

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANA PAULA FARIAS WALTRICK

ESTUDO DO PAPEL DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEIXE SOBRE AS RESPOSTAS DO TIPO DEPRESSIVAS INDUZIDAS PELO LPS (Lipopolissacarídeo de *E. coli*) EM RATOS TRATADOS COM O INIBIDOR DA ENZIMA INDOLAMINA 2,3-DIOXIGENASE (IDO), 1-METIL-TRIPTOFANO (1-MT).

CURITIBA

2015

ANA PAULA FARIAS WALTRICK

ESTUDO DO PAPEL DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEIXE SOBRE AS RESPOSTAS DO TIPO DEPRESSIVAS INDUZIDAS PELO LPS (Lipopolissacarídeo de *E. coli*) EM RATOS TRATADOS COM O INIBIDOR DA ENZIMA INDOLAMINA 2,3-DIOXIGENASE (IDO), 1-METIL-TRIPTOFANO (1-MT).

Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas como requisito para a conclusão do Curso de Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a Dr^a Anete Curte Ferraz

CURITIBA

2015

Aos meus pais e irmãos, que nem por um segundo deixaram de acreditar.

AGRADECIMENTO

Esta monografia simboliza o fim de um ciclo. É o fim de uma graduação por mim muito sonhada e eu, finalmente, serei bióloga. As primeiras pessoas que me vêm à cabeça quando penso em agradecer, com certeza são meus pais. Sem sombra de dúvidas eu devo a eles tudo o que sou hoje, tudo o que almejo para o meu futuro e tudo o que conquistei até agora. Mãe e pai, muito obrigada por todo o apoio, por todos os puxões de orelha, por todas as vezes em que vocês entenderam e compartilharam comigo pequenas vitórias que, hoje, me fazem uma pessoa melhor, mais forte e, definitivamente, eternamente grata a vocês.

Agradeço aos meus irmãos pelo companheirismo e pela amizade, por entenderem todas as minhas fases difíceis e por comemorarem comigo cada obstáculo vencido.

Ao namorado, Felipe, agradeço pelo amor imenso de sempre, mas principalmente pela paciência que teve comigo cada vez que precisei me ausentar, ainda mais nos últimos dias em que passei as noites em claro terminando este trabalho. Te amo muito, e muito obrigada por tudo. Sempre.

Agradeço aos amigos e colegas por todos os anos que passamos juntos. Os amigos de graduação, os amigos da vida. Todos são importantes além de conta e muito provavelmente esquecerei alguém se eu tentar citá-los, mas estão todos no meu coração.

Um agradecimento mais que especial à professora Anete que me acolheu em seu laboratório, apostou várias chances em mim e meu deu (e continua dando) oportunidades incríveis. Muito obrigada por fazer de mim uma aluna e uma pessoa melhor, pela amizade e pelo carinho de sempre. Eu não poderia ter escolhido melhor orientadora.

Agradeço também ao Bruno Carabelli por tudo. Sem ele este trabalho não seria possível. Muito obrigada por tudo o que me ensinou e continua ensinando, pela amizade e por ter tanta paciência com a estagiária novata. Sou muito grata a você por ter me deixado fazer parte dos seus projetos.

Por fim, agradeço a todos que me ajudaram a tornar esse sonho na tão esperada, e agora tão mais próxima, realidade. **MUITO OBRIGADA!**

Aninha e suas pedras

(Outubro, 1981)

Não te deixes destruir...

Ajuntando novas pedras e construindo novos poemas.

Recria tua vida, sempre, sempre.

Remove pedras e planta roseiras e faz doces.

Recomeça.

Faz de tua vida mesquinha um poema.

E viverás no coração dos jovens e na memória das gerações que hão de vir.

Esta fonte é para uso de todos os sedentos.

Toma a tua parte.

Vem a estas páginas e não entres seu uso aos que têm sede.

Cora Coralina

RESUMO

A depressão é o distúrbio de humor mais comum entre os descritos, afetando parcelas muito significativas da população mundial. Tendo um tratamento com fortes efeitos colaterais e apresentando risco de suicídio ainda nas primeiras semanas deste, justifica-se a importância e necessidade de pesquisas acerca do assunto. A etiologia completa da depressão ainda é desconhecida, mas, já se sabe que além de deficiências nos sistemas modulatórios monoaminérgicos, a hipótese inflamatória da depressão representada por aumento de citocinas pró-inflamatórias e ativação da imunidade celular assume importância no desencadeamento da doença. Este aspecto inflamatório deve ser levado em conta quando há a procura por novos compostos que tenham como objetivo tratar a doença. Estudos são feitos para encontrar compostos que possam potencializar o efeito antidepressivo de fármacos já existentes e, além disso, diminuir e amenizar efeitos colaterais destes fármacos. O óleo de peixe (OP), que tem em sua composição ácidos graxos poli-insaturados da família ômega-3, tem sido muito estudado devido ao seu efeito antidepressivo e anti-inflamatório. Trabalhos prévios do nosso laboratório associam a ação antidepressiva deste óleo ao sistema serotoninérgico. Como na vigência do processo inflamatório ocorre um desvio da via de formação de serotonina, nosso objetivo foi estudar se o efeito antidepressivo do óleo de peixe se dá por diminuição da inflamação e, conseqüentemente aumento de serotonina. Para isto, foram utilizados 60 ratos Wistar com 60 dias de idade, que receberam óleo de peixe ou água através de gavagem durante dois meses. Após isto os animais foram submetidos a um modelo de depressão de LPS (Lipopolissacarídeo de *E. coli*) via injeção intraperitoneal e a um pré-tratamento com 1-MT (1-metil-triptofano), inibidor da enzima Indolamina 2,3-dioxigenase (IDO). Os animais passaram por testes comportamentais de campo aberto e de natação forçada modificado, para avaliar os comportamentos de ansiedade, motricidade e tipo-depressivo, respectivamente. Após os testes, os animais foram ortotanasiados e tiveram estruturas retiradas para estudos neuroquímicos posteriores de HPLC e Western Blot. Conclui-se que o óleo de peixe foi eficaz em reverter o comportamento tipo-depressivo induzido pelo modelo de LPS e, embora o 1-MT, sozinho, não tenha tido efeito algum, quando associado ao OP ocorreu a reversão deste comportamento. Com os resultados parciais de Western Blot não observamos diferenças significativas ainda, mas nossa expectativa é de que os níveis de IDO estejam aumentados devido ao LPS e que o óleo de peixe tenha diminuído a inflamação de forma geral, diminuindo a expressão da IDO.

Palavras-chave: óleo de peixe; depressão; inflamação; indolamina 2,3-dioxigenase; 1-metil-triptofano.

ABSTRACT

Depression is the most common humor disorder amongst the described, affecting a significant portion of the world population. Having a treatment with severe side effects and presenting risk of suicide even in the first weeks, thus justifies the importance and need for research on the subject. Full etiology of depression is still unknown, but it is known that in addition to deficiencies in modulating monoaminergic systems, the inflammatory hypothesis of depression represented by an increase in pro-inflammatory cytokines and cellular immunity activation becomes important in triggering the disease. This inflammatory aspect should be taken into account when there is a search for new compounds that has as objective treatment of the disease. Studies are made to find compounds which can potentiate the antidepressant effect of existing drugs and, in addition, reduce and minimize side effects of these drugs. The fish oil (FO), which has in its composition polyunsaturated fatty acids of the omega-3 family, has been extensively studied due to their antidepressant and anti-inflammatory effect. Previous studies from our laboratory associates the antidepressant action of this oil to the serotonergic system. As in the duration of the inflammatory process occurs a deviation from the route of serotonin formation, our aim was to study if the antidepressant effect of fish oil takes place by decrease of inflammation and therefore increase of serotonin. For this, 60 Wistar rats with 60 days of age were used, which received the fish oil or water through gavage for two months. After that the animals were subjected to an LPS model of depression (lipopolysaccharide of *E. Coli*) by intraperitoneal injection and to a pretreatment with 1-MT (1-methyl-tryptophan), and inhibitor of the indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) enzyme. The animals underwent an open field behavioral and modified forced swimming testing, to evaluate anxiety, motor and type-depressant behaviors, respectively. After the tests, the animals were decapitated and had structures removed for subsequent analysis of HPLC and Western Blot. It is concluded that the fish oil was effective in reversing the type-depressive behavior induced by LPS model and, although the 1-MT by itself did not have any effect, when it was associated with the FO a reversal of this behavior took place. With the partial results of Western Blot we did not observe significant differences yet, but we expect that IDO levels are increased due to LPS that fish oil has decreased inflammation in general, decreasing the expression of IDO.

Keywords: fish oil; depression; inflammation; indoleamine 2,3-dioxygenase; 1-methyl-tryptophan.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Síntese do triptofano desviada pela enzima IDO para a via das quinureninas.....	19
Figura 2 – Linha temporal do experimento.....	22
Figura 3 – Grupos experimentais.....	23
Figura 4 – Teste do Campo Aberto.....	28
Figura 5 – Teste da Natação Forçada Modificado.....	30
Figura 6 – Expressão da IDO hipocampal.....	31

LISTA DE ABREVIATURAS E/OU SIGLAS

1-MT – 1-metil-triptofano

5HIAA – ácido 5-hidroxiindolacético

5-HT – 5-hidróxitriptamina (serotonina)

5-HT_{1A} – receptor 1A de 5-hidróxitriptamina (serotonina)

AGPIs ω -3 – ácidos graxos poli-insaturados da família ômega 3

ANOVA – análise de variância

BDNF – fator neurotrófico derivado do encéfalo

CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais

DHA – ácido docosohexanoico

DSM V – Manual de Diagnóstico e Estatística dos Transtornos Mentais 5ª ed.

EPA – ácido eicosapentanoico

IDO – indolamina 2,3-dioxigenase

IFN- γ – interferon γ

IL-1 β – interleucina 1 β

IL-6 – interleucina 6

IMAOs – inibidores da monoamina oxidase

ISRN – inibidores seletivos de receptação de noradrenalina

ISRS – inibidores seletivos de receptação de serotonina

LPS – lipopolissacarídeo de *E. coli*

NA – noradrenalina (norepinefrina)

OP – óleo de peixe

SAL – salina

sIL-2R – receptor solúvel para interleucina 2

TNF- α – fator de necrose tumoral α

TRI – triptofano

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 OBJETIVO GERAL.....	14
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 DEPRESSÃO.....	16
2.2 TEORIA INFLAMATÓRIA DA DEPRESSÃO.....	18
2.3 ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS DA FAMÍLIA ÔMEGA-3.....	20
3 MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	22
3.2 TESTES COMPORTAMENTAIS.....	24
3.3 ORTOTANÁSIA.....	25
3.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	26
4 RESULTADOS	27
4.1 TESTE DO CAMPO ABERTO.....	27
4.2 TESTE DA NATAÇÃO FORÇADA MODIFICADO.....	28
4.3 RESULTADOS PARCIAIS DE WESTERN BLOT.....	30
5 DISCUSSÃO	32
6 CONCLUSÕES	36
REFERÊNCIAS	37

1 INTRODUÇÃO

A depressão é uma patologia que se enquadra entre os Transtornos de Humor e que, de acordo com a Organização Mundial de Saúde, será em breve uma das principais causas de incapacitação no mundo. Visto isso, entende-se a importância de estudar a fundo a depressão e substâncias que sejam eficazes e facilitem seu tratamento. De acordo com o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-V, 5ª edição de 2013) existem vários sintomas e critérios para que um paciente seja diagnosticado com depressão, como o estado deprimido e/ou anedonia por pelo menos duas semanas, seguido de pelo menos cinco dos sintomas a seguir: sentimento de culpa, insônia ou hipersonia, dificuldade de concentração, fadiga, agitação ou retardo psicomotor, perda ou ganho de peso, ideias de morte e/ou suicídio com ou sem tentativas de suicídio. O quadro clínico da depressão é muito grave e deve ser tratado e combatido rapidamente.

Para chegar a compostos que possam combater a depressão é necessário saber primeiramente as causas da doença, que até hoje ainda não são completamente conhecidas. Estudos mostram que a depressão é uma doença multifatorial de etiologia complexa e que, até 50% do risco de se desenvolver a patologia é genético (Nestler et al., 2002). A teoria mais aceita atualmente para explicar as causas da depressão é a Teoria Monoaminérgica, na qual o organismo apresenta deficiências nos sistemas modulatórios serotoninérgico e/ou noradrenérgico, e como consequência inicia-se o processo depressivo. A Teoria Monoaminérgica surgiu a partir de fármacos que continham efeitos já conhecidos sobre a transmissão monoaminérgica e seus efeitos sobre pacientes que sofriam de depressão. Além disso, estudos mostraram que pacientes com depressão apresentaram baixos níveis de serotonina e noradrenalina no sangue, líquido e urina, apontando assim para deficiências nas aminas biogênicas desses indivíduos (Nestler et al. 2002). Para corroborar a Teoria Monoaminérgica podemos citar também a eficiência de fármacos ligados aos sistemas modulatórios em relação à depressão, como os IMAOS (inibidores da enzima monoaminoxidase), os inibidores seletivos de receptação de serotonina (ISRS) e/ou noradrenalina (ISRN) e os antidepressivos tricíclicos. Também existem evidências de que pacientes com tendências suicidas apresentam baixos níveis do metabólito da serotonina, 5-HIAA

(ácido 5-hidroxiindolacético), demonstrando a ligação do neurotransmissor com a patologia (Savitz & Drevets, 2009).

Uma nova teoria que relaciona a diminuição de serotonina, ativação da imunidade celular, aumento de citocinas pró-inflamatórias e aumento de morte celular, foi formulada: a Teoria Inflamatória da Depressão (Smith, 1991). Em seguida, o caráter inflamatório da doença e a diminuição de serotonina foram também relacionados com a diminuição de BDNF, demonstrando um caráter inflamatório tanto central quanto periférico (Kubera et al., 2011; Maes et al., 2011). Alguns estudos apontam que a disfunção serotoninérgica observada na depressão é consequência da ativação da imunidade celular, pois a disponibilidade de L-triptofano (TRI, precursor da serotonina) é baixa e isso caracteriza um marcador de ativação imunológico da patologia (Maes, 1995). Esses baixos níveis de TRI e de serotonina são consequência da ativação da enzima indolamina 2,3-dioxigenase (IDO) que, quando em níveis aumentados, desvia a via do triptofano aumentando a via das quinureninas e diminuindo a síntese de serotonina. A via das quinureninas, por sua vez, produz catabólitos como o ácido quinurênico e o ácido xanturênico, compostos citotóxicos que levam à morte celular, agravando ainda mais o quadro inflamatório do organismo (Dantzer et al., 2008; Maes et al., 2011).

Um estudo feito em 2009 mostrou que a administração periférica de LPS (Lipopolissacarídeo de *E. coli*) em camundongos ativou a enzima IDO induzindo os animais a um comportamento tipo-depressivo e diminuiu o nível de serotonina nos cérebros desses animais. No mesmo estudo mostrou-se que quando aplicado um anti-inflamatório (bloqueio indireto) ou antagonista da IDO (bloqueio direto) nesse modelo de LPS, o comportamento tipo-depressivo era revertido nos camundongos (O'Connor et al., 2009).

É largamente sabida a eficácia de antidepressivos como inibidores seletivos de receptação de serotonina e, muitos estudos também demonstram efeitos antiinflamatórios dos ISRS (Mårtensson & Nässberger, 1993; Xia, DePierre, & Nässberger, 1996). Sabe-se também de evidências do efeito antidepressivo de outros compostos que estão sendo mais estudados atualmente como o óleo de peixe, cuja composição é de ácidos graxos poli-insaturados da família ômega-3 (AGPIs ω -3). O óleo de peixe tem sua eficácia antidepressiva demonstrada por estudos do nosso laboratório (Ferraz et al., 2008; Vines et al., 2012), nos quais

foram feitas suplementações de óleo de peixe em várias fases do desenvolvimento do sistema nervoso central de ratos e foi verificado o efeito antidepressivo em testes comportamentais de natação forçada e natação forçada modificado. Um estudo recente também do nosso laboratório (Carabelli et al., 2014) demonstrou esses mesmos efeitos antidepressivos da suplementação de óleo de peixe em ratos nas fases de gestação e lactação após testes de natação forçada modificados, além de níveis aumentados de serotonina no hipocampo.

Os AGPIs ω -3 modificam a fluidez das membranas celulares através da modulação de estruturas proteicas, essa fluidez possivelmente aumentaria a sensibilidade de receptores de serotonina, facilitando a ligação do neurotransmissor aos seus receptores. A serotonina por sua vez, quando ligada aos receptores, estimularia a neurogênese no hipocampo (Beltz & Sandeman, 2003) juntamente com o BDNF, que também teria seus níveis aumentados devido à suplementação com o óleo de peixe (Jing et al., 2010; Luchtman et al., 2012).

Todas essas evidências nos levaram a investigar se o efeito antidepressivo do óleo de peixe estaria ligado com o efeito anti-inflamatório do composto, levando em conta o forte componente inflamatório da depressão. O modelo de depressão utilizado foi o modelo inflamatório de LPS (Lipopolissacarídeo de *E. coli*) via intraperitoneal em ratos machos *Wistar* de 60 dias de idade, suplementados com óleo de peixe através de gavagem durante 60 dias e submetidos a testes comportamentais sob efeito de um inibidor da enzima IDO, o 1-metil-triptofano (1-MT).

1.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do trabalho foi verificar o efeito antidepressivo e anti-inflamatório da suplementação com óleo de peixe e a participação da enzima IDO e seu antagonista 1-MT em ratos *Wistar* em um modelo de depressão inflamatório de LPS.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Com relação aos objetivos específicos visamos:

- Verificar possíveis alterações de motricidade ou comportamentos de ansiedade nos animais que pudessem gerar alterações nos resultados posteriores dos testes de natação forçada modificados;
- Avaliar a ação do óleo de peixe e do inibidor daIDO, 1-MT, no modelo de LPS;
- Avaliar uma possível interação entre os dois tratamentos através do teste de natação forçada modificado.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 DEPRESSÃO

A depressão maior é uma doença psiquiátrica que se encaixa entre os Transtornos de Humor, sendo o distúrbio mais recorrente entre eles. Também chamada somente de depressão, é duas vezes mais comum em mulheres do que em homens e tem uma alta prevalência durante a vida do indivíduo. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, até 2020 a depressão será a segunda maior causa de incapacitação em todo o mundo, perdendo apenas para doenças cardiovasculares (P.-Y. Lin, Huang, & Su, 2010).

O diagnóstico da depressão é feito a partir de uma série de critérios sintomáticos estabelecidos pelo Manual Diagnóstico e Estatístico dos Transtornos Mentais, hoje em sua 5ª edição de 2013. De acordo com o Manual, a depressão maior é caracterizada por um ou mais episódios depressivos com pelo menos duas semanas de humor deprimido e/ou anedonia (perda de prazer e interesse em atividades anteriormente interessantes ao indivíduo), isso acompanhado de pelo menos mais cinco sintomas adicionais por também duas semanas. Entre os sintomas encontram-se o sentimento de desesperança, culpa, desamparo, alterações de apetite (perda ou ganho de peso), insônia ou hipersonia, retardo ou agitação psicomotora, fadiga, pensamentos sobre morte, com tentativas ou não de suicídio (American Psychiatric Association, 2013).

Com uma sintomatologia longa, complexa e que pode levar à morte, é importante que sejam feitos estudos a fim de entender melhor a depressão para que se possa chegar a compostos que possam combater e prevenir a doença. A etiologia da depressão é complexa e multifatorial, e ainda existem lacunas nas hipóteses que tentam explicá-la: nenhuma tem total abrangência e consistência. Estudos epidemiológicos mostraram que até 50% do risco de se desenvolver depressão é genético, fazendo dela uma doença fortemente herdável. Existe uma grande dificuldade em encontrar os genes que podem ser responsáveis pela doença, e isso se dá, pois, sendo uma doença multifatorial, é possível que muito

mais que um gene esteja envolvido no processo (Nestler et al., 2002). Além disso, fatores não genéticos também podem fazer parte da etiologia da depressão, como traumas emocionais e estresse, por exemplo.

Em termos moleculares, existem algumas teorias que tentam explicar as causas da depressão, e entre elas a mais amplamente aceita atualmente é a Teoria Monoaminérgica da Depressão. Esta teoria diz que uma disfunção nos sistemas modulatórios monoaminérgicos pode desencadear a depressão e pode ser a causa principal da doença (Morilak & Frazer, 2004). A teoria é fundamentada por exames bioquímicos feitos em sangue, urina e líquido de pacientes depressivos, visto que os resultados desses exames apresentavam baixos níveis de noradrenalina (NA) e serotonina (5-HT). Os baixos níveis desses neurotransmissores demonstram a relação entre o distúrbio nos sistemas modulatórios monoaminérgicos e a depressão. Existe ainda outro fator que contribui para a corroboração da teoria: o tratamento com inibidores da enzima monoaminoxidase (IMAOs), que diminuem o metabolismo das monoaminas causado pela enzima, é muito eficaz em casos de depressão. Outros fármacos utilizados como antidepressivos como os inibidores seletivos de receptação de serotonina ou noradrenalina e os antidepressivos tricíclicos também são eficazes em tratamentos contra a depressão, afirmando ainda mais a relação das monoaminas com a doença (Nestler et al., 2002).

Outra possível explicação existente para a etiologia da depressão é a Hipótese das Neurotrofinas, que relaciona a diminuição do BDNF (fator neurotrófico derivado do cérebro) à patogênese da doença. Estudos observaram uma deficiência de BDNF em pacientes com depressão que, por consequência, leva a uma diminuição do volume hipocampal desses indivíduos. O tratamento com antidepressivos mostra a normalização dos níveis de BDNF no sangue de pacientes que teriam demonstrados baixos níveis do fator anteriormente, aumentando assim as evidências de ligação da deficiência de BDNF com a depressão (Boldrini et al., 2009).

Atualmente, evidências demonstraram que a diminuição de serotonina e a morte celular na região hipocampal estão intimamente ligadas a inflamação central e periférica, em que há também a ativação da imunidade celular através da ativação

de monócitos e linfócitos T (Maes et al., 1995). Assim surge uma nova teoria para explicar a etiologia da depressão: a Teoria Inflamatória da Depressão, que mostra o aumento de citocinas pró-inflamatórias e a ativação da imunidade celular como peças chaves para o desencadeamento da doença (Dowlati et al., 2010).

2.2 TEORIA INFLAMATÓRIA DA DEPRESSÃO

A Teoria Inflamatória da Depressão consiste no aumento de citocinas pró-inflamatórias e ativação da imunidade celular, causando uma inflamação de caráter tanto central como periférico. Além disso, a consequência do aumento de citocinas é uma diminuição serotoninérgica no organismo. Há a ativação de monócitos, aumento de interleucinas como a IL-1 β e a IL-6 e fator de necrose tumoral α (TNF- α). A ativação da imunidade celular também ocorre através dos linfócitos T citotóxicos helper, demonstrada pelo aumento nos níveis séricos do receptor solúvel para interleucina 2 (sIL-2R) e na produção de Interferon- γ (IFN γ) e inter-relações significativas entre a fase aguda da resposta inflamatória e a ativação da imunidade celular (Maes et al., 2011; Maes et al., 2012; Michael Maes, 1995).

Estudos apontam a disfunção serotoninérgica que ocorre na depressão como uma consequência da ativação da imunidade celular. A ativação imunológica celular da depressão tem como marcador uma baixa quantidade disponível de L-triptofano (TRP, o aminoácido precursor da serotonina) (Maes et al., 2011; Maes et al., 2012). Isso significa que os baixos níveis do precursor e, conseqüentemente, da serotonina, são induzidos pela enzima indolamina 2,3-dioxigenase (IDO). Quando ocorre um quadro de inflamação crônica, os níveis basais de IDO aumentam muito, e essa quantidade aumentada de IDO estimula o catabolismo de triptofano, desviando a síntese de serotonina para a via das quinureninas, e gerando catabólitos como os ácidos quinurênico e xanturênico (catabólitos citotóxicos que aumentam a morte celular), diminuindo assim os níveis de serotonina (5-HT) (Dantzer et al., 2011; Dantzer et al., 2008; Maes et al., 2011).

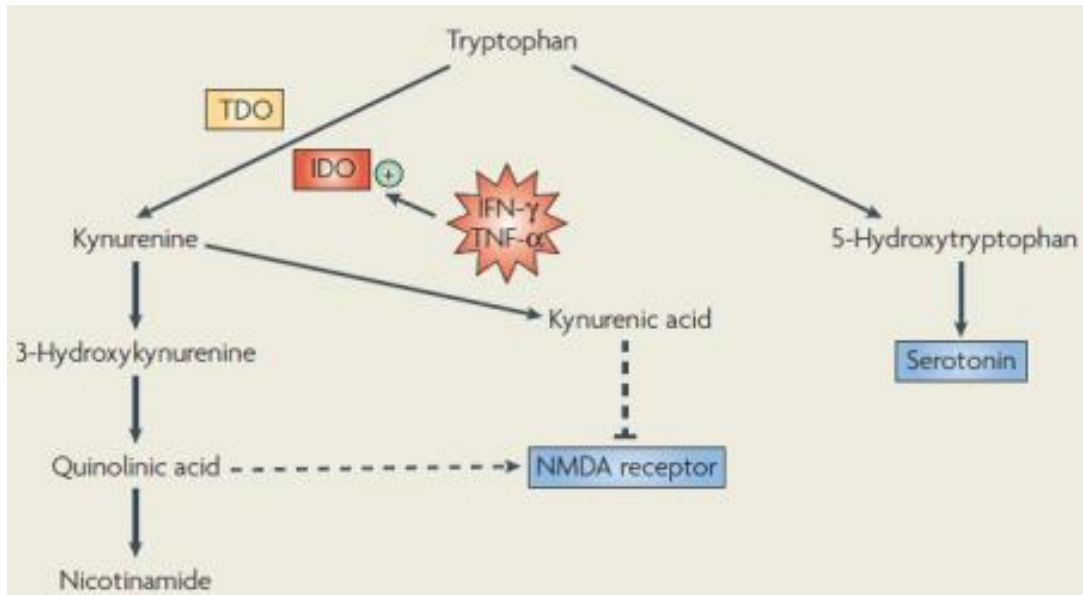


Figura 1. Síntese do triptofano desviada pela enzima IDO para a via das quinureninas. Fonte: Dantzer et al., 2008.

Um estudo de O'Connor demonstrou que o lipopolissacarídeo de *E. coli* (LPS) quando administrado periféricamente em camundongos causa um quadro de inflamação que ativa a enzima a IDO levando o animal a um comportamento tipo depressivo. O modelo de LPS além de levar a um comportamento tipo depressivo também aumenta o turnover de serotonina no cérebro, e um bloqueio direto (através de antagonista) da IDO ou indireto (através de anti-inflamatórios), pode reverter esse comportamento dos animais (O'Connor et al., 2009). Um antagonista da IDO, 1-metil-triptofano (1-MT), é inibidor competitivo da enzima e mostrou-se eficaz em reverter comportamentos tipo depressivos induzidos por modelo de depressão de LPS em estudos de Corona e estudos de O'Connor (Corona et al., 2013; O'Connor et al., 2009).

O tratamento utilizado para combater a doença atualmente não abrange essas questões inflamatórias diretamente, mas sabe-se que o uso dos (ISRS) têm certo efeito anti-inflamatório, e são muito eficazes no tratamento da depressão (Mårtensson & Nässberger, 1993; Xia et al., 1996). Existem também estudos que mostram a eficácia antidepressiva e também anti-inflamatória de outros compostos como os ácidos graxos poli-insaturados da família ômega 3 (AGPIs ω -3) (Vines et al., 2012; Pudell et al., 2014).

2.3 ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS DA FAMÍLIA ÔMEGA 3

Os ácidos graxos são hidrocarbonetos compostos por uma cadeia de átomos de carbono aos quais estão ligados átomos de hidrogênio e, quando essa cadeia de átomos de carbono possui uma ou mais duplas ligações, os ácidos graxos são chamados de insaturados (Ross, 2007; Lehninger et al., 1998). O tamanho da cadeia hidrocarbonada e seu grau de instauração determinam as propriedades físicas e químicas da substância, no caso ácido graxo, em questão. Propriedades nutricionais e funcionais também são evidenciadas de acordo com o tipo de cadeia, determinando também as várias famílias de ácidos graxos existentes (Naliwaiko et al., 2004).

Duas famílias de ácidos graxos poli-insaturados são consideradas essenciais aos mamíferos: a família ômega-3 e a família ômega-6. Essas duas famílias são consideradas essenciais, pois os mamíferos não são capazes de sintetizar essas substâncias em seus organismos, e precisam obtê-las a partir da alimentação. Os ácidos graxos poli-insaturados das famílias ômega-3 e ômega-6 podem ser encontrados principalmente em alguns tipos de plantas, como as oleaginosas, e em peixes de águas frias e profundas (Horrocks & Farooqui, 2004). Substâncias essenciais são importantes para o bom desenvolvimento do organismo e até para a prevenção de doenças (Tapiero et al., 2002; Muskiet et al., 2006).

A relação entre os ácidos graxos poli-insaturados e o sistema nervoso é extremamente importante, e se dá pela presença dessas substâncias nas membranas neuronais. Os AGPIs podem promover alterações na função cerebral, já que modificam características físico-químicas dos neurônios (McNamara & Carlson, 2006). Além disso, os AGPIs participam ativamente dos processos de sinalização celular (por afetarem o funcionamento de receptores), receptação de neurotransmissores e transmissão de sinais (Bodnar & Wisner, 2005; Fürst & Kuhn, 2000).

Os ácidos graxos poli-insaturados da família ômega-3 assimilados através da alimentação, podem ser adquiridos também através de suplementação nutricional

com óleo de peixe. Estes ácidos graxos são fundamentais para a constituição das membranas lipídicas, e principalmente quando se fala na manutenção da fluidez dessas membranas (Calder, 2010). Por aumentarem a fluidez das membranas neuronais, altas concentrações de ácido docosahexanoico cerebral talvez melhorem a sensibilidade dos receptores serotoninérgicos (Bodnar & Wisner, 2005).

Os AGPIs encontrados em cápsulas de óleo de peixe utilizadas na suplementação nutricional são o ácido docosohexanoico (DHA) e o ácido eicosapentanoico (EPA), e alguns estudos mostraram diferenças entre os níveis de AGPIs da família ômega 3 de pacientes com transtornos psiquiátricos e de grupos controle, principalmente de DHA (Green et al., 2006).

Vários estudos do nosso grupo mostraram o efeito antidepressivo do óleo de peixe em que este efeito está ligado a um aumento de serotonina e BDNF e, possivelmente, expressão e/ou atividade de receptores 5-HT1A. (Vines et al., 2012; Pudell et al., 2014; Carabelli et al., 2014).

Considerando as evidências reunidas aqui, que mostram o forte componente inflamatório na etiologia da doença depressiva, assim como as evidências da potencialidade anti-inflamatória e, principalmente antidepressiva do óleo de peixe (rico em ácidos graxos poli-insaturados da família ω -3) representado por alterações significativas induzidas por este óleo sobre o sistema serotoninérgico em ratos adultos, nosso objetivo, no atual trabalho, foi estudar o efeito da suplementação com óleo de peixe em ratos Wistar jovens adultos (60 dias de idade) submetidos a um modelo de depressão de LPS (lipopolissacarídeo de *E. coli*). Para tanto, estudamos o efeito deste óleo sobre a enzima IDO através da utilização do 1-MT (inibidor direto da IDO), assim como analisamos a expressão desta enzima em hipocampus de animais tratados ou não com LPS, suplementados ou não com óleo de peixe.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Para a realização dos experimentos foram utilizados 60 ratos *Wistar* machos de 60 dias de idade, obtidos no Biotério Central do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Todo o experimento foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, e seguiu exigências estabelecidas pelo “*Guide for care and use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)*”, com aprovação número 795 no Comitê de Ética. Os animais ficaram em condições controladas de biotério, com temperatura de $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, ciclo claro/escuro de 12h/12h, água e ração livres e com troca de gaiolas e cepilho em dias alternados.

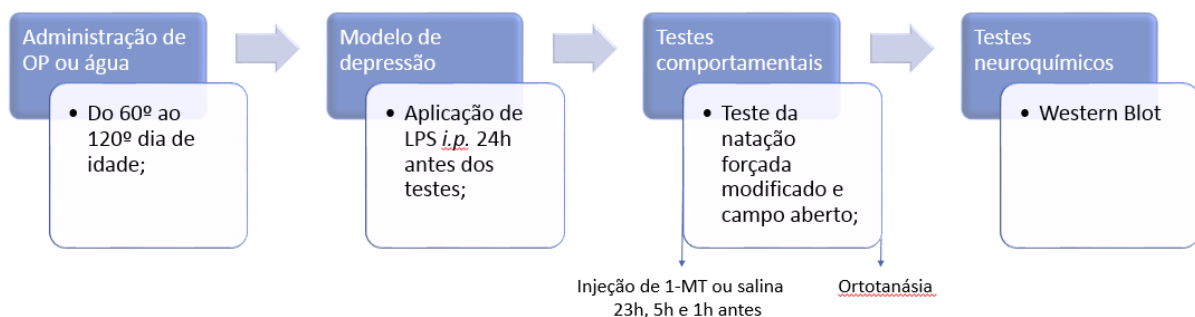


Figura 2. Linha temporal do experimento.

Inicialmente os animais foram separados aleatoriamente em dois grupos: o que recebeu a suplementação com o óleo de peixe (grupo OP) e o que recebeu administração de água (grupo controle), ambos por via de gavagem durante dois meses. Os animais do grupo OP receberam diariamente 3g/kg via oral de uma mistura de óleo de peixe composta por 12% de ácido docosahexanoico, 18% de ácido eicosapentanoico e antioxidante tocoferol. Essa mistura é proveniente de cápsulas de óleo de peixe gentilmente cedidas pela Fundação Herbarium. Ao 120º dia de idade os animais dos grupos Controle e OP foram distribuídos em 2 outros

grupos cada, dando um total de 4 grupos. Grupo OP que recebeu injeção de LPS (OP/LPS), grupo OP que recebeu injeção de veículo Salina (OP/Salina), grupo Controle/LPS e grupo Controle/Salina.

Os animais de grupos que receberam injeção de LPS (OP/LPS e Controle/LPS) receberam injeção de 250µg/kg (Konsman et al., 2008) via intraperitoneal 24 horas antes dos testes comportamentais, visando causar um processo inflamatório no animal. Nas primeiras horas o animal apresenta um comportamento doentio ou “sickness behaviour” que pode interferir nos resultados dos testes. Passadas as primeiras horas o comportamento doentio dá lugar ao comportamento tipo-depressivo modelo desejado pelo nosso estudo. (Dantzer et al., 2008). Justifica-se aqui a injeção de LPS 24 horas antes dos testes.

Os quatro grupos então foram divididos em outros quatro grupos (totalizando 8): OP/LPS que recebeu o inibidor daIDO, 1-MT (OP/LPS/1-MT), OP/LPS que recebeu veículo salina (OP/LPS/Salina), OP/Salina que recebeu 1-MT (OP/Salina/1-MT) e OP/Salina que recebeu somente salina, (OP/Salina/Salina), para o grupo que foi suplementado com óleo de peixe (grupo OP). O grupo Controle foi dividido da mesma maneira, respectivamente: Controle/LPS/1-MT, Controle/LPS/Salina, Controle/Salina/1-MT e Controle/Salina/Salina. O 1-MT foi administrado via injeção intraperitoneal 23h, 5h e 1h antes dos testes comportamentais. A dose utilizada de 1-MT foi de 3mg/kg, dose mínima utilizada em trabalho submetido, mas ainda não publicado de acordo com uma curva-resposta satisfatória (Dias et al., 2015; trabalho submetido à revista *Molecular Neurobiology*).

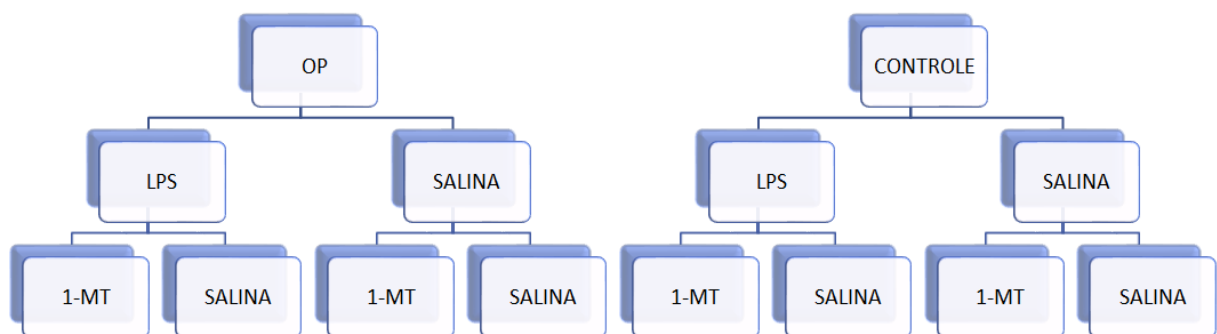


Figura 3. Grupos experimentais: OP/LPS/1-MT; OP/LPS/SAL; OP/SAL/1-MT; OP/SAL/SAL; CONTROLE/LPS/1-MT; CONTROLE/LPS/SAL; CONTROLE/SAL/1-MT; CONTROLE/SAL/SAL.

O experimento deste estudo seguiu todas as normas preconizadas pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal, e todos os cuidados necessários foram tomados para que fossem evitados possíveis desconfortos aos animais. Houve também a preocupação em minimizar o número de animais utilizados ao longo do experimento sem que isso compromettesse as análises estatísticas dos resultados, refletindo desta forma as atuais práticas bioéticas de experimentação animal.

3.2 TESTES COMPORTAMENTAIS

Foram realizados dois testes comportamentais com os grupos de animais: o teste de campo aberto e o teste da natação forçada modificado, feitos de acordo com literatura pré-existente.

O teste do campo aberto tem como finalidade avaliar qualquer alteração de motricidade no animal e qualquer comportamento de ansiedade. O teste é feito individualmente e cada animal é colocado no centro de uma arena circular (com cerca 1m de diâmetro) limitada por uma parede de 40cm de altura. O animal é livre para explorar o espaço durante 5 minutos e, durante esse tempo, o software Smart System ® Junior (Panlab, Harvard Apparatus, Espanha) é utilizado para medir o comportamento de locomoção do animal através da análise da distância percorrida, velocidade do animal e tempo gasto pelo animal em cada área da arena de campo aberto (central, intermediária e periférica). Após cada teste a arena é limpa com uma solução de água-etanol de 10% para minimizar ou até evitar interferências que possam ser causadas por odores deixados pelos ratos que realizaram o teste anteriormente (Naliwaiko et al., 2004).

O teste de natação forçada modificado tem como finalidade avaliar comportamentos tipo-depressivo nos animais. É um teste preditivo feito de acordo com literatura pré-existente (Cryan, Markou, & Lucki, 2002). Também é um teste individual no qual o animal é colocado em um cilindro plástico opaco (20cm de diâmetro x 50cm de altura) preenchido com uma coluna de água de 30cm (com uma temperatura de 24° +- 1°C). O animal passa por um treino de 15 minutos para que se habitue ao ambiente e, 24h após o treino, é feito efetivamente o teste. Cada

animal é colocado novamente no cilindro preenchido com água e o teste dura cinco minutos, sendo gravado com uma câmera posicionada sobre o cilindro para posteriores análises. A água de cada teste é trocada para minimizar ou até evitar possíveis interferências de um animal para outro, os animais são secados e realocados em suas gaiolas após o teste. A análise das gravações é feita a partir da maior frequência de comportamento do animal a cada 5 segundos, e os comportamentos podem ser de natação (relacionado ao sistema serotoninérgico), escalada (ligado ao sistema noradrenérgico) e imobilidade (este ligado ao comportamento tipo-depressivo, sendo ele revertido quando há a ação de algum composto com efeito antidepressivo, caracterizando o teste como preditivo).

3.3 ORTOTANÁSIA

Após os testes comportamentais os ratos foram ortotanasados por meio de decapitação por guilhotina e tiveram as estruturas retiradas para posteriores análises neuroquímicas.

3.4 WESTERN BLOT

As amostras de hipocampo foram homogeneizadas em 500 microlitros de tampão de lise (desoxicolato de sódio a 0,2%, 1% de Triton X-100, 50 mM Tris-HCl pH 7,4, fluoreto de fenilmetilsulfonilo 1 mM (PMSF), fenantrolina 2,5 mM) e centrifugou-se a 13.000 rpm durante 15 min a 4°C. Os sobrenadantes foram recolhidos e, em seguida, a concentração de proteína foi medida utilizando o método de Bradford (BioRad) (Bradford, 1976). As amostras foram preparadas por diluição de 40 µg de proteínas com o agente de redução (700 mM de Tris-HCl, 30% glicerol, SDS a 290 mM, 0,012% de azul de bromofenol e 5% β-mercaptoetanol). Após desnaturação durante 5 minutos a 95 ° C, as amostras foram sujeitas a eletroforese em 12% de gel de SDS-poliacrilamida, e, em seguida, transferido para membranas de nitrocelulose (Amersham GE, Little Chalfont, Reino Unido) utilizando um aparelho semi-dry (Bio-Rad) Trans-Blot. As membranas foram bloqueadas com TBST-Leite

desnatado 5% durante 1 hora a temperatura ambiente, e, em seguida, incubadas com anticorpo primário anti IDO (1: 500, Santa Cruz Biotechnology, EUA) a 4°C durante a noite. Após lavagens com TBS-T, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário apropriado [anti-mouse (1: 4000)] durante 1 h. Anticorpo anti-mouse monoclonal anti β -actina (Sigma) 1:10.000 foi utilizado para verificar a quantidade de proteína aplicada no gel para normalização. A reação foi desenvolvida com o kit de quimioluminescência WestPico (Pierce Rockford, EUA) e detectado no filme de autorradiografia. A densitometria das bandas foi medida através do software Image J.

3.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados foram expressos como média \pm Erro Padrão da Média e submetidos à análise de variância (ANOVA) de três vias, seguida do pós-teste de Duncan. Diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente significantes para $p \leq 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 TESTE DO CAMPO ABERTO

A Figura 4 mostra os resultados obtidos no campo aberto para a distância total percorrida na arena (A), distância percorrida no centro (B), distância na periferia (C), o tempo em que os animais permaneceram no centro (D) e o tempo na periferia (E). A ANOVA de 3 vias não mostrou diferenças em nenhum dos parâmetros avaliados, entre nenhum dos grupos: em relação à distância total (A) não houve efeito do óleo de peixe (OP) [F(1,51) = 3,89; n.s.], do 1-MT [F(1,51) = 0,6; n.s.] ou do LPS [F(1,51) = 0,29; n.s.]. Nenhuma interação entre o óleo de peixe e o 1-MT (OP/1-MT) [F(1,51) = 0,29; n.s.], entre OP e LPS: [F(1,51) = 0,01; n.s.], entre o 1-MT e o LPS: [F(1,51) = 0,04; n.s.] ou entre os três tratamentos (OP/1-MT/LPS): [F(1,51) = 0,1; n.s.].

Em relação à distância no centro (B) não houve efeito do OP [F(1,51) = 1,25; n.s.], do 1MT [F(1,51) = 0,08; n.s.] ou do LPS [F(1,51) = 0,63; n.s.]. Nenhuma interação entre OP e 1-MT [F(1,51) = 2,6; n.s.], entre OP e LPS [F(1,51) = 0,04; n.s.], entre 1-MT e LPS [F(1,51) = 0,004; n.s.] ou alguma interação entre os 3 tratamentos: OP/1-MT/LPS [F(1,51) = 0,99; n.s.].

Na distância percorrida na periferia (C) também não houve efeito do OP [F(1,51) = 2,94; n.s.], do 1-MT [F(1,51) = 0,48; n.s.] ou do LPS [F(1,51) = 0,14; n.s.]. Interações não ocorreram entre OP/1-MT [F(1,51) = 0,05; n.s.], entre OP/LPS [F(1,51) = 0,02; n.s.], entre 1-MT/LPS [F(1,51) = 0,04; n.s.] ou entre OP/1-MT/LPS [F(1,51) = 0,01; n.s.].

A ANOVA de 3 vias também não mostrou diferenças no tempo em que os animais permaneceram no centro da arena (D), para o grupo OP [F(1,51) = 0,24; n.s.], 1-MT [F(1,51) = 1,52; n.s.], LPS [F(1,51) = 0,7; n.s.], interações entre OP/1-MT [F(1,51) = 0,01; n.s.], OP/LPS [F(1,51) = 0,11; n.s.], 1-MT/LPS [F(1,51) = 1,29; n.s.] ou entre OP/1-MT/LPS [F(1,51) = 0,86; n.s.].

E por último, em relação ao tempo na periferia (E): OP [F(1,51) = 0,24; n.s.], 1-MT [F(1,51) = 1,52; n.s.], LPS [F(1,51) = 0,7; n.s.], entre OP/1-MT [F(1,51) = 0,01;

n.s.], OP/LPS [$F(1,51) = 0,11$; n.s.], 1MT/LPS [$F(1,51) = 1,29$; n.s.] ou entre OP/1-MT/LPS [$F(1,51) = 0,86$; n.s.].

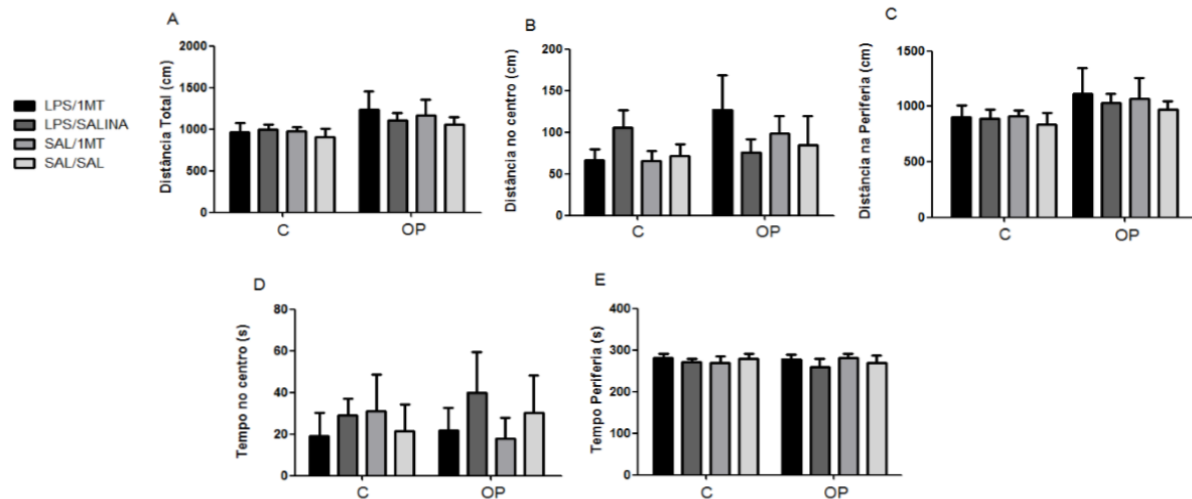


Figura 4. Teste do Campo Aberto. A Distância total (cm). B Distância no centro (cm). C Distância na periferia. D Tempo no Centro (s). E Tempo na Periferia (s). OP: Grupos tratados com óleo de peixe. C: Grupos controle. 1MT: 1-MetilTriptofano. LPS: Lipopolissacarídeo de E. coli. SAL: Salina. Grupos: OP/1MT/LPS n=8, OP/1MT/SALINA n= 7, OP/SAL/LPS n= 7, OP/SAL/SAL n= 7. C/1MT/LPS n= 8, C/1MT/SAL n= 8, C/SAL/LPS n= 7, C/SAL/SAL n= 7. ANOVA de 3 vias seguida de pós teste de Duncan. Valores expressos como média ± e.p.m. * p≤0,005 comparando.

4.2 TESTE DA NATAÇÃO FORÇADA MODIFICADO

A Figura 5 mostra o teste da natação forçada. Em relação ao comportamento de natação (A), a ANOVA de 3 vias mostrou efeito do tratamento com óleo de peixe [$F(1,51) = 50$; $p \leq 0,0000001$], do tratamento com 1-MT [$F(1,51) = 4,99$; $p \leq 0,05$] e da aplicação do LPS [$F(1,51) = 22,17$; $p \leq 0,00005$].

Nenhuma interação entre o óleo de peixe e 1-MT [$F(1,51) = 0,4$; n.s.], mas sim uma interação entre o óleo de peixe e o LPS [$F(1,51) = 9,8$; $p \leq 0,005$]. Não foi observada nenhuma interação entre o 1-MT e o LPS [$F(1,51) = 1,65$; n.s.] e também nenhuma interação entre os 3 tratamentos: OP/1-MT/LPS, [$F(1,51) = 0,2$; n.s.].

O pós-teste de Duncan mostrou que os grupos Controle/1-MT/LPS e controle/Salina/LPS tiveram frequência de natação menor que todos os outros

grupos ($p \leq 0,005$), mostrando que o óleo de peixe foi capaz de reverter o efeito do LPS, visto pela maior frequência de natação em todos os grupos tratados com óleo de peixe, porém o 1MT sozinho não foi eficaz de reverter esse efeito. Ainda, o grupo controle (sem nenhum tratamento – C/SAL/SAL) teve frequência de natação maior que os grupos controle/1MT/LPS ($p \leq 0,05$) e controle/Salina/LPS ($p \leq 0,005$), embora ainda menor que todos os outros grupos tratados com óleo de peixe.

Em relação ao comportamento de imobilidade (B) a ANOVA de 3 vias mostrou efeito do tratamento com óleo de peixe [$F(1,51) = 40,88$; $p \leq 0,0000001$], aplicação de LPS [$F(1,51) = 19,75$; $p \leq 0,00005$] e interação entre o tratamento com óleo de peixe e LPS [$F(1,51) = 10,98$; $p \leq 0,005$]. Não foi observado nenhum efeito do 1-MT [$F(1,51) = 3,71$; n.s.], nenhuma interação entre o óleo de peixe e o 1-MT [$F(1,51) = 2,01$; n.s.]. Também não foi observada nenhuma interação entre o 1MT e o LPS [$F(1,51) = 2,07$; n.s.] ou entre os 3 tratamentos: OP/1-MT/LPS, [$F(1,51) = 0,16$; n.s.].

O pós-teste de Duncan revelou que o grupo não suplementado mas que recebeu 1MT e LPS (C/1MT/LPS) apresentou frequência maior de imobilidade em relação a todos os grupos tratados com óleo de peixe ($p \leq 0,05$) e frequência de imobilidade semelhante ao grupo tratado apenas com LPS (C/SAL/LPS), mostrando que o 1-MT sozinho não foi efetivo em reverter o comportamento tipo-depressivo causado pelo LPS.

Embora tenha apresentado frequência de imobilidade menor que os grupos citados acima ($p \leq 0,05$), o grupo sem tratamento (C/SAL/SAL) apresentou frequência de imobilidade maior do que todos os grupos tratados com óleo de peixe.

A ANOVA de 3 vias não mostrou diferenças em relação ao comportamento de escalada (C) para o tratamento com óleo de peixe [$F(1,51) = 2,38$; n.s.], nenhuma diferença para o tratamento com 1MT [$F(1,51) = 0,61$; n.s.], ou para o tratamento com o LPS [$F(1,51) = 0,17$; n.s.]. Nenhuma interação entre os tratamentos com óleo de peixe e 1-MT foi observada [$F(1,51) = 0,4$; n.s.], também nenhuma interação entre o óleo de peixe e o LPS [$F(1,51) = 0,33$; n.s.], assim como entre o 1-MT e o LPS [$F(1,51) = 0,29$; n.s.] ou entre os 3 tratamentos (OP/1-MT/LPS): [$F(1,51) = 0,004$; n.s.].

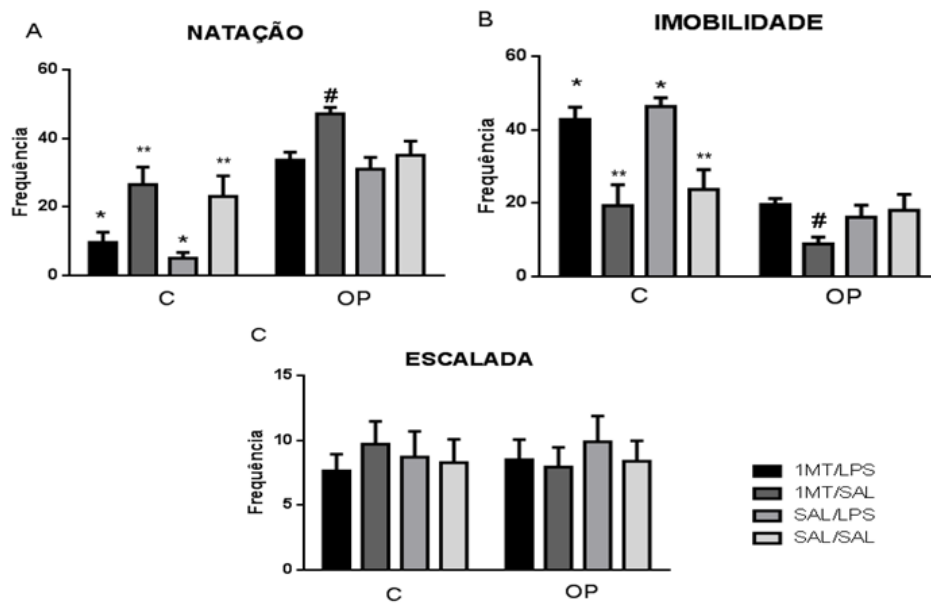


Figura 5. Teste da Natação Forçada Modificado. A Frequência de Natação. B Frequência de Imobilidade. C Frequência de Escalada. OP: Grupos tratados com óleo de peixe. C: Grupos controle. 1MT: 1-Metil-Triptofano. LPS: Lipopolissacarídeo de *E. coli*. SAL: Salina. Grupos: OP/1MT/LPS n=8, OP/1MT/SALINA n= 7, OP/SAL/LPS n= 7, OP/SAL/SAL n= 7. C/1MT/LPS n= 8, C/1MT/SAL n= 8, C/SAL/LPS n= 7, C/SAL/SAL n= 7. ANOVA de 3 vias seguida de pós teste de Duncan. Valores expressos como média ± e.p.m. * p≤0,005 comparando C/1MT/LPS e C/SAL/LPS a todos os outros grupos. # p≤ 0,05 comparando o grupo C/SAL/SAL a todos os outros grupos. ** p≤ 0,05 comparando C/1MT/SAL e C/SAL/SAL a todos os outros grupos.

4.3 RESULTADOS PARCIAIS DE WESTERN BLOT

A ANOVA de 3 vias não mostrou efeito de nenhum dos tratamentos: óleo de peixe [F(1,16) = 1,38; n.s.], tratamento com 1-MT [F(1,16) = 0,06; n.s.] ou da aplicação do LPS [F(1,16) = 0,06; n.s.].

Nenhuma interação foi observada entre o óleo de peixe e 1-MT [F(1,16) = 0,08; n.s.], ou entre o óleo de peixe e o LPS [F(1,16) = 1,17; n.s.]. Também não foram observadas interações entre o 1-MT e o LPS [F(1,16) = 1,79; n.s.] ou entre os 3 tratamentos: OP/1-MT/LPS, [F(1,16) = 3,83; n.s.].

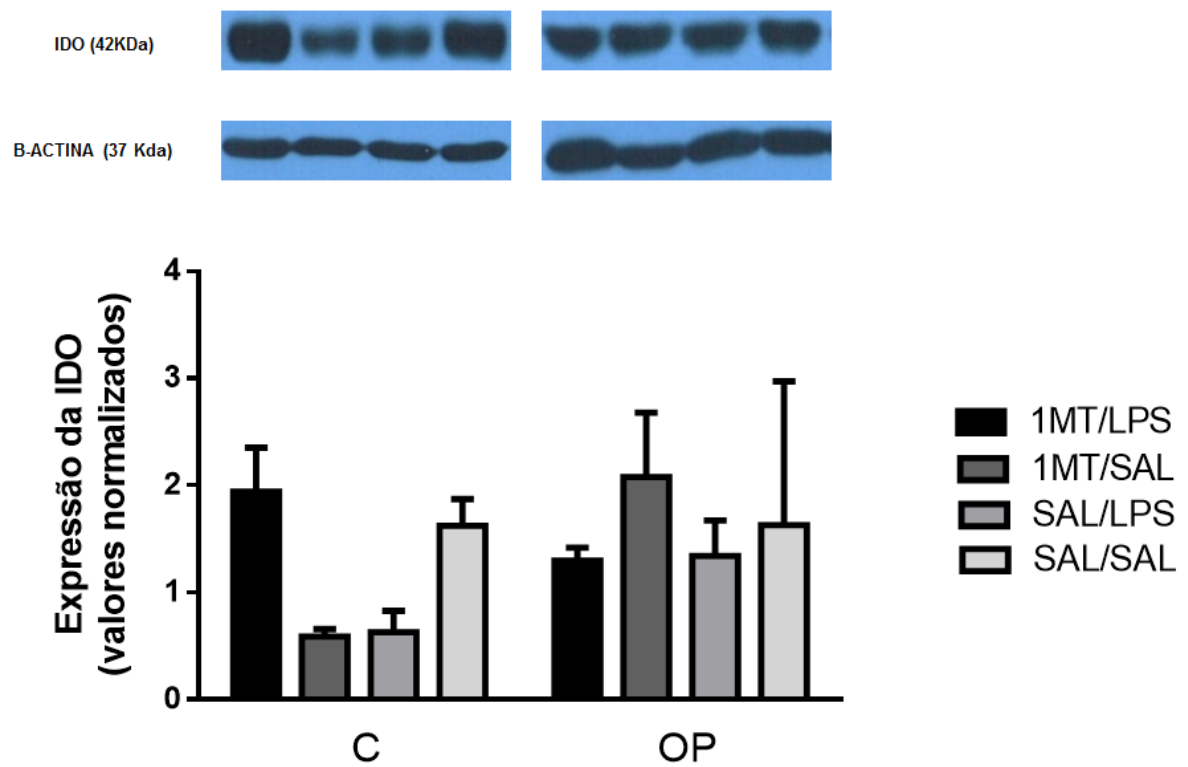


Figura 6. Expressão da IDO hipocampal. C= Grupo Controle, OP=Grupo suplementado com óleo de peixe. 1MT= ratos tratados com 1-metilriptofano. LPS= ratos que receberam aplicação do Lipopolissacarídeo de *E. coli*. N=3 para todos os grupos. Valores normalizados pela expressão da B-actina. Valores expressos como média \pm E.P.M.

5 DISCUSSÃO

A relação entre a suplementação com AGPIs da família ω -3 e distúrbios de humor está bem estabelecida e descrita em trabalhos previamente desenvolvidos em nosso laboratório. Este fato mostra a importância destes ácidos graxos no ótimo desenvolvimento e funcionamento cerebral.

Nosso objetivo, no atual trabalho, foi estudar o efeito da suplementação com óleo de peixe em ratos Wistar jovens adultos (60 dias de idade) submetidos a um modelo de depressão e inflamação de LPS (lipopolissacarídeo de *E. coli*). Para tanto, estudamos o efeito deste óleo sobre a enzima IDO através da utilização do 1-MT (inibidor direto da IDO), assim como analisamos a expressão desta enzima em hipocampus de animais tratados ou não com LPS, suplementados ou não com óleo de peixe.

O teste do campo aberto foi utilizado para verificar alterações de motricidade nos animais e quaisquer comportamentos de ansiedade. Neste teste não encontramos diferenças estatisticamente significativas relativas aos parâmetros de distância total percorrida na arena, distância percorrida no centro, distância na periferia, o tempo em que os animais permaneceram no centro e na periferia da arena. Esses resultados demonstram que a atividade motora e o comportamento de ansiedade não foram distintos entre os grupos experimentais (Figura 4). No entanto, não podemos descartar o efeito ansiolítico provocado pelo LPS. Por exemplo, Salazar et al. (2012) mostraram que, independentemente do comportamento motor, o LPS induziu a um comportamento tipo-ansiedade em camundongos submetidos ao teste de campo aberto e principalmente ao teste da caixa claro/escuro. É importante ressaltar que o teste do campo aberto avalia predominantemente comportamento motor e pode apresentar uma sensibilidade diminuída para detectar ansiedade, o que pode explicar os resultados encontrados na atual investigação. Por outro lado, este teste nos permite excluir a possibilidade de resultados falso-positivos no teste da natação forçada, já que uma atividade motora exacerbada poderia ser responsável pela redução no tempo de imobilidade.

Considerando o teste da natação forçada modificado, podemos observar na Figura 5, que o grupo C/SAL/LPS teve a menor frequência de natação e a maior frequência de imobilidade, indicando que o modelo de LPS administrado nos animais

está de acordo com as premissas, já que o comportamento tipo depressivo verificado pela frequência alta de imobilidade foi observado nos animais desse grupo.

Interessantemente, nos animais que receberam LPS e foram suplementados com óleo de peixe é possível observar o efeito antidepressivo deste óleo rico em ácidos graxos poli-insaturados, caracterizado por diminuição da frequência de imobilidade e aumento da frequência de natação, este último comportamento relacionado à atividade do sistema serotoninérgico. Estes resultados corroboram trabalhos previamente desenvolvidos em nosso laboratório em que a suplementação com óleo de peixe foi realizada durante fases precoces de desenvolvimento do sistema nervoso como a gestação e lactação (Vines et al., 2012; Carabelli et al., 2014). No atual trabalho escolhemos realizar a suplementação em animais jovens adultos (com idade de 60 dias), portanto utilizando uma nova janela de desenvolvimento do sistema nervoso central. Tal mudança foi embasada por dados da literatura, que evidenciavam a importância da suplementação com ácidos graxos da família ômega-3 durante as fases de gestação e lactação para estudar cognição e depressão, sem, no entanto, mostrar-se significativa no estudo de efeitos anti-inflamatórios (Madore et al., 2014).

Diante desta constatação alteramos a metodologia com vistas a estudar os efeitos do óleo de peixe frente a um modelo inflamatório. Somado a isto, os dados de Mori et al., 2015 (submetidos à revista *Neurotoxicity Research*), mostraram que a suplementação por um curto período de 50 dias realizada em animais com 70 dias de idade foi capaz de promover neuroproteção e efeitos antioxidantes nos animais já adultos. Nossos resultados evidenciam o sucesso desta janela temporal escolhida.

No entanto, quando olhamos o grupo C/1MT/LPS, ou seja, animais que receberam LPS e 1-MT, observamos que a frequência de natação também foi baixa, conseqüentemente a de imobilidade foi alta, demonstrando que o 1-MT não conseguiu reverter o comportamento tipo depressivo provocado pelo modelo de LPS. O 1-MT é um inibidor competitivo da enzima IDO e, teria como função bloquear a IDO e a cascata que causaria o comportamento do tipo depressivo nos animais (Corona, 2013). Estudos desenvolvidos em outros laboratórios (O'Connor et al., 2009; Corona et al., 2013) mostraram efeito do 1-MT em reverter o comportamento tipo-depressivo, porém estes autores implantaram pellets de liberação lenta em

camundongos antes da aplicação do LPS diferentemente da aplicação intraperitoneal administrada em ratos na nossa metodologia. Estas diferenças podem ter contribuído para a ausência de efeito do 1-MT. No entanto, nosso protocolo foi baseado em outro trabalho em que esta dose aplicada em ratos Wistar teve um efeito antidepressivo (Dias et al., 2015). Outra possibilidade seria a do LPS ter causado uma diminuição tão intensa de serotonina decorrente do processo inflamatório que o 1-MT mesmo em 3 aplicações não foi suficiente para reverter o comportamento tipo-depressivo decorrente desta condição.

O processo inflamatório induzido pelo LPS é acompanhado por aumento da expressão da enzima IDO (Tomaz et al., 2014). No atual trabalho, o comportamento tipo-depressivo gerado pelo modelo inflamatório do LPS não conseguiu ser revertido pelo 1-MT. Curiosamente, quando o 1-MT foi administrado em animais suplementados com OP, a reversão deste comportamento foi obtida. A explicação para tal resultado pode decorrer do fato de que o 1-MT é um inibidor direto da IDO e, de que o OP pode ter uma ação semelhante a anti-inflamatórios não-estereoidais, inibindo indiretamente esta enzima, diminuindo os níveis de citocinas pró-inflamatórias, por exemplo. Assim, a ação conjunta do OP e do 1-MT consegue reverter os parâmetros analisados no teste de natação forçada modificado que caracterizam comportamentos tipo-depressivos, como o comportamento de imobilidade dos animais.

Quando observamos o grupo OP/1MT/SAL podemos observar alta frequência de natação, e baixa frequência de imobilidade, mostrando que o óleo de peixe foi eficiente em aumentar os níveis de natação, potencializando o efeito do 1-MT. Na observação do grupo OP/1-MT/LPS, em que os animais receberam LPS e, espera-se encontrar níveis altos da enzima IDO, percebemos que o óleo de peixe também potencializou o efeito do 1-MT e conseguiu reverter o comportamento tipo depressivo induzido pelo modelo de LPS. Um menor tempo de imobilidade sugere um efeito antidepressivo do óleo de peixe sobre o comportamento de desespero observado nos animais.

Quanto aos resultados de Escalada não observamos diferenças significativas entre os grupos, evidenciando ausência de alterações no sistema noradrenérgico desses animais (Cryan, Valentino & Lucki, 2005).

Em trabalhos anteriores, na ausência de um modelo inflamatório, o óleo de peixe aumentou os níveis de serotonina e do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) em tecido hipocampal (Vines et al., 2012; Pudell et al., 2014; Carabelli et al., 2015). No estudo atual, utilizando um modelo inflamatório, propomos que o óleo de peixe tenha agido indiretamente sobre a enzima IDO (elevada devido ao quadro inflamatório), possivelmente inibindo o desvio de síntese de serotonina a partir do aminoácido triptofano para a via das quinureninas, compostos tóxicos. Ao inibir esta via, o óleo de peixe aumenta os níveis de serotonina e exerce um efeito antidepressivo. Entretanto, não podemos descartar a possibilidade do óleo de peixe aumentar os níveis de serotonina por outros mecanismos. Assim, trabalhos futuros dosando citocinas e serotonina elucidarão esta questão.

Em relação aos resultados parciais de Western Blot, nossa expectativa é de que o modelo de LPS tenha aumentado os níveis da enzima IDO provocando um quadro de inflamação crônica nos animais. Além disso, esperamos que o óleo de peixe seja capaz de diminuir a expressão da enzima IDO e conseqüentemente interferir na cascata provocada pelo aumento da IDO diminuindo a inflamação de forma geral e explicando os resultados que tivemos de reversão do comportamento tipo-depressivo nos testes comportamentais de natação forçada modificado. No entanto, nossos resultados parciais não apontam qualquer diferença estatística significativa entre esses grupos. Muito provavelmente a amostra analisada ainda muito pequena (n=3) tenha nos levado a resultados falsos negativos. A análise da expressão da enzima IDO se encontra em processamento e, em futuro breve, esperamos elucidar os resultados de Western Blot.

Em conjunto, nossos resultados sugerem que o óleo de peixe reverteu o comportamento tipo-depressivo provocado pela IDO, por sua vez induzida pelo LPS, através de mecanismos não determinados até o presente momento.

6 CONCLUSÕES

Levando em consideração o conjunto de dados aqui apresentados, é possível concluir que:

O modelo de inflamação do LPS funcionou de acordo com as premissas do modelo para reproduzir o comportamento tipo-depressivo nos animais, por conta do alto comportamento de imobilidade observado no teste de natação forçada modificado.

O óleo de peixe é eficaz em reverter o comportamento tipo depressivo causado pelo modelo de depressão e inflamação de LPS (lipopolissacarídeo de *E. coli*).

REFERÊNCIAS

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. (2013). **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5th Edition (DSM-5)**. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 4th edition TR. (p. 280). doi:10.1176/appi.books.9780890425596.744053.

BELTZ, B. S., & SANDEMAN, D. C. (2003). **Regulation of life-long neurogenesis in the decapod crustacean brain**. *Arthropod Structure and Development*. doi:10.1016/S1467-8039(03)000380.

BODNAR, L. M. AND WISNER, K. L. (2005) **Nutrition and depression: Implications for improving mental health among childbearing-aged women**. *Biological Psychiatry*, 58(9), pp. 679–685. doi: 10.1016/j.biopsych.2005.05.009.

BOLDRINI, M., UNDERWOOD, M. D., HEN, R., ROSOKLIJA, G. B., DWORK, A. J., JOHN MANN, J., & ARANGO, V. (2009). **Antidepressants increase neural progenitor cells in the human hippocampus**. *Neuropsychopharmacology*, 34, 2376–2389. doi:10.1038/npp.2009.75.

CALDER, P. C. (2010) **Omega-3 fatty acids and inflammatory processes**. *Nutrients*, 2(3), pp. 355–374. doi: 10.3390/nu2030355.

CARABELLI, B., DELATTRE, A. M., PUDELL, C., MORI, M. A., SUCHECKI, D., MACHADO, R. B., VENANCIO, D. P., PIAZZETTA, S. R., HAMMERSCHMIDT, I., ZANATA, S. M., LIMA, M. M. S., ZANOVELI, J. M., FERRAZ, A. C. (2014). **The Antidepressant-Like Effect of Fish Oil: Possible Role of Ventral Hippocampal 5HT1A Post-synaptic Receptor**. *Molecular Neurobiology*. doi:10.1007/s12035-014-8849-8.

CORONA, A. W., NORDEN, D. M., SKENDELAS, J. P., HUANG, Y., O'CONNOR, J. C., LAWSON, M., DANTZER, R., KELLEY, K. W. AND GODBOUT, J. P. (2013) **Indoleamine 2, 3-dioxygenase inhibition attenuates lipopolysaccharide induced persistent microglial activation and depressive-like complications in fractalkine receptor (CX3CR1)-deficient mice**. *Brain, Behavior, and Immunity*, 31, pp. 134–142. doi: 10.1016/j.bbi.2012.08.008.

CRYAN, J. F., MARKOU, A., & LUCKI, I. (2002). **Assessing antidepressant activity in rodents: Recent developments and future needs.** Trends in Pharmacological Sciences.

CRYAN, J. F., VALENTINO, R. J. AND LUCKI, I. (2005) **Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test.** Neuroscience & Biobehavioral Reviews, 29(4-5), pp. 547–569. doi: 10.1016/j.neubiorev.2005.03.008.

DANTZER, R., CONNOR, J. C. O., LAWSON, M. A., & KELLEY, K. W. (2011). **Inflammation-associated depression: From serotonin to kynurenine.** Psychoneuroendocrinology, 36(3), 426–436. doi:10.1016/j.psyneuen.2010.09.012.

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.** Nature Reviews. Neuroscience, 9, 46–56. doi:10.1038/nrn2297.

DIAS, I. C. da S., CARABELLI, B., ISHII, D. K., MORAIS, H. de, CARVALHO, M. C. de, SOUZA, L. E. R. de, ZANATA, S. M., BRANDÃO, M. L., CUNHA, T. M., FERRAZ, A. C., CUNHA, J. M., ZANOVELLI, J. M. (2015, submetido e ainda não publicado). **Indoleamine 2,3-dioxygenase/kynurenine pathway as a potential pharmacological target to treat depression associated with diabetes.** Molecular neurobiology (no prelo).

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.** Biological Psychiatry, 67(5), 446–57. doi:10.1016/j.biopsych.2009.09.033.

FERRAZ, A. C., KISS, Á., ARAÚJO, R. L. F., SALLES, H. M. R., NALIWAIKO, K., PAMPLONA, J., & MATHEUSSI, F. (2008). **The antidepressant role of dietary long-chain polyunsaturated n-3 fatty acids in two phases in the developing brain.** Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids, 78, 183–188. doi:10.1016/j.plefa.2008.02.00.

FÜRST, P. AND KUHN, K. S. (2000) **Fish oil emulsions: What benefits can they bring?** Clinical Nutrition, 19(1), pp. 7–14. doi: 10.1054/clnu.1999.0072.

GREEN, P., HERMESH, H., MONSELISE, A., MAROM, S., PRESBURGER, G. AND WEIZMAN, A. (2006) **Red cell membrane omega-3 fatty acids are decreased in nondepressed patients with social anxiety disorder.** *European Neuropsychopharmacology*, 16(2), pp. 107–113. doi: 10.1016/j.euroneuro.2005.07.005.

HORROCKS, L. A. AND FAROOQUI, A. A. (2004) **Docosahexaenoic acid in the diet: Its importance in maintenance and restoration of neural membrane function.** *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 70(4), pp. 361–372. doi: 10.1016/j.plefa.2003.12.011.

JING, T., WU, L., BORGMANN, K., SURENDRAN, S., GHORPADE, A., LIU, J., & XIONG, H. (2010). **Soluble factors from IL-1 β -stimulated astrocytes activate NR1a/NR2B receptors: implications for HIV1-induced neurodegeneration.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 402(2), 241–6. doi:10.1016/j.bbrc.2010.10.006.

KONSMAN, J. P., VEENEMAN, J., COMBE, C., POOLE, S., LUHESHI, G. N., & DANTZER, R. (2008). **Central nervous action of interleukin-1 mediates activation of limbic structures and behavioural depression in response to peripheral administration of bacterial lipopolysaccharide.** *European Journal of Neuroscience*, 28, 2499–2510. doi:10.1111/j.14609568.2008.06549.

KUBERA, M., OBUCHOWICZ, E., GOEHLER, L., BRZESZCZ, J., & MAES, M. (2011). **Progress in NeuroPsychopharmacology & Biological Psychiatry In animal models, psychosocial stress-induced (neuro) inflammation, apoptosis and reduced neurogenesis are associated to the onset of depression.** *Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry*, 35(3), 744–759. doi:10.1016/j.pnpbp.2010.08.026.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica.** São Paulo: Ed. Sarvier, 1998. p.179-197.

LIN, P. Y., HUANG, S. Y., & SU, K. P. (2010). **A Meta-Analytic Review of Polyunsaturated Fatty Acid Compositions in Patients with Depression.** *Biological Psychiatry*, 68, 140–147. Retrieved from WOS:000279900100005.

LUCHTMAN, D. W., MENG, Q., & SONG, C. (2012). **Ethyl-eicosapentaenoate (E-EPA) attenuates motor impairments and inflammation in the MPTP-probenecid mouse model of Parkinson's disease.** *Behavioural Brain Research*, 226(2), 386–396. doi:10.1016/j.bbr.2011.09.033.

MADORE, C., NADJAR, A., DELPECH, J.-C., SERE, A., AUBERT, A., PORTAL, C., JOFFRE, C. AND LAYÉ, S. (2014) **Nutritional n-3 PUFAs deficiency during perinatal periods alters brain innate immune system and neuronal plasticity-associated genes.** *Brain, Behavior, and Immunity*, 41, pp. 22–31. doi: 10.1016/j.bbi.2014.03.021.

MAES, M. (1995). **Evidence for an immune response in major depression: a review and hypothesis.** *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 19, 11–38. doi:10.1016/0278-5846(94)00101-M.

MAES, M. (1995). **The monocyte-T-lymphocyte hypothesis of major depression.** *Psychoneuroendocrinology*, 20, 111–116. doi:10.1016/0306-4530(94)00066-J.

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 2,3dioxygenase, 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(3), 702–21. doi:10.1016/j.pnpbp.2010.12.017.

MAES, M., RINGEL, K., KUBERA, M., BERK, M., & RYBAKOWSKI, J. (2012). **Increased autoimmune activity against 5-HT: a key component of depression that is associated with inflammation and activation of cell-mediated immunity, and with severity and staging of depression.** *Journal of Affective Disorders*, 136(3), 386–92. doi:10.1016/j.jad.2011.11.016.

MAES, M., YIRMYIA, R., NORABERG, J., BRENE, S., HIBBELN, J., PERINI, G., KUBERA, M., BOB, P., LERER, B. AND MAJ, M. (2008) **The inflammatory & neurodegenerative (I&ND) hypothesis of depression: Leads for future research and new drug developments in depression.** *Metabolic Brain Disease*, 24(1), pp. 27–53. doi: 10.1007/s11011-008-9118-1.

MÅRTENSSON, U., & NÄSSBERGER, L. (1993). **Influence of antidepressants on mitogen stimulation of human lymphocytes.** *Toxicology in Vitro : An International Journal Published in Association with BIBRA*, 7, 241–245. doi:10.1016/0887-2333(93)90007-R.

MCNAMARA, R. K. AND CARLSON, S. E. (2006) **Role of omega-3 fatty acids in brain development and function: Potential implications for the pathogenesis and prevention of psychopathology.** *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 75(4-5), pp. 329–349. doi: 10.1016/j.plefa.2006.07.010.

MORI, M. A., DELATTRE, A. M., CARABELLI, B., BORTOLANZA, M., KWIATKOSKI, R. C., STAZIAK, P. V., VISENTAINER, J. V., MONTANHER, P. F., DEL BEL, E. A., FERRAZ, A. C. (2015, submetido e ainda não publicado). **Fish oil suppresses glial activation in a 6-OHDA model of Parkinson's disease: strategies for neuroprotection.** *Neurotoxicity Research* (no prelo).

MORILAK, D. A. AND FRAZER, A. (2004) **Antidepressants and brain monoaminergic systems: A dimensional approach to understanding their behavioural effects in depression and anxiety disorders.** *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, 7(2), pp. 193–218. doi: 10.1017/s1461145704004080.

MUSKIET, F. A. J., VAN GOOR, S. A., KUIPERS, R. S., VELZING-AARTS, F. V., SMIT, E. N., BOUWSTRA, H., JANNEKE DIJCK-BROUWER, D. A., RUDY BOERSMA, E. AND HADDERS-ALGRA, M. (2006) **Long-chain polyunsaturated fatty acids in maternal and infant nutrition.** *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 75(3), pp. 135–144. doi: 10.1016/j.plefa.2006.05.010.

NALIWAIKO, K., ARAÚJO, R. L. F., DA FONSECA, R. V., CASTILHO, J. C., ANDREATINI, R., BELLISSIMO, M. I., OLIVEIRA, B. H., MARTINS, E. F., CURI, R., FERNANDES, L. C. AND FERRAZ, A. C. (2004) **Effects of fish oil on the central nervous system: A new potential antidepressant?** *Nutritional Neuroscience*, 7(2), pp. 91–99. doi: 10.1080/10284150410001704525.

NESTLER, E. J., BARROT, M., DILEONE, R. J., EISCH, A. J., GOLD, S. J., & MONTEGGIA, L. M. (2002). **Neurobiology of depression.** *Neuron*.

O'CONNOR, J. C., LAWSON, M. A., ANDRÉ, C., MOREAU, M., LESTAGE, J., CASTANON, N., KELLEY, K. W., DANTZER, R. (2009). **Lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase activation in mice.** *Molecular Psychiatry*, 14, 511–522. doi:10.1038/sj.mp.4002148.

O'CONNOR, J. C., SALAZAR, A., GONZALEZ-RIVERA, B. L., REDUS, L. AND PARROTT, J. M. (2012) **Indoleamine 2, 3-dioxygenase mediates anhedonia and anxiety-like behaviors caused by peripheral lipopolysaccharide immune challenge,** *Brain, Behavior, and Immunity*, 26, p. S17. doi: 10.1016/j.bbi.2012.07.084.

PUDELL, C., VICENTE, B. A., DELATTRE, A. M., CARABELLI, B., MORI, M. A., SUCHECKI, D., MACHADO, R. B., ZANATA, S. M., VISENTAINER, J. V., JUNIOR, O. DE O. S., LIMA, M. M. S., FERRAZ, A. C., (2014). **Fish oil improves anxiety-like, depressive-like and cognitive behaviours in olfactory bulbectomised rats.** *The European Journal of Neuroscience*, 39(2), 266–274. doi:10.1111/ejn.12406.

ROSS, B. M. (2007) **ω -3 fatty acid deficiency in major depressive disorder is caused by the interaction between diet and a genetically determined abnormality in phospholipid metabolism.** *Medical Hypotheses*, 68(3), pp. 515–524. doi: 10.1016/j.mehy.2006.07.054.

SAVITZ, J., & DREVETS, W. C. (2009). **Bipolar and major depressive disorder: Neuroimaging the developmental-degenerative divide.** *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. doi:10.1016/j.neubiorev.2009.01.004.

SMITH, R. S. (1991) **The macrophage theory of depression.** *Medical Hypotheses*, 36(2), p. 178. doi: 10.1016/0306-9877(91)90266-2.

TAPIERO, H., NGUYEN BA, G., COUVREUR, P. AND TEW, K. (2002) **Polyunsaturated fatty acids (PUFA) and eicosanoids in human health and pathologies.** *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 56(5), pp. 215–222. doi: 10.1016/s0753-3322(02)00193-2.

TOMAZ, V. S., CORDEIRO, R. C., COSTA, A. M. N., DE LUCENA, D. F., NOBRE JÚNIOR, H. V., DE SOUSA, F. C. F., VASCONCELOS, S. M. M., VALE, M. L., QUEVEDO, J. AND MACÊDO, D. (2014) **Antidepressant-like effect of nitric oxide synthase inhibitors and sildenafil against lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior in mice.** *Neuroscience*, 268, pp. 236–246. doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.03.025.

VINES, A., DELATTRE, A. M., LIMA, M. M. S., RODRIGUES, L. S., SUCHECKI, D., MACHADO, R. B., TUFIK, S., PEREIRA, S. I. R., ZANATA, S. M., FERRAZ, A. C. (2012). **The role of 5-HT 1A receptors in fish oil-mediated increased BDNF expression in the rat hippocampus and cortex: A possible antidepressant mechanism.** In *Neuropharmacology* (Vol. 62, pp. 184–191).

XIA, Z., DEPIERRE, J. W., & NÄSSBERGER, L. (1996). **Tricyclic antidepressants inhibit IL-6, IL-1 beta and TNF-alpha release in human blood monocytes and IL-2 and interferon-gamma in T cells.** *Immunopharmacology*, 34, 27–37.