



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

CLÁUDIO MANUEL GONÇALVES DA SILVA LEITE

**EFEITOS COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICOS DE INIBIDORES DA
ENZIMA DIPEPTIDILPETIDASE 4 EM MODELO DE DEPRESSÃO INDUZIDA
POR RESERPINA EM CAMUNDONGOS**

FORTALEZA
2018

CLÁUDIO MANUEL GONÇALVES DA SILVA LEITE

**EFEITOS COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICOS DE INIBIDORES DA
ENZIMA DIPEPTIDILPETIDASE 4 EM MODELO DE DEPRESSÃO INDUZIDA
POR RESERPINA EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Silvânia Maria Mendes de Vasconcelos

FORTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- L551e Leite, Cláudio Manuel Gonçalves da Silva.
EFEITOS COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICOS DE INIBIDORES DA ENZIMA
DIPEPTIDILPETIDASE 4 EM MODELO DE DEPRESSÃO INDUZIDA POR RESERPINA EM
CAMUNDONGOS / Cláudio Manuel Gonçalves da Silva Leite. – 2018.
50 f. : il.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-
Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2018.
Orientação: Prof. Dr. Silvânia Maria Mendes de Vasconcelos.
1. sitagliptina. 2. depressão. 3. diabetes mellitus. 4. reserpina. 5. antidepressivos. I. Título.
CDD 615.1
-

CLÁUDIO MANUEL GONÇALVES DA SILVA LEITE

**EFEITOS COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICOS DE INIBIDORES DA
ENZIMA DIPEPTIDILPETIDASE 4 EM MODELO DE DEPRESSÃO INDUZIDA
POR RESERPINA EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Silvânia Maria Mendes de Vasconcelos

Aprovada em ____ de _____ de ____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Silvânia Maria Mendes de Vasconcelos (Orientadora)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Danielle Macêdo Gaspar

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Thiago Holanda de Freitas

Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

RESUMO

EFEITOS COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICOS DE INIBIDORES DA ENZIMA DIPEPTIDILPETIDASE 4 EM MODELO DE DEPRESSÃO INDUZIDA POR RESERPINA EM CAMUNDONGOS

Depressão é um transtorno do humor de alta prevalência na população geral que se caracteriza por hipotimia, anedonia e anergia. Os inibidores da dipeptidilpeptidase 4 (DPP4) são fármacos utilizados para o tratamento do diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) que possuem ação no sistema nervoso central (SNC). Realizamos este estudo com o objetivo de avaliar os efeitos comportamentais, antioxidante e anti-inflamatório da administração de sitagliptina, um inibidor da DPP4, em modelo de depressão induzida por reserpina em camundongos. Foram utilizados camundongos *Swiss* fêmeas pesando 25 a 30g que receberam injeção diária de reserpina (1mg/kg, via subcutânea) sozinha ou associada a sitagliptina (3 e 6 mg/kg, via subcutânea) durante três dias. No terceiro dia, uma hora após a última administração dos fármacos, os animais foram submetidos aos testes comportamentais campo aberto, suspensão de cauda, nado forçado, cruz elevada e placa perfurada. Após os testes, os animais foram sacrificados e realizou-se a dissecação de hipocampo, córtex pré-frontal e corpo estriado. As áreas cerebrais foram utilizadas para a execução dos seguintes estudos neuroquímicos: níveis de peroxidação lipídica, glutathiona reduzida (GSH), atividade da superóxido dismutase (SOD), atividade da mieloperoxidase, (MPO) concentração de interleucina-6 (IL-6) e interleucina-4 (IL-4). Os resultados demonstraram que a administração de reserpina induziu um quadro comportamental de depressão-*like*, pelo aumento do tempo de imobilidade dos animais tanto no teste de suspensão de cauda quanto no nado forçado, sem alterar a atividade locomotora dos animais, essa ação foi revertida pela associação com sitagliptina, principalmente na maior dose (6 mg/kg). Reserpina apresentou efeitos oxidantes demonstrados pelo aumento de malondialdeído, SOD e MPO e redução de GSH nas áreas cerebrais estudadas. Em nosso estudo a administração de sitagliptina, principalmente na maior dose, foi capaz de reverter as alterações na peroxidação lipídica, da atividade da MPO e nos níveis de GSH induzidas por reserpina. A associação da sitagliptina com reserpina aumentou os níveis de IL-6 e diminuiu os de IL-4 quando comparados ao grupo reserpina. A partir dos resultados do nosso estudo, conclui-se que, em modelo animal de depressão induzida por reserpina, a sitagliptina, especialmente na dose de 6mg/kg, apresenta ação antidepressiva, antioxidante e anti-inflamatória. Palavras-chave: sitagliptina; depressão; diabetes mellitus; reserpina; antidepressivos.

ABSTRACT

BEHAVIORAL AND NEUROCHEMICAL EFFECTS OF DIPEPTIDYL PEPTIDASE-IV INHIBITORS IN AN ANIMAL MODEL OF DEPRESSION INDUCED BY RESERPINE

Depression is a mood disorder of high prevalence in the general population which is characterized by hypothymia, anhedonia and low energy. Inhibitors of the enzyme dipeptidylpeptidase 4 (DPP4) are drugs used to treat type 2 diabetes mellitus (DM2) which also have effects on the central nervous system (CNS). Therefore, we carried out this study with the objective of evaluating the behavioral, antioxidant and anti-inflammatory effects of the administration of sitagliptin, a DPP4 inhibitor, in a model of depression induced by reserpine in mice. Female Swiss mice weighing 25 to 30g were given a daily injection of reserpine (1mg / kg, subcutaneously) alone or in combination with sitagliptin (3 and 6 mg / kg, subcutaneously) for three days. On the third day of treatment, one hour after the last administration of the drugs, the animals were submitted to the following behavioral tests: open field, tail suspension, forced swimming, raised cross and perforated plate. After the behavioral tests, the animals were sacrificed by decapitation and the hippocampus, the prefrontal cortex and the striatum were dissected. The brain areas were used to perform the following neurochemical studies: levels of lipid peroxidation, reduced glutathione (GSH), superoxide dismutase (SOD) activity, myeloperoxidase activity, (MPO) concentration of interleukin-6 (IL-6) and interleukin-4 (IL-4). The results demonstrated that repeated administration of reserpine induced a depressed-like behavioral pattern by increasing the immobility time of the animals in both the tail suspension test and forced swimming without altering the locomotor activity of the animals. This action was reversed by the association with sitagliptin, mainly in the highest dose (6 mg / kg). Reserpine presented oxidative effects demonstrated by the increase of MDA, SOD and MPO and reduction of GSH in the cerebral areas studied. In our study, the administration of sitagliptin, mainly at the highest dose, was able to reverse reserpine-induced changes in lipid peroxidation, MPO activity and GSH levels. The association of sitagliptin with reserpine increased IL-6 levels and decreased IL-4 levels when compared to the reserpine group. From the results of our study, we conclude that, in an animal model of depression induced by reserpine, sitagliptin, especially at the dose of 6mg / kg, presents antidepressive, antioxidant and anti-inflammatory effects. Keywords: sitagliptin; depression; diabetes mellitus; reserpine; antidepressants.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Número de cruzamentos (1A), *rearing* (1B) e *grooming* (1C).

Figura 2. Tempo de imobilização no teste suspensão de cauda (2A) e nado forçado (2B).

Figura 3. NEBA (A), TPBA (B), NEBF (C) e TPBF (D) no teste de cruz elevada.

Figura 4. Número de mergulhos (A) e tempo de permanência nos orifícios (B) no teste de placa perfurada.

Figura 5. Concentração de malondialdeído (MDA) no hipocampo (5A), córtex pré-frontal (5B) e corpo estriado (5C).

Figura 6. Concentração de glutathiona reduzida (GSH) no hipocampo (6A), córtex pré-frontal (6B) e corpo estriado (6C).

Figura 7. Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) no hipocampo (7A), córtex pré-frontal (7B) e corpo estriado (7C).

Figura 8. Atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) no hipocampo (8A), córtex pré-frontal (8B) e corpo estriado (8C).

Figura 9. Concentrações de IL-6 (9A) e IL-4 (9B) no hipocampo.

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT	Serotonina
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
BSA	Albumina bovina sérica
CE	Corpo estriado
CTL-CTL	Grupo controle – controle
CTL-SGT3	Grupo controle - sitagliptina 3mg/kg
CTL-SGT6	Grupo controle - sitagliptina 6mg/kg
DA	Dopamina
DM2	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2
DPP4	Enzima dipeptidilpeptidase 4
DSM-5	Manual de Diagnóstico e Estatística dos Transtornos Mentais 5ª Ed
DTNB	2-Ácido nitrobenzóico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EROS	Espécies reativas de oxigênio
GIP	Poli-peptídeo inibitório gástrico
GLP-1	Peptídeo semelhante ao glucagon tipo 1
GSH	Glutationa reduzida
HP	Hipocampo
HTAB	Brometo de hexadeciltrimetilamônio
IL-4	Interleucina-4
IL-6	Interleucina-6
MDA	Malondialdeído
MPO	Mieloperoxidase
NA	Noradrenalina
NBT	Azul de nitrotetrazólio
NEBA	Número de entradas no braço aberto
NEBF	Número de entradas no braço fechado
NO	Óxido nítrico
NO2	Nitrito
NO3	Nitrato
OMS	Organização Mundial da Saúde
PF	Córtex pré frontal
RES-CTL	Grupo reserpina - controle
RES-SGT3	Grupo reserpina - sitagliptina 3mg/kg

RES-SGT6	Grupo reserpina - sitagliptina 6mg/kg
SC	Subcutânea
SNC	Sistema nervoso central
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	<i>Thiobarbituric acid reactive substances</i>
TPBA	Tempo de permanência no braço aberto
TPBF	Tempo de permanência no braço fechado

Sumário

Sumário	10
1. INTRODUÇÃO	11
1.1 Depressão: conceito e aspectos epidemiológicos	11
1.2 Depressão: fisiopatologia e tratamento	11
1.3 Incretinomiméticos	13
1.4 Inibidores da DPP4	14
1.5 Modelo animal de depressão induzida por reserpina	15
2. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA	16
3. OBJETIVOS	17
3.1 Geral	17
3.2 Específicos	17
4. MÉTODOS	18
4.1 Animais	18
4.2 Drogas	18
4.3 Protocolo de tratamento	18
4.4 Testes de comportamento	19
4.5 Testes neuroquímicos	20
4.6 Análise estatística	22
5. RESULTADOS	23
5.1 Resultados dos testes de comportamento	23
5.1.1 Resultados do teste de campo aberto	23
5.1.2 Resultados dos testes de suspensão da cauda e nado forçado	25
5.1.3 Resultados dos testes de cruz elevada e placa perfurada	27
5.2 Resultados dos testes neuroquímicos	30
5.2.1 Resultados dos níveis de peroxidação lipídica	30
5.2.2 Resultados dos níveis de glutathiona reduzida	30
5.2.3 Resultados da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)	30
5.2.4 Resultados da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO)	30
5.2.5 Resultados das concentrações de interleucina-6 (IL-6) e interleucina-4 (IL-4)	35
6. DISCUSSÃO	37
REFERÊNCIAS	42

1. INTRODUÇÃO

1.1 Depressão: conceito e aspectos epidemiológicos

A depressão é um transtorno do humor caracterizado por tristeza, apatia e anergia. Segundo o Manual de Diagnóstico e Estatística dos Transtornos Mentais 5ª Edição (DSM-5), deve-se diagnosticar depressão quando estão presentes por no mínimo duas semanas cinco ou mais dos seguintes sintomas: humor deprimido, anedonia, mudanças no apetite ou peso, insônia ou hipersonia, agitação ou retardo psicomotor, fadiga ou perda de energia, sentimento de menos-valia ou culpa inapropriada, diminuição da concentração, pensamentos recorrentes de morte ou ideação suicida. Além disso, os sintomas devem representar uma mudança em relação a um estado anterior, causar sofrimento significativo ou perda funcional e não estarem associados a uso de substância ou outra condição médica (American Psychiatric Association, 2013). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a depressão atingiu 350 milhões de pessoas no mundo em 2014, sendo ligeiramente mais prevalente em mulheres que em homens. No Brasil, cerca de uma em cada dez pessoas sofre com o transtorno. O impacto funcional da depressão é significativamente importante e ela representa a quarta principal causa de incapacitação em todo o mundo.

Os pacientes que sofrem de depressão e apresentam uma doença clínica em comorbidade apresentam pior prognóstico. Em pacientes com DM2, por exemplo, a depressão pode levar a alterações neuroquímicas e hormonais que podem produzir efeitos hiperglicemiantes e ocasionar distúrbios no metabolismo glicêmico (Hameed *et al.*, 2015). A depressão também está associada à existência de doenças crônicas, como demências. Pessoas com depressão podem apresentar alterações biológicas com potencial de aumentar os riscos de desenvolvê-las. Além disso, pacientes portadores de doenças crônicas podem apresentar limitações em sua vida diária que aumentem as chances de ter depressão (Byers e Yaffe, 2011).

1.2 Depressão: fisiopatologia e tratamento

Devido à heterogeneidade clínica e etiológica dos transtornos depressivos, tem sido difícil elucidar por completo a fisiopatologia da depressão. As teorias disponíveis são baseadas em estudos que investigam o estresse psicossocial (hormônios do estresse), os neurotransmissores (serotonina, noradrenalina, dopamina, glutamato e ácido gama-aminobutírico), os neurocircuitos, os fatores neurotróficos e o ritmo circadiano (Hasler, 2010).

As teorias etiológicas da depressão se aplicam aparentemente a apenas alguns tipos de pacientes deprimidos, mas não a outros, e, além disso, a fisiopatologia pode variar

consideravelmente ao longo do curso da doença. Diante dessas evidências, defende-se que não há uma hipótese biológica única que explique todos os casos de depressão. Consequentemente, os tratamentos antidepressivos, incluindo abordagens psicológicas e biológicas, devem ser adaptados de acordo com o indivíduo e o estágio da doença.

Dentre as teorias sobre a etiologia biológica da depressão, a hipótese clássica propõe que a doença se deve à deficiência de neurotransmissores monoaminérgicos, como noradrenalina (NA), dopamina (DA) e serotonina (5-HT). Conforme essa teoria, o sistema neurotransmissor trimonoaminérgico pode estar disfuncional em diversos circuitos cerebrais, com diferentes neurotransmissores envolvidos, dependendo do perfil de sintomas de cada paciente (Hasler, 2010; Stahl, 2010).

As evidências diretas da hipótese monoaminérgica ainda são escassas. No entanto, alguns estudos apresentam como resultado de investigação baixos níveis de metabólitos monoaminérgicos no liquor cefalorraquidiano de pacientes deprimidos. Estes achados estão em conformidade com a observação da efetividade clínica dos antidepressivos, que agem aumentando a sinalização monoaminérgica (Naughton *et al.*, 2000; Nutt, 2000).

A teoria clássica progrediu com a formulação da hipótese dos receptores monoaminérgicos. Esta hipótese sugere que a depleção dos neurotransmissores verificada nos pacientes deprimidos seria responsável por uma supra-regulação compensatória dos receptores pós-sinápticos. As evidências diretas dessa proposição também são insuficientes, mas estudos *post mortem* mostraram consistentemente o aumento no número de receptores de serotonina no córtex pré-frontal de pacientes que cometeram suicídio e, além disso, estudos de neuroimagem identificaram anormalidades nos receptores de serotonina em pacientes deprimidos (Stahl, 2010).

Todos os antidepressivos eficazes atualmente disponíveis reforçam a ação sináptica de uma ou mais monoaminas e, dessa forma, revertem, teoricamente, a supra-regulação compensatória dos receptores monoaminérgicos ao longo do tempo. Esse fenômeno é mediado provavelmente pelo processo de ativação de genes relacionados com a síntese desses receptores. Vale destacar ainda que as alterações na expressão gênica também podem incluir o aumento de fatores neurotróficos, como o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (Stahl, 2010).

Ao longo das últimas décadas, estudos clínicos e pré-clínicos têm demonstrado uma forte correlação entre inflamação e distúrbios neuropsiquiátricos (Miller *et al.*, 2009). Pacientes deprimidos, por exemplo, apresentam aumentos em biomarcadores sanguíneos periféricos, incluindo citocinas inflamatórias. Além disso, a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROS), gera estresse oxidativo e estimula a produção de citocinas inflamatórias com

ativação de neutrófilos, macrófagos e outras células do sistema imunológico. A ativação de macrófagos leva a secreção de glutamato, o que promove um aumento no metabolismo do ácido araquidônico com consequente produção de mais radicais livres que causam dano neural. Esses radicais podem comprometer áreas cerebrais, como hipocampo, levando a perda neuronal nessa região e redução do volume hipocampal (Maes *et al.*, 2011).

Pesquisas têm sugerido a possível implicação do óxido nítrico (NO) na fisiopatologia de transtornos mentais, como esquizofrenia, transtorno bipolar e depressão (Andreazza *et al.*, 2008). O NO tem sido relacionado à função de diversos neurotransmissores, bem como a aprendizado, memória e neurodesenvolvimento. A detecção de NO é feita pela quantificação no plasma em nitrito (NO₂) e nitrato (NO₃). A mensuração dos níveis de NO₂ e NO₃ tem sido correlacionada com o nível de NO.

A depressão é um dos transtornos psiquiátricos mais frequentes em pacientes com DM2, sobretudo em indivíduos idosos (Blay *et al.*, 2011). Depressão nesses pacientes está associada à falta de controle glicêmico, complicações crônicas, aumento da mortalidade, redução de funções física e mental, custos de saúde mais elevados e diminuição da adesão à dieta e hipoglicemiantes (De Groot *et al.*, 2001; Bruce *et al.*, 2005; Gonzalez *et al.*, 2008; Markowitz *et al.*, 2011). Um estudo epidemiológico demonstrou ainda que os indivíduos com diabetes e depressão têm pior qualidade de vida e uma maior utilização de serviços de saúde (Atlantis *et al.*, 2012).

A depressão pode ser subdiagnosticada no DM2. As limitações no diagnóstico de depressão em pacientes com diabetes incluem a falta de critérios diagnósticos específicos e a sobreposição de sintomas. O controle difícil da glicemia é uma barreira para a identificação precoce de sintomas depressivos, tais como fadiga, alterações no peso e apetite, distúrbios do sono e retardo motor. Além disso, a depressão em pacientes diabéticos pode ser qualitativamente diferente da depressão observada entre os indivíduos sem DM2 (Campayo *et al.*, 2011). Um diagnóstico válido e oportuno de depressão nos diabéticos é de extrema relevância clínica, especialmente levando-se em conta que a detecção e tratamento da depressão melhora o controle glicêmico (Campayo *et al.*, 2011).

1.3 Incretinomiméticos

A maioria dos pacientes com DM2 faz uso de antidiabéticos orais. Esses fármacos podem ter diferentes mecanismos. Biguanidas e tiazolidinedionas melhoram a ação periférica da insulina. Sulfonilureias, metiglinidas e incretinomiméticos estimulam a secreção de insulina.

Inibidores da α glicosidase reduzem a demanda de insulina pós prandial por dificultar a absorção de carboidratos (Qaseem *et al.*, 2012).

As incretinas são hormônios produzidos pelo trato gastrointestinal após a chegada do bolo alimentar no intestino. Uma vez liberadas, agem no pâncreas estimulando a secreção de insulina. O peptídeo semelhante ao glucagon tipo 1 (GLP-1) é uma incretina endógena secretada pelas células L, encontradas no íleo e no cólon. Esse peptídeo é metabolizado pela enzima DPP4 (Amori *et al.*, 2007; Koliaki e Doupis, 2011).

Incretinomiméticos são fármacos utilizados no tratamento do DM2. Eles mimetizam os efeitos das incretinas e são divididos em duas classes: agonistas dos receptores GLP-1, como a liraglutida, e inibidores da enzima DPP4, como a sitagliptina (Amori *et al.*, 2007).

1.4 Inibidores da DPP4

A DPP4 é uma enzima expressa na superfície da maioria dos tipos de células que desativa uma variedade de peptídeos, incluindo duas incretinas: polipeptídeo inibitório gástrico (GIP) e peptídeo semelhante ao glucagon tipo 1 (GLP-1). Os fármacos inibidores da DPP4, ao contrário dos agonistas do GLP-1, podem ser administrados por via oral.

Sitagliptina é um inibidor da DPP4 aprovado para tratamento do DM2 e largamente comercializado no Brasil. A eficácia da sitagliptina como antidiabético oral em monoterapia foi demonstrada em pelo menos dois ensaios clínicos randomizados e controlados (Aschner *et al.*, 2006; Raz *et al.*, 2006).

Estudos recentes têm documentado vários efeitos de incretinas sobre a estrutura e a função cerebral. Receptores de GLP-1 têm sido encontrados em áreas cerebrais, como hipocampo, e estão envolvidos na modulação hipocampal (Trapp e Hisadome, 2011).

Os estudos sobre os efeitos neurológicos de incretinas têm focado em modelos animais de doenças neurodegenerativas e transtornos de humor, condições que também são encontrados em populações com doenças metabólicas, como DM2. As alterações metabólicas e neuropsicológicas comuns representam uma via possível para tratamento de distúrbios neuropsiquiátricos, como a depressão, com incretinomiméticos (Mcintyre *et al.*, 2013).

Em recente estudo, análogos de GLP-1 foram propostos como possível terapêutica para o tratamento da Doença de Alzheimer, doença na qual a neuroinflamação tem papel crítico. Os resultados sugeriram que uma fração ativa do peptídeo melhorou as deficiências sinápticas induzidas por agentes nocivos relacionados com a inflamação na região 1 do Corno de Amon (CA1) do hipocampo em modelo animal (Iwai *et al.*, 2014).

Além disso, acredita-se que o GLP-1 participa da atividade neuronal como fator de crescimento e protege os neurônios de efeitos tóxicos. Em estudos pré-clínicos sobre Doença de Alzheimer, análogos de GLP-1 levaram a redução da apoptose, proteção dos neurônios contra o estresse oxidativo, proteção da plasticidade sináptica e formação de memória (Holscher, 2010).

1.5 Modelo animal de depressão induzida por reserpina

Na década de 1960, um modelo neuroquímico de depressão foi proposto com base em relatos clínicos de que a depleção de monoaminas induzida pela reserpina, fármaco utilizado para o tratamento da hipertensão arterial, causava efeitos adversos similares à depressão (Schildkraut, 1995). Esse efeito seria uma consequência da redução das concentrações de noradrenalina e serotonina no SNC. O modelo ficou conhecido posteriormente como “teoria monoaminérgica” para explicar a etiologia da depressiva (Schildkraut, 1995; Gao et al., 2013).

A reserpina apresenta alta afinidade para o transportador de monoamina vesicular tipo 2 (VMAT-2) e conseqüentemente bloqueia a ligação de monoamina ao seu local, inibindo seu armazenamento vesicular e impedindo a liberação de monoamina na fenda sináptica (Colpaert, 1987; Burger et al., 2005; Fuentes et al., 2007).

Dentre vários modelos animais utilizados para estudar a depressão, o modelo de depressão induzida por reserpina é amplamente difundido na literatura e bastante utilizado em laboratórios de estudo neurocomportamental. Nos modelos animais de camundongos, a injeção de reserpina causa alterações em testes comportamentais sugestivas de comportamento depressivo, como aumento no tempo de imobilidade nos testes de nado forçado e suspensão de cauda (O'neil e Moore, 2003; Ikram e Haleem, 2017).

2. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

Evidências sugerem uma relação bidirecional entre DM2 e depressão. Acredita-se que a depressão pode ser tanto consequência como fator de risco para o aparecimento de DM2 e existe uma comorbidade frequente entre as duas condições. Uma meta-análise de 24 estudos mostrou que a depressão foi significativamente associada com o descontrole glicêmico em indivíduos com diabetes (Lustman *et al.*, 2000).

Novos fármacos, como os inibidores da DPP4, direcionados para o tratamento do DM2, têm demonstrado uma ação importante no SNC. Receptores para GLP-1 são encontrados em várias áreas cerebrais e parecem desempenhar importantes ações neuroprotetoras (McClellan *et al.*, 2011).

Os incretinomiméticos, especialmente a sitagliptina, devido aos seus efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes e neuroprotetores, são hipoteticamente capazes de contribuir no tratamento de doenças neurodegenerativas e transtornos mentais. Estes efeitos, portanto, justificariam o uso destes fármacos na depressão que, por sua vez, está associada a inflamação e processos oxidativos do SNC.

Desse modo, a pesquisa da possível ação antidepressiva dos inibidores da DPP4 nos modelos de depressão induzida por reserpina traz uma perspectiva de redirecionamento do uso clínico desses fármacos. Vale salientar que o modelo de depressão induzida por reserpina é considerado um modelo de depressão resistente ao tratamento, pois alguns antidepressivos tradicionais não revertem o efeito depressogênico da reserpina. O estudo de novos fármacos para depressão resistente ao tratamento é fortemente encorajado, considerando-se a escassez atual de opções terapêuticas disponíveis.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

- Estudar os efeitos antidepressivos da sitagliptina em modelo de depressão induzida por reserpina em camundongos.

3.2 Específicos

- Estudar os efeitos em testes comportamentais de camundongos submetidos ao modelo de depressão induzida por reserpina e tratados posteriormente com sitagliptina nas doses de 3mg/kg e 6mg/kg.

- Determinar os níveis de peroxidação lipídica, glutathione reduzida, dosagem de proteínas totais, atividade da enzima superóxido dismutase, atividade da enzima mieloperoxidase, concentração de IL-6 e concentração de IL-4 em hipocampo, córtex pré frontal, e corpo estriado de camundongos submetidos ao modelo de depressão induzida por reserpina e tratados posteriormente com sitagliptina nas doses de 3mg/kg e 6mg/kg.

4. MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos *Swiss* fêmeas com peso entre 25 e 30 gramas provenientes do Biotério do Centro Universitário Unichristus. Os animais foram mantidos em ambiente padrão com temperatura controlada a $22\pm 1^{\circ}\text{C}$, ciclo claro/escuro de 12 horas e água e comida *ad libitum*. Foram necessários 60 animais divididos em 6 grupos de 10. O projeto de pesquisa foi devidamente enviado ao Comitê de Ética no Uso de Animais do Centro Universitário Unichristus e aprovado sob número de protocolo CEUA 013/17, tendo sido respeitadas as normas e o padrão ético estabelecidos dentro dos procedimentos permitidos para estudos com animais.

4.2. Drogas

Foram utilizadas as seguintes drogas: (a) reserpina (Sigma-Aldrich©, EUA) suspensa em solução salina contendo 0,1% dimetil sulfóxido e 0,3% tween 80, administrada uma vez ao dia na dose de 1 mg/kg por via subcutânea (SC); e (b) sitagliptina (Merck Sharp & Dohme©, ITA), administrada uma vez ao dia nas doses de 3 ou 6mg/kg por via SC.

4.3 Protocolo de tratamento

Os camundongos foram aleatoriamente divididos em seis grupos distintos com dez animais cada e receberam o seguinte protocolo de administração por três dias seguidos:

- a) Grupo controle + controle (CTL-CTL): animais receberam injeção por via SC de solução salina (0,9%) e, após 30 minutos, nova injeção por via SC de solução salina (0,9%);
- b) Grupo controle + sitagliptina 3 (CTL-SGT3): animais receberam injeção por via SC de solução salina (0,9%) e, após 30 minutos, injeção por via SC de sitagliptina (3mg/kg);
- c) Grupo controle + sitagliptina 6 (CTL-SGT6): animais receberam injeção por via SC de solução salina (0,9%) e, após 30 minutos, injeção por via SC de sitagliptina (6mg/kg);
- d) Grupo reserpina + controle (RES-CTL): animais receberam injeção por via SC de reserpina (1mg/kg) e, após 30 minutos, injeção por via SC de solução salina (0,9%);
- e) Grupo reserpina + sitagliptina 3 (RES-SGT3): animais receberam injeção por via SC de reserpina (1mg/kg) e, após 30 minutos, injeção por via SC de sitagliptina (3mg/kg);
- f) Grupo reserpina + sitagliptina 6 (RES-SGT6): animais receberam injeção por via SC de reserpina (1mg/kg) e, após 30 minutos, injeção por via SC de sitagliptina (6mg/kg).

No terceiro dia de tratamento, uma hora após a última administração dos fármacos, os animais foram submetidos aos seguintes testes comportamentais: campo aberto, placa perfurada, cruz elevada, suspensão de cauda e nado forçado.

Após os testes comportamentais, os animais foram sacrificados por decapitação. Em seguida, o hipocampo, o córtex pré-frontal e o corpo estriado foram dissecados e isolados para a realização dos testes neuroquímicos.

4.4 Testes de comportamento

4.4.1 Teste do campo aberto – Avaliação da atividade exploratória do animal

No teste do campo aberto, utiliza-se uma estrutura de acrílico com paredes transparentes e um piso preto de tamanho 30x30x15cm dividido em nove quadrantes iguais. Os parâmetros observados são: (a) número de cruzamentos completos, isto é, com as quatro patas, entre os quadrantes (atividade locomotora espontânea), (b) número de comportamentos de autolimpeza (“*grooming*”) e (c) número de levantamentos (“*rearing*”). Os registros são realizados durante um tempo de cinco minutos, contados após um minuto de habituação do animal.

4.4.2 Teste de suspensão da cauda – Avaliação da atividade antidepressiva do fármaco

No teste de suspensão da cauda, suspende-se os camundongos a 50cm do chão por uma fita fixada a 1cm a partir da ponta da cauda. Registra-se o tempo de imobilização do animal durante um período de cinco minutos. Considera-se imóvel o camundongo que permanecer passivamente suspenso. Cada animal é testado individualmente (Steru *et al.*, 1985).

4.4.3 Teste do nado forçado – Avaliação da atividade antidepressiva do fármaco

No teste do nado forçado, o procedimento consiste em colocar os animais individualmente em cilindros plásticos (altura de 35cm e diâmetro de 24cm), contendo 13,5cm de altura de água. Registra-se, por um período de cinco minutos, o tempo total de imobilização do animal. Considera-se imóvel o animal que faz apenas os movimentos mínimos necessários para manter a cabeça fora da água. Além disso, também podem ser eventualmente observados: (a) o tempo de latência até o início do comportamento de imobilidade, contado a partir do segundo minuto, e (b) o comportamento de “*climbing*”, definido como a tentativa de escalada do animal com suas patas dianteiras contra as paredes do cilindro (Porsolt *et al.*, 1977; Borsini e Meli, 1988).

4.4.4 Teste de cruz elevada – Avaliação da atividade ansiolítica do fármaco

No teste de cruz elevada, utiliza-se uma estrutura elevada a 70cm do chão com dois braços cruzados em que um dos braços é fechado e outro aberto (tamanho 50x10x30cm). Os parâmetros registrados são o número de entradas no braço aberto (NEBA), tempo de permanência no braço aberto (TPBA), número de entradas no braço fechado (NEBF) e o tempo de permanência no braço fechado (TPBF) (Lister, 1987; Teixeira *et al.*, 2000).

4.4.5 Teste da placa perfurada – Avaliação da atividade ansiolítica do fármaco

O teste da placa perfurada consiste em colocar o camundongo sobre uma placa perfurada (tamanho 50x50cm) com 16 furos de 2cm de diâmetro equidistantes uns dos outros e das bordas da placa. Registram-se, durante cinco minutos, o número de vezes em que o animal introduz o focinho nos orifícios e o tempo de permanência em cada orifício (Clark *et al.*, 1971).

4.5 Testes neuroquímicos

Uma hora após o último dia de tratamento, os animais foram sacrificados por rápida decapitação e seus cérebros foram removidos e lavados em salina gelada. As regiões cerebrais do hipocampo (HP), córtex pré-frontal (PF) e corpo estriado (CE) foram dissecadas, congeladas e armazenadas a -70°C até serem utilizadas para os ensaios. Os tecidos foram homogeneizados em 20 volumes do tampão de estudo, e então centrifugados a 14000 vezes por 10 minutos. O *pellet* resultante foi lavado, recentrifugado e ressuspendido em tampão para adição ao ensaio.

4.5.1 Determinação dos níveis de peroxidação lipídica

Os níveis de peroxidação lipídica foram estimados pelas concentrações de malondialdeído (MDA) por meio do ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico - *thiobarbituric acid reactive substances* (TBARS). (Huong *et al.*, 1998)

Brevemente, as áreas cerebrais foram homogeneizadas em 10% título massa/volume com tampão fosfato de sódio 50mM, pH 7.4. Depois, 63 µl do homogenato foi adicionado a 100 µl de ácido perclórico 35%. As amostras foram então centrifugadas a 5.000 rpm por 10 minutos. Em seguida, 150µl de sobrenadante foi coletado e misturado com 50 µl de ácido tiobarbitúrico 1,2%, sendo então aquecidos em banho quente por 30 minutos. As amostras foram resfriadas e, após isso, a absorbância foi lida em microplacas 96 poços em leitor de espectrofotometria (Asys® UVM 340) a 535nm. Os resultados foram expressos em µmol MDA/mg de tecido.

4.5.2 Determinação dos níveis de glutatona reduzida (GSH)

O método foi baseado na reação do 2-ácido nitro benzoico (DTNB) com os grupos tióis livres.(Sedlak e Lindsay, 1968) Brevemente, as áreas cerebrais foram homogeneizadas em 10% título massa/volume com tampão fosfato de sódio 50mM pH 7,4. Depois, os sobrenadantes foram coletados e misturados com tampão Tris HCl 0,4M pH 8,9 com 0,01M de DTNB. A absorvância das amostras foi imediatamente lida em microplacas 96 poços em leitor de espectrofotometria (Asys® UVM 340) a 412nm. Os resultados foram expressos em ng GSH/mg de tecido.

4.5.3 Dosagem de proteínas totais

A concentração de proteínas totais nas amostras foi determinada pelo emprego do reagente de *Bradford* (*Bio-Rad Protein Assay – Dye Reagent Concentrate - BioRad Laboratories®*, Hercules, CA, USA). Nessa reação, na presença de proteínas, ocorre mudança de coloração da solução ácida de *Coomassie Brilliant Blue G-250* detectada para leituras próximas do comprimento de onda de 595nm. Com isso, foram pipetados 160µL de amostra e 40µL de solução de *Bradford* nas placas e a leitura foi feita por espectrofotômetro (Asys® UVM 34) a 595nm, utilizando-se uma curva de calibração de albumina bovina sérica (BSA) de 0,2 a 1,0 mg/ml.

4.5.3 Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)

A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi realizada de acordo com método simples.(Sun *et al.*, 1988) Nesse ensaio, os homogenatos de cérebros foram centrifugados por 20 minutos a 12000 rpm, 4°C, e o sobrenadante foi coletado. Em câmara escura, 1 ml do tampão de reação (tampão fosfato de sódio 50mM, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 100nM e L-metionina 13mM, pH 7,8) foi misturado a 30 µl do sobrenadante, com 50µl de azul de nitrotetrazólio (NBT) 75µM e 300µl de riboflavina 2µM. Os tubos contendo a solução foram expostos a uma lâmpada fluorescente de 15 W durante 15 minutos. A absorvância foi então determinada utilizando um leitor de microplacas (Asys® UVM 34) a 560nm. Os resultados foram expressos como unidades de SOD necessárias para inibir a taxa de redução de NBT em 50 por cento, isto é, unidades de enzima por µg de proteína (U/µg de proteína).

4.5.4 Atividade da enzima mieloperoxidase (MPO)

A atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) fornece um parâmetro oxidativo em condições inflamatórias. A MPO é uma enzima presente nos grânulos de neutrófilos, sendo comumente utilizada como marcador de migração e ativação de neutrófilos nos tecidos.(Gray *et al.*, 2008) Neste ensaio, o peróxido de hidrogênio é clivado por meio da MPO presente nas amostras teciduais. O radical oxigênio resultante combina-se com diidrocloreto de θ -dianisidina

que é convertido a um composto colorido acastanhado. O aparecimento deste composto, ao longo do tempo, é medido por espectrofotômetro para determinar o conteúdo de MPO das amostras.(Pulli *et al.*, 2013) As áreas cerebrais foram homogeneizadas em tampão fosfato 50mM com brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) 0,5%, ph 6,0. Em seguida, os homogenatos foram centrifugados (14000 rpm, 4°C) por 2 minutos. Foram retirados 30µL do sobrenadante e adicionados a placa de 96 poços com 200µL do tampão de reação, contendo 0,167 mg/ml de hidrocloreto de θ -dianisidina e 0,0005% de peróxido de hidrogênio. A absorbância foi medida nos tempos 0 e 3 minutos com comprimento de onda de 450nm. O resultado foi expresso em U/min/ug de proteína.

4.5.4 Determinação das concentrações de interleucina-6 (IL-6) e interleucina-4 (IL-4)

As áreas cerebrais foram homogeneizadas em dez volumes de tampão PBS, pH 7,4 e centrifugadas a 10000rpm durante 30 minutos a 4°C. Foi coletado o sobrenadante e a concentração das citocinas foi determinada em amostras de 50µL por reação imunoenzimática (ELISA) (BioLegends®, San Diego, CA, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Os resultados foram expressos em pg/mg de tecido.

As concentrações de interleucina-6 e interleucina-4 foram realizadas apenas na região cerebral do hipocampo dos animais pertencentes aos grupos CTL-CTL, CTL-SGT6, RES-CTL e RES-SGT6.

4.6 Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando-se o software *GraphPad Prism*® versão 7.04 para o Sistema Operacional Windows. Na análise de dados paramétricos, aplicaram-se os testes Análise de Variância (*one-way* ANOVA) e, como *post hoc*, teste de Tukey para comparações múltiplas. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas em $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Resultados dos testes de comportamento

5.1.1 Resultados do teste de campo aberto

Na atividade locomotora espontânea (Figura 1A) nenhuma alteração foi observada em relação ao grupo controle e reserpina. Contudo, os animais que receberam somente SGT 6 mg/kg (CTL-SGT6) demonstraram um aumento no número de travessias dos quadrantes quando comparados aos grupos controle (CTL-CTL) e reserpina (RES-CTL) [F (5, 55) = 4,025; P=0,0035].

Nenhum efeito foi observado nos testes de *rearing* [F (5, 55) = 1,057; P = 0,3941] ou *grooming* [F (5, 55) = 1,057; P = 0,3941] nos grupos estudados quando comparados ao controle (Figura 1B e 1C, respectivamente).

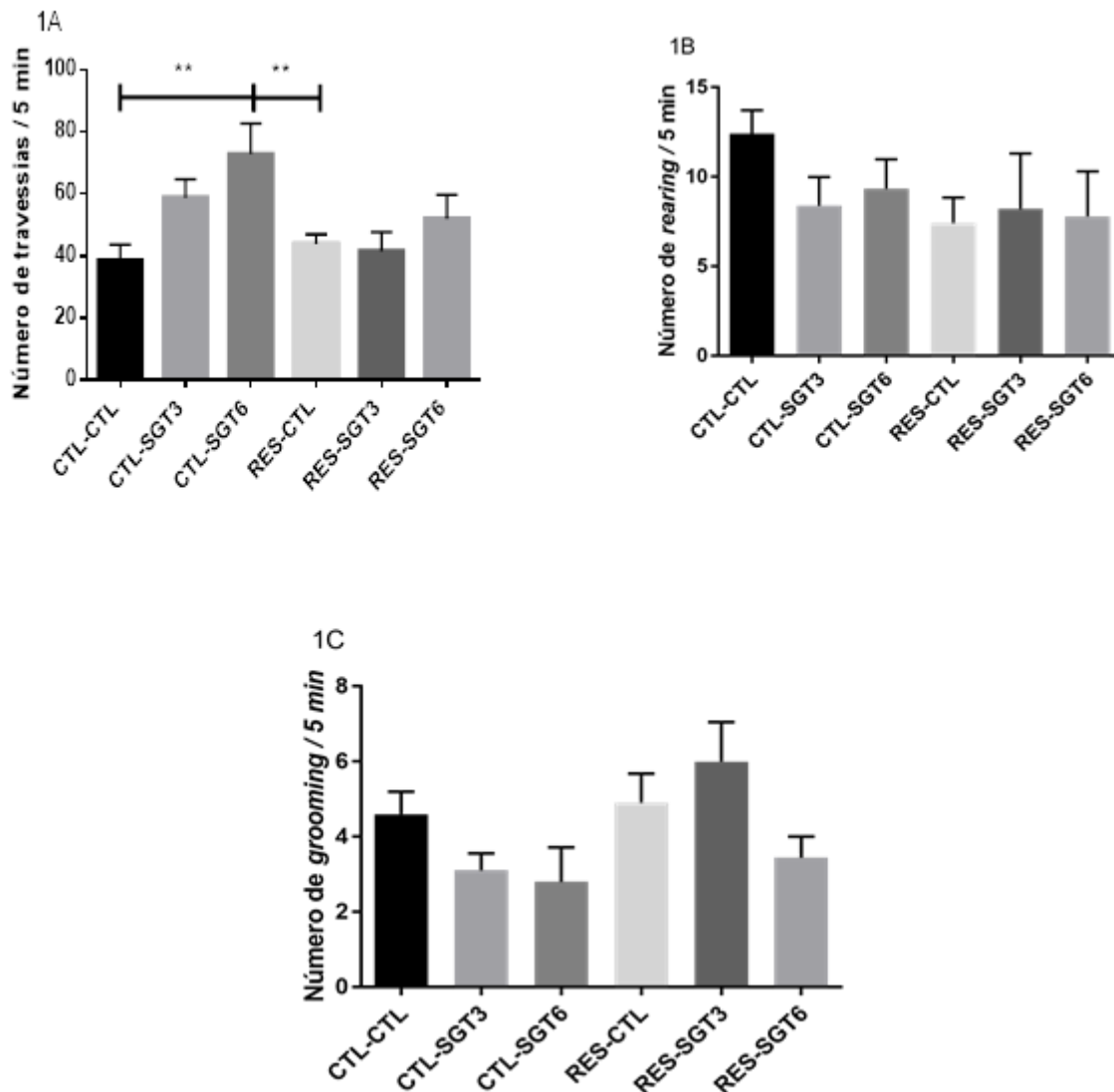


Figura 1. Número de cruzamentos (1A), rearing (1B) e grooming (1C) dos animais submetidos ao modelo de depressão induzida pela administração de reserpina e posteriormente tratados com sitagliptina (SGT 3 ou SGT 6 mg/Kg). Cada barra representa a média \pm erro padrão da média-EPM ($n = 6-20$ animais por grupo). Os dados foram analisados por one-way ANOVA seguido pelo teste post hoc Tukey. Dois asteriscos (**) indicam $p \leq 0,01$.

5.1.2 Resultados dos testes de suspensão da cauda e nado forçado

Foi observado um aumento no tempo de imobilização dos animais, após a administração da reserpina, em relação ao grupo controle (CTL-CTL) tanto no teste de suspensão de cauda [$F(5, 55) = 17,15; P < 0,0001$] quanto no teste do nado forçado [$F(5, 55) = 14,78; P < 0,0001$].

Esse efeito da reserpina foi revertido pela administração associada com sitagliptina, na maior dose, no teste de suspensão de cauda (Figura 2A) e, em ambas as doses, no teste de nado forçado (Figura 2B).

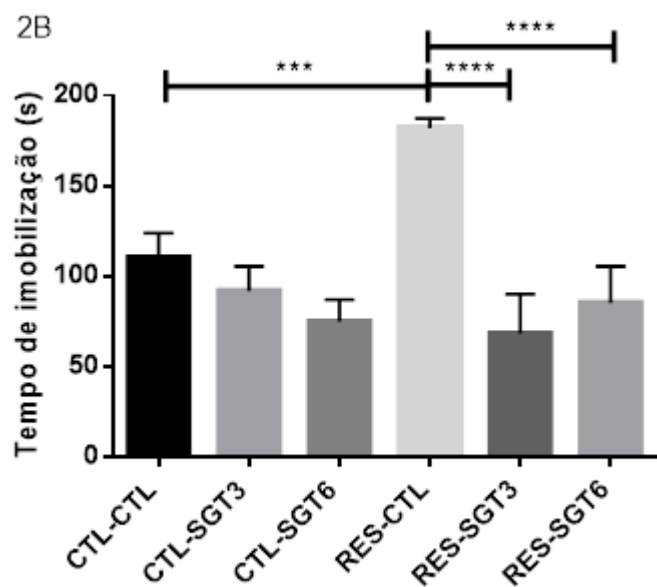
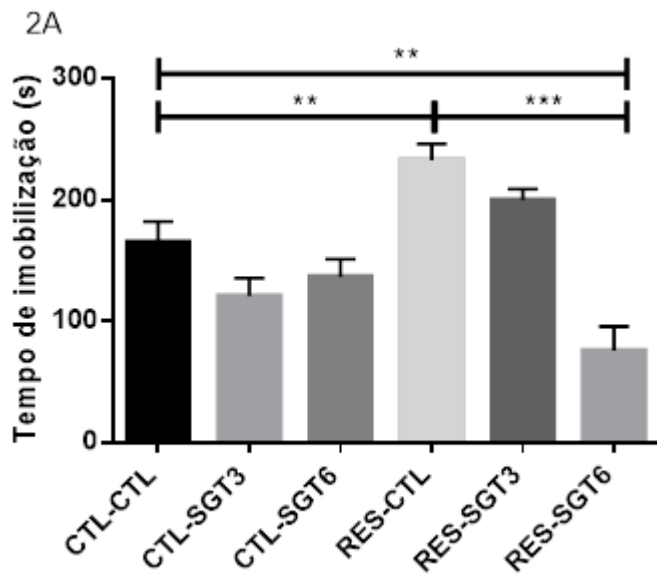


Figura 2. Tempo de imobilização no teste suspensão de cauda (2A) e nado forçado (2B) dos animais submetidos ao modelo de depressão induzida pela administração de reserpina e posteriormente tratados com sitagliptina (SGT 3 ou SGT 6 mg/Kg). Cada barra representa a média \pm erro padrão da média (n = 5-20 animais por grupo). Os dados foram analisados por one-way ANOVA seguido pelo teste post hoc Tukey. Dois asteriscos (**) indicam $p \leq 0,01$ e três asteriscos (***) indicam $p \leq 0,001$ e quatro asteriscos (****) indicam $p \leq 0,0001$.

5.1.3 Resultados dos testes de cruz elevada e placa perfurada

Nenhum efeito foi observado no teste de cruz elevada em relação ao grupo controle (Figura 3), exceto nos animais tratados com reserpina e sitagliptina 6mg/kg (RES-SGT6) que apresentaram um aumento no TPBA [F (5, 55) = 4,197; P=0,0027] quando comparados ao grupo tratado apenas com reserpina (Figura 3B).

Em relação ao teste da placa perfurada, nenhum efeito foi observado no número de mergulhos (Figura 4A) em relação ao grupo controle [F(5,55); P= 0,7257]. Contudo, um aumento no tempo de permanência no orifício (Figura 4B) foi observado no grupo RES-STG6 quando comparados aos animais do grupo RES-CTL [F (5, 55) = 5,193; P = 0,0006].

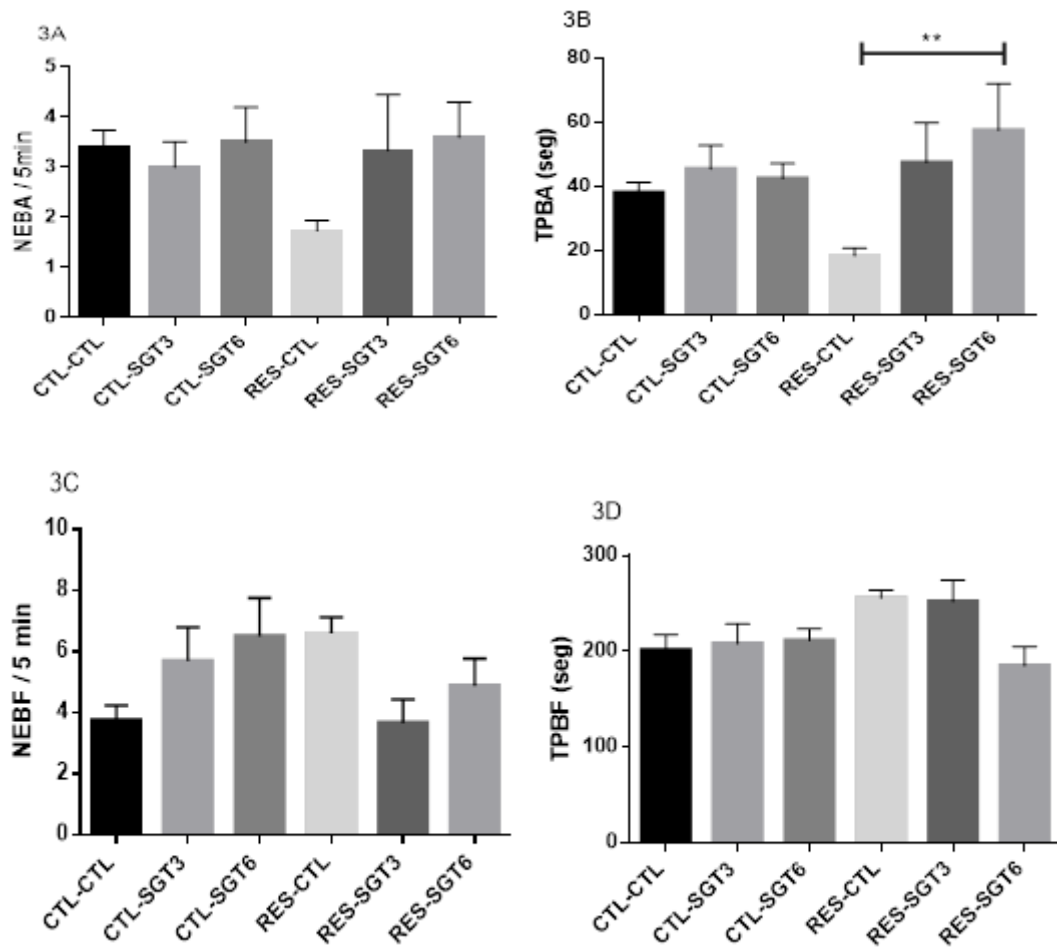
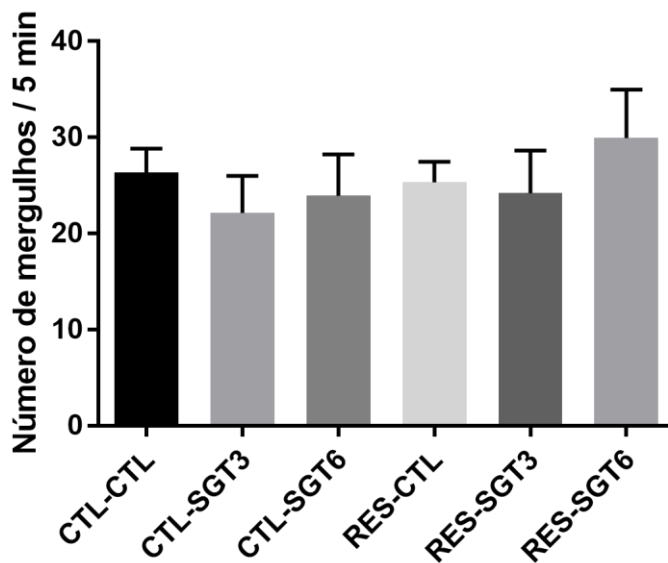


Figura 3. NEBA (A), TPBA (B), NEBF (C) e TPBF (D) no teste de cruz elevada dos animais submetidos ao modelo de depressão induzida pela administração de reserpina e posteriormente tratados com sitagliptina (3 ou 6 mg/Kg). Cada barra representa a média \pm erro padrão da média ($n = 6-20$ animais por grupo). Os dados foram analisados por one-way ANOVA seguido pelo teste post hoc Tukey. Dois asteriscos (**) indicam $p \leq 0,01$.

4A



4B

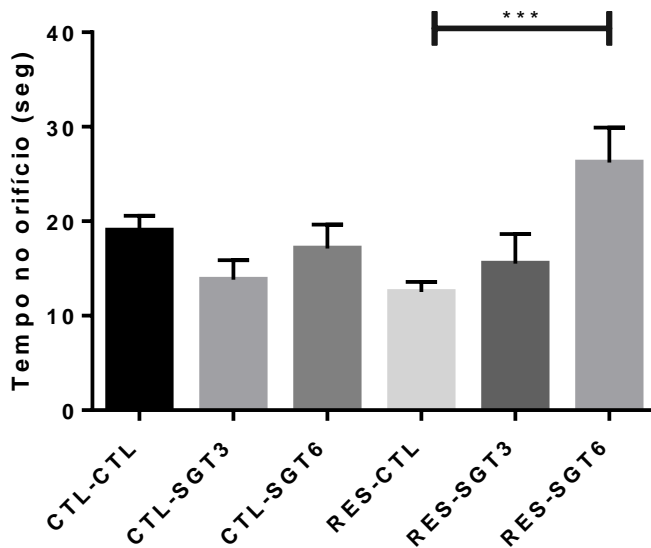


Figura 4. Número de mergulhos (A) e tempo de permanência nos orifícios (B) no teste de placa perfurada dos animais submetidos ao modelo de depressão induzida pela administração de reserpina e posteriormente tratados com sitagliptina (3 ou 6 mg/Kg). Cada barra representa a média \pm erro padrão da média (n = 6-20 animais por grupo). Os dados foram analisados por one-way ANOVA seguido pelo teste post hoc Tukey. Três asteriscos (***) indica $p \leq 0,001$.

5.2 Resultados dos testes neuroquímicos

5.2.1 Resultados dos níveis de peroxidação lipídica

Reserpina aumentou as concentrações de MDA no hipocampo [F (5, 40) = 11; P<0,0001], córtex pré-frontal [F (5, 43) = 4,916; P=0,0012] e corpo estriado [F (5, 43) = 22,54; P<0,0001] quando comparado ao grupo controle. O tratamento com sitagliptina, especialmente na dose 6mg/kg, reverteu esse efeito nas três áreas cerebrais. Os resultados estão expostos na Figura 5.

5.2.2 Resultados dos níveis de glutatona reduzida

Uma diminuição significativa foi observada das concentrações de GSH no grupo tratado com reserpina em relação ao controle no hipocampo [F (5, 42) = 8,395; P<0,0001] e no córtex pré-frontal [F (5, 43) = 6,033; P=0,0003]. O tratamento com sitagliptina, somente na dose 6mg/kg, foi capaz de reverter esse efeito nas três áreas cerebrais. Os resultados estão expostos na Figura 6.

5.2.3 Resultados da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)

Reserpina só aumentou a atividade da SOD no hipocampo [F (5, 39) = 5,424; P=0,0007] quando comparado ao grupo controle. Contudo um aumento dessa enzima também foi observado no córtex pré-frontal [F (5, 38) = 4,682; P=0,0020] após associação de RES-SGT3 em relação ao grupo controle (Figura 7).

5.2.4 Resultados da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO)

Foi observado um aumento da atividade enzimática da MPO nos animais tratados com reserpina, em relação ao grupo controle [F (5, 37) = 8,585; P<0,0001], somente no hipocampo. Esse efeito foi revertido após a administração de sitagliptina, tanto na dose de 3mg/kg (p=0,0140) quanto na dose de 6mg/kg (p= 0,0053). Não houve diferença entre os grupos em relação às regiões cerebrais do córtex pré-frontal [F (5, 41) = 1,585; P=0,1857] e do corpo estriado [F (5, 40) = 5,24; P=0,0009]. Os resultados estão expostos na Figura 8.

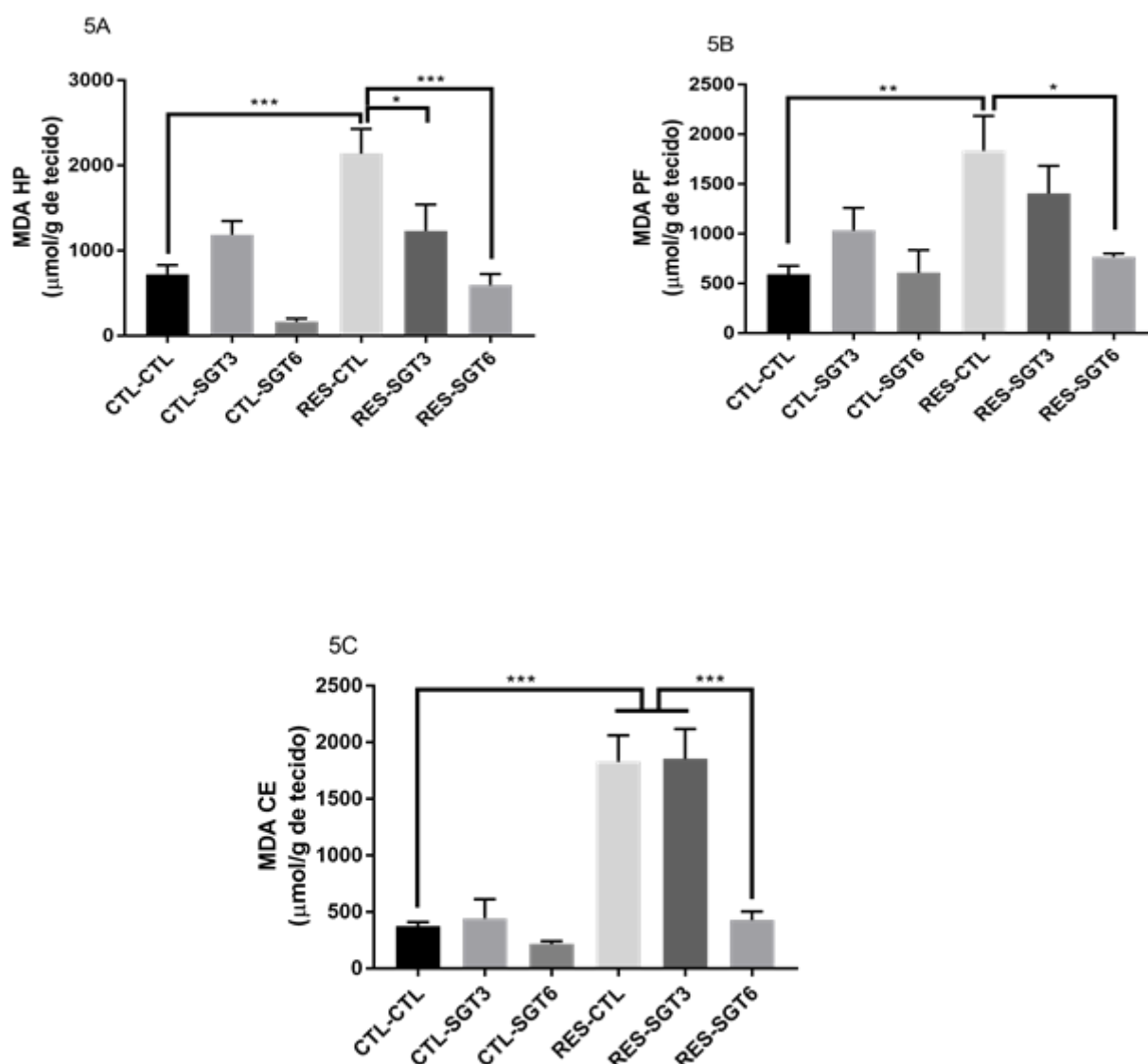


Figura 5. Concentração de malondialdeído (MDA) no hipocampo-HP (5A), córtex pré frontal-PF (5B) e corpo estriado-CE (5C) dos animais submetidos ao modelo de depressão induzida pela administração de reserpina e posteriormente tratados com sitagliptina (3 ou 6 mg/Kg). Cada barra representa a média \pm erro padrão da média ($n = 7-10$ animais por grupo). Realizou-se one-way ANOVA seguido pelo teste post hoc Tukey. Um asterisco (*) indica $p \leq 0.05$, dois asteriscos (**) indicam $p \leq 0.01$ e três asteriscos (***) indicam $p \leq 0.001$.

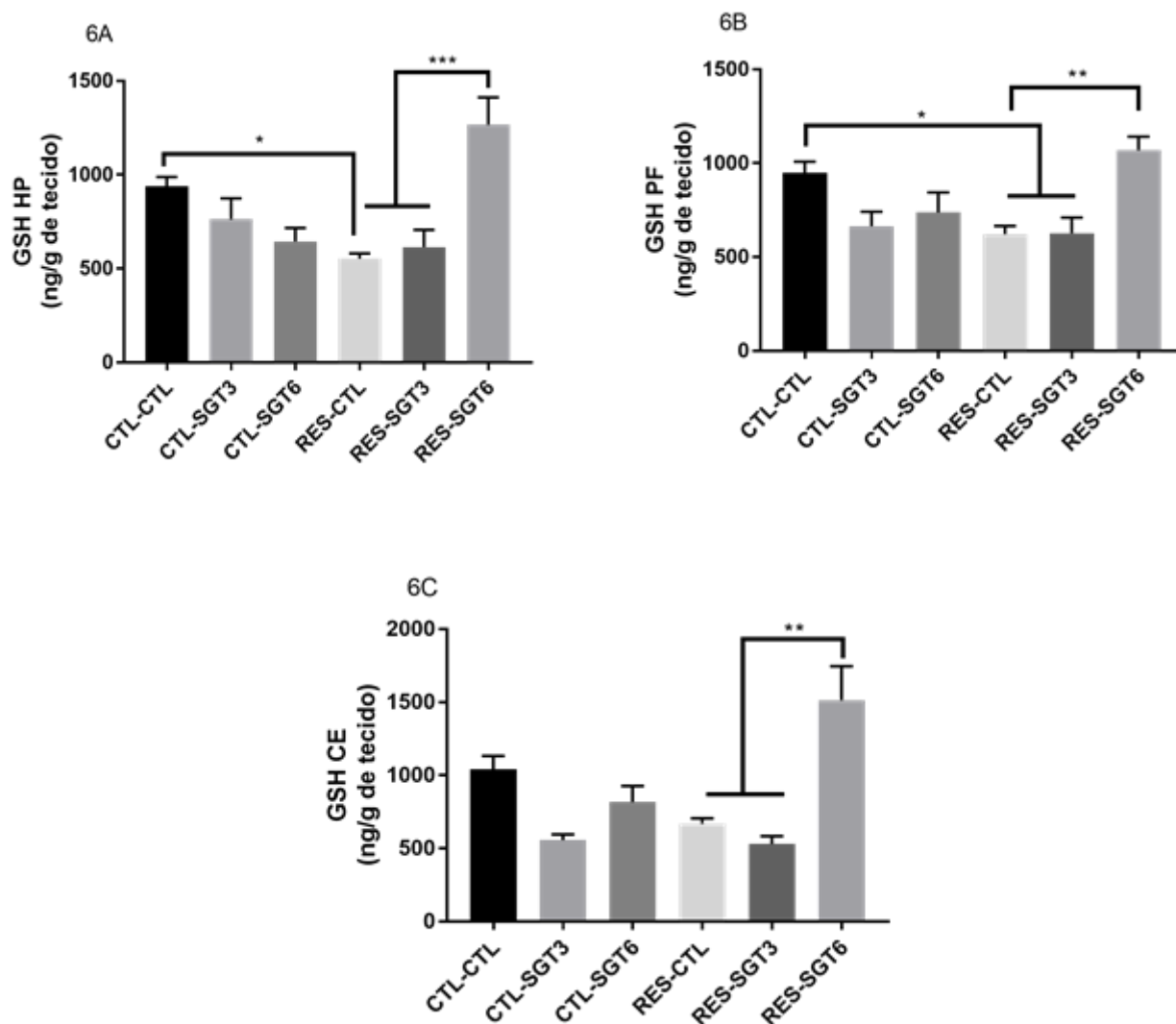


Figura 6. Concentração de glutatona reduzida (GSH) no hipocampo-HP (6A), córtex pré-frontal-PF (6B) e corpo estriado-CE (6C) dos animais submetidos ao modelo de depressão induzida pela administração de reserpina e posteriormente tratados com sitagliptina (3 ou 6 mg/Kg). Cada barra representa a média \pm erro padrão da média ($n = 8-10$ animais por grupo). Realizou-se one-way ANOVA seguido pelo teste post hoc Tukey. Um asterisco (*) indica $p \leq 0.05$, dois asteriscos (**) indicam $p \leq 0.01$ e três asteriscos (***) indicam $p \leq 0.001$.

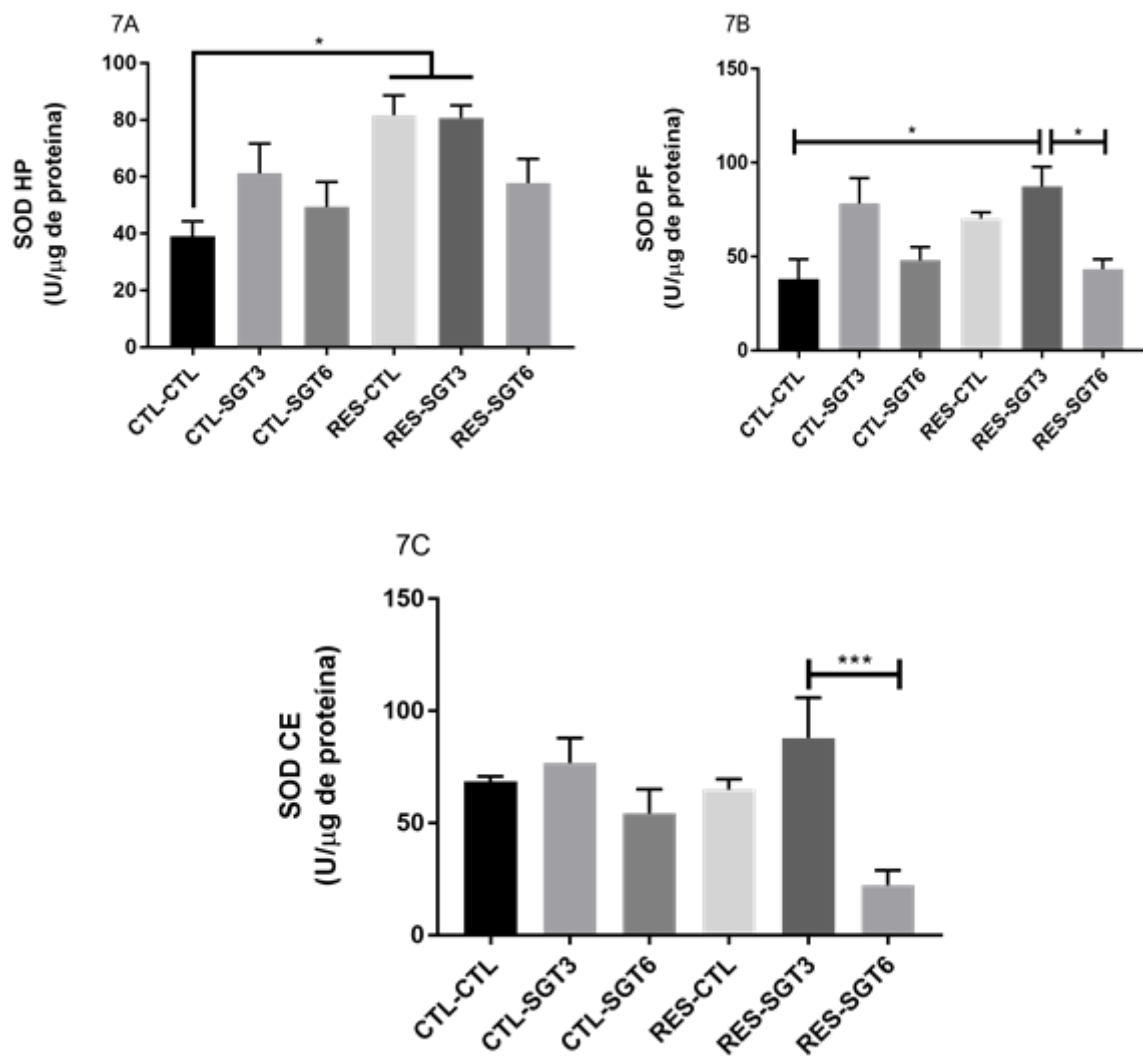


Figura 7. Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) no hipocampo (7A), córtex pré-frontal (7B) e corpo estriado (7C) dos animais submetidos ao modelo de depressão induzida pela reserpina e posteriormente tratados com sitagliptina (3 ou 6 mg/Kg). Cada barra representa a média \pm erro padrão da média ($n = 7-8$ animais por grupo). Realizou-se one-way ANOVA seguido pelo teste post hoc Tukey. Um asterisco (*) indica $p \leq 0.05$ e três asteriscos (***) indicam $p \leq 0.001$.

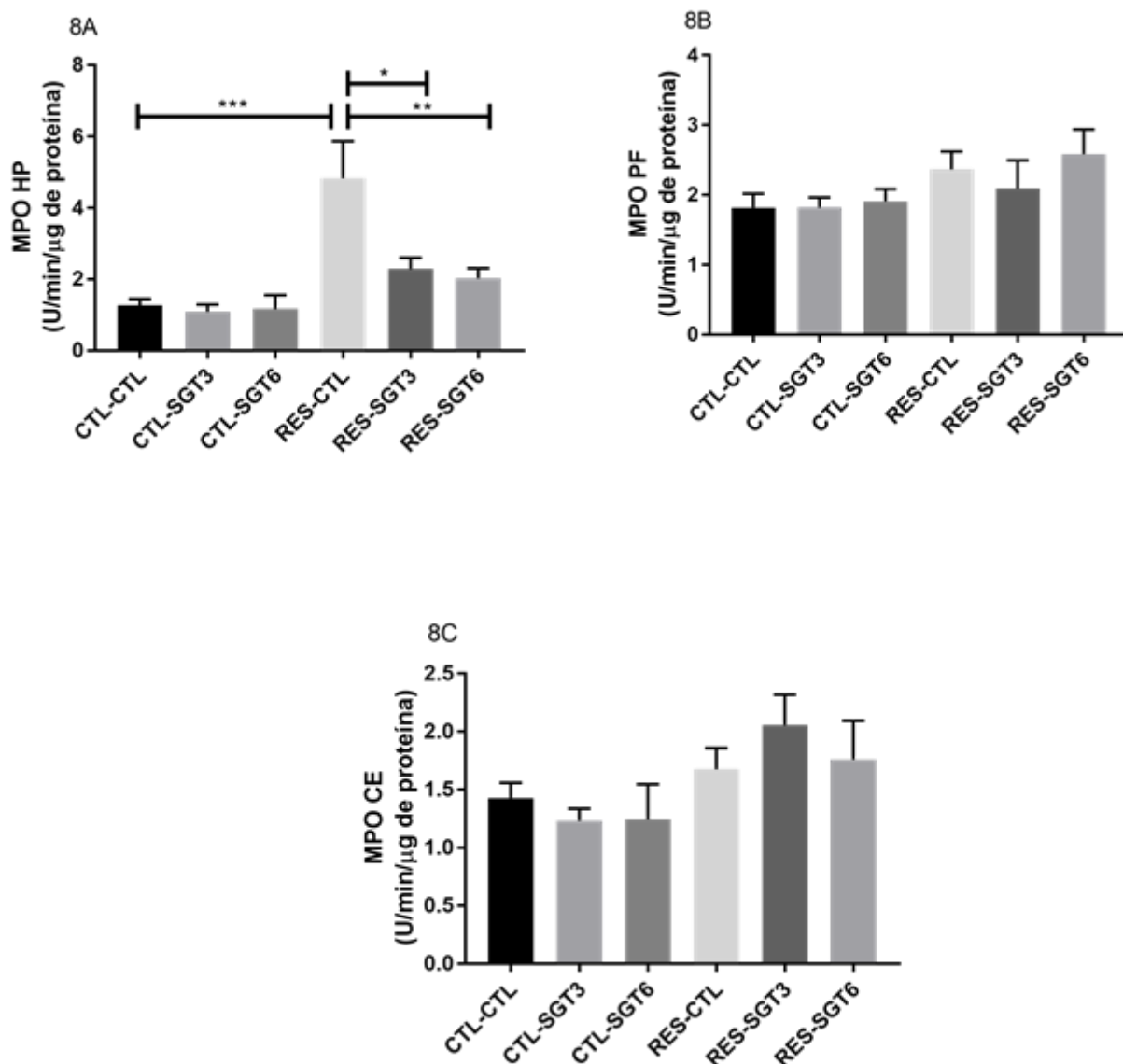


Figura 8. Atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) no hipocampo-HP (8A), córtex pré-frontal-PF (8B) e corpo estriado-CE (8C) dos animais submetidos ao modelo de depressão induzida pela administração de reserpina e posteriormente tratados com sitagliptina (3 ou 6 mg/Kg). Cada barra representa a média \pm erro padrão da média (n = 6-11 animais por grupo). Realizou-se one-way ANOVA seguido pelo teste post hoc Tukey. Um asterisco (*) indica $p \leq 0.05$, dois asteriscos (**) indicam $p \leq 0.01$ e três asteriscos (***) indicam $p \leq 0.001$.

5.2.5 Resultados das concentrações de interleucina-6 (IL-6) e interleucina-4 (IL-4)

Houve diferença estatisticamente significativa em relação ao efeito dos tratamentos tanto nas concentrações de IL-6 [$F(3, 22) = 7,722$; $P=0,0011$] quanto de IL-4 [$F(3, 30) = 5,366$; $P=0,0044$] no hipocampo. As concentrações de IL-6 apresentaram tendência a aumentar no grupo tratado com reserpina em relação ao controle, sem significância estatística ($p=0,1017$). Esse efeito foi revertido após administração de sitagliptina 6mg/kg [$F(3, 22) = 7,722$; $P=0,0011$]. As concentrações de IL-4 aumentaram no grupo RES-STG6 [$F(3, 30) = 5,366$; $P=0,0044$] em relação aos grupos CTL-CTL e RES-CTL. Os resultados estão expostos na Figura 9.

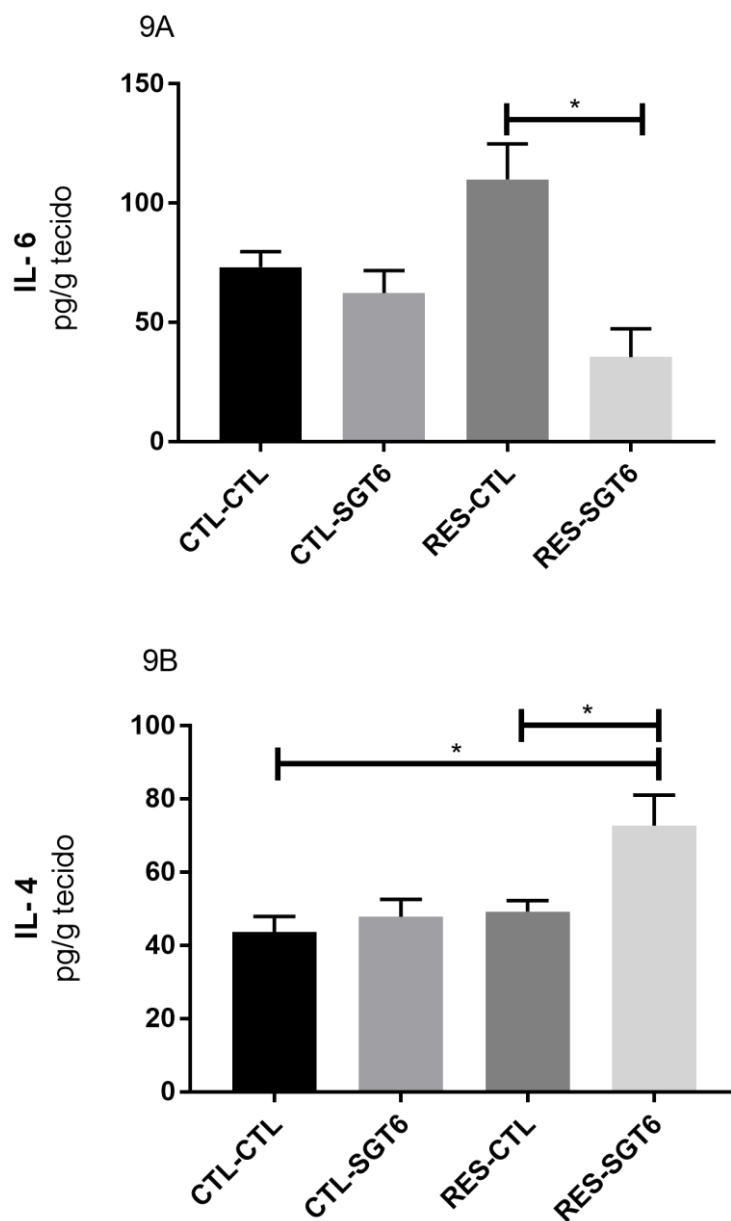


Figura 9. Concentrações de IL-6 (9A) e IL-4 (9B) no hipocampo dos animais submetidos ao modelo de depressão induzida pela administração de reserpina e posteriormente tratados com sitagliptina (3 ou 6 mg/Kg). Cada barra representa a média \pm erro padrão da média ($n = 7-10$ animais por grupo). Realizou-se one-way ANOVA seguido pelo teste post hoc Tukey. Um asterisco (*) indica $p \leq 0.05$.

6. DISCUSSÃO

O presente estudo investigou os efeitos antidepressivos, antioxidante e anti-inflamatório da sitagliptina em modelo animal de depressão induzida pela administração repetida de reserpina. Sitagliptina é um fármaco já utilizado na clínica da diabetes e tem como mecanismo de ação a inibição da enzima dipeptidilpeptidase 4, que é responsável pela degradação do GLP1 endógeno.

Evidências têm mostrado que o GLP-1 também é produzido no cérebro (Alvarez *et al.*, 1996) particularmente a partir do núcleo do trato solitário (Larsen *et al.*, 1997), área postrema e tronco cerebral caudal (Hamilton e Holscher, 2009). Além disso, o GLP-1 aumenta o crescimento de neuritos e protege contra a lesão oxidativa em células neuronais cultivadas (Perry *et al.*, 2007). O receptor GLP-1R é amplamente expresso em muitas regiões do SNC e desempenha um papel importante na regulação da plasticidade neuronal e da sobrevivência celular. Camundongos superexpressando o GLP-1R no hipocampo desenvolveram aumento no crescimento de neuritos e mostraram melhora nos testes de aprendizado (During *et al.*, 2003). Esses estudos sugerem que os incretinomiméticos possuem importantes ações no SNC, ainda não bem estabelecidas, e que o estudo desse sistema de incretinas pode ajudar no desenvolvimento, ou redirecionamento, de fármacos para condições neuropsiquiátricas, como a depressão.

O tratamento farmacológico atual da depressão é focado predominantemente no aumento da transmissão monoaminérgica. Sabe-se que, além da deficiência de neurotransmissores, muitos outros mecanismos neurobiológicos estão subjacentes à fisiopatologia depressiva, incluindo alterações inflamatórias, oxidativas e diminuição de fatores neurotróficos. Desse modo, fármacos com mecanismos de ação diversos são necessários para melhorar as taxas de resposta e remissão dos pacientes deprimidos. Nesse contexto, há necessidade pela pesquisa de novos fármacos com ação antidepressiva.

Os resultados da presente pesquisa demonstraram que a administração repetida de reserpina induziu um quadro comportamental de depressão-*like*, demonstrado pelo aumento do tempo de imobilidade dos animais tanto no teste de suspensão de cauda quanto no nado forçado, sem alterar a atividade locomotora dos animais. Essa ação foi revertida pela associação com a sitagliptina, principalmente na maior dose (6 mg/kg).

Vários estudos têm demonstrado que a administração de reserpina causa aumento no tempo de imobilização do teste de nado forçado e suspensão de cauda (Antkiewicz-Michaluk *et al.*, 2014; Ikram e Haleem, 2017; Bakhtiarpoor *et al.*, 2018). Esses testes são conhecidos

como *screening* farmacológico para o estudo de fármacos com ação antidepressiva. Como comentado anteriormente, a reserpina é um bloqueador irreversível do transportador de monoamina vesicular 2 (VMAT-2). Essa ação leva a uma inibição do transporte de monoaminas para as vesículas de armazenamento (Guillot e Miller, 2009; Wimalasena, 2011). Como resultado, as terminações nervosas perdem a capacidade de concentrar e armazenar as monoaminas, que são posteriormente metabolizadas no citoplasma (Metzger *et al.*, 2002). Conseqüentemente ocorre uma redução da quantidade de monoaminas disponíveis na fenda sináptica para o impulso ser transmitido (Metzger *et al.*, 2002; Ji *et al.*, 2007). A reversão do efeito depressor da reserpina pela sitagliptina sugere que as catecolaminas estão envolvidas na ação antidepressiva desse fármaco.

Um estudo utilizando modelo de depressão em ratos pela administração de lipopolissacarídeo (LPS) demonstrou que a exendina-4, agonista do receptor de GLP-1, também apresentou efeito antidepressivo no teste de nado forçado. Segundo os autores, a ação antidepressiva desse incretinomimético estaria relacionada ao *turnover* da dopamina no corpo estriado (Ventorp *et al.*, 2017).

Nos nossos resultados a reserpina não funcionou como modelo para indução de ansiedade. Contudo, a sitagliptina na maior dose e somente quando associada à reserpina, aumentou o TPBA (*plus maze*) e o tempo de permanência no orifício (*role bord*) quando comparado a reserpina. Entretanto, esses resultados não foram diferentes do grupo controle. Assim, podemos afirmar que a sitagliptina não apresentou efeito nos testes de ansiedade estudados nessa pesquisa.

De forma semelhante aos nossos resultados, Kamble *et al.* (2016) verificaram que a sitagliptina (6 mg/kg) teve um efeito antidepressivo nos modelos de suspensão de cauda e nado forçado, sem alterar os testes comportamentais para ansiedade. Segundo esses autores, o efeito antidepressivo da sitagliptina pode ser consequência direta do aumento da concentração de GLP-1. Além disso, é importante notar que outros peptídeos e substratos da DPP-4 com ações neuroprotetoras e neurogênicas, tais como polipeptídeo ativador da adenilato ciclase da pituitária, peptídeo insulínico dependente da glucose e factor-1 derivado de células estromais, também podem estar envolvidos na ação antidepressiva mediada pelo fármaco (Kamble *et al.*, 2016).

Como alterações oxidativas estão relacionadas à fisiopatologia da depressão (Ng *et al.*, 2008), decidimos pesquisar os efeitos da sitagliptina no estresse oxidativo através do estudo da

peroxidação lipídica, GSH, SOD e MPO no CPF, HC e CE de camundongos utilizando o modelo de depressão induzido por reserpina.

O resultado desse estudo encontrou que a reserpina apresentou efeitos oxidantes demonstrado pelo aumento de MDA, SOD e MPO e redução de GSH em todas as áreas estudadas. Esses resultados estão de acordo com a literatura (Bilska *et al.*, 2007; Teixeira *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2013), pois verificou-se que a administração de reserpina causa estresse oxidativo no CPF, HC ou CE. Nossos resultados fortalecem o modelo de depressão pela administração de reserpina como significativo para estudar diferentes mecanismos relacionados à depressão, tal como o estresse oxidativo.

Estudos pré-clínicos e clínicos mostram que na depressão existe uma diminuição nas defesas antioxidantes e aumento de espécies reativas de oxigênio em várias regiões cerebrais (Khanzode *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2016). Vale salientar que a falha das defesas antioxidantes leva a peroxidação lipídica. Por isso, alguns estudos mostraram aumento da lipoperoxidação e redução de GSH em modelos animais de depressão induzidos por reserpina (Bakhtiarpoor *et al.*, 2018), corticosterona (Silva *et al.*, 2016) e LPS (Mello *et al.*, 2013), bem como em pacientes deprimidos comparados a controles saudáveis (Khanzode *et al.*, 2003; Galecki *et al.*, 2009). Assim, nossos resultados no aumento da peroxidação lipídica e diminuição dos níveis de GSH, no modelo de depressão por reserpina, estão de acordo com evidências clínicas e pré-clínicas de alterações nos lipídios das membranas cerebrais e na concentração de GSH observados na depressão.

Em nosso estudo, a administração de sitagliptina, principalmente na maior dose, foi capaz de reverter as alterações na peroxidação lipídica e nos níveis de GSH induzidas por reserpina em todas as áreas cerebrais estudadas. Um estudo recente também demonstrou que a sitagliptina apresentou uma redução na peroxidação lipídica e um aumento de GSH hipocampal em um modelo animal de convulsão induzido por pentilenotetrazol (Nader *et al.*, 2018). Esses resultados sugerem uma ação antioxidante e neuroprotetora do fármaco.

Reserpina somente aumentou a atividade da SOD no hipocampo dos animais. De forma similar, Silva *et al.* (2016), utilizando um modelo de depressão por administração crônica de corticosterona, observaram um aumento na atividade da SOD no HC e córtex pré-frontal, sem nenhuma alteração no corpo estriado. Segundo os autores, alta atividade da SOD em animais tratados com corticosterona pode refletir um mecanismo compensatório à produção excessiva de espécies reativas de oxigênio-ROS (Kolla *et al.*, 2005; Liu e Zhou, 2012). Esse mecanismo também é observado em pacientes deprimidos (Bilici *et al.*, 2001). Estudos prévios que

avaliaram a atividade sérica da SOD em pacientes com depressão maior também revelaram aumento da atividade dessa enzima (Khanzode *et al.*, 2003; Sarandol *et al.*, 2007).

Um resultado não esperado foi verificado com animais no grupo da associação (RES+SGT3). Esses animais apresentaram um aumento na atividade desta enzima no HC e córtex pré-frontal em relação ao grupo controle. Contudo uma redução foi observada na associação da sitagliptina na maior dose (RES+SGT6). Esse resultado sugere que a ação da sitagliptina pode estar relacionada com sua dose. Assim, os resultados tem demonstrado que a ação antioxidante tem uma resposta melhor na dose de sitagliptina de 6 mg/kg.

Atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) somente foi aumentada no hipocampo após administração da reserpina. Sitagliptina reduziu esse efeito nas duas doses estudadas, sugerindo assim um efeito anti-inflamatório desse fármaco. A MPO é uma enzima expressa em células cerebrais (Jolivalt *et al.*, 1996; Nauseef, 2001) e imunes que desempenha um papel importante na regulação de processos inflamatórios e causa dano oxidativo (Hansson *et al.*, 2006; Yap *et al.*, 2007). MPO é observada nas células periféricas de pacientes depressivos (Vaccarino *et al.*, 2008; Galecki *et al.*, 2012) e o aumento da sua expressão em região cerebrais está relacionado à doenças neurodegeneração (Green *et al.*, 2004).

Para confirmar os efeitos anti-inflamatórios da sitagliptina resolvemos medir no HC os níveis interleucina IL-6 (pró-inflamatória) e IL-4 (anti-inflamatória). Esses testes foram realizados somente com a melhor dose da sitagliptina (6 mg/kg) verificada nos experimentos anteriores. Os resultados não mostraram nenhum aumento significativo nas concentrações dessas interleucinas em relação ao grupo reserpina. Contudo a associação da sitagliptina com reserpina aumentou os níveis de IL-6 e diminuiu os de IL-4 quando comparados ao grupo reserpina. Desde que a sitagliptina sozinha não apresentou nenhum efeito nessas interleucinas. Sugerimos que essa droga somente interfere no processo inflamatório na presença de um evento estressor, como, por exemplo, a reserpina.

Os resultados antidepressivos, antioxidantes e anti-inflamatório da sitagliptina apresentados na presente pesquisa são animadores, porém estudos adicionais em humanos precisarão ser realizados para verificar a translação para a prática clínica dos achados desse estudo, bem como a aplicabilidade terapêutica da sitagliptina no tratamento da depressão isolada e/ou associada a antidepressivos clássicos já utilizados na clínica.

7. CONCLUSÃO

A partir dos resultados do nosso estudo, conclui-se que, em modelo animal de depressão induzida por reserpina, a sitagliptina, especialmente na dose de 6mg/kg, apresenta ação antidepressiva, conforme os efeitos do tratamento em testes comportamentais e neuroquímicos.

REFERÊNCIAS

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders Fifth Edition (DSM-5)**. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders Fifth Edition (DSM-5). Washington, DC 2013.

AMORI, R. E.; LAU, J.; PITTAS, A. G. Efficacy and safety of incretin therapy in type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis. **Jama**, v. 298, n. 2, p. 194-206, Jul 11 2007. ISSN 0098-7484.

ANDREAZZA, A. C. et al. Oxidative stress markers in bipolar disorder: a meta-analysis. **J Affect Disord**, v. 111, n. 2-3, p. 135-44, Dec 2008. ISSN 0165-0327 (Print)

0165-0327.

ANTKIEWICZ-MICHALUK, L. et al. Antidepressant-like effect of tetrahydroisoquinoline amines in the animal model of depressive disorder induced by repeated administration of a low dose of reserpine: behavioral and neurochemical studies in the rat. **Neurotox Res**, v. 26, n. 1, p. 85-98, Jul 2014. ISSN 1029-8428.

ASCHNER, P. et al. Effect of the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor sitagliptin as monotherapy on glycemic control in patients with type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 29, n. 12, p. 2632-7, Dec 2006. ISSN 0149-5992 (Print)

0149-5992.

ATLANTIS, E. et al. Trends in health-related quality of life and health service use associated with body mass index and comorbid major depression in South Australia, 1998-2008. **Qual Life Res**, v. 21, n. 10, p. 1695-704, Dec 2012. ISSN 0962-9343.

BLAY, S. L. et al. Increased health burden associated with comorbid depression in older Brazilians with diabetes. **J Affect Disord**, v. 134, n. 1-3, p. 77-84, Nov 2011. ISSN 0165-0327.

BORSINI, F.; MELI, A. Is the forced swimming test a suitable model for revealing antidepressant activity? **Psychopharmacology (Berl)**, v. 94, n. 2, p. 147-60, 1988. ISSN 0033-3158 (Print)

0033-3158.

BRUCE, D. G. et al. A prospective study of depression and mortality in patients with type 2 diabetes: the Fremantle Diabetes Study. **Diabetologia**, v. 48, n. 12, p. 2532-9, Dec 2005. ISSN 0012-186X (Print)

0012-186x.

BYERS, A. L.; YAFFE, K. Depression and risk of developing dementia. **Nat Rev Neurol**, v. 7, n. 6, p. 323-31, May 03 2011. ISSN 1759-4758.

CAMPAYO, A.; GOMEZ-BIEL, C. H.; LOBO, A. Diabetes and depression. **Curr Psychiatry Rep**, v. 13, n. 1, p. 26-30, Feb 2011. ISSN 1523-3812.

CANDEIAS, E. M. et al. Gut-brain connection: The neuroprotective effects of the anti-diabetic drug liraglutide. **World J Diabetes**, v. 6, n. 6, p. 807-27, Jun 25 2015. ISSN 1948-9358 (Print)

1948-9358.

CAO, B. et al. Comparative efficacy and acceptability of antidiabetic agents for Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: A systematic review and network meta-analysis. **Diabetes Obes Metab**, May 23 2018. ISSN 1462-8902.

CLARK, G.; KOESTER, A. G.; PEARSON, D. W. Exploratory behavior in chronic disulfoton poisoning in mice. **Psychopharmacologia**, v. 20, n. 2, p. 169-71, 1971.

DE GROOT, M. et al. Association of depression and diabetes complications: a meta-analysis. **Psychosom Med**, v. 63, n. 4, p. 619-30, Jul-Aug 2001. ISSN 0033-3174 (Print)

0033-3174.

GAO, S. et al. Tetrandrine exerts antidepressant-like effects in animal models: role of brain-derived neurotrophic factor. **Behav Brain Res**, v. 238, p. 79-85, Feb 1 2013. ISSN 0166-4328.

GEJL, M. et al. In Alzheimer's Disease, 6-Month Treatment with GLP-1 Analog Prevents Decline of Brain Glucose Metabolism: Randomized, Placebo-Controlled, Double-Blind Clinical Trial. **Front Aging Neurosci**, v. 8, p. 108, 2016. ISSN 1663-4365 (Print)

1663-4365.

GONZALEZ, J. S. et al. Depression and diabetes treatment nonadherence: a meta-analysis. **Diabetes Care**, v. 31, n. 12, p. 2398-403, Dec 2008. ISSN 0149-5992.

GRAY, E. et al. Elevated activity and microglial expression of myeloperoxidase in demyelinated cerebral cortex in multiple sclerosis. **Brain Pathol**, v. 18, n. 1, p. 86-95, Jan 2008. ISSN 1015-6305 (Print)

1015-6305.

HAMEED, I. et al. Type 2 diabetes mellitus: From a metabolic disorder to an inflammatory condition. **World J Diabetes**, v. 6, n. 4, p. 598-612, May 15 2015. ISSN 1948-9358.

HAMILTON, A.; HOLSCHER, C. Receptors for the incretin glucagon-like peptide-1 are expressed on neurons in the central nervous system. **Neuroreport**, v. 20, n. 13, p. 1161-6, Aug 26 2009. ISSN 0959-4965.

HASLER, G. Pathophysiology of depression: do we have any solid evidence of interest to clinicians? **World Psychiatry**, v. 9, n. 3, p. 155-61, Oct 2010. ISSN 1723-8617.

HOLSCHER, C. The role of GLP-1 in neuronal activity and neurodegeneration. **Vitam Horm**, v. 84, p. 331-54, 2010. ISSN 0083-6729 (Print)

0083-6729.

HOLT, R. I.; DE GROOT, M.; GOLDEN, S. H. Diabetes and depression. **Curr Diab Rep**, v. 14, n. 6, p. 491, Jun 2014. ISSN 1534-4827.

HUONG, N. T. et al. In vitro antioxidant activity of Vietnamese ginseng saponin and its components. **Biol Pharm Bull**, v. 21, n. 9, p. 978-81, Sep 1998. ISSN 0918-6158 (Print)

0918-6158.

IKRAM, H.; HALEEM, D. J. Repeated treatment with reserpine as a progressive animal model of depression. **Pak J Pharm Sci**, v. 30, n. 3, p. 897-902, May 2017. ISSN 1011-601X (Print)

1011-601x.

IWAI, T. et al. Glucagon-like peptide-1 protects synaptic and learning functions from neuroinflammation in rodents. **J Neurosci Res**, v. 92, n. 4, p. 446-54, Apr 2014. ISSN 0360-4012.

KAMBLE, M. et al. Neurobehavioral effects of liraglutide and sitagliptin in experimental models. **Eur J Pharmacol**, v. 774, p. 64-70, Mar 05 2016. ISSN 0014-2999.

KOLIAKI, C.; DOUPIS, J. Incretin-based therapy: a powerful and promising weapon in the treatment of type 2 diabetes mellitus. **Diabetes Ther**, v. 2, n. 2, p. 101-21, May 2011.

LISTER, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 92, n. 2, p. 180-5, 1987. ISSN 0033-3158 (Print)

0033-3158.

LONG-SMITH, C. M. et al. The diabetes drug liraglutide ameliorates aberrant insulin receptor localisation and signalling in parallel with decreasing both amyloid-beta plaque and glial pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. **Neuromolecular Med**, v. 15, n. 1, p. 102-14, Mar 2013. ISSN 1535-1084.

LUSTMAN, P. J. et al. Depression and poor glycemic control: a meta-analytic review of the literature. **Diabetes Care**, v. 23, n. 7, p. 934-42, Jul 2000. ISSN 0149-5992 (Print)

0149-5992.

MAES, M. et al. A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro)degenerative processes in that illness. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 35, n. 3, p. 676-92, Apr 29 2011. ISSN 0278-5846.

MARKOWITZ, S. M. et al. A review of treating depression in diabetes: emerging findings. **Psychosomatics**, v. 52, n. 1, p. 1-18, Jan-Feb 2011. ISSN 0033-3182.

MCCLEAN, P. L. et al. Glucagon-like peptide-1 analogues enhance synaptic plasticity in the brain: a link between diabetes and Alzheimer's disease. **Eur J Pharmacol**, v. 630, n. 1-3, p. 158-62, Mar 25 2010. ISSN 0014-2999.

MCCLEAN, P. L.; HOLSCHER, C. Liraglutide can reverse memory impairment, synaptic loss and reduce plaque load in aged APP/PS1 mice, a model of Alzheimer's disease. **Neuropharmacology**, v. 76 Pt A, p. 57-67, Jan 2014. ISSN 0028-3908.

MCCLEAN, P. L. et al. The diabetes drug liraglutide prevents degenerative processes in a mouse model of Alzheimer's disease. **J Neurosci**, v. 31, n. 17, p. 6587-94, Apr 27 2011. ISSN 0270-6474.

MCINTYRE, R. S. et al. The neuroprotective effects of GLP-1: possible treatments for cognitive deficits in individuals with mood disorders. **Behav Brain Res**, v. 237, p. 164-71, Jan 15 2013. ISSN 0166-4328.

MILLER, A. H.; MALETIC, V.; RAISON, C. L. Inflammation and its discontents: the role of cytokines in the pathophysiology of major depression. **Biol Psychiatry**, v. 65, n. 9, p. 732-41, May 01 2009. ISSN 0006-3223.

NAUGHTON, M.; MULROONEY, J. B.; LEONARD, B. E. A review of the role of serotonin receptors in psychiatric disorders. **Hum Psychopharmacol**, v. 15, n. 6, p. 397-415, Aug 2000. ISSN 0885-6222.

NUTT, D. Treatment of depression and concomitant anxiety. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 10 Suppl 4, p. S433-7, Dec 2000. ISSN 0924-977X (Print)
0924-977x.

O'NEIL, M. F.; MOORE, N. A. Animal models of depression: are there any? **Hum Psychopharmacol**, v. 18, n. 4, p. 239-54, Jun 2003. ISSN 0885-6222 (Print)
0885-6222.

PORSOLT, R. D.; LE PICHON, M.; JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature**, v. 266, n. 5604, p. 730-2, Apr 21 1977. ISSN 0028-0836 (Print)
0028-0836.

PULLI, B. et al. Measuring myeloperoxidase activity in biological samples. **PLoS One**, v. 8, n. 7, p. e67976, 2013. ISSN 1932-6203.

QASEEM, A. et al. Oral pharmacologic treatment of type 2 diabetes mellitus: a clinical practice guideline from the American College of Physicians. **Ann Intern Med**, v. 156, n. 3, p. 218-31, Feb 07 2012. ISSN 0003-4819.

RAZ, I. et al. Efficacy and safety of the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor sitagliptin as monotherapy in patients with type 2 diabetes mellitus. **Diabetologia**, v. 49, n. 11, p. 2564-71, Nov 2006. ISSN 0012-186X (Print)

0012-186x.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Anal Biochem**, v. 25, n. 1, p. 192-205, Oct 24 1968. ISSN 0003-2697 (Print)

0003-2697.

STAHL, S. Transtornos de ansiedade e do humor. In: GUANABARA-KOOGAN (Ed.). **Psicofarmacologia**. 3. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2010. cap. 14, p.481-519.

STERU, L. et al. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 85, n. 3, p. 367-70, 1985. ISSN 0033-3158 (Print)

0033-3158.

SUN, Y.; OBERLEY, L. W.; LI, Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. **Clin Chem**, v. 34, n. 3, p. 497-500, Mar 1988. ISSN 0009-9147 (Print)

0009-9147.

TEIXEIRA, R. C.; ZANGROSSI, H.; GRAEFF, F. G. Behavioral effects of acute and chronic imipramine in the elevated T-maze model of anxiety. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 65, n. 4, p. 571-6, Apr 2000. ISSN 0091-3057 (Print)

0091-3057.

TRAPP, S.; HISADOME, K. Glucagon-like peptide 1 and the brain: central actions-central sources? **Auton Neurosci**, v. 161, n. 1-2, p. 14-9, Apr 26 2011. ISSN 1566-0702.

ALVAREZ, E. et al. Expression of the glucagon-like peptide-1 receptor gene in rat brain. **J Neurochem**, v. 66, n. 3, p. 920-7, Mar 1996. ISSN 0022-3042 (Print)

0022-3042.

ANTKIEWICZ-MICHALUK, L. et al. Antidepressant-like effect of tetrahydroisoquinoline amines in the animal model of depressive disorder induced by repeated administration of a low dose of reserpine: behavioral and neurochemical studies in the rat. **Neurotox Res**, v. 26, n. 1, p. 85-98, Jul 2014. ISSN 1029-8428.

BAKHTIARPOOR, M. M.; SETORKI, M. P.; KAFFASHIAN, M. R. P. Effects of Essential Oil of *Satureja bachtiarica* Bunge in a Rat Model of Reserpine-Induced Depression. **Iran J Med Sci**, v. 43, n. 4, p. 409-415, Jul 2018. ISSN 0253-0716 (Print)

0253-0716.

BILICI, M. et al. Antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in major depression: alterations by antidepressant treatments. **J Affect Disord**, v. 64, n. 1, p. 43-51, Apr 2001. ISSN 0165-0327 (Print)

0165-0327.

BILSKA, A. et al. Alpha-lipoic acid differently affects the reserpine-induced oxidative stress in the striatum and prefrontal cortex of rat brain. **Neuroscience**, v. 146, n. 4, p. 1758-71, Jun 8 2007. ISSN 0306-4522 (Print)

0306-4522.

BURGER, M. E. et al. Acute reserpine and subchronic haloperidol treatments change synaptosomal brain glutamate uptake and elicit orofacial dyskinesia in rats. **Brain Res**, v. 1031, n. 2, p. 202-10, Jan 21 2005. ISSN 0006-8993 (Print)

0006-8993.

COLPAERT, F. C. Pharmacological characteristics of tremor, rigidity and hypokinesia induced by reserpine in rat. **Neuropharmacology**, v. 26, n. 9, p. 1431-40, Sep 1987. ISSN 0028-3908 (Print)

0028-3908.

DURING, M. J. et al. Glucagon-like peptide-1 receptor is involved in learning and neuroprotection. **Nat Med**, v. 9, n. 9, p. 1173-9, Sep 2003. ISSN 1078-8956 (Print)

1078-8956.

FUENTES, P. et al. Inhibition of VMAT-2 and DT-diaphorase induce cell death in a substantia nigra-derived cell line--an experimental cell model for dopamine toxicity studies. **Chem Res Toxicol**, v. 20, n. 5, p. 776-83, May 2007. ISSN 0893-228X (Print)

0893-228x.

GALECKI, P. et al. The expression of genes encoding for COX-2, MPO, iNOS, and sPLA2-IIA in patients with recurrent depressive disorder. **J Affect Disord**, v. 138, n. 3, p. 360-6, May 2012. ISSN 0165-0327.

GALECKI, P. et al. Oxidative stress parameters after combined fluoxetine and acetylsalicylic acid therapy in depressive patients. **Hum Psychopharmacol**, v. 24, n. 4, p. 277-86, Jun 2009. ISSN 0885-6222.

GAO, S. et al. Tetrandrine exerts antidepressant-like effects in animal models: role of brain-derived neurotrophic factor. **Behav Brain Res**, v. 238, p. 79-85, Feb 1 2013. ISSN 0166-4328.

GREEN, P. S. et al. Neuronal expression of myeloperoxidase is increased in Alzheimer's disease. **J Neurochem**, v. 90, n. 3, p. 724-33, Aug 2004. ISSN 0022-3042 (Print)

0022-3042.

GUILLOT, T. S.; MILLER, G. W. Protective actions of the vesicular monoamine transporter 2 (VMAT2) in monoaminergic neurons. **Mol Neurobiol**, v. 39, n. 2, p. 149-70, Apr 2009. ISSN 0893-7648 (Print)

0893-7648.

HAMILTON, A.; HOLSCHER, C. Receptors for the incretin glucagon-like peptide-1 are expressed on neurons in the central nervous system. **Neuroreport**, v. 20, n. 13, p. 1161-6, Aug 26 2009. ISSN 0959-4965.

HANSSON, M.; OLSSON, I.; NAUSEEF, W. M. Biosynthesis, processing, and sorting of human myeloperoxidase. **Arch Biochem Biophys**, v. 445, n. 2, p. 214-24, Jan 15 2006. ISSN 0003-9861 (Print)

0003-9861.

IKRAM, H.; HALEEM, D. J. Repeated treatment with reserpine as a progressive animal model of depression. **Pak J Pharm Sci**, v. 30, n. 3, p. 897-902, May 2017. ISSN 1011-601X (Print)

1011-601x.

JI, J.; MCDERMOTT, J. L.; DLUZEN, D. E. Sex differences in K⁺-evoked striatal dopamine output from superfused striatal tissue fragments of reserpine-treated CD-1 mice. **J Neuroendocrinol**, v. 19, n. 9, p. 725-31, Sep 2007. ISSN 0953-8194 (Print)

0953-8194.

JOLIVALT, C. et al. Apolipoprotein E is highly susceptible to oxidation by myeloperoxidase, an enzyme present in the brain. **Neurosci Lett**, v. 210, n. 1, p. 61-4, May 24 1996. ISSN 0304-3940 (Print)

0304-3940.

KAMBLE, M. et al. Neurobehavioral effects of liraglutide and sitagliptin in experimental models. **Eur J Pharmacol**, v. 774, p. 64-70, Mar 05 2016. ISSN 0014-2999.

KHANZODE, S. D. et al. Oxidative damage and major depression: the potential antioxidant action of selective serotonin re-uptake inhibitors. **Redox Rep**, v. 8, n. 6, p. 365-70, 2003. ISSN 1351-0002 (Print)

1351-0002.

KOLLA, N. et al. Amitriptyline and fluoxetine protect PC12 cells from cell death induced by hydrogen peroxide. **J Psychiatry Neurosci**, v. 30, n. 3, p. 196-201, May 2005. ISSN 1180-4882 (Print)

1180-4882.

LARSEN, P. J. et al. Distribution of glucagon-like peptide-1 and other preproglucagon-derived peptides in the rat hypothalamus and brainstem. **Neuroscience**, v. 77, n. 1, p. 257-70, Mar 1997. ISSN 0306-4522 (Print)

0306-4522.

LIU, W.; ZHOU, C. Corticosterone reduces brain mitochondrial function and expression of mitofusin, BDNF in depression-like rodents regardless of exercise preconditioning. **Psychoneuroendocrinology**, v. 37, n. 7, p. 1057-70, Jul 2012. ISSN 0306-4530.

MELLO, B. S. et al. Effects of doxycycline on depressive-like behavior in mice after lipopolysaccharide (LPS) administration. **J Psychiatr Res**, v. 47, n. 10, p. 1521-9, Oct 2013. ISSN 0022-3956.

METZGER, R. R. et al. Inhibitory effect of reserpine on dopamine transporter function. **Eur J Pharmacol**, v. 456, n. 1-3, p. 39-43, Dec 5 2002. ISSN 0014-2999 (Print)
0014-2999.

NADER, M. A. et al. Sitagliptin enhances the neuroprotective effect of pregabalin against pentylentetrazole-induced acute epileptogenesis in mice: Implication of oxidative, inflammatory, apoptotic and autophagy pathways. **Neurochem Int**, v. 115, p. 11-23, May 2018. ISSN 0197-0186.

NAUSEEF, W. M. Contributions of myeloperoxidase to proinflammatory events: more than an antimicrobial system. **Int J Hematol**, v. 74, n. 2, p. 125-33, Aug 2001. ISSN 0925-5710 (Print)
0925-5710.

NG, F. et al. Oxidative stress in psychiatric disorders: evidence base and therapeutic implications. **Int J Neuropsychopharmacol**, v. 11, n. 6, p. 851-76, Sep 2008. ISSN 1461-1457 (Print)
1461-1457.

O'NEIL, M. F.; MOORE, N. A. Animal models of depression: are there any? **Hum Psychopharmacol**, v. 18, n. 4, p. 239-54, Jun 2003. ISSN 0885-6222 (Print)

0885-6222.

PERRY, T. et al. Evidence of GLP-1-mediated neuroprotection in an animal model of pyridoxine-induced peripheral sensory neuropathy. **Exp Neurol**, v. 203, n. 2, p. 293-301, Feb 2007. ISSN 0014-4886 (Print)

0014-4886.

SARANDOL, A. et al. Major depressive disorder is accompanied with oxidative stress: short-term antidepressant treatment does not alter oxidative-antioxidative systems. **Hum Psychopharmacol**, v. 22, n. 2, p. 67-73, Mar 2007. ISSN 0885-6222 (Print)

0885-6222.

SCHILDKRAUT, J. J. The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. 1965. **J Neuropsychiatry Clin Neurosci**, v. 7, n. 4, p. 524-33; discussion 523-4, Fall 1995. ISSN 0895-0172 (Print)

0895-0172.

SILVA, M. C. et al. Evidence for protective effect of lipoic acid and desvenlafaxine on oxidative stress in a model depression in mice. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 64, p. 142-8, Jan 4 2016. ISSN 0278-5846.

TEIXEIRA, A. M. et al. Influence of chronic exercise on reserpine-induced oxidative stress in rats: behavioral and antioxidant evaluations. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 88, n. 4, p. 465-72, Feb 2008. ISSN 0091-3057 (Print)

0091-3057.

VACCARINO, V. et al. Association of major depressive disorder with serum myeloperoxidase and other markers of inflammation: a twin study. **Biol Psychiatry**, v. 64, n. 6, p. 476-83, Sep 15 2008. ISSN 0006-3223.

VENTORP, F. et al. Exendin-4 Treatment Improves LPS-Induced Depressive-Like Behavior Without Affecting Pro-Inflammatory Cytokines. **J Parkinsons Dis**, v. 7, n. 2, p. 263-273, 2017. ISSN 1877-7171.

WIMALASENA, K. Vesicular monoamine transporters: structure-function, pharmacology, and medicinal chemistry. **Med Res Rev**, v. 31, n. 4, p. 483-519, Jul 2011. ISSN 0198-6325.

XU, Y. et al. Ferulic acid increases pain threshold and ameliorates depression-like behaviors in reserpine-treated mice: behavioral and neurobiological analyses. **Metab Brain Dis**, v. 28, n. 4, p. 571-83, Dec 2013. ISSN 0885-7490.

YAP, Y. W.; WHITEMAN, M.; CHEUNG, N. S. Chlorinative stress: an under appreciated mediator of neurodegeneration? **Cell Signal**, v. 19, n. 2, p. 219-28, Feb 2007. ISSN 0898-6568 (Print)

0898-6568.