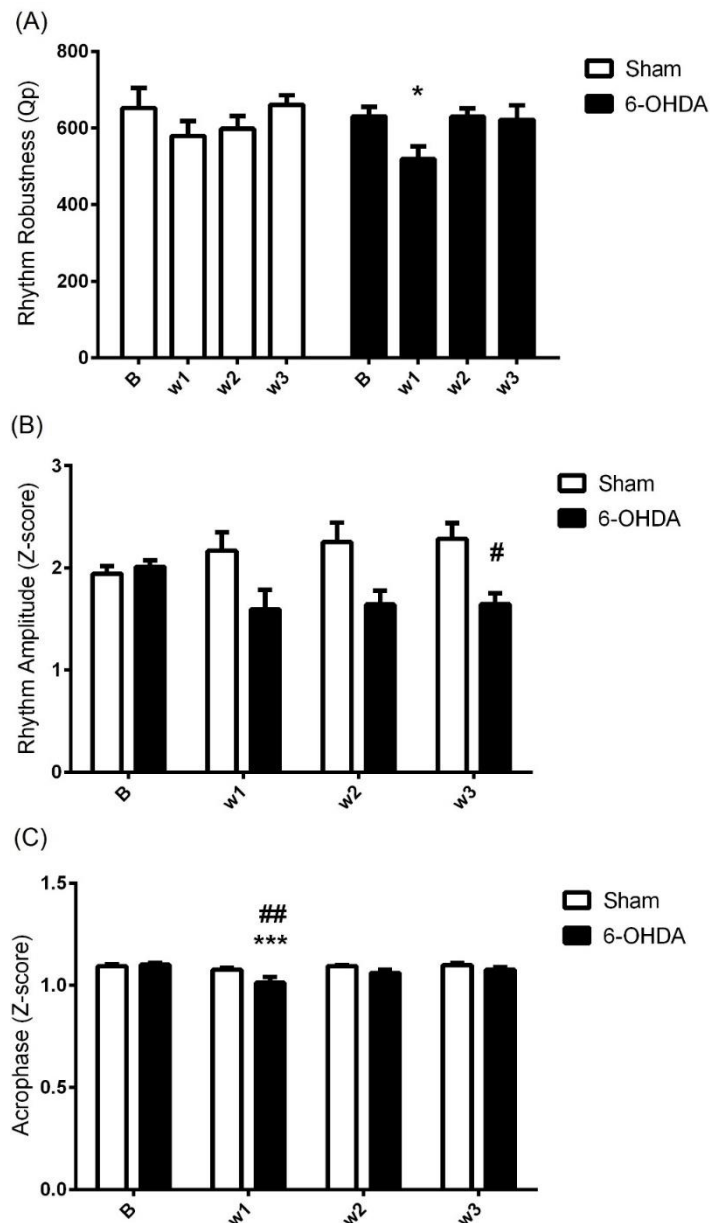


Fig. 4. Qp values from the chi-square periodogram analysis (A), locomotor activity rhythm amplitude (B), and acrophase (C) of the animals infused with vehicle or 6-OHDA intranigral. Weekly interval (baseline (B) - week before the stereotaxic surgery; w1 - first week immediately after the day of the surgery; w2 - second week after the surgery; w3 - third week after the surgery). Values are expressed as mean \pm SEM (Sham, $n = 12$; 6-OHDA, $n = 11$); * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$, in comparison with baseline of the same group; # $p < 0.05$ and ## $p < 0.01$, in

comparison with Sham group in the respective week (Two-way ANOVA followed by Newman-Keuls test).

3.1.3 Tyrosine hydroxylase immunohistochemistry

The figure 5 demonstrate that, in experiment 1, administration of 6-OHDA caused a partial loss of TH-immunoreactive neurons in the SNpc compared with the Sham group ($p < 0.0001$). The 6-OHDA group exhibited a 60% reduction of TH-immunoreactive neurons.

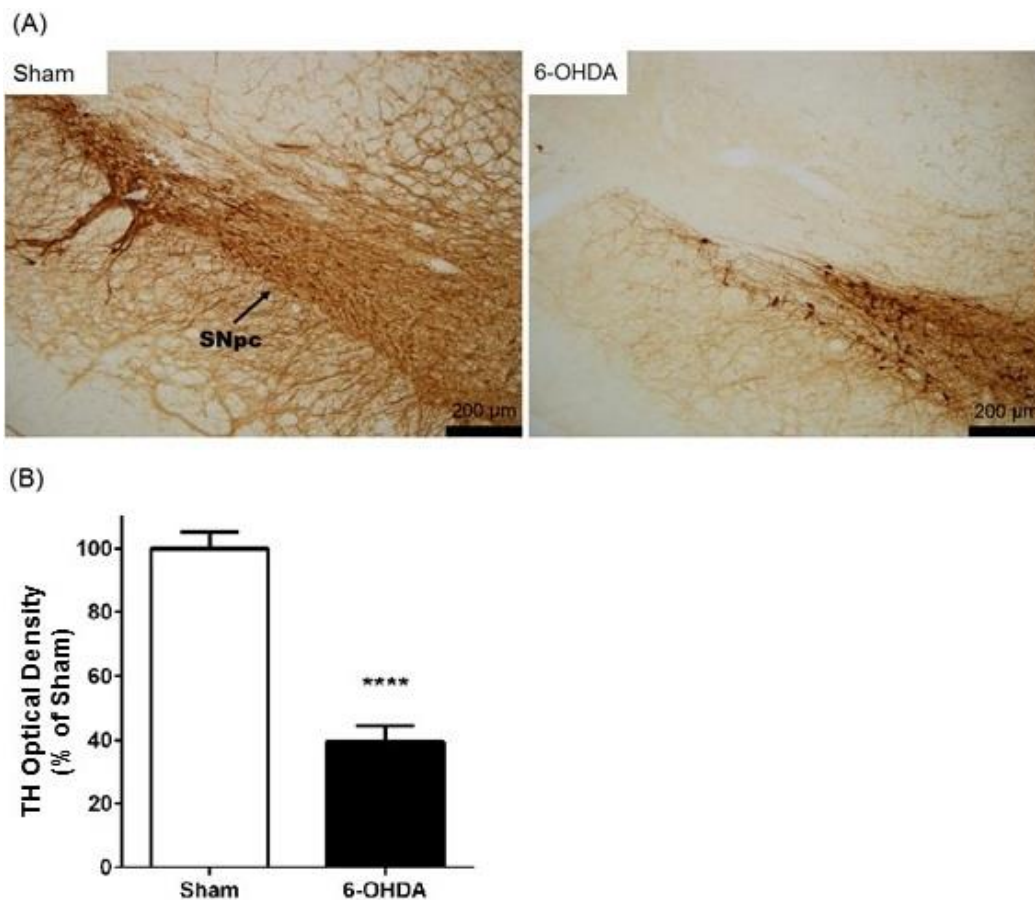


Fig. 5. Immunohistochemical analysis of the SNpc 22 days after the stereotaxic surgery. (A) Photomicrographs of representative sections of tyrosine hydroxylase immunostaining in the groups Sham and 6-OHDA (10x magnification; scale bars, 200 μ m). (B) Quantification of TH optical density in the SNpc in each group. The data are expressed as a percentage of Sham group; **** $p < 0.0001$, in comparison with Sham group (Two-tailed unpaired Student's t-test).

3.2 Effects of agomelatine on locomotor activity rhythm of 6-OHDA intranigral infused rats

3.2.1 Total Activity

All the groups had fluctuations on total activity after surgery and the beginning of the treatment protocol (Fig. 6A), however, only the Sham+ago group had a significant difference over time, a decrease in comparison with the respective baseline ($p < 0.05$) on the first week, as showed by time effect [$F(3, 45) = 10.44, p < 0.0001$], but not by lesion effect [$F(1, 15) = 0.353, p = 0.5608$], treatment effect [$F(1, 15) = 1.053, p = 0.3208$], or lesion x treatment interaction [$F(1, 15) = 0.746, p = 0.4010$]. In the separated dark phase analysis (Fig. 6B), it can be observed the same outcome as in total activity, Sham+ago group showed a significant decrease in comparison with the respective group baseline, as indicated by time effect [$F(3, 45) = 11.759, p < 0.0001$], but not by lesion [$F(1, 15) = 0.448, p = 0.5132$], or lesion x treatment interaction [$F(1, 15) = 0.858, p = 0.3687$]. Regarding the activity in the light phase (Fig. 6B), all groups presented similar counts over time, as showed by lesion effect [$F(1, 15) = 0.281, p = 0.6032$], treatment effect [$F(1, 15) = 0.736, p = 0.4043$], lesion x treatment interaction [$F(1, 15) = 0.096, p = 0.7603$], and time effect [$F(3, 45) = 1.195, p = 0.3222$].

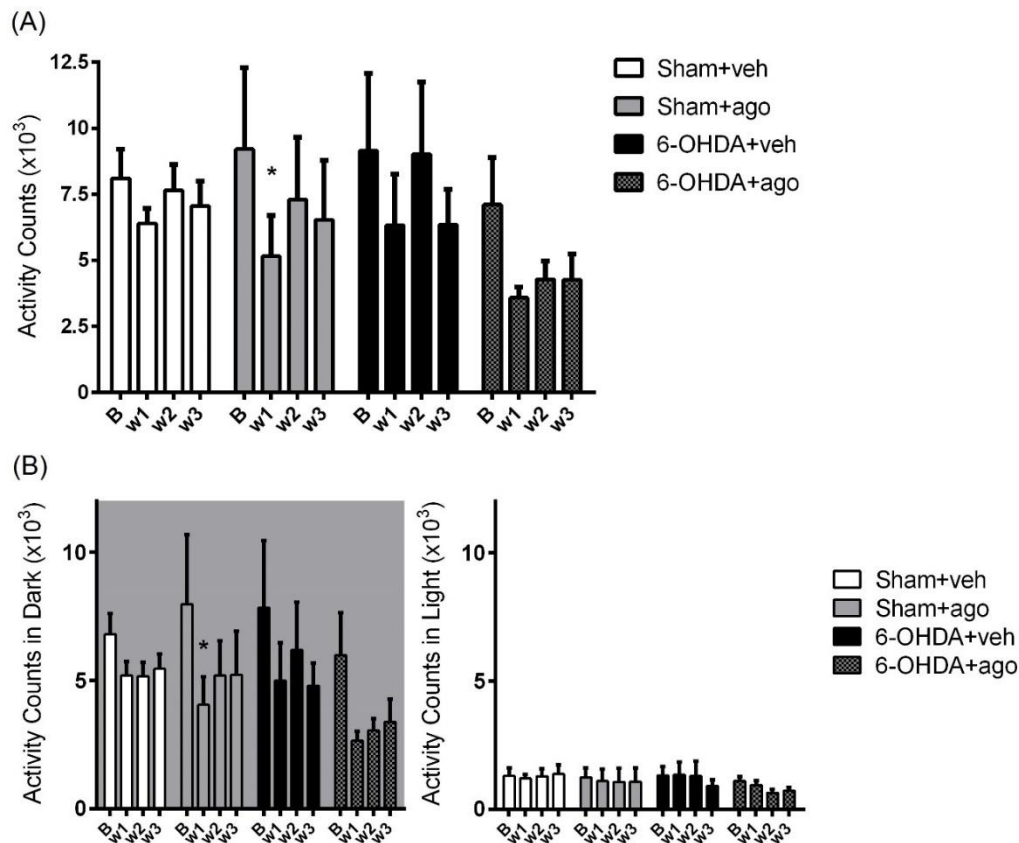


Fig. 6. Total activity counts of the animals infused with vehicle or 6-OHDA intranigral, and treated with vehicle or agomelatine (A). Total activity counts during light phase (B) and dark phase (C) of the animals infused with vehicle or 6-OHDA intranigral, and treated with vehicle or agomelatine. Weekly counting interval (baseline (B) - week before the stereotaxic surgery; w1 - first week immediately after the day of the surgery; w2 - second week after the surgery; w3 - third week after the surgery). Values are expressed as mean±SEM (Sham+veh, $n = 6$; Sham+ago, $n = 3$; 6-OHDA+veh, $n = 5$; 6-OHDA+ago, $n = 5$); * $p < 0,05$, in comparison with the baseline of the same group (Two-way ANOVA followed by Newman-Keuls test).

3.2.2 Rhythm Robustness, Amplitude and Acrophase

The rhythm robustness (Fig. 7A) diminished on the first week after lesion and beginning of treatment in both Sham+ago and 6-OHDA+ago groups ($p < 0.05$) in comparison with the respective baselines, as demonstrated by treatment effect [$F(1, 15) = 6.277$, $p = 0.0242$], and time effect [$F(3, 45) = 13.480$, $p < 0.0001$], but not by lesion [$F(1, 15) = 0.363$, $p = 0.5556$], and lesion x treatment interaction [$F(1, 15) = 1.359$, $p = 0.2618$]. Regarding the rhythm amplitude (Fig. 7B), there was no differences between or within groups, except for the decrease on the first week after surgery in comparison with baseline of Sham+ago group ($p < 0.01$), as indicated by time effect [$F(3, 45) = 14.100$, $p < 0.0001$] and

treatment [$F(1, 15) = 4.519, p = 0.0505$], but not by lesion [$F(1, 15) = 1.090, p = 0.3129$], or lesion x treatment interaction [$F(1, 15) = 0.110, p = 0.7438$]. The acrophase (Fig. 7C) was not significantly altered in any group, however the time effect has significantly changed [$F(3, 45) = 6.023, p = 0.0015$], but not lesion effect [$F(1, 15) = 3.707, p = 0.0733$], treatment effect [$F(1, 15) = 0.045, p = 0.834434345$], or lesion x treatment interaction [$F(1, 15) = 0.303, p = 0.5896$].

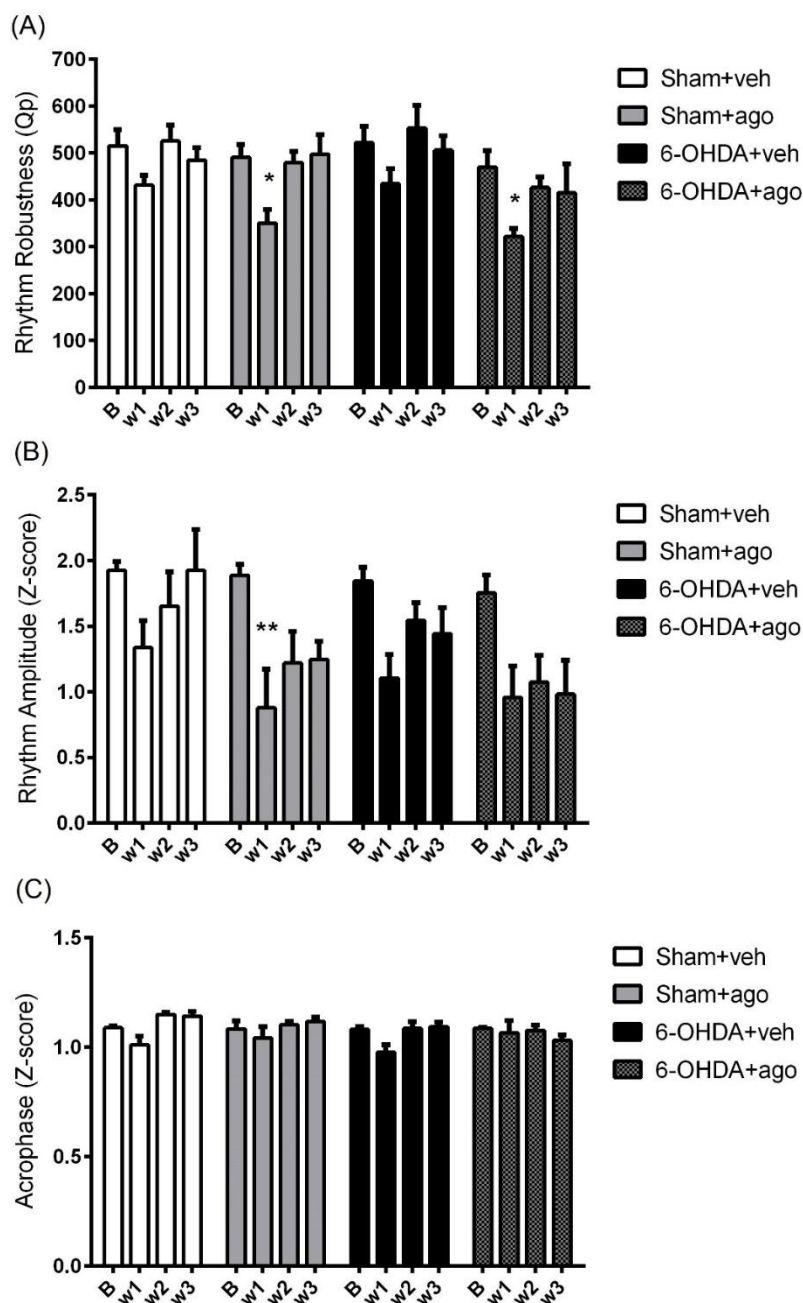


Fig. 7. Qp values from the chi-square periodogram analysis (A), locomotor activity amplitude (B), and acrophase (C) of the animals infused with vehicle or 6-OHDA intranigral, and treated with vehicle or agomelatine. Weekly interval (baseline (B) - week before the stereotaxic surgery; w1 - first week immediately

after the day of the surgery; w2 - second week after the surgery; w3 - third week after the surgery). Values are expressed as mean \pm SEM (Sham+veh, $n = 6$; Sham+ago, $n = 3$; 6-OHDA+veh, $n = 5$; 6-OHDA+ago, $n = 5$); * $p < 0.05$, and ** $p < 0.01$ in comparison with the baseline of the same group (Two-way ANOVA followed by Newman-Keuls test).

3.2.3 Tyrosine hydroxylase immunohistochemistry

The figure 8 demonstrate that, in experiment 2, administration of 6-OHDA caused a partial loss of TH-immunoreactive neurons in the SNpc of 6-OHDA+veh (55 %; $p < 0.001$) and 6-OHDA+ago (40%; $p < 0.01$) groups compared with the Sham+veh group.

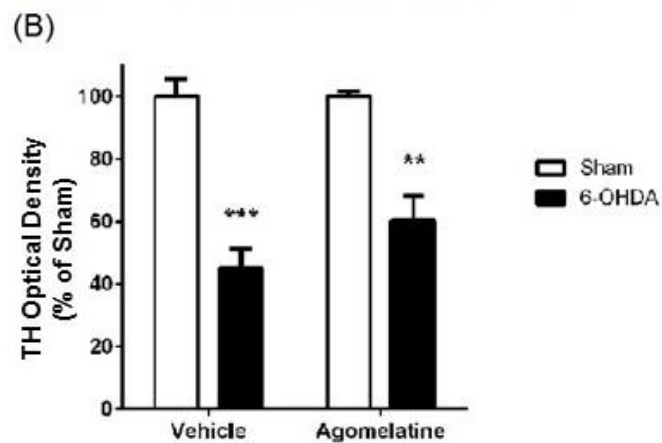
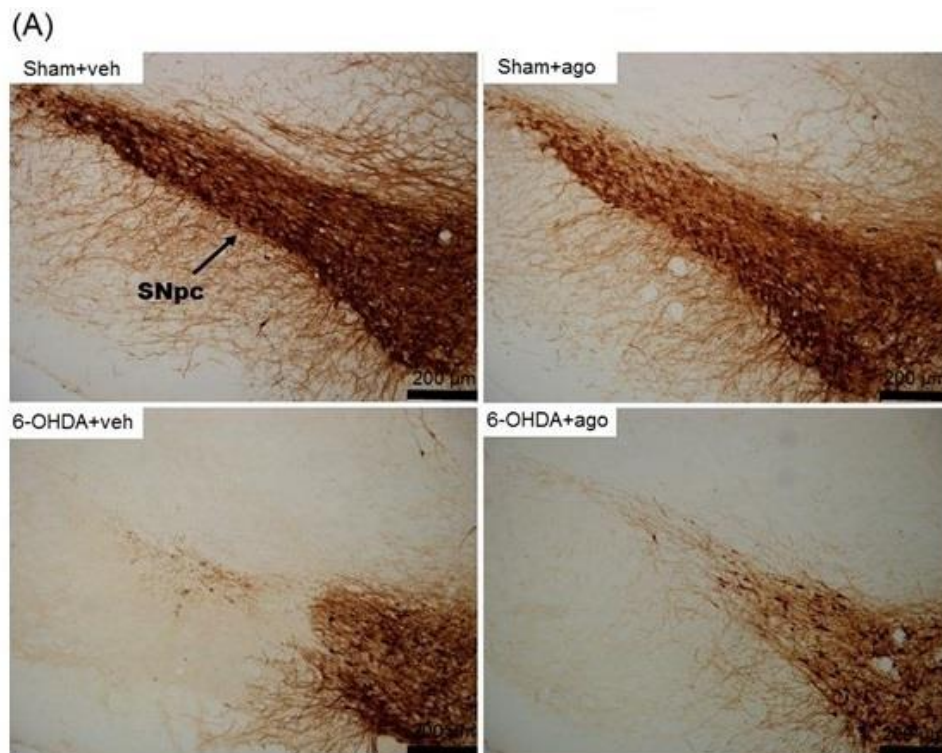


Fig. 8. Immunohistochemical analysis of the SNpc 22 days after the stereotaxic surgery. (A) Photomicrographs of representative sections of tyrosine hydroxylase immunostaining in the groups Sham+veh, Sham+ago, 6-OHDA+veh and 6-OHDA+ago (10x magnification; scale bars, 200 μ m). (B) Quantification of TH optical density in the SNpc in each group. The data are expressed as a percentage of Sham+veh group; ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$, in comparison with Sham+veh group (Two-way ANOVA followed by Newman-Keuls test).

3.3 Evaluation of the antidepressant-like effect of agomelatine in the Parkinson's disease 6-OHDA model

3.3.1 Sucrose Preference Test

The sucrose preference test (Fig. 9) did not revealed differences in sucrose preference between groups, however, the 6-OHDA lesion caused a significant preference decrease in the experimental groups (6-OHDA+veh and 6-OHDA+ago) [$F(1, 39) = 7.068$, $p = 0.0113$]. The treatment did not induce significant alterations [$F(1, 39) = 1.278$, $p = 0.2650$], also there was not lesion x treatment interaction [$F(1, 39) = 0.524$, $p = 0.4733$]. The animals showed a significant individual variation over time [$F(3, 117) = 3.968$, $p = 0.0098$] and interaction between time and lesion [$F(3, 117) = 2.675$, $p = 0.0504$].

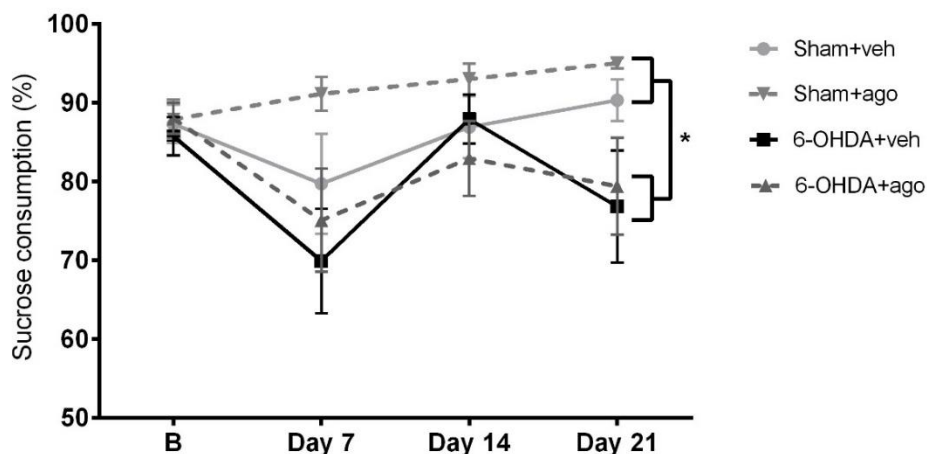


Fig. 9. Sucrose preference of the animals infused with vehicle or 6-OHDA intranigral, and treated with vehicle or agomelatine. The data were obtained before the 6-OHDA infusion for baseline (B); and 7, 14 and 21 days after 6-OHDA infusion. Values are expressed as mean \pm SEM (Sham+veh, $n = 10$; Sham+ago, $n = 10$; 6-OHDA+veh, $n = 12$; 6-OHDA+ago, $n = 12$); * $p < 0.05$, Sham animals in comparison with 6-OHDA-infused animals (Two-way ANOVA).

3.3.2 Open field test

In the open field test, the groups 6-OHDA+veh and 6-OHDA+ago did not show significant differences in comparison with control group (Sham+veh) in both locomotion (Fig. 10A) and rearing (Fig. 10B) frequencies, nevertheless, the analysis of variance revealed that locomotion frequency of the animals significantly changed individually over time [$F(1, 44) = 4.467, p = 0.0402$] and showed an interaction between time and lesion effects [$F(1, 44) = 15.350, p = 0.0003$]; the lesion [$F(1, 44) = 3.363, p = 0.0734$] as well as the treatment [$F(1, 44) = 0.018, p = 0.8911$] did not alter locomotion significantly, and there was no interaction between lesion and treatment [$F(1, 44) = 0.236, p = 0.6294$]. In relation to the rearing frequency, it was significantly altered by lesion [$F(1, 44) = 9.633, p = 0.0033$], and were observed significant interaction between time and lesion [$F(1, 44) = 6.955, p = 0.0115$]; treatment [$F(1, 44) = 0.136, p = 0.7137$] and time effect [$F(1, 44) = 0.026, p = 0.8716$] did not cause significant changes, and there was no lesion x treatment interaction [$F(1, 44) = 0.447, p = 0.5072$].

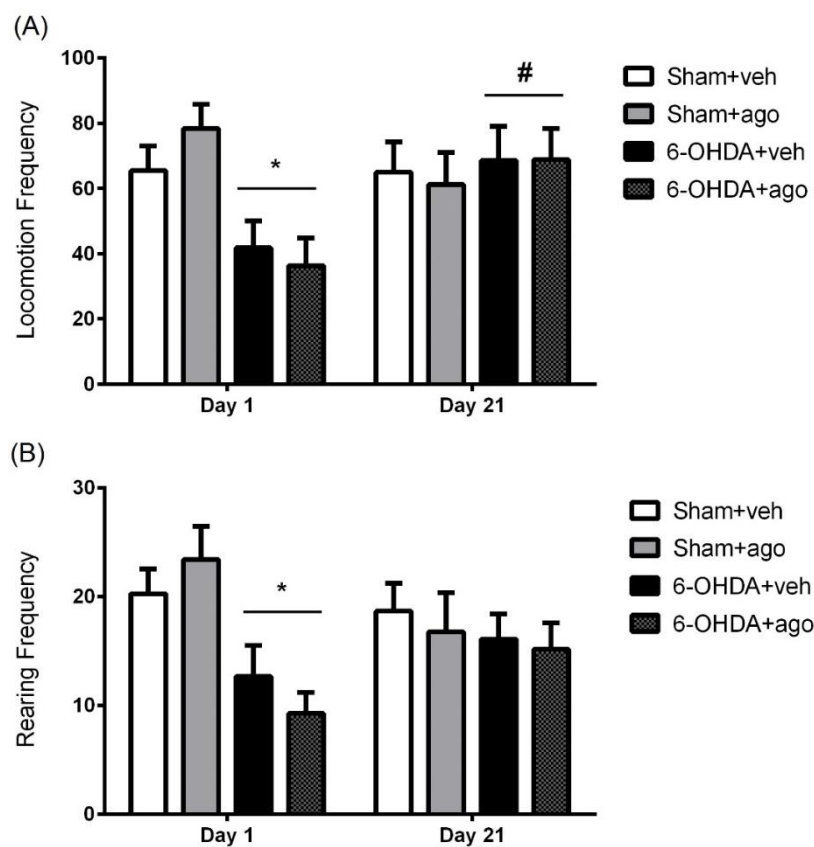


Fig. 10 Locomotion (A) and rearing (B) frequency of the animals infused with vehicle or 6-OHDA intranigral, and treated with vehicle or agomelatine in the open field test. The data were obtained 1 and 21 days after 6-OHDA infusion. Values

are expressed as mean \pm SEM ($n = 12$ /group); * $p < 0.05$, in comparison with Sham animals; # $p < 0.05$, in comparison with 6-OHDA infused animals at Day 1 (Two-way ANOVA).

4. Discussion

Our present findings show that after infusion of 6-OHDA in SNpc, rats exhibited disturbances on circadian locomotor rhythms parameters, which most likely happened due to the induced loss of DA neurons in the substantia nigra (about 60%) and/or DA induced depletion. Despite unaffected total and dark phase activity, animals showed a more diurnal activity on the first week after lesion, which is opposed to the data of Fifel et al. (2013), that observed mice slightly more nocturnal after MPTP treatment. The robustness of locomotor activity rhythms and rhythm amplitude decreased post-infusion, what has also been observed in rotenone-lesioned rats (LAX et al., 2012); rhythm amplitude likewise diminished in rats lesioned with 6-OHDA in the striatum (BOULAMERY et al., 2010), and monkeys treated with MPTP (ALMIRALL et al., 2001). Regarding the acrophase, the animals had a significant phase advance in week 1 following the lesion (2h15min), agreeing with the study of Ben & Bruguerolle (2000) where 6-OHDA lesion in the striatum phase-advanced it in around 4 hours.

In the studies of Ben & Bruguerolle (2000) and Boulamery et al. (2010) the 6-OHDA infusions were directed to the striatum, and the neurotoxin concentration was higher, aiming total DA content depletion. Lax et al. (2012) using rotenone subcutaneously, and Fifel et al. (2013) using MPTP intraperitoneally, also aimed for a more pronounced lesion. In the present work, the 6-OHDA infusions were directed into SNpc region and performed with the objective of causing a partial lesion in dopaminergic neuron bodies without severe motor alterations, mimicking pre-motor stages of PD. This difference in models may explain the less pronounced impairment of circadian locomotor rhythm, and the restoration of rhythm robustness and acrophase after week 1 in the present study.

6-OHDA, after entering DA neurons, acts mainly by generating reactive oxygen species due to its oxidation which can occur spontaneously or can be catalyzed by monoamine oxidase (MAO) or iron (FERRO et al., 2005). Melatonin receptor agonists have been reported to exert direct free radical scavenging activity and indirect antioxidant activity via its stimulatory actions on the

antioxidant system (GUPTA; SHARMA, 2014). Animal models of PD induced by rotenone, MPTP and 6-OHDA demonstrated that melatonin have a neuroprotective effect (BORAH; MOHANAKUMAR, 2009; MA et al., 2009; BASSANI et al., 2014). About agomelatine treatment, Aguiar et al. (2013) observed that doses of 25 and 50 mg/kg showed antioxidant properties (decreased lipid peroxidation and nitrite content) in the brain of mice submitted to two chemically induced seizure models; and in the study of Gupta et al. (2015), the treatment attenuated tissue damage and the reduction of antioxidant enzymes in a model of vascular dementia induced by chronic cerebral hypoperfusion.

Thus, our hypothesis was that agomelatine would be able to protect neurons in SNpc from 6-OHDA oxidation. Our findings in experiment 2, showed that the infusion of 6-OHDA induced a partial reduction of SNpc TH-immunoreactive neurons (about 55%) in animals of 6-OHDA+veh group in comparison with Sham+veh group. As can be observed, animals infused with 6-OHDA and treated with agomelatine had a more discrete loss of DA neurons in comparison with Sham+veh group (about 40%), however, it was not a significant protection of dopaminergic neurons in the SNpc. Some authors postulate that melatonin have important pro-oxidative properties (WILLIS, 2008), and Tapias et al. (2010) showed that melatonin may exacerbate neurodegeneration in a rotenone model of PD (TAPIAS et al., 2010). In the present study, agomelatine did not exacerbate the neuron loss, nor did it significantly decrease it. One hypothesis is that agomelatine was not able to stimulate the antioxidant system before the increase in reactive oxygen species (ROS) induced by 6-OHDA.

The analysis in experiment 2 indicates that the chronic agomelatine treatment contributed significantly to the decrease of rhythm robustness and amplitude in rats treated with the drug. Agomelatine did not affect significantly the other circadian parameters. On the other hand, the Sham+ago group demonstrated a decrease in total activity, activity in dark phase, and rhythm amplitude on the first week after stereotaxic surgery, which are explained by individual variations and not by treatment. These individual variations may be more evident due to the limited number of animals in this experiment, which may likewise justify the absence of significant disturbances in circadian parameters induced by 6-OHDA lesion as expected.

Agomelatine efficacy to resynchronize experimentally altered circadian rhythms in rodents is well established by different models: following an 8-h phase advance of the light-dark cycle, agomelatine accelerates re-entrainment in rats; and is effective to entraining circadian rhythms of free-running rats in constant darkness; as well as corrects the abnormalities in the circadian rhythm of motor activity and sleep/wake cycle induced by prenatal restraint stress. In addition, agomelatine corrects age-related changes in circadian response to environmental stimulus in hamsters (REDMAN et al., 1995; MARTINET et al., 1996; REETH, VAN et al., 2001; MAIRESSE et al., 2013). However, none of these studies used a protocol with direct neurodegeneration induced by toxin. The lack of neuroprotection of agomelatine treatment is another possibly important factor for absence of significant changes on 6-OHDA+ago group circadian parameters.

Willner (1997) proposed that the reduction of the consumption of a sweet solution (e.g., sucrose, saccharin) in rats is a measure of anhedonia. In relation to experiment 3, the reduction of dopaminergic neurons in SNpc caused by the infusion of 6-OHDA led to a significant decrease in sucrose preference. As demonstrated in previous studies of our group (SANTIAGO et al., 2010, 2014), 6-OHDA intranigral that induce a partial lesion can lead to an anhedonic state after 21 days following the neurotoxin injection. However, we could not observe significant differences between groups, and the agomelatine treatment was not able to induce changes in the sucrose preference of animals. Differently, in the study of Papp et al.(2003), where rats were submitted to chronic mild stress as a model of major depression, agomelatine (50 mg/kg) managed to prevent the reduction in sucrose preference induced by stress after 4 weeks of chronic evening treatment (2h before the dark phase). It is important to note that monoamine reuptake inhibitors, as well as melatonin, were able to reverse the depressive-like behavior induced by SNpc lesion (CHENU et al., 2007; WINTER et al., 2007; BASSANI et al., 2014).

Depressive-like behavior have been attenuated by agomelatine in different models of depression as chronic mild stress, forced swimming test, and a transgenic mouse model of the neuroendocrine characteristics of depression (PAPP et al., 2003; BOURIN et al., 2004; BARDEN et al., 2005). Furthermore,

melatonin exerted neuroprotective and antidepressant-like effects in a rotenone model of PD (BASSANI et al., 2014).

We could not find in the literature any study that shows no antidepressant effect of agomelatine. Thus, we cannot explain the lack of agomelatine efficacy in preserving the basal levels of sucrose preference after lesion in our experimental schedule. However, considering that agomelatine antidepressant-like effect depends on 5-HT_{2c} receptor antagonism (RACAGNI et al., 2011), which indirectly increases dopamine and noradrenaline levels in the frontal cortex (MILLAN et al., 2003), one possible explanation is that the impairment of the nigrostriatal pathway and dopamine depletion can restrain this effect.

The open field test was performed in the present work to assess locomotor activity in a novel environment and discard possible motor bias in the other behavioral test. The results showed a significant interaction between lesion and time factor, indicating a motor impairment only 24 h after surgery in 6-OHDA-infused animals. This motor recovery has been previously reported and can be explained by the activation of compensatory plasticity mechanisms triggered by the remaining neurons, including changes in the number or affinity of dopaminergic receptors (SANTIAGO et al., 2010, 2014). Thus, locomotor activity did not interfere in sucrose preference.

The time of agomelatine administration (two hours before the onset of dark phase) applied in the present study have been reported previously (DAGYTE et al., 2011; MORLEY-FLETCHER et al., 2011; NORMAN et al., 2012) and seemed to improve or not interfere with the efficacy of treatments. In relation to locomotor activity, Millan et al. (2005) demonstrated a reduction spontaneous locomotor activity of rats after administration of agomelatine in doses equal or greater than 40 mg/kg. This can partially explain the decrease in locomotor activity and amplitude in Sham+ago group. However, Millan et al. (2005) conduct the motor test 30 minutes after agomelatine administration, which might not reflect the overall motor activity, since Bourin et al. (2004) submitted rats to forced swimming test and the immobility behavior diminished after repeated administration of agomelatine 50 mg/kg, and in the present study the data of the open field test showed a motor impairment only 24 h after toxin infusion. Moreover, Redman et al. (1995) conduct another spontaneous locomotor activity test, and agomelatine induced only moderate sedation at doses up to 64 mg/kg.

Our data indicate that locomotor rhythmicity is perturbed after a partial loss of DA neurons in SNpc, reinforcing the role of DA in circadian modulation. Agomelatine was not capable of protect dopaminergic neurons in the SNpc from 6-OHDA toxicity; moreover, agomelatine significantly decreased the rhythm robustness and was not able to induce significant changes on other circadian parameters and in sucrose preference impairment in SNpc lesioned rats. More studies will be necessary to better elucidate the influence of agomelatine in PD models.

Declaration of Interest

The authors report no conflicts of interest. This work was supported by grants from CNPq and CAPES, which had no further role in the study design; collection, analysis, and interpretation of the data; writing the report; and decision to submit the paper for publication. RA and MABFV are recipients of a CNPq fellowship.

References

AARSLAND, D.; PÅHLHAGEN, S.; BALLARD, C. G.; EHRT, U.; SVENNINGSSON, P. Depression in Parkinson disease—epidemiology, mechanisms and management. **Nature Reviews Neurology**, v. 8, n. 1, p. 35–47, 2011.

AGUIAR, C. C.; ALMEIDA, A. B.; ARAUJO, P. V; et al. Effects of agomelatine on oxidative stress in the brain of mice after chemically induced seizures. **Cellular and molecular neurobiology**, v. 33, n. 6, p. 825–835, 2013.

ALMIRALL, H.; BAUTISTA, V.; SÁNCHEZ-BAHILLO, A.; TRINIDAD-HERRERO, M. Ultradian and circadian body temperature and activity rhythms in chronic MPTP treated monkeys. **Neurophysiologie Clinique**, v. 31, n. 3, p. 161–170, 2001.

AVILA, A.; CARDONA, X.; MARTIN-BARANERA, M.; et al. Agomelatine for Depression in Parkinson Disease. **Journal of Clinical Psychopharmacology**, v. 35, n. 6, p. 1, 2015.

BAIER, P. C.; BRANISA, P.; KOCH, R.; et al. Circadian distribution of motor-activity in unilaterally 6-hydroxy-dopamine lesioned rats. **Experimental Brain Research**, v. 169, n. 2, p. 283–288, 2006.

BANASR, M.; SOUMIER, A.; HERY, M.; MOCAËR, E.; DASZUTA, A. Agomelatine, a New Antidepressant, Induces Regional Changes in

Hippocampal Neurogenesis. **Biological Psychiatry**, v. 59, n. 11, p. 1087–1096, 2006.

BARDEN, N.; SHINK, E.; LABBÉ, M.; et al. Antidepressant action of agomelatine (S 20098) in a transgenic mouse model. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 29, p. 908–916, 2005.

BASSANI, T. B.; GRADOWSKI, R. W.; ZAMINELLI, T.; et al. Neuroprotective and antidepressant-like effects of melatonin in a rotenone-induced Parkinson's disease model in rats. **Brain research**, v. 1593, p. 95–105, 2014.

BEN, V.; BRUGUEROLLE, B. Effects of bilateral striatal 6-OHDA lesions on circadian rhythms in the rat A radiotelemetric study. **Life Sciences**, v. 67, n. 13, p. 1549–1558, 2000.

BERARDIS, D. DE; IORIO, G. DI; ACCIAVATTI, T.; et al. The Emerging Role of Melatonin Agonists in the Treatment of Major Depression : Focus on Agomelatine. **CNS & Neurological Disorders**, v. 10, p. 119–132, 2011.

BODINAT, C. DE; GUARDIOLA-LEMAITRE, B.; MOCAËR, E.; et al. Agomelatine, the first melatonergic antidepressant: discovery, characterization and development. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 9, n. 8, p. 628–642, 2010.

BORAH, A.; MOHANAKUMAR, K. P. Melatonin inhibits 6-hydroxydopamine production in the brain to protect against experimental parkinsonism in rodents. **Journal of Pineal Research**, v. 47, n. 4, p. 293–300, 2009.

BOULAMERY, A.; SIMON, N.; VIDAL, J.; et al. Effects of L-Dopa on circadian rhythms of 6-OHDA striatal lesioned rats: a radiotelemetric study. **Chronobiology International**, v. 27, n. 2, p. 251–264, 2010.

BOURIN, M.; MOCAËR, E.; PORSOLT, R. Antidepressant-like activity of S 20098 (agomelatine) in the forced swimming test in rodents: involvement of melatonin and serotonin receptors. **Journal of psychiatry & neuroscience : JPN**, v. 29, n. 2, p. 126–33, 2004.

BOVÉ, J.; PERIER, C. Neurotoxin-based models of Parkinson's disease. **Neuroscience**, v. 211, p. 51–76, 2012.

BRAAK, H.; BRAAK, E. Pathoanatomy of Parkinson's disease. **Journal of neurology**, v. 247 Suppl, p. I13-I10, 2000.

CAPITELLI, C.; SERENIKI, A.; LIMA, M. M. S.; et al. Melatonin attenuates tyrosine hydroxylase loss and hypolocomotion in MPTP-lesioned rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 594, n. 1–3, p. 101–108, 2008.

CAROCCI, A.; CATALANO, A.; SINICROPI, M. S. Melatonergic drugs in development. **Clinical pharmacology : advances and applications**, v. 6, p. 127–37, 2014.

CHAUDHURI, K. R.; SCHAPIRA, A. H. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: dopaminergic pathophysiology and treatment. **The Lancet Neurology**, v. 8, n. 5, p. 464–474, 2009.

CHENU, F.; DAILLY, E.; BOURIN, M. Effect of antidepressant drugs on 6-OHDA-treated mice in the FST. **European Neuropsychopharmacology**, v. 17, n. 3, p. 187–193, 2007.

DAGYTE, G.; CRESCENTE, I.; POSTEMA, F.; et al. Agomelatine reverses the decrease in hippocampal cell survival induced by chronic mild stress. **Behavioural Brain Research**, v. 218, n. 1, p. 121–128, 2011.

DANIELSON, S. R.; ANDERSEN, J. K. Oxidative and nitrative protein modifications in Parkinson's disease. **Free radical biology & medicine**, v. 44, n. 10, p. 1787–94, 2008.

DAUER, W.; PRZEDBORSKI, S. Parkinson's disease: mechanisms and models. **Neuron**, v. 39, n. 6, p. 889–909, 2003.

DEMYTTENAERE, K. Agomelatine: A narrative review. **European Neuropsychopharmacology**, v. 21, p. S703–S709, 2011.

DEXTER, D. T.; JENNER, P. Parkinson disease: from pathology to molecular disease mechanisms. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 62, p. 132–144, 2013.

DORENBOS, R.; CONTINI, M.; HIRASAWA, H.; GUSTINCICH, S.; RAVIOLA, E. Expression of circadian clock genes in retinal dopaminergic cells. **Visual neuroscience**, v. 24, n. 4, p. 573–80, 2007.

FERRO, M. M.; BELLISSIMO, M. I.; ANSELMO-FRANCI, J. A.; et al. Comparison of bilaterally 6-OHDA- and MPTP-lesioned rats as models of the early phase of Parkinson's disease: Histological, neurochemical, motor and memory alterations. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 148, n. 1, p. 78–87, 2005.

FIFEL, K.; DKHISSI-BENYAHYA, O.; COOPER, H. M. Lack of long-term changes in circadian, locomotor, and cognitive functions in acute and chronic MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) mouse models of Parkinson's disease. **Chronobiology international**, v. 30, n. 6, p. 741–55, 2013.

FRISINA, P. G.; HAROUTUNIAN, V.; LIBOW, L. S. The neuropathological basis for depression in Parkinson's disease. **Parkinsonism and Related Disorders**, v. 15, n. 2, p. 144–148, 2009.

GRADOWSKI, R. W.; SANTIAGO, R. M.; ZAMINELLI, T.; et al. Antidepressant-like effect of curcumin in 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. **Current Trends in Neurology**, v. 7, p. 69–80, 2013.

GRADOWSKI, R. W.; ZAMINELLI, T.; BASSANI, T. B.; et al. Antidepressant and Antioxidative Effect of Ibuprofen in the Rotenone Model of Parkinson ' s Disease. **Neurotox Res**, v. 26, p. 351–362, 2014.

GRAVOTTA, L.; GAVRILA, A. M.; HOOD, S.; AMIR, S. Global depletion of dopamine using intracerebroventricular 6-hydroxydopamine injection disrupts normal circadian wheel-running patterns and PERIOD2 expression in the rat forebrain. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 45, n. 2, p. 162–171, 2011.

GROVER, S.; SOMAIYA, M.; KUMAR, S.; AVASTHI, A. Psychiatric aspects of Parkinson's disease. **Journal of neurosciences in rural practice**, v. 6, n. 1, p. 65–76, 2015.

GUARDIOLA-LEMAITRE, B.; BODINAT, C. DE; DELAGRANGE, P.; et al. Agomelatine: Mechanism of action and pharmacological profile in relation to antidepressant properties. **British Journal of Pharmacology**, v. 171, n. 15, p. 3604–3619, 2014.

GUPTA, S.; SHARMA, B. Pharmacological benefits of agomelatine and vanillin in experimental model of Huntington's disease. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 122, p. 122–35, 2014.

GUPTA, S.; SINGH, P.; SHARMA, B. M.; SHARMA, B. Neuroprotective effects of agomelatine and vinpocetine against chronic cerebral hypoperfusion induced vascular dementia. **Current neurovascular research**, p. 240–252, 2015.

HANOUN, N.; MOCAËR, E.; BOYER, P.-A.; HAMON, M.; LANFUMEY, L. Differential effects of the novel antidepressant agomelatine (S 20098) versus fluoxetine on 5-HT_{1A} receptors in the rat brain. **Neuropharmacology**, v. 47, n. 4, p. 515–26, 2004.

HARDELAND, R.; CARDINALI, D. P.; SRINIVASAN, V.; et al. Melatonin—A pleiotropic, orchestrating regulator molecule. **Progress in Neurobiology**, v. 93, n. 3, p. 350–384, 2011.

HOOD, S.; CASSIDY, P.; COSSETTE, M.-P.; et al. Endogenous dopamine regulates the rhythm of expression of the clock protein PER2 in the rat dorsal striatum via daily activation of D2 dopamine receptors. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 30, n. 42, p. 14046–14058, 2010.

HUANG, K.-L.; LU, W.-C.; WANG, Y.-Y.; et al. Comparison of agomelatine and selective serotonin reuptake inhibitors/serotonin-norepinephrine reuptake inhibitors in major depressive disorder: A meta-analysis of head-to-head randomized clinical trials. **The Australian and New Zealand journal of psychiatry**, v. 48, n. 7, p. 663–671, 2014.

ISCHIROPOULOS, H.; BECKMAN, J. S. Oxidative stress and nitration in neurodegeneration: Cause, effect, or association? **Journal of Clinical**

Investigation, v. 111, n. 2, p. 163–169, 2003.

LAX, P.; ESQUIVA, G.; ESTEVE-RUDD, J.; et al. Circadian Dysfunction in a Rotenone-Induced Parkinsonian Rodent Model. **Chronobiology International**, v. 29, n. 2, p. 147–156, 2012.

LEES, A. J.; HARDY, J.; REVESZ, T. Parkinson's disease. **The Lancet**, v. 373, n. 9680, p. 2055–2066, 2009.

LEON, J.; ACUÑA-CASTROVIEJO, D.; SAINZ, R. M.; et al. Melatonin and mitochondrial function. **Life Sciences**, v. 75, n. 7, p. 765–790, 2004.

LI, S.; WANG, Y.; WANG, F.; HU, L.-F.; LIU, C.-F. A New Perspective for Parkinson's Disease: Circadian Rhythm. **Neuroscience Bulletin**, v. 33, n. 1, p. 62–72, 2017.

LIEBERMAN, A. Depression in Parkinson's disease - a review. **Acta Neurologica Scandinavica**, v. 113, n. 1, p. 1–8, 2006.

LIMA, M. M. S. Sleep disturbances in Parkinson's disease: The contribution of dopamine in REM sleep regulation. **Sleep Medicine Reviews**, v. 17, n. 5, p. 367–375, 2013.

LIMA, M. M. S.; ANDERSEN, M. L.; REKSIDLER, A. B.; VITAL, M. A. B. F.; TUFIK, S. The role of the substantia nigra pars compacta in regulating sleep patterns in rats. **PLoS ONE**, v. 2, n. 6, p. 1–7, 2007.

LIU, J.; CLOUGH, S. J.; HUTCHINSON, A. J.; et al. MT 1 and MT 2 Melatonin Receptors: A Therapeutic Perspective. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 56, n. 1, p. 361–383, 2016.

MA, J.; SHAW, V. E.; MITROFANIS, J. Does melatonin help save dopaminergic cells in MPTP-treated mice? **Parkinsonism and Related Disorders**, v. 15, n. 4, p. 307–314, 2009.

MAIRESSE, J.; SILLETTI, V.; LALOUX, C.; et al. Chronic agomelatine treatment corrects the abnormalities in the circadian rhythm of motor activity and sleep/wake cycle induced by prenatal restraint stress in adult rats. **Int J Neuropsychopharmacol**, v. 16, n. 2, p. 323–338, 2013.

MARTINET, L.; GUARDIOLA-LEMAITRE, B.; MOCAER, E. Entrainment of circadian rhythms by S-20098, a melatonin agonist, is dose and plasma concentration dependent. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 54, n. 4, p. 713–718, 1996.

MARTYNHAK, B. J.; CORREIA, D.; MORAIS, L. H.; et al. Neonatal exposure to constant light prevents anhedonia-like behavior induced by constant light exposure in adulthood. **Behavioural Brain Research**, v. 222, n. 1, p. 10–14, 2011.

MCCLUNG, C. A. Circadian rhythms, the mesolimbic dopaminergic circuit, and drug addiction. **The Scientific World Journal**, v. 7, n. S2, p. 194–202, 2007a.

MCCLUNG, C. A. Circadian genes, rhythms and the biology of mood disorders. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 114, n. 2, p. 222–232, 2007b.

MENDOZA, J.; CHALLET, E. Circadian insights into dopamine mechanisms. **Neuroscience**, v. 282, p. 230–242, 2014.

MILLAN, M. J.; BROCCO, M.; GOBERT, A.; DEKEYNE, A. Anxiolytic properties of agomelatine, an antidepressant with melatonergic and serotonergic properties: Role of 5-HT_{2C} receptor blockade. **Psychopharmacology**, v. 177, n. 4, p. 1–12, 2005.

MILLAN, M. J.; GOBERT, A.; LEJEUNE, F.; et al. The novel melatonin agonist agomelatine (S20098) is an antagonist at 5-hydroxytryptamine_{2C} receptors, blockade of which enhances the activity of frontocortical dopaminergic and adrenergic pathways. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 306, n. 3, p. 954–964, 2003.

MORLEY-FLETCHER, S.; MAIRESSE, J.; SOUMIER, A.; et al. Chronic agomelatine treatment corrects behavioral, cellular, and biochemical abnormalities induced by prenatal stress in rats. **Psychopharmacology**, v. 217, n. 3, p. 301–13, 2011.

MUZERENGI, S.; CONTRAFATTO, D.; CHAUDHURI, K. R. Non-motor symptoms: identification and management. **Parkinsonism & related disorders**, v. 13 Suppl 3, p. S450-6, 2007.

NORMAN, T. R. Dysfunctional Circadian Rhythms and Mood Disorders: Opportunities for Novel Therapeutic Approaches. **Depression: From Psychopathology to Pharmacotherapy**, v. 27, p. 32–52, 2010.

NORMAN, T. R.; CRANSTON, I.; IRONS, J. A.; et al. Agomelatine suppresses locomotor hyperactivity in olfactory bulbectomised rats : A comparison to melatonin and to the 5-HT_{2c} antagonist , S32006. **European Journal of Pharmacology**, v. 674, n. 1, p. 27–32, 2012.

OERTEL, W.; SCHULZ, J. B. Current and experimental treatments of Parkinson disease: A guide for neuroscientists. **Journal of Neurochemistry**, v. 139, p. 325–337, 2016.

OLANOW, C. W. The Pathogenesis of Cell Death in Parkinson's Disease. **Movement Disorders**, v. 22, p. 335–342, 2007.

OSSOWSKA, K.; LORENC-KOCI, E. Depression in Parkinson's disease. **Pharmacological Reports**, v. 65, n. 6, p. 1545–1557, 2013.

PANDI-PERUMAL, S. R.; TRAKHT, I.; SRINIVASAN, V.; et al. Physiological effects of melatonin: Role of melatonin receptors and signal transduction

pathways. **Progress in Neurobiology**, v. 85, n. 3, p. 335–353, 2008.

PAPP, M.; GRUCA, P.; BOYER, P.-A.; MOCAËR, E. Effect of agomelatine in the chronic mild stress model of depression in the rat.

Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology, v. 28, n. 4, p. 694–703, 2003.

PAPP, M.; WILLNER, P.; MUSCAT, R. An animal model of anhedonia: attenuation of sucrose consumption and place preference conditioning by chronic unpredictable mild stress. **Psychopharmacology**, v. 104, n. 2, p. 255–9, 1991.

PAXINOS, G.; WATSON, C. R. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates**. Academic Press, 2007.

POEGGELER, B.; SAARELA, S.; REITER, R. J.; et al. Melatonin--a highly potent endogenous radical scavenger and electron donor: new aspects of the oxidation chemistry of this indole accessed in vitro. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 738, p. 419–20, 1994.

PRZEDBORSKI, S. Pathogenesis of nigral cell death in Parkinson's disease. **Parkinsonism & Related Disorders**, v. 11, p. S3–S7, 2005.

RACAGNI, G.; RIVA, M. A.; MOLTENI, R.; et al. Mode of action of agomelatine: synergy between melatonergic and 5-HT_{2C} receptors. **The world journal of biological psychiatry : the official journal of the World Federation of Societies of Biological Psychiatry**, v. 12, n. 8, p. 574–87, 2011.

RAINER, Q.; XIA, L.; GUILLOUX, J.-P. P.; et al. Beneficial behavioural and neurogenic effects of agomelatine in a model of depression/anxiety. **Int J Neuropsychopharmacol**, v. 15, n. 3, p. 1–15, 2011.

REDMAN, J. R.; BROWN, M.; GUARDIOLA-LEMAITRE, B.; DELAGRANGE, P.; ARMSTRONG, S. M. Dose dependent effects of S-20098, a melatonin agonist, on direction of re-entrainment of rat circadian activity rhythms. **Psychopharmacology**, v. 118, p. 385–390, 1995.

REETH, O. VAN; OLIVARES, E.; ZHANG, Y.; et al. Comparative effects of a melatonin agonist on the circadian system in mice and Syrian hamsters. **Brain research**, v. 762, n. 1–2, p. 185–94, 1997.

REETH, O. VAN; WEIBEL, L.; OLIVARES, E.; et al. Melatonin or a melatonin agonist corrects age-related changes in circadian response to environmental stimulus. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 280, n. 5, p. R1582-91, 2001.

REFINETTI, R. Non-stationary time series and the robustness of circadian rhythms. **Journal of Theoretical Biology**, v. 227, n. 4, p. 571–581, 2004.

RUAN, G. X.; ALLEN, G. C.; YAMAZAKI, S.; MCMAHON, D. G. An autonomous

circadian clock in the inner mouse retina regulated by dopamine and GABA. **PLoS Biology**, v. 6, n. 10, p. 2248–2265, 2008.

SAN, L.; ARRANZ, B. Agomelatine: A novel mechanism of antidepressant action involving the melatonergic and the serotonergic system. **European Psychiatry**, v. 23, p. 396–402, 2008.

SANTIAGO, R. M.; BARBIEIRO, J.; LIMA, M. M. S.; et al. Depressive-like behaviors alterations induced by intranigral MPTP, 6-OHDA, LPS and rotenone models of Parkinson's disease are predominantly associated with serotonin and dopamine. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 34, n. 6, p. 1104–1114, 2010.

SANTIAGO, R. M.; BARBIERO, J.; GRADOWSKI, R. W.; et al. Induction of depressive-like behavior by intranigral 6-OHDA is directly correlated with deficits in striatal dopamine and hippocampal serotonin. **Behavioural Brain Research**, v. 259, p. 70–77, 2014.

SANTIAGO, R. M.; TONIN, F. S.; BARBIERO, J.; et al. The nonsteroidal antiinflammatory drug piroxicam reverses the onset of depressive-like behavior in 6-OHDA animal model of Parkinson's disease. **Neuroscience**, v. 300, p. 246–253, 2015.

SCHINTU, N.; ZHANG, X.; SVENNINGSSON, P. Studies of Depression-Related States in Animal Models of Parkinsonism. **Journal of Parkinson's Disease**, v. 2, n. 2, p. 87–106, 2012.

SCHMID, B.; HELFRICH-FÖRSTER, C.; YOSHII, T. A New ImageJ Plug-in "ActogramJ" for Chronobiological Analyses. **Journal of biological rhythms**, v. 26, n. 5, p. 464–467, 2011.

SOTO-OTERO, R.; MÉNDEZ-ALVAREZ, E.; HERMIDA-AMEIJEIRAS, A.; MUÑOZ-PATIÑO, A. M.; LABANDEIRA-GARCIA, J. L. Autoxidation and neurotoxicity of 6-hydroxydopamine in the presence of some antioxidants: potential implication in relation to the pathogenesis of Parkinson's disease. **Journal of neurochemistry**, v. 74, n. 4, p. 1605–12, 2000.

SRINIVASAN, V.; CARDINALI, D. P.; SRINIVASAN, U. S.; et al. Therapeutic potential of melatonin and its analogs in Parkinson's disease: focus on sleep and neuroprotection. **Therapeutic Advances in Neurological Disorders**, v. 4, n. 5, p. 297–317, 2011.

TADAIESKY, M. T.; DOMBROWSKI, P. A.; FIGUEIREDO, C. P.; et al. Emotional, cognitive and neurochemical alterations in a premotor stage model of Parkinson's disease. **Neuroscience**, v. 156, n. 4, p. 830–840, 2008. TANNER, C. M. Advances in Environmental Epidemiology. **Movement Disorders**, v. 25, p. 58–62, 2010.

TAPIAS, V.; CANNON, J. R.; GREENAMYRE, J. T. Melatonin treatment potentiates neurodegeneration in a rat rotenone parkinson's disease model.

Journal of Neuroscience Research, v. 88, n. 2, p. 420–427, 2010.

TARDITO, D.; MOLTENI, R.; POPOLI, M.; RACAGNI, G. Synergistic mechanisms involved in the antidepressant effects of agomelatine. **European Neuropsychopharmacology**, v. 22, n. SUPPL3, p. S482–S486, 2012.

TARGA, A. D. S.; RODRIGUES, L. S.; NOSEDA, A. C. D.; et al. Unraveling a new circuitry for sleep regulation in Parkinson's disease. **Neuropharmacology**, v. 108, p. 161–171, 2016.

TOLOSA, E.; COMPTA, Y.; GAIG, C. The premotor phase of Parkinson's disease. **Parkinsonism & Related Disorders**, v. 13, n. SUPPL. SEPT., p. S2–S7, 2007.

TRUONG, D. D.; BHIDAYASIRI, R.; WOLTERS, E. Management of non-motor symptoms in advanced Parkinson disease. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 266, n. 1–2, p. 216–228, 2008.

TSANG, A. H. K.; CHUNG, K. K. K. Oxidative and nitrosative stress in Parkinson's disease. **BBA - Molecular Basis of Disease**, v. 1792, n. 7, p. 643–650, 2009.

VERWEY, M.; DHIR, S.; AMIR, S. Circadian influences on dopamine circuits of the brain: regulation of striatal rhythms of clock gene expression and implications for psychopathology and disease. **F1000Research**, v. 5, p. 2062, 2016.

VIDENOVIC, A.; GOLOMBEK, D. Circadian and sleep disorders in Parkinson's disease. **Experimental Neurology**, v. 243, p. 45–56, 2013. Elsevier Inc.
VIDENOVIC, A.; NOBLE, C.; REID, K. J.; et al. Circadian melatonin rhythm and excessive daytime sleepiness in Parkinson's disease. **JAMA neurology**, v. 71, n. 4, p. 463–469, 2014.

VIDENOVIC, A.; WILLIS, G. L. Circadian system - A novel diagnostic and therapeutic target in Parkinson's disease? **Movement Disorders**, v. 31, n. 3, p. 260–269, 2016.

WANG, S.; ZHANG, Z.; GUO, Y.; et al. Anhedonia and activity deficits in rats: impact of post-stroke depression. **Journal of Psychopharmacology**, v. 23, n. 3, p. 295–304, 2009.

WILLIS, G. L. Parkinson's Disease as a Neuroendocrine Disorder of Circadian Function : Dopamine-Melatonin Imbalance and the Visual System in the Genesis and Progression of the Degenerative Process. **Reviews in the Neurosciences**, v. 19, n. 4, p. 245–316, 2008.

WILLISON, L. D.; KUDO, T.; LOH, D. H.; KULJIS, D.; COLWELL, C. S. Circadian dysfunction may be a key component of the non-motor symptoms of Parkinson's disease: Insights from a transgenic mouse model. **Experimental Neurology**, v. 243, p. 57–66, 2013.

WILLNER, P. Validity , reliability and utility of the chronic mild stress model of depression : a 10-year review and evaluation. **Psychopharmacology**, v. 134, p. 319–329, 1997.

WINTER, C.; RUMOHR, A. VON; MUNDT, A.; et al. Lesions of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta and in the ventral tegmental area enhance depressive-like behavior in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 184, n. 2, p. 133–141, 2007.

ZUPANCIC, M.; GUILLEMINAULT, C. Agomelatine: A preliminary review of a new antidepressant. **CNS drugs**, v. 20, n. 12, p. 981–992, 2006.

4 CONCLUSÕES

4.1 CONCLUSÃO GERAL

A agomelatina piorou o ritmo circadiano da atividade locomotora, e não afetou o comportamento tipo-depressivo de ratos no modelo de DP induzido por 6-OHDA intranigral.

4.2 CONCLUSÕES ESPECÍFICAS

A infusão de 6-OHDA provocou uma redução parcial, mas significativa dos neurônios imunorreativos à TH na SNpc (aproximadamente 60%) dos animais.

Os animais apresentaram diminuição da robustez do ritmo circadiano da atividade locomotora e um avanço de fase da acrofase na primeira semana após a infusão da toxina. E na terceira semana pós-infusão a amplitude do ritmo também diminuiu.

Na segunda parte do estudo os animais infundidos com 6-OHDA na SNpc e tratados com agomelatina de forma prolongada (50 mg/kg; 22 dias) não apresentaram uma proteção contra a lesão.

O tratamento com agomelatina ainda levou a uma diminuição da robustez e da amplitude do ritmo da atividade locomotora quando comparados os animais tratados e não tratados, e não influenciou significativamente os outros parâmetros.

Na terceira parte, a infusão de 6-OHDA levou, de forma geral, a uma diminuição da preferência por sacarose nos grupos experimentais. Mas não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos. O tratamento prolongado com agomelatina não foi capaz de provocar mudanças significativas na preferência por sacarose.

Os animais que foram submetidos à lesão com 6-OHDA apresentaram um prejuízo motor 24 h após a infusão da toxina. No teste ao fim do experimento os animais lesados não mostraram prejuízo na atividade locomotora.

REFERÊNCIAS

- AARSLAND, D.; PÅHLHAGEN, S.; BALLARD, C. G.; EHRT, U.; SVENNINGSSON, P. Depression in Parkinson disease—epidemiology, mechanisms and management. **Nature Reviews Neurology**, v. 8, n. 1, p. 35–47, 2011.
- AGUIAR, C. C.; ALMEIDA, A. B.; ARAUJO, P. V; et al. Effects of agomelatine on oxidative stress in the brain of mice after chemically induced seizures. **Cellular and molecular neurobiology**, v. 33, n. 6, p. 825–835, 2013.
- AVILA, A.; CARDONA, X.; MARTIN-BARANERA, M.; et al. Agomelatine for Depression in Parkinson Disease. **Journal of Clinical Psychopharmacology**, v. 35, n. 6, p. 1, 2015.
- BAIER, P. C.; BRANISA, P.; KOCH, R.; et al. Circadian distribution of motor-activity in unilaterally 6-hydroxy-dopamine lesioned rats. **Experimental Brain Research**, v. 169, n. 2, p. 283–288, 2006.
- BANASR, M.; SOUMIER, A.; HERY, M.; MOCAËR, E.; DASZUTA, A. Agomelatine, a New Antidepressant, Induces Regional Changes in Hippocampal Neurogenesis. **Biological Psychiatry**, v. 59, n. 11, p. 1087–1096, 2006.
- BASSANI, T. B.; GRADOWSKI, R. W.; ZAMINELLI, T.; et al. Neuroprotective and antidepressant-like effects of melatonin in a rotenone-induced Parkinson's disease model in rats. **Brain research**, v. 1593, p. 95–105, 2014.
- BERARDIS, D. DE; IORIO, G. DI; ACCIAVATTI, T.; et al. The Emerging Role of Melatonin Agonists in the Treatment of Major Depression : Focus on Agomelatine. **CNS & Neurological Disorders**, v. 10, p. 119–132, 2011.
- BODINAT, C. DE; GUARDIOLA-LEMAITRE, B.; MOCAËR, E.; et al. Agomelatine, the first melatonergic antidepressant: discovery, characterization and development. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 9, n. 8, p. 628–642, 2010.
- BOURIN, M.; MOCAËR, E.; PORSOLT, R. Antidepressant-like activity of S 20098 (agomelatine) in the forced swimming test in rodents: involvement of melatonin and serotonin receptors. **Journal of psychiatry & neuroscience : JPN**, v. 29, n. 2, p. 126–33, 2004.
- BOVÉ, J.; PERIER, C. Neurotoxin-based models of Parkinson's disease. **Neuroscience**, v. 211, p. 51–76, 2012.
- BRAAK, H.; BRAAK, E. Pathoanatomy of Parkinson's disease. **Journal of neurology**, v. 247 Suppl, p. I13-I10, 2000.
- CAROCCI, A.; CATALANO, A.; SINICROPI, M. S. Melatonergic drugs in development. **Clinical pharmacology : advances and applications**, v. 6, p.

127–37, 2014.

CHAUDHURI, K. R.; SCHAPIRA, A. H. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: dopaminergic pathophysiology and treatment. **The Lancet Neurology**, v. 8, n. 5, p. 464–474, 2009.

DAGYTE, G.; CRESCENTE, I.; POSTEMA, F.; et al. Agomelatine reverses the decrease in hippocampal cell survival induced by chronic mild stress. **Behavioural Brain Research**, v. 218, n. 1, p. 121–128, 2011.

DANIELSON, S. R.; ANDERSEN, J. K. Oxidative and nitrative protein modifications in Parkinson's disease. **Free radical biology & medicine**, v. 44, n. 10, p. 1787–94, 2008.

DAUER, W.; PRZEDBORSKI, S. Parkinson's disease: mechanisms and models. **Neuron**, v. 39, n. 6, p. 889–909, 2003.

DEMYTTENAERE, K. Agomelatine: A narrative review. **European Neuropsychopharmacology**, v. 21, p. S703–S709, 2011.

DEXTER, D. T.; JENNER, P. Parkinson disease: from pathology to molecular disease mechanisms. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 62, p. 132–144, 2013.

DORENBOS, R.; CONTINI, M.; HIRASAWA, H.; GUSTINCICH, S.; RAVIOLA, E. Expression of circadian clock genes in retinal dopaminergic cells. **Visual neuroscience**, v. 24, n. 4, p. 573–80, 2007.

GRADOWSKI, R. W.; ZAMINELLI, T.; BASSANI, T. B.; et al. Antidepressant and Antioxidative Effect of Ibuprofen in the Rotenone Model of Parkinson's Disease. **Neurotox Res**, v. 26, p. 351–362, 2014.

GRAVOTTA, L.; GAVRILA, A. M.; HOOD, S.; AMIR, S. Global depletion of dopamine using intracerebroventricular 6-hydroxydopamine injection disrupts normal circadian wheel-running patterns and PERIOD2 expression in the rat forebrain. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 45, n. 2, p. 162–171, 2011.

GROVER, S.; SOMAIYA, M.; KUMAR, S.; AVASTHI, A. Psychiatric aspects of Parkinson's disease. **Journal of neurosciences in rural practice**, v. 6, n. 1, p. 65–76, 2015.

GUARDIOLA-LEMAITRE, B.; BODINAT, C. DE; DELAGRANGE, P.; et al. Agomelatine: Mechanism of action and pharmacological profile in relation to antidepressant properties. **British Journal of Pharmacology**, v. 171, n. 15, p. 3604–3619, 2014.

GUPTA, S.; SHARMA, B. Pharmacological benefits of agomelatine and vanillin in experimental model of Huntington's disease. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 122, p. 122–35, 2014.

GUPTA, S.; SINGH, P.; SHARMA, B. M.; SHARMA, B. Neuroprotective effects of agomelatine and vinpocetine against chronic cerebral hypoperfusion induced vascular dementia. **Current neurovascular research**, p. 240–252, 2015.

HANOUN, N.; MOCAËR, E.; BOYER, P.-A.; HAMON, M.; LANFUMEY, L. Differential effects of the novel antidepressant agomelatine (S 20098) versus fluoxetine on 5-HT_{1A} receptors in the rat brain. **Neuropharmacology**, v. 47, n. 4, p. 515–26, 2004.

HARDELAND, R.; CARDINALI, D. P.; SRINIVASAN, V.; et al. Melatonin—A pleiotropic, orchestrating regulator molecule. **Progress in Neurobiology**, v. 93, n. 3, p. 350–384, 2011.

HOOD, S.; CASSIDY, P.; COSSETTE, M.-P.; et al. Endogenous dopamine regulates the rhythm of expression of the clock protein PER2 in the rat dorsal striatum via daily activation of D2 dopamine receptors. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 30, n. 42, p. 14046–14058, 2010.

HUANG, K.-L.; LU, W.-C.; WANG, Y.-Y.; et al. Comparison of agomelatine and selective serotonin reuptake inhibitors/serotonin-norepinephrine reuptake inhibitors in major depressive disorder: A meta-analysis of head-to-head randomized clinical trials. **The Australian and New Zealand journal of psychiatry**, v. 48, n. 7, p. 663–671, 2014.

ISCHIROPOULOS, H.; BECKMAN, J. S. Oxidative stress and nitration in neurodegeneration: Cause, effect, or association? **Journal of Clinical Investigation**, v. 111, n. 2, p. 163–169, 2003.

LEES, A. J.; HARDY, J.; REVESZ, T. Parkinson's disease. **The Lancet**, v. 373, n. 9680, p. 2055–2066, 2009.

LEON, J.; ACUÑA-CASTROVIEJO, D.; SAINZ, R. M.; et al. Melatonin and mitochondrial function. **Life Sciences**, v. 75, n. 7, p. 765–790, 2004.

LI, S.; WANG, Y.; WANG, F.; HU, L.-F.; LIU, C.-F. A New Perspective for Parkinson's Disease: Circadian Rhythm. **Neuroscience Bulletin**, v. 33, n. 1, p. 62–72, 2017.

LIEBERMAN, A. Depression in Parkinson's disease - a review. **Acta Neurologica Scandinavica**, v. 113, n. 1, p. 1–8, 2006.

LIMA, M. M. S. Sleep disturbances in Parkinson's disease: The contribution of dopamine in REM sleep regulation. **Sleep Medicine Reviews**, v. 17, n. 5, p. 367–375, 2013.

LIU, J.; CLOUGH, S. J.; HUTCHINSON, A. J.; et al. MT 1 and MT 2 Melatonin Receptors: A Therapeutic Perspective. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 56, n. 1, p. 361–383, 2016.

- MAIRESSE, J.; SILLETTI, V.; LALOUX, C.; et al. Chronic agomelatine treatment corrects the abnormalities in the circadian rhythm of motor activity and sleep/wake cycle induced by prenatal restraint stress in adult rats. **Int J Neuropsychopharmacol**, v. 16, n. 2, p. 323–338, 2013.
- MARTINET, L.; GUARDIOLA-LEMAITRE, B.; MOCAER, E. Entrainment of circadian rhythms by S-20098, a melatonin agonist, is dose and plasma concentration dependent. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 54, n. 4, p. 713–718, 1996.
- MARTYNHAK, B. J.; CORREIA, D.; MORAIS, L. H.; et al. Neonatal exposure to constant light prevents anhedonia-like behavior induced by constant light exposure in adulthood. **Behavioural Brain Research**, v. 222, n. 1, p. 10–14, 2011.
- MCCLUNG, C. A. Circadian rhythms, the mesolimbic dopaminergic circuit, and drug addiction. **The Scientific World Journal**, v. 7, n. S2, p. 194–202, 2007.
- MENDOZA, J.; CHALLET, E. Circadian insights into dopamine mechanisms. **Neuroscience**, v. 282, p. 230–242, 2014.
- MILLAN, M. J.; GOBERT, A.; LEJEUNE, F.; et al. The novel melatonin agonist agomelatine (S20098) is an antagonist at 5-hydroxytryptamine_{2C} receptors, blockade of which enhances the activity of frontocortical dopaminergic and adrenergic pathways. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 306, n. 3, p. 954–964, 2003.
- MUZERENGI, S.; CONTRAFATTO, D.; CHAUDHURI, K. R. Non-motor symptoms: identification and management. **Parkinsonism & related disorders**, v. 13 Suppl 3, p. S450-6, 2007.
- NORMAN, T. R. Dysfunctional Circadian Rhythms and Mood Disorders: Opportunities for Novel Therapeutic Approaches. **Depression: From Psychopathology to Pharmacotherapy**, v. 27, p. 32–52, 2010.
- OERTEL, W.; SCHULZ, J. B. Current and experimental treatments of Parkinson disease: A guide for neuroscientists. **Journal of Neurochemistry**, v. 139, p. 325–337, 2016.
- OLANOW, C. W. The Pathogenesis of Cell Death in Parkinson's Disease. **Movement Disorders**, v. 22, p. 335–342, 2007.
- OSSOWSKA, K.; LORENC-KOCI, E. Depression in Parkinson's disease. **Pharmacological Reports**, v. 65, n. 6, p. 1545–1557, 2013.
- PANDI-PERUMAL, S. R.; TRAKHT, I.; SRINIVASAN, V.; et al. Physiological effects of melatonin: Role of melatonin receptors and signal transduction pathways. **Progress in Neurobiology**, v. 85, n. 3, p. 335–353, 2008.
- PAPP, M.; GRUCA, P.; BOYER, P.-A.; MOCAËR, E. Effect of agomelatine in the chronic mild stress model of depression in the rat.

Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology, v. 28, n. 4, p. 694–703, 2003.

POEGGELER, B.; SAARELA, S.; REITER, R. J.; et al. Melatonin--a highly potent endogenous radical scavenger and electron donor: new aspects of the oxidation chemistry of this indole accessed in vitro. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 738, p. 419–20, 1994.

PRZEDBORSKI, S. Pathogenesis of nigral cell death in Parkinson's disease. **Parkinsonism & Related Disorders**, v. 11, p. S3–S7, 2005.

RACAGNI, G.; RIVA, M. A.; MOLTENI, R.; et al. Mode of action of agomelatine: synergy between melatonergic and 5-HT_{2C} receptors. **The world journal of biological psychiatry : the official journal of the World Federation of Societies of Biological Psychiatry**, v. 12, n. 8, p. 574–87, 2011.

RAINER, Q.; XIA, L.; GUILLOUX, J.-P. P.; et al. Beneficial behavioural and neurogenic effects of agomelatine in a model of depression/anxiety. **Int J Neuropsychopharmacol**, v. 15, n. 3, p. 1–15, 2011.

REDMAN, J. R.; BROWN, M.; GUARDIOLA-LEMAITRE, B.; DELAGRANGE, P.; ARMSTRONG, S. M. Dose dependent effects of S-20098, a melatonin agonist, on direction of re-entrainment of rat circadian activity rhythms. **Psychopharmacology**, v. 118, p. 385–390, 1995.

REETH, O. VAN; OLIVARES, E.; ZHANG, Y.; et al. Comparative effects of a melatonin agonist on the circadian system in mice and Syrian hamsters. **Brain research**, v. 762, n. 1–2, p. 185–94, 1997.

RUAN, G. X.; ALLEN, G. C.; YAMAZAKI, S.; MCMAHON, D. G. An autonomous circadian clock in the inner mouse retina regulated by dopamine and GABA. **PLoS Biology**, v. 6, n. 10, p. 2248–2265, 2008.

SANTIAGO, R. M.; TONIN, F. S.; BARBIERO, J.; et al. The nonsteroidal antiinflammatory drug piroxicam reverses the onset of depressive-like behavior in 6-OHDA animal model of Parkinson's disease. **Neuroscience**, v. 300, p. 246–253, 2015.

SCHINTU, N.; ZHANG, X.; SVENNINGSSON, P. Studies of Depression-Related States in Animal Models of Parkinsonism. **Journal of Parkinson's Disease**, v. 2, n. 2, p. 87–106, 2012.

SOTO-OTERO, R.; MÉNDEZ-ALVAREZ, E.; HERMIDA-AMEIJEIRAS, A.; MUÑOZ-PATIÑO, A. M.; LABANDEIRA-GARCIA, J. L. Autoxidation and neurotoxicity of 6-hydroxydopamine in the presence of some antioxidants: potential implication in relation to the pathogenesis of Parkinson's disease. **Journal of neurochemistry**, v. 74, n. 4, p. 1605–12, 2000.

SRINIVASAN, V.; CARDINALI, D. P.; SRINIVASAN, U. S.; et al. Therapeutic potential of melatonin and its analogs in Parkinson's disease: focus on sleep

and neuroprotection. **Therapeutic Advances in Neurological Disorders**, v. 4, n. 5, p. 297–317, 2011.

TANNER, C. M. Advances in Environmental Epidemiology. **Movement Disorders**, v. 25, p. 58–62, 2010.

TARDITO, D.; MOLTENI, R.; POPOLI, M.; RACAGNI, G. Synergistic mechanisms involved in the antidepressant effects of agomelatine. **European Neuropsychopharmacology**, v. 22, n. SUPPL3, p. S482–S486, 2012.

TARGA, A. D. S.; RODRIGUES, L. S.; NOSEDA, A. C. D.; et al. Unraveling a new circuitry for sleep regulation in Parkinson's disease. **Neuropharmacology**, v. 108, p. 161–171, 2016.

TRUONG, D. D.; BHIDAYASIRI, R.; WOLTERS, E. Management of non-motor symptoms in advanced Parkinson disease. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 266, n. 1–2, p. 216–228, 2008.

TSANG, A. H. K.; CHUNG, K. K. K. Oxidative and nitrosative stress in Parkinson's disease. **BBA - Molecular Basis of Disease**, v. 1792, n. 7, p. 643–650, 2009.

VIDENOVIC, A.; GOLOMBEK, D. Circadian and sleep disorders in Parkinson's disease. **Experimental Neurology**, v. 243, p. 45–56, 2013. Elsevier Inc.
VIDENOVIC, A.; NOBLE, C.; REID, K. J.; et al. Circadian melatonin rhythm and excessive daytime sleepiness in Parkinson's disease. **JAMA neurology**, v. 71, n. 4, p. 463–469, 2014.

VIDENOVIC, A.; WILLIS, G. L. Circadian system - A novel diagnostic and therapeutic target in Parkinson's disease? **Movement Disorders**, v. 31, n. 3, p. 260–269, 2016.

WILLISON, L. D.; KUDO, T.; LOH, D. H.; KULJIS, D.; COLWELL, C. S. Circadian dysfunction may be a key component of the non-motor symptoms of Parkinson's disease: Insights from a transgenic mouse model. **Experimental Neurology**, v. 243, p. 57–66, 2013.

ZUPANCIC, M.; GUILLEMINAULT, C. Agomelatine: A preliminary review of a new antidepressant. **CNS drugs**, v. 20, n. 12, p. 981–992, 2006.