

RONISE MARTINS SANTIAGO

**PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA SEROTONÉRGICO NA
DEPRESSÃO ASSOCIADA AO MODELO ANIMAL DA DP
6-OHDA: EFEITO DOS ANTIDEPRESSIVOS E DOS
ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO ESTEROIDAIIS**

**DOUTORADO FARMACOLOGIA-UFPR
CURITIBA-PR
2014**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANA

**Participação do sistema serotoninérgico na
depressão associada ao modelo animal da DP 6-
OHDA: efeito dos antidepressivos e dos anti-
inflamatórios não esteroidais**

Tese apresentada à Universidade Federal do Paraná –
Setor de Ciências Biológicas - Departamento de
Farmacologia, como requisito parcial à obtenção do título
de Doutor em Farmacologia.

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

Curitiba – PR

2014



PARECER

A Comissão Examinadora da Tese de Doutorado intitulada "PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA SEROTONÉRGICO NA DEPRESSÃO ASSOCIADA AO MODELO ANIMAL DA DP 06-OHDA: EFEITO DOS ANTIDEPRESSIVOS E DOS ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO ESTEROIDAIIS", de autoria da pós-graduanda **RONISE MARTINS SANTIAGO**, sob orientação da Prof.^a Dr.^a Maria Aparecida Barbato Frazão Vital e banca composta pelos professores: Prof.^a Dr.^a Maria Aparecida Barbato Frazão Vital (Presidente – Farmacologia – UFPR), Prof. Dr. Edmar Miyoshi (Ciências Farmacêuticas – UEPG), Prof. Dr. Francisco Silveira Guimarães (Farmacologia – FMRP – USP), Prof.^a Dr.^a Janaina Menezes Zanoveli (Farmacologia – UFPR), e Prof. Dr. João Palermo Neto (FMVZ – USP), reuniu-se e de acordo com o Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, a pós-graduanda foi APROVADA. Para a devida publicação o trabalho deverá sofrer as modificações sugeridas, que serão conferidas pela sua orientadora. Em Curitiba, 25 de abril de 2014.

Prof.^a Dr.^a Maria Aparecida Barbato Frazão Vital (Presidente – Farmacologia – UFPR)

Prof. Dr. Edmar Miyoshi (Ciências Farmacêuticas – UEPG)

Prof. Dr. Francisco Silveira Guimarães (Farmacologia – FMRP – USP)

Prof.^a Dr.^a Janaina Menezes Zanoveli (Farmacologia – UFPR)

Prof. Dr. João Palermo Neto (FMVZ – USP)

Para meu marido Marcelo Sato o qual serei sempre grata pela dedicação e apoio. O meu maior incentivador, meu amor, minha vida.

Agradecimentos

Ao meu marido Marcelo Sato, que por vezes teve que entender a minha ausência. Pelas palavras de incentivos e gestos de amor presentes em todos os momentos. Obrigada por sempre apoiar meus sonhos,

Aos meus pais Ozanan e Dorinha Santiago e irmãos (Rodrigo e Rosiane), que, com muito carinho formaram o meu caráter ao longo dos anos e não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida,

A minha orientadora e mestra Prof^a. Dr^a Maria Vital, que compartilhou comigo as suas ideias, conhecimento e experiências, pela paciência na orientação e amizade que tornaram possível a conclusão desta tese,

Aos Profs. Dr Roberto Andreatini e Dr. Marcelo Lima pelas sugestões e contribuições que foram fundamentais neste trabalho.

Aos professores do departamento de farmacologia da UFPR, pelo conhecimento transmitido com tanta clareza.

Aos funcionários do setor pela convivência harmoniosa, pelas trocas de conhecimento e experiências que foram tão importantes na minha vida acadêmica/pessoal.

Aos colegas da farmacologia, pelos momentos descontraídos.

Aos meus amigos (de perto e de longe) que estiveram sempre ao meu lado contribuindo e apoiando.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte deste trabalho,

Muito obrigada.

LISTAS

Abreviaturas

5-HIAA	Ácido 5-hidroxiindolacético
5-HT	Serotonina
6-OHDA	6-hidroxidopamina
AAS	Ácido acetilsalicílico
AINE	Anti-inflamatório não esteroideal
AP	Ântero posterior
CA	Campo aberto
CMS	Estresse crônico moderado
COX	Ciclooxigenase
DA	Dopamina
DAB	3,3- diaminobenzidina
DOPAC	Ácido 3,4-dihidroxifenilacético
DP	Doença de Parkinson
DV	Dorso ventral
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
HPA	Hipotálamo-hipófise-adrenal
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HVA	Ácido homovanílico
i.p.	Intraperitoneal
IDO	Indolamina 2,3-dioxigenase
IFN	Interferon
IL	Interleucina
ISRS	Inibidor seletivo da recaptção de serotonina
ISRSN	Inibidor seletivo da recaptção de serotonina e noradrenalina
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LPS	Lipopolissacarídeo
ML	Médio lateral
MPTP	1-metil 4-fenil 1,2,3,6-tetrahidropiridina
NA	Noradrenalina
NF	Natação Forçada
NMDA	N-metil-D-aspártico
PG	Prostaglandina
PVC	Policloreto de polivinila
SNC	Sistema nervoso central
SNpc	Substância negra parte compacta
TH	Tirosina hidroxilase
TNF	Fator de necrose tumoral
TRICATs	Catabólitos de triptofano

Figuras

1 Representação esquemática do experimento 1	28
2 Parâmetros motores dos animais lesados com 6-OHDA	29
3 Comportamento tipo depressivo avaliado no teste de NF	30
4 Alteração da porcentagem no consumo de sacarose provocada pela 6-OHDA	30
5 Análise histológica da SNpc e quantificação neuronal após a infusão da 6-OHDA	31
6 Determinação das alterações nas concentrações estriatais de dopamina, DOPAC e HVA provocada pela neurotoxina 6-OHDA	33
7 Análise neuroquímica das concentrações no hipocampo de 5-HT e 5-HIAA provocada pela neurotoxina 6-OHDA	33
8 Correlação entre os níveis dos neurotransmissores e os comportamentos tipo depressivos	34
9 Representação esquemática do experimento 2	35
10 Efeito dos antidepressivos e do l-triptofano no teste de NF após a infusão da 6-OHDA	38
11 Consumo de sacarose após a infusão da 6-OHDA e tratamento com antidepressivos e l-triptofano	38
12 Níveis de DA e DOPAC estriatais 21 dias após a infusão de 6-OHDA na SNpc e tratamento com antidepressivos e l-triptofano	40
13 Concentração hipocampal de NA, 5-HT e 5-HIAA após a infusão da 6-OHDA e tratamento com antidepressivos e l-triptofano	41
14 Correlação entre os níveis de 5-HT hipocampal e os comportamentos tipos depressivos	42
15 Representação esquemática do experimento 3	43
16 Avaliação do efeito antidepressivo do celecoxibe e piroxicam no teste de NF	44
17 Efeito do CMS e tratamento prolongado com celecoxibe e piroxicam	45
18 Níveis hipocampais de 5-HT, 5-HIAA e NA após tratamento agudo com celecoxibe e piroxicam	46
19 Representação esquemática do experimento 4	47
20 Efeito antidepressivo do piroxicam no teste de NF 21 dias após a infusão da 6-OHDA	49
21 Consumo de sacarose após a infusão da 6-OHDA e tratamento com piroxicam por 21 dias	49
22 Concentrações estriatais de DA, DOPAC e HVA obtido 21 dias após a infusão de 6-OHDA na SNpc e tratamento com o piroxicam	50

23	Concentrações hipocampal de 5HT e 5-HIAA 21 dias após a infusão de 6-OHDA na SNpc e do tratamento com piroxicam	51
24	Análise imunohistoquímica e quantificação neuronal da SNpc 21 dias após a exposição a neurotoxina e tratamento com piroxicam	52
25	Representação esquemática do experimento 5	53
26	Avaliação do efeito antidepressivo no teste de NF do piroxicam associado ao pizotifeno	54
27	Concentrações hipocampais de 5-HT e 5-HIAA após o tratamento agudo com piroxicam e pizotifeno	55
28	Esquema proposto para a causa da depressão no modelo animal da DP 6-OHDA e mecanismo de ação antidepressivo dos AINEs, dos antidepressivos e do l-triptofano.	65

Tabelas

1	Procedimentos estressores	23
2	Parâmetros motores 1 e 21 dias após a infusão da 6-OHDA e tratamento com os antidepressivos	37
3	Efeito do piroxicam na atividade motora	48
4	Resumo dos resultados obtidos	56

SUMÁRIO

1 Introdução	12
1.1 Depressão e doença de Parkinson	12
1.2 Neuroinflamação na depressão e doença de Parkinson	13
1.3 Anti-inflamatórios na depressão e doença de Parkinson	15
1.4 Modelo animal da 6-hidroxidopamina	17
2 Objetivos	19
2.1 Objetivo geral	19
2.2 Objetivos específicos	19
3 Material e Métodos	20
3.1 Animais	20
3.2 Drogas	20
3.3 Cirurgia estereotáxica	21
3.4 Campo aberto	22
3.5 Teste de natação forçada	22
3.6 Teste de preferência por sacarose	23
3.7 Estresse crônico moderado	23
3.8 Determinação dos níveis de dopamina, noradrenalina e serotonina por HPLC	25
3.9 TH, coloração de Nissl e quantificação neuronal	25
3.10 Análise estatística	27
4 Delineamento experimental e resultados	28
4.1 Experimento 1: caracterização da depressão no modelo animal da DP 6-OHDA	28
4.1.1 Testes comportamentais em animais lesados com 6-OHDA	29
4.1.2 Coloração de Nissl e quantificação neuronal	31
4.1.3 Determinação estriatal de DA e hipocampal de 5-HT	32
4.1.4 Correlações entre os comportamentos tipo depressivos e neurotransmissores	34
4.2 Experimento 2: reversão do comportamento tipo depressivo e envolvimento do sistema serotoninérgico	35
4.2.1 Testes comportamentais em animais lesados e tratados com antidepressivos e l-triptofano	36
4.2.2 Determinação dos níveis de monoamina após o tratamento com os antidepressivos e l-triptofano	39
4.2.3 Correlação entre os comportamentos tipo depressivos e a 5-HT hipocampal	41

4.3 Experimento 3: avaliação do efeito antidepressivo de drogas anti-inflamatórias	42
4.3.1. Efeitos comportamentais do tratamento agudo com o celecoxibe e o piroxicam	44
4.3.2 Efeitos do tratamento prolongado com o celecoxibe e o piroxicam nos testes comportamentais	45
4.3.3 Determinação dos níveis de monoamina após tratamento agudo com celecoxibe e piroxicam	46
4.4 Experimento 4: avaliação do efeito antidepressivo do piroxicam na depressão no modelo animal da DP - 6-OHDA	47
4.4.1 Efeito do tratamento prolongado com o piroxicam nos testes comportamentais	48
4.4.2 Determinação dos níveis de monoamina após tratamento prolongado com piroxicam	49
4.4.3 Quantificação neuronal na SNpc	51
4.5 Experimento 5: envolvimento do sistema serotoninérgico no efeito antidepressivo do piroxicam	53
4.5.1 Efeitos do tratamento agudo sobre os testes comportamentais	53
4.5.2 Determinação dos níveis de 5-HT e do 5-HIA após tratamento agudo com piroxicam	55
5 Discussão	57
5.1 Depressão no modelo animal da DP 6-OHDA	57
5.2 Efeito antidepressivo do celecoxibe e piroxicam	60
6 Considerações finais	64
6 Conclusões	66
Referências bibliográficas	67
Anexos	79
1 Induction of depressive-like behavior by intranigral 6-OHDA is directly correlated with deficits in striatal dopamine and hippocampal serotonin	
2 Antidepressant-like effect of celecoxib and piroxicam in rat models of depression	

RESUMO

Depressão é um distúrbio psiquiátrico frequente em pacientes com doença de Parkinson (DP), cuja causa ainda não foi elucidada. A hipótese da neurodegeneração crônica natural da DP defende que a redução de monoaminas, como a dopamina (DA), a serotonina (5-HT) e a noradrenalina (NA) é a causa da depressão. No entanto novas evidências sugerem que a inflamação crônica pode ser um dos processos patológicos causadores da depressão. Consideramos a hipótese de que a neuroinflamação esteja relacionada com o comportamento tipo depressivo observado nos modelos animais da DP, através da alteração do sistema serotoninérgico. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi investigar a participação do sistema serotoninérgico na depressão associada ao modelo animal da DP utilizando a 6-OHDA assim como avaliar o efeito antidepressivo dos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), piroxicam e celecoxibe. Para este estudo foram utilizados ratos Wistar machos, de aproximadamente 3 meses de idade, pesando entre 280 a 300 g. O trabalho foi dividido em 5 experimentos, sendo eles: 1) caracterização da depressão no modelo animal da DP induzido pela 6-OHDA, 2) reversão do comportamento tipo-depressivo e envolvimento do sistema 5-HT, 3) avaliação do efeito antidepressivo de drogas anti-inflamatórias, 4) avaliação do efeito antidepressivo do piroxicam na depressão no modelo animal da DP - 6-OHDA e 5) envolvimento do sistema serotoninérgico no efeito antidepressivo do piroxicam. Os resultados deste estudo demonstraram que o modelo animal da DP 6-OHDA foi capaz de produzir comportamento tipo depressivo em ratos e promover déficits de DA no estriado e 5-HT e NA no hipocampo. Estes comportamentos tipo depressivos e a redução dos níveis hipocámpais de 5-HT foram revertidos com o tratamento prolongado de drogas antidepressivas, sertralina, venlafaxina e nortriptilina tal como o l-triptofano (precursor da 5-HT). O terceiro experimento demonstrou que o tratamento agudo e prolongado de piroxicam e celecoxibe exerceram efeitos antidepressivos nos testes de natação forçada (NF) e no modelo de depressão do estresse crônico moderado (CMS), respectivamente. Quando administrado a animais lesados com 6-OHDA por 21 dias o piroxicam foi capaz de impedir o aparecimento do comportamento tipo depressivo nos testes de NF e de preferência por sacarose assim como a redução de 5-HT hipocámpal. O efeito antidepressivo do piroxicam, administrado agudamente, foi bloqueado pelo pizotifeno um antagonista não seletivo de 5-HT. Em conclusão, demonstramos que a depressão está presente no modelo animal da DP 6-OHDA, podendo ser revertida tanto com drogas antidepressivas ou l-triptofano quanto por AINEs. Desta forma, sugerimos que a depressão associada ao modelo animal de DP 6-OHDA está relacionada à alteração no sistema serotoninérgico causada pelo menos em parte por um processo de neuroinflamação e que o efeito antidepressivo dos AINEs celecoxibe e piroxicam estão ligados a sua capacidade de inibir este processo inflamatório e conseqüentemente a redução de 5-HT central.

ABSTRACT

Depression is a common psychiatric disorder in patients with Parkinson's disease (PD), whose cause has not yet been elucidated. The hypothesis of natural chronic neurodegeneration of PD argues that the reduction of monoamines, such as dopamine (DA), serotonin (5-HT) and noradrenaline (NA), is the cause of depression. But new evidence suggests that chronic inflammation may be a causative pathological process of depression. We consider the hypothesis that neuroinflammation is associated with depressive-like behavior observed in animal models of PD by modifying the serotonergic system. Thus, the aim of this study was to investigate the involvement of the serotonergic system in the associated animal model of PD 6-OHDA depression as well as to evaluate the antidepressant effect of NSAIDs, piroxicam and celecoxib. Male Wistar rats were used, approximately 3 months old, weighing between 280 to 300 g. The work was divided into 5 experiments, which are: 1) characterization of depression in an animal model of PD 6-OHDA, 2) reversal of depressive-like behavior and involvement of 5-HT system 3) evaluation of antidepressant effects of anti-inflammatory drugs, 4) evaluation of the antidepressant effect of piroxicam in depression in an animal model of PD- 6-OHDA and 5) involvement of the serotonergic system in the antidepressant-like effect of piroxicam. The results showed that the animal model of PD 6-OHDA was able to produce depressive-like behavior in rats and promote deficits in striatal DA and 5-HT and NA in the hippocampus. These depressive-like behavior and reduction of hippocampal 5-HT levels were reversed by prolonged treatment of antidepressant drugs, sertraline, venlafaxine and nortriptyline and l-tryptophan (5-HT precursor). The third experiment demonstrated that acute and prolonged treatment with celecoxib or piroxicam exerted antidepressant effects on forced swimming test (FST) model of depression and chronic mild stress (CMS), respectively. When administered to animals injured with 6-OHDA for 21 days piroxicam was able to prevent the onset of depressive-like behavior in FST and sucrose preference test, as well as the reduction of hippocampal 5-HT. The antidepressant-like effect of piroxicam administered acutely was blocked by pizotifen a non-selective antagonist of 5-HT. In conclusion, we demonstrate that depression is present in the animal model of PD 6-OHDA, which can be reversed with either antidepressant drugs or l-tryptophan as well NSAIDs. Thus, we suggest that depression associated with the 6-OHDA animal model of PD is related to a change in the serotonergic system caused at least partly by a process of neuroinflammation and the antidepressant effect of NSAIDs, celecoxib and piroxicam are connected to their ability to inhibit the inflammatory process and thus reducing central 5-HT.

1. INTRODUÇÃO

1.1 DEPRESSÃO E DOENÇA DE PARKINSON

Depressão é um distúrbio psiquiátrico comum em pacientes com doença de Parkinson (DP), sendo mais prevalente nestes pacientes quando comparado a portadores de outras doenças crônicas igualmente incapacitantes (Kanda et al., 2008). A prevalência de depressão nestes pacientes é acima de 40% (Cummings, 1992), com uma incidência de 1,86% ao ano e um risco cumulativo de 8,5% ao longo da vida (Althaus et al., 2008; Frisina et al., 2009). Esta comorbidade pode agravar a evolução da DP (Kanda et al., 2008; Frisina et al., 2009), reduzir o grau de independência refletindo na qualidade de vida, assim como acelerar o declínio cognitivo e diminuir as atividades de vida diária dos pacientes (Riedel et al., 2010).

A causa da depressão em pacientes com DP ainda não foi elucidada. Entretanto, a hipótese da neurodegeneração crônica natural da DP sugere que a redução de monoaminas, como a dopamina (DA), a serotonina (5-hidroxitriptamina; 5-HT) e a noradrenalina (NA), pode ser a causa da depressão nestes pacientes (Norman, 2002; Okun e Watts, 2002; Wolters et al., 2008; Frisina et al., 2009). É consenso que tanto as vias dopaminérgicas quanto as de outros neurotransmissores são afetadas durante todo o curso da DP e que provavelmente desempenham um papel importante no desenvolvimento de sintomas não motores. Neste sentido, Kanda et al. (2008) consideram que a redução dos níveis de 5-HT no cérebro de pacientes com DP é um fator de risco para a depressão. Na mesma linha de raciocínio Paulus e Ellinger (1991) demonstraram, em um estudo *post-mortem* em pacientes parkinsonianos e deprimidos, aumento na perda de células neuronais serotoninérgicas no núcleo dorsal da rafe quando comparados com pacientes com DP não deprimidos. Em concordância com os dados de Paulus e Ellinger, Braak et al. (2004) relataram que no estágio 2 da DP ocorre, entre outros eventos, a neurodegeneração de células serotoninérgicas da rafe, região que modula o humor, podendo induzir o aparecimento da depressão.

De acordo com alguns autores a 5-HT tem uma função inibitória na liberação de DA no estriado. Assim, a diminuição da neurotransmissão

serotoninérgica no sistema nervoso central (SNC) pode ser um mecanismo compensatório relacionado à redução da neurotransmissão dopaminérgica na DP (Kanda et al., 2009; Suzuki et al., 2009). Por outro lado, Politis et al. (2012) descreveram que a ocorrência de sintomas não motores em pacientes parkinsonianos pode estar associada com uma perda de neurônios serotoninérgicos.

Na tentativa de explicar a causa da depressão em pacientes com DP, novas hipóteses foram desenvolvidas como, por exemplo, a hipótese inflamatória da depressão (Maes et al., 2009). Evidências sugerem que a ativação contínua do sistema imune e/ou a inflamação crônica podem ser um dos processos patológicos da depressão associada à DP (Currier e Nemeroff, 2010). De acordo com alguns autores, nos pacientes com DP tanto a formação de corpúsculo de Lewy, característica patológica da doença, quanto a morte de neurônios promovem a ativação da microglia, que produz fatores neurotóxicos, como as citocinas (Mosley et al, 2006), e o aumento da expressão da cicloxigenase (COX-2) aumentando consequentemente a síntese de prostaglandina (PGs) (Hald e Lotharius, 2005).

1.2 NEUROINFLAMAÇÃO, DEPRESSÃO E DOENÇA DE PARKINSON

A hipótese de que a inflamação contribui ativamente na fisiopatologia da depressão na DP vêm sendo fortemente apoiada ao longo dos últimos anos. A inflamação é a primeira linha de defesa do organismo contra lesões teciduais ou infecções. No entanto, uma resposta inflamatória excessiva pode se tornar fonte de uma lesão tecidual ainda maior do que a provocada pelo estímulo inicial. Os neurônios, como resultado de sua grande diferenciação celular, apresentam pouca ou nenhuma habilidade em se dividir e uma reduzida capacidade de recuperação frente a lesões, tornando-se, portanto extremamente vulneráveis a processos autoimunes e inflamatórios (Gao et al., 2003). De acordo com Collins et al. (2012) na DP, quando as células da glia são ativadas, elas passam a secretar altos níveis de mediadores pró-inflamatórios, que induzem a morte dos neurônios dopaminérgicos e aumentam ainda mais a ativação destas células, o que resulta em um ciclo de propagação de inflamação e neurodegeneração.

Esta hipótese é corroborada pela presença da microglia ativada, aumento de citocinas pró-inflamatórias e da COX-2 glial e neuronal em cérebros *post-mortem* de pacientes com DP (Knott et al., 2000; Nagatsu et al., 2000). Os processos inflamatórios associados com um aumento da expressão da enzima COX-2 têm sido implicados na cascata de eventos deletérios que levam a neurodegeneração (Knott et al., 2000). Neste sentido, a expressão de COX-2 tem sido associada com a degeneração de neurônios dopaminérgicos da substância negra parte compacta (SNpc) tanto em humanos quanto em modelos animais da DP (Teismann et al., 2003; Lima et al., 2006). De acordo com Dantzer et al. (2008), pacientes que sofrem de processos inflamatórios crônicos apresentam risco aumentado de desenvolver depressão, assim como pacientes em tratamento com citocinas pró-inflamatórias como as interleucinas (IL), os interferons (IFN)- γ ou fator de necrose tumoral (TNF)- α (Raison et al., 2006). Aarsland et al. (2012) relataram que pacientes com depressão associada a DP apresentam um aumento no processo inflamatório, com níveis aumentados de IL-1 β , IL-6, TNF- α e cortisol. Em adição, evidências sugerem que a depressão aumenta a neuroinflamação e, em contrapartida, os antidepressivos exercem efeitos antiinflamatórios (Abdel-Salam et al., 2003, Vismari et al., 2012).

A hipótese inflamatória propõe que a depressão é caracterizada pela ativação do sistema de resposta inflamatória com o aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, tal como a PGE2 (Calabrese et al., 1986; Dantzer, 2001; Abdel-Wahab e Salama, 2011). Estas citocinas por sua vez promovem alterações na via metabólica do triptofano reduzindo os seus níveis e, conseqüentemente, a disponibilidade de 5-HT. Isto estabelece um elo importante entre os níveis de citocinas inflamatórias e monoaminas (Müller et al., 2009).

Estudos têm demonstrado que as citocinas pró-inflamatórias, tais como a IL-6, IL-1 β , TNF- α , INF- γ estão aumentadas no plasma e líquido cefalorraquidiano (LCR) de pacientes deprimidos (Dowlati et al., 2010; Liu et al., 2013). Estas citocinas pró-inflamatórias podem ativar o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) e este efeito é geralmente atribuído a um aumento da produção do hormônio liberador de corticotrofina nos núcleos hipotalâmicos (Berkenbosch et al., 1987). Este, por sua vez, estimula a produção do hormônio

adrenocorticotrófico, com conseqüente aumento de secreção do cortisol no plasma (Saveanu e Nemeroff, 2012). Esta desregulação do eixo HPA sugere que a depressão está relacionada com uma falha no feedback negativo deste eixo, o que resultaria em hipercortisolemia nos pacientes deprimidos (Saveanu e Nemeroff, 2012).

Além da ativação do eixo HPA, citocinas e PGE2 são capazes de reduzir o nível de 5-HT através da ativação da enzima indolamina 2,3-dioxigenase (IDO; Yuan et al., 1998; Maes et al., 2011; Leonard e Maes, 2012; Iachininoto et al., 2013), uma enzima que degrada o triptofano em metabólitos de triptofanos (TRICATs) como a quinurenina (Neumeister et al., 2004). A quinurenina por sua vez é metabolizada pela enzima quinurenina 3 monooxigenase em ácido quinolínico agonista do receptor ácido N-metil-D-aspartático (NMDA) e considerado um metabólito neurotóxico (Zunszain et al., 2012).

Em modelos animais, Przybylkowski et al. (2004) avaliaram o curso temporal da expressão da COX e seus metabólitos no estriado de ratos tratados com 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), os resultados indicaram um aumento de COX-2 até ao 21º dia após a administração da neurotoxina. Lima et al. (2006) também demonstraram que os modelos distintos de DP induzidos por 6-hidroxidopamina (6-OHDA), MPTP, e lipopolissacarídeo (LPS) mostram aumento tempo-dependente da expressão de COX-2, um dado significativo, considerada a importância do processo neuroinflamatório na DP.

1.3 ANTI-INFLAMATÓRIOS NA DEPRESSÃO E DOENÇA DE PARKINSON

O mecanismo de ação farmacológico dos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) ocorre através da inibição da COX, enzima passo limitante para a síntese das PGs a partir do ácido araquidônico (Sostres et al. 2010). A COX possui duas isoformas - uma isoforma constitutiva (COX-1) e uma isoforma induzível (COX-2), que tem um elevado grau de homologia estrutural e enzimática. No entanto, as isoformas da COX são farmacologicamente distintas, de tal modo que são diferencialmente inibidas pelos AINEs (Smith et al. 2000). AINEs tradicionais e o ácido acetilsalicílico (AAS) inibem ambas as

isoformas e o AINEs seletivos (coxibes) inibem preferencialmente a COX-2 (Sostres et al. 2010). Estudos sugerem que ambas as isoformas estão distribuídas de forma heterogênea entre células do tecido nervoso central, sendo a COX-1 detectada em células da microglia e a COX-2 encontrada principalmente em células da glia, e em menores níveis (passíveis de supra regulação em pacientes com DP e em modelos de indução de parkinsonismo) nos neurônios dopaminérgicos da SNpc (Esposito et al., 2007).

A investigação do efeito potencialmente neuroprotetor de AINEs em modelos experimentais da DP foi iniciado por estudos *in vitro* desenvolvidos por Grilli et al. (1996), que demonstraram que o AAS e salicilato de sódio foram capazes de prevenir a neurotoxicidade induzida pelo glutamato, sugerindo um potencial efeito neuroprotetor destas drogas. Em estudo com parecoxibe foi demonstrado que esta droga foi eficaz em impedir as alterações motoras, cognitivas e o déficit da expressão de tirosina hidroxilase (TH) causadas por infusão intranigral de MPTP em ratos (Reksidler et al., 2007). Na mesma linha, Soliman et al. (2009) demonstraram que a administração de piroxicam 7 dias antes e depois da administração do MPTP (40 mg/kg) em camundongos foi capaz de reduzir a neurodegeneração na SNpc e a deficiência motora. Usando infusão unilateral de 6-OHDA, em ratos, Sánchez-Pernaute et al. (2004) avaliaram o efeito neuroprotetor do tratamento com celecoxibe, inibidor seletivo da COX-2, por 21 dias antes e após a administração da neurotoxina. Os resultados mostraram neuroproteção, diminuição da ativação da microglia e aumento da imunorreatividade para TH. Em outro estudo, o tratamento crônico com o celecoxibe foi capaz de reverter o comportamento tipo depressivo induzido pelo protocolo do estresse crônico moderado (CMS) em ratos, reduzir a expressão de COX-2 no cérebro e, subsequentemente, a concentração de PGE2 (Guo et al., 2009).

Em paralelo, três estudos clínicos relataram melhora significativa dos sintomas depressivos após o tratamento adjuvante com celecoxibe. Em um estudo, pacientes com transtorno depressivo (n=40) que não responderam ao tratamento apenas com fluoxetina (40 mg/dia) foram divididos aleatoriamente em grupos que receberam fluoxetina+celecoxibe (200 mg duas vezes ao dia) ou placebo sob condições duplo-cego, durante 6 semanas. O tratamento combinado foi associado à melhora significativa dos sintomas depressivos

(Akhondzadeh et al., 2009). O segundo estudo, duplo-cego, randomizado, controlado por placebo, com duração de 6 semanas, relatou resultados similares ao anterior, a eficácia do celecoxibe como adjuvante (400 mg/dia) a reboxetina (intervalo de dose flexível, 4-10 mg / dia) em doentes depressivos (n=40;. Muller et al, 2006). No último estudo, randomizado, duplo-cego, controlado por placebo (n=40 pacientes), conclui-se que o tratamento com celecoxibe (200 mg duas vezes ao dia) e sertralina (200mg/dia), também por 6 semanas, levou à redução plasmática da concentração de IL-6, apoiando a ideia de que o celecoxibe é eficaz como adjuvante dos antidepressivos (Abbasi et al., 2012).

1.4 MODELO ANIMAL DA 6-HIDROXIDOPAMINA

O modelo animal induzido pela neurotoxina 6-OHDA foi o primeiro modelo animal associado com a morte de neurônios dopaminérgicos na DP (Ungerstedt, 1968). A perda neuronal dopaminérgica mais significativa ocorre na SNpc do mesencéfalo. (Schwartzing e Huston, 1996; Dauer e Przedborski, 2003). A 6-OHDA não atravessa a barreira hematoencefálica, portanto deve ser administrada diretamente no encéfalo. É transportada para os neurônios catecolaminérgicos através de mecanismos de transporte específico (p. ex., os transportadores de DA e NA), devido ao fato de ser estruturalmente semelhante à DA e NA. Uma vez dentro dos neurônios a 6-OHDA é facilmente oxidada e induz a produção de radicais livres (Betarbet et. al., 2002, Meredith et. al., 2008). Promove também a inibição do complexo I da cadeia transportadora de elétrons (com diminuição dos níveis de ATP) levando a morte dos neurônios dopaminérgicos da SNpc (Mogi et al., 1999).

A morte dos neurônios dopaminérgicos leva a ativação da microglia que passa a secretar citocinas pró-inflamatórias, tal como o TNF- α , a IL-1 β e o IFN- γ , estas podem se ligar diretamente aos seus receptores nos neurônios dopaminérgicos ativando a via de transdução que resulta em apoptose, ou podem induzir a expressão da COX-2 dentro de células da glia, por sua vez a PGE₂, produto da COX-2, também induz eventos tóxicos nos neurônios dopaminérgicos (Gao et al, 2003). Em adição como já descrito nesta introdução tanto as citocinas quanto a PGE₂ são capazes de reduzir o nível de 5-HT

através da ativação da IDO (Yuan et al., 1998; Maes et al., 2011; Leonard e Maes, 2012; Iachininoto et al., 2013).

De acordo com a literatura esta neurotoxina quando infundida no SNC tem a capacidade de induzir o comportamento tipo depressivo nos animais lesados. Tadaiesky et al. (2008) demonstraram que a injeção intraestriatal de 6-OHDA em ratos causou redução no consumo de sacarose uma semana após a injeção da neurotoxina. Este comportamento tipo depressivo foi associado à redução de DA e seus metabólitos além da redução de 5-HT e dos neurônios positivos para TH. Recentemente, demonstramos que ratos que receberam infusão intranigral de 6-OHDA apresentaram comportamentos tipo depressivos tanto no teste de natação forçada modificado (NF) quanto no consumo de sacarose e que estas alterações comportamentais estão correlacionadas à redução dos níveis estriatais de DA e metabólitos e a redução dos níveis hipocámpais de 5-HT e metabólito (Santiago et al., 2010).

Entretanto, apesar de seu impacto negativo, a etiologia da depressão nos pacientes parkinsonianos permanece desconhecida e poucos estudos foram desenvolvidos utilizando modelos experimentais da DP para avaliar essa comorbidade. De acordo com os dados descritos acima, consideramos a hipótese de que a neuroinflamação esteja relacionada com o comportamento tipo depressivo observado nos modelos animais da DP, através da alteração do sistema serotoninérgico. Desta forma, esta tese foi desenvolvida com o propósito de investigar a participação do sistema serotoninérgico na depressão associada ao modelo animal 6-OHDA assim como a avaliação do efeito antidepressivo dos AINEs, piroxicam e celecoxibe.

2. OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a participação do sistema serotoninérgico na depressão associada ao modelo animal da DP 6-OHDA e investigar o efeito antidepressivo dos AINEs, celecoxibe e piroxicam.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Caracterizar o comportamento tipo depressivo no modelo animal da DP induzido por 6-OHDA em diferentes tempos.

Reverter o comportamento tipo depressivo observado no modelo da 6-OHDA com drogas antidepressivas de diferentes classes.

Investigar o envolvimento do sistema serotoninérgico no comportamento tipo depressivo em animais lesados com 6-OHDA.

Investigar se AINEs (celecoxibe e piroxicam) possuem efeitos antidepressivos no modelo do CMS.

Avaliação do efeito antidepressivo do piroxicam no modelo animal da DP 6-OHDA.

Investigar a relação entre o sistema serotoninérgico e o efeito antidepressivo do piroxicam no teste de NF.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar machos, de aproximadamente 3 meses de idade, pesando entre 280 a 320 g no início dos experimentos provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Foram mantidos 5 animais por caixa padrão de polipropileno durante os experimentos, em uma sala com umidade e temperatura controladas ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), ciclo de claro-escuro de 12 horas (7-19h). A água e a comida foram fornecidas à vontade durante todo o estudo, exceto durante o procedimento de CMS, descrito adiante.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em grupos distintos de acordo com a necessidade de cada experimento.

Todos os experimentos e tratamento dos animais foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, protocolo 470. O máximo de esforço foi empreendido para minimizar possíveis desconfortos causados aos animais.

3.2 DROGAS

- L-Triptofano (100mg/kg, dissolvido em salina 0,9%. Sigma-Aldrich, Alemanha) - Precursor do neurotransmissor 5-HT;
- Sertralina (10 mg/kg, dissolvido em salina 0,9%. EMS, São Paulo, Brazil) - Inibidor seletivo da recaptção de 5-HT (ISRS);
- Venlafaxina (10mg/kg, dissolvido em salina 0,9%. Medley, São Paulo, Brazil) - Inibidor seletivo da recaptção de 5-HT e NA (ISRSN);
- Nortriptilina (20mg/kg, dissolvido em salina 0,9%. Novartis, São Paulo, Brazil) - Antidepressivo tricíclico;
- Celecoxibe (10 mg/kg, dissolvido em salina 0,9%. Pfizer, São Paulo, Brazil) – AINE;
- Piroxicam (10 mg/kg, dissolvido em salina 0,9%. EMS, São Paulo, Brazil)- AINE;

- Imipramina (20 mg/kg, dissolvido em salina 0,9%. Uci-farma, São Paulo, Brazil) - Antidepressivo tricíclico;
- Pizotifeno (3 mg/kg, dissolvido em salina 0,9%. Novartis, São Paulo, Brazil) - Antagonista não seletivo 5-HT;
- 6-OHDA (6 μ g/ μ L, dissolvido em LCR + 0,2% ácido ascórbico. Sigma Chemical Co., EUA) – Neurotoxina;

As doses utilizadas nesta tese, foram baseadas em estudos anteriores, que descrevem os efeitos antidepressivos do l-triptofano (Yoshihara, et al., 2012), sertralina (Detke et al., 1995), venlafaxina (Reneric e Lucki, 1998), nortriptilina (Consoni et al., 2006) e imipramina (Detanico et al., 2009), efeitos anti-inflamatório/analgésico do celecoxibe (Chichorro et al., 2006) e piroxicam (Fujita et al., 2012), efeito antagônico do pizotifeno (Nielsen, 1986) e efeito neurotóxico da 6-OHDA (Santiago et al., 2010).

3.3 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA

A administração bilateral em dose única da 6-OHDA na região da SNpc foi realizada por cirurgia estereotáxica. Todos os animais foram anestesiados com uma associação de tiopental e hidrato de cloral (Equitesin[®] 0,3 ml/kg) intraperitoneal (i.p.). Posteriormente o animal foi colocado no aparelho estereotáxico onde foi realizada a infusão da 6-OHDA com uma agulha (27 gauge) conectada a uma seringa de 10 μ L (Hamilton, EUA) nas coordenadas: ântero posterior (AP): - 5,0 mm a partir do bregma; médio lateral (ML): \pm 2,1 mm a partir da linha média e dorso ventral (DV): - 8,0 mm a partir da calota craniana segundo Paxinos e Watson (2005). Para evitar refluxo, a agulha foi mantida no local da infusão por 2 minutos após o término do procedimento. Os animais do grupo sham passaram pelo mesmo procedimento, porém receberam LCR (Santiago et al., 2010).

3.4 CAMPO ABERTO

Para avaliação da atividade motora utilizamos o teste de campo aberto (CA), um aparato que consiste em uma arena redonda (100 cm de diâmetro e 45 cm de altura), com o solo dividido em 19 quadrantes. Os animais foram colocados cuidadosamente no centro do CA e deixado a explorá-lo livremente durante 5 min. Foram registrados três parâmetros motores: número de quadrantes (isto é, o número de travessias das quatro patas do animal de um quadrante para outro), frequência de levantar (ou seja, o número de vezes que os animais permaneciam sobre as patas traseiras) e tempo de imobilidade (tempo em segundos que o animal permanece imóvel).

Outro aparato utilizado para avaliação motora foi uma arena redonda preta (170 cm de diâmetro e 40 cm de altura), no qual, os movimentos dos animais foram monitorados e gravados utilizando um sistema automático (HVS System, Buckingham, UK). Os animais foram cuidadosamente colocados na posição sudoeste do CA e deixados a explorar livremente a área por 5 min. Dois parâmetros locomotores foram registrados ao longo do teste: a distância percorrida (isto é, à distância em metros que o animal percorreu durante o teste) e velocidade de locomoção (a velocidade com a qual o animal se locomoveu durante o teste). Os resultados foram expressos em metros (m) e metros/segundo (m/s) respectivamente.

O CA foi limpo com uma solução de água-etanol 5% antes do teste de cada animal a fim de eliminar possível viés causado por odores e substâncias deixados pelos ratos anteriores.

3.5 TESTE DE NATAÇÃO FORÇADA

O procedimento utilizado foi o teste de NF proposto por Porsolt et al. (1978) e Reneric et al. (2002). Resumidamente o teste consiste em duas seções. A Primeira é uma seção treino onde os animais foram colocados em um tanque cilíndrico de policloreto de polivinila (PVC) com dimensões de 25 cm de diâmetro e 60 cm de altura, preenchido com água a temperatura de 24 ± 1 °C a uma profundidade de 25 cm, que não permite que os ratos toquem o fundo do tanque, por 15 min. Após 24 h da primeira seção, os animais foram

novamente colocados no tanque por 5 min. e seu comportamento monitorado por uma câmera localizada acima do tanque. A avaliação do comportamento incluiu: o tempo de natação (definido como movimentos horizontais, no qual o animal realiza movimentos circulares e cruzamentos de um quadrante para o outro), o tempo de imobilidade (verificada quando não existe nenhum movimento adicional além daqueles necessários para manter a cabeça do animal fora da água) e o tempo de escalada (que consiste em movimentos verticais, no qual o animal tenta com as patas dianteiras escalar as paredes do cilindro). A água foi trocada após cada animal a fim de evitar a influência de temperatura e substâncias deixada pelo rato anterior. Os resultados foram expressos em segundos (s) (Santiago et al., 2010).

3.6 TESTE DE PREFERÊNCIA POR SACAROSE

Preferência por sacarose é frequentemente utilizado como uma medida de anedonia em roedores (Papp et al., 1991; Wang et al., 2009). Inicialmente, foram fornecidas a cada rato duas garrafas contendo água nos lados extremos da gaiola durante a fase de habituação de 24 h. Após este período, o conteúdo de um dos frascos foi trocado aleatoriamente por uma solução de sacarose a 0,5%. As garrafas foram então pesadas antes de serem apresentadas aos ratos e 24 h depois. A soma do consumo de água e consumo de sacarose foi definida como o consumo total. O percentual de consumo de sacarose foi calculado usando a seguinte equação: % de preferência sacarose = ingestão de sacarose \times 100 / ingestão total. Os animais passaram por uma triagem uma semana antes do teste basal e permaneceram no experimento apenas os ratos que apresentaram uma preferência por sacarose superior a 60%. Nesta triagem 40% dos animais foram retirados do estudo. Os resultados foram expressos em %.

3.7 ESTRESSE CRÔNICO MODERADO

O modelo CMS foi desenvolvido para simular o desenvolvimento e progressão da depressão clínica. Este modelo imita a anedonia, um dos principais sintomas de depressão maior (Willner et al., 1992). Neste modelo de

depressão, os ratos são expostos sequencialmente ao longo de um período de várias semanas a uma variedade de fatores de estresses moderados, e a medida utilizada para monitorar o comportamento tipo depressivo, é a diminuição da preferência por sacarose. Os ratos foram inicialmente divididos em dois grupos: estressados e não estressados. Os grupos estressados foram expostos a um regime de estresse durante 6 semanas (42 dias), composto de estressores suaves imprevisíveis que foram apresentados de forma aleatória, incluindo privação de alimentação e de água, inclinação da gaiola, gaiola suja, iluminação contínua durante a noite e escuridão contínua durante o dia (Tabela 1). A sequência pseudoaleatória dos fatores de estresses foi usada para impedir que os ratos se habituassem ao estresse moderado repetido. O grupo não estressado permaneceu intacto, com exceção do tratamento necessário para cuidar dos animais, por exemplo, limpeza de gaiolas, pesagem, marcação da cauda, e administração da droga.

Tabela 1. Procedimentos estressores ^a

	Privação de comida	Privação de água	Claro constante	Caixa inclinada	Caixa molhada	Escuro constante	Caixa suja
Segunda	10h				10h		
Terça	10h		10h				
Quarta		10h	10h				
Quinta		10h		10h			
Sexta				10h			10h
Sábado							14h
Domingo					10h	14h	10h

^a O teste de preferência por sacarose foi realizado no período de: sexta as 14 h até sábado as 14h.

3.8 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE DOPAMINA, NORADRENALINA E SEROTONINA POR HPLC

A análise neuroquímica dos níveis de DA e seus metabólitos no estriado, NA, 5-HT e seus metabólitos hipocampal foi realizada através, do sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), utilizado para separar as substâncias e quantificados pelo detector eletroquímico. Para esta mensuração as estruturas encefálicas dos animais foram retiradas após a decapitação, obedecendo ao tempo máximo de 3 min para a retirada dos tecidos e armazenamento em freezer -80 °C até a realização da análise neuroquímica. O tecido foi pesado antes do congelamento. As amostras foram suspendidas com ácido perclórico 0,1 M com 0,02% de metabissulfito de sódio como antioxidante, em concentração de 15 µL/mg de material encefálico. Estas amostras foram então fragmentadas com caneta sonicadora e centrifugada a 10.000 G por 40 min.

O sobrenadante (20 µL) foi injetado em uma estação de HPLC composta por uma bomba Shimadzu LC10AD, uma coluna de fase reversa C-18, 75 x 4,6 mm, partículas de 4 µm, em temperatura de 30 °C. Os neurotransmissores DA, NA, 5-HT e seus metabólitos foram identificados e quantificados por um detector eletroquímico LECD6A, com potencial de oxidação ajustado para + 80 mV. A fase móvel foi constituída de fosfato monossódico 12H₂O 7,16g; ácido cítrico 4,2g; ácido etilenodiamino tetra-ácetico (EDTA) 40 mg; ácido octanossulfônico 550 mg; metanol 100 ml; água 800 ml; em pH=3. As áreas de pico foram comparadas as áreas dos padrões externos (SIGMA®). Os resultados foram expressos como ng/g de peso úmido de tecido.

3.9 TH, COLORAÇÃO DE NISSL E QUANTIFICAÇÃO NEURONAL

Para a análise imunohistoquímica os animais foram anestesiados profundamente com tiopental e perfundidos intracardialmente, primeiro com solução salina 0,9%, em seguida, com uma solução fixadora de 4% de paraformaldeído em tampão fosfato 0,1 M (pH=7,4). Os cérebros forão removidos, armazenados no mesmo fixador por no mínimo 3 dias, e então em

solução de sacarose 30% até que estivessem saturados com a solução e afundados no recipiente. Posteriormente os cérebros foram congelados em gelo seco e armazenados em freezer - 80°C até a preparação para a análise de imunohistoquímica. Para cada rato 12 seções de 40 µm de espessura foram cortadas em um criostato no plano coronal que abrange cerca de 360 µm (-4,92 para -5,28 de bregma) do mesencéfalo (Paxinos e Watson, 2005). Estas coordenadas correspondem à extensão máxima dos neurônios dopaminérgicos no interior da SNpc. As seções foram montadas em lâminas. A imunohistoquímica para marcação de TH foi avaliada usando o anticorpo de rato anti-TH monoclonal (1:200, catálogo MAB318; Millipore, Chemicon Internacional, Tecnologia, Billerica, MA, EUA). A recuperação de antígeno de alta temperatura foi realizada por imersão das lâminas em um banho de água a 95 - 98°C em 10 mM de tampão de citrato trissódico pH=6,0, durante 45 min. A ligação não específica foi bloqueada através da incubação das lâminas durante 1 h com soro de cabra normal, diluído em PBS. Após a incubação *overnight* a 4°C com os anticorpos primários, as lâminas foram lavadas com PBS e incubadas com o anticorpo secundário *Envision plus* (Dako Citomações, Carpinteria, CA, EUA), por 1 h à temperatura ambiente. Os cortes foram lavados em PBS, e a visualização foi concluída através da utilização de DAB (3,3-diaminobenzidina; Dako Cytomation) em solução de cromógeno e contrastado levemente com hematoxilina de Harris.

Para a coloração de Nissl as lâminas contendo os cortes foram secas e coradas com cresil violeta após a desidratação em concentrações crescentes de solução de etanol-xilol.

As contagens foram realizadas fazendo uso do software Image-Pro Express 6 (Media Cybernetics, EUA). Cada seção foi digitalizada com uma câmera digital conectada a um microscópio IX71 (Olympus Optical Co., Japão). A área digital foi criada, a fim de delimitar as fronteiras da SNpc. Para cada análise, a mesma área foi adotada. Uma ferramenta de "tag Manual" foi usada para contar os neurônios dentro da área. Todas as contagens foram realizadas nas imagens obtidas na ampliação de 40x. Um número significativo de neurônios no SNpc foi obtido para cada grupo. Os resultados de ambos os testes foram apresentados como % do grupo controle.

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O teste de Kolmogorov - Smirnov, foi inicialmente utilizado para assegurar que os dados estivessem de acordo com os critérios para a realização de análise de variância (ANOVA).

Os dados analisados pela ANOVA de uma via foi seguido pelo teste *post-hoc* de Newmann–Keuls. A análise da ANOVA de duas foi seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni e os coeficientes de correlação de Pearson (r) foram calculados para estabelecer correlações entre as concentrações de neurotransmissores e seus respectivos comportamentos obtidos no teste de NF e teste de preferência por sacarose.

O nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$.

4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS

4.1 EXPERIMENTO 1: CARACTERIZAÇÃO DA DEPRESSÃO NO MODELO ANIMAL DA DP 6-OHDA

Este experimento foi realizado com o objetivo de avaliar o comportamento tipo depressivo em animais lesados bilateralmente na SNpc com a neurotoxina 6-OHDA em diferentes tempos. Para tal foram utilizados oito grupos: 4 grupos sham (sham 1 dia, sham 7 dias, sham 14 dias e sham 21 dias) e 4 grupos 6-OHDA (6-OHDA 1 dia, 6-OHDA 7 dias, 6-OHDA 14 dias e 6-OHDA 21 dias), todos os grupos com n=10. Os ratos foram submetidos à cirurgia estereotáxica no dia 0. Após a indução da lesão o teste de CA foi realizado nos dias: 1, 7, 14 e 21. E os testes comportamentais de depressão no 7º, 14º e 21º dia pós-cirúrgico. Imediatamente após o último teste comportamental, um subconjunto dos animais foi decapitado e seus cérebros retirados para dissecação do estriado e hipocampo para avaliação neuroquímica; outro subconjunto dos animais foi perfundido intracardialmente para avaliação imunohistoquímica. Este experimento foi realizado em duplicata onde um grupo foi submetido aos testes de CA e NF e outro grupo ao teste de preferência por sacarose.

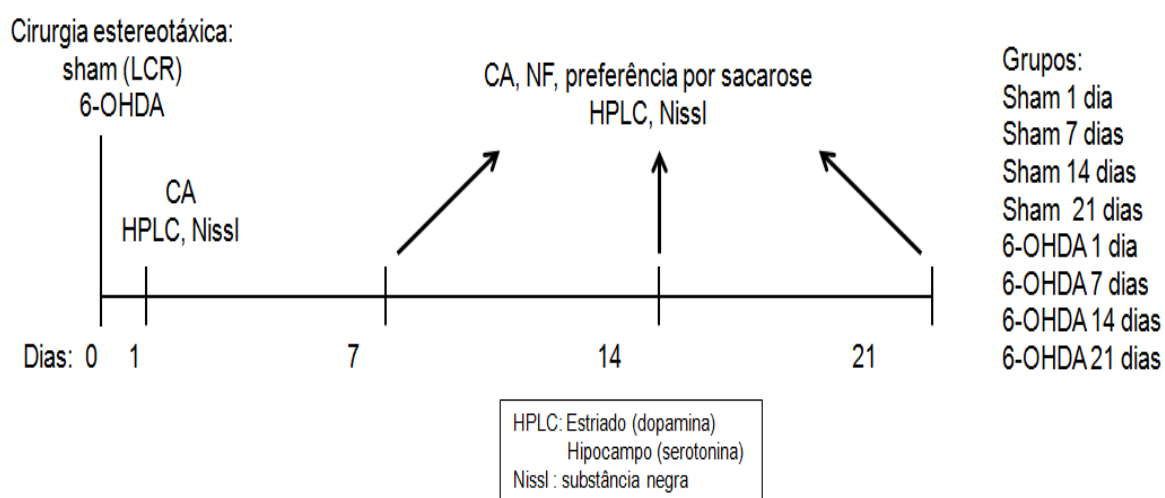


Figura 1: Representação esquemática do experimento 1. 6-OHDA: 6-hidroxidopamina; LCR: líquido cefalorraquidiano; CA: campo aberto; NF: teste de natação forçada.

4.1.1 Testes comportamentais em animais lesados com 6-OHDA

No teste de CA (Fig. 2A e B), observamos redução na distância percorrida e na velocidade de locomoção (ambos $p < 0,01$) no grupo 6-OHDA apenas 1 dia após a exposição a neurotoxina quando comparado ao grupo sham.

No teste de NF, o tempo de natação se mostrou reduzido no grupo 6-OHDA (todos $p < 0,05$) e o tempo de imobilidade aumentado (todos $p < 0,01$) quando comparado ao grupo sham nos dias 7, 14, e 21 após a exposição a 6-OHDA (Fig. 3 A e B). A análise do comportamento de tempo de escalada no teste de NF não demonstrou diferença entre os grupos (dados não mostrados).

Em relação ao teste de preferência por sacarose a infusão da 6-OHDA provocou redução significativa no consumo de sacarose no dia 7 ($p < 0,05$). Os grupos não diferiram significativamente no dia 14. Porém 21 dias após a cirurgia, o efeito anedônico ainda foi detectado em comparação com o grupo sham ($p < 0,01$) (Fig. 4). Os grupos sham e 6-OHDA não apresentaram diferença entre si em relação ao consumo total de líquidos em nenhum dos dias avaliados (dados não mostrados).

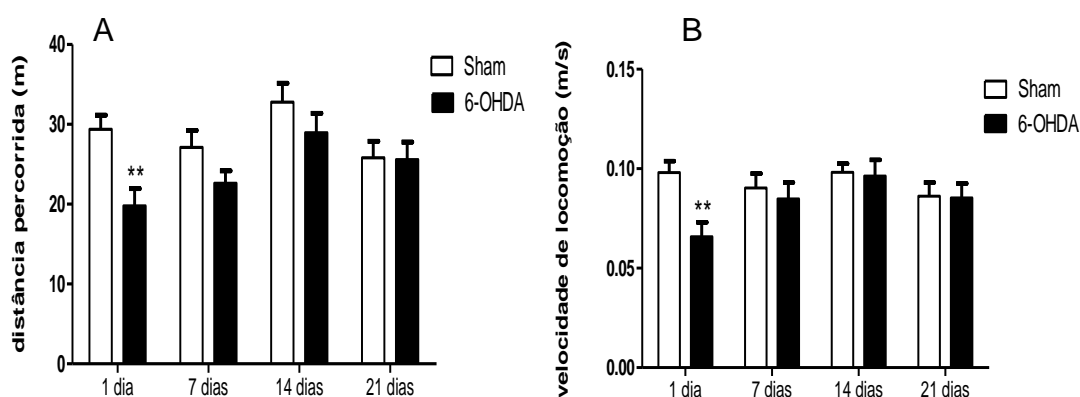


Figura 2: Parâmetros motores dos animais lesados com 6-OHDA. Atividade motora avaliada no teste do campo aberto no grupo 6-OHDA. (A) A velocidade de locomoção. (B) A distância percorrida. Os dados foram obtidos a 1, 7, 14, e 21 dias após a infusão de 6-OHDA. Os dados são expressos como média \pm erro padrão ($n=8-9$ /grupo). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, comparado com o grupo sham (ANOVA de duas vias seguido pelo teste de *post hoc* de Bonferroni)

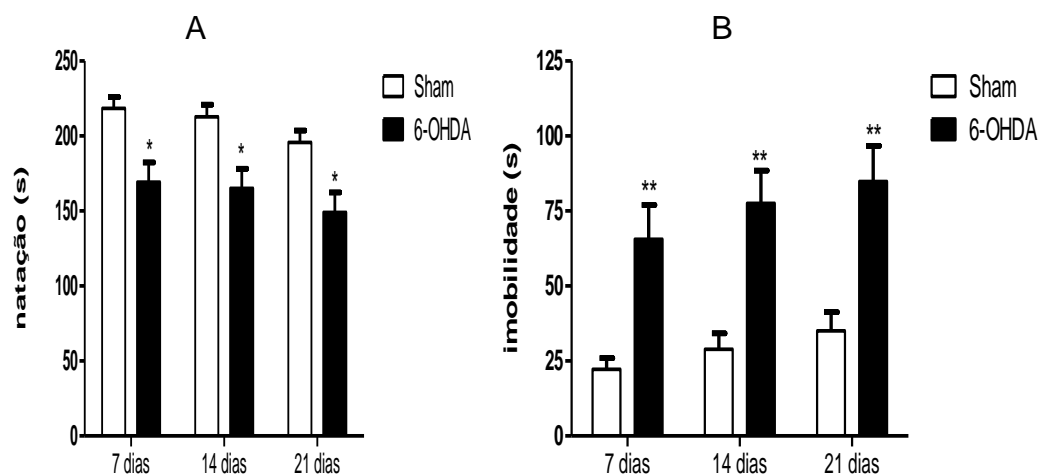


Figura 3: Comportamento tipo depressivo avaliado no teste de NF. Comportamento tipo depressivo induzido pela neurotoxina 6-OHDA em diferentes tempos avaliados no teste de natação forçada. (A) Natação. (B) imobilidade. Os dados foram obtidos 7, 14, e 21 dias após a infusão da 6-OHDA. Os dados são expressos como média \pm erro padrão (n=9-10/grupo). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, comparado com sham (ANOVA de duas vias seguido pelo teste *post hoc* de Bonferroni).

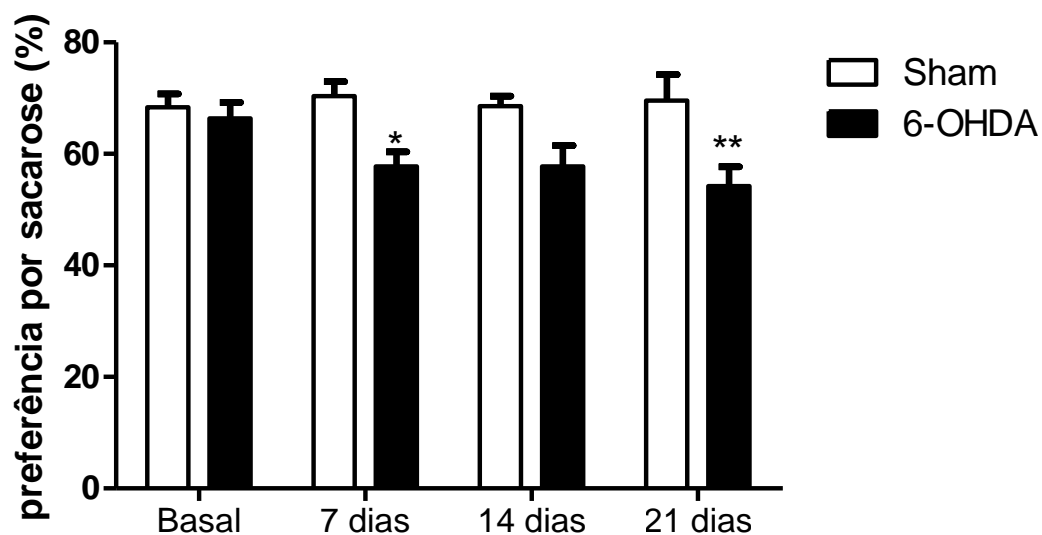


Figura 4: Alteração da porcentagem no consumo de sacarose provocada pela 6-OHDA. Teste de preferência por sacarose. Os dados foram obtidos, 1 semana antes (basal) e 7, 14, e 21 dias após a infusão da 6-OHDA. Os dados são expressos como média \pm erro padrão (n=8-9/grupo). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, comparado com o grupo sham (ANOVA de duas vias seguido pelo teste *post hoc* de Bonferroni).

4.1.2 Coloração de Nissl e quantificação neuronal

A análise da população de neurônios na SNpc revelou que a infusão da 6-OHDA foi capaz de causar perda neuronal pronunciada (Fig. 5A e B). A quantificação de neurônios corados por Nissl indicou que a 6-OHDA induziu a redução de 28,1% dos neurônios na SNpc em comparação com o grupo sham ($p < 0,01$) 1 dia após a infusão. Além disso, nos dias 7, 14 e 21 também demonstramos redução no percentual de neurônios na SNpc no grupo 6-OHDA em comparação com o grupo sham (topos $p < 0,001$).

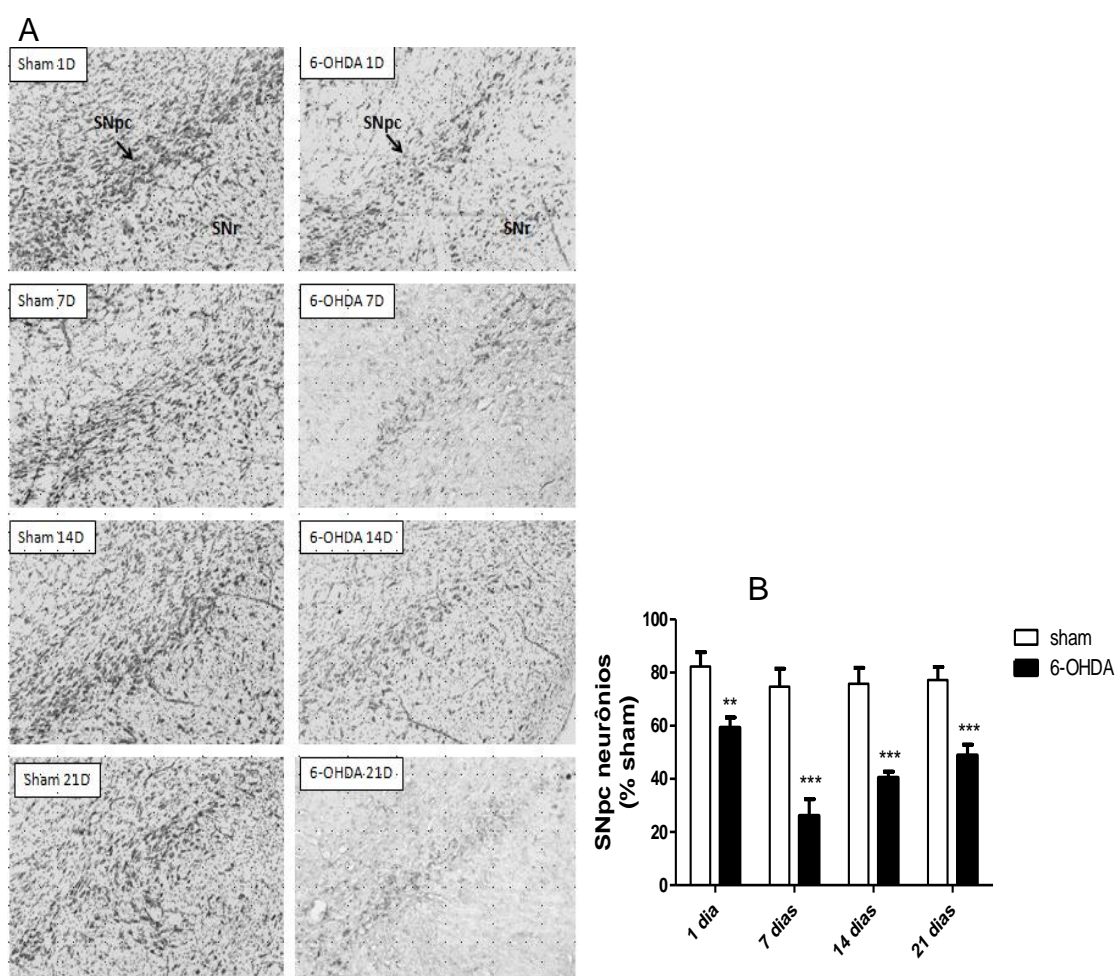


Figura 5: Análise histológica da SNpc e quantificação neuronal após a infusão da 6-OHDA. Os dados foram obtidos 1, 7, 14, e 21 dias após a infusão de 6-OHDA. (A) fotomicrografias representativas de neurônios Nissl corados no mesencéfalo ventral de cada grupo. (B) quantificação estereológica do número total de neurônios no SNpc para cada grupo. Os dados são expressos como uma porcentagem do grupo sham ($n=5-8$ /grupo). *** $p < 0,01$, em comparação com o grupo sham (ANOVA de duas vias seguido pelo teste *post hoc* de Bonferroni)

4.1.3 Determinação estriatal de DA e hipocampal de 5-HT

A figura 6A-C apresenta as concentrações estriatais de DA e dos seus metabolitos ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) e ácido homovanílico (HVA). A DA foi significativamente reduzida no grupo 6-OHDA comparado ao grupo sham ($p < 0,001$), 7, 14, e 21 dias após a exposição à neurotoxina. O grupo 6-OHDA exibiu ainda redução nos níveis de DOPAC em comparação com o grupo sham no dia 7 ($p < 0,05$) e 21 ($p < 0,001$). A concentração de HVA aumentou no grupo 6-OHDA comparado com o grupo sham, no 1º dia após a cirurgia ($p < 0,001$), seguido por uma redução no 7º ($p < 0,001$), 14 ($p < 0,01$), e 21º dia ($p < 0,001$) após a infusão da 6-OHDA.

A análise das concentrações de 5-HT e de seu metabolito 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) no hipocampo indicou que a 5-HT reduziu no grupo 6-OHDA comparado com o grupo sham no 1º, 7º, 14º, e 21º dia após a exposição à neurotoxina (todos $p < 0,05$) (Fig. 7). Além disso, a 6-OHDA foi capaz de aumentar o nível de 5-HIAA em comparação com o grupo sham, no dia 1 ($p < 0,05$) e reduzir no dia 21 após a cirurgia ($p < 0,05$). (Fig. 7B)

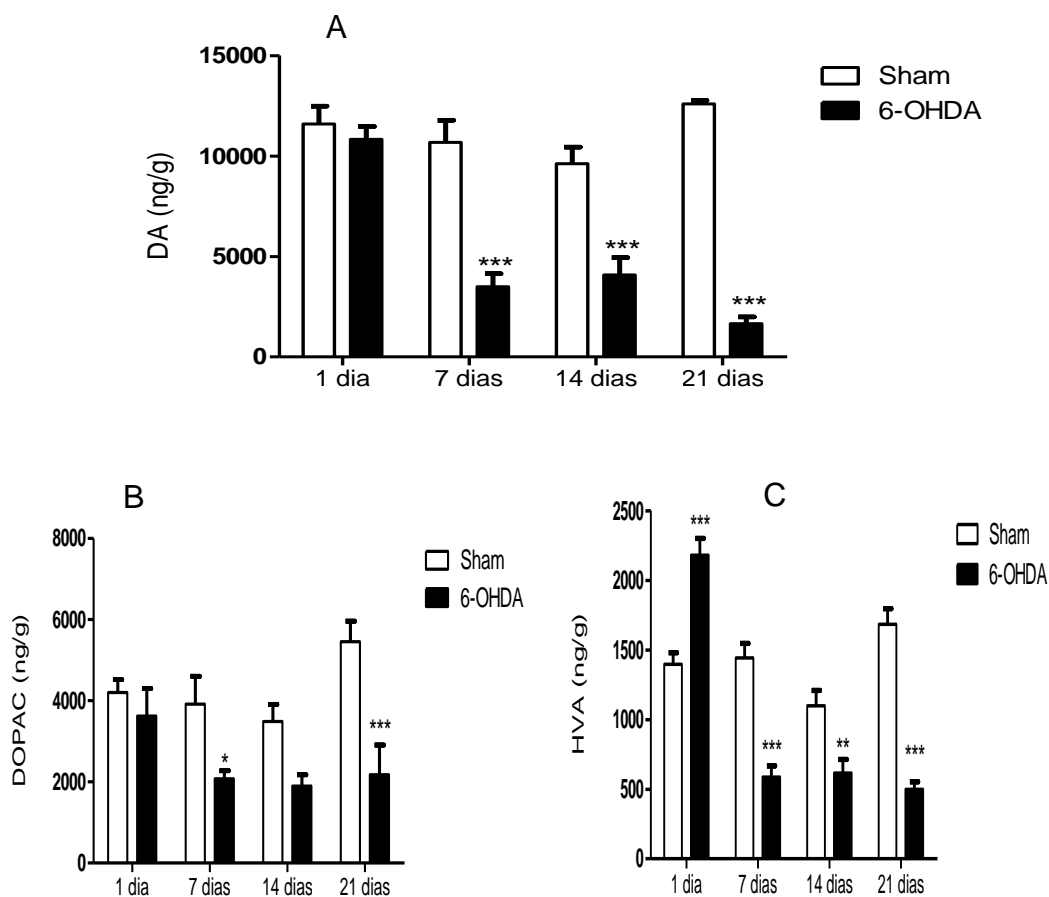


Figura 6: Determinação das alterações nas concentrações estriatais de dopamina, DOPAC e HVA provocada pela neurotoxina 6-OHDA. Os dados foram obtidos 1, 7, 14, e 21 dias após a infusão de 6-OHDA por HPLC. (A) as concentrações de DA. (B) As concentrações de DOPAC. (C) Concentrações de HVA. Os dados são expressos como média \pm erro padrão (n=4-10/grupo). * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, em comparação com o grupo sham (ANOVA de duas vias seguido pelo teste *post hoc* de Bonferroni).

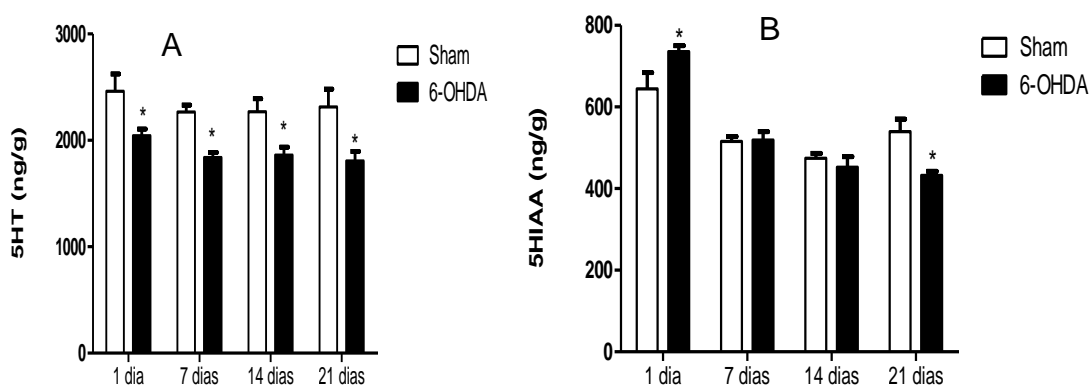


Figura 7: Análise neuroquímica das concentrações no hipocampo de 5-HT e 5-HIAA provocada pela neurotoxina 6-OHDA. Os dados foram obtidos 1, 7, 14, e 21 dias após a infusão de 6-OHDA. (A), as concentrações de 5-HT. (B) as concentrações de 5-HIAA. Os dados são expressos como média \pm erro padrão (n=5-8/grupo). * $p < 0,05$, em comparação com o grupo sham (ANOVA de duas vias seguido pelo teste *post hoc* de Bonferroni).

4.1.4 Correlações entre os comportamentos tipo depressivos e neurotransmissores

Os níveis dos neurotransmissores alterados 21 dias após à infusão de 6-OHDA foram correlacionados com os comportamentos tipo depressivos observado nos animais lesados no mesmo tempo. Os coeficientes de correlação de Pearson revelaram correlação positiva entre a concentração hipocampal de 5-HT e natação ($r=0,92$, $p=0,087$; Fig. 8A-D) e correlação negativa entre a DA estriatal e imobilidade ($r=-0,92$, $p=0,078$). Além disso, foi encontrada uma forte correlação positiva entre concentração de 5-HT no hipocampo ($r=0,98$, $p=0,0002$) e o nível de DA no estriado ($r=0,97$, $p=0,0007$) com a preferência por sacarose.

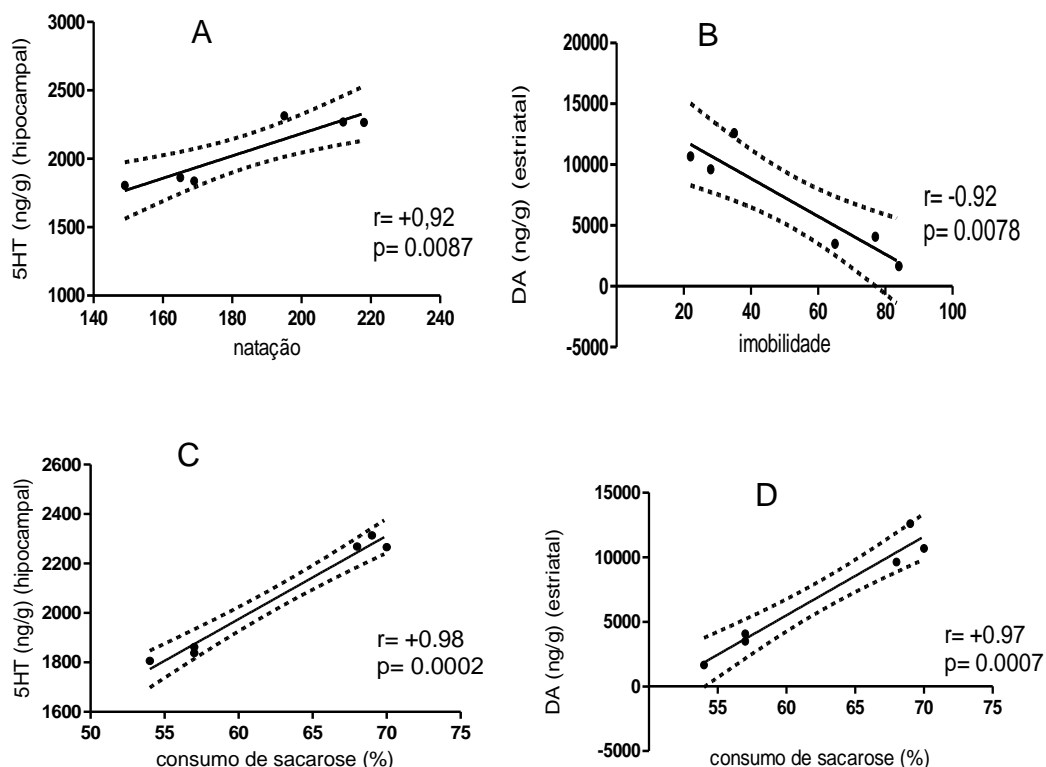


Figura 8: Correlação entre os níveis dos neurotransmissores e os comportamentos tipos depressivos. Comportamento tipo depressivo foi correlacionado com os sistemas de neurotransmissores 21 dias após a infusão de 6-OHDA, utilizando a média de cada grupo. Os coeficientes de correlação de Pearson foram calculados para o seguinte: (A) 5-HT x natação, (B) a dopamina x imobilidade, (C) 5-HT x preferência por sacarose, e (D) da dopamina x preferência por sacarose.

4.2 EXPERIMENTO 2: REVERSÃO DO COMPORTAMENTO TIPO DEPRESSIVO E ENVOLVIMENTO DO SISTEMA SEROTONÉRGICO

Com o intuito de comprovarmos as alterações comportamentais observadas no experimento 1 como sinais depressivos e avaliar o envolvimento do sistema serotoninérgico nestes comportamentos, o experimento 2 foi realizado com o objetivo de promover a reversão do comportamento tipo depressivo através do tratamento prolongado com drogas antidepressivas de diferentes classes, sertralina (ISRS), venlafaxina (ISRSN), nortriptilina (antidepressivo tricíclico) e a avaliação da participação do sistema serotoninérgico através da administração prolongada de l-triptofano (precursor da 5-HT). Os animais foram distribuídos em dez grupos (n=7-10/grupo) sendo eles: sham+salina, sham+l-triptofano, sham+sertralina, sham+venlafaxina, sham+nortriptilina, 6-OHDA+salina, 6-OHDA+l-triptofano, 6-OHDA+sertralina, 6-OHDA+venlafaxina, 6-OHDA+nortriptilina. No dia 0 os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica. Uma hora após a cirurgia os animais foram tratados por gavagem, de acordo com o seu grupo, uma vez ao dia durante 21 dias (a última administração ocorreu 1 h antes do teste de CA). O teste de CA foi realizado nos dias 1 e 21 e o teste de NF e preferência por sacarose no dia 21. Imediatamente após o teste comportamental, os animais foram decapitados e seus cérebros retirados para a dissecação do estriado e hipocampo analisados neuroquimicamente. Este experimento foi realizado em duplicata onde um grupo foi submetido aos testes de CA e NF e outro grupo ao teste de preferência por sacarose.

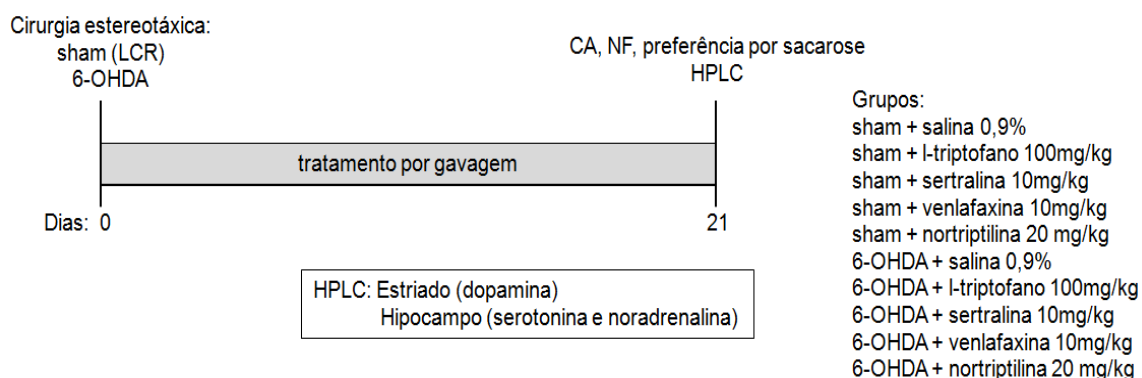


Figura 9: Representação esquemática do experimento 2. 6-OHDA: 6-hidroxi-dopamina; LCR: líquido cefalorraquidiano; CA: campo aberto; NF: teste de natação forçada.

4.2.1 Testes comportamentais em animais lesados e tratados com antidepressivos e l-triptofano

Na avaliação da atividade motora através do teste de CA os animais dos grupos, 6-OHDA+salina ($p<0,001$), 6-OHDA+sertralina ($p<0,01$), 6-OHDA+venlafaxina ($p<0,001$) e 6-OHDA+nortriptilina ($p<0,01$) apresentaram redução do número de quadrantes percorridos e aumento da frequência de levantar ($p<0,01$, $p<0,05$, $p<0,01$ e $p<0,05$, respectivamente) em comparação ao grupo sham+salina (controle) 1 dia após a infusão da 6-OHDA. Em adição, os grupos 6-OHDA+salina ($p<0,01$), 6-OHDA+sertralina ($p<0,05$), 6-OHDA+venlafaxina ($p<0,05$) e 6-OHDA+nortriptilina ($p<0,05$) apresentaram um aumento do tempo de imobilidade em comparação com o grupo sham+salina 1 dia após a exposição à neurotoxina. No entanto no 21º dia, apenas os grupos sham+nortriptilina ($p<0,05$) e 6-OHDA+nortriptilina ($p<0,01$) demonstraram diminuição do número de quadrantes percorridos, aumento da frequência de levantar (ambos $p<0,01$) e do tempo de imobilidade (ambos $p<0,05$) quando comparado com o grupo sham+salina. (Tabela 2).

No teste de NF (Fig. 10 A e B) realizado no 21º dia após a cirurgia, observamos que o grupo 6-OHDA+salina ($p<0,001$) apresentou diminuição do tempo de natação em relação ao grupo sham+salina, em contrapartida os grupos sham+l-triptofano, sham+sertralina e sham+venlafaxina apresentaram aumento em comparação com o grupo sham+salina (todos $p<0,05$). Em relação ao tempo de imobilidade apenas o grupo 6-OHDA+salina demonstrou aumento em comparação ao grupo sham+salina ($p<0,01$). Por fim, o tempo de escalada não foi alterado em nenhum grupo comparado ao grupo sham+salina (dados não mostrados).

A análise do teste de preferência por sacarose (Fig. 11) revelou que 21 dias após a exposição à neurotoxina, apenas o grupo 6-OHDA+salina ($p<0,001$) apresentou redução significativa em relação ao basal.

Tabela 2. Parâmetros motores 1 e 21 dias após a infusão da 6-OHDA e tratamento com os antidepressivos

Grupos	Dia	Número de quadrante	Frequência de levantar	Tempo de imobilidade (s)
sham+ saline	1	82,9±6,73	16,50±2,36	0,80±0,32
	21	67,57±4,42	12,71 ±1,286	13,00±4,92
sham + l-tryptofano	1	93±3,05	21,60±1,70	0,50±0,50
	21	73,57±8,56	15,29±1,82	12,29±4,55
sham+ sertralina	1	77,7±3,00	14,70±1,83	1,00±0,39
	21	62,00±10,71	11,00±1,44	12,86±4,06
sham + venlafaxina	1	81,8±10,22	15,20±1,86	1,20±0,35
	21	65,43±8,16	13,71±1,14	8,571±5,63
sham+nortriptilina	1	93,8±5,73	15,30±2,77	0,50±0,26
	21	34,14±8,55 [*]	4,57±1,28 ^{**}	42,71±8,28 [*]
6-OHDA+ saline	1	29,5±3,28 ^{**}	6,800±1,162 ^{**}	9,80±2,82 ^{**}
	21	69,57±6,81	12,86±1,71	15,43±5,66
6-OHDA + l-tryptofano	1	78,5±7,22	15,10±2,12	0,30±0,21
	21	72,86±7,18	15,86±1,59	8,857±4,15
6-OHDA+sertralina	1	49,2±4,91 ^{**}	7,700±0,84 [*]	7,00±1,55 [*]
	21	67,50±9,44	12,14±1,68	17,71±7,46
6-OHDA+venlafaxina	1	34,6±7,05 ^{***}	6,400±1,52 ^{**}	7,40±2,12 [*]
	21	67,50±7,07	12,29±1,30	9,000±4,31
6-OHDA+nortriptilina	1	49,2±4,91 ^{**}	8,700±1,13 [*]	7,80±1,96 [*]
	21	24,86±3,75 ^{**}	4,28±1,08 ^{**}	37,86±6,53 [*]

Todos os valores são expressos como média ± erro padrão (n = 7-10 / grupo). * p<0,05, ** p<0,01 e *** p<0,001 em comparação com o grupo sham + salina. (ANOVA de uma via seguido pelo teste post hoc de Newman-Keuls).

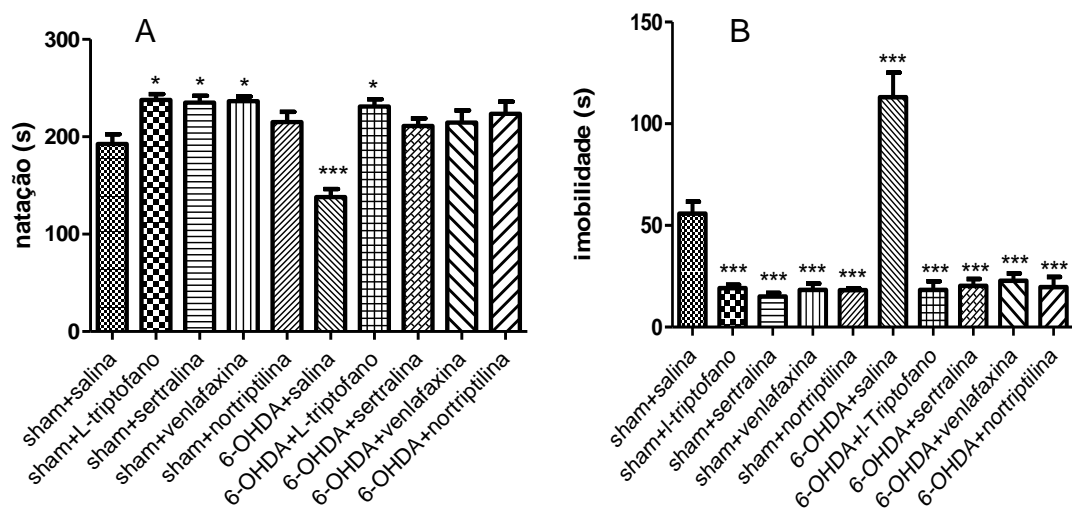


Figura 10: Efeito dos antidepressivos e do l-triptofano no teste de NF após a infusão da 6-OHDA. Comportamento dos animais no teste de NF após o tratamento prolongado com antidepressivos e l-triptofano: 100 mg/kg de l-triptofano, 10 mg/kg de sertralina, 10mg/kg de venlafaxina ou 20 mg/kg de nortriptilina (A) tempo de natação e (B) tempo de imobilidade. Os dados são expressos como média \pm erro padrão (n=6/grupo). *p<0.05, **p<0.01 e ***p<0.001 em comparação com o grupo sham + salina (ANOVA de uma via seguido do teste pos hoc de Newman-Keuls).

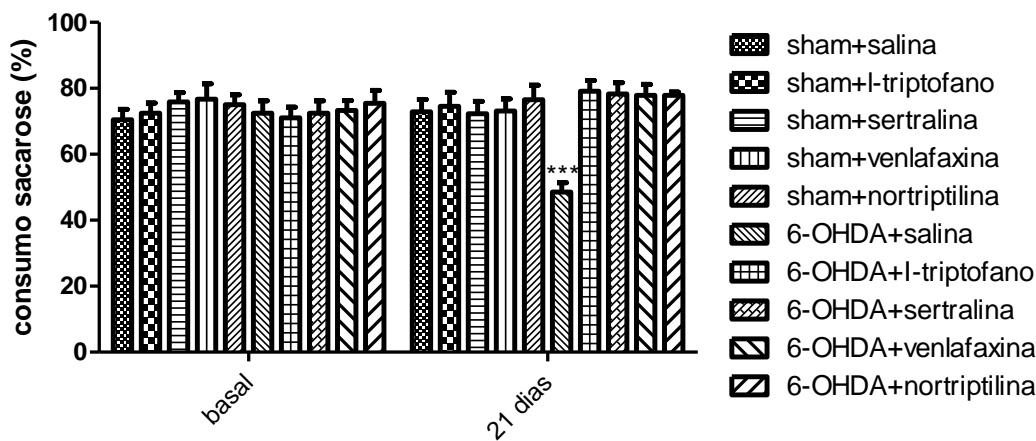


Figura 11: Consumo de sacarose após a infusão da 6-OHDA e tratamento com antidepressivos e l-triptofano. Percentual da preferência por sacarose 1 semana antes (basal) e 21 dias após a infusão de 6-OHDA na SNpc e o tratamento com 100 mg/Kg de l-triptofano, 10 mg/Kg de sertralina, 10mg/Kg de venlafaxina ou 20 mg/Kg de nortriptilina. Os dados são expressos como média \pm erro padrão (n = 7 / grupo). *** p<0,001 em relação ao grupo sham + salina. (ANOVA de duas vias seguido pelo teste post hoc de Bonferroni).

4.2.2 Determinação dos níveis de monoamina após o tratamento com os antidepressivos e o l-triptofano

Na Figura 12A e B, estão representadas as concentrações estriatais de DA e seu metabólito DOPAC. A DA apresentou-se reduzida ($p < 0,001$) nos grupos 6-OHDA+salina, 6-OHDA+l-triptofano ($p < 0,05$), 6-OHDA+sertralina ($p < 0,01$), 6-OHDA+venlafaxina ($p < 0,01$) e 6-OHDA+nortriptilina ($p < 0,001$) em comparação ao grupo sham+salina no 21º após a infusão da neurotoxina. Em relação ao DOPAC os grupos sham+l-triptofano ($p < 0,05$), 6-OHDA+salina ($p < 0,01$), 6-OHDA+l-triptofano ($p < 0,05$), 6-OHDA+sertralina ($p < 0,05$) e 6-OHDA+nortriptilina ($p < 0,01$), demonstraram redução na concentração quando comparados com o grupo sham+salina.

De acordo com as concentrações hipocâmpais de 5-HT e seu metabólito 5-HIAA verificamos redução na 5-HT no dia 21 após a cirurgia no grupo 6-OHDA+salina e um aumento nos grupos sham+l-triptofano, sham+sertralina e sham+venlafaxina (todos $p < 0,05$) quando comparados com o grupo sham+salina. Apenas o grupo 6-OHDA+l-triptofano demonstrou aumento significativo na concentração do 5HIAA ($P < 0,001$) comparado com o grupo sham+salina no dia 21 após a infusão da neurotoxina (Fig. 13A e B). A concentração hipocâmpal de NA demonstrou estar reduzida nos grupos 6-OHDA+salina ($p < 0,01$), 6-OHDA+l-triptofano ($p < 0,05$), 6-OHDA+sertralina ($p < 0,01$), 6-OHDA+venlafaxina ($p < 0,01$) e 6-OHDA+nortriptilina ($p < 0,05$) em comparação com ao grupo sham+salina no dia 21 após a lesão (Fig. 13C).

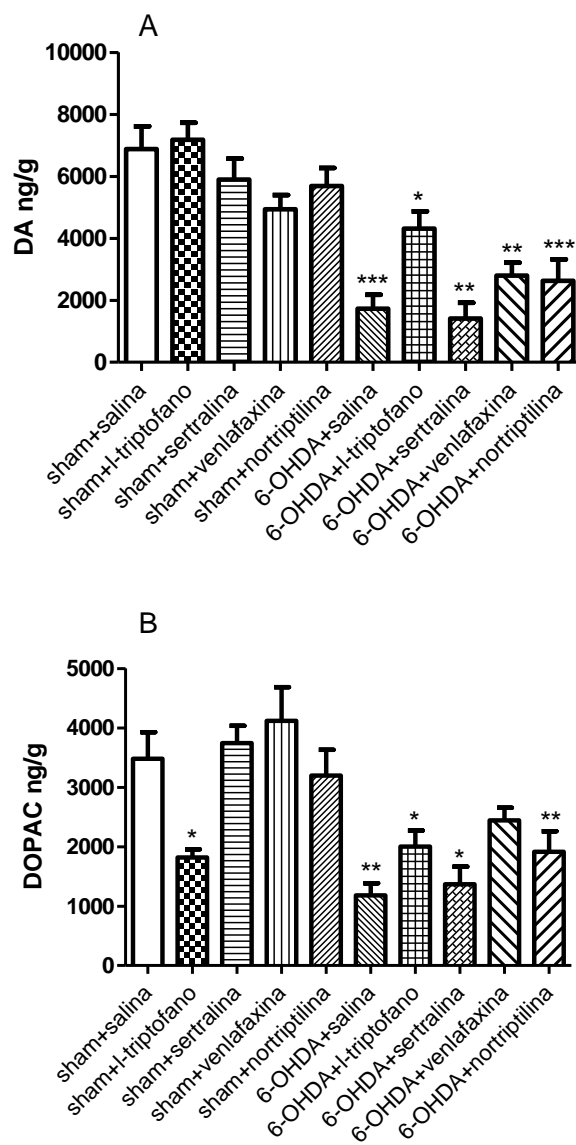


Figura 12: Níveis de DA e DOPAC estriatais 21 dias após a infusão de 6-OHDA na SNpc e e tratamento com antidepressivos e l-tryptofano. Os dados foram obtidos após o tratamento com 100 mg/Kg de l-tryptofano, 10 mg/Kg de sertralina, 10mg/Kg de venlafaxina ou 20 mg/Kg de nortriptilina. Os dados são expressos como média \pm erro padrão (n=6/grupo). * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em relação ao grupo sham + salina. (ANOVA de uma via seguido pelo teste post hoc de Newman-Keuls).

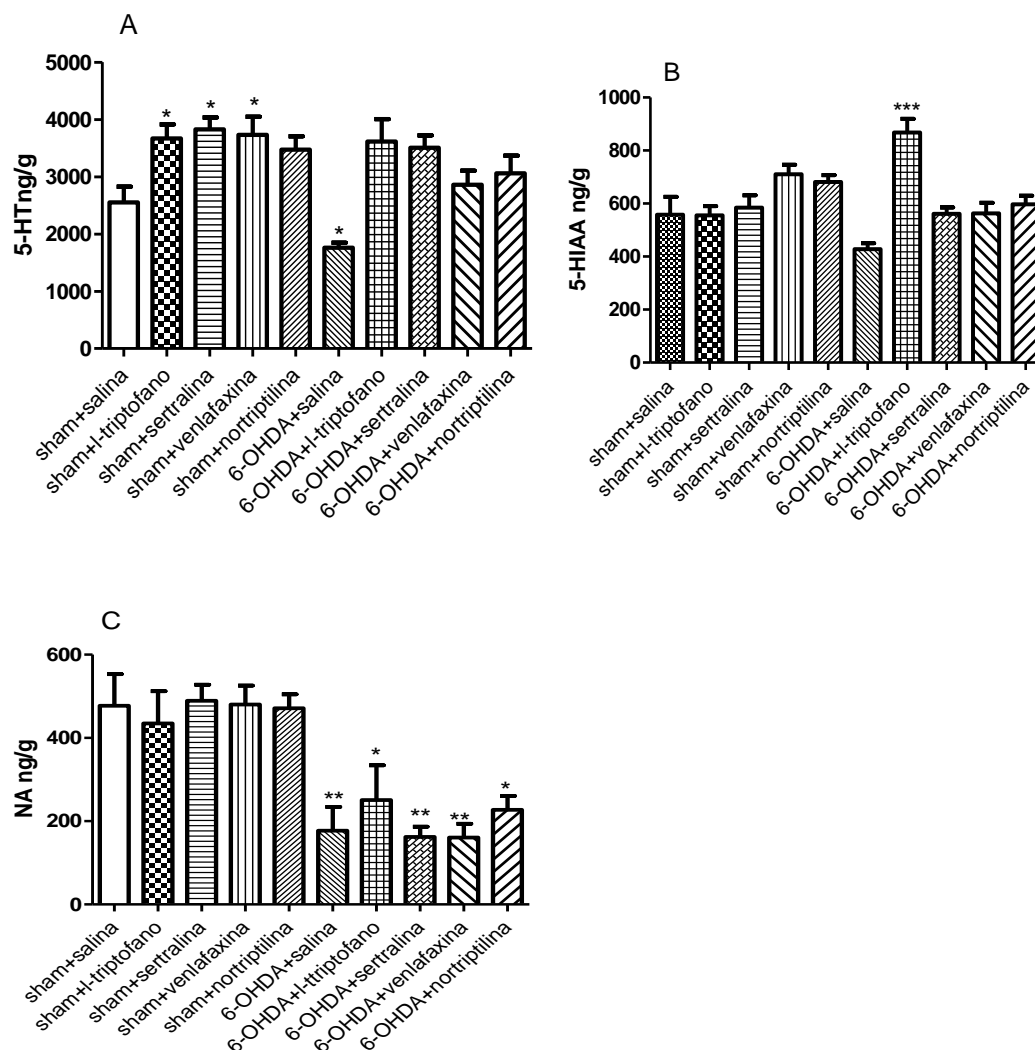


Figura 13 Concentração hipocampal de NA, 5-HT e 5-HIAA após a infusão da 6-OHDA e tratamento com antidepressivos e l-tryptofano. Os dados foram obtidos após o tratamento com 100 mg/Kg de l-tryptofano, 10 mg/Kg de sertralina, 10mg/Kg de venlafaxina ou 20 mg/Kg de nortriptilina. Os dados são expressos como média \pm erro padrão ($n = 6$ / grupo). * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em relação ao grupo sham + salina. (ANOVA de uma via seguido pelo teste post hoc de Newman-Keuls).

4.2.3 Correlação entre os comportamentos tipo depressivos e a 5-HT hipocampal

A alteração do neurotransmissor 5-HT foi fortemente correlacionada com os comportamentos tipo depressivos apresentados pelos animais testados 21 dias após a cirurgia estereotáxica. O coeficiente de correlação de Pearson revelou correlações positivas entre a concentração hipocampal de 5-HT e o

tempo de natação ($r=0,93$, $p<0,001$) (Fig. 14 A) e a porcentagem de preferência por sacarose ($r=0,74$, $p=0,0138$), apresentada na Fig. 14 B.

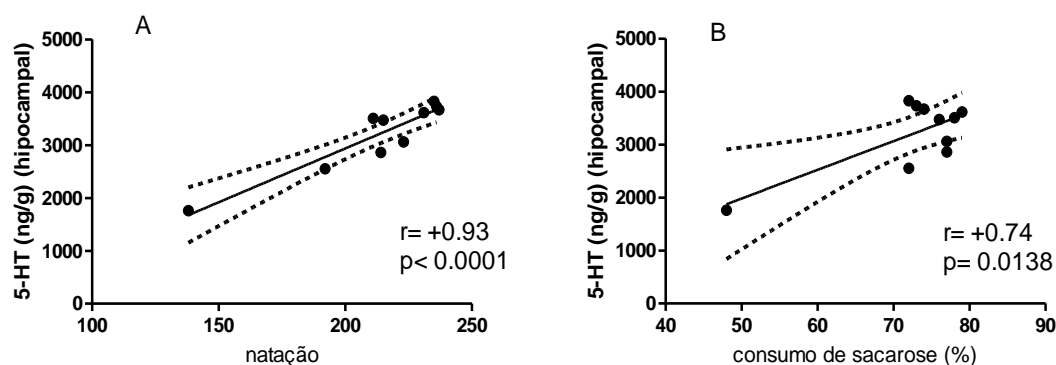


Figura 14: Correlação entre os níveis de 5-HT hipocampal e os comportamentos tipos depressivos. Comportamento tipo depressivo foi correlacionado com o sistema serotoninérgico utilizando a média dos grupos. Os coeficientes de correlação de Pearson foram calculados para o seguinte: (A) 5-HT x natação, (B) 5-HT x preferência por sacarose.

4.3 EXPERIMENTO 3: AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIDEPRESSIVO DE DROGAS ANTI-INFLAMATÓRIAS

Diante da necessidade em avaliar se drogas AINEs possuem efeito antidepressivo executamos este experimento, que foi dividido em dois procedimentos: tratamento agudo e o tratamento prolongado como descrito a seguir:

Tratamento agudo;

Os ratos foram distribuídos em quatro grupos ($n=8$ /grupo): 0,9 % de solução salina (controle), 10 mg/Kg de celecoxib, de 10 mg/Kg de piroxicam e 20 mg/Kg de imipramina (controle positivo). Três administrações das drogas foram realizadas por gavagem, 1, 5 e 24 h antes de testar os animais no CA e no teste de NF (Slattery e Cryan, 2012). Ao final do teste os animais foram decapitados e o hipocampo retirado por dissecação para a análise neuroquímica.

Tratamento prolongado

Neste protocolo, os animais foram distribuídos aleatoriamente em grupos de oito: estressado+salina (n=9), estressado+imipramina (n=15), estressado+celecoxibe (n=11), estressado+piroxicam (n=11), não estressado+salina (n=10), não estressado+imipramina (n = 10), não estressado+celecoxib (n=10), e não estressado+piroxicam (n = 10). Apenas os grupos estressados foram submetidos ao protocolo de CMS, durante todo o experimento (42 dias). Após 3 semanas de exposição ao CMS, os tratamentos com as drogas (gavagem) foram iniciados e perdurou por 21 dias (desde o dia 21 até o dia 42). O teste de preferência por sacarose foi realizado nos dias 0 (basal), 7, 14, 21, 22, 28, 35, e 42 do experimento. Os animais do grupo não estressados foram alocados individualmente em gaiolas de polipropileno antes do teste de preferência por sacarose e alojados em grupos novamente ao final do teste. Este procedimento foi realizado uma vez por semana (2 semanas) antes do início dos experimentos para a habituação dos animais .

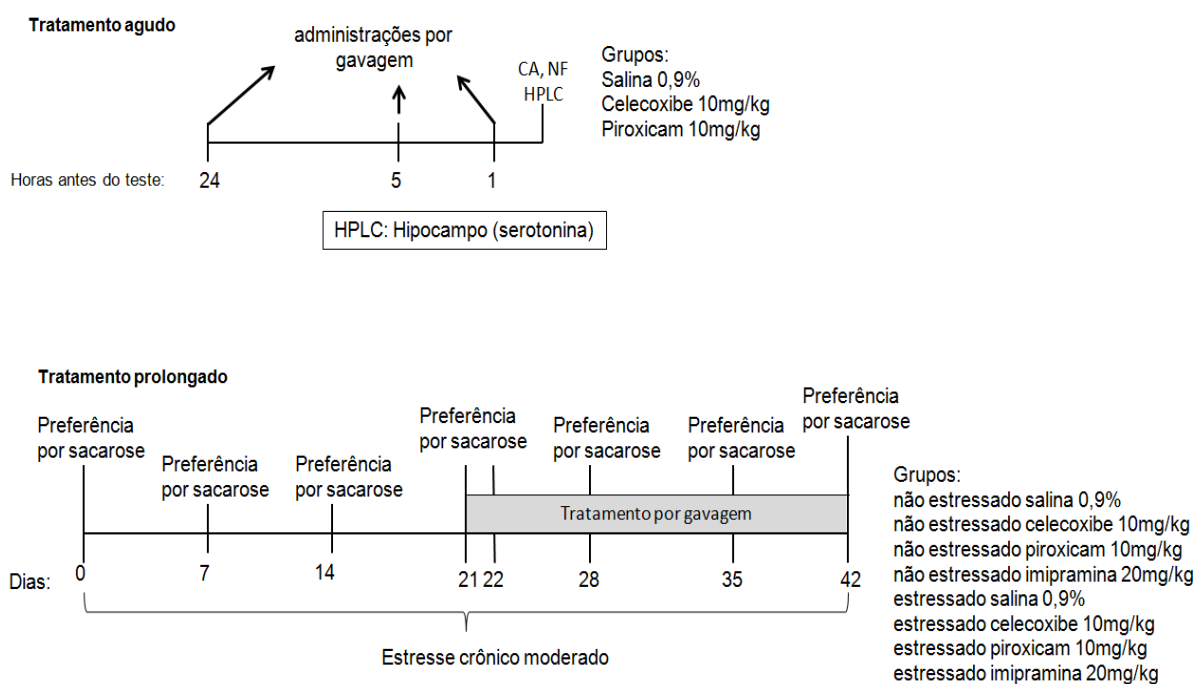


Figura 15: Representação esquemática do experimento 3. CA: campo aberto; NF: teste de natação forçada.

4.3.1 Efeitos comportamentais do tratamento agudo com o celecoxibe e o piroxicam

Nem o tratamento agudo com os anti-inflamatórios, nem tratamento com imipramina (controle positivo) alterou a velocidade de locomoção e a distância percorrida no teste de CA em comparação com o grupo salina (dados não mostrados).

No teste de NF os grupos celecoxibe ($p < 0,001$), piroxicam ($p < 0,001$) e imipramina ($p < 0,05$) apresentaram aumento do tempo de natação em comparação com o grupo salina, assim como redução do tempo de imobilidade: celecoxibe ($p < 0,05$), piroxicam ($p < 0,01$), e imipramina ($p < 0,05$). No parâmetro da escalada, apenas o grupo imipramina apresentou aumento no tempo de escalada ($p < 0,01$) quando comparado ao grupo salina (Fig. 16A-C).

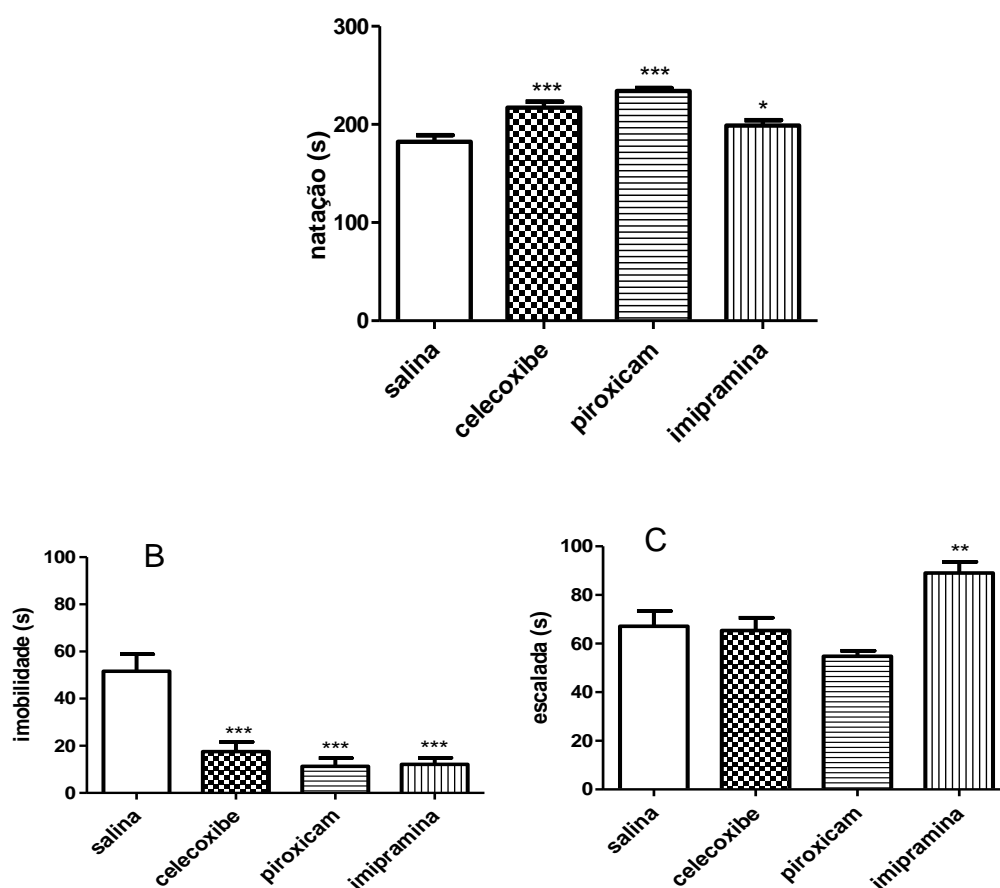


Figura 16: Avaliação do efeito antidepressivo do celecoxibe e piroxicam no teste de NF. Teste NF 1 h após o tratamento agudo com 10 mg/Kg de celecoxib, de 10 mg/Kg de piroxicam, e 20 mg/Kg de imipramina em ratos. (A) tempo de natação e (B) tempo de imobilidade. Os dados são expressos como média \pm erro padrão ($n = 8/\text{grupo}$). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, comparado com o grupo salina (ANOVA de uma via seguido por *post hoc* de Newman-Keuls)

4.3.2 Efeitos do tratamento prolongado com o celecoxibe e o piroxicam nos testes comportamentais

Em relação aos efeitos do CMS nos animais e reversão da anedonia pelos AINEs (celecoxibe e piroxicam), demonstramos que o CMS foi capaz de produzir anedonia nos animais, através da diferença na preferência por sacarose apresentada entre os grupos estressados e não estressados no dia 7 ($p < 0,01$), 14 ($p < 0,01$) e 21 ($p < 0,001$). Este efeito de anedonia se manteve ainda até o tratamento agudo nos grupos estressado+imipramina, estressado+celecoxibe ($n = 11$), estressado+piroxicam (todos $p < 0,01$) e até o dia 42 no grupo estressado+salina em comparação com os grupos não estressado+salina ($p < 0,05$). No dia 42, os grupos estressados tratados com celecoxibe e piroxicam não exibiram nenhuma diferença dos respectivos grupos não estressados e diferiram significativamente entre o grupo estressado salina ($p < 0,05$). (Fig. 17)

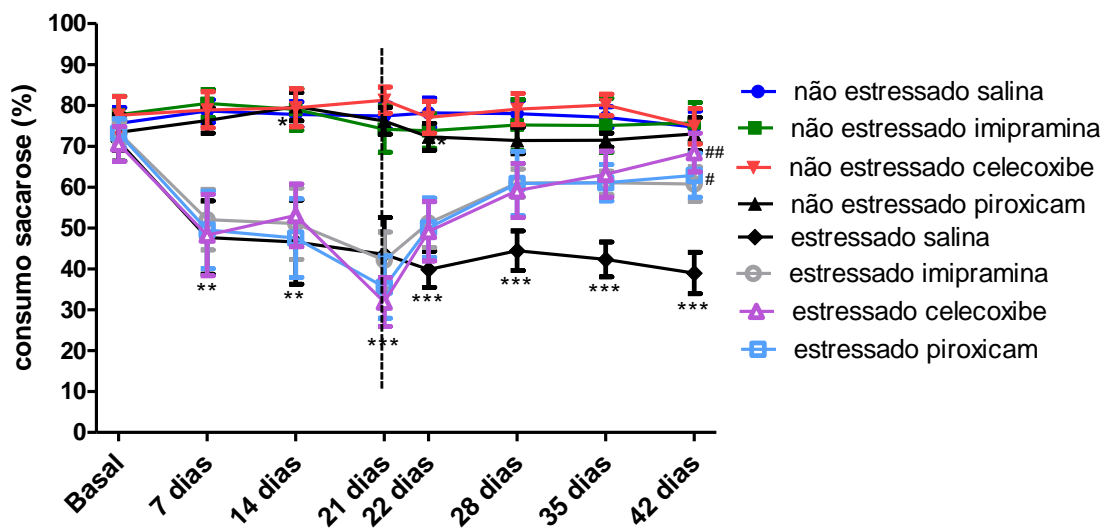


Figura 17: Efeito do CMS e tratamento prolongado com celecoxibe e piroxicam. Comportamento tipo anedônico induzido por estresse crônico moderado nos grupos tratados com: solução salina 0,9%, imipramina 20 mg/Kg celecoxibe 10 mg/Kg e piroxicam 10 mg/Kg. A linha a tracejado vertical indica o início do tratamento agudo e de longo prazo com os medicamentos. Os dados são expressos como média \pm erro padrão ($n = 9-15$ /grupo). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, em comparação com o grupo não estressado salina; # $p < 0,05$, # # $p < 0,01$, comparado com o grupo estressado salina. (ANOVA de duas vias seguido pelo teste post hoc de Bonferroni).

4.3.3 Determinação dos níveis de monoamina após tratamento agudo com celecoxibe e piroxicam

A análise dos níveis de 5-HT no hipocampo revelou que o tratamento agudo com piroxicam ($p < 0,05$) e imipramina ($p < 0,01$) foi capaz de aumentar o nível deste neurotransmissor quando comparado ao grupo salina. Os grupos celecoxibe ($p < 0,05$), piroxicam ($p < 0,05$) e imipramina ($p < 0,05$) apresentaram ainda aumento nos níveis de 5-HIAA em comparação com o grupo salina. O nível de NA hipocampal aumentou nos grupos piroxicam ($p < 0,01$) e imipramina ($p < 0,01$) em comparação com o grupo salina (Fig. 18A-C).

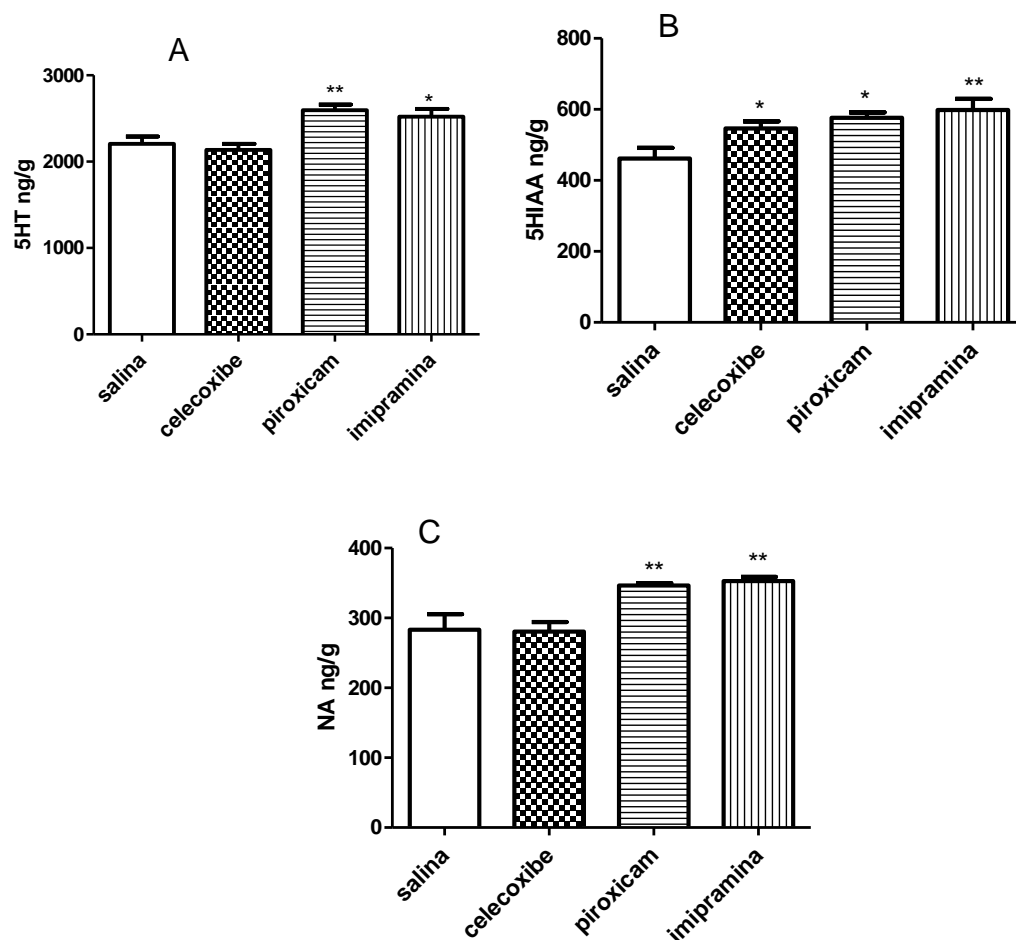


Figura 18: Níveis hipocâmpais de 5-HT, 5-HIAA e NA após tratamento agudo com celecoxibe e piroxicam. Os animais foram tratados agudamente com: 10 mg/Kg de celecoxibe, 10 mg/Kg de piroxicam, e 20 mg/Kg de imipramina. (A) Níveis de 5-HT (B) Níveis de 5-HIAA (C) Níveis de NA. Os dados são expressos como média \pm erro padrão ($n=5$ /grupo). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, comparado com o grupo salina (ANOVA de uma via seguido pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls)

4.4 EXPERIMENTO 4: AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIDEPRESSIVO DO PIROXICAM NA DEPRESSÃO NO MODELO ANIMAL DA DP - 6-OHDA

O objetivo deste experimento foi avaliar o efeito antidepressivo do AINE piroxicam no modelo animal da DP 6-OHDA. Os animais foram distribuídos em quatro grupos: sham+salina 0,9 % (n=7/8), sham+10 mg/kg piroxicam (n=7/9), 6-OHDA+salina (n=7/8) e 6-OHDA+piroxicam (n=6/9). No dia 0 os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica. Uma hora após a cirurgia os animais foram tratados com piroxicam ou solução salina por gavagem uma vez por dia durante 21 dias sendo que a última administração ocorreu 1 h antes do teste comportamental.

O teste de CA foi realizado nos dias 1 e 21 após a infusão da neurotoxina. Além disso, os animais foram avaliados nos testes de NF e preferência por sacarose no dia 21. Imediatamente após o teste comportamental, os animais foram decapitados e seus cérebros retirados para a dissecação do estriado e hipocampo para análise neuroquímica ou perfundidos intracardialmente para imunohistoquímica. Este experimento foi realizado em duplicata onde um grupo foi submetido aos testes de CA e NF e outro grupo ao teste de preferência por sacarose.

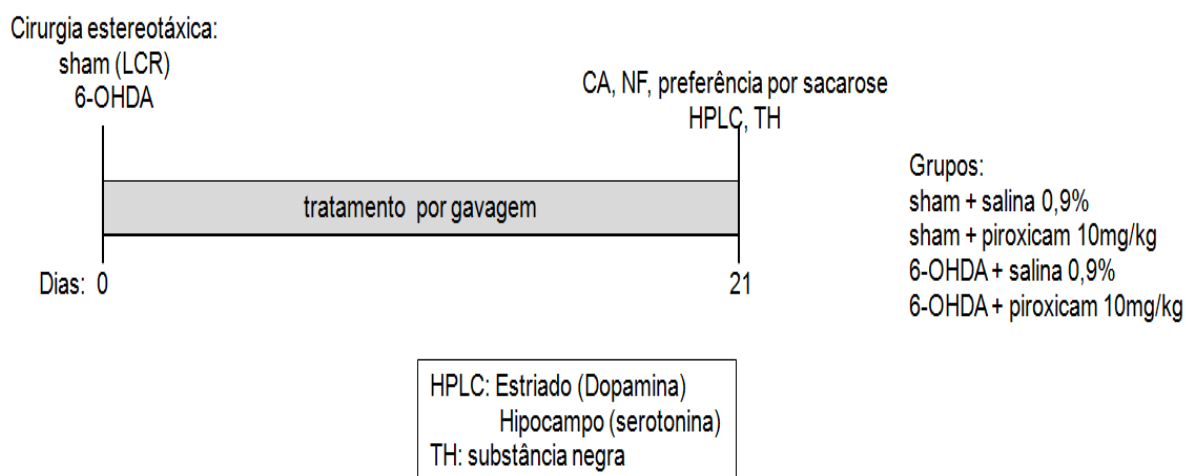


Figura 19: Representação esquemática do experimento 4. 6-OHDA: 6-hidroxidopamina; LCR: líquido cefalorraquidiano; CA: campo aberto; NF: teste de natação forçada.

4.4.1 Efeito do tratamento prolongado com o piroxicam nos testes comportamentais

No teste de CA, como pode ser visto na Tabela 3 o grupo 6-OHDA+salina demonstrou diminuição do número de quadrantes percorridos ($p<0,01$) e da frequência de levantar ($p<0,01$) e aumento do tempo de imobilidade ($p<0,05$) em comparação com o grupo sham+salina, apenas 1 dia após a infusão da 6-OHDA.

No teste de NF, demonstramos que o grupo 6-OHDA+salina apresentou redução do tempo de natação ($p<0,05$) e aumento do tempo de imobilidade ($p<0,001$) em comparação ao grupo sham+salina (Fig. 20 A e B). No parâmetro tempo de escalada nenhum grupo apresentou diferença (dados não mostrados).

O teste de preferência por sacarose (Fig. 21) revelou que 21 dias após a exposição à neurotoxina, apenas o grupo 6-OHDA+salina ($p<0,05$) apresentou redução em relação ao grupo sham+salina.

Tabela 3. Efeito do piroxicam na atividade motora

Grupos	Dias	Número de quadrante	Frequência de levantar	Tempo de imobilidade (s)
Sham+ salina	1	57.00 ± 6.63	15.37 ± 2.35	0.12 ± 0.12
	21	59.00 ± 2.99	14.14 ± 1.69	0.14 ± 0.14
Sham + piroxicam	1	54.00 ± 5.82	15.14 ± 0.76	0.28 ± 0.28
	21	50.14 ± 3.59	17.28 ± 3.73	0.28 ± 0.18
6-OHDA + salina	1	27.44 ± 4.45**	7.22 ± 1.10**	2.00 ± 0.62*
	21	58.43 ± 4.46	14.28 ± 4.17	0.14 ± 0.14
6-OHDA + piroxicam	1	51.9 ± 5.78	11.00 ± 1.89	0.50 ± 0.26
	21	64.43 ± 6.15	18.57 ± 2.93	0.33 ± 0.33

Todos os valores são expressos como média ± erro padrão (n = 7-10 / grupo). * $p<0,05$, ** $p<0,01$ em comparação com o grupo sham+salina. (ANOVA de uma via seguido pelo teste post hoc de Newman-Keuls).

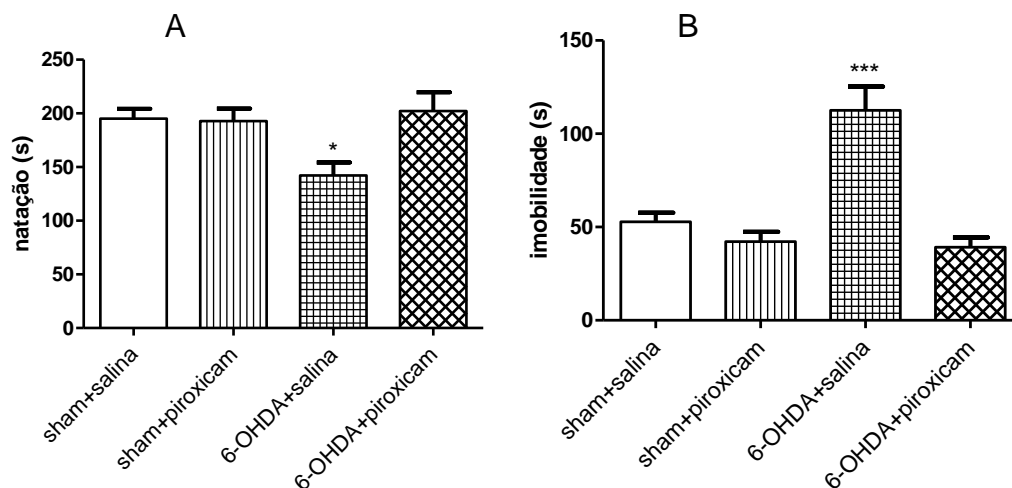


Figura 20: Efeito antidepressivo do piroxicam no teste de NF 21 dias após a infusão da 6-OHDA. Tratamento prolongado (21 dias) com 10mg/Kg de piroxicam, após a infusão de 6-OHDA na SNpc. (A) tempo de Natação e (B) tempo de imobilidade. Os dados são expressos como média \pm erro padrão (n=6-7/grupo). * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ em comparação com o grupo sham + salina. (ANOVA de uma via seguido pelo teste post hoc de Newman-Keuls).

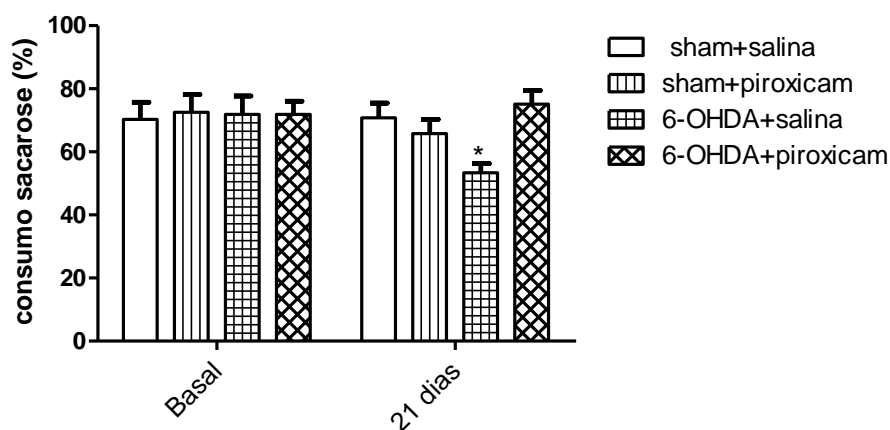


Figura 21: Consumo de sacarose após a infusão da 6-OHDA e tratamento com piroxicam por 21 dias. Percentual da preferência por sacarose 1 semana antes (basal) e 21 dias após a infusão de 6-OHDA na SNpc e o tratamento com piroxicam 10 mg/Kg. Os dados são expressos como média \pm erro padrão (n=8-9/grupo). * $p < 0,05$ em relação ao grupo sham + salina. (ANOVA de duas vias seguido pelo teste *post hoc* de Bonferroni).

4.4.2 Determinação dos níveis de monoamina após tratamento prolongado com piroxicam

A Figura 22A-C, mostra as concentrações estriatais de DA, DOPAC e HVA. A DA apresenta reduzida ($p < 0,001$) nos grupos 6-OHDA+salina e 6-OHDA+piroxicam em comparação com o grupo sham+salina no dia 21 após a

infusão da 6-OHDA. Da mesma forma, ambos os grupos apresentaram redução significativa da concentração de DOPAC e HVA em comparação ao grupo sham+salina (ambos $p < 0,001$).

Em relação às análises da 5-HT e seu metabólito 5HIAA hipocampal, evidenciamos que tanto a 5HT quanto a 5HIAA estão reduzidas no grupo 6-OHDA+salina ($p < 0,001$) quando comparado com o grupo sham+salina. No entanto, o grupo 6-OHDA+piroxicam não apresentou redução em relação ao grupo sham+salina (Fig. 23A e B).

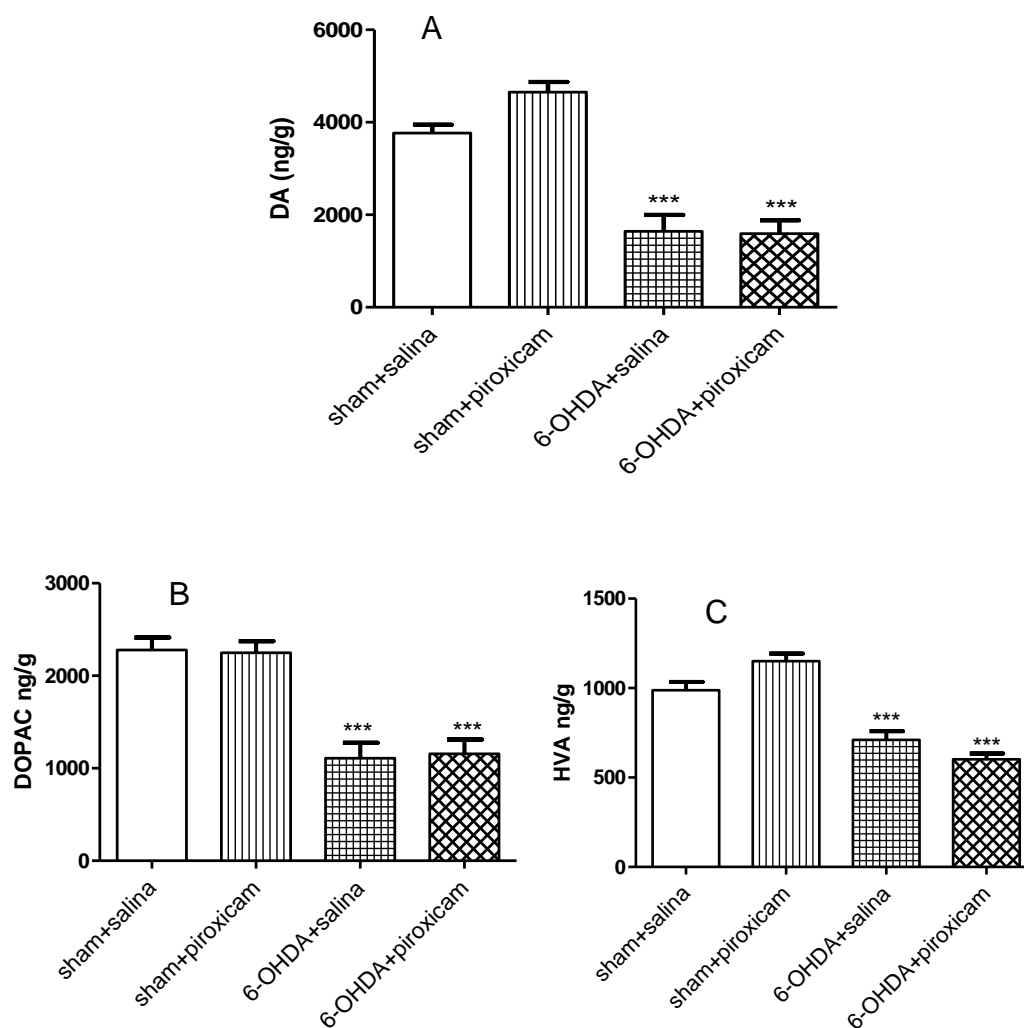


Figura 22: Concentrações estriatais de DA, DOPAC e HVA obtido 21 dias após a infusão de 6-OHDA na SNpc e tratamento com o piroxicam 10mg/Kg. (A) concentrações de DA, (B) concentrações de DOPAC e (C) concentrações de HVA. Os dados são expressos como média \pm erro padrão (n = 8/grupo). *** $p < 0,001$ em comparação com o grupo sham+salina. (ANOVA de uma via seguido do teste *pos hoc* de Newman-Keuls).

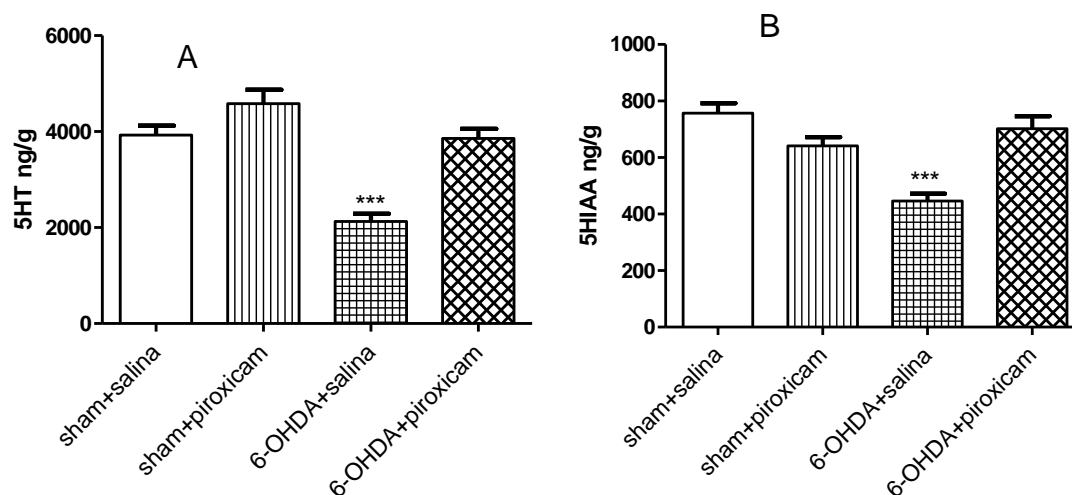


Figura 23: Concentrações hipocampal de 5HT e 5-HIAA 21 dias após a infusão de 6-OHDA na SNpc e do tratamento com piroxicam 10mg/kg. (A) concentrações da 5HT e (B) concentrações de 5HIAA. Os dados são expressos como média \pm erro padrão ($n=7$ /grupos) *** $p<0,001$ em comparação com o grupo sham+salina. (ANOVA de uma via seguido do teste pos hoc de Newman-Keuls).

4.4.3 Quantificação neuronal na SNpc

A análise da população neuronal residente na SNpc revelou que os animais dos grupos lesados com 6-OHDA apresentaram uma perda neuronal. A quantificação de neurônios TH-ir positivos mostrou que a 6-OHDA produziu redução de 32,6 % ($p<0,001$) nos neurônios localizados na SNpc em ambos os grupos (6-OHDA+salina e 6-OHDA+piroxicam) em comparação com o grupo sham+salina (Fig. 24A e B).

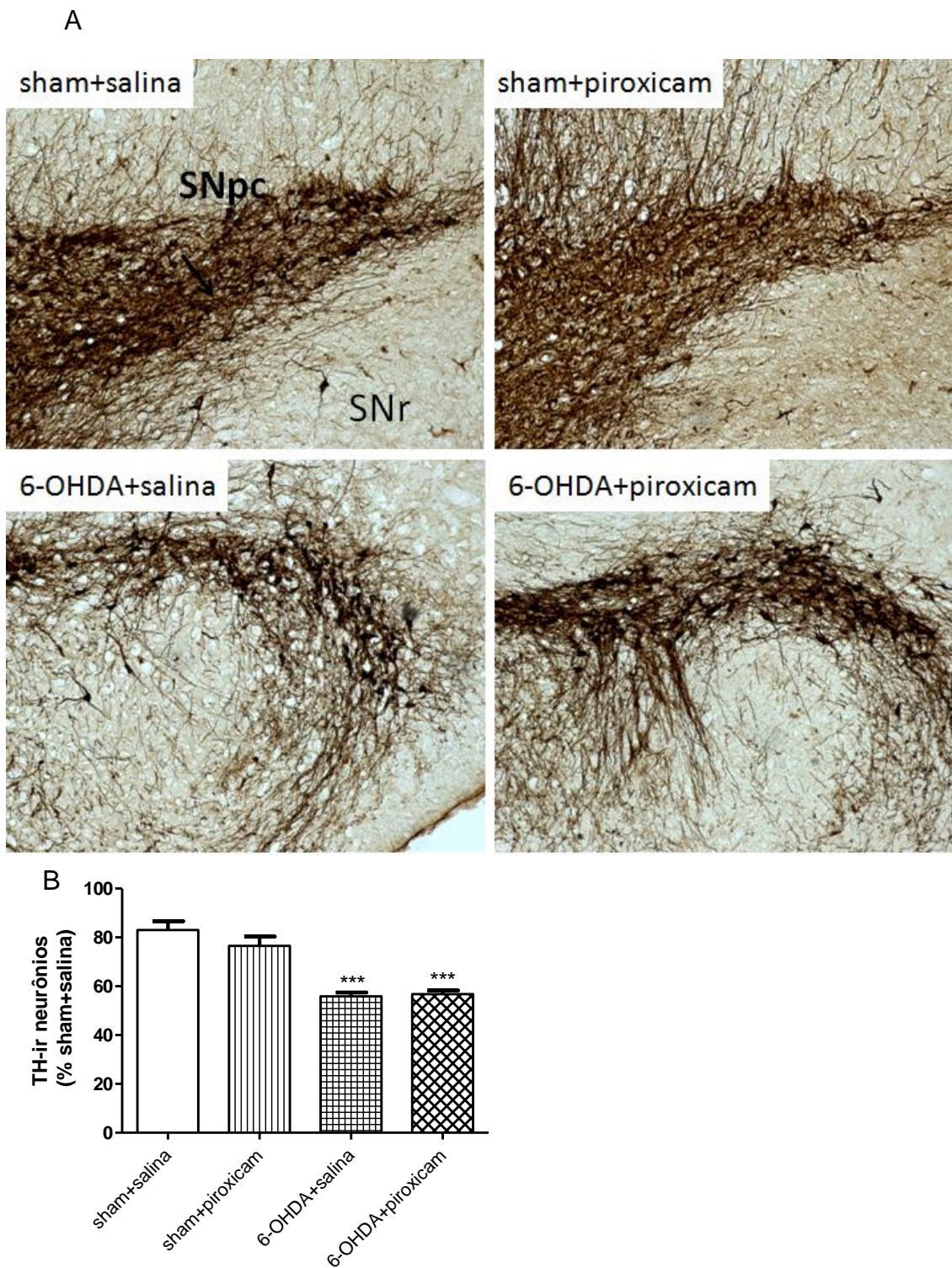


Figura 24: Análise imunohistoquímica e quantificação neuronal da SNpc 21 dias após a exposição a neurotoxina e tratamento piroxicam 10mg/Kg. (A): fotomicrografias representativas dos neurônios TH-ir do mesencéfalo ventral no painel A. (B) Quantificação da estereologia do número total de neurônios no SNpc para cada grupo. Os dados são expressos em porcentagem do grupo controle (n=19/grupo). *** $p < 0,01$ comparado com o grupo sham + salina. (ANOVA de uma via seguido do teste pos hoc de Newman-Keuls).

4.5 EXPERIMENTO 5: ENVOLVIMENTO DO SISTEMA SEROTONÉRGICO NO EFEITO ANTIDEPRESSIVO DO PIROXICAM

Diante da necessidade de avaliar se o efeito antidepressivo apresentado pelo antiinflamatório piroxicam estava relacionado com o sistema serotoninérgico, realizamos o experimento 5. Para tal foram utilizados sete grupos (n=8/grupo): salina (grupo controle), 3 mg/kg pizotifeno (antagonista não seletivo dos receptores de 5-HT), 10 mg/kg sertralina, 10 mg/kg piroxicam, sertralina+piroxicam, sertralina+pizotifeno, e piroxicam+pizotifeno. Três administrações das drogas foram realizadas, 1, 5 e 24 h antes dos testes comportamentais do CA e NF (Slattery e Cryan, 2012).

Piroxicam e sertralina foram administradas por gavagem, e o pizotifeno foi administrado por i.p. 30 minutos antes da gavagem. Imediatamente após o teste de NF, os animais foram decapitados e seus cérebros retirados para a dissecação do hipocampo analisado neuroquimicamente.

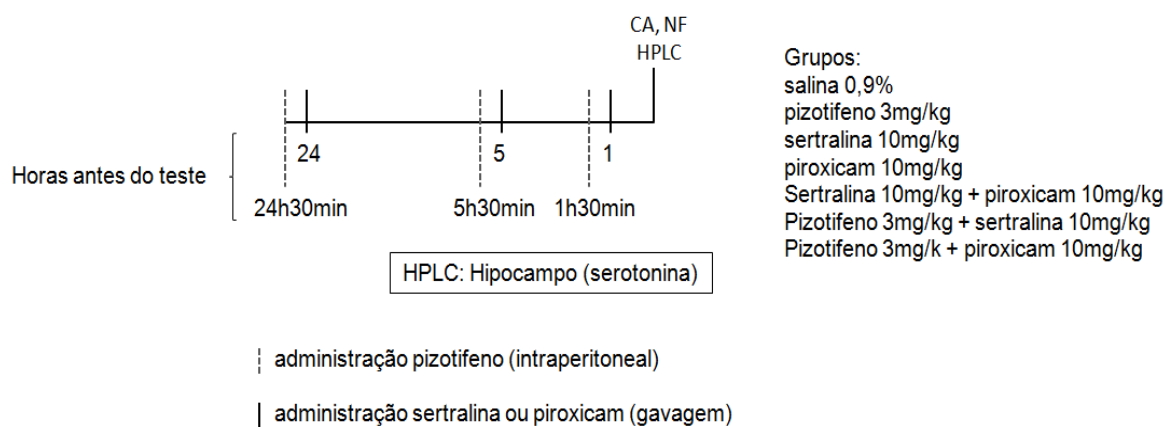


Figura 25: Representação esquemática experimento 5. CA: campo aberto; NF: teste de natação forçada.

4.5.1 Efeitos do tratamento agudo sobre os testes comportamentais

No teste de CA, a avaliação do número de quadrante percorrido e da frequência de levantar 1 h após a administração aguda revelou que nenhum dos grupos apresentou diferenças nestes parâmetros em comparação ao grupo salina (dados não mostrados).

No teste de NF, o tempo de natação foi significativamente aumentado após o tratamento agudo nos grupos sertralina, piroxicam, e sertralina+piroxicam em comparação com o grupo salina ($p < 0,05$, $p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente). O grupo sertralina+piroxicam também apresentou aumento significativo do tempo de natação em comparação com os grupos sertralina e piroxicam (ambos $p < 0,05$). Em adição os grupos sertralina, piroxicam e sertralina+piroxicam exibiram diminuição do tempo de imobilidade em comparação com o grupo salina (todos $p < 0,05$). Apenas o grupo de sertralina+piroxicam demonstrou diminuição do tempo de escalada comparado com o grupo salina ($p < 0,05$) (fig. 26A-C).

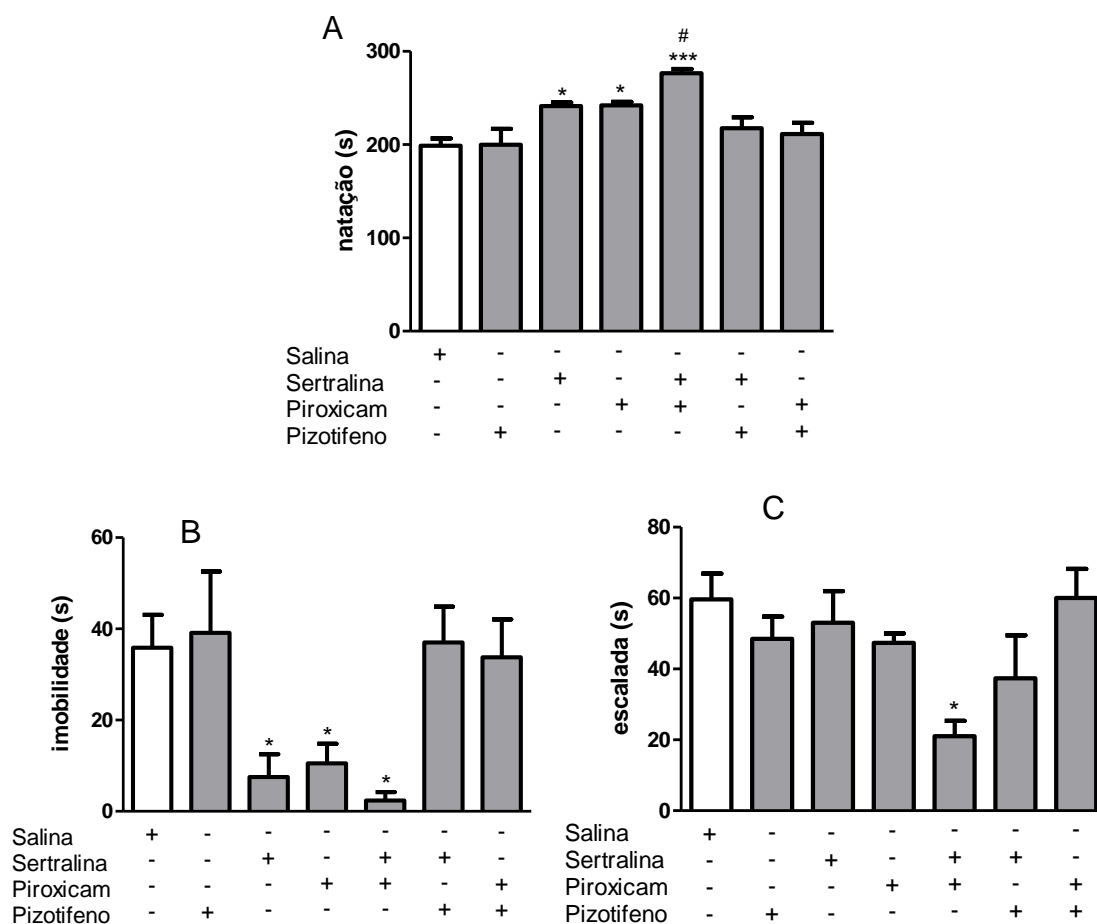


Figura 26: Avaliação do efeito antidepressivo no teste de NF do piroxicam associado ao pizotifeno. Comportamento dos animais no teste de NF 1 h após o tratamento agudo com 3 mg/Kg de pizotifeno, 10 mg/Kg de sertralina, 10 mg/Kg de piroxicam e combinações destas drogas. (A) tempo de Natação. (B) tempo de imobilidade. (C) tempo de escalada. Os dados são expressos como média \pm erro padrão ($n = 8$ /grupo). * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, em comparação com o grupo salina; # $p < 0,05$, em comparação com grupos sertralina e piroxicam (ANOVA de uma via seguido do teste pos hoc de Newman-Keuls).

4.5.2. Determinação dos níveis de 5-HT e do 5-HIAA após tratamento agudo com o piroxicam

De acordo com a análise neuroquímica dos níveis de 5-HT e 5-HIAA hipocampal foi observado um aumento nos níveis de 5-HT nos grupos pizotifeno ($p < 0,05$), sertralina ($p < 0,05$), piroxicam ($p < 0,05$), piroxicam+sertralina ($p < 0,01$), pizotifeno+sertralina ($p < 0,05$) e pizotifeno+piroxicam ($p < 0,05$) quando comparados ao grupo salina. Com relação aos níveis de seu metabólito 5-HIAA os grupos pizotifeno, pizotifeno+piroxicam exibiram aumento ($p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente) e os grupos sertralina ($p < 0,01$) e piroxicam+sertralina ($p < 0,05$) redução em comparação com o grupo salina. (Fig. 27 A e B).

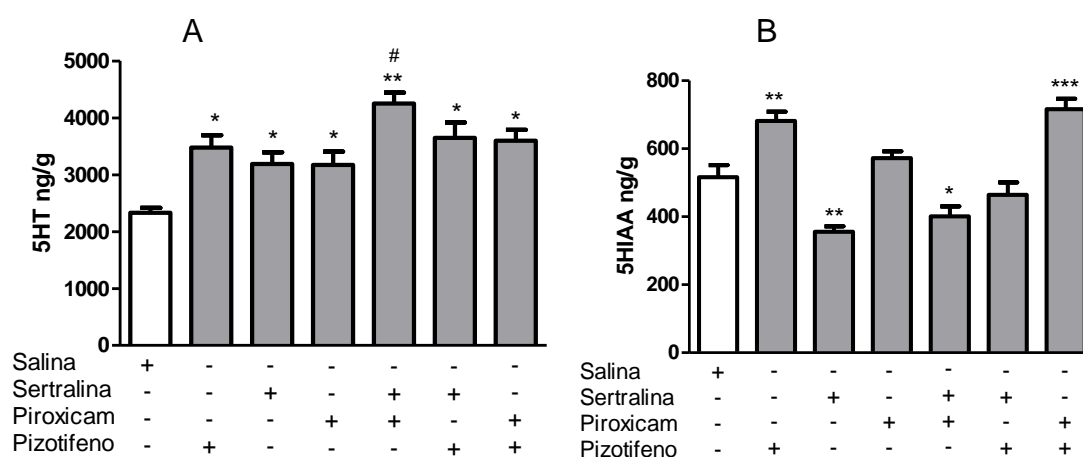


Figura 27: Concentrações hipocampais de 5-HT e 5-HIAA após o tratamento agudo com piroxicam e pizotifeno. Análise das concentrações de 5-HT e 5-HIAA após tratamento agudo com 3 mg/Kg de pizotifeno, 10 mg/Kg de sertralina, 10 mg/Kg de piroxicam, e combinações destas drogas. (A) concentrações de 5-HT. (B) concentrações de 5-HIAA. Os dados são expressos como média \pm erro padrão ($n = 8$ /grupo). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, em comparação com o grupo salina; # $p < 0,05$, em comparação com sertralina e piroxicam grupos (ANOVA de uma via seguido do teste pos hoc de Newman-Keuls).

Tabela 4: Resumo dos resultados obtidos

Experimento	Grupos	Testes comportamentais				Neuroquímico						Imunohistoquímica		
		CA	Natação Forçada			Sacarose	DA	DOPAC	HVA	5-HT	5-HIAA	NA	Nissl	TH
			Natação	Imobilidade	Escalada									
1	sham 1 dia													
	sham 7 dias													
	sham 14 dias													
	sham 21 dias													
	6-OHDA 1 dia	↓							↓	↑		↓		
	6-OHDA 7 dias		↓	↑		↓	↓	↓	↓	↓		↓		
	6-OHDA 14 dias		↓	↑			↓	↓	↓	↓		↓		
	6-OHDA 21 dias		↓	↑		↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓		
2	sham+salina													
	sham+l-triptofano		↑	↓				↓		↑	↑			
	sham+sertralina		↑	↓					↑					
	sham+venlafaxina		↑	↓					↑					
	sham+nortriptilina	↓		↓										
	6-OHDA+salina		↓	↑		↓	↓	↓	↓			↓		
	6-OHDA+l-triptofano		↑	↓			↓	↓				↓		
	6-OHDA+sertralina			↓			↓	↓				↓		
	6-OHDA+venlafaxina			↓			↓	↓				↓		
6-OHDA+nortriptilina	↓		↓			↓	↓				↓			
3	Salina					↓ ^b								
	Celecoxibe		↑ ^a	↓ ^a							↑ ^a			
	Piroxicam		↑ ^a	↓ ^a					↑ ^a	↑ ^a	↑ ^a			
	Imipramina		↑ ^a	↓ ^a	↑ ^a									
4	sham+salina													
	sham+piroxicam													
	6-OHDA+salina		↓	↑		↓	↓	↓	↓	↓			↓	
	6-OHDA+piroxicam						↓	↓	↓				↓	
5	salina													
	pizotifeno								↑	↑				
	sertralina		↑	↓					↑	↓				
	piroxicam		↑	↓					↑					
	sertralina+piroxicam		↑↑	↓	↓				↑	↓				
	sertralina+pizotifeno								↑					
	piroxicam+pizotifeno								↑	↑				

^a tratamento agudo, ^b grupo salina estressado (CMS).

5 DISCUSSÃO

5.1 DEPRESSÃO NO MODELO ANIMAL DA DP 6-OHDA

Os resultados da primeira parte deste estudo mostraram no modelo animal da DP induzido pela neurotoxina 6-OHDA comportamentos tipo depressivos associados a redução de DA estriatal e 5-HT hipocampal. Após a infusão bilateral da neurotoxina na SNpc, os animais apresentaram notáveis alterações nos tempos de natação e de imobilidade avaliadas através do teste de NF. Além disso, um padrão semelhante a anedonia foi observado na redução no consumo de sacarose. Em adição, a redução da população de neurônios na SNpc foi consistente e observada em todos os pontos do curso temporal investigados. A redução dos níveis estriatais e hipocampais de DA e 5-HT, respectivamente, também se apresentou de forma contínua. As alterações comportamentais e os níveis dos neurotransmissores, promovido pela lesão, apresentaram ainda fortes correlações, relatadas entre a 5-HT e natação, DA e imobilidade, 5-HT e a preferência por sacarose e DA e preferência por sacarose.

O tratamento durante 21 dias com sertralina, venlafaxina, nortriptilina e l-triptofano foi capaz de impedir o comportamento tipo depressivo e a redução de 5-HT hipocampal observados, na Figura 12, em ratos lesionados com a neurotoxina 6-OHDA. Entretanto, os tratamentos não foram capazes de impedir a redução da DA no estriado e da NA no hipocampo (Figura 13).

A atividade motora dos animais foi avaliada através do teste de CA, a fim de descartar um possível viés motor nos parâmetros tipo depressivos analisados. Os resultados representados na Figura 2 demonstraram que os animais lesados com 6-OHDA apresentam alteração motora apenas 1 dia após a cirurgia. Esta recuperação motora já havia sido relatada na literatura e pode ser explicada pela ativação de mecanismos compensatórios de plasticidade desencadeados pelos neurônios restantes associados a mudanças no número e/ou afinidade dos receptores dopaminérgicos (Perry et al., 2005; Lima et al., 2007). Porém, como podemos observar na Tabela 2 os animais tratados com nortriptilina apresentaram uma redução motora no 21º dia após a cirurgia. Os resultados da atividade motora e do teste de NF destes animais estão em

direções opostas, ou seja, os ratos apresentaram diminuição na atividade motora e aumento no tempo de natação, o que, segundo Slattery e Cryan (2012), torna o resultado do teste de NF válido.

A depressão é um sintoma comum entre os pacientes com DP, considerada como uma importante síndrome que pode agravar e levar a consequências na evolução do processo da DP, além de apresentar uma grande influência sobre a qualidade de vida dos pacientes (Kanda et al., 2008; Frisina et al., 2009). De acordo Politis et al. (2010), as mudanças de humor foram o segundo problema de autorrelato mais frequente em um estudo com pacientes com DP avançada.

Mesmo com tamanha importância, existem poucos estudos em modelos animais de DP com foco na depressão. O teste de NF se tornou uma ferramenta amplamente utilizada para o estudo de comportamento tipo depressivo e principalmente para a avaliação do efeito antidepressivo de drogas. Este foi desenvolvido como um teste de triagem para drogas com potencial atividade antidepressiva (Porsolt et al., 1978). No presente estudo, foi utilizado o teste de NF modificado e avaliados os tempos de natação, imobilidade e escalada. A duração prolongada da imobilidade é geralmente considerada como "desespero comportamental" que pode ser extrapolada para um estado semelhante ao da depressão humana (Malkesman e Weller, 2009). Este teste permite ainda fazermos uma correlação entre os comportamentos analisados com os diferentes sistemas de neurotransmissores (por exemplo, natação com o sistema serotoninérgico; imobilidade com o sistema dopaminérgico). Portanto, a utilização de bloqueadores de recaptção de serotonina aumenta o tempo de natação (Detke et al., 1995; Lucki, 1997; Cryan e Lucki 2002).

De acordo com os nossos resultados, mostrados na Figura 3, os grupos da 6-OHDA demonstraram redução do tempo de natação nos dias 7, 14 e 21. Em paralelo, aumento significativo do tempo de imobilidade em comparação com o grupo sham nos mesmos dias. A diminuição do tempo de natação sugere que os sinais tipo depressivos observados em animais lesionados estão relacionadas com a deficiência do sistema serotoninérgico. Na Figuras 5, podemos observar que a infusão da neurotoxina na SNpc dos animais causa uma perda significativa de neurônios dopaminérgicos nesta região nos dia 1, 7,

14 e 21 após a cirurgia assim como uma redução nos níveis estriatais de DA nos dias 7, 14 e 21 e hipocampais de 5-HT nos dias 1, 7, 14 e 21 após a lesão, representados nas Figuras 6 e 7 respectivamente. Os nossos resultados mostraram ainda na Figura 8 uma forte correlação entre os níveis de 5-HT e DA com o tempo de natação e o tempo de imobilidade, respectivamente, e ambos com preferência por sacarose, o que por sua vez é consistente com a hipótese de deficiência de neurotransmissor como a causa da depressão em pacientes com DP (Kanda et al., 2008; Tan et al., 2011).

Esta hipótese se fortalece com o fato de que os animais tratados com antidepressivos como a sertralina, venlafaxina e nortriptilina (mostrados na Figura 10) apresentaram parâmetros comportamentais similares aos dos animais tratados com l-triptofano no teste de NF, aumento do tempo de natação e redução do tempo de imobilidade nos grupos sham e impediram redução do tempo de natação e aumento do tempo de imobilidade nos animais lesados com 6-OHDA. Em adição, o nível de 5-HT hipocampal foi novamente correlacionado com os comportamentos tipo depressivos observados nos animais, sendo eles o tempo de natação e a preferência por sacarose. Por outro lado nenhuma droga foi capaz de impedir a redução de DA estriatal e de NA hipocampal (Figura 13).

De acordo com Tan et al. (2011) estudos demonstraram que os níveis de 5-HT e seu metabólito 5-HIAA estão reduzidos no LCR de pacientes deprimidos. Outros estudos já demonstraram que os níveis de 5-HIAA no LCR de pacientes parkinsonianos são menores quando comparados com indivíduos saudáveis (Johansson e Roos, 1967; Gottfries et al, 1969; Chase et al., 1972) e essas reduções são ainda menores quando comparados indivíduos com DP e depressão e DP sem depressão (Mayeux et al., 1986).

O teste de preferência por sacarose foi utilizado para avaliar a anedonia (um sintoma da depressão; Papp et al., 1991; Wang et al., 2009) que é considerada como uma diminuição no consumo e preferência por soluções doces (por exemplo, solução de sacarose), indicando diminuição da capacidade de resposta aos estímulos de recompensa (Willner et al., 1987, 1992; Papp et al., 1991; Moreau et al., 1995; Henningsen et al., 2009) e refletindo em um estado caracterizado como perda da capacidade de sentir prazer (Papp et al., 1991; Wang et al, 2009). No experimento 1 os grupos 6-

OHDA do dia 7 e 21 demonstraram redução no consumo de sacarose (Figura 4). Por outro lado, os animais lesados com 6-OHDA e tratados com os antidepressivos e o l-triptofano não apresentaram redução no consumo de sacarose 21 dias após a lesão, representados na Figura 11.

A baixa atividade da 5-HT nos cérebros de pacientes com DP é considerada como um fator de risco para depressão (Kanda et al., 2008). Os sistemas de neurotransmissores (DA e 5-HT) estão envolvidos na regulação do humor e alterações nesses sistemas estão associados com a depressão na população em geral e em pacientes com doenças neurodegenerativas, como DP (Aarsland et al., 2012). De acordo com Kanda et al. (2008) e Suzuki et al., (2008) a 5-HT tem a função inibitória na liberação de DA no estriado, assim, a redução do neurotransmissor 5-HT pode ser um mecanismo compensatório relacionado com a redução da neurotransmissão dopaminérgica na DP.

5.2 EFEITO ANTIDEPRESSIVO DO CELECOXIBE E PIROXICAM

Em relação ao estudo do efeito antidepressivo dos AINEs, demonstrado na Figura 16, o tratamento agudo com celecoxibe e piroxicam levou a diminuição do tempo de imobilidade e aumento do tempo de natação, sem alterar a atividade motora dos animais. Os níveis de 5-HT e NA no hipocampo também foram aumentados pelo tratamento agudo com piroxicam (Figura 18). O tratamento prolongado com piroxicam e celecoxibe reverteu à redução da preferência por sacarose, causado pelo CMS, semelhante ao grupo imipramina (antidepressivo tricíclico), sendo capazes, portanto, de reverter o estado "anedônico" dos animais (Figura 17). Considerando-se que este modelo tem boa validade de face, validade de constructo e validade preditiva (Kumar et al., 2011; Larsen et al., 2010), os resultados sugerem que os AINEs, piroxicam e celecoxibe, apresentaram um importante efeito antidepressivo.

No experimento 4, no qual avaliamos o efeito tipo antidepressivo do piroxicam no modelo animal da DP 6-OHDA, observamos nas Figuras 20 e 21 que o tratamento prolongado por 21 dias com piroxicam impediu o aparecimento do comportamento tipo depressivo nos testes de NF e preferência por sacarose, nos animais lesados com 6-OHDA. O grupo 6-OHDA+piroxicam também não apresentou diferença no nível de 5-HT

hipocampal comparado com o grupo sham+salina (Figura 23). Por outro lado, o tratamento prolongado com o piroxicam não foi capaz de prevenir a perda de neurônios dopaminérgicos e conseqüentemente a redução de DA estriatal, como demonstrado nas Figuras 24 e 22, respectivamente.

O papel da inflamação na fisiopatologia da depressão, esta cada vez, mais reconhecido na literatura e vem sendo descrita como a hipótese inflamatória ou de citocina da depressão (Li et al., 2011). Evidências sugerem que a ativação contínua do sistema imune e/ou a inflamação crônica podem ser um dos processos patológicos da depressão (Currier e Nemeroff, 2010). Em adição, a expressão neuronal de COX-2 esta relacionada com apoptose e envolvida na resposta ao estresse (McCoy et al., 2006). De acordo com Maes et al. (1993) a disfunção no sistema serotoninérgico na depressão é consequência da ativação imune mediada por células. Na resposta inflamatória inicial a imunidade inata inicia a ativação de uma cascata que resulta na ativação e no recrutamento da imunidade adaptativa (Mosley et al, 2006). Por conseguinte, as citocinas pró-inflamatórias liberadas durante a resposta imune inata e adaptativa podem levar ao aparecimento de doenças do SNC (Neurauter et al., 2008). Estudos têm mostrado que condições de estresse estão associadas com um aumento na atividade do eixo HPA e elevação da corticosterona sérica (Palermo-Neto, et al., 2003; Costa-Pinto e Palermo-Neto, 2010). Em adição, estudos realizados por Guimarães et al. (1993) e Joca et al. (2003) sustentam a idéia de que, a ativação do eixo HPA em resposta ao estresse crônico, induz alteração no sistema serotoninérgico hipocampal, predispondo o indivíduo ao desenvolvimento da depressão.

Por outro lado sabe-se que as citocinas também facilitam a ativação da microglia (Huang e Halliday, 2012), que por sua vez passa a secretar altos níveis de mediadores pró-inflamatórios que induzem a morte dos neurônios dopaminérgicos e aumentam ainda mais a ativação destas células, o que resulta em um ciclo de promoção de inflamação e neurodegeneração (Collins et al., 2012). Desta forma, em relação ao mecanismo antidepressivo do celecoxibe, acreditamos que seu efeito esteja relacionado à sua capacidade de reduzir os níveis de IL-6 ou inibir PGE2 como descrito por outros autores (Hinson et al., 1996; El-Ghazaly et al, 2010; Abbasi et al, 2012).

Outra hipótese para explicar os nossos resultados e o mecanismo de ação do piroxicam, seria a relação entre a neuroinflamação e redução do neurotransmissor 5-HT. A mudança nos níveis de citocinas e PGE2 após o tratamento piroxicam pode estar envolvida no seu efeito antidepressivo. De acordo com alguns autores, os níveis de citocinas pró-inflamatórias estão aumentadas na SNpc, estriado e LCR de pacientes com DP (Nagatsu et al., 2000; Hirsch et al., 2013). Assim como o aumento da concentração de citocinas pró-inflamatórias, tais como a interleucina IL-1, IL-6 e TNF α , e também PGE2 foram observados no sangue e LCR de pacientes deprimidos (Calabrese et al., 1986; Thomas et al., 2005; Kahl et al., 2006; Dowlati et al., 2010). Estudos em animais e humanos indicam que as citocinas interagem com muitos domínios fisiopatológicos que caracterizam a depressão como o metabolismo de neurotransmissores, função neuroendócrina e plasticidade sináptica (Miller et al., 2009; Loftis et al., 2010; Kuan-Pin, 2012).

No experimento 5, verificou-se que o tratamento agudo com piroxicam promoveu um efeito antidepressivo no teste de NF que foi associada com um aumento nos níveis de 5-HT no hipocampo. Além disso, este efeito foi potencializado pela adição de sertralina, mas bloqueado pela administração do pizotifeno, antagonista não seletivo do receptor de 5-HT, como podemos observar nas Figuras 26 e 27.

De acordo com Maes et al. (2011) citocinas pró-inflamatórias são capazes de reduzir o nível de 5-HT através da ativação da enzima IDO. A IDO, como descrito na introdução desta tese, é uma enzima que degrada triptofano em catabólitos de triptofano (TRICATs) e nicotinamida, reduzindo a biodisponibilidade do triptofano para a síntese de 5-HT (Neumeister et al., 2004). O neurotransmissor 5-HT é derivado do aminoácido essencial, triptofano, e a sua síntese no cérebro é altamente dependente da biodisponibilidade de triptofano no plasma (Fernstrom, 1983), desta forma a ativação da IDO por citocinas pró-inflamatórias, induz o metabolismo do triptofano, reduzindo sua bio-disponibilidade e conseqüentemente o nível de 5-HT nos neurônios (Leonard and Maes, 2012).

Em adição, além das citocinas, a PGE2 também é capaz de reduzir o nível de 5-HT através da ativação da enzima IDO (Byrne et al., 1986; Braun et al., 2005; Dantzer et al., 2008; O'Connor et al., 2009). Desta forma,

acreditamos que fármacos anti-inflamatórios, tais como o celecoxibe e o piroxicam, exercem a sua ação através da inibição da inflamação e, conseqüentemente, a liberação de citocinas.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados deste estudo demonstraram que o modelo animal da DP induzido pela neurotoxina 6-OHDA produz comportamentos tipo depressivo em ratos e promove déficits de DA no estriado e 5-HT e NA no hipocampo. As alterações comportamentais e os níveis dos neurotransmissores foram ainda fortemente correlacionados entre a 5-HT hipocampal e o tempo de natação, DA do estriado e imobilidade, 5-HT do hipocampo e a preferência por sacarose e o nível de DA estriatal e a preferência por sacarose.

Estes comportamentos tipo depressivos e a redução dos níveis hipocampais de 5-HT foram revertidos com o tratamento prolongado de drogas antidepressivas de diferentes classes, sertralina (ISRS), venlafaxina (ISRSN) e nortriptilina (antidepressivo tricíclico) tal como o l-triptofano (precursor da 5-HT).

O terceiro experimento demonstrou que a administração aguda por via oral dos AINEs, piroxicam e celecoxibe, exerceu efeito antidepressivo no teste de NF e promoveu aumento dos níveis de 5-HT e NA no hipocampo pelo piroxicam. No modelo de depressão do CMS o tratamento prolongado com ambos os AINEs restauraram a preferência por sacarose dos animais reduzida pelo CMS.

Quando administrado a animais lesados com a neurotoxina 6-OHDA por 21 dias o piroxicam foi capaz de impedir o aparecimento do comportamento tipo depressivo nos testes de NF e de preferência por sacarose assim como a redução de 5-HT hipocampal, porém não foi capaz de impedir a redução de DA no estriado. No teste de NF o efeito antidepressivo do piroxicam, administrado agudamente, foi associado a um aumento nos níveis de 5-HT no hipocampo, devido ao fato do seu efeito antidepressivo ter sido anulado por um bloqueador não seletivo de 5-HT, o pizotifeno.

Em suma, demonstramos que a depressão esta presente no modelo animal da DP 6-OHDA, que pode ser revertida tanto com drogas antidepressivas ou l-triptofano quanto por AINEs que atuam no sistema serotoninérgico. Sugerimos ainda que a depressão associada ao modelo animal de DP induzido por 6-OHDA está relacionada à alteração no sistema serotoninérgico causada pelo menos em parte por um processo de neuroinflamação e que o efeito antidepressivo dos AINEs celecoxibe e

piroxicam está ligado à sua capacidade de inibir este processo inflamatório e consequentemente a redução de 5-HT central.

Um resumo dos processos descritos nesta tese está esquematicamente representado na Figura 28.

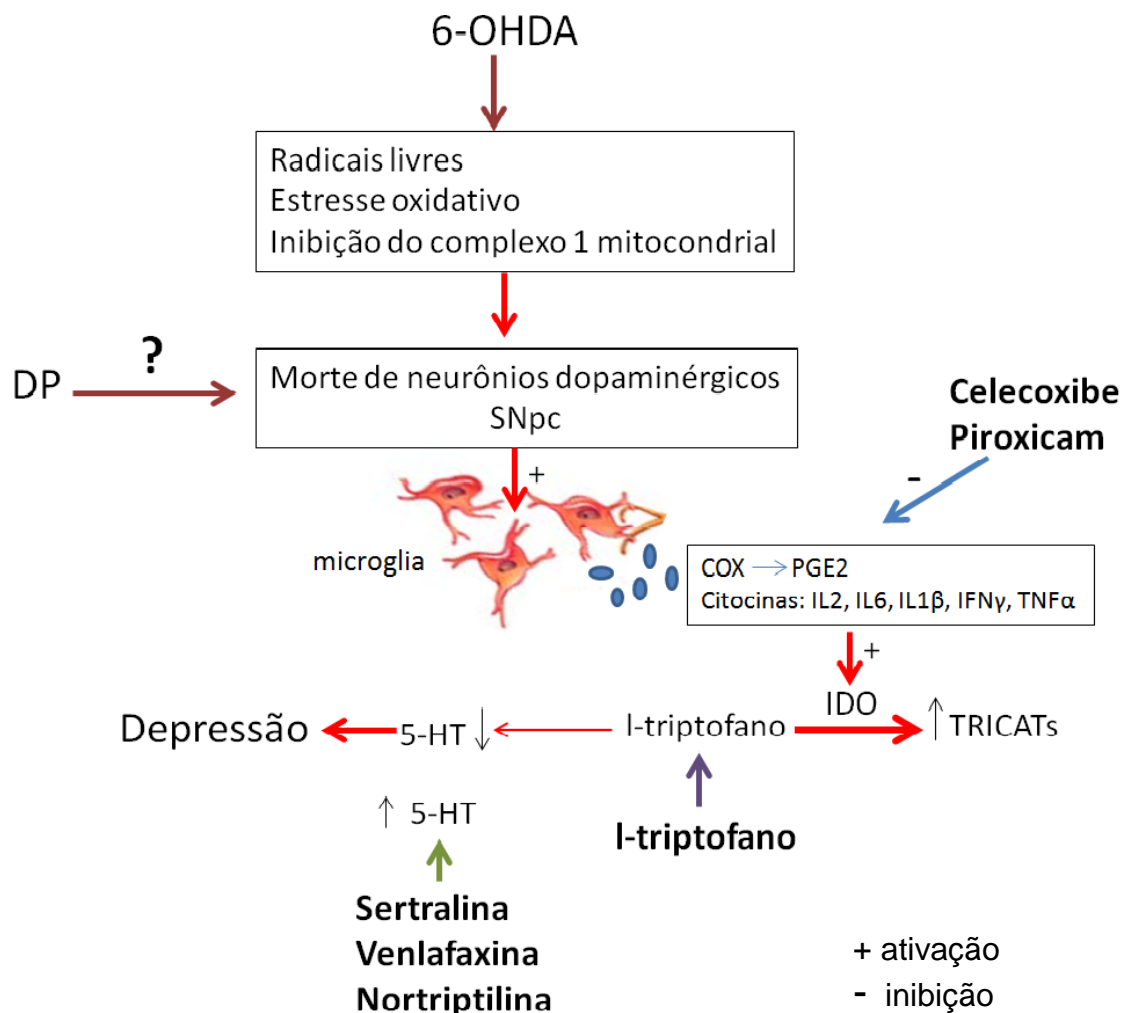


Figura 28 Esquema proposto para a causa da depressão no modelo animal da DP 6-OHDA e mecanismo de ação antidepressivo dos AINEs, dos antidepressivos e do L-triptofano. Linha vermelha: causa da depressão no modelo animal da DP 6-OHDA, linha azul: mecanismo de ação do efeito antidepressivo dos AINEs celecoxibe e piroxicam, linha verde: mecanismo de ação dos antidepressivos sertralina, venlafaxina, nortriptilina e linha roxa: mecanismo de ação do L-triptofano. 6-OHDA: 6-hidroxi-dopamina, DP: doença de Parkinson, SNpc: substância negra parte compacta, COX: cicloxigenase, PGE2: prostaglandina E2; IL: interleucina, IFNγ: interferon gama, TNFα: fator de necrose tumoral alfa, IDO: indolamina 2,3-dioxigenase; TRICATs: catabólitos de triptofano; 5-HT: serotonina.

7. CONCLUSÕES

- 1) A infusão bilateral da neurotoxina 6-OHDA na SNpc de ratos é capaz de produzir comportamentos tipo depressivos observados nos testes de NF e preferência por sacarose.
- 2) A neurotoxina 6-OHDA foi capaz de promover perda acentuada de neurônios dopaminérgicos na SNpc dos animais nos dias 1, 7, 14 e 21 e consequente redução dos níveis estriatais de DA nos dias 7, 14 e 21 após a infusão.
- 3) Os animais lesados com 6-OHDA apresentaram reduções hipocâmpais de 5-HT nos dias 1, 7, 14 e 21 após a infusão da neurotoxina.
- 4) Os sintomas depressivos observados nos animais lesados foram correlacionados com a redução hipocâmpal de 5-HT e estriatais de DA.
- 5) O tratamento por 21 dias com os antidepressivos, sertralina (ISRS), venlafaxina (ISRSN) e nortriptilina (antidepressivo tricíclico) foi capaz de reverter o comportamento tipo depressivo observado no modelo da DP 6-OHDA.
- 6) O sistema serotoninérgico parece estar envolvido nos comportamentos tipo depressivos observados em animais lesados com 6-OHDA, uma vez que o tratamento prolongado com l-triptofano (precursor da 5-HT) foi capaz de reverter estes sinais de maneira similar aos antidepressivos citados acima.
- 7) O tratamento com os antidepressivos e o l-triptofano foi capaz de impedir a redução hipocâmpal de 5-HT observada em animais lesados com 6-OHDA.
- 8) Os AINEs, celecoxibe e piroxicam, demonstraram efeitos tipo antidepressivos no teste de NF após tratamento agudo e no modelo do CMS após tratamento prolongado.
- 9) O tratamento agudo com piroxicam promoveu o aumento dos níveis hipocâmpais de 5-HT e NA.
- 10) O piroxicam apresentou efeito tipo antidepressivo no modelo animal da DP 6-OHDA, após tratamento prolongado por 21 dias.
- 11) Os animais lesados com 6-OHDA e tratados com piroxicam não apresentaram redução dos níveis de 5-HT hipocâmpais.
- 12) O efeito tipo depressivo do piroxicam (tratamento agudo) no teste de NF é dependente do sistema serotoninérgico, devido ao fato de seu efeito ter sido inibido pelo pizotifeno, um bloqueador não seletivo dos receptores de 5-HT.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aarsland, D., Pahlhagen, S., Ballard, C.G., Ehrt, U., Svenningsson, P., 2012. Depression in Parkinson disease-epidemiology, mechanisms and management. *Nat. Rev. Neurol.* 8: 35–47.

Abbasi, S.H., Hosseini, F., Modabbernia, A., Ashrafi, M., Akhondzadeh, S., 2012. Effect of celecoxib add-on treatment on symptoms and serum IL-6 concentrations in patients with major depressive disorder: randomized double-blind placebo-controlled study. *J Affect Disord* 141(2-3): 308-314.

Abdel-Salam, O.M.E., Nofal, S.M., El-Shenawy, S.M., 2003. Evaluation of the anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of different antidepressants in the rat. *Pharmacol Res* 48: 157-165.

Abdel-Wahab, B.A., Salama, R.H., 2011. Venlafaxine protects against stress-induced oxidative DNA damage in hippocampus during antidepressant testing in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 100:59-65.

Akhondzadeh, S., Jafari, S., Raisi, F., Nasehi, A.A., Ghoreishi, A., Salehi, B., Mohebbi-Rasa, S., Raznahan, M., Kamalipour, A., 2009. Clinical trial of adjunctive celecoxib treatment in patients with major depression: a double blind and placebo controlled trial. *Depress Anxiety* 26: 607-611.

Althaus, A., Becker, O.A., Spottke, A., Dengler, R., Schneider, F., Kloss, M., Eggert, K., Oertel, W. H., Dilmann, U., 2008. Frequency and treatment of depressive symptoms in a Parkinson's disease registry. *Parkinsonism and Related Disorders.* 14(8): 626-32.

Berkenbosch, F., Van Oers, J., del Rey, A., Tilders, F., Besedovsky, H., 1987. Corticotropin-releasing factor-producing neurons in the rat activated by interleukin-1. *Science.* 238: 524–526.

Betarbet, R.; Sherer, T.B.; Greenamyre, J.T., 2002. Animal models of Parkinson's disease. *Bioessays.* 24: 308-318.

Braak, H., Ghebremedhin, E., Rüb, U., Bratzke, H., Tredici, K.D., 2004. Stages in the development of Parkinson's disease related pathology. *Cell Tissue Res.* 318: 121–134.

Braun, D., Longman, R.S., Albert, M.L., 2005. A two-step induction of indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO) activity during dendritic-cell maturation. *Blood*. 106(7): 2375–81.

Byrne, G.I., Lehmann, L.K., Kirschbaum, J.G., Borden, E.C., Lee, C.M., Brown, R.R., 1986. Induction of tryptophan degradation in vitro and in vivo: a gamma-interferon-stimulated activity. *J Interferon Res*. 6(4): 389–96.

Calabrese, J.R., Skwerer, R.G., Barna, B., Gullledge, A.D., Valenzuela, R., Butkus A, Subichin S, Krupp, N.E., 1986. Depression, immunocompetence, and prostaglandins of the E series. *Psychiatry Res*. 17: 41-47.

Chase, T.N., Ng, L.K., Watanabe, A.M., 1972. Parkinson's disease. Modification by 5-hydroxytryptophan. *Neurology*. 22: 479–484.

Chichorro, J.G, Zampronio, A.R., Souza, G.E.P., Rae, G.A., 2006. Orofacial cold hyperalgesia due to infraorbital nerve constriction injury in rats: Reversal by endothelin receptor antagonists but not non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Pain*. 123 (1-2): 64-74.

Collins, L.M., Toulouse, A., Connor, T.J., Nolan, Y.M., 2012. Contributions of central and systemic inflammation to the pathophysiology of Parkinson's disease. *Neuropharmacol*. 62(7): 2154-68.

Consoni, F.T., Vital, M.A., Andreatini, R., 2006. Dual monoamine modulation for the antidepressant-like effect of lamotrigine in the modified forced swimming test. *Eur Neuropsychopharmacol*. 16(6): 451-8.

Costa-Pinto, F.A., Palermo-Neto, J., 2010. Neuroimmune interactions in stress. *Neuroimmunomodulation*. 17:196-99.

Cryan, J.F., Lucki, I., 2002. Antidepressant-like behavioral effects mediated by 5-Hydroxytryptamine (2C) receptors. *J Pharmacol Exp Ther*. 295: 1120-1126.

Cummings, J.L., 1992. Depression and Parkinson's disease: a review. *Am J Psychiatry*. 149(4): 443-54.

Currier, M.B., Nemeroff, C.B., 2010. Inflammation and mood disorders: proinflammatory cytokines and the pathogenesis of depression. *Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry*. 9: 212–20.

Daeur, W.; Przedborski, S., 2003. Parkinson's Disease: Mechanisms and models. *Revista Neuron.* 39: 889-909.

Dantzer, R., 2001. Cytokine-induced sickness behavior: where do we stand?. *Brain Behav Immun.* 15: 7-24.

Dantzer, R., O'Connor, J.C., Freund, G.G., Johnson, R.W., Kelley K.W., 2008. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci.* 9: 46-56.

Detke, M.J., Rickels, M., Lucki, I., 1995. Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. *Psychopharmacology (Berl).* 121: 66-72.

Detanico, B.C., Piato, A.L., Freitas, J.J., Lhullier, F.L., Hidalgo, M.P., Caumo, W., Elisabetsky, E., 2009. Antidepressant-like effects of melatonin in the mouse chronic mild stress model. *European Journal of Pharmacology* 607: 121–125.

Dowlati, Y., Herrmann, N., Swardfager, W., Liu, H., Sham, L., Reim, E.K., Lanctôt, K.L., 2010. A meta-analysis of cytokines in major depression. *Biol. Psychiatry.* 67(5): 446-457.

El-Ghazaly, M.A., Nada, A.S., El-Hazek, R.M., Khayyal, M.T., 2010. Effect of selective COX-2 inhibitor, celecoxib on adjuvant-induced arthritis model in irradiated rats. *Int J Radiat Biol.* 86: 1079-1087.

Esposito, E., Di Matteo, V., Benigno, A., Pierucci, M., Crescimanno, G., Di Giovanni, G., 2007. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in Parkinson's disease. *Exp Neurol.* 205: 295-312.

Fernstrom, J.D., 1983. Role of precursor availability in control of monoamine biosynthesis in brain. *Physiol. Rev.* 63(2): 484-546.

Frisina, P.G.; Haroutunian, V.; Libow, L.S., 2009. The neuropathological basis for depression in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* 15: 144-148.

Fujita, I., Okumura, T., Sakakibara A., Kita y., 2012. Involvement of inflammation in severe post-operative pain demonstrated by pre-surgical and post-surgical treatment with piroxicam and ketorolac. *Journal of Pharmacy and Pharmacology,* 64: 747–55.

Gao, H.M., Liu, B., Zhang, W., Hong, J.S., 2003. Novel anti-inflammatory therapy for Parkinson's disease. *Trends Pharmacol Sci.* 24(8): 395-401.

Gottfries, C.G., Gottfries, I., Roos, B.E., 1969. Homovanillic acid and 5-hydroxyindoleacetic acid in the cerebrospinal fluid of patients with senile dementia, presenile dementia and parkinsonism. *J. Neurochem.* 16: 1341–1345.

Grilli M, Pizzi M, Memo M, Spano P (1996) Neuroprotection by aspirin and sodium salicylate through blockade of NF- κ B activation. *Science.* 274: 1383-1385.

Guimarães, F.S., Del Bel, E.A., Padovan, C.M., Mendonça Netto, S., Titze De Almeida, R., 1993. Hippocampal 5-HT receptors and consolidation of stressful memories. *Behav Brain Res.* 58: 133-9.

Guo, J.Y., Li, C.Y., Ruan, Y.P., Sun, M., Qi, X.L., Zhao, B.S., Luo, F., 2009. Chronic treatment with celecoxib reverses chronic unpredictable stress-induced depressive-like behavior via reducing cyclooxygenase-2 expression in rat brain. *Eur J Pharmacol.* 612: 54-60.

Hald, A.; Lotharius, J., 2005. Oxidative stress and inflammation in Parkinson's disease: Is there a causal link? *Experimental Neurology.* 193: 279-290.

Henningsen, K., Andreasen, J.T., Bouzinova, E.V., Jayatissa, M.N., Jensen, M.S., Redrobe, J.P., Wiborg, O., 2009. Cognitive deficits in the rat chronic mild stress model for depression: relation to anhedonia-like responses. *Behav Brain Res.* 198: 136-141.

Hinson, R.M., Williams, J.A., Shacter, E., 1996. Elevated interleukin 6 is induced by prostaglandin E2 in a murine model of inflammation: possible role of cyclooxygenase-2. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93: 4885-4890.

Hirsch, E.C., Jenner, P., Przedborski, S., 2013. Pathogenesis of Parkinson's Disease. *Movement Disorders.* 28(1): 24-30.

Huang, Y., Halliday, G.M., 2012. Aspects of innate immunity and Parkinson's disease. *Front Pharmacol.* 8(3): 33.

Iachininoto, M.G., Nuzzolo, E.R., Bonanno, G., Mariotti, A., Procoli, A., Locatelli, F., De Cristofaro, R., Rutella, S., 2013. Cyclooxygenase-2 (COX-2) Inhibition

Constrains Indoleamine 2,3-Dioxygenase 1 (IDO1) Activity in Acute Myeloid Leukaemia Cells. *Molecules*. 18: 10132-10145.

Joca, S.R.L., Padovan, C.M., Guimarães, F.S., 2003. Activation of postsynaptic 5-HT_{1A} receptors in the dorsal hippocampus prevents learned helplessness development. *Brain Res*. 978: 177-84.

Johansson, B., Roos, B.E., 1967. 5-Hydroxyindoleacetic and homovanillic acid levels in the cerebrospinal fluid of healthy volunteers and patients with Parkinson's syndrome. *Life Sci*. 6: 1449–1454.

Kahl, K.G., Bens, S., Ziegler, K., Rudolf, S., Dibbelt, L., Kordon, A., Schweiger, U., 2006. Cortisol, the cortisol-dehydroepiandrosterone ratio, and pro-inflammatory cytokines in patients with current major depressive disorder comorbid with borderline personality disorder. *Biol Psychiatry*. 59 (7): 667–71.

Kanda, F., Oishi, K., Kuga. A., Kobesho, H., Shirafuji. T., Higuchi. H., Ishihara, H., 2008. Characteristics of depression in Parkinson's disease: Evaluating with Zung's Self-Rating Depression Scale. *Parkinsonism and Related Disorders*. 14: 19-23.

Knott, C., Stern, G., Wilkin, G.P., 2000. Inflammatory regulators in Parkinson's disease: iNOS, lipocortin-1, and cyclooxygenases-1 and -2. *Mol Cell Neurosci*. 16: 724–739.

Kuan-Pin, S., 2012. Inflammation in psychopathology of depression: Clinical, biological, and therapeutic implications. *Bio Medicine*. 2(2): 68-74.

Kumar, B., Kuhad, A., Chopra, K., 2011. Neuropsychopharmacological effect of sesamol in unpredictable chronic mild stress model of depression: behavioral and biochemical evidences. *Psychopharmacology (Berl)*. 214: 819-828.

Larsen, M.H., Mikkelsen, J.D., Hay-Schmidt, A., Sandi, C., 2010. Regulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the chronic unpredictable stress rat model and the effects of chronic antidepressant treatment. *J Psychiatr Res*. 44: 808-816.

Leonard, B., Maes, M., 2012. Mechanistic explanations how cell-mediated immune activation, inflammation and oxidative and nitrosative stress pathways and their sequels and concomitants play a role in the pathophysiology of

unipolar depression. *Neurosci Biobehav Rev.* 36(2): 764-85.

Li, M., Soczynska, J.K., Kennedy, S.H., 2011. Inflammatory biomarkers in depression: an opportunity for novel therapeutic interventions. *Curr Psychiatry Rep.* 13: 316-320.

Lima, M.M.S, Reksidler, A.B., Zanata, S.M., Machado, H.B., Tufik S, Vital M.A., 2006. Different parkinsonism models produce a time-dependent induction of COX-2 in the substantia nigra of rats. *Brain Res.* 1101: 117-125.

Lima, M.M.S., Andersen, M.L., Reksidler, A.B., Vital, M.A.B.F., Tufik, S., 2007. The role of the substantia nigra pars compacta in regulating sleep patterns in rats. *PLoS ONE.* 2: 513.

Liu, W., Sheng, H., Xu, Y., Liu, Y., Lu, J., Nia, X., 2013. Swimming exercise ameliorates depression-like behavior in chronically stressed rats: relevant to proinflammatory cytokines and IDO activation. *Behav. Brain Res.* 242: 110-116.

Loftis, J.M., Huckans, M., Morasco, B.J., 2010. Neuroimmune mechanisms of cytokine-induced depression: Current theories and novel treatment strategies. *Neurobiology of Disease.* 37: 519–533.

Lucki I., 1997. The forced swimming test as a model for core and component behavioral effects of antidepressant drugs. *Behav. Pharmacol.* 8: 523-532.

Maes, M., Meltzer, H.Y., Scharpé, S., Bosmans, E., Suy, E., De Meester, I., Calabrese, J., Cosyns, P., 1993. Relationships between lower plasma L-tryptophan levels and immune inflammatory variables in depression. *Psychiatry Res.* 49 (2): 151–165.

Maes, M., Yirmiya, R., Noraberg, J., Brene, S., Hibbeln, J., Perini, G., Kubera, M., Bob, P., Lerer, B., Maj, M., 2009. The inflammatory & neurodegenerative (I&ND) hypothesis of depression: leads for future research and new drug developments in depression. *Metab. Brain Dis.* 24: 27–53.

Maes, M., Leonard, B.E., Myint, A.M., Kubera, M., Verkerk, R., 2011. The new '5-HT' hypothesis of depression: Cell-mediated immune activation induces indoleamine 2,3-dioxygenase, which leads to lower plasma tryptophan and an increased synthesis of detrimental tryptophan catabolites (TRYCATs), both of

which contribute to the onset of depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*. 35: 702–72.

Malkesman, O., Weller, A., 2009. Two different putative genetic animal models of childhood depression-a review. *Progress in Neurobiology*. 88(3): 153-69.

Mayeux, R., Stern, Y., Williams, J.B., Cote, L., Frantz, A., Dyrenfurth, I., 1986. Clinical and biochemical features of depression in Parkinson's disease. *Am. J. Psychiatry*. 143: 756-759.

McCoy, M.K., Martinez, T.N., Ruhn, K.A., Szymkowski, D.E., Smith, C.G., Botterman, B.R., Tansey, K.E., Tansey, M.G., 2006. Blocking soluble tumor necrosis factor signaling with dominant-negative tumor necrosis factor inhibitor attenuates loss of dopaminergic neurons in models of Parkinson's disease. *J Neurosci*. 37: 9365-9375.

Meredith, G.E., Sonsalla, P., Chesselet, M.F., 2008. Animal Models of Parkinson's Disease Progression. *Acta Neuropathol*. 115(4): 385–398.

Miller, A.H., Maletic, V., Raison, C.L., 2009. Inflammation and its discontents: the role of cytokines in the pathophysiology of major depression. *Biol. Psychiatry*. 65: 732-741.

Mogi, M., Togari, A., Kondo, T., Mizuno, Y., Komure, O., Kuno, S., Ichinose, H., Nagatsu, T., 1999. Brain-derived growth factor and nerve growth factor concentrations are decreased in the substantia nigra in Parkinson's disease. *Neurosci Lett*. 270(1): 45.

Moreau, J.L., Scherschlicht, R., Jenck, F., Martin, J.R., 1995. Chronic mild stress-induced anhedonia model of depression: sleep abnormalities and curative effects of electroshock treatment. *Behav Pharmacol*. 6: 682-687.

Mosley, R.L. Benner, E.J., Kadiu, I., Thomas, M., Boska, M.D., Hasan, K., Laurie, C., Gendelman, H.E., 2006. Neuroinflammation, oxidative stress, and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Clinical Neuroscience Research*. 6: 261-281.

Muller, N., Schwarz, M.J., Dehning, S., Douhe, A., Cerovecki, A., Goldstein-Muller, B., Spellmann, I., Hetzel, G., Maino, K., Kleindienst, N., Muller, H.J., Arolt, V., Riedel, M., 2006. The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib has

therapeutic effects in major depression: results of a double-blind, randomized, placebo controlled, add-on pilot study to reboxetine. *Mol Psychiatry*. 11: 680-684.

Müller, N., Myint, A.M., Schwarz, M.J., 2009. The impact of neuroimmune dysregulation on neuroprotection and neurotoxicity in psychiatric disorders—relation to drug treatment. *Dialogues Clin Neurosci* 11: 319-332.

Nagatsu T, Mogi M, Ichinose H, Togari A., 2000. Changes in cytokines and neurotrophins in Parkinson's disease. *J Neural Trans*. 60: 277–290.

Neumeister, A., Nugent, A.C., Waldeck, T., Geraci, M., Schwarz, M., Bonne, O., Bain, E.E., Luckenbaugh, D.A., Herscovitch, P., Charney, D.S., Drevets, W.C., 2004. Neural and behavioral responses to tryptophan depletion in unmedicated patients with remitted major depressive disorder and controls. *Arch. Gen. Psychiatry*. 61: 765–773.

Neurauter, G., Schröcksnadel, K., Scholl-Bürgi, S., Sperner-Unterwieser, B., Schubert, C., Ledochowski, M., Fuchs, D., 2008. Chronic immune stimulation correlates with reduced phenylalanine turnover. *Curr Drug Metab*. 9(7): 622-7.

Nielsen, J. A. 1986. Metergoline, pirenperone and pizotifen alter dopamine and 5-hydroxytryptamine synthesis in discrete rat brain nuclei. *Neurochem*. 9(3): 423-42.

Norman, S., Alexander I., Tröster., Fields J.A., Brooks R., 2002. Effects of depression and Parkinson's Disease on cognitive functioning. *Journal Neuropsychiatry Clinical Neuroscience*. 14: 31-36.

O'Connor, J.C., Andre, C., Wang, Y., Lawson, M.A., Szegedi, S.S., Lestage, J., Castanon, N., Kelley, K.W., Dantzer, R., 2009. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha mediate the upregulation of indoleamine 2,3-dioxygenase and the induction of depressive-like behavior in mice in response to bacillus Calmette–Guerin. *J Neurosci*. 29 (13): 4200–09.

Okun, M.S., Watts, R.L., 2002. Depression associated with Parkinson's disease: clinical features and treatment. *Neurology*. 58 (1): 63-70.

Palermo-Neto, J., de Oliveira Massoco, C., Robispirre de Souza, W., 2003. Effects of physical and psychological stressors on behavior, macrophage activity, and Ehrlich tumor growth. *Brain Behav. Immun.* 17:43-54.

Papp, M., Willner, P., Muscat, R., 1991. An animal model of anhedonia: attenuation of sucrose consumption and place preference conditioning by chronic unpredictable mild stress. *Psychopharmacology (Berl)*. 104(2): 255-9.

Paulus WJ, Ellinger K., 1991. The neuropathologic basis of different clinical subgroups of Parkinson's disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 50: 743–755.

Paxinos, G., Watson, C., 2005. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 5th edition San Diego: Academic Press.

Perry, J.C., Hipolide, D.C., Tufik, S., Martins, R.D., Da Cunha, C., Andreatini, R., Vital, M.A.B.F., 2005. Intra-nigral MPTP lesion in rats: Behavioral and autoradiography studies. *Experimental Neurology*. 195: 322 – 329.

Politis, M., Wu, K., Molloy, S., Bain, P., Chaudhuri, K.R., Piccini, P., 2010. Parkinson's disease symptoms: the patient's perspective. *Mov Disord.* 25: 1646–51.

Politis, M., Wu, K., Loane, C., Quinn, N.P., Brooks, D.J., Oertel, W.H., Björklund, A., Lindvall, O., Piccini, P., 2012. Serotonin neuron loss and nonmotor symptoms continue in Parkinson's patients treated with dopamine grafts. *Sci. Transl. Med.* 4(128): 128-41.

Porsolt, R.D., Anton, G., Blavet, N., Jalfre, M., 1978. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur J Pharmacol.* 47(4): 379-91.

Przybyłkowski, A., Kurkowska-Jastrzębska, I., Joniec, I., Ciesielska, A., Członkowska, A., Członkowski, A., 2004. Cyclooxygenases mRNA and protein expression in striata in the experimental mouse model of Parkinson's disease induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine administration to mouse. *Brain Res.* 1019: 144-151.

Raison, C.L., Capuron, L., Miller, A.H., 2006. Cytokines sing the blues: inflammation and the pathogenesis of depression. *Trends Immunol.* 27(1): 24-31.

Reksidler, A.B., Lima, M.M.S., Zanata, S.M., Machado, H.B., Da Cunha, C., Andreatini, R., Tufik, S., Vital, M.A.B.F., 2007. The COX-2 inhibitor parecoxib produces neuroprotective effects in MPTP-lesioned rats. *Eur J Pharmacol.* 560: 163-175.

Reneric, J.P., Lucki, I., 1998. Antidepressant behavioral effects by dual inhibition of monoamine reuptake in the rat forced swimming test. *Psychopharmacology (Berl.)*. 136: 190–197.

Reneric, J.P., Bouvard, M., Stinus, L., 2002. In the rat forced swimming test, chronic but not subacute administration of dual 5-HT/NA antidepressant treatments may produce greater effects than selective drugs. *Behav Brain Res.* 136(2): 521-32.

Riedel, O., Klotsche, J., Spottke, A., Deuschl, G., Förstl, H., Henn, F., Heuser, I., Oertel, W., Reichmann, H., Riederer, P., Trenkwalder, C., Dodel, R., Wittchen, H.U., 2010. Frequency of dementia, depression, and other neuropsychiatric symptoms in 1,449 outpatients with Parkinson's disease. *J. Neurol.* 257: 1073–1082.

Sánchez-Pernaute, R., Ferree, A., Cooper, O., Yu, M., Brownell, A.L., Isacson, O., 2004. Selective COX-2 inhibition prevents progressive dopamine neuron degeneration in a rat model of Parkinson's disease. *J Neuroinflammation.* 1:6.

Santiago, R.M., Barbiero, J., Lima, M.M., Dombrowski, P.A., Andreatini, R., Vital, M.A., 2010. 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. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 34: 1104–1114.

Saveanu, R.V., Nemeroff, C.B., 2012. Etiology of Depression: Genetic and Environmental Factors. *PsychiatrClin N Am* 35: 51–71.

Schwartz, R.K.W., Huston, J.P., 1996. The unilateral 6-hydroxydopamine lesion Model in behavioral brain research. Analysis of functional deficits, recovery and treatments. *Progress in Neurobiology.* 50: 275-331.

Slattery, D.A., Cryan, J.F., 2012. Using the rat forced swim test to assess antidepressant-like activity in rodents. *Nat Protoc.* 7(6): 1009-1914.

Smith, M.L., Hawcroft, G., Hull, M.A., 2000. The effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on human colorectal cancer cells: evidence of different mechanisms of action. *Eur J Cancer*. 36: 664-674.

Soliman, Y., Jackson, T., Mazziro, E., Soliman, K.F.A., 2009. The effects of piroxicam in the attenuation of MPP+/MPTP toxicity in vitro and in vivo. *Neurochem Res*. 34: 304-310.

Sostres, C., Gargallo, C.J., Arroyo, M.T., Lanas, A., 2010. Adverse effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs, aspirin and coxibs) on upper gastrointestinal tract. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 24: 121-132.

Suzuki, K., Miyamoto, M., Miyamoto, T., Okuma, Y., Hattori, N., Kamei, S., Yoshii, F., Utsumi, H., Iwasaki, Y., Lijima, M., Hirata, K., 2008. Correlation between depressive symptoms and nocturnal disturbances in Japanese patients with Parkinson's disease. *Parkinsonism Related Disord*. 15(1): 15-9.

Tadaiesky, M.T., Dombrowski, P.A., Figueiredo, C.P., Cargnin-Ferreira, E., Da Cunha, C., Takahashi, R.N., 2008. Emotional, cognitive and neurochemical alterations in a premotor stage model of Parkinson's disease. *Neuroscience*. 156: 830-840.

Tan, S.K.H., Hartung, H., Sharp, T., Temel, Y., 2011. Serotonin-dependent depression in Parkinson's disease: A role for the subthalamic nucleus? *Neuropharmacology*. 61: 387-399.

Teismann, P., Tieu, K., Choid-K, Wu D-C, Naini A, Hunot S, Vila M, Jackson, Lewis V, Przedborski S., 2003. Cyclooxygenase-2 is instrumental in Parkinson's disease neurodegeneration. *PNAS*. 100 (9): 5473-5478.

Thomas, A.J., Davis, S., Morris, C., Jackson, E., Harrison, R., O'Brien, J.T., 2005. Increase in interleukin-1beta in late-life depression. *Am J Psychiatry*. 162: 175-7.

Ungerstedt, U., 1968. 6-Hydroxydopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur. J. Pharmacol*. 5: 107-110.

Vismari L, Alves GJ, Muscará MN, Palermo-Neto J., 2012. A possible role to nitric oxide in the anti-inflammatory effects of amitriptyline. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 34(4): 578-85.

Zunszain P.A., Anacker C., Cattaneo A., Choudhury S., Musaelyan K., Myint A.M., Thuret S., Price J., Pariante C.M., 2012. Interleukin-1b: A New Regulator of the Kynurenine Pathway Affecting Human Hippocampal Neurogenesis. *Neuropsychopharmacology*. 37:939–949.

Wang, Y., Cui, X.L., Liu, Y.F., Gao, F., Wei, D., Li, X.W., Wang, H.N., Tan, Q.R., Jiang, W., 2011. LPS inhibits the effects of fluoxetine on depression-like behavior and hippocampal neurogenesis in rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 35(8): 1831-5.

Willner, P., Towell, A., Sampson, D., Sophokleous, S., Muscat, R., 1987. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. *Psychopharmacology (Berl)*. 93: 358-364.

Willner, P., Muscat, R., Papp, M., 1992. Chronic mild stress-induced anhedonia: a realistic animal model of depression. *Neurosci Biobehav Rev*. 16: 525-534.

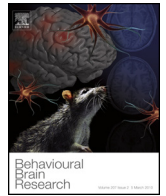
Wolters, E. C., 2008. Variability in the clinical expression of Parkinson's disease. *Journal of the Neurological Sciences*. 266: 197-20.

Yoshiharaa, S., Otania, H., Tsunodab, M., Ishiia, K., Iizukaa, H., Ichibaa, H., Fukushimaa, T., 2012. Alterations in extracellular tryptophan and dopamine concentrations in rat striatum following peripheral administration of d- and l-tryptophan: An in vivo microdialysis study. *Neuroscience Letters*. 526: 74–78.

Yuan, W., Collado-Hidalgo, A., Yufit, T., Taylor, M., Varga, J., 1998. Modulation of cellular tryptophan metabolism in human fibroblasts by transforming growth factor-beta: selective inhibition of indoleamine 2, 3-dioxygenase and tryptophanyl-tRNA synthetase gene expression. *J Cell Physiol*. 177(1): 174–186.

ANEXOS

Anexo 1



Research report

Induction of depressive-like behavior by intranigral 6-OHDA is directly correlated with deficits in striatal dopamine and hippocampal serotonin

Ronise M. Santiago^a, Janaína Barbiero^a, Raisa W. Gradowski^a, Suelen Bochen^a,
Marcelo M.S. Lima^b, Cláudio Da Cunha^a, Roberto Andreatini^a, Maria A.B.F. Vital^{a,*}

^a Pharmacology Department, Federal University of Paraná, Brazil

^b Physiology Department, Federal University of Paraná, Brazil

HIGHLIGHTS

- The intranigral infusion of 6-OHDA was able to promote a depressive-like behavior.
- 6-OHDA-lesioned rats exhibited a reduction in the levels of hippocampal serotonin and striatal dopamine.
- Animals that received 6-OHDA showed a decrease in swimming time and consumption of sucrose.
- There is a correlation between hippocampal serotonin and time swimming and sucrose consumption.
- There is a correlation between striatal dopamine levels and immobility time in the forced swim test.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 July 2013

Received in revised form 17 October 2013

Accepted 22 October 2013

Available online xxx

Keywords:

Parkinson's disease

Depressive-like behavior

6-OHDA

ABSTRACT

Among the non-motor phenomena of Parkinson's disease (PD) are depressive symptoms, with a prevalence of 40–70%. The reason for this high prevalence is not yet clear. The basal ganglia receives dopamine (DA) inputs from the substantia nigra pars compacta (SNpc), which is known to be impaired in PD patients. The neurotransmitter deficiency hypothesis of PD considers that low serotonin (5-hydroxytryptamine [5-HT]) activity in the brain in PD patients is a risk factor for depression. We investigated whether DA depletion promoted by the neurotoxin 6-hydroxydopamine (6-OHDA) is able to induce depressive-like behavior and neurotransmitter alterations that are similar to those observed in PD. To test this hypothesis, we performed intranigral injections of 6-OHDA in male Wistar rats and conducted motor behavior, depressive-like behavior, histological, and neurochemical tests. After the motor recovery period, 6-OHDA was able to produce anhedonia and behavioral despair 7, 14, and 21 days after neurotoxin infusion. These altered behavioral responses were accompanied by reductions of striatal DA. Additionally, decreases in hippocampal 5-HT content were detected in the 6-OHDA group. Notably, correlations were found between 5-HT and DA levels and swimming, immobility, and sucrose preference. Our results indicate that 6-OHDA produced depressive-like behavior accompanied by striatal DA and hippocampal 5-HT reductions. Moreover, DA and 5-HT levels were strongly correlated with “emotional” impairments, suggesting the important participation of these neurotransmitters in anhedonia and behavioral despair after 6-OHDA-induced nigral lesions.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disease among the elderly, second only to Alzheimer's disease [1,2]. Presently, the major clinical features of PD include

the asymmetric onset of bradykinesia, rigidity, resting tremor, and disturbances in balance [3]. In addition to these motor signs of PD, comorbidities also affect these patients, leading to mental, emotional, and social impairment, thus contributing to the reduction of the quality of life of PD patients [4–7].

Among the non-motor signs of PD are depressive symptoms [5,8–10], with a prevalence of 40–70% [8,9,11]. The reason for this high prevalence is not yet clear. The basal ganglia receives dopamine (DA) inputs from the substantia nigra pars compacta (SNpc), which is known to be impaired in PD patients. Thus,

* Corresponding author at: Departamento de Farmacologia, Universidade Federal do Paraná, Brazil. Tel.: +55 41 3361 1717; fax: +55 41 3266 2042.

E-mail address: vital@ufpr.br (M.A.B.F. Vital).

observations of pathological features in the SNpc in depressed PD patients, though only trending toward significance, appear to be relevant and suggest that the nigrostriatal circuit is involved in PD-related depression [9].

Pathophysiological evidence indicates that serotonin (5-hydroxytryptamine [5-HT]) is altered in patients with PD-associated depression [12]. A 5-HT hypothesis has also been proposed for PD-related depression [13]. This hypothesis posits that 5-HT induces DA release in the basal ganglia, which is down-regulated by 5-HT_{2C} receptors [14]. Decreases in 5-HT content or increases in the inhibitory activity of 5-HT_{2C} receptors may be associated with a decrease in dopaminergic neurotransmission in PD patients and the subsequent worsening of mood symptoms.

Changes in neural network activity in the basal ganglia may impact serotonergic neurotransmission, thus contributing to the development of depression in PD [15]. Recent studies indicate that animal models of PD are also able to produce comorbid depressive-like behaviors in PD [16–19]. We previously reported that bilateral injections of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) into the SNpc produced depressive-like behavior that was strongly correlated with impairments in striatal DA and 5-HT [20]. The objective of the present study was to investigate the time-dependent relationship between depressive-like behavior and neurochemical (i.e., striatal and hippocampal) and histological changes in a bilateral intranigral model of PD induced by 6-OHDA.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Male Wistar rats from our breeding colony were used, weighing 280–320 g at the beginning of the experiments. The animals were randomly housed in groups of five in polypropylene cages with wood shavings as bedding and maintained in a temperature-controlled room (22 ± 2 °C) on a 12 h/12 h light/dark cycle (lights on at 7:00 AM). The animals had free access to water and food throughout the experiment. All of the tests were performed weekly (each Tuesday) between 9:00 AM and 11:00 AM.

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 experimental protocol complied with the recommendations of the Federal University of Paraná and was approved by the University Ethics Committee (protocol no. 470).

2.2. Experimental design

The rats were randomly distributed into eight groups: four sham groups (cerebrospinal fluid [CSF]) served as controls and four 6-Hydroxydopamine (6-OHDA) groups (6 µg 6-OHDA in 1 µl of artificial cerebrospinal fluid, supplemented with 0.2% ascorbic acid; Sigma, St. Louis, MO, USA). The four 6-OHDA groups were further subdivided into eight additional groups: sham 1 day (*n* = 20), 6-OHDA 1 day (*n* = 10), sham 7 days (*n* = 10), 6-OHDA 7 days (*n* = 10), sham 14 days (*n* = 10), 6-OHDA 14 days (*n* = 10), sham 21 days (*n* = 10), and 6-OHDA 21 days (*n* = 10). The rats underwent stereotaxic surgery, and 6-OHDA and cerebrospinal fluid were bilaterally infused in a single dose into the SNpc on day 0.

After the induction of the SNpc lesion, motor behavior tests were performed at different time-points: 1, 7, 14, and 21 days post-6-OHDA. Depressive-like behavior was recorded 7, 14, and 21 days post-6-OHDA. Immediately after each time-point of behavioral testing, the animals were decapitated, followed by dissection of the striatum and hippocampus for neurochemical assessment or intracardially perfused for histological assessment.

2.3. Stereotaxic surgery

The neurotoxin 6-OHDA was prepared according to established doses that promote significant dopaminergic neuron loss [3]. The animals were anesthetized with equitiesin (0.3 ml/kg chlornembutal, intraperitoneal [i.p.]). 6-OHDA was bilaterally infused through a 27-gauge stainless steel needle according to the following coordinates: antero-posterior (AP): –5.0 mm from bregma; medio-lateral (ML): ±2.1 mm from the midline; dorso-ventral (DV): –8.0 mm from skull [21]. The flow of the injection was controlled with an electronic pump (Harvard Apparatus, USA) at a rate of 0.33 µl/min for 3 min. The needle remained in the injection site for an additional 2 min to avoid reflux. Sham operations followed the same procedure, but sterile artificial cerebrospinal fluid was injected.

2.4. Open-field test

The apparatus consisted of a round black arena (170 cm diameter, 45 cm height). Animal movements were monitored and recorded with an automatic system (HVS System, Buckingham, UK). The animals were gently placed in the southwest position of the open field and allowed to freely explore the area for 5 min. Two motor parameters were recorded: distance traveled (i.e., the distance in meters that the animal traveled during the test) and speed of locomotion (i.e., speed of locomotion in meters/second that the animal do during the test). The open-field arena was washed with a 5% water-ethanol solution before behavioral testing to eliminate possible bias caused by odors left by previous rats.

2.5. Forced swim test

The procedure was a modification of the method proposed previously [22,23]. The test was conducted in two sessions. In the training session, the rats were placed for 15 min in a tank (25 cm diameter, 60 cm height) that contained water at a temperature of 24 ± 1 °C and depth of 25 cm. Twenty-four hours after the training session, the rats were subjected to the forced swim test (FST) for 5 min, which was video-recorded for subsequent quantification of the following parameters: immobility (i.e., the lack of motion of the entire body, with the exception of only small movements necessary to keep the animal's head above the water), climbing (i.e., vigorous movements of the forepaws in and out of the water, usually directed against the wall of the tank), and swimming (i.e., large forepaw movements that displaced water and moved the animal's body around the cylinder, which were more than necessary to keep the head above the water). The water was changed after each animal to avoid the influence of temperature and substances left by previous rats.

2.6. Sucrose preference test

Sucrose preference is frequently used as measure of anhedonia in rodents [24,25]. The animals were transferred to single-housing cages with free access to food. Each rat was provided with two preweighed bottles of water on opposite sides of the cage during the 24 h training phase to adapt the rats to drinking from two bottles. After training, one bottle was randomly switched to contain a 0.5% sucrose solution as described previously [26]. Twenty-four hours later, the bottles were reversed to avoid perseveration effects. The bottles were weighed before being offered to the animal and at the end of the experiment (24 h before). The sum of water consumption and sucrose consumption was defined as total intake. The percentage of sucrose intake was calculated according to the following equation: % sucrose preference = (sucrose intake [g]/total

intake [g]) \times 100. The tests began 1 week prior to neurotoxin exposure to provide baseline values and were completed 21 days later.

2.7. Nissl staining and neuronal quantification

After tissue extraction for neurochemical purposes, the rats' midbrains were collected 1, 7, 14, and 21 days after stereotaxic surgery and quickly frozen on dry ice. For each rat, twelve 20- μ m-thick sections were cut on a cryostat in the coronal plane to cover approximately 360 μ m (−4.92 to −5.28 from bregma) of the mid-brain [21]. These coordinates correspond to the maximal extent of dopaminergic neurons in the SNpc [27]. The sections were mounted onto slides, dried, stained with Cresyl violet, and coverslipped after dehydration in ascending concentrations of ethanol-xylene solutions. Cell counts were made using Image-Pro Express 6 software (Media Cybernetics, USA). Each slice was digitized with a digital camera connected to an IX71 microscope (Olympus Optical Japan). A digital area was created to delimit the boundaries of the SNpc. For each analysis, the same area was adopted. A "manual tag" tool was used to count the neurons inside the area. All of the counts were performed using images obtained at 400 \times magnification. The parameters (counting frame, sampling grid) were calculated according to recommendations of straightforward neuron counting based on a computer approach. This method is not specific to the DA phenotype, so the mean number of all neurons in the SNpc was obtained for each group. The number of neurons was counted in the striatum in sham rats, and striatal denervation is expressed as a percentage of the sham group.

2.8. Determination of dopamine, serotonin, and metabolite concentrations

The striatum and hippocampus were rapidly dissected 1, 7, 14, and 21 days after stereotaxic surgery and stored at −80 °C until neurochemical quantification. The endogenous concentrations of DA, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), homovanillic acid (HVA), 5-HT, and 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) were assayed using reverse-phase high-performance liquid chromatography (HPLC) with electrochemical detection. The system consisted of a Synergi Fusion-RP C-18 reverse-phase column (150 mm \times 4.6 mm inner diameter, 4 μ m particle size) fitted with a 4 mm \times 3.0 mm pre-column (SecurityGuard Cartridges Fusion-RP), an electrochemical detector (ESA Coulochem III Electrochemical Detector) equipped with a guard cell (ESA 5020) with the electrode set at 350 mV and a dual-electrode analytical cell (ESA 5011A), and a LC-20AT pump (Shimadzu) equipped with a manual Rheodyne 7725 injector with a 20 μ l loop. The column was maintained inside a temperature-controlled oven at 25 °C (Shimadzu). The cell contained two chambers in series. Each chamber included a porous graphite coulometric electrode, double counter electrode, and double reference electrode. Oxidizing potentials were set at 100 mV for the first electrode and 450 mV for the second electrode. The tissue samples were homogenized with an ultrasonic cell disrupter (Sonics) in 0.1 M perchloric acid that contained sodium metabisulfite 0.02% and internal standard. After centrifugation at 10,000 \times g for 30 min at 4 °C, 20 μ l of the supernatant was injected into the chromatograph. The mobile phase (1 ml/min flow rate) had the following composition: 20 g citric acid monohydrate (Merck), 200 mg octane-1-sulfonic acid sodium salt (Merck), 40 mg ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA; Sigma), and 900 ml HPLC-grade water. The pH of the buffer running solution was adjusted to 4.0, and the solution was then filtered through a 0.45 μ m filter. Methanol (Merck) was added to give a final composition of 10% methanol (v/v). The neurotransmitter and metabolite concentrations were calculated using standard curves that were generated by determining in triplicate the ratios

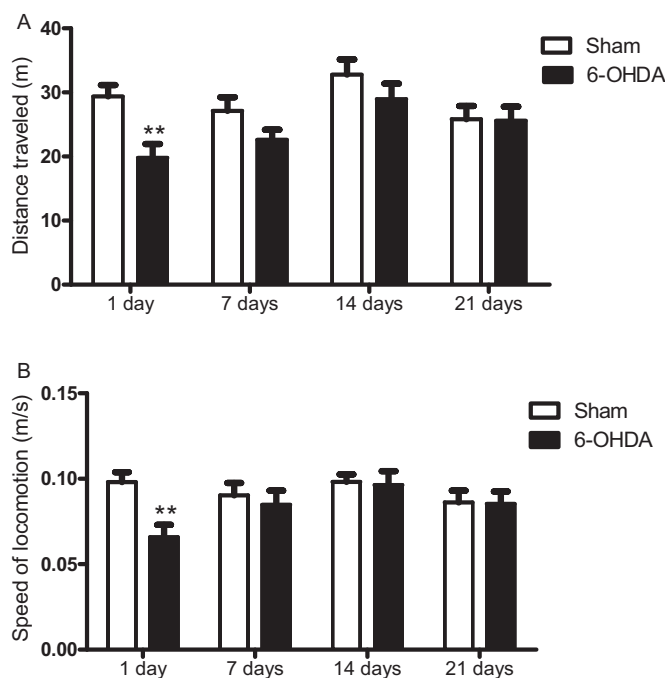


Fig. 1. Locomotion assessed in the open-field test in the 6-OHDA group. (A) Speed of locomotion. (B) Distance traveled. The data were obtained 1, 7, 14, and 21 days after 6-OHDA infusion. The data are expressed as mean \pm SEM ($n=8-9$ /group). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, compared with sham group (two-way ANOVA followed by Bonferroni test).

between three different known amounts of the internal standard. The units are expressed as ng/g of wet weight.

2.9. Statistical analysis

The parametric data obtained were analyzed using two-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni post hoc test. Pearson correlation coefficients (r) were calculated to establish relationships between neurotransmitter concentrations and behavior in the FST and sucrose preference test. The level of significance was set at $p \leq 0.05$.

3. Results

3.1. Behavioral tests

In the open-field test (Fig. 1A), the 6-OHDA group exhibited a reduction of distance traveled ($p < 0.01$) compared with the sham group 1 day after neurotoxin exposure, reflected by significant effects of the column ($F_{1,62} = 9.361$, $p = 0.0033$) and row ($F_{3,62} = 4.007$, $p = 0.0113$) factors but no significant interaction ($F_{3,62} = 1.694$, $p = 0.1776$). Similarly, the speed of locomotion after neurotoxin exposure was reduced in the 6-OHDA group 1 day after neurotoxin exposure compared with the sham group ($p < 0.01$), reflected by a significant effect of the column factor ($F_{1,62} = 2.230$, $p = 0.0936$) but not row factor ($F_{3,62} = 1.780$, $p = 0.1603$) and no interaction ($F_{3,62} = 2.230$, $p = 0.0936$).

In the FST, swimming was decreased in the 6-OHDA group compared with the sham group 7, 14, and 21 days after neurotoxin exposure (all $p < 0.05$), with significant effects of the column ($F_{1,49} = 27.17$, $p < 0.0001$) and row ($F_{2,49} = 1.970$, $p = 0.1503$) factors and a significant interaction ($F_{2,49} = 0.00604$, $p = 0.9940$; Fig. 2A). The 6-OHDA group also exhibited an increase in immobility compared with the sham group 7, 14, and 21 days after neurotoxin exposure (all $p < 0.01$), with significant effects of the column

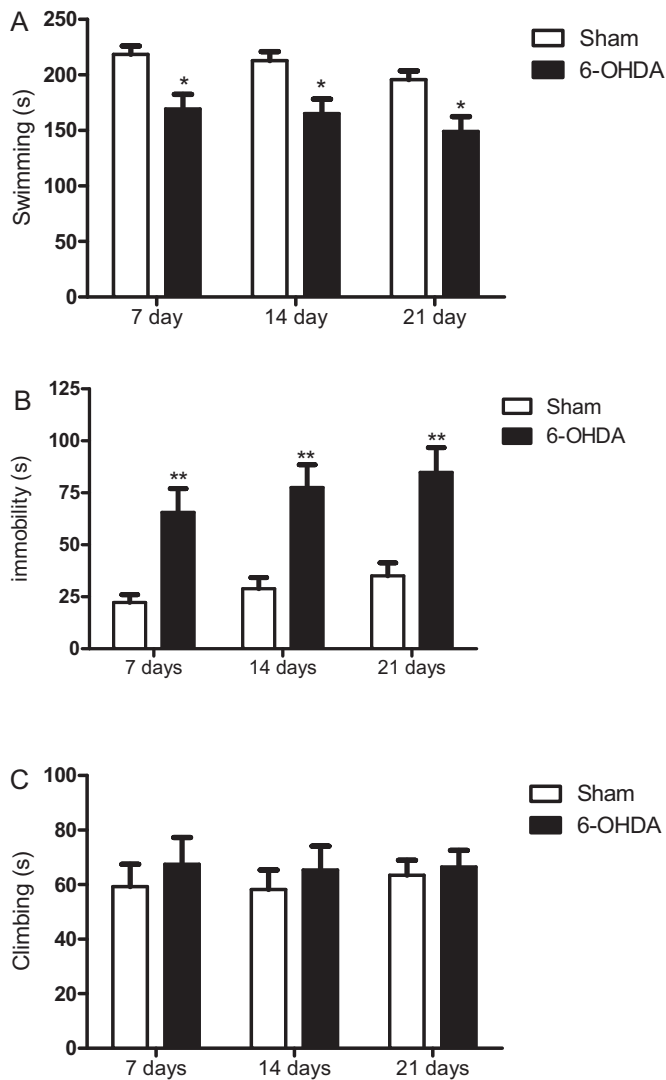


Fig. 2. Depressive-like behavior elicited by the neurotoxin 6-OHDA at different times in the forced swimming test. (A) Swimming. (B) Immobility. (C) Climbing. The data were obtained 7, 14, and 21 days after 6-OHDA infusion. The data are expressed as mean \pm SEM ($n = 9-10$ /group). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, compared with sham group (two-way ANOVA followed by Bonferroni test).

($F_{1,49} = 38.85$, $p < 0.0001$) and row ($F_{2,49} = 1.474$, $p = 0.2391$) factors and a significant interaction ($F_{2,49} = 0.06791$, $p = 0.9344$; Fig. 2B). The analysis of climbing behavior in the FST demonstrated that bilateral intranigral 6-OHDA infusion did not significantly affect this parameter, reflected by no effects of the column ($F_{1,49} = 0.8705$, $p = 0.3556$) or row ($F_{2,49} = 0.0752$, $p = 0.9276$) factor and no interaction ($F_{2,49} = 0.05433$, $p = 0.9472$; Fig. 2C).

The analysis of sucrose preference revealed that the 6-OHDA group exhibited a significant reduction of sucrose consumption compared with the basal and sham groups 7 days after neurotoxin exposure ($p < 0.05$; Fig. 3). The groups did not significantly differ 14 days after neurotoxin exposure. At 21 days, the anhedonic effect induced by 6-OHDA was still detected compared with the sham group ($p < 0.01$), reflected by significant effects of the column ($F_{1,56} = 21.29$, $p < 0.0001$) and row ($F_{3,56} = 1.167$, $p = 0.3307$) factors and a significant interaction ($F_{3,56} = 1.822$, $p = 0.1536$; Fig. 3).

3.2. Nissl staining and neuronal quantification

The analysis of the neuronal population in the SNpc revealed that 6-OHDA caused pronounced neuronal loss (Fig. 4). The

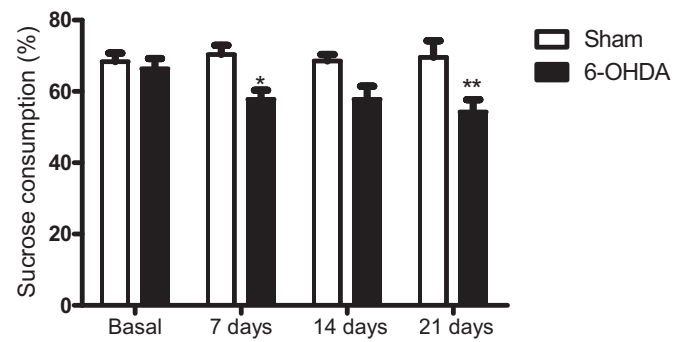


Fig. 3. Percentage of sucrose preference elicited by the neurotoxin 6-OHDA. The data were obtained 1 week before (baseline) and 7, 14, and 21 days after 6-OHDA infusion. The data are expressed as mean \pm SEM ($n = 8-9$ /group). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, compared with sham group (two-way ANOVA followed by Bonferroni test).

quantification of positive Nissl-stained neurons indicated that 6-OHDA reduced SNpc neurons by 28.1% compared with the sham group ($p < 0.01$) 1 day after infusion. Moreover, the 7, 14, and 21 day time-points showed a sustained deficit in the percentage of neurons in the SNpc in the 6-OHDA group compared with the sham group ($p < 0.001$), reflected by significant effects of the column ($F_{1,82} = 89.96$, $p < 0.0001$) and row ($F_{3,82} = 5.658$, $p = 0.0014$) factors and a significant interaction ($F_{3,82} = 2.329$, $p = 0.0805$; Fig. 4B).

3.3. Determination of striatal and hippocampal DA, 5-HT, and metabolite concentrations

Fig. 5A presents the striatal concentrations of DA and the metabolites DOPAC and HVA. Dopamine was significantly reduced in the 6-OHDA group compared with the sham group ($p < 0.001$) 7, 14, and 21 days after neurotoxin exposure, reflected by significant effects of the column ($F_{1,46} = 102.5$, $p < 0.0001$) and row ($F_{3,46} = 13.12$, $p < 0.0001$) factors and a significant interaction ($F_{3,46} = 11.02$, $p < 0.0001$). The 6-OHDA group exhibited a significant reduction of striatal DOPAC levels compared with the sham group 7 days ($p < 0.05$) and 21 days ($p < 0.001$) after neurotoxin exposure, reflected by significant effects of the column ($F_{1,46} = 27.99$, $p < 0.0001$) and row ($F_{3,46} = 3.255$, $p = 0.0300$) factors and a significant interaction ($F_{3,46} = 2.197$, $p = 0.1012$; Fig. 5B). Striatal HVA concentrations increased in the 6-OHDA group compared with the control group on day 1 ($p < 0.001$), followed by a reduction on days 7 ($p < 0.001$), 14 ($p < 0.01$), and 21 ($p < 0.001$), reflected by significant effects of the column ($F_{1,46} = 36.52$, $p < 0.0001$) and row ($F_{3,46} = 36.49$, $p < 0.0001$) factors and a significant interaction ($F_{3,46} = 35.24$, $p < 0.0001$; Fig. 5C).

The analysis of neurotransmitter and metabolite concentrations in the hippocampus indicated that 5-HT decreased in the 6-OHDA group compared with the sham group 1, 7, 14, and 21 days after neurotoxin exposure (all $p < 0.05$), reflected by significant effects of the column ($F_{1,38} = 34.51$, $p < 0.0001$) and row ($F_{3,38} = 1.707$, $p = 0.1818$) factors and a significant interaction ($F_{3,38} = 0.08605$, $p = 0.9673$; Fig. 6A). Additionally, 6-OHDA significantly increased 5-HIAA compared with the sham group on day 1 ($p < 0.05$) and day 21 ($p < 0.05$), reflected by significant effects of the column ($F_{1,38} = 0.2798$, $p = 0.5999$) and row ($F_{3,38} = 40.75$, $p < 0.0001$) factors and a significant interaction ($F_{3,38} = 5.959$, $p = 0.0020$; Fig. 6B).

3.4. Correlations with depressive-like behavior

6-Hydroxydopamine-induced neurotransmitter alterations strongly correlated with depressive-like behavior. Pearson's correlation coefficients revealed a positive correlation between hippocampal 5-HT concentration and swimming ($r = 0.92$,

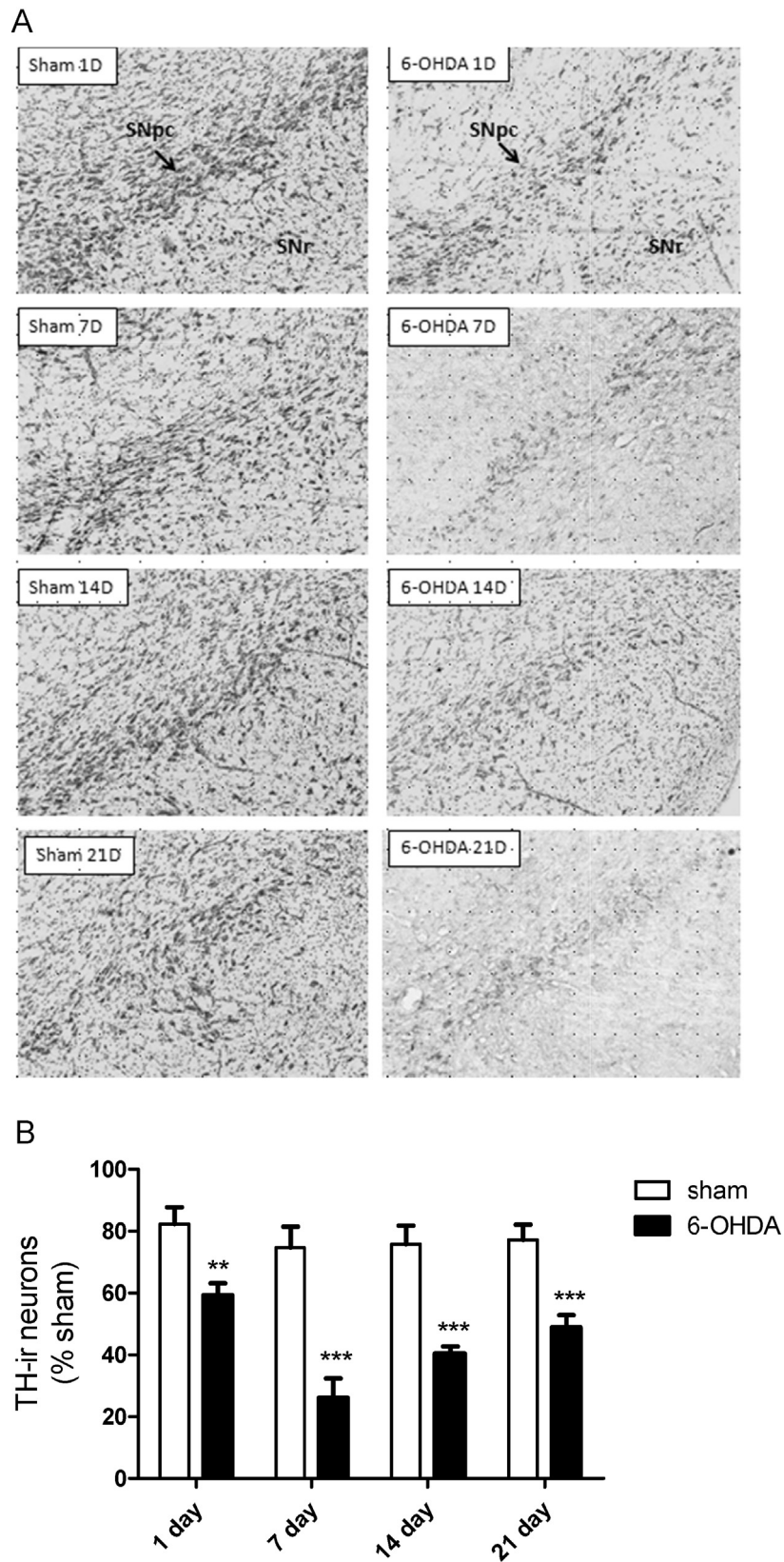


Fig. 4. Histological analysis of the SNpc at the end of the experiments. The data were obtained 7, 14, and 21 days after 6-OHDA infusion. (A) Representative photomicrographs of Nissl-stained neurons in the ventral midbrain for each group (magnification: 4× and 40× for the inset squares). (B) Stereological quantification of the total number of neurons in the SNpc for each group. The data are expressed as a percentage of the sham group ($n=5-8/\text{group}$). *** $p < 0.01$, compared with sham group (two-way ANOVA followed by Bonferroni test).

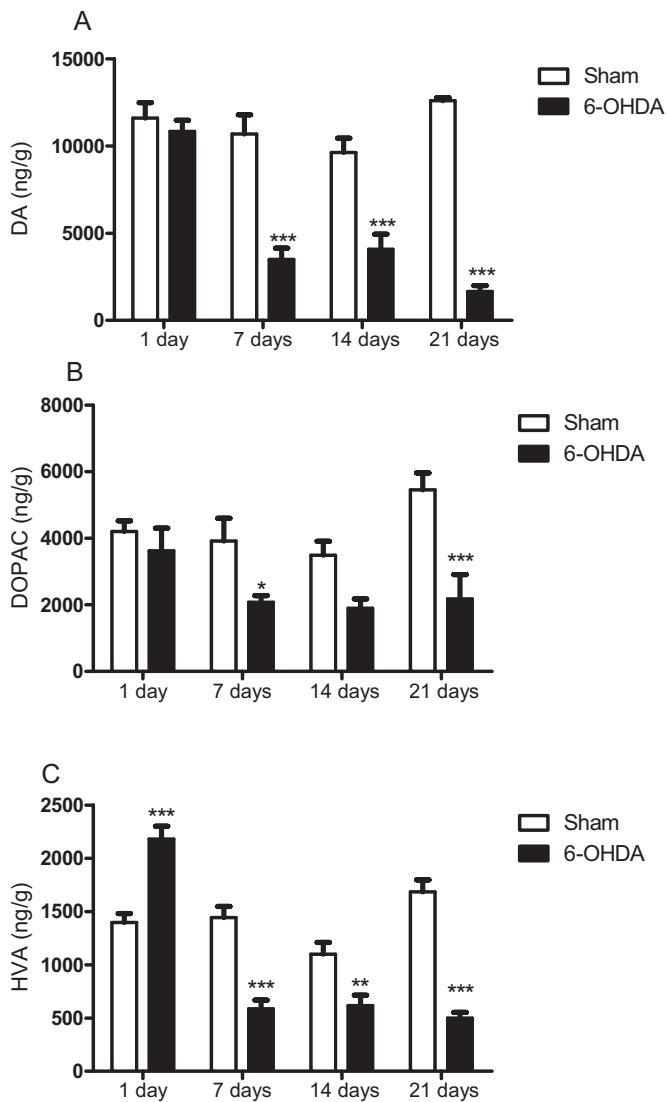


Fig. 5. Neurochemical examination of the striatal concentrations of dopamine, DOPAC, and HVA elicited by the neurotoxin 6-OHDA. The data were obtained 7, 14, and 21 days after 6-OHDA infusion. (A) Dopamine concentrations. (B) DOPAC concentrations. (C) HVA concentrations. The data are expressed as mean \pm SEM ($n=4-10$ /group). * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, compared with sham group (two-way ANOVA followed by Bonferroni test).

$p=0.087$; Fig. 7A) and a negative correlation between striatal DA and immobility ($r=-0.92$, $p=0.078$; Fig. 7B). Additionally, a strong positive correlation was found between hippocampal 5-HT concentration and sucrose preference ($r=0.98$, $p=0.0002$; Fig. 7C). A strong positive correlation was found between striatal DA levels and sucrose preference ($r=0.97$, $p=0.0007$; Fig. 7D).

4. Discussion

The present results showed that the animal model of 6-OHDA-induced PD produced sustained depressive-like behavior associated with striatal and hippocampal DA and 5-HT deficits, respectively. After bilateral 6-OHDA infusion, the animals exhibited marked impairments in swimming and immobility assessed in the FST and a similar pattern of anhedonia reflected by a reduction of sucrose preference. Additionally, a reduction of the neuronal population in the SNpc was consistently observed at all time-points investigated, with a lowering of striatal and hippocampal DA and 5-HT levels at all time-points investigated. The behavioral

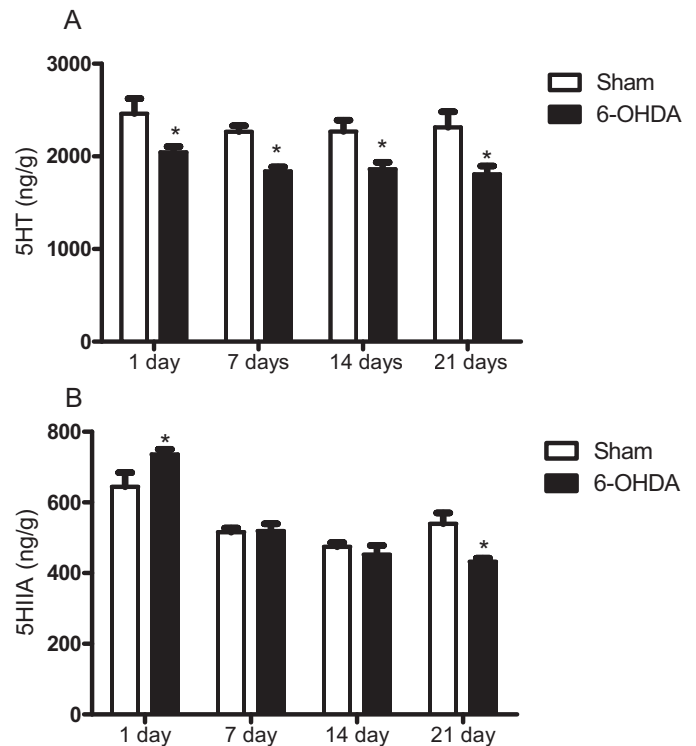


Fig. 6. Neurochemical examination of the hippocampal concentrations of 5-HT and 5-HIAA elicited by the neurotoxin 6-OHDA. The data were obtained 7, 14, and 21 days after 6-OHDA infusion. (A) 5-HT concentrations. (B) 5-HIAA concentrations. The data are expressed as mean \pm SEM ($n=5-8$ /group). * $p < 0.05$, compared with sham group (two-way ANOVA followed by Bonferroni test).

repercussions of the changes in neurotransmitter levels promoted by 6-OHDA-induced lesions were reflected by strong correlations between hippocampal 5-HT and swimming, striatal DA and immobility, hippocampal 5-HT and sucrose preference, and striatal DA and sucrose preference.

Motor activity was assessed in the open-field test to discard possible motor bias in the depressive-like parameters. The results demonstrated that the animals in the 6-OHDA group had motor deficits only on day 1 after surgery that then recovered. 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 [28,29].

Depression is a common symptom among patients with PD and itself is considered a major syndrome that can aggravate and lead to consequences in the evolution of PD. Depression can also greatly influence quality of life [9,30]. Notwithstanding the importance of depression in PD, few studies have used animal models of PD and focused on the behavior and neurochemical mechanisms. The FST [22] has become a widely used tool to allow such studies. The prolonged duration of immobility in this test is often considered “behavioral despair” that can be extrapolated to a condition similar to human depression [31]. The main advantage of this test is that it allows correlations to be made between behavior and different neurotransmitter systems, such as correlations between swimming and the serotonergic system or between immobility and the dopaminergic system. Norepinephrine reuptake blockers increase climbing time in the FST, and serotonin reuptake blockers increase swimming time [32–34].

In the present study, the 6-OHDA group exhibited a reduction of swimming time 7, 14, and 21 days after neurotoxin exposure. The 6-OHDA group also exhibited a significant increase in immobility time compared with the control group at 7, 14, and 21 days. The

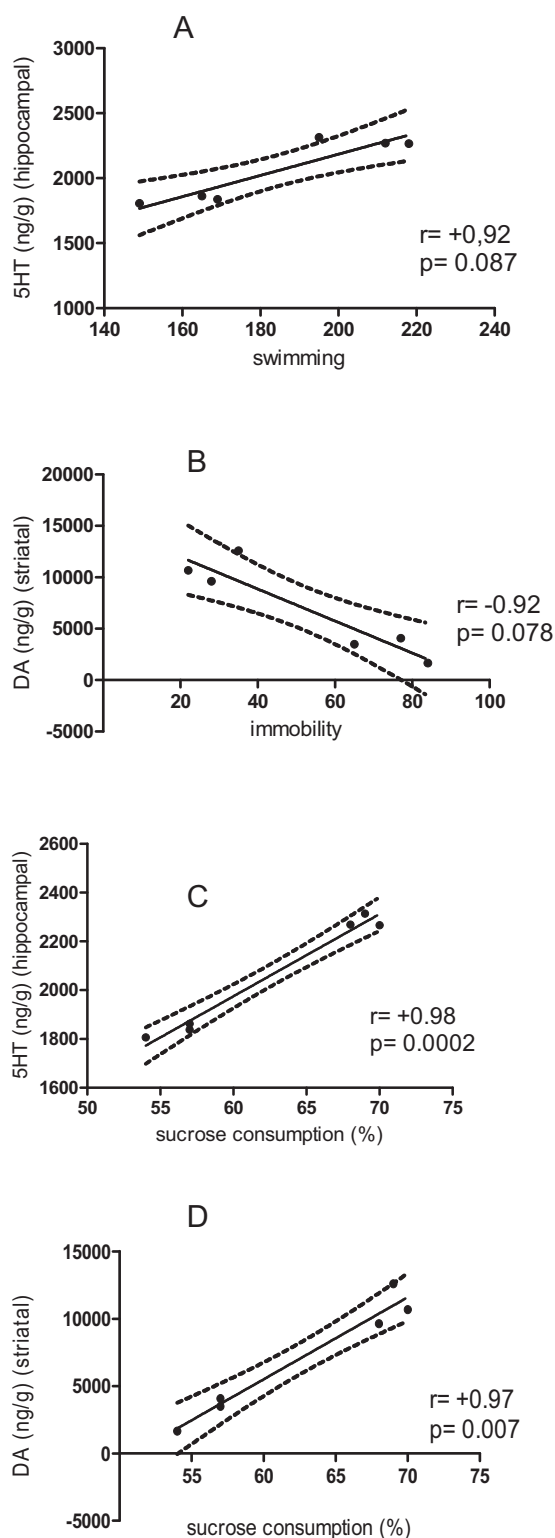


Fig. 7. Depressive-like behavior was closely correlate with neurotransmitter systems after 6-OHDA infusion. Pearson's correlation coefficients were calculated for the following: (A) 5-HT \times swimming, (B) dopamine \times immobility, (C) 5-HT \times sucrose preference, and (D) dopamine \times sucrose preference.

decrease in swimming time suggests that depressive symptoms in lesioned animals are related to deficiencies in the serotonergic and dopaminergic systems. In the sucrose preference test, the 6-OHDA group exhibited a reduction of sucrose consumption only

on days 7 and 21. Such results may reflect a state of anhedonia characterized by the loss of the ability to feel pleasure [24,25].

The depressive-like symptoms described above were correlated with the neurochemical changes in the striatum and hippocampus. The HPLC results showed that the 6-OHDA group had an average 44% reduction of striatal dopamine levels, in addition to decreases in the metabolites DOPAC and HVA. The 6-OHDA group also exhibited a significant average loss of 19% of 5-HT levels in the hippocampus compared with the sham group. Our results showed a strong correlation between 5-HT and DA levels and swimming time and immobility time, respectively. Both 5-HT and DA levels were correlated with sucrose preference. These results are consistent with the hypothesis that neurotransmitter deficiency causes depression in PD patients.

Although the present results showed depressive-like behavior in 6-OHDA-lesioned rats, the literature reports controversy in this area. According to Huot et al. [35], unlike in idiopathic PD, much variability exists in striatal 5-HT levels in 6-OHDA-lesioned rats. Part of this variability might derive from the experimental paradigms used to produce the lesion. For example, the age at which the neurotoxin is injected, the injection site, and the rat strain may all impact 6-OHDA-induced changes in 5-HT levels.

According to Aarsland et al. [36], the majority of studies that have explored the mechanisms that underlie depression in PD patients have focused on neurotransmitter systems such as norepinephrine, DA, and 5-HT in mood regulation. Changes in these systems are associated with depression in patients with neurodegenerative diseases, such as PD [36]. Braak et al. [37] reported that stage 2 of PD involves the brain stem, and disintegration of locus coeruleus noradrenergic cells and raphe serotonergic cells in the region of the brainstem sensory relay center that modulates mood and affect can induce the onset of depression. Additionally, a post-mortem study showed that patients with PD and depression had increased neuronal cell loss in the serotonergic dorsal raphe nucleus compared with nondepressed patients with PD [38]. The involvement of dopaminergic system dysfunction in depression associated with PD has been suggested by several studies, including functional imaging studies and CSF analysis of brain tissue obtained at autopsy [36].

The neurotransmitter deficiency hypothesis considers that low 5-HT activity in the brains of PD patients is a risk factor for depression [30]. Serotonin plays an inhibitory role in the release of DA in the striatum. Therefore, reductions of 5-HT may be a compensatory mechanism related to reductions of dopaminergic neurotransmission in PD [30,39]. These neurotransmitter systems (DA and 5-HT) are involved in the regulation of mood, and alterations in these systems are associated with depression in the general population and in patients with neurodegenerative diseases like PD [36].

5. Conclusions

Although the precise etiology is still unknown, deficits in monoaminergic systems appear to contribute to the onset of depression in PD. Our data showed that rats that received 6-OHDA-induced lesions in the SN exhibited depressive-like behavior from day 7 until day 21 of the study, accompanied by reductions of striatal dopamine and hippocampal serotonin.

Conflict of interest

The authors have no conflict of interest to declare.

Acknowledgments

This work was supported by grants from CNPq and CAPES, who had no further role in the study design; in the collection, analysis,

and interpretation of the data; in the writing of the report; and in the decision to submit the paper for publication. CC, RA, and MABFV are recipients of CNPq fellowships. MMSL is a recipient of a Fundação Araucária – Governo do Estado do Paraná fellowship.

References

- [1] Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 2003;39:889–909.
- [2] Elbaz A, Tranchant C. Epidemiologic studies of environmental exposures in Parkinson's disease. *J Neurol Sci* 2007;262:37–44.
- [3] Lima MMS, Martins EF, Delattre AM, Proença MB, Mori MA, Carabelli B, et al. Motor and non-motor features of Parkinson's disease: a review of clinical and experimental studies. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2012;11:439–49.
- [4] Den Oudsten BL, Van Heck GL, De Vries J. Quality of life and related concepts in Parkinson's disease: a systematic review. *Mov Disord* 2007;22:1528–37.
- [5] Hemmerle AM, Herman JP, Serroog KB. Stress, depression and Parkinson's disease. *Exp Neurol* 2012;233:79–86.
- [6] Hirsch E, Graybiel AM, Agid YA. Melanized dopamine neurons are differentially susceptible to degeneration in Parkinson's disease. *Nature* 1988;334:345–8.
- [7] Soh SE, Morris ME, McGinley JL. Determinants of health-related quality of life in Parkinson's disease: a systematic review. *Parkinsonism Relat Disord* 2011;17:1–9.
- [8] Barnum CJ, Tansey MG. Neuroinflammation and non-motor symptoms: the dark passenger of Parkinson's disease. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2012;12:350–8.
- [9] Frisina PG, Haroutunian V, Libow LS. The neuropathological basis for depression in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2009;15:144–8.
- [10] Wolters EC. Variability in the clinical expression of Parkinson's disease. *J Neurol Sci* 2008;266:197–203.
- [11] Althaus A, Becker OA, Spottke A, Dengler R, Schneider F, Kloss M, et al. Frequency and treatment of depressive symptoms in a Parkinson's disease registry. *Parkinsonism Relat Disord* 2008;14:626–32.
- [12] Schrag A. Psychiatric aspects of Parkinson's disease: an update. *J Neurol* 2004;251:795–804.
- [13] Mayeux R. Depression in the patient with Parkinson's disease. *J Clin Psychiatry* 1990;51(Suppl 20–23), discussion 24–25.
- [14] Dremencov E, Newman ME, Kinor N, Blatman-Jan G, Schindler CJ, Overstreet DH, et al. Hyperfunctionality of serotonin-2C receptor-mediated inhibition of accumbal dopamine release in an animal model of depression is reversed by antidepressant treatment. *Neuropharmacology* 2005;48:34–42.
- [15] Tan SKH, Hartung H, Sharp T, Temel Y. Serotonin-dependent depression in Parkinson's disease: a role for the subthalamic nucleus. *Neuropharmacology* 2011;61:387–99.
- [16] Littelljohn D, Mangano E, Shukla N, Hayley S. Interferon- γ deficiency modifies the motor and co-morbid behavioral pathology and neurochemical changes provoked by the pesticide paraquat. *Neuroscience* 2009;164:1894–906.
- [17] Pankova NB, Vetrile LA, Basharova LA, Krupina NA, Khlebnikova NN, Rodina VI, et al. Immunization of rats with conjugates of dopamine and serotonin with bovine serum albumin prevents the development of experimental MPTP-induced depressive syndrome (electrophysiological parameters). *Neurosci Behav Physiol* 2004;34:131–8.
- [18] Tadaiesky MT, Dombrowski PA, Figueiredo CP, Cargnin-Ferreira E, Da Cunha C, Takahashi RN. Emotional, cognitive and neurochemical alterations in a pre-motor stage model of Parkinson's disease. *Neuroscience* 2008;156:830–40.
- [19] Vuckovic MG, Wood RI, Holschneider DP, Abernathy A, Togasaki DM, Smith A, et al. Memory, mood, dopamine, and serotonin in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned mouse model of basal ganglia injury. *Neurobiol Dis* 2008;32:319–27.
- [20] Santiago RM, Barbieiro J, Lima MMS, Dombrowski PA, Andreatini R, Vital MABF. 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. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2010;34:1104–14.
- [21] Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates: the new coronal set. 5th ed. San Diego: Academic Press; 2005.
- [22] Porsolt RD, Anton G, Blavet N, Jalife M. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur J Pharmacol* 1978;47:379–91.
- [23] Reneric JP, Bouvard M, Stinus L. In the rat forced swimming test, chronic but not subacute administration of dual 5-HT/NA antidepressant treatments may produce greater effects than selective drugs. *Behav Brain Res* 2002;136:521–32.
- [24] 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 (Berl)* 1991;104:255–9.
- [25] Wang SH, Zhang ZJ, Guo YJ, Zhou H, Teng GJ, Chen BA. Anhedonia and activity deficits in rats: impact of post-stroke depression. *J Psychopharmacol* 2009;23:295–304.
- [26] Slattery DA, Markou A, Cryan JF. Evaluation of reward processes in an animal model of depression. *Psychopharmacology (Berl)* 2007;190:555–68.
- [27] Reksidler AB, Lima MMS, Dombrowski P, Andersen ML, Zanata SM, Andreatini R, et al. Repeated intranigral MPTP administration: a new protocol of prolonged locomotor impairment mimicking Parkinson's disease. *J Neurosci Methods* 2008;167:268–77.
- [28] Lima MMS, Andersen ML, Reksidler AB, Vital MABF, Tufik S. The role of the substantia nigra pars compacta in regulating sleep patterns in rats. *PLoS One* 2007;2:e513.
- [29] Perry JC, Hipolide DC, Tufik S, Martins RD, Da Cunha C, Andreatini R, et al. Intranigral MPTP lesion in rats: behavioral and autoradiography studies. *Exp Neurol* 2005;195:322–9.
- [30] Kanda F, Oishi K, Sekiguchi K, Kuga A, Kobessho H, Shirafuji T, et al. Characteristics of depression in Parkinson's disease: evaluating with Zung's Self-Rating Depression Scale. *Parkinsonism Relat Disord* 2008;14:19–23.
- [31] Malkesman O, Weller A. Two different putative genetic animal models of childhood depression: a review. *Prog Neurobiol* 2009;88:153–69.
- [32] Cryan JF, Lucki I. Antidepressant-like behavioral effects mediated by 5-hydroxytryptamine_{2C} receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;295:1120–6.
- [33] Detke MJ, Rickels M, Lucki I. Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. *Psychopharmacology (Berl)* 1995;121:66–72.
- [34] Lucki I. The forced swimming test as a model for core and component behavioral effects of antidepressant drugs. *Behav Pharmacol* 1997;8:523–32.
- [35] Huot P, Fox SH, Brotchie JM. The serotonergic system in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 2011;95:163–212.
- [36] Aarsland D, Pahlhagen S, Ballard CG, Ehrt U, Svenningsson P. Depression in Parkinson disease: epidemiology, mechanisms and management. *Nat Rev Neurol* 2012;8:35–47.
- [37] Braak H, Ghebremedhin E, Rüb U, Bratzke H, Del Tredici K. Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell Tissue Res* 2004;318:121–34.
- [38] Paulus W, Jellinger K. The neuropathologic basis of different clinical subgroups of Parkinson's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 1991;50:743–55.
- [39] Suzuki K, Miyamoto M, Miyamoto T, Okuma Y, Hattori N, Kamei S, et al. Correlation between depressive symptoms and nocturnal disturbances in Japanese patients with Parkinson's disease. *Parkinsonism Related Disord* 2009;15:15–9.

Anexo 2

Antidepressant-like effect of celecoxib piroxicam in rat models of depression

Ronise M. Santiago · Janaína Barbiero · Bruno J. Martynhak · Suelen L. Boschen · Luisa M. da Silva · Maria F. P. Werner · Claudio Da Cunha · Roberto Andreatini · Marcelo M. S. Lima · Maria A. B. F. Vital

Received: 23 July 2013 / Accepted: 10 January 2014 / Published online: 24 January 2014
© Springer-Verlag Wien 2014

Abstract Beyond the current hypothesis of depression, several new biological substrates have been proposed for this disorder. The present study investigated whether the anti-inflammatory drugs celecoxib and piroxicam have antidepressant activity in animal models of depression. After acute administration, we observed antidepressant-like effects of celecoxib (10 mg/kg) and piroxicam (10 mg/kg) in the modified forced swim test in rats. Piroxicam increased serotonin and norepinephrine levels in the hippocampus. Prolonged (21-day) treatment with celecoxib (10 mg/kg) and piroxicam (10 mg/kg) rescued sucrose preference in a chronic mild stress model of depression. Additionally, the chronic mild stress-induced reduction of hippocampal glutathione was prevented by treatment with celecoxib and piroxicam. Superoxide dismutase in the hippocampus was increased after chronic mild stress compared with the non-stressed saline group. The non-stressed celecoxib and piroxicam groups and stressed piroxicam group exhibited an increase in hippocampal superoxide dismutase activity compared with the stressed saline group. Lipid hydroperoxide was increased in the stressed group treated with vehicle and non-stressed group treated with imipramine but not in the stressed groups treated with celecoxib and piroxicam. These results suggest that the antidepressant-like effects of anti-inflammatory

drugs might be attributable to enhanced antioxidant defenses and attenuated oxidative stress in the hippocampus.

Keywords Celecoxib · Piroxicam · Modified forced swim test · Chronic mild stress

Introduction

Mood disorders, including major depressive disorder (MDD), are psychiatric disturbances characterized by the presence of affective, cognitive, psychomotor, and neurovegetative symptoms. Major depressive disorder has a prevalence of 15 % in the population (Wang et al. 2011; Li et al. 2011), but its pathogenesis is not completely understood (Hannestad et al. 2011). Several studies have focused on monoaminergic systems, but the monoaminergic hypothesis does not appear to be sufficient to fully explain the mechanisms of MDD (Catena-Dell’Osso et al. 2011).

Beyond the current hypothesis, several new biological substrates have been proposed for this disorder. One possible explanation that was recently proposed for these alterations is based on the inflammatory and neurodegenerative hypothesis of depression (Maes et al. 2010). According to Raison and Miller (2011), inflammation is related to depression, such as increased levels of inflammatory mediators, including cytokines, in MDD patients compared with non-depressed individuals. This hypothesis purports that depression is characterized by activation of the inflammatory response system, with increased production of pro-inflammatory cytokines, such as interleukin (IL)-1 β , IL-6, and tumor necrosis factor α (TNF- α), and prostaglandin E₂ (PGE₂; Calabrese et al. 1986; Dantzer 2001; Abdel-Wahab and Salama 2011). These cytokines promote alterations in

R. M. Santiago (✉) · J. Barbiero · B. J. Martynhak · S. L. Boschen · L. M. da Silva · M. F. P. Werner · C. Da Cunha · R. Andreatini · M. A. B. F. Vital
Departamento de Farmacologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil
e-mail: ronise.santiago@gmail.com

M. M. S. Lima
Departamento de Fisiologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil

the tryptophan metabolic pathway and reduce the availability of serotonin, establishing an important link between inflammatory cytokine and monoamine levels (Müller et al. 2009). Studies have shown that pro-inflammatory cytokines, including TNF- α and IL-6, induce indoleamine dioxygenase (IDO), which activates the glial pathway and subsequently the catabolism of tryptophan, thus leading to the synthesis of tryptophan catabolites (TRYCATs) and nicotinamide, reducing the serotonin synthesis, and decreasing the neuronal availability of serotonin (Moir and Eccleston 1968; Leonard and Maes 2012; Catena-Dell'Osso et al. 2013). Indoleamine dioxygenase is not only induced by pro-inflammatory cytokines but also PGE₂ (Iachininoto et al. 2013; Maes et al. 2011; Yuan et al. 1998).

Inflammatory cytokines are known to induce reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) production, contributing to oxidative/nitrosative damage and neural injury (Dantzer 2001; Abdel-Wahab and Salama 2011). The involvement of oxidative stress and role of antioxidant defenses in the pathogenesis of major depression have also gained prominence in depression research. Evidence indicates that oxidative stress markers, such as ROS production (Eren et al. 2007; Sarandol et al. 2007) and the levels of malondialdehyde (a product of lipid peroxidation; Bilici et al. 2001; Khanzode et al. 2003; Galecki et al. 2009; Sarandol et al. 2007; Kotan et al. 2011), are increased in the plasma of patients with major depression. Furthermore, disturbances in the activity of the antioxidant enzyme superoxide dismutase (SOD) are generally found in the plasma of depressed patients (Rybka et al. 2013; Herken et al. 2007; Stefanescu and Ciobica 2012).

The chronic mild stress (CMS) protocol typically models depression by producing inflammatory and oxidative responses in rodents (Kubera et al. 1996; Maes et al. 2010; Yager et al. 2010; Schaalan and Nassar 2011; Wang et al. 2012). Additionally, the CMS model produces an inflammatory response that can be reversed by antidepressant treatment (Kubera et al. 1996). Several studies have been shown that antidepressant treatment reverses these responses in several brain regions. Eren et al. (2007) demonstrated the beneficial effects of lamotrigine, aripiprazole, and escitalopram on non-enzymatic antioxidant systems in CMS-induced depression, including the upregulation of glutathione and vitamin C levels and a decrease in lipid peroxidation levels in the cortex. Abelaira et al. (2012) showed that tianeptine treatment reversed the decrease in SOD activity in the prefrontal cortex, hippocampus, amygdala, and nucleus accumbens in CMS-induced depression in rats. In parallel, chronic treatment with the selective cyclooxygenase (COX)-2 inhibitor celecoxib has been reported to reverse chronic unpredictable stress-induced depressive-like behavior in rats by reducing COX-2 expression in the brain and subsequently the concentration of PGE₂ (Guo et al. 2009). Altogether, this evidence indicates that

depression and CMS increase neuroinflammation and oxidative stress, and antidepressant drugs also exert anti-inflammatory and antioxidant effects (Abdel-Salam et al. 2003).

To our knowledge, three clinical studies have reported significant improvements in depressive symptoms following adjunctive treatment with celecoxib. In one study, MDD patients ($n = 40$) who were non-responders to fluoxetine (40 mg/day) were randomly assigned to groups that received celecoxib (200 mg twice daily) or placebo under double-blind conditions for 6 weeks. The combination treatment was associated with significant improvement in depressive symptoms (Akhondzadeh et al. 2009). The second study reported similar findings in a 6-week, randomized, double-blind, placebo-controlled study that evaluated the efficacy of adjunctive celecoxib (400 mg/day) and reboxetine (flexible-dose range, 4–10 mg/day) in MDD patients ($n = 40$; Muller et al. 2006). In the third study, a randomized, double-blind, placebo-controlled study ($n = 40$ patients with MDD) found that treatment with celecoxib (200 mg twice daily) and sertraline (200 mg/day) for 6 weeks reduced the concentration of IL-6, supporting the hypothesis that celecoxib is safe and effective as an antidepressant adjuvant (Abbasi et al. 2012).

Celecoxib and piroxicam strongly inhibit COX-2 and are well-known nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and analgesics. They are indicated for the acute or long-term treatment of inflammation associated with musculoskeletal and joint disorders, such as osteoarthritis (Starek and Krzek 2009). Considering the potential roles of COX-2 in the central nervous system and its possible involvement in the pathogenesis of depression and other psychiatric disorders (Yermakova and O'Banion 2000) and that inflammatory responses are known to be accompanied by the induction of oxidative stress pathways, the aim of the present study was to provide a more detailed assessment of the antidepressant effect of different NSAIDs, including celecoxib and piroxicam, in rat models of depression. We assessed whether celecoxib and piroxicam differentially improve depressive-like behavior and investigated the neurobiological bases of hippocampal monoamine levels and oxidative stress parameters in rats.

Materials and methods

Animals

One hundred and eighteen male Wistar rats, 3 months old and weighing 280–320 g, were used. All of the rats were allowed 1 week to acclimate to the environment before beginning any experimentation.

In the acute experimental condition, 32 animals were randomly housed in groups of five. They were maintained in

a temperature-controlled room (22 ± 2 °C) on a 12 h/12 h light/dark cycle (lights on at 7:00 a.m.) with free access to water and food throughout the experiment. In the prolonged experimental condition, the stressed groups (86 animals) were divided into two animals per cage, isolated by an aluminum central wall that prevented contact between them. These animals were subjected to the CMS protocol. This procedure was adopted to promote depressive-like behavior in these animals (see below). The non-stressed groups remained undisturbed. The animals were randomly housed in groups of five and maintained in a temperature-controlled room (22 ± 2 °C) on a 12 h/12 h light/dark cycle (lights on at 7:00 a.m.) with free access to water and food throughout the experiment. All of the animals were housed in polypropylene cages ($41 \times 32 \times 16.5$ cm) with wood shavings as bedding.

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 experimental protocols complied with the recommendations of the Federal University of Paraná and were approved by the University Ethics Committee (protocol no. 470).

Drugs

Celecoxib (10 mg/kg; Pfizer, São Paulo, Brazil), piroxicam (10 mg/kg; EMS, São Paulo, Brazil), and imipramine (20 mg/kg; positive control; Uci-farma, São Paulo, Brazil) were dissolved in 0.9 % saline (vehicle). The vehicle of each drug was administered in the respective control rats. All of the drugs were administered orally by gavage in a constant volume of 1.0 ml/kg.

Acute experiment

The 32 rats were randomly distributed into four groups ($n = 8$ per group): 10 mg/kg celecoxib, 10 mg/kg piroxicam, 0.9 % saline, and 20 mg/kg imipramine. Three administrations of the drugs were performed, 1, 5, and 24 h (Slattery and Cryan 2012) before testing the animals in the open field, followed by the modified forced swim test (FST).

Prolonged experiment

In this experiment, the 86 rats were randomly distributed into eight groups: stressed + 0.9 % saline ($n = 9$), stressed + 20 mg/kg imipramine ($n = 15$), stressed + 10 mg/kg celecoxib ($n = 11$), stressed + 10 mg/kg piroxicam ($n = 11$), non-stressed + 0.9 % saline ($n = 10$), non-stressed + 20 mg/kg imipramine ($n = 10$), non-stressed + 10 mg/kg celecoxib ($n = 10$), and non-stressed + 10 mg/kg piroxicam ($n = 10$). The stressed groups were subjected to CMS throughout the experiment, and the non-stressed groups remained undisturbed. After 3-week (21-day) exposure to

CMS, the drug treatments began and continued for 21 days (i.e., from day 21 to day 42). The sucrose preference test was performed on days 0 (baseline), 7, 14, 21, 22, 28, 35, and 42 of the experiment. The animals in the non-stressed group were individually allocated to polypropylene cages before the sucrose test preference and housed again in groups at the end of the test. This procedure was performed once per week (for 2 weeks) before the start of the experiments for the habituation of animals.

Chronic mild stress

The CMS model was developed to mimic the development and progression of clinical depression. The CMS model mimics anhedonia, one of the main symptoms of major depression (Willner et al. 1992). In this model of depression, the rats are sequentially exposed over a period of several weeks to a variety of mild stressors, and the measure used to track depressive-like symptoms is a decrease in the consumption of sucrose.

The rats were initially divided into two groups: stressed and non-stressed. The stressed groups were exposed to a stress regimen for 6 weeks (42 days), consisting of weekly unpredictable mild stressors that were presented in pseudorandom order, including food and water deprivation, overnight cage tilt, overnight soiled cage, and continuous overnight illumination (Table 1). The pseudorandom sequence of the stressors was used to prevent the rats from habituating to repeated mild stress. The non-stressed group remained undisturbed, with the exception of the handling necessary for animal care (e.g., cleaning cages), weighing, tail marking, and drug administration.

Open field test

The apparatus consisted of a round black arena (170 cm diameter, 40 cm height). Animal movements were monitored and recorded using an automatic system (HVS System, Buckingham, UK). The animals were gently placed in the southwest position of the open field and allowed to freely explore the area for 5 min. Two motor parameters were recorded throughout the test: distance (i.e., the distance in meters that the animal traveled during the test) and speed traveled (i.e., the speed of locomotion during the test). The open field arena was washed with a 5 % water-ethanol solution before behavioral testing to eliminate possible bias caused by odors left by previous rats.

Modified forced swim test

The procedure was a modification of the method proposed by Porsolt et al. (1978) and Renner et al. (2002). The test was conducted in two sessions. In the training session, the

Table 1 Stressor schedule

	Food deprivation	Water deprivation	Still light	Cage tilt	Cage wet	Still dark	Soiled cage
AM	10:00					10:00	
Monday	↑						
PM	↓						
AM	10:00		10:00				
Tuesday			↑				
PM			↓				
AM		10:00	10:00				
Wednesday		↑					
PM		↓					
AM		10:00			10:00		
Thursday					↑		
PM					↓		
AM					10:00		10:00
Friday							↑
PM							↓
AM				2:00			2:00
Saturday				↓			
PM							
AM				10:00		10:00	
Sunday						↑	
PM							

The sucrose preference test was performed from 2:00 p.m. Friday to 2:00 p.m. Saturday

rats were placed in a tank (20 × 20 × 40 cm) that contained water at a temperature of 24 ± 1 °C and depth of 15 cm for 15 min. Twenty-four hours after the training session, the rats were subjected to the FST for 5 min, which was videotaped for the subsequent quantification of the following parameters: immobility (i.e., the absence of motion of the entire body and only small movements necessary to keep the animal's head above the water), climbing (i.e., vigorous movements of the forepaws in and out of the water, usually directed against the wall of the tank), and swimming (i.e., large forepaw movements that displaced water and moved the body around the cylinder and were more than necessary to keep the head above the water). The water was replaced after each animal to avoid the influence of urinary or fecal material and temperature.

Sucrose preference test

Sucrose preference is frequently used as a measure of anhedonia in rodents (Papp et al. 1991; Wang et al. 2009). Initially, each rat was provided two bottles of water on the extreme sides of the cage during the 24 h training phase to allow the rats to drink from two bottles. After training, the

contents of one bottle were randomly switched to contain a 0.5 % sucrose solution. The bottles were weighed before being presented to the rats and after 24 h. The sum of water consumption and sucrose consumption was defined as total intake. The percentage of sucrose intake was calculated using the following equation: % sucrose preference = sucrose intake × 100/total intake. All of the tests were conducted weekly (i.e., every Friday).

Determination of norepinephrine, serotonin, and metabolite concentrations

The hippocampi were rapidly dissected 1 h after the FST and stored at −80 °C until the neurochemical analysis. The endogenous concentrations of norepinephrine, serotonin, and 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) were assayed using reverse-phase high-performance liquid chromatography with electrochemical detection (HPLC-ED; Santiago et al. 2010). The system consisted of a Synergi Fusion-RP C-18 reverse-phase column (150 × 4.6 mm inner diameter, 4 μm particle size; Phenomenex, Torrance, CA, USA) fitted with a 4 × 3.0 mm pre-column (Security Guard Cartridges Fusion-RP, Phenomenex, Torrance, CA, USA),

dual-coulometric electrochemical detector (Coulchem III, ESA, Chelmsford, MA, USA), and LC-20AT pump (Shimadzu, Kyoto, Japan). This detector consisted of two cells that were successively connected and contained a porous graphite working electrode together with associated reference and counter electrodes. The detector was equipped with a guard cell (ESA 5020) electrode set at +350 mV and working electrodes (5011A analytical cell, ESA) set at $E_1 = +100$ mV and $E_2 = +450$ mV vs. a solid-state palladium reference electrode. The column was maintained inside a temperature-controlled oven (25 °C). The tissue samples were homogenized with an ultrasonic cell disrupter (Sonics, Newtown, CT, USA) in 0.1 M perchloric acid that contained 0.02 % sodium metabisulfite and an internal standard. After centrifugation at $10,000\times g$ for 30 min at 4 °C, 20 μ l of the supernatant was injected into the chromatograph. The mobile phase (flow rate, 1 ml/min) had the following composition: 20 g of monohydrated citric acid (Merck, Germany), 200 mg octane-1-sulfonic acid sodium salt (Merck, Germany), 40 mg ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA; Sigma, St. Louis, MO, USA), 900 ml HPLC-grade water, and 100 ml methanol (J.T. Baker, USA). The pH of the running buffer solution was adjusted to 4.0, and the buffer solution was then filtered through a 0.45 m filter. The neurotransmitter and metabolite concentrations were calculated using standard curves that were generated by determining the ratios between three different known amounts of the internal standard in triplicate. The units are expressed as nanograms per gram of tissue.

Determination of reduced glutathione content

The levels of reduced glutathione (GSH) in the hippocampus were determined according to Sedlak and Lindsay (1968). Aliquots of tissue homogenate were mixed with 12.5 % trichloroacetic acid, vortexed for 10 min, and centrifuged for 15 min at $900\times g$. The supernatant was reserved, and TRIS buffer (0.4 M, pH 8.9) and 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid; DTNB; 0.01 M) was added. Absorbance was read at 415 nm using a spectrophotometer with a microplate reader. The procedures were performed at 4 °C, and the individual values were interpolated into a standard curve of GSH and are expressed as micrograms of GSH per gram of tissue (Ariza et al. 2010).

Determination of enzymatic activity of superoxide dismutase

Superoxide dismutase activity was determined according to Marklund and Marklund (1974) and Gao et al. (1998). The measurements were based on the ability of SOD to inhibit pyrogallol autoxidation. Pyrogallol (1 mM) was added to the buffer solution (200 mM Tris HCl-EDTA, pH 8.5) and

supernatant aliquots, and the mixture was vortexed for 1 min. The reaction was incubated for 20 min at room temperature, stopped with the addition of 1 N HCl, and centrifuged for 4 min at $18,700\times g$. The absorbance of the resulting supernatant was read at 405 nm using a spectrophotometer. The amount of SOD that inhibited the oxidation of pyrogallol by 50 % (relative to control) was defined as a unit of SOD activity.

Determination of lipid hydroperoxide

The homogenate was diluted in 90 % methanol (100 μ l of homogenate + 400 μ l of 90 % methanol), adjusted to pH 6.5, sonicated, and centrifuged at $9,000\times g$ for 15 min at 4 °C. Lipid hydroperoxide (LOOH) activity was determined using the Ferrous Oxidation-Xylenol Orange (FOX) method as described by Jiang et al. (1992). The FOX method is based on the oxidation of Fe^{2+} (ammonium ferrous sulfate) in Fe^{3+} by hydroperoxide in acid medium in the presence of a pigment complex of Fe(III) xylenol orange. The sample (30 μ l) was incubated for 30 min at room temperature with 270 μ l of a reaction mixture that contained 1 ml xylenol orange, 250 μ M $FeSO_4$, 25 mM H_2SO_4 , and 4 mM butylated hydroxytoluene in 90 % methanol. The readings were taken at 560 nm in a spectrophotometer. The results are expressed as millimoles of hydroperoxide per milligram of tissue.

Statistical analysis

The Kolmogorov–Smirnov test was initially employed to ensure that the data satisfied the criteria for performing analysis of variance (ANOVA). The open field test, FST, and neurochemical data were analyzed using one-way ANOVA followed by the Newman–Keuls post hoc test. The CMS and sucrose preference test data were analyzed using two-way ANOVA followed by the Bonferroni post hoc test. The significance level was set at $p < 0.05$.

Results

Effects of acute treatment with celecoxib and piroxicam on behavior

Neither the acute treatment with the anti-inflammatory drugs (Fig. 1a, b) nor treatment with imipramine (i.e., positive control) significantly affected speed ($F_{3,31} = 1.281$, $p = 0.3002$) or distance traveled ($F_{3,31} = 1.295$, $p = 0.2955$) in the open field test compared with the saline group.

Celecoxib ($p < 0.001$), piroxicam ($p < 0.001$), and imipramine ($p < 0.05$) significantly increased swimming

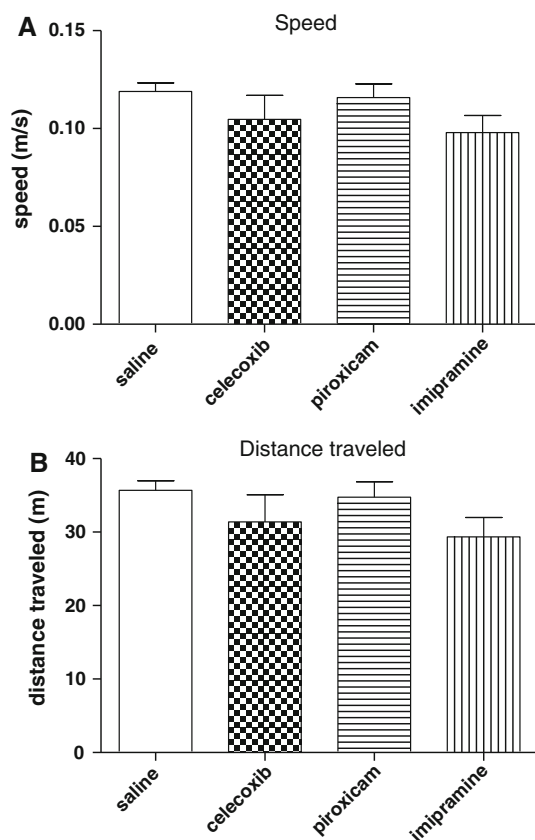


Fig. 1 Effects of 10 mg/kg celecoxib, 10 mg/kg piroxicam, and 20 mg/kg imipramine on motor activity in the open field 1 h after acute treatment. **a** Speed of locomotion and **b** distance traveled during 5 min. The data are expressed as mean \pm SEM ($n = 8$ /group; one-way ANOVA followed by Newman–Keuls post hoc test)

compared with the saline group ($F_{3,31} = 16.15$, $p < 0.0001$; Fig. 2a). Celecoxib ($p < 0.05$), piroxicam ($p < 0.01$), and imipramine ($p < 0.05$) significantly decreased immobility compared with the saline group ($F_{3,31} = 16.49$, $p < 0.0001$; Fig. 2b). The anti-inflammatory drugs did not significantly affect climbing, but imipramine ($p < 0.01$) increased climbing compared with the control group ($F_{3,31} = 8.925$, $p = 0.0003$; Fig. 2c).

Effects of prolonged treatment with celecoxib and piroxicam on behavior

Figure 3 shows the effects of CMS in the sucrose preference test. The two-way ANOVA indicated significant effects of treatment ($F_{7,619} = 26.67$, $p < 0.001$) and weeks ($F_{7,619} = 3.74$, $p < 0.001$) and a significant treatment \times weeks interaction ($F_{49,619} = 7.19$, $p = 0.0219$). We also found a significant difference in sucrose preference between groups on day 7 ($F_{7,85} = 4.739$, $p = 0.0002$), day 14 ($F_{7,85} = 4.430$, $p = 0.0003$), and day 21 ($F_{7,85} = 11.77$, $p < 0.0001$). Prior to anti-inflammatory

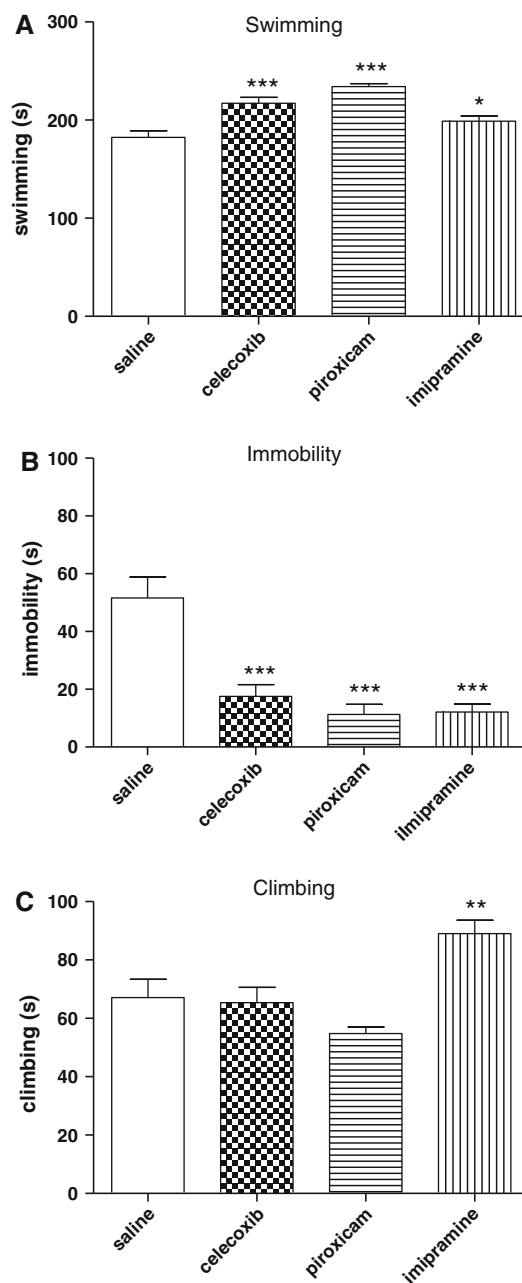
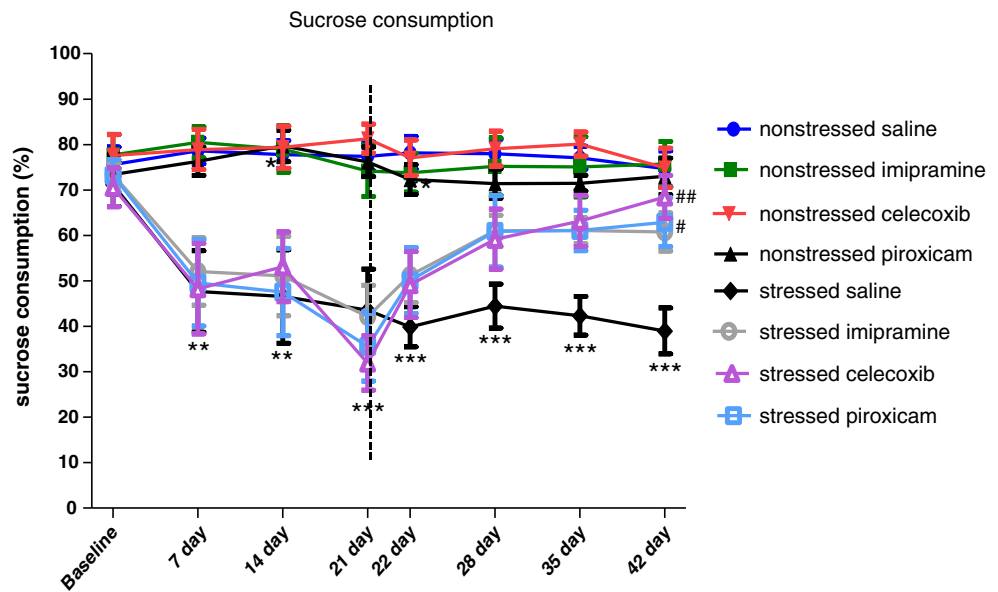


Fig. 2 Modified forced swim test 1 h after acute treatment with 10 mg/kg celecoxib, 10 mg/kg piroxicam, and 20 mg/kg imipramine in rats. **a** Swimming time. **b** Immobility time. **c** Climbing. The data are expressed as mean \pm SEM ($n = 8$ /group). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, compared with saline group (one-way ANOVA followed by Newman–Keuls post hoc test)

treatment onset (day 21), a significant reduction of sucrose preference (i.e., “anhedonia”) was observed in all of the stressed groups compared with their respective non-stressed groups on the same day ($p < 0.01$). Such an effect was sustained until the animals were acutely treated with celecoxib, piroxicam, and imipramine ($p < 0.01$) until day 42 compared with saline-treated rats ($p < 0.05$). On day

Fig. 3 Anhedonia-like behavior induced by chronic mild stress in the saline, 10 mg/kg celecoxib, 10 mg/kg imipramine groups. The vertical dotted line indicates the start of acute and long-term treatment with the drugs. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, compared with non-stressed saline group; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, compared with stressed saline group (two-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test). The data are expressed as mean \pm SEM ($n = 9$ –15/group)



42, the stressed groups treated with celecoxib and piroxicam exhibited no differences from the respective non-stressed groups but differed significantly from the stressed saline group ($p < 0.05$).

Determination of monoamine levels after acute treatment with celecoxib and piroxicam

The analysis of serotonin levels in the hippocampus revealed that acute piroxicam treatment ($p < 0.05$) significantly increased serotonin levels compared with the control group ($F_{3,19} = 8.356$, $p = 0.0014$; Fig. 4a). The celecoxib ($p < 0.05$) and piroxicam ($p < 0.05$) groups exhibited significant differences in 5-HIAA levels compared with the saline group ($F_{3,19} = 5.640$, $p = 0.0078$; Fig. 4b). Hippocampal norepinephrine content increased in the piroxicam group ($p < 0.01$) compared with the saline group ($F_{3,19} = 8.467$, $p = 0.0013$; Fig. 4c).

Determination of oxidative stress parameters after prolonged treatment with celecoxib and piroxicam

The stressed saline group had reduced hippocampal GSH levels compared with the non-stressed saline group ($p < 0.01$). In contrast, the stressed celecoxib ($p < 0.05$) and stressed piroxicam ($p < 0.001$) groups but not stressed imipramine group exhibited an increase in GSH levels compared with the stressed saline group ($F_{7,86} = 6.134$, $p < 0.0001$; Fig. 5).

Figure 6 shows that the stressed saline group had increased SOD hippocampal activity compared with the non-stressed saline group ($p < 0.05$). Unexpectedly, the non-stressed celecoxib ($p < 0.01$) and non-stressed

imipramine ($p < 0.001$) groups exhibited an increase in hippocampal SOD activity compared with the non-stressed saline group ($F_{7,51} = 5.927$, $p < 0.0001$).

Figure 7 shows that after CSM protocol, only the stressed saline group exhibited an increased in LOOH levels compared with the non-stressed saline group ($p < 0.05$). However, the non-stressed imipramine group had increased LOOH hippocampal levels compared with the non-stressed saline group ($F_{7,47} = 9.885$, $p < 0.0001$).

Discussion

In the present study, we observed an antidepressant effect of the anti-inflammatory agents celecoxib and piroxicam. Such acute effects were observed in the behavioral tests. Piroxicam increased norepinephrine and serotonin levels in the hippocampus. In the CMS model, prolonged treatment with both anti-inflammatory drugs restored sucrose preference to control levels and restored the levels of oxidative stress promoted by CMS.

The FST was developed as a screening test for drugs with potential antidepressant activity (Porsolt et al. 1978). In the present study, we used a modification of the FST and assessed climbing, swimming, and immobility. The main achievement of this model in Porsolt's view is that it allows correlations between behaviors analyzed and different neurotransmitter systems (e.g., swimming and the serotonergic system, climbing and the noradrenergic system; Detke et al. 1995; Lucki 1997; Cryan and Lucki 2002). In the present study, imipramine increased both swimming and climbing behaviors, effects that are consistent with its serotonergic and noradrenergic activity, respectively

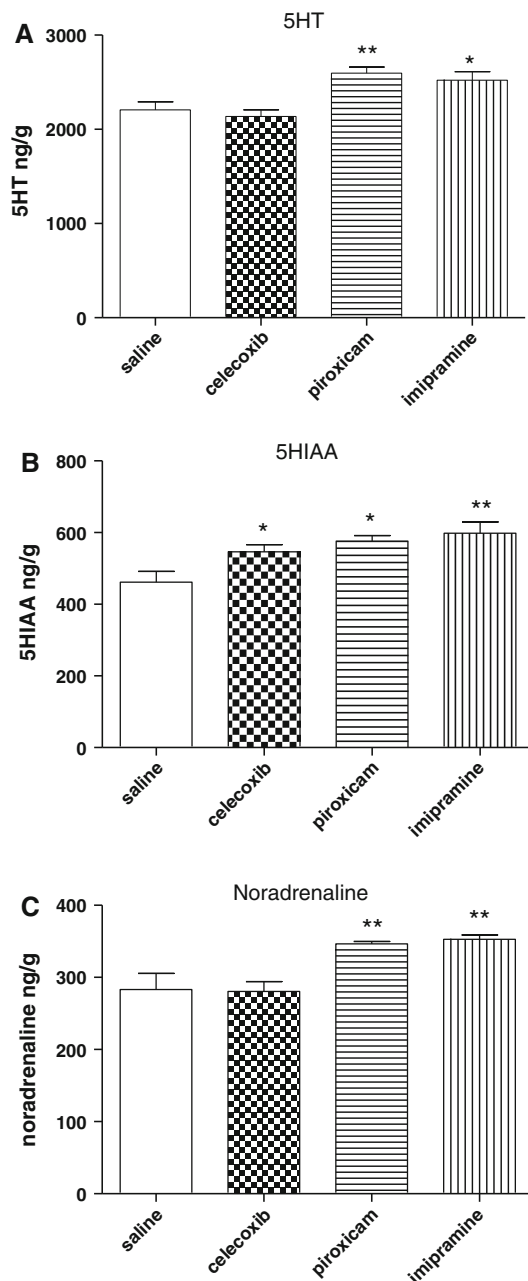


Fig. 4 Hippocampal serotonin and norepinephrine levels after acute treatment with 10 mg/kg celecoxib, 10 mg/kg piroxicam, and 20 mg/kg imipramine. **a** Serotonin levels. **b** 5-HIAA levels. **c** Norepinephrine levels. The data are expressed as mean \pm SEM ($n = 5$ /group). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, compared with saline group (one-way ANOVA followed by Newman–Keuls post hoc test)

(Detke et al. 1995; Cryan and Lucki 2002; Consoni et al. 2006). Acute piroxicam and celecoxib treatment decreased immobility time and increased swimming time without significantly changing spontaneous locomotor activity, which may be related to serotonergic activity. Unexpectedly, acute piroxicam treatment increased norepinephrine levels but not climbing behavior. Additionally, acute piroxicam treatment also increased serotonin levels in the

hippocampus, and celecoxib did not alter the levels of hippocampal serotonin. In fact, monoamine deficiency is important in the pathophysiology of depression (Huether et al. 1997; Pandey et al. 1992), increased monoamine metabolism may result in increased ROS generation in depression (Fridovich 1983). However, it is not the only hypothesis. Maes et al. (1990, 1991) suggested that depression is an inflammatory disorder. Based on experimental and clinical findings, they described the cytokine hypothesis as a cause of depression (Maes 1993, 1995, 1999, 2002; Schiepers et al. 2005). Thus, we believe that the antidepressant effect of celecoxib is related to its ability to reduce IL-6 levels or inhibit PGE2 as described by other authors (Abbasi et al. 2012; El-Ghazaly et al. 2010; Hinson et al. 1996).

The sucrose preference test was used to evaluate anhedonia (i.e., a core symptom of depression; Papp et al. 1991; Wang et al. 2009). Anhedonia has been widely operationalized as a decrease in the consumption of and preference for palatable sweet solutions (e.g., sucrose solution), indicating decreased responsiveness to rewarding stimuli as a consequence of the sequential exposure to a variety of mild stressors (Willner et al. 1987, 1992; Papp et al. 1991; Moreau et al. 1995; Henningsen et al. 2009). In the present study, prolonged treatment with the anti-inflammatory drugs piroxicam and celecoxib reversed the reduction of sucrose preference, which was similar to the imipramine group. These anti-inflammatory drugs were able to reverse the “anhedonic” state induced by CMS in rats. Considering that this model has good face validity, construct validity, and predictive validity (Larsen et al. 2010; Kumar et al. 2011), the present results suggest an important antidepressant effect of piroxicam and celecoxib.

Prolonged treatment with the anti-inflammatory drugs restored oxidative stress parameters to levels that were similar to controls. The cellular antioxidant defense mechanism against ROS includes enzymatic and non-enzymatic defenses. Reduced glutathione is an endogenous non-enzymatic antioxidant molecule that is oxidized to glutathione disulfide (GSSG) by ROS (Bellanti et al. 2013). For this reason, the level of hippocampal GSH is reduced in stressed rats. Chronic treatment with piroxicam and celecoxib normalized GSH levels in the hippocampus in stressed rats, indicating that antioxidant mechanisms are involved in the antidepressant-like effect of these drugs. Superoxide dismutase is an important enzymatic antioxidant defense that converges the superoxide anion radical (O_2^-) to hydrogen peroxide (H_2O_2) by catalyzing its dismutation (Fridovich 1983). In the present study, SOD activity was increased in the hippocampus in stressed rats treated with saline. These results may be related to a compensatory mechanism associated with increases in oxidative stress, reflected by decreased GSH content and

Fig. 5 Hippocampal glutathione levels after prolonged (21 day) treatment with 10 mg/kg celecoxib, 10 mg/kg piroxicam, and 20 mg/kg imipramine. The data are expressed as mean \pm SEM ($n = 9-12$ /group). * $p < 0.05$, compared with non-stressed saline group; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.01$, compared with stressed saline group (one-way ANOVA followed by Newman-Keuls post hoc test)

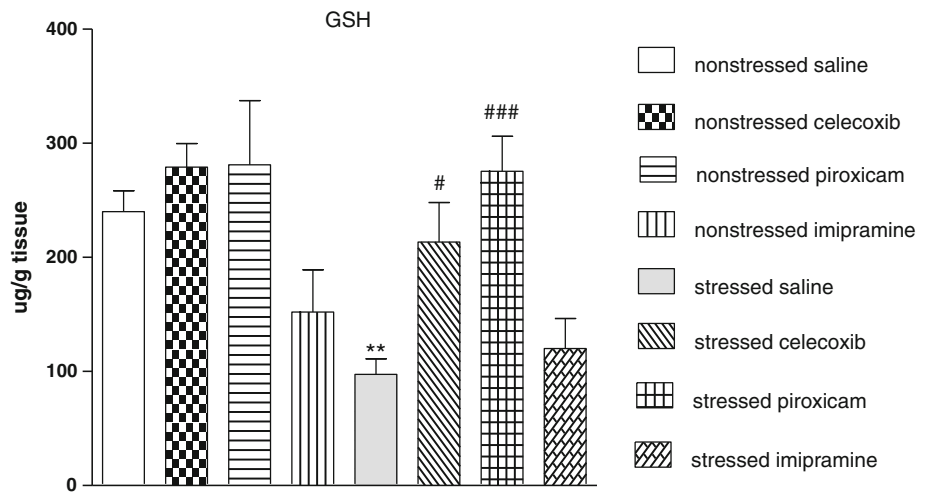


Fig. 6 Hippocampal SOD protein levels after prolonged (21-day) treatment with 10 mg/kg celecoxib, 10 mg/kg piroxicam, and 20 mg/kg imipramine. The data are expressed as mean \pm SEM ($n = 6-7$ /group). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, compared with non-stressed saline group (one-way ANOVA followed by Newman-Keuls post hoc test)

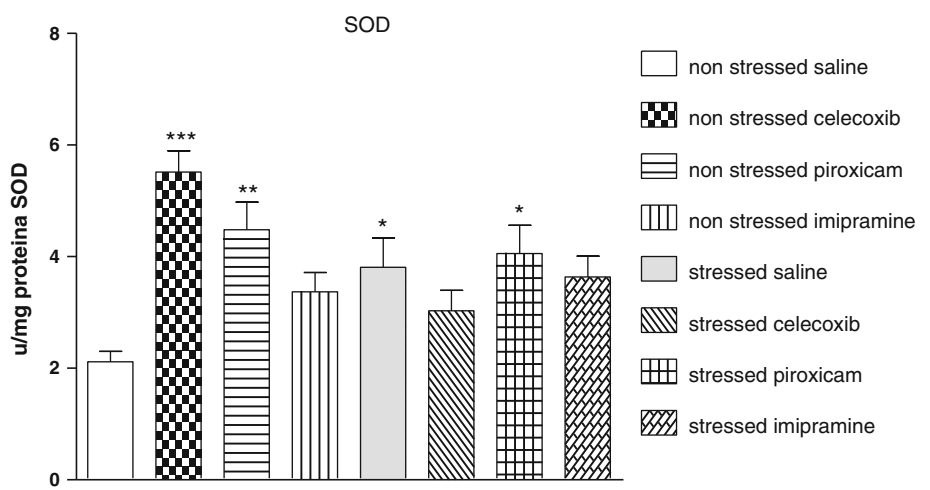
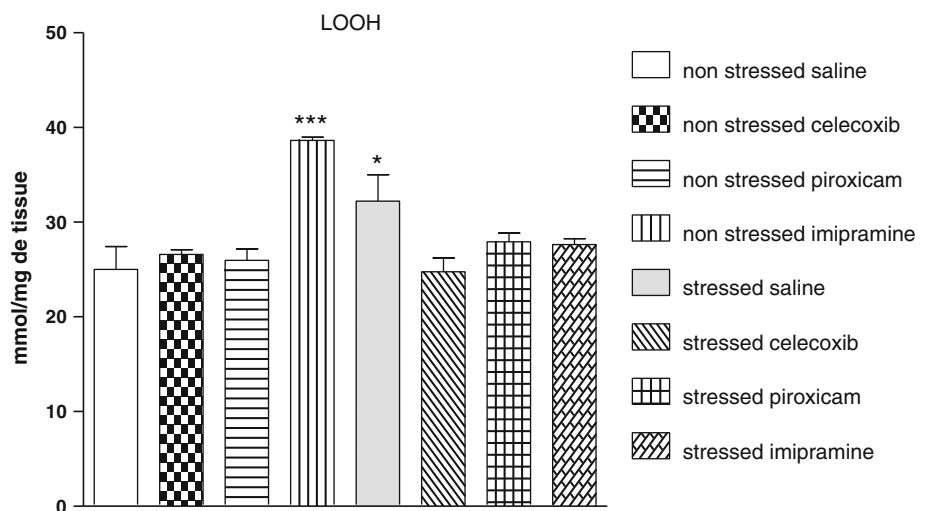


Fig. 7 Hippocampal LOOH levels after prolonged (21-day) treatment with 10 mg/kg celecoxib, 10 mg/kg piroxicam, and 20 mg/kg imipramine. The data are expressed as mean \pm SEM ($n = 5-7$ /group). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, compared with non-stressed saline group (one-way ANOVA followed by Newman-Keuls post hoc test)



increased LOOH levels. Interestingly, we found that SOD activity increased in the hippocampus in non-stressed animals that were chronically treated with celecoxib or piroxicam and stressed animals that were chronically treated

with piroxicam compared with the non-stressed saline group. These findings indicate a possible increase in enzymatic antioxidant defenses, consistent with the neuroprotective potential of these drugs. Moreover, treatment

with piroxicam and celecoxib, similar to imipramine, counteracted the stress-induced increase in lipid peroxidation in the hippocampus. However, prolonged imipramine treatment increased lipid peroxidation in the hippocampus in non-stressed rats, despite its beneficial effect in stressed rats. Recently, Abdel-Salam et al. (2013) performed an experimental encephalopathy study and also observed an increase in the brain levels of lipid peroxidation in animals chronically treated with imipramine. Therefore, the inhibition of serotonin reuptake and subsequent increase of serotonin concentrations in the synaptic cleft in non-stressed animal may promote lipid peroxidation reactions. However, this hypothesis needs further investigation. Notably, an increase in the levels of lipoperoxides in the hippocampus in rats treated with imipramine was not detected by De Morais et al. (2013).

The role of inflammation in the pathophysiology of depression has become increasingly recognized in the literature and described as the inflammatory or cytokine hypothesis of depression (Li et al. 2011). Increased oxidative damage induced by stress may increase the incidence of neuronal and DNA damage (Abdel-Wahab and Salama 2011). The combined dysregulation of lipid metabolism and antioxidant defenses as an integral component of stress and depression was recently reported (Yager et al. 2010). Significant correlations were found between the severity of depression and erythrocyte SOD and malondialdehyde levels. Additionally, a significant correlation was found between the length of the index episode and duration of the illness. These findings suggest that the increased severity of depression increases antioxidant enzyme levels. As the illness becomes chronic, vulnerability to ROS (Bilici et al. 2001) and antioxidant mechanisms may contribute to the clinical effects of anti-inflammatory drugs on depression (Khanzode et al. 2003). Additionally, neuronal COX-2 expression has been correlated with apoptosis and shown to be involved in the neuronal response to stress (McCoy et al. 2006).

Altogether, our results indicate that the anti-inflammatory drugs piroxicam and celecoxib have antidepressant effects in both the FST and CMS model. The present findings suggest that the antidepressant-like effects of celecoxib and piroxicam might be attributable to enhanced antioxidant defenses and attenuated oxidative stress in the hippocampus. Further studies are needed to further elucidate the mechanisms of the antidepressant-like effects of celecoxib and piroxicam.

Conclusions

In conclusion, the present data provide evidence that the anti-inflammatory drugs piroxicam and celecoxib exert

antidepressant-like effects with acute and prolonged treatment, suggesting antioxidant properties in which antioxidant defenses are enhanced and oxidative stress is attenuated.

Acknowledgments This work was supported by grants from CNPq CAPES and the Araucária Foundation, which had no further role in the study design, collection, analysis, and interpretation of data, writing the report, or decision to submit the manuscript for publication. CC, RA, and MABFV are recipients of CNPq fellowships.

References

- Abbasi SH, Hosseini F, Modabbernia A, Ashrafi M, Akhondzadeh S (2012) Effect of celecoxib add-on treatment on symptoms and serum IL-6 concentrations in patients with major depressive disorder: randomized double-blind placebo-controlled study. *J Affect Disord* 141(2–3):308–314
- Abdel-Salam OME, Nofal SM, El-Shenawy SM (2003) Evaluation of the anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of different antidepressants in the rat. *Pharmacol Res* 48:157–165
- Abdel-Salam OM, Mohammed NA, Sleem AA, Farrag AR (2013) The effect of antidepressant drugs on thioacetamide-induced oxidative stress. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 17:735–744
- Abdel-Wahab BA, Salama RH (2011) Venlafaxine protects against stress-induced oxidative DNA damage in hippocampus during antidepressant testing in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 100:59–65
- Abelaira HM, Réus GZ, Ribeiro KF, Zappellini G, Cipriano AL, Scaini G, Streck EL, Quevedo J (2012) Lamotrigine treatment reverses depressive-like behavior and alters BDNF levels in the brains of maternally deprived adult rats. *Pharmacol Biochem Behav* 101:348–353
- Akhondzadeh S, Jafari S, Raisi F, Nasehi AA, Ghoreishi A, Salehi B, Mohebbi-Rasa S, Raznahan M, Kamalipour A (2009) Clinical trial of adjunctive celecoxib treatment in patients with major depression: a double blind and placebo controlled trial. *Depress Anxiety* 26:607–611
- Ariza D, Lima MM, Moreira CG, Dombrowski PA, Avila TV, Allemand A, Mendes DA, Da Cunha C, Vital MA (2010) Intranasal LPS administration produces dopamine, glutathione but not behavioral impairment in comparison to MPTP and 6-OHDA neurotoxin models of Parkinson's disease. *Neurochem Res* 35:1620–1627
- Bellanti F, Matteo M, Rollo T, De Rosario F, Greco P, Vendemiale G, Serviddio G (2013) Sex hormones modulate circulating antioxidant enzymes: impact of estrogen therapy. *Redox Biol* 1:340–346
- Bilici M, Efe H, Koroglu MA, Uydu HA, Bekaroglu M, Deger O (2001) Antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in major depression: alterations by antidepressant treatments. *J Affect Disord* 64:43–51
- Calabrese JR, Skwerer RG, Barna B, Gullledge AD, Valenzuela R, Butkus A, Subichin S, Krupp NE (1986) Depression, immunocompetence, and prostaglandins of the E series. *Psychiatry Res* 17:41–47
- Catena-Dell'Osso M, Bellantuono C, Consoli G, Baroni S, Rotella F, Marazziti D (2011) Inflammatory and neurodegenerative pathways in depression: a new avenue for antidepressant development? *Curr Med Chem* 18:245–255
- Catena-Dell'Osso M, Rotella F, Dell'Osso A, Fagiolini A, Marazziti D (2013) Inflammation, serotonin and major depression. *Curr Drug Targets* 14(5):571–577

- Consoni FT, Vital MABF, Andreatini R (2006) Dual monoamine modulation for the antidepressant-like effect of lamotrigine in the modified forced swimming test. *Eur Neuropsychopharmacol* 16:451–458
- Cryan JF, Lucki I (2002) Antidepressant-like behavioral effects mediated by 5-hydroxytryptamine_{2C} receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 295:1120–1126
- Dantzer R (2001) Cytokine-induced sickness behavior: where do we stand? *Brain Behav Immun* 15:7–24
- De Moraes H, de Souza CP, da Silva LM, Ferreira DM, Werner MF, Andreatini R, da Cunha JM, Zanoveli JM (2013) Increased oxidative stress in prefrontal cortex and hippocampus is related to depressive-like behavior in streptozotocin-diabetic rats. *Behav Brain Res* 258:52–64
- Detke MJ, Rickels M, Lucki I (1995) Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. *Psychopharmacology* 121:66–72
- El-Ghazaly MA, Nada AS, El-Hazek RM, Khayyal MT (2010) Effect of selective COX-2 inhibitor, celecoxib on adjuvant-induced arthritis model in irradiated rats. *Int J Radiat Biol* 86:1079–1087
- Eren I, Naziroglu M, Demirdas A (2007) Protective effects of lamotrigine, aripiprazole and escitalopram on depression-induced oxidative stress in rat brain. *Neurochem Res* 15:1188–1195
- Fridovich I (1983) Superoxide radical: an endogenous toxicant. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 23:239–257
- Gałecki P, Szemraj J, Biełkiewicz M, Florkowski A, Gałecka E (2009) Lipid peroxidation and antioxidant protection in patients during acute depressive episodes and in remission after fluoxetine treatment. *Pharmacol Rep* 61:436–447
- Gao J, Yin DH, Yao Y, Sun H, Qin Z, Schoneich C, Williams TD, Squier TC (1998) Loss of conformational stability in calmodulin upon methionine oxidation. *Biophys J* 74:1115–1134
- Guo JY, Li CY, Ruan YP, Sun M, Qi XL, Zhao BS, Luo F (2009) Chronic treatment with celecoxib reverses chronic unpredictable stress-induced depressive-like behavior via reducing cyclooxygenase-2 expression in rat brain. *Eur J Pharmacol* 612:54–60
- Hannestad J, Dellagioia N, Bloch M (2011) The effect of antidepressant medication treatment on serum levels of inflammatory cytokines: a meta-analysis. *Neuropsychopharmacology* 36:2452–2459
- Henningsen K, Andreasen JT, Bouzinova EV, Jayatissa MN, Jensen MS, Redrobe JP, Wiborg O (2009) Cognitive deficits in the rat chronic mild stress model for depression: relation to anhedonia-like responses. *Behav Brain Res* 198:136–141
- Herken H, Gurel A, Selek S, Armutcu F, Ozen ME, Bulut M, Kap O, Yumru M, Savas HA, Akyol O (2007) Adenosine deaminase, nitric oxide, superoxide dismutase, and xanthine oxidase in patients with major depression: impact of antidepressant treatment. *Arch Med Res* 38:247–252
- Hinson RM, Williams JA, Shacter E (1996) Elevated interleukin 6 is induced by prostaglandin E2 in a murine model of inflammation: possible role of cyclooxygenase-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:4885–4890
- Huether G, Fettkotter I, Keilhoff G, Wolf G (1997) Serotonin acts as a free radical scavenger and is oxidized to a dimer during the respiratory burst of activated microglia. *J Neurochem* 69:2096–2101
- Iachininoto MG, Nuzzolo ER, Bonanno G, Mariotti A, Procoli A, Locatelli F, De Cristofaro R, Rutella S (2013) Cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibition constrains indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) activity in acute myeloid leukaemia cells. *Molecules* 18:10132–10145
- Jiang ZY, Hunt JV, Wolff SP (1992) Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Anal Biochem* 202:384–389
- Khanzode SD, Dakhale GN, Khanzode SS, Saoji A, Palasodkar R (2003) Oxidative damage and major depression: the potential antioxidant action of selective serotonin re-uptake inhibitors. *Redox Rep* 8:365–370
- Kotan VO, Sarandol E, Kirhan E, Ozkaya G, Kirli S (2011) Effects of long-term antidepressant treatment on oxidative status in major depressive disorder: a 24-week follow-up study. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 35:1284–1290
- Kubera M, Symbirtsev A, Basta-Kaim A, Borycz J, Roman A, Papp M, Claesson M (1996) Effect of chronic treatment with imipramine on interleukin-1 and interleukin-2 production by splenocytes obtained from rats subjected to a chronic mild stress model of depression. *Pol J Pharmacol* 48:503–506
- Kumar B, Kuhad A, Chopra K (2011) Neuropsychopharmacological effect of sesamol in unpredictable chronic mild stress model of depression: behavioral and biochemical evidences. *Psychopharmacology* 214:819–828
- Larsen MH, Mikkelsen JD, Hay-Schmidt A, Sandi C (2010) Regulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the chronic unpredictable stress rat model and the effects of chronic antidepressant treatment. *J Psychiatry Res* 44:808–816
- Leonard B, Maes M (2012) Mechanistic explanations how cell-mediated immune activation, inflammation and oxidative and nitrosative stress pathways and their sequels and concomitants play a role in the pathophysiology of unipolar depression. *Neurosci Biobehav Rev* 36(2):764–785
- Li M, Soczynska JK, Kennedy SH (2011) Inflammatory biomarkers in depression: an opportunity for novel therapeutic interventions. *Curr Psychiatry Rep* 13:316–320
- Lucki I (1997) The forced swimming test as a model for core and component behavioral effects of antidepressant drugs. *Behav Pharmacol* 8:523–532
- Maes M (1993) A review on the acute phase response in major depression. *Rev Neurosci* 4(4):407–416
- Maes M (1995) Evidence for an immune response in major depression: a review and hypothesis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 19(1):11–38
- Maes M (1999) Major depression and activation of the inflammatory response system. *Adv Exp Med Biol* 461:25–46
- Maes M (2002) Introduction to the special section. *Int J Neuropsychopharmacol* 5(4):329–331
- Maes M, Bosmans E, Suy E, Vandervorst C, De Jonckheere C, Raus J (1990) Immune disturbances during major depression: upregulated expression of interleukin-2 receptors. *Neuropsychobiology* 24(3):115–120
- Maes M, Bosmans E, Suy E, Vandervorst C, DeJonckheere C, Raus J (1991) Depression-related disturbances in mitogen-induced lymphocyte responses and interleukin-1 beta and soluble interleukin-2 receptor production. *Acta Psychiatr Scand* 84(4):379–386
- Maes M, Mihaylova I, Kubera M, Uytterhoeven M, Vrydags N, Bosmans E (2010) Increased plasma peroxides and serum oxidized low density lipoprotein antibodies in major depression: markers that further explain the higher incidence of neurodegeneration and coronary artery disease. *J Affect Disord* 125:287–294
- Maes M, Leonard BE, Myint AM, Kubera M, Verkerk R (2011) The new “5-HT” hypothesis of depression: cell-mediated immune activation induces indoleamine 2,3-dioxygenase, which leads to lower plasma tryptophan and an increased synthesis of detrimental tryptophan catabolites (TRYCATs), both of which contribute to the onset of depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 35(3):702–721
- Marklund S, Marklund G (1974) Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem* 47:469–474

- McCoy MK, Martinez TN, Ruhn KA, Szymkowski DE, Smith CG, Botterman BR, Tansey KE, Tansey MG (2006) Blocking soluble tumor necrosis factor signaling with dominant-negative tumor necrosis factor inhibitor attenuates loss of dopaminergic neurons in models of Parkinson's disease. *J Neurosci* 37:9365–9375
- Moir AT, Eccleston D (1968) The effects of precursor loading in the cerebral metabolism of 5-hydroxyindoles. *J Neurochem* 15(10):1093–1108
- Moreau JL, Scherschlicht R, Jenck F, Martin JR (1995) Chronic mild stress-induced anhedonia model of depression: sleep abnormalities and curative effects of electroshock treatment. *Behav Pharmacol* 6:682–687
- Muller N, Schwarz MJ, Dehning S, Douhe A, Cerovecki A, Goldstein-Muller B, Spellmann I, Hetzel G, Maino K, Kleindienst N, Muller HJ, Arolt V, Riedel M (2006) The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib has therapeutic effects in major depression: results of a double-blind, randomized, placebo controlled, add-on pilot study to reboxetine. *Mol Psychiatry* 11:680–684
- Müller N, Myint AM, Schwarz MJ (2009) The impact of neuroimmune dysregulation on neuroprotection and neurotoxicity in psychiatric disorders: relation to drug treatment. *Dialogues Clin Neurosci* 11:319–332
- Pandey GN, Sharma RP, Janicak PG, Davis JM (1992) Monoamine oxidase and cortisol response in depression and schizophrenia. *J Psychiatr Res* 44:1–8
- Papp M, Willner P, Muscat R (1991) An animal model of anhedonia: attenuation of sucrose consumption and place preference conditioning by chronic unpredictable mild stress. *Psychopharmacology* 104:255–259
- Porstolt RD, Anton G, Blavet N, Jalfre M (1978) Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur J Pharmacol* 47:379–391
- Raison CL, Miller AH (2011) Is depression an inflammatory disorder? *Curr Psychiatry Rep* 13:467–475
- Renner JP, Bouvard M, Stinus L (2002) In the rat forced swimming test, chronic but not subacute administration of dual 5-HT/NA antidepressant treatments may produce greater effects than selective drugs. *Behav Brain Res* 136:521–532
- Rybka J, Kędziora-Kornatowska K, Banaś-Leżańska P, Majsterek I, Carvalho LA, Cattaneo A, Anacker C, Kędziora J (2013) Interplay between the pro-oxidant and antioxidant systems and proinflammatory cytokine levels, in relation to iron metabolism and the erythron in depression. *Free Radic Biol* 63:187–194
- Santiago RM, Barbiero J, Lima MM, Dombrowski PA, Andreatini R, Vital MA (2010) 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. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 34:1104–1114
- Sarandol A, Sarandol E, Eker SS, Erdinc S, Vatansever E, Kirli S (2007) Major depressive disorder is accompanied with oxidative stress: short-term antidepressant treatment does not alter oxidative-antioxidative systems. *Hum Psychopharmacol* 22:67–73
- Schaalan MF, Nassar NN (2011) Effects of octreotide in chronically mild stressed rats: possible role of immune and oxidative stress pathways. *Neurochem Res* 36:1717–1723
- Schiepers OJ, Wichers MC, Maes M (2005) Cytokines and major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 29(2):201–217
- Sedlak J, Lindsay RH (1968) Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem* 25:192–205
- Slattery DA, Cryan JF (2012) Using the rat forced swim test to assess antidepressant-like activity in rodents. *Nat Protoc* 7(6):1009–1014
- Starek M, Krzek J (2009) A review of analytical techniques for determination of oxicams, nimesulide and nabumetone. *Talanta* 77:925–942
- Stefanescu C, Ciobica A (2012) The relevance of oxidative stress status in first episode and recurrent depression. *J Affect Disord* 143:34–38
- Wang SH, Zhang ZJ, Guo YJ, Zhou H, Teng GJ, Chen BA (2009) Anhedonia and activity deficits in rats: impact of post-stroke depression. *J Psychopharmacol* 23:295–304
- Wang Y, Cui XL, Liu YF, Gao F, Wei D, Li XW, Wang HN, Tan QR, Jiang W (2011) LPS inhibits the effects of fluoxetine on depression-like behavior and hippocampal neurogenesis in rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 35:1831–1835
- Wang C, Wu HM, Jing XR, Meng Q, Liu B, Zhang H, Gao GD (2012) Oxidative parameters in the rat brain of chronic mild stress model for depression: relation to anhedonia-like responses. *J Membr Biol* 245:675–681
- Willner P, Towell A, Sampson D, Sophokleous S, Muscat R (1987) Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. *Psychopharmacology* 93:358–364
- Willner P, Muscat R, Papp M (1992) Chronic mild stress-induced anhedonia: a realistic animal model of depression. *Neurosci Biobehav Rev* 16:525–534
- Yager S, Forlenza MJ, Muller GE (2010) Depression and oxidative damage to lipids. *Psychoneuroendocrinology* 35:1356–1362
- Yermakova A, O'Banion MK (2000) Cyclooxygenases in the central nervous system: implications for treatment of neurological disorders. *Curr Pharm Des* 6:1755–1776
- Yuan W, Collado-Hidalgo A, Yufit T, Taylor M, Varga J (1998) Modulation of cellular tryptophan metabolism in human fibroblasts by transforming growth factor-beta: selective inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophanyl-tRNA synthetase gene expression. *J Cell Physiol* 177(1):174–186