

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

YASMINE TROJAN DOS SANTOS

**ESTABELECIMENTO DE MODELO DE DEPRESSÃO INDUZIDA POR
INTERFERON-ALFA EM CAMUNDONGOS**

Porto Alegre

2015

YASMINE TROJAN DOS SANTOS

**ESTABELECIMENTO DE MODELO DE DEPRESSÃO INDUZIDA POR
INTERFERON-ALFA EM CAMUNDONGOS**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel (a) em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr Elaine Elisabetsky

Porto Alegre

2015

AGRADECIMENTOS

À minha família, meus pais e meu irmão, por sempre me oferecerem suporte nas minhas escolhas e ajudando como possível.

À minha orientadora, professora Elaine Elisabetsky, por todo o conhecimento transmitido, por me permitir realizar a arte da pesquisa científica, por todas as indicações durante o andamento deste trabalho e um obrigado especial pela sua preocupação com os alunos e com a qualidade das aulas de Farmacologia.

Ao Fernando, por ter me acompanhado na maior parte desta jornada e sempre ter me ajudado da sua maneira, seja resumindo os estudos comigo, cedendo um ombro ou me alegrando em um dia de crise.

Aos membros do Laboratório de Etnofarmacologia da UFRGS, pelo companheirismo e pelos debates sempre enriquecedores. Um agradecimento especial a Luísa por ter aberto as portas deste grupo para mim e ser uma grande amiga/conselheira.

À professora Adriana Coitinho, pela ajuda com as dúvidas de imunologia, desde a escrita do projeto até a realização do trabalho.

Aos funcionários da UEA do HCPA, principalmente à Marta e à Fernanda, pelo auxílio fornecido sempre que necessário.

Aos amigos da turma 9, para os quais a palavra “colegas” não basta. Obrigada por fazerem destes 4 anos de graduação uma troca constante de conhecimento, histórias, risadas, tristezas e tantas outras coisas que tornavam as horas passadas dentro da universidade as melhores do meu dia. Aos demais amigos trazidos graças à biomed, pelos quais sempre passarei sorrindo quando encontrar nos corredores do ICBS ou da vida.

Às amigas de fora da universidade, que tornavam até os finais de semana de estudos mais agradáveis, fornecendo companhia mesmo quando havia um artigo ou caderno em minhas mãos. Aos amigos do Música e Cena e do Ballet Sinos, que estavam sempre ao meu lado em cima do palco e me permitindo fazer o que eu mais gostava, ainda que houvesse pouco tempo disponível durante a graduação.

Aos professores e funcionários da UFRGS que estiveram presentes em algum momento da minha graduação, colaborando na minha formação como biomédica.

Ao CNPq e ao Fundo de Investimento à Pesquisa e Eventos (FIPE)/HCPA pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

RESUMO.....	4
1 INTRODUÇÃO.....	5
1.1 Sistema Glutamatérgico e Depressão.....	6
1.2 Sistema Imune e Depressão.....	6
1.3 Interferon- α e Depressão.....	8
2 OBJETIVOS.....	10
2.1 Objetivo Geral.....	10
2.2 Objetivos Específicos.....	10
3. ARTIGO CIENTÍFICO.....	11
4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	31
5. REFERÊNCIAS.....	32
ANEXO I – NORMAS DA REVISTA JOURNAL OF PHARMACOLOGICAL AND TOXICOLOGICAL METHODS.....	38

Resumo

A depressão maior é o mais comum dos distúrbios de humor, e inclui sintomas comportamentais, psicológicos e fisiológicos. Os sintomas emocionais da depressão incluem anedonia, apatia, pessimismo, sentimento de culpa e perda de motivação; os sintomas vegetativos incluem distúrbios do sono e do apetite, perda de libido e retardo do pensamento e da ação. A teoria clássica sobre as bases bioquímicas da depressão considera um déficit funcional dos neurotransmissores monoaminérgicos, como serotonina (5-HT) e noradrenalina (NOR), em certos locais do cérebro. Porém, uma vez que existem tanto problemas de eficácia quanto de segurança e efetividade com os antidepressivos moduladores do sistema monoaminérgico, tem se buscado entender o papel de outros sistemas na doença, dentre eles o glutamatérgico e o imune. A associação entre a ativação do sistema imune e a patofisiologia da depressão é sustentada por estudos clínicos, em ao menos três conjuntos de evidências: níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias em pacientes depressivos, os benefícios de imunomoduladores e a indução de quadros depressivos por imunoterapia com IFN- α . Nesse estudo, camundongos Balb/c foram submetidos a 7 administrações diárias de IFN- α nas doses de 3MIU/kg e 4MIU/kg e seus pesos monitorados durante todo o experimento. Durante os últimos 3 dias de administração de interferon os animais foram observados quanto a presença de comportamento doentio, e após a sétima administração foram submetidos aos testes de preferência por sacarose, suspensão pela cauda (TST) e campo aberto. Após o 6º dia de tratamento, a dose de 4MIU/kg (mas não a de 3MIU) de IFN- α induziu aumento significativo de *sickness behavior* em comparação com o grupo controle. Não houve diferença quanto ao consumo de sacarose, peso corporal, tempo de imobilidade no teste de suspensão pela cauda ou à distância total percorrida e número de cruzamentos no campo aberto. Os sintomas apresentados no *sickness behavior* assemelham-se aos sintomas neurovegetativos da depressão, que tendem a aparecer previamente aos sintomas cognitivos e afetivos. Estudos com lipopolissacarídeo (LPS) sugerem que há diferentes mecanismos neurais subjacentes ao *sickness behavior* e a resposta comportamental tipo-depressiva devido à ativação do sistema imune, e esse estudo estende a observação para o IFN. A variabilidade dos resultados nesse modelo deve-se também a diferenças experimentais. Considerando a relevância terapêutica de prevenir ou atenuar a depressão induzida por IFN a busca por modelos experimentais úteis na procura de alternativas terapêuticas é relevante e o aqui apresentado pode ser um deles.

1. Introdução

A depressão maior é o mais comum dos distúrbios de humor, e inclui sintomas comportamentais, psicológicos e fisiológicos, afetando 17-20% da população mundial (Rang & Dale, 2007, Simon, 2003). Esse distúrbio prejudica a produtividade dos indivíduos afetados e aumenta significativamente a frequência de tentativas de suicídio e o risco de morte por suicídios completos (Kiyohara & Yoshimasu, 2009). Estima-se que 85 – 90% das mortes por suicídio ocorreram em indivíduos com desordem psiquiátrica diagnosticável, sendo a maioria depressão severa (Charney & Manji, 2004). Os sintomas emocionais da depressão incluem anedonia, apatia, pessimismo, sentimento de culpa e perda de motivação; os sintomas biológicos incluem distúrbios do sono e do apetite, perda de libido e retardo do pensamento e da ação (Rang & Dale, 2007).

Proposta por Schildkraut em 1965, a teoria clássica sobre a bioquímica da depressão considera a hipótese de que há um déficit funcional dos neurotransmissores monoaminérgicos, como serotonina (5-HT) e noradrenalina (NOR) em certos locais do cérebro (Rang & Dale, 2007). Originalmente, a teoria era baseada em evidências de que antidepressivos que reforçavam transmissões monoaminérgicas eram efetivos em atenuar os sintomas da doença e certas drogas que reduziam estes neurotransmissores poderiam induzir a doença (Stahl, 2008). Apoiando a teoria, evidências mostram que drogas bloqueadoras de síntese de NOR e 5-HT revertem o benefício de antidepressivos seletivos do sistema monoaminérgico (Rang & Dale, 2007). Corroborando a teoria, após uma dose intravenosa ou oral de L-triptofano, a elevação do aminoácido no plasma é menor em pacientes deprimidos, indicando menor disponibilidade de L-triptofano nestes indivíduos (Rang & Dale, 2007). Estudos sugerem que o metabólito de 5-HT, o ácido 5-hidroxi-indol-acético (5HIAA), está reduzido no líquido cerebrospinal de pacientes depressivos (Stahl, 2008); porém, a relação não é clara, uma vez que outros estudos mostram que a redução ocorre apenas em alguns pacientes que tendem a ter comportamentos impulsivos.

Os fármacos antidepressivos desenvolvidos a partir da teoria monoaminérgica da depressão não são inteiramente satisfatórios (Insel e Sahakian, 2012; Khan *et al*, 2012; Kirsch *et al*, 2008) e, mesmo em pacientes responsivos, levam a efeitos adversos variados e desagradáveis que em alguns casos causam interrupção da terapia. De modo evidentemente contrário ao que se espera de terapias para uma condição associada ao suicídio, estudos

sugerem que maior risco de suicídio ou comportamento suicida está associado aos antidepressivos mais utilizados (Cipriani *et al*, 2005; Licinio & Wong, 2005).

Uma vez que existem tanto problemas de eficácia quanto de segurança e efetividade com os antidepressivos moduladores do sistema monoaminérgico, tem se buscado entender o papel de outros sistemas na doença, dentre eles o sistema glutamatérgico e o sistema imune.

1.1 Sistema glutamatérgico e depressão

Evidências recentes sugerem que há envolvimento do sistema glutamatérgico na patofisiologia da depressão (Sanacora *et al*, 2008). Foi relatado aumento nos níveis de glutamato no plasma, no córtex frontal e occipital de pacientes com depressão maior, além de níveis aumentados de glutamina no córtex occipital (Hashimoto *et al*, 2007; Hashimoto, 2009; Machado-Vieira *et al*, 2009). Estudos *post-mortem* mostram alterações na expressão de subunidades dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos e metabotrópicos em diferentes áreas encefálicas de pacientes com depressão (Machado-Vieira *et al*, 2009, Hashimoto, 2009; Tokita *et al*, 2012).

O papel do sistema glutamatérgico na patofisiologia da depressão é reforçado também pela ação antidepressiva de substâncias antagonistas de receptores ácido *N*-metil-D-aspartato (NMDA), como cetamina e memantina, de moduladores positivos de receptores ácido- α -amino-3-hidroxi-5-metilsoxazol-4-propriânico (AMPA), como piracetam, aniracetam e ciclotiazide, de agentes que inibem a liberação de glutamato (por exemplo, riluzol), e de drogas que afetam a expressão e/ou função de receptores metabotrópicos, como os antagonistas dos grupo I mGlu e do grupo II mGlu e os agonistas do grupo III mGlu (tais como JNJ16259685) (Hashimoto, 2009; Machado-Vieira *et al*, 2009, Tokita *et al* 2012).

1.2 Sistema imune e depressão

A ativação da resposta inflamatória ocorre em decorrência de infecções por microorganismos patogênicos e é mediada inicialmente por citocinas (como IL- β e TNF α) liberadas por macrófagos (Kenneth *et al*, 2010). A partir da liberação dessas citocinas, ocorre a indução da produção de outras, derivadas de linfócitos T, como IFN γ , IL-6 e IL-8. A existência de uma associação entre a ativação do sistema imune e a patofisiologia da depressão é sustentada por estudos clínicos. Níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias,

como IL-6 e TNF- α (Dowlati *et al*, 2010, Howren *et al*, 2009, Myint *et al*, 2005), de células T CD4+ ativas (Maes, 2010), de prostaglandina E2 (Ohishi *et al*, 1988, Calabrese *et al*, 1986, Linnoila *et al*, 1983), e de proteína C-reativa (Lanquillon *et al*, 2000 e Hafner *et al*, 2008) são encontrados em pacientes depressivos. As evidências de que fármacos que modulam o sistema imune, como inibidores de COX-2 e antagonistas de TNF- α , apresentam benefícios terapêuticos em pacientes depressivos colaboram na sustentação da associação entre a patologia e a ativação de uma resposta inflamatória.

A ativação imune é seguida da ativação da enzima indolamina-2,3-dioxigenase (IDO), uma das responsáveis por converter triptofano em cinurenina. A IDO é induzida principalmente por IFN- γ (Oxenkrug, 2007), além de outras citocinas pró-inflamatórias (Maes *et al*, 2011) e do estresse oxidativo (Daley-Yates *et al*, 1988). A ativação da enzima desvia o triptofano da via da serotonina para a via dos chamados catabólitos de triptofano (TRYCATs), como os ácidos quinolínico e ácido xanturênico. Foram encontrados níveis significativamente reduzidos de triptofano plasmático livre em pacientes deprimidos (DeMyer *et al*, 1981; Joseph *et al*, 1984; Møller, 1985; Cowen *et al.*, 1989; Maes *et al.*, 1990, 1991a, 1991b;) e há uma associação entre a diminuição de triptofano livre e a expressão de diversos sintomas da depressão maior (Curzon, 1979, Banki *et al*, 1981, Maes *et al*, 1990). O desvio do triptofano da rota da serotonina para a rota dos seus catabólitos, conseqüente à ativação da IDO pelo sistema imune, pode estar relacionado ao aparecimento dos sintomas depressivos, uma vez que os catabólitos de triptofano possuem efeitos depressogênicos e ansiogênicos (Lapin, 2003 e Mackay *et al*, 2006).

Em camundongos, comportamentos tipo-depressivos são induzidos por L-cinurenina, em uma relação dose-dependente, assim como por lipopolissacarídeo (LPS) (O'Connor *et al* 2009a, b). No teste de nado forçado e de suspensão pela cauda a administração periférica de LPS causou indução da IDO e aumento da imobilidade, alterações que são revertidas por 1-metil-triptofano ou minociclina, que levam ao bloqueio da ativação da IDO e a redução da produção de citocinas pró-inflamatórias, respectivamente (O'Connor *et al* 2009b).

As citocinas inflamatórias podem influenciar duas rotas neurofarmacológicas envolvidas na patofisiologia da depressão maior: monoaminérgica e glutamatérgica. O metabolismo de serotonina e noradrenalina é elevado por IL-1 β no hipotálamo, córtex pré-frontal e hipocampo (Merali *et al*, 1997, Song *et al*, 1999). A liberação de citocinas inflamatórias levam ao aumento da produção de agonistas de NMDA (Muller & Schwarz, 2007). A recaptação de serotonina por transportador sináptico pode ser aumentada por IL-1 β

(Ramamoorthy *et al* 1995), TNF- α (ver Mossner *et al* 1998) e IFN- α (ver Morikawa *et al* 1998). Citocinas podem influenciar a expressão dos receptores serotoninérgicos 5-HT1A (Abe *et al* 1999) e 5-HT2 (Kagaya *et al* 2001), além dos níveis de dopamina que são reduzidos por IL-6, IL-2 e TNF- α (Song *et al*, 1999, Song, 2000 e Petitto *et al* 1997). Segundo Muller (2014), os ácidos cinurênicos e quinolínicos (TRYCATs) agem na neurotransmissão glutamatérgica como antagonistas e agonistas de N-metil-D-aspartato, respectivamente.

1.3 Interferon- α e a depressão

Amplamente utilizada, a imunoterapia com interferon-alfa (IFN- α) é aplicada a pacientes com alguns tipos de câncer e doenças virais crônicas, como hepatite C. Mudanças comportamentais são observadas, incluindo humor deprimido, fadiga, anedonia, apetite reduzido e aumento da sensibilidade à dor (Dantzer, 2009). Entre os muitos efeitos adversos indesejados que acompanham o tratamento destaca-se a depressão. Estima-se que sintomas depressivos ocorram em 21–58% dos pacientes tratados com IFN- α (Raison, 2005). Relevante a pesquisa translacional, comportamentos tipo-depressivos também aparecem em roedores tratados com IFN- α (Myint *et al.*, 2009) e são atenuados pelo pré-tratamento com antidepressivos (Musselman *et al.*, 2001).

O interferon-alfa é uma citocina pleiotrópica que induz um fenótipo depressivo associado com altos níveis de inflamação (Raison & Muller, 2013). Sabe-se que esta citocina é uma potente indutora de outras citocinas pró-inflamatórias como interleucina-6 (IL-6), interleucina-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α). Em pacientes com infecção crônica pelo vírus HCV tratados com interferon-alfa e que desenvolveram depressão, observou-se aumento nos níveis plasmáticos basais de citocinas pró-inflamatórias (Wichers *et al.*, 2006). Além disso, o interferon-alfa induz hiperativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal como resultado de desregulação em mecanismos de feedback negativo. Esta hiperativação pode ser considerada uma das características da depressão (Hoyo-Becerra *et al.*, 2014). No córtex pré-frontal os níveis de serotonina são reduzidos por administração de IFN- α (Asnis *et al*, 2003). A imunoterapia com a citocina também está associada com níveis reduzidos de triptofano no plasma (Maes *et al* 2001, Bonaccorso *et al* 2002, Wichers & Maes 2002) e estudos clínicos demonstram aumento na taxa de cinurenina/triptofano em pacientes com hepatite C recebendo IFN- α (Maes *et al* 2001; Bonaccorso *et al* 2002). Assim, é de se supor que a imunoterapia com IFN- α , uma vez que induz outras citocinas pró-inflamatórias,

também induz a enzima IDO e conseqüentemente leva a menor disponibilidade de triptofano com as conseqüências no humor acima detalhadas.

Uma vez estabelecida a associação entre a ativação do sistema imune e a patofisiologia da depressão maior, modelos animais que mimetizem os efeitos da imunoterapia com interferon-alfa são relevantes para estudos que busquem avaliar o uso de antidepressivos durante o tratamento. Este trabalho visa à caracterização de modelo animal de depressão induzida por interferon-alfa em camundongos Balb/c.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Estabelecer os parâmetros do modelo experimental de depressão induzida por interferon-alfa em camundongos Balb/c que induzam comportamentos correlatos de depressão.

2.2 Objetivos Específicos

- 1) Determinar as doses de interferon-alfa que induzam comportamento doentio (*sickness behavior*);
- 2) Determinar as doses de interferon-alfa que aumentem o tempo de imobilidade no teste de suspensão pela cauda;
- 3) Determinar as doses de interferon-alfa que diminuam a preferência por sacarose.

3. Artigo Científico

Periódico: Journal of Pharmacological and Toxicological Methods

Título: Estabelecimento de Modelo de Depressão Induzida por Interferon-alfa em Camundongos Balb/c

Normas da Revista: http://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/505776?generatepdf=true e Anexo I.

ESTABELECIMENTO DE MODELO DE DEPRESSÃO INDUZIDA POR INTERFERON-ALFA EM CAMUNDONGOS BALB/C

Yasmine Trojan dos Santos^{1*}, Patrícia Santos¹, Roberta Andrejew Caetano¹, Rafael Pires Lima¹, Radharani Benvenuti¹, Ana Paula Hermann¹, Elaine Elisabetsky¹

¹Laboratório de Etnofarmacologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Sarmiento Leite 500/202, Porto Alegre, RS, 90050-170, Brasil.

* Autor correspondente:

Yasmine Trojan dos Santos

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, ICBS

Rua Sarmiento Leite, 500/202, 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil.

Fone/FAX: 55 51 33083121

yasminetrojan@gmail.com

Resumo

Introdução: A associação entre a ativação do sistema imune e a patofisiologia da depressão é sustentada por pelo menos três conjuntos de evidências: níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias em pacientes depressivos, benefícios de fármacos imunomoduladores e a indução de quadros depressivos por terapia com IFN- α . O objetivo deste trabalho é o estabelecimento de modelo de depressão induzida por interferon-alfa em camundongos.

Metódos: Camundongos Balb/c foram submetidos a administrações diárias de IFN- α por 7 dias nas doses de 3MIU/kg e 4MIU/kg, com pesos corporais monitorados durante o experimento. Durante os últimos 3 dias de administração os animais foram observados para a verificação de comportamento doentio e após a sétima administração foram submetidos aos testes de preferência por sacarose, suspensão pela cauda (TST) e campo aberto. Os resultados foram analisados por ANOVA e/ou Friedman conforme apropriado. **Resultados:** Após o 6º dia de tratamento, a dose de 4MIU/kg (mas não a de 3MIU) de IFN- α induziu aumento significativo de *sickness behavior* em comparação com o grupo controle. Não houve diferença quanto ao consumo de sacarose, variação de peso corporal, tempo de imobilidade no teste de suspensão pela cauda ou desempenho no campo aberto entre os grupos. **Discussão:** Os sintomas apresentados no *sickness behavior* assemelham-se aos sintomas neurovegetativos da depressão, que tendem a aparecer previamente aos sintomas cognitivos e afetivos. Assim, o aumento demonstrado no *sickness behavior* de animais tratados com IFN- α 4MIU/kg, mas não aumento no tempo de imobilidade do TST, sugere que os mecanismos por trás do desenvolvimento desses sintomas são diferentes, corroborando com as evidências de modelos tratados com LPS. Além disso, diferenças experimentais devem ser observadas a fim de que se consolide o modelo, que terá melhor validade de face se apresentar comportamentos correlatos de depressão tais como aumento de imobilidade no TST e reduzida preferência à sacarose. **Palavras-chave:** Depressão, Hepatite C, Interferon- α , Métodos, Sickness Behavior.

1. Introdução

A depressão maior é o mais comum dos distúrbios de humor, e inclui sintomas comportamentais, psicológicos e fisiológicos, afetando 17-20% da população mundial com conseqüências significativas (Rang & Dale, 2007, Simon, 2003). Esse distúrbio prejudica a produtividade dos indivíduos afetados e aumenta significativamente a frequência de tentativas de suicídio e o risco de morte por suicídios completos (Kiyohara & Yoshimasu, 2009). Uma vez que existem tanto problemas de eficácia quanto de segurança e efetividade com os antidepressivos moduladores do sistema monoaminérgico disponíveis no mercado, tem se buscado entender o papel de outros sistemas na doença, dentre eles o sistema glutamatérgico e o sistema imune.

A existência de uma associação entre a ativação do sistema imune e a patofisiologia da depressão é sustentada por estudos clínicos, em ao menos três conjuntos de evidências. Por um lado, níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e TNF- α (Dowlati *et al*, 2010, Howren *et al*, 2009, Myint *et al*, 2005), de células T CD4+ ativas (Maes, 2010), de prostaglandina E2 (Ohishi *et al*, 1988, Calabrese *et al*, 1986, Linnoila *et al*, 1983), e de proteína C-reativa (Lanquillon *et al*, 2000 e Hafner *et al*, 2008) são encontrados em pacientes depressivos. Além disso, as evidências de que fármacos que modulam o sistema imune, como inibidores de COX-2 e antagonistas de TNF- α , apresentam benefícios terapêuticos em pacientes depressivos colaboram na sustentação da associação entre a patologia e a ativação de uma resposta inflamatória. Finalmente, a imunoterapia com interferon-alfa (IFN- α) aplicada a pacientes com alguns tipos de câncer e doenças virais crônicas, como hepatite C, induz quadros de depressão entre os muitos efeitos adversos. Estima-se que sintomas depressivos ocorram em 21–58% dos pacientes tratados com IFN- α (Raison, 2005); relevante a pesquisa translacional, comportamentos tipo-depressivos também aparecem em roedores

tratados com IFN- α (Myint *et al.*, 2009) e são atenuados pelo pré-tratamento com antidepressivos (Musselman *et al.*, 2001).

O interferon-alfa é uma citocinopleiotrópica, potente indutora de outras citocinas pró-inflamatórias como interleucina-6 (IL-6), interleucina-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α). Em pacientes com infecção crônica pelo vírus HCV tratados com interferon-alfa e que desenvolveram depressão, observou-se aumento nos níveis plasmáticos basais de citocinas pró-inflamatórias (Wichers *et al.*, 2006). Além disso, o interferon-alfa induz hiperativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal como resultado de desregulação em mecanismos de feedback negativo. Esta hiperativação pode ser considerada uma das características da depressão (Hoyo-Becerra *et al.*, 2014). Além disso, no córtex pré-frontal os níveis de serotonina são reduzidos por administração de IFN- α (Asnis *et al.*, 2003).

Uma vez estabelecida a associação entre a ativação do sistema imune e a patofisiologia da depressão maior, modelos animais que mimetizem os efeitos da imunoterapia com interferon-alfa são relevantes para estudos que busquem avaliar o uso de antidepressivos durante o tratamento. Este trabalho visa à caracterização de modelo animal de depressão induzida por interferon-alfa em camundongos Balb/c, utilizando os testes de preferência por sacarose, indução de comportamento doentio (*sickness behavior*) e teste de suspensão pela cauda.

2. Materiais e Métodos

Animais

Camundongos machos adultos da linhagem Balb/c (60 dias) foram obtidos de fornecedores credenciados (biotério da UFPel), sob supervisão da Unidade de Experimentação Animal do

HCPA. Os animais foram mantidos na UEA em ambiente controlado com temperatura entre 20 e 24 °C, umidade relativa do ar entre 40-60%, ciclo claro/escuro de 12h/12h com luzes acesas as 7h. Os animais foram alimentados com ração padrão para a espécie e água ad libitum e permaneceram em quarentena e aclimatação por 2 semanas antes do início dos experimentos. Todos os procedimentos ocorreram de acordo com os aspectos éticos adotados na universidade (aprovação pelo comitê de ética n° 28014).

Drogas

IFN- α 2b foi obtido da Aché (São Paulo, SP, Brasil) e albumina de soro bovino foi adquirida da empresa Sigma (St Louis, MO, USA); alíquotas de IFN- α foram diluídas em solução salina tamponada com fosfato (PBS). O grupo controle recebeu albumina 0,1% diluída em PBS. As soluções foram administradas no volume de 0,1 mL/10 g de peso corporal, por via intraperitoneal.

Desenho experimental

Após o período de aclimatação os animais foram isolados (1animal/caixa moradia) por 10 dias durante os quais duas garrafas de água foram mantidas em cada caixa moradia como adaptação para o teste de preferência a sacarose (vide abaixo). A partir do 15° dia os animais foram tratados diariamente por 7 dias com IFN- α 3MIU/kg ou 4MIU/kg (doses definidas através de pilotos realizados pelo grupo de acordo com a faixa encontrada na literatura) por via intraperitoneal (n=14-15); os controles receberam solução tamponada com fosfato (PBS) contendo 0,1% de albumina bovina. Os experimentos comportamentais foram realizados

conforme a sequência mostrada na Fig. 1. Os animais foram pesados antes e ao fim do tratamento com interferon.

Avaliação do *Sickness Behavior*:

Um conjunto de sintomas tem sido considerado para a caracterização de “*sickness behavior*” (comportamento doentio), que inclui: postura corporal encurvada, ptose palpebral, pelo irregular, ereção do pelo, ausência de resposta ao toque e letargia, (Anisman *et al*, 2007). Os animais foram observados em sua caixa-moradia, durante 1-3 minutos, 1 x dia (entre 8:30 e 9:30 horas), durante os últimos 3 dias de administração de interferon e na manhã seguinte à última administração. O grau de *sickness behavior* foi mensurado na seguinte escala de quatro escores (considerando os parâmetros descritos acima exceto letargia): 0 = sem sintoma, 1 = presença de um sintoma, 2 = presença de dois sintomas, 3 = presença de três ou mais sintomas dos acima elencados.

Preferência por sacarose

A metodologia utilizada no teste de preferência por sacarose foi a relatada por Frenois *et al* (2007). Baseia-se num paradigma no qual o animal pode escolher entre uma garrafa de água e uma garrafa contendo solução de sacarose. Após serem aclimatados por 10 dias com duas garrafas por gaiola, durante os 4 dias que precederam o início do tratamento com IFN- α os animais foram submetidos (em suas caixas-moradia) a sessões diárias de treinamento nas quais uma garrafa contendo solução sacarose 1% de foi justaposta à garrafa contendo de água por 12 horas (ciclo escuro); as sessões de treinamento tem o objetivo de reduzir a reação à novidade da solução de sacarose e estabelecer as linha bases de consumo. A posição das

garrafas foi intercalada a cada dia, a fim de evitar preferência dos animais por um lugar específico. Os animais não foram privados de comida ou água em qualquer momento, seja na fase de treinamento ou no teste. O consumo de fluído (gramas) foi medido através de pesagem das garrafas antes e depois da sessão de teste. O teste de preferência por sacarose foi realizado após a última administração de IFN- α , durante 12 horas a partir do desligamento das luzes do biotério. O consumo de sacarose foi expressado como porcentagem do total de líquido consumido, considerando o total de líquido consumido e o peso corporal do animal, segundo a fórmula: (sacarose consumida/líquido consumido) x 100/peso corporal.

Teste de suspensão pela cauda

A metodologia utilizada no teste de suspensão pela cauda (*tail suspension test*) foi a relatada por Steru *et al.* (1985) e adaptada para o nosso laboratório (Linck *et al.*, 2012; Costacampos *et al.*, 2013). No dia seguinte ao último tratamento, os animais foram suspensos pela porção terminal de suas caudas (com uma fita crepe) a uma altura de 50 cm acima da superfície. Foi avaliada a duração da imobilidade durante 6 minutos, conforme a metodologia de referência, sendo que os animais foram considerados imóveis apenas quando se balançavam passivamente ou permaneceram com movimentação mínima. Após os experimentos, os animais retornaram à caixa moradia.

Atividade Locomotora

Para descartar reações não-específicas dos tratamentos farmacológicos e falsos positivos no teste de suspensão pela cauda, os camundongos foram testados quanto a atividade locomotora em arenas de campo aberto feitas de melamina na cor cinza (40 x 40 x

40 cm). A atividade locomotora total (locomoção) foi avaliada no período da tarde no mesmo dia que os animais foram submetidos ao TST. Os animais foram filmados (por uma câmera digital instalada acima das arenas do campo aberto) durante 15 minutos, sendo os primeiros 5 minutos considerados como atividade exploratória e os últimos 10 minutos como atividade locomotora. Os vídeos foram analisados através do software ANY-Maze.

Análise estatística:

Os dados paramétricos foram analisados por ANOVA de uma via seguida pelo teste post hoc de Tukey. Os dados não paramétricos foram analisados por Teste de Friedman e Kruskal-Wallis, seguido de Mann-Whitney *U*. Foram considerados significativos valores de $p < 0,05$. Foram utilizados os programas PrismGraphPad 5.0 e SPSS 18.0 para Windows.

3. Resultados

Após o 6º dia de tratamento, a dose de 4MIU/kg (mas não a de 3MIU) de IFN- α induziu aumento significativo de *sickness behavior* em comparação com o grupo controle ($H=11,6$, $p < 0,01$, Fig. 2A). Não houve diferença significativa quanto ao consumo de solução palatável no teste de preferência por sacarose ($F_{2,41}=0,5039$, $p=0,6078$, Fig. 2B) ou peso corporal entre os grupos ($F_{2,41}=0,9121$, $p=0,4097$, Fig. 2C).

Não se observou diferença significativa ($F_{2,41}=0,3348$, $p=0,7174$) com nenhuma das duas doses de interferon quanto ao tempo de imobilidade no teste de suspensão pela cauda (Fig.3), nem tampouco à distância total percorrida ($F_{2,41}=0,07471$, $p=0,9281$) e número de cruzamentos no campo aberto ($F_{2,41}=1,783$, $p=0,1809$, dados não mostrados).

4. Discussão

Nosso estudo pretende modelar a situação clínica observada em pacientes tratados com IFN- α que desenvolvem sintomas depressivos. Após 6 dias de administração intraperitoneal de IFN- α 4MIU/kg, camundongos Balb/c apresentaram aumento significativo de parâmetros que caracterizam *sickness behavior*. Após 7 dias de tratamento com IFN- α , não houve aumento no tempo de imobilidade no TST, na preferência por sacarose, ou alteração de peso corporal em relação aos controles.

Relevante para os objetivos deste trabalho, os sintomas apresentados no *sickness behavior* assemelham-se aos sintomas neurovegetativos da depressão, que tendem a aparecer previamente aos sintomas cognitivos e afetivos da doença (Dantzer *et al* 2008, 2011). Estudos com animais tratados com lipopolissacarídeo (LPS), uma endotoxina que provoca resposta imune, sugerem uma dissociação entre mecanismos neurais subjacentes ao *sickness* dos envolvidos na resposta comportamental tipo-depressiva devido à ativação do sistema imune (Frenois *et al*, 2007). Segundo Dantzer *et al* (2008), resultados experimentais confirmam que a depressão associada a inflamação se desenvolve em cima de um cenário de *sickness behavior* mas não se confunde totalmente com este. Assim, o aumento do *sickness behavior* demonstrado nos animais tratados com IFN- α 4MIU/kg, mas ausência de alteração no tempo de imobilidade do TST e preferência por sacarose visto em nosso estudo, corroboram as evidências relatadas para o modelo com LPS.

As administrações crônicas de IFN- α com doses de 3 e de 4MIU/kg foram ineficientes para induzir aumento de imobilidade no TST, podendo ser consideradas doses baixas, se compararmos com os resultados de Ping *et al* (2012), em que camundongos tratados com 6MIU/kg apresentaram aumento no tempo de imobilidade no TST e FST e diminuição da preferência por sacarose (as doses menores testadas pelo grupo apresentaram resultados

positivos apenas no teste de nado forçado). Orsal *et al* (2008) encontraram efeitos crônicos de IFN- α apenas no teste de nado forçado (FST) e não no TST enquanto De La Garza II *et al* (2005) não encontraram efeitos comportamentais de IFN- α em ratos, tanto no FST quanto em teste de sacarose. A variabilidade dos resultados desse modelo se deve a diferenças experimentais. Diferentemente dos estudos do nosso grupo e de Orsal *et al* que utilizaram camundongos Balb/c, Ping *et al* testaram camundongos C57BL/6J e a via subcutânea de administração. Possíveis diferenças na biodisponibilidade do IFN- α conforme a via de administração e nos perfis imunológicos das linhagens, explicariam a oscilação dos resultados, assim como a dose a qual os animais foram submetidos. Em nossos experimentos a diferença significativa no *sickness* desapareceu no dia dos demais testes comportamentais e ainda assim não houve presença de sintomas tipo-depressivos. É importante observar que a diferença estatística foi perdida devido ao aumento nos escores de *sickness* do grupo controle, enquanto o grupo de IFN- α 4MIU/kg não diminuiu seus escores. Uma possibilidade é, portanto, realizar os testes de TST e preferência por sacarose no 7º dia onde o *sickness behavior* é mais intenso. De qualquer maneira os dados terão que ser analisados considerando que possa haver dificuldades motoras no momento do teste de imobilidade.

De La Garza II *et al* observaram diminuição significativa do peso de ratos tratados agudamente com o IFN- α . Na clínica, a citocina leva a diminuição de apetite e anorexia (Dantzer, 2009); embora a diferença entre os grupos não tenha sido significativa no presente estudo, é possível observar uma tendência de diminuição do peso em uma que parece ter alguma relação dose-dependente. Considerando-se que os animais apresentavam uniformidade nos pesos corporais no início do experimento, os dados indicam que a reação ao tratamento neste aspecto é variável e pode ser explorado em trabalhos posteriores, uma vez que a perda de peso pode ser relacionada à anorexia como parte de anedonia e indicaria diferentes susceptibilidades à depressão.

Estudos do nosso grupo detectaram aumento no tempo de imobilidade no TST após administração aguda de IFN- α ; além disso, mostramos que a N-acetilcisteína (NAC), um modulador glutamatérgico com propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes centrais, preveniu esse aumento (dados não publicados). Porém, uma vez que os sintomas de depressão induzida por IFN- α levam algumas semanas para aparecer na clínica, seria importante que a modelagem em animais se faça mantendo o mesmo padrão da clínica, ou seja, através de administrações crônicas da citocina para que o modelo tenha maior valor translacional e validade de construto. Considerando-se (1) o percentual de pacientes que desenvolvem sintomas depressivos durante o tratamento com IFN- α , (2) o fato do Rio Grande do Sul apresentar o segundo maior percentual de casos confirmados de hepatite C no Brasil (13%, Ministério da Saúde, 2012), (3) as evidências de que há uma forte relação entre depressão e inflamação, e (4) a necessidade de um tratamento mais efetivo, especialmente com menos efeitos adversos do que os antidepressivos padrão que se somam aos efeitos vegetativos do IFN- α , é relevante o estabelecimento de um modelo experimental para que se explorem novas alternativas terapêuticas, tais como NAC.

5. Contribuidores

Yasmine T. dos Santos desenhou o estudo, realizou os experimentos e análises estatísticas e escreveu o manuscrito. Ana Paula Hermann auxiliou no desenho do estudo. Patrícia Santos, Roberta A. Caetano, Rafael P. Lima e Radharani Benvenuto participaram dos experimentos e revisaram o manuscrito. Elaine Elisabethsky desenhou o estudo, analisou os dados e editou o manuscrito. Todos os autores contribuíram para o manuscrito final.

6. Conflitos de Interesse

Os autores declaram que não há conflitos de interesse neste trabalho.

7. Referências

Anisman, H., Poulter, M. O., Gandhi, R., Merali, Z., Hayley, S. Interferon-alpha effects are exaggerated when administered on a psychosocial stressor backdrop: cytokine, corticosterone and brain monoamine variations. *J Neuroimmunol.* 2007 May;186(1-2):45-53

Asnis GM, De La GR, Kohn SR, Reinus JF, Henderson M, Shah J: IFN-induced depression: a role for NSAIDs. *Psychopharmacol Bull* 2003; 37: 29–50.

Calabrese JR, Skwerer RG, Barna B, Gullledge AD, Valenzuela R, Butkus A, Subichin S, Krupp NE: Depression, immune competence, and prostaglandins of the E series. *Psychiatry Res* 1986; 17: 41–47.

Costa-Campos, L., Hermann, A. P., Pilz, L. K., Michels, M. Noetzold, G. Elisabetsky, E. Interactive effects of N-acetylcysteine and antidepressants. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2013 Jul 1;44:125-30.

Dantzer R, O'Connor JC, Lawson MA, Kelley KW. Inflammation-associated depression: from serotonin to kynurenine. *Psychoneuroendocrinology.* 2011 Apr;36(3):426-36.

Dantzer, Robert. Cytokine, sickness behavior, and depression. *Immunol Allergy Clin North Am* 2009, 29(2): 247-264.

Dantzer R, O'Connor J. C., Freund G. G., Johnson R. W., Kelley K. W. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci.* 2008 Jan;9(1):46-56.

De La Garza, R 2nd, Asnis G, M, Pedrosa E, Stearns C, Migdal A, L, Reinus J,F, Paladugu R, Vemulapalli S. Recombinant human interferon-alpha does not alter reward behavior, or neuroimmune and neuroendocrine activation in rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2005 Jun;29(5):781-92

Dowlati Y, Herrmann N, Swardfager W, Liu H, Sham L, Reim EK, Lanctot KL: A metaanalysis of cytokines in major depression. *Biol Psychiatry* 2010; 67: 446–457.

F. Frenois, M. Moreau, J. O'Connor, M. Lawson, C. Micon, J. Lestage, K.W. Kelley, R. Dantzer, N. Castanon, Lipopolysaccharide induces delayed FosB/DeltaFosB immunostaining within the mouse extended amygdala, hippocampus and hypothalamus, that parallel the expression of depressivelike behavior, *Psychoneuroendocrinology* 32 (2007) 516–531.

Hafner S, Baghai TC, Eser D, Schule C, Rupprecht R, Bondy B, Bedarida G, von SC: Creactive protein is associated with polymorphisms of the angiotensin-converting enzyme gene in major depressed patients. *J Psychiatr Res* 2008; 42: 163–165.

Howren MB, Lamkin DM, Suls J: Associations of depression with C-reactive protein, IL-1, and IL-6: a meta-analysis. *Psychosom Med* 2009; 71: 171–186.

Hoyo-Becerra C, Schlaak JF, Hermann DM. Insights from interferon- α -related depression for the pathogenesis of depression associated with inflammation. *Brain Behav Immun.* 2014 Jul 24.

Kiyohara C, Yoshimasu K. Molecular epidemiology of major depressive disorder. *Environ Health Prev Med* 2009; 14: 71-87

Lanquillon S, Krieg JC, Bening-Abu-Shach U, Vedder H: Cytokine production and treatment response in major depressive disorder. *Neuropsychopharmacology* 2000; 22: 370–379.

Linck, V. M., Costa-Campos, L., Pilz, L. K., Garcia, C. R., Elisabetsky, E. AMPA glutamate receptors mediate the antidepressant-like effects of N-acetylcysteine in the mouse tail suspension test. *Behav Pharmacol.* 2012; 23(2):171-7

Linnoila M, Whorton AR, Rubinow DR, Cowdry RW, Ninan PT, Waters RN: CSF prostaglandin levels in depressed and schizophrenic patients. *Arch Gen Psychiatry* 1983; 40: 405–406

Maes M. Depression is an inflammatory disease, but cell-mediated immune activation is the key component of depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2010 [special issue].

Ministério da Saúde, Boletim Epidemiológico Hepatites Virais. Ano III número 1 2012

Musselman, D.L., Lawson, D.H., Gumnick, J.F., Manatunga, A.K., Penna, S., Goodkin, R.S., Goodkin, R.S., Nemeroff, C.B., Miller, A.H., 2001. Paroxetine for the prevention of depression induced by high-dose interferon alfa. *N. Engl. J. Med.* 344, 961–966.

Myint, A.M., Schwarz, M.J., Steinbusch, H.W., Leonard, B.E., 2009. Neuropsychiatric disorders related to interferon and interleukins treatment. *Metab. Brain Dis.* 24,55–68.

Myint AM, Leonard BE, Steinbusch HW, Kim YK: Th1, Th2, and Th3 cytokine alterations in major depression. *J Affect Disord* 2005; 88:167–173.

Ohishi K, Ueno R, Nishino S, Sakai T, Hayaishi O: Increased level of salivary prostaglandins in patients with major depression. *Biol Psychiatry* 1988; 23: 326–334.

Orsal, A. S., Blois, S. M., Bermpohl, D., Schaefer, M., Coquery, N. Administration of interferon-alpha in mice provokes peripheral and central modulation of immune cells, accompanied by behavioral effects. *Neuropsychobiology.* 2008;58(3-4):211-22

Ping F, Shang J, Zhou J, Zhang H, Zhang L. 5-HT(1A) receptor and apoptosis contribute to interferon- α -induced "depressive-like" behavior in mice. *Neurosci Lett.* 2012 Apr 18;514(2):173-8.

Rang H P, Dale M M. Fármacos Antidepressivos. In: _____. *Farmacologia.* 6° edição. São Paulo: Elsevier; 2007. p 564-582.

Raison, C.L., Demetrashvili, M., Capuron, L., Miller, A.H., 2005. Neuropsychiatric adverse effects of interferon-alpha: recognition and management. *CNS Drugs* 19, 105–123.

Simon GE. Social and economic burden of mood disorders. *Biol Psychiatry*. 2003 Aug 1;54(3):208-15.

Steru, L., Chermat, R., Thierry, B., Simon, P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 1985;85(3):367-70.

Wichers MC, Kenis G, Leue C, Koek G, Robaey G, Maes M. Baseline immune activation as a risk factor for the onset of depression during interferon-alpha treatment. *Biol Psychiatry*. 2006 Jul 1;60(1):77-9

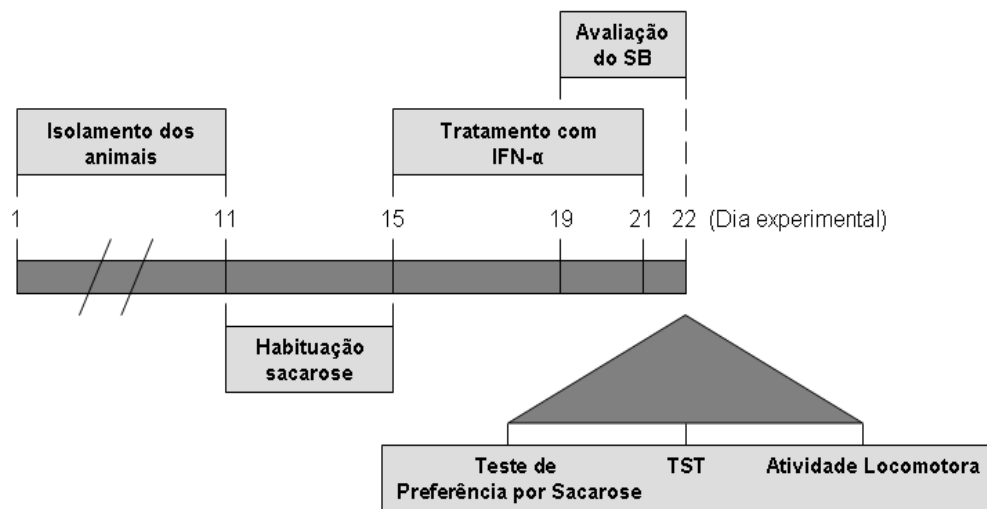


Fig. 1: Desenho experimental. Após a habituação dos animais com duas garrafas e com a solução de sacarose, os animais receberam tratamento diário com IFN- α (i.p.) por 7 dias. Após o quarto dia de tratamento, iniciou-se a avaliação do comportamento doentio, até após o sétimo dia de tratamento, no qual foram realizados os testes de preferência por sacarose, suspensão pela causa e atividade locomotora. SB: *Sickness Behavior*; TST: *Tail Suspension Test*.

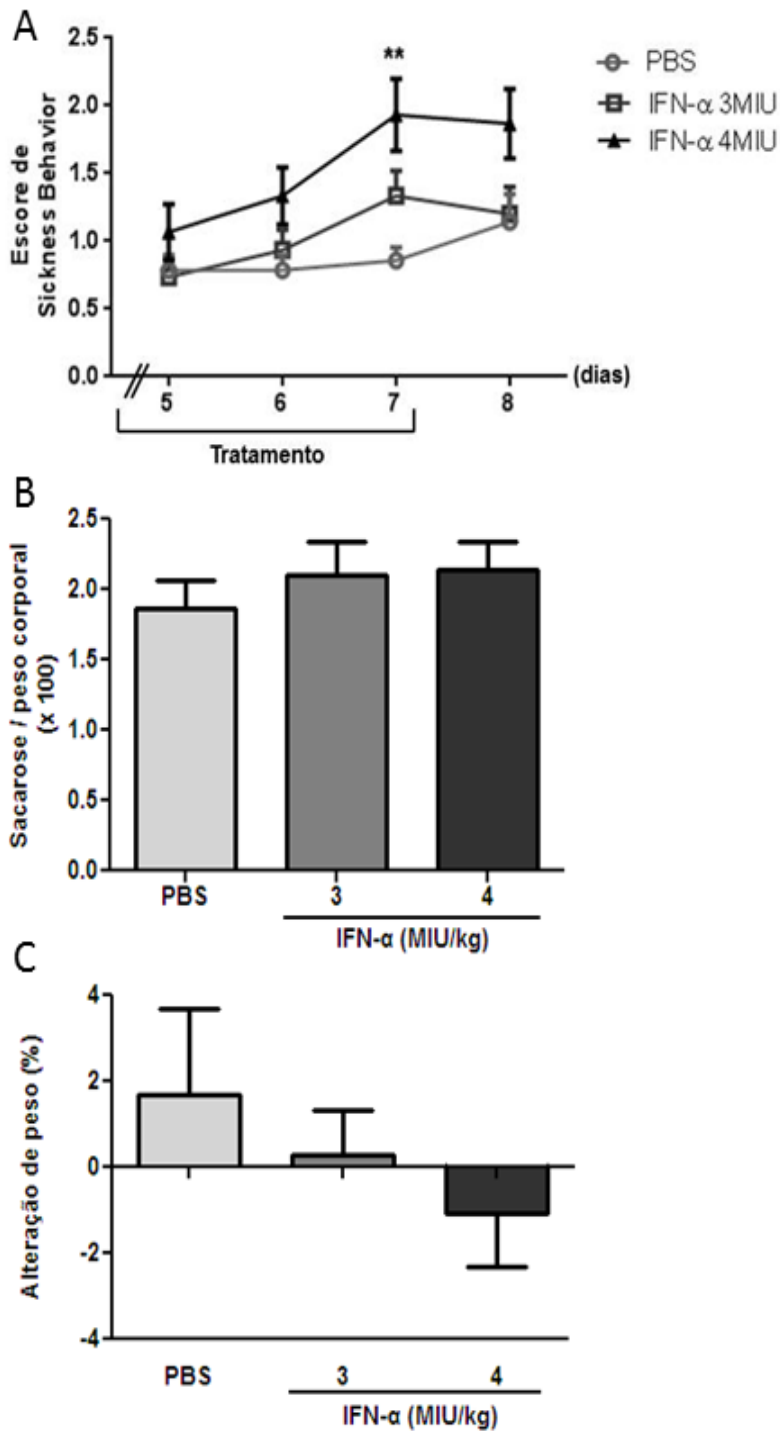


Fig 2. (A) Efeitos do IFN- α no comportamento doentio em camundongos Balb/C. Dados expressos em média +- EPM. n = 14-15. Dados analisados por Teste de Friedman; diferenças intradias por Kruskal-Wallis/Mann-Whitney. ** p < 0,01 vs grupo PBS. (B) Efeitos do IFN- α no teste de preferência por sacarose e (C) no peso corporal dos animais. Dados expressos em média +- EPM. n = 14-15.

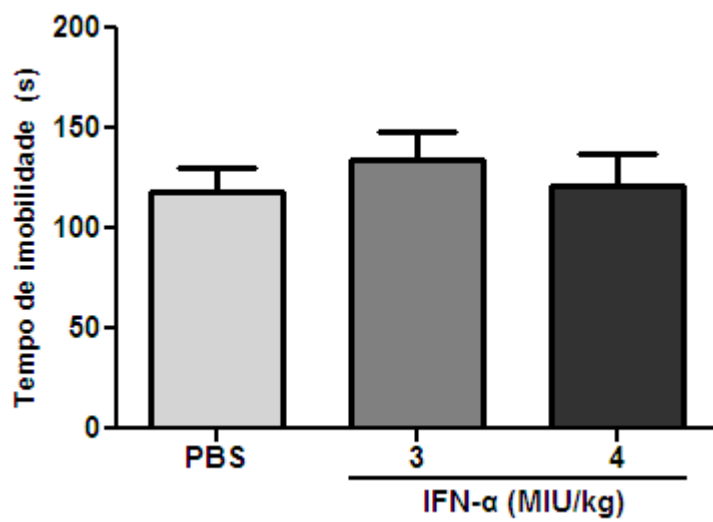


Fig. 3. Efeitos do IFN- α no teste de suspensão pela cauda. Dados expressos em média \pm EPM. n = 14-15.

4. Conclusões e perspectivas

A dose de 4MIU/kg de interferon-alfa induziu aumento significativo nos escores de *sickness behavior*, mas não sintomas tipo-depressivos, tais como redução de preferência por sacacore e aumento de tempo de imobilidade no TST. Outros estudos em modelos animais de IFN- α apresentaram resultados variáveis, sendo provável por influência dos diferentes desenhos experimentais, doses e vias de administração.

Pilotos realizados com camundongos Swiss também não apresentaram resultados com sintomas tipo-depressivos. Os dados relatados no trabalho não são de grande magnitude e é pouco provável que as alterações neuroquímicas vistas na literatura fossem replicadas. Os sintomas vegetativos representados pelo *sickness behavior* em animais e por uma série de parâmetros na clínica podem ser tomados como ponto decisivo para o início de medicação antes que se estabeleça depressão de forma mais acentuada.

Uma vez estabelecido o modelo, a perspectiva é de que seja testado o efeito de NAC e derivados. NAC é um modulador glutamatérgico, utilizado na clínica como mucolítico e na intoxicação por paracetamol. Por sua ação antioxidante, NAC tem sido utilizado em pacientes tratados com IFN- α (Look *et al*, 1999, Grant *et al*, 2000, Neri, 2000) e os estudos clínicos são focados na avaliação dos benefícios da associação de agentes antioxidantes com interferon. Porém, estudos que avaliem se o uso concomitante de NAC altera a incidência, o curso ou a intensidade dos sintomas depressivos observados em pacientes utilizando IFN- α não existem. Além da ação antioxidante e moduladora do sistema glutamatérgico, NAC mostrou ter propriedades anti-inflamatórias em estudos animais (Khan *et al*, 2004, Gang *et al*, 2008, Beloosesky *et al*, 2012) e em humanos (Nascimento *et al*, 2010, Mahmoud e Ammar, 2011, Csontos *et al*, 2012). Assim, analisar os potenciais efeitos anti-depressivos de NAC na depressão induzida por IFN- α é de grande interesse, uma vez que ele poderia ser benéfico tanto por sua ação moduladora do sistema glutamatérgico, como por sua ação sobre a inflamação.

5. Referências

Abe, S., Hori, T., Suzuki, T., Baba, A., Shiraishi, H., Yamamoto, T., 1999. Effects of chronic administration of interferon alpha A/D on serotonergic receptors in rat brain. *Neurochem. Res.* 24 (3), 359–363.

Beloosesky, R. Weiner, Z. Ginsberg, Y. Ross, M. G. Maternal N-acetylcysteine (NAC) protects the rat fetal brain from inflammatory cytokine responses to lipopolysaccharide (LPS). *J. Matern. Fetal Neonatal Med.* 2012 Aug;25(8):1324-8.

Bonaccorso, S., Marino, V., Puzella, A., et al., 2002. Increased depressive ratings in patients with hepatitis C receiving interferon-[alpha]-based immunotherapy are related to interferon-[alpha]-induced changes in the serotonergic system. *J. Clin. Psychopharmacol.* 22 (1), 86–90.

Charney, D. S. Manji, H. K. Life stress, genes, and depression: Multiple pathways lead to increased risk and new opportunities for intervention. *Sci. STKE* 2004, re5 (2004).

Cipriani A, Barbui C, Geddes J R. Suicide, depression, and antidepressants. *Br Med J* 2005; 330(7488): 373-374

Csontos, C. Rezman, B. Foldi, V. Bogar, L. Drenkovics, L. Röth, E. Weber, G. Lantos, J. Effect of N-acetylcysteine treatment on oxidative stress and inflammation after severe burn. *Burns.* 2012 May;38(3):428-37

Curzon G. Study of disturbed tryptophan metabolism in depressive illness. *Ann Biol Clin (Paris)* 1979;37(1):27–33.

Daley-Yates PT, Powell AP, Smith LL. Pulmonary indoleamine 2, 3-dioxygenase activity and its significance in the response of rats, mice, and rabbits to oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol* 1988;96(2):222–32.

DeMyer MK, Shea PA, Hendrie HC, Yoshimura NN. Plasma tryptophan and five other amino acids in depressed and normal subjects. *Arch Gen Psychiatry* 1981;38(6):642–6.

Gang C, Jixin S, Zhigang H, and Chunhua H, Inhibitory Effect on Cerebral Inflammatory Response following Traumatic Brain Injury in Rats: A Potential Neuroprotective Mechanism of N-Acetylcysteine. *Mediators of Inflammation*, vol. 2008, Article ID 716458, 8 pages, 2008.

Grant, P. R., Black, A., Garcia, N., Prieto, J., Garson, J. A. Combination therapy with interferon-alpha plus N-acetyl cysteine for chronic hepatitis C: a placebo controlled double-blind multicentre study. *J Med Virol*. 2000 Aug;61(4):439-42

Hashimoto K, Sawa A, Iyo M. Increased levels of glutamate in brains from patients with mood disorders. *Biol Psychiatry* 2007;62:1310–1316. [PubMed: 17574216]

Hashimoto K. Emerging role of glutamate in the pathophysiology of major depressive disorder. *Brain Res Rev* 2009; 61: 105-123

Insel, T. R., Sahakian, B. J. Drug research: a plan for mental illness. *Nature*. 2012 Mar 14;483(7389):269.

Joseph MS, Brewerton TD, Reus VI, Stebbins GT. Plasma L-tryptophan/neutral amino acid ratio and dexamethasone suppression in depression. *Psychiatry Res* 1984;11(3):185–92.

Kagaya, A., Kugaya, A., Takebayashi, M., et al., 2001. Plasma concentrations of interleukin-1 beta, interleukin-6, soluble interleukin-2 receptor and tumor necrosis factor alpha of depressed patients in Japan. *Neuropsychobiology* 43, 59–62.

Khan, A., Faucett, J., Lichtenberg, P., Kirsch, I., Brown, W. A. A systematic review of comparative efficacy of treatments and controls for depression. *PLoS One*. 2012;7(7):e41778.

Khan, M., Sekhon, B., Jatana, M., Giri, S., Gilg, A. G., Sekhon, C., Singh, I. and Singh, A. K. (2004), Administration of N-acetylcysteine after focal cerebral ischemia protects brain and reduces inflammation in a rat model of experimental stroke. *J. Neurosci. Res.*, 76: 519–527.

Kirsch, I., Deacon, B. J., Huedo-Medina, T. B., Scoboria, A., Moore, T. J., Johnson, B. T. Initial severity and antidepressant benefits: a meta-analysis of data submitted to the Food and Drug Administration. *PLoS Med.* 2008 Feb;5(2):e45.

Lapin IP. Neurokynurenines (NEKY) as common neurochemical links of stress and anxiety. *AdvExp Med Biol* 2003;527:121–5.

Licinio J, Wong M-L. Depression, antidepressants and suicidality: a critical appraisal. *Nat Rev Drug Discov* 2005; 4: 165-171

Look, M. P., Gerard, A., Rao, G. S., Sudhop, T., Fischer, H. P., Sauerbruch, T., Spengler, U. Interferon/antioxidant combination therapy for chronic hepatitis C-- a controlled pilot trial. *Antiviral Res.* 1999 Sep;43(2):113-22.

Machado-Vieira, R., Salvadore, G., Ibrahim, L., Diaz-Granados, N., and Zarate, C. J. (2009). Targeting glutamatergic signaling for the development of novel therapeutics for mood disorders. *Curr Pharm Des* 15(14), 1595-611.

Mackay, G. M., Forrest, C. M., Stoy, N., Christofides, J., Egerton, M. Stone, T. W, Darlington LG. Tryptophan metabolism and oxidative stress in patients with chronic brain injury. *Eur J Neurol.* 2006 Jan;13(1):30-42

Maes, M. Leonard, B.E. Myint, A.M. Kubera, M. Verkerk, R. The new '5-HT' hypothesis of depression: Cell-mediated immune activation induces indoleamine 2,3-dioxygenase, which leads to lower plasma tryptophan and an increased synthesis of detrimental tryptophan catabolites (TRYCATs), both of which contribute to the onset of depression / *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 35 (2011) 702–721

Maes M, Bonaccorso S, Marino V, Puzella A, Pasquini M, Biondi M, et al. Treatment with interferon-alpha (IFN alpha) of hepatitis C patients induces lower serum dipeptidyl peptidase IV activity, which is related to IFN alpha-induced depressive and anxiety symptoms and immune activation. *Mol Psychiatry* 2001;6(4):475–80.

Maes M, Schotte C, D'Hondt P, Claes M, Vandewoude M, Scharpe S, et al. Biological heterogeneity of melancholia: results of pattern recognition methods. *J Psychiatr Res* 1991a;25(3):95-108.

Maes M, Minner B, Suy E. The relationships between the availability of L-tryptophan to the brain, the spontaneous HPA-axis activity, and the HPA-axis responses to dexamethasone in depressed patients. *J AminoAcids* 1991b;1(1):57–65.

Maes M, Vandewoude M, Schotte C, Martin M, D'Hondt P, Scharpe S, et al. The decreased availability of L-tryptophan in depressed females: clinical and biological correlates. *ProgNeuropsychopharmacolBiol Psychiatry* 1990;14(6):903–19.

Maes M, Maes L, Suy E. Symptom profiles of biological markers in depression: a multivariate study. *Psychoneuroendocrinology* 1990;15(1):29–37.

Mahmoud, K. M., Ammar, A. S. Effect of N-acetylcysteine on cardiac injury and oxidative stress after abdominal aortic aneurysm repair: a randomized controlled trial. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2011 Sep;55(8):1015-21.

Merali Z, Lacosta S, Anisman H: Effects of interleukin-1 β and mild stress on alterations of norepinephrine, dopamine and serotonin neurotransmission: a regional microdialysis study. *Brain Res* 1997; 761: 225–235.

Møller SE. Tryptophan to competing amino acids ratio in depressive disorder: relation to efficacy of antidepressive treatments. *Acta Psychiatr Scand Suppl* 1985;325:3-31.

Morikawa, O., Sakai, N., Obara, H., Saito, N., 1998. Effects of interferon-alpha, interferon-gamma and cAMP on the transcriptional regulation of the serotonin transporter. *Eur. J. Pharmacol.* 349, 317–324.

Mossner, R., Heils, A., Stober, G., Okladnova, O., Daniel, S., Lesch, K.P., 1998. Enhancement of serotonin transporter function by tumor necrosis factor alpha but not by interleukin-6. *Neurochem. Int.* 33, 251–254.

Muller N, Schwarz MJ: The immune-mediated alteration of serotonin and glutamate: towards an integrated view of depression. *Mol Psychiatry* 2007; 12: 988–1000.

Muller, N. Immunology of major depression. *Neuroimmunomodulation*, 2014;21(2-3):123-30.

Murphy, K. Travers, P. Walport, M. *Imunobiologia de Janeway* /; 7.ed. – Porto Alegre :Artmed, 2010.

Nascimento, M. M. Suliman M. E. Silva, M. Chinaglia, T. Marchioro, J. Hayashi, S. Y. Riella, M. C. Lindholm, B. Anderstam, B. Effect of oral N-acetylcysteine treatment on plasma inflammatory and oxidative stressmarkers in peritoneal dialysis patients: a placebo-controlled study. *Perit Dial Int.* 2010 May-Jun;30(3):336-42

Neri, S., Ierna, D., Antoci, S., Campanile, E., D'Amico, R. A., Noto, R. Association of alpha-interferon and acetyl cysteine in patients with chronic C hepatitis. *Panminerva Med.* 2000 Sep;42(3):187-92

O'Connor JC, André C, Wang Y, Lawson MA, Szegedi SS, Lestage J, et al. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha mediate the upregulation of indoleamine 2, 3-dioxygenase and the induction of depressive-like behavior in mice in response to bacillus Calmette–Guerin. *J Neurosci* 2009a;29(13):4200–9.

O'Connor JC, Lawson MA, André C, Moreau M, Lestage J, Castanon N, et al. Lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior is mediated by indoleamine 2, 3-dioxygenase activation in mice. *Mol Psychiatry* 2009b;14(5):511–22.

Oxenkrug GF. Genetic and hormonal regulation of tryptophan kynurenine metabolism: implications for vascular cognitive impairment, major depressive disorder, and aging. *Ann NY AcadSci* 2007;1122:35–49.

Petitto, J.M., McCarthy, D.B., Rinker, C.M., Huang, Z., Getty, T., 1997. Modulation of

behavioral and neurochemical measures of forebrain dopamine function in mice by species-specific interleukin-2. *J. Neuroimmunol.* 73, 183–190.

Ramamoorthy, S., Ramamoorthy, J.D., Prasad, P.D., et al., 1995. Regulation of the human serotonin transporter by interleukin-1 beta. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 216, 560–567.

Sanacora, G, Zarate, CA, Krystal, J, Manji, HK.(2008). Targeting the Glutamatergic System to Develop Novel, Improved Therapeutics for Mood Disorders. *Nat. Rev. Drug Discov.* 7(5):426–437.

Song C, Merali Z, Anisman H: Variations of nucleus accumbens dopamine and serotonin following systemic interleukin-1, interleukin-2 or interleukin-6 treatment. *Neuroscience* 1999; 88: 823–836.

Song, C., 2000. The interaction between cytokines and neurotransmitters in depression and stress: possible mechanism of antidepressant treatments. *Hum. Psychopharmacol.* 15, 199–211.

Stahl, S, M. Depression and bipolar disorder : Stahl's essential psychopharmacology, 3rd edition. Cambridge University Press, Nova York, 2008

Tokita, K., Yamaji, T., Hashimoto, K. Roles of glutamate signaling in preclinical and/or mechanistic models of depression. *PharmacolBiochemBehav.* 2012 Feb;100(4):688-704.

Wichers M, Maes M. The psychoneuroimmuno-pathophysiology of cytokine-induced depression in humans. *Int J Neuropsychopharmacol* 2002;5(4):375–88.

6. Anexos

Anexo I – Normas da revista *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*.

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

Journal of Pharmacological and Toxicological Methods publishes articles on methods of investigation used in pharmacology, safety pharmacology and toxicology. Defined in the broadest sense. With its international editorial board and noted contributors, *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* is the leading journal devoted exclusively to the elaboration and validation of experimental methods.

For more details on how to write a world class paper, please visit our Pharmacology Author Resources page.

Authors are encouraged to submit supplementary video material to enrich their written article.

Authors are encouraged to submit video material or animation sequences to support and enhance your scientific research. For more information please see the paragraph on video data below.

Types of paper

The *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* publishes papers in a range of categories:

"Original articles": description and characterization of a new or modified disease model, method, technique, apparatus or approach to analysis of data. This may include interspecies comparisons that contrast drug actions from a model relevance perspective; "Brief communications" detailing simple modifications of an existing model, method, technique, apparatus or approach to analysis of data; "How To" articles that provide step-by-step guidance on the execution of a specific technique; "Appraisal of state-of-the-art" or "Historical review" of particular models, methods, techniques or apparatus; "Methods in drug discovery" - perhaps the most important category. Here, by showing how a method was used to select a drug that was eventually found to be clinically effective, the author establishes validation of the method.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

Human and animal rights

If the work involves the use of animal or human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>; EU Directive 2010/63/EU for animal experiments http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm; Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals <http://www.icmje.org>. Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. Further information and an example of a Conflict of Interest form can be found at: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/286/p/7923.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/sharingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

Contributors

Each author is required to declare his or her individual contribution to the article: all authors must have materially participated in the research and/or article preparation, so roles for all authors should be described. The statement that all authors have approved the final article should be true and included in the disclosure.

Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see <http://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement. Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the

source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>).

Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <http://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. For more information see <http://www.elsevier.com/copyright>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some authors may also be reimbursed for associated publication fees. To learn more about existing agreements please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse
- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf e.g. by their research funder or institution

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our universal access programs (<http://www.elsevier.com/access>).
- No open access publication fee payable by authors.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards. For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution (CC BY)

Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article. The open access publication fee for this journal is **USD 3000**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/languageediting/>) or visit our customer support site (<http://support.elsevier.com>) for more information.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Additional information

Papers focused on the actions of drugs are beyond the scope of the journal. Manuscripts will be evaluated by a member of the board of editors of the Journal, and a panel of international

reviewers. An editorial decision will normally be made within 4 weeks of receipt of the manuscript, and publication will normally take place within 3 months of final acceptance.

PREPARATION

Essential title page information for all articles

Title. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible. **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lowercase superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name, and, if available, the email address of each author. **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a " Present address" (or " Permanent address") may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

This must not exceed 300 words and should be subdivided into four subsections headed: Introduction, Methods, Results, Discussion.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 10 keywords (one of which should be "methods") in alphabetical order, using British spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and" , "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in the field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Specific instructions for "regular articles":

Introduction

This must outline the reason for the study and justify the approach taken.

Methods

This section should be sufficiently detailed to permit the reader to replicate the study. It should be a full recipe, with step by step instructions. We prefer the bulk of the descriptions in prose, but tables summarising sequences of procedures are a good accompaniment to the text. Subcomponents of the method that have been described in detail in the literature should be described in full, but appropriate citation of the original source method is mandatory.

Results

This section should be concise and must not contain repetition of the methods. Data in the text must not replicate data in tables or figures. SI units must be used.

Discussion

The potential value of the data to pharmacological or toxicological research methods must be clearly explained, with appropriate reference to existing methods and their limitations. This section must not contain paragraphs dealing with topics that are beyond the scope of the study.

Specific instructions for "How To" articles:

" How To" articles that provide step-by-step guidance on the execution of specific techniques.

Introduction For "How To" articles, this section will be very brief, and will simply identify the therapeutic area, the goal of the method, and give mention to published (less detailed, presumably) descriptions if available. It is unlikely that many papers will be cited in this section.

Methods

This section should be sufficiently detailed to permit the reader to replicate the study. It should be a full recipe, with step by step instructions. I prefer the bulk of the descriptions in prose, but tables summarising sequences of procedures are a good accompaniment to the text. Subcomponents of the method that have been described in detail in the literature should be described in full, but appropriate citation of the original source method is mandatory.

Results

This section should be concise and must not contain repetition of the methods. Data in the text must not replicate data in tables or figures. SI units must be used. For How To articles, some representative data showing that the recipe works is essential. It would be especially useful,

too, if data is contrasted with that using other methods (if no author-derived comparative data is available, please reproduce data from the literature in a table, citing the source). It is essential for the reader to know that the method works, and works well.

Discussion

The potential value of the data to pharmacological or toxicological research methods must be clearly explained, with appropriate reference to existing methods and their limitations. This section must not contain paragraphs dealing with topics that are beyond the scope of the study.

Specific instructions for "Appraisal of State of the Art"-articles:

Appraisal articles are reviews about the current best models. The review needs to describe the current best model, and discuss the evidence (or lack of) to support the idea that the model is good. A good model should demonstrably detect drugs that work (or cause adverse effects) in man, and demonstrably have few false positives or negatives. This evidence should be presented. The review should contrast the current best model with other available but inferior models, thereby illustrating why one is the state-of-the-art model.

Text to be divided into sections according to author choice.

Specific instructions for "Historical review" articles:

Historical reviews can be more personal and less formal. Senior figures in a field may have decades of experience with models, methods, techniques of apparatus. It is of immense value and interest to the research community to learn the history of the development of a model, understand why one model was abandoned and another developed, and get insight into the thinking behind a model, and the impact of good and bad models in drug development in a particular field. In addition, in many fields many models are still used that are transparently inadequate - it would be of great value to obtain a candid expose from an experienced practitioner as to why this might be, including insight into personal perspective as it changed over the years.

Text to be divided into sections according to author choice

Specific instructions for "Methods in drug discovery" articles:

These articles are specifically intended to showcase, for the wider audience, exactly how methods were applied by a pharmaceutical company in the preclinical development of one of their own drugs. While it is appreciated that companies may wish to keep certain information confidential, it would be of great interest to the reader to be able to understand the logic (or lack of) behind the choice of each preclinical test used in the drug's development.

Demonstration that use of a series of models, methods, techniques and apparatus gave rise to a drug that works in man is the closest we can get to a methods validation - a much neglected area. The reader would also benefit by having revealed the logic behind the decision-making that allowed the successful drug to proceed in development, while analogues and other compounds were dropped. Consideration of whether this decision was making based on proof, or on the exercise of judgement, or a mixture of both will be of value to the author as well as the reader as it will identify weak areas in the process for future improvements in pharmacological and toxicological methods.

Text to be divided into the following sections

Brief overview of evidence that drug X is now established as being clinically effective

Original hypothesis that triggered the search for a drug of type X
Preclinical models used in defining drug X's properties (subsections in sequence, explaining logic behind choice)

Outcome of tests (subsections in sequence, explaining logic behind successive decision making)
Conclusions

Specific instructions for all articles:

Chemical compounds

You can enrich your article by providing a list of chemical compounds studied in the article. The list of compounds will be used to extract relevant information from the NCBI PubChem Compound database and display it next to the online version of the article on ScienceDirect. You can include up to 10 names of chemical compounds in the article. For each compound, please provide the PubChem CID of the most relevant record as in the following example: Glutamic acid (PubChem CID:611). The PubChem CIDs can be found via <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound>. Please position the list of compounds immediately below the 'Keywords' section. It is strongly recommended to follow the exact text formatting as in the example below:

Chemical compounds studied in this article

Ethylene glycol (PubChem CID: 174); Plitidepsin (PubChem CID: 44152164); Benzalkonium chloride (PubChem CID: 15865)

More information is available at: <http://www.elsevier.com/PubChem>.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise.

List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Please note: Because of technical complications that can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have a standard template available in key reference management packages. This covers packages using the Citation Style Language, such as Mendeley (<http://www.mendeley.com/features/reference-manager>) and also others like EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to word processing packages which are available from the above sites, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style as described in this Guide. The process of including templates in these packages is constantly ongoing. If the journal you are looking for does not have a

template available yet, please see the list of sample references and citations provided in this Guide to help you format these according to the journal style.

If you manage your research with Mendeley Desktop, you can easily install the reference style for this journal by clicking the link below:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/journal-of-pharmacological-and-toxicological-methods>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plugins for Microsoft Word or LibreOffice. For more information about the Citation Style Language, visit <http://citationstyles.org>.

Reference style

Text: Citations in the text should follow the referencing style used by the American Psychological Association. You are referred to the Publication Manual of the American Psychological Association, Sixth Edition, ISBN 978-1-4338-0561-5, copies of which may be ordered from <http://books.apa.org/books.cfm?id=4200067> or APA Order Dept., P.O.B. 2710, Hyattsville, MD 20784, USA or APA, 3 Henrietta Street, London, WC3E 8LU, UK.

List: references should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J. A. J., & Lupton, R. A. (2010). The art of writing a scientific article. *Journal of Scientific Communications*, 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk, W., Jr., & White, E. B. (2000). *The elements of style*. (4th ed.). New York: Longman, (Chapter 4).

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G. R., & Adams, L. B. (2009). How to prepare an electronic version of your article. In B. S. Jones, & R. Z. Smith (Eds.), *Introduction to the electronic age* (pp. 281–304). New York: E-Publishing Inc.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations:

<http://www.issn.org/services/online-services/access-to-the-ltwa/>.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <http://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Supplementary material

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more

detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Database linking

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving readers access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See <http://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)

Printed version of figures (if applicable) in color or black-and-white

- Indicate clearly whether or not color or black-and-white in print is required.
- For reproduction in black-and-white, please supply black-and-white versions of the figures for printing purposes.

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.