

Sildenafil Depresyon Benzeri Etkisinin Farelerde Zorunlu Yüzdürme Testi ile Değerlendirilmesi

Elif AKSÖZ*, S.Sırrı BİLGE**, Mehmet KURT**, Yüksel KESİM***, Süleyman ÇELİK***

- ✓ Fosfodiesteraz tip 5 (PDE5), nitrik oksit sentaz (NOS) ve guanilat siklazın beyinde davranışlardan sorumlu alanlarda yüksek aktivite gösterdiği bildirilmektedir. Eretil disfonksiyon tedavisinde kullanılan PDE5 inhibitörü sildenafilin kan beyin bariyerini geçtiği ve davranışla ilgili bazı yan etkilere neden olabileceği ileri sürülmektedir. Bu çalışmanın amacı, sildenafilin depresyon üzerine etkisini farelerde, zorunlu yüzdürme testi ile araştırmaktır. Sildenafil (1, 5, 10, 15, 20, 30 mg/kg), sertralin (20 mg/kg) ve imipramin (30 mg/kg) intraperitoneal (ip) olarak verildi. Tüm ilaçlar testlerden 15 dakika önce uygulandı. Sertralin ve imipramin hem tek başlarına hem de sildenafil ile kombine edilerek kullanıldı. Kombinasyon uygulamalarında diğer ilaçlar sildenafilden 10 dakika önce verildi. Lokomotor aktivite ölçüm cihazında (Ugo Basile, 7430-Varese, İtalya) her bir farenin lokomotor aktivitesi kaydedildi. Ardından, 6 dakikalık yüzme testinin son 4 dakikasında immobilité süreleri ölçüldü. İmmobilité süresinin uzaması depresyon benzeri etki olarak değerlendirildi. Sildenafil yalnızca 10 mg/kg dozda lokomotor aktiviteyi değiştirmeden immobilité süresini artırdı ($p<0.05$). İmipramin ve sertralin immobilité süresini anlamlı olarak azalttı ($p<0.05$). Sildenafilin (10 mg/kg) depresan benzeri etkisi sertralin ve imipramin ile kombine edildiğinde önlendi ($p<0.05$). Bu bulgular, sildenafilin zorunlu yüzdürme testinde depresan benzeri etkisinin olduğunu ve NO-cGMP yolağının depresyonda önemli rolünün olabileceğini düşündürmektedir.
- Anahtar kelimeler:** Sildenafil, depresyon, zorunlu yüzdürme testi, fare

- ✓ **The Depressant-Like Effect of Sildenafil in The Forced Swimming Test in Mice**
- Phosphodiesterase type 5 (PDE5), nitric oxide synthase (NOS) and guanylate cyclase have shown high activity in areas responsible to behaviours in brain. It is alleged that PDE5 inhibitor sildenafil which is used in erectile disfunction passes blood brain barrier and can cause adverse effects related to behaviours. The aim of this study, to investigate the effect of sildenafil in depression by forced swimming test in mice. We administered sildenafil (1, 5, 10, 15, 20, 30 mg/kg), sertraline (20 mg/kg) and imipramine (30 mg/kg) with intraperitoneal (ip) injection. All drugs were injected 15 min. before testing. Sertraline and imipramine given alone and in combination with sildenafil. When combination with sildenafil and other drugs were employed, other drugs were administered 10 min. before sildenafil. The activity of each mice was recorded for 5 min. in an activity cage (Ugo Basile, 7430-Varese, Italy). Then immobility was measured during the last 4 min. of the 6 min. swim test. Increase immobility time in a swim test has been found to represent "depression-like" behaviour. Sildenafil at a dose of 10mg/kg increased the immobility time without affecting locomotor activity ($p<0.05$). Imipramine and sertraline significantly decreased the immobility time ($p<0.05$). The depressant-like effect of sildenafil (10 mg/kg) was prevented by pretreatment with both sertraline and imipramine ($p<0.05$). These findings suggest that, sildenafil has a depressant-like effect on the forced swimming test and NO-cGMP pathway may play a role in depression.
- Key words:** Sildenafil, depression, forced swimming test, mice

* Arař.Gör., Dr., ** Yrd.Doç.Dr., *** Prof.Dr., Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, SAMSUN

GİRİŞ

Erektile disfonksiyon tedavisinde kullanılan sildenafil, siklik guanozin monofosfata (cGMP) özgül fosfodiesteraz tip 5'in (PDE5) seçici inhibitörüdür⁽¹⁾. Ereksiyon fizyolojisinde cinsel uyarıya sekonder olarak salıverilen nitrik oksit (NO) guanilat siklazı aktifleyerek cGMP yapımını sağlar. cGMP, protein kinaz G'yi (PKG) aktifler ve hücre içi kalsiyum (Ca²⁺) seviyesi azalır. Damar düz kasları gevşer ve kan akımı artışı ile ereksiyon meydana gelir. Fakat cGMP kısa bir süre sonra PDE5 tarafından parçalanır. Sildenafil, korpus kavernozumdaki PDE5'i inhibe ederek cGMP yıkımını engeller ve etkinin devamını sağlar⁽²⁾.

Son zamanlarda sildenafilin davranışlar üzerinde istenmeyen etkileri bildirilmeye başlanmıştır. Klinik çalışmalarda uykusuzluk, sınırlılık ve anksiyete gibi santral sinir sistemi yan etkilerinin yanı sıra depresyon benzeri etkiden de söz edilmektedir⁽³⁾. Sildenafil, etkisini cGMP yıkımını inhibe ederek göstermektedir. cGMP artışının, NO-cGMP yolağı üzerine, özellikle de NOS aktivitesi üzerine negatif feedback etki yapabileceği ve buna bağlı olarak NO seviyesinde azalma ortaya çıkabileceği bildirilmektedir⁽⁴⁾.

NO, hem santral hem de periferik sinir sisteminde nörotransmitter görevi yapan çözünür bir gazdır. Bir çok fizyolojik olayda rol almasının yanı sıra depresyon gibi nöropsikiyatrik hastalıklarda da rolü olduğu düşünülmektedir⁽⁵⁾. NO, sentezlendikçe salıverilen bir moleküldür. L-arjininden, O₂ ve NADPH yardımıyla, nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi aracılığı ile oluşur⁽⁶⁾. Kısa yarı ömründen dolayı NO'nun etkilerini araştıran çalışmalarda prekürsörleri, donörleri ya da NOS inhibitörleri kullanılmaktadır. Nöronal NOS inhibitörü 7-nitroindazol'un (7-NI) zorunlu yüzdürme testinde doza bağımlı olarak antidepresan benzeri etki oluşturduğu ve bu etkinin L-arjinin'in önceden verilmesiyle önlendiği⁽⁷⁾; başka bir NOS inhibitörü metilen mavisinin de zorunlu yüzdürme testinde antidepresan benzeri etki gösterdiği bildirilmiştir⁽⁸⁾. NO-cGMP yolağının spesifik in-

hibitörü 1H-(1,2,4)Oksadiazol(4,3-a)kuinoksalin-1-one (ODQ)'nun da benzer şekilde antidepresan benzeri etki oluşturduğu rapor edilmiştir⁽⁹⁾. Klinik çalışmalarda da depresyonlu hastalarda, plazmada NO metabolitleri nitrat ve nitrit seviyelerinin yükseldiği^(10,11), hipotalamusta ve lokus cerulousta NOS immunoreaktif hücrelerin azaldığı bildirilmektedir^(12,13). Tüm bu çalışmalar depresyonda NO'nun önemine işaret etmektedir.

Bu çalışmanın amacı, sildenafilin depresyon üzerine etkisini farelerde zorunlu yüzdürme testini kullanarak araştırmaktır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Deney hayvanları: Bu çalışmada, ağırlıkları 25-40 gr arasında değişen, 5-7 haftalık erkek albino fareler kullanıldı. Deneyler 12 saat aydınlık-karanlık (07.00-19.00) periyoda sahip, ısısı ve bağıl nemi sabit (22±2 °C) laboratuvarda gerçekleştirildi. Çalışmalar, Helsinki Deklarasyonuna ve Amerikan Ulusal Sağlık Örgütü (USA NIH) tarafından bildirilen Laboratuvar Hayvanlarının Kullanımına ve Bakımına İlişkin Rehber'e uygun olarak gerçekleştirildi.

İlaçlar: Sildenafil sitrat (Fako İlaçları A.Ş., İstanbul), İmipramin HCl (Novartis İlaçları A.Ş., İstanbul), Sertralin HCl (Pfizer İlaçları A.Ş., İstanbul). Tüm ilaçlar serum fizyolojikte çözüldürüldü.

Yöntem: Her birinde 7 adet albino fare bulunan 11 grup rasgele seçim yöntemi ile oluşturuldu. Çalışmada kullanılan ilaçlar, 10 ml/kg hacminde ve intraperitoneal olarak verildi. Kontrol grubuna sadece serum fizyolojik (SF) (10 ml/kg, ip) injekte edildi. Sildenafil 1, 5, 10, 15, 20 ve 30 mg/kg dozlarında uygulandı. Bir trisiklik antidepresan olan imipramin (30 mg/kg, ip) ve selektif serotonin geri alım inhibitörü olan sertralin (20 mg/kg, ip), önce tek başlarına, daha sonra sildenafil (10 mg/kg) ile kombine edilerek kullanıldı. Kombinasyon uygulamalarında antidepresan ilaçlar sildenafilden 10 dakika önce verildi.

Lokomotor aktivite ölçümü: İlaçlar uygulandıktan 15 dakika sonra fareler lokomotor aktivite cihazına (Ugo Basile, 7430-Varese, İtalya) konularak spontan lokomotor aktivite 5 dakika süreyle ölçüldü.

Zorunlu yüzdürme testi: Zorunlu yüzdürme testi iki aşama halinde yapıldı. İlk olarak 15 dakikalık bir ön uygulama, 24 saat sonra da gerçek uygulamaya geçildi. Bu test için, 18 cm çaplı pleksiglas bir silindir kabın içine ısı 24±1°C arasında olan su dolduruldu. Deney hayvanları 12 cm derinliği olan suda 6 dakika yüzdürüldü ve son 4 dakika içinde immobilité süreleri ölçülerek kaydedildi. Hayvanlar çabalamayı bırakıp, sadece başları suyun üzerinde, ekstremiteleri hareketsiz olarak durduklarında immobil kabul edildi. İmmobilité süresinin uzaması depresyon benzeri etki olarak değerlendirildi.

İstatistiksel analiz: Veriler ortalaması± standart hata olarak ifade edildi. Gruplar arasındaki farkın değerlendirmesinde varyans analizi (ANOVA) kullanıldı. Post Hoc analizde Bonferroni testinden yararlanıldı. p<0.05 değeri anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

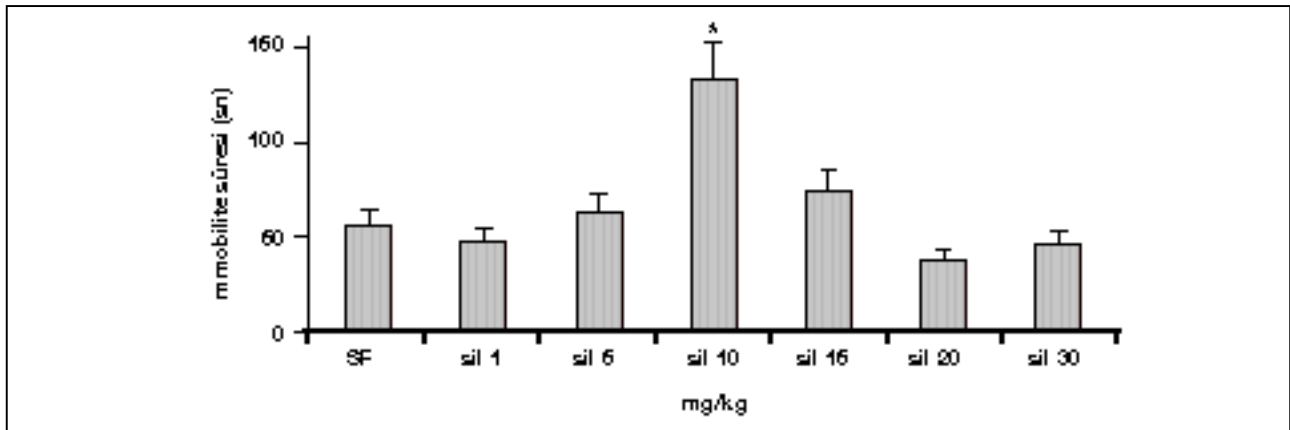
Zorunlu yüzdürme testi

Sildenafil 1, 5, 15, 20, 30 mg/kg dozlarında uygulandığında immobilité süresinde

kontrol grubuna göre anlamlı bir değişiklik saptanmazken 10 mg/kg verildiğinde immobilité süresinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığı saptandı (p<0.05) (Şekil 1). İmipramin (30 mg/kg, ip) ve sertralin (20 mg/kg, ip) tek başlarına uygulandığında, immobilité süresi kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldı (p<0.05). İmipramin ve sertralin sildenafilin depresan benzeri etki yapan dozu olan 10 mg/kg ile kombine edildiğinde ise; sildenafilin immobilité süresini artırıcı etkisinin önlendiği saptandı (p<0.05) (Şekil 2).

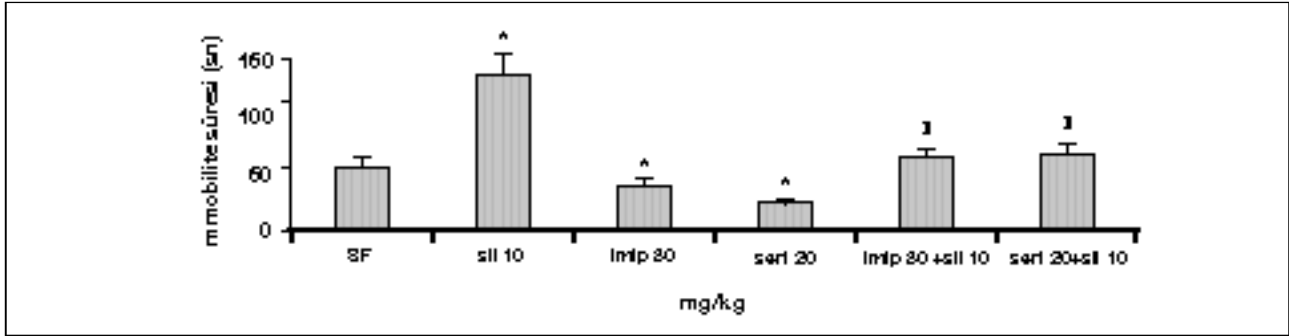
Lokomotor aktivite

Sildenafil 1, 10, 15, 20, 30 mg/kg dozlarında uygulandığında lokomotor aktivitede kontrol grubuna göre anlamlı bir değişiklik saptanmadı. Buna karşılık, 5 mg/kg sildenafil verilen grupta lokomotor aktivitenin kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığı saptandı (p<0.05) (Tablo). İmipramin (30 mg/kg) tek başına verildiğinde lokomotor aktive anlamlı olarak azalırken (p<0.05), sildenafil ile kombine edildiğinde imipramine göre anlamlı olarak arttığı saptandı (p<0.05). Sertralin (20 mg/kg) tek başına lokomotor aktivitede anlamlı değişiklik yapmazken, sildenafil ile kombine verildiğinde sildenafil 10 mg/kg'a göre lokomotor aktivitenin anlamlı olarak arttığı saptandı (p<0.05).



Şekil 1. Farklı dozlarda (1,5,10,15,20,30 mg/kg,ip) uygulanan sildenafilin (sil) zorunlu yüzdürme testinde immobilité süresi üzerine etkisi. Veriler ortalaması±standart hata olarak verildi (n=7).

*p<0.05 SF grubuna göre anlamlı.



Şekil 2. Sildenafil (10 mg/kg) imipramin (30 mg/kg) ve sertralin (20 mg/kg) ile birlikte verildiğinde zorunlu yüzdürme testinde immobilité süresi üzerine etkisi. Veriler ortalama±standart hata olarak verildi (n=7).

*p<0.05 SF grubuna göre,

p<0.05 sildenafil (10mg/kg) grubuna göre anlamlı

Tablo. Farklı Dozlarda (1,5,10,15,20,30 mg/kg, ip), İmipramin (30 mg/kg,ip) ve Sertralinin (20 mg/kg) ile Birlikte Verilmesinin Lokomotor Aktivite Üzerine Etkisi. Veriler Ortalama±standart Hata Olarak Verildi (n=7).

İlaç	Ortalama lokomotor aktivite
Serum fizyolojik (SF)	273.6 ± 21.6
Sildenafil 1 mg/kg	309.0 ± 31.0
Sildenafil 5 mg/kg	382.8 ± 34.1*
Sildenafil 10 mg/kg	328.7 ± 30.3
Sildenafil 15 mg/kg	345.3 ± 31.7
Sildenafil 20 mg/kg	310.0 ± 26.0
Sildenafil 30 mg/kg	279.1 ± 22.0
İmipramin 30 mg/kg	166.6 ± 8.1
Sertralin 20 mg/kg	244.5 ± 33.2
Sildenafil 10 mg/kg + İmipramin 30 mg/kg	257.8 ± 25.1
Sildenafil 10 mg/kg + Sertralin 20mg/kg	247.8 ± 33.4#

* p<0.05 SF grubuna göre,

p<0.05 sildenafil (10mg/kg) grubuna göre anlamlı

TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada bir depresyon modeli olan zorunlu yüzdürme testinde sildenafilin etkisi incelendi. Porsolt ve arkadaşları tarafından tarif edilen zorunlu yüzdürme testine göre, immobilité süresinin uzaması depresyon benzeri etki, immobilité süresinin azalması ise anti-

depresan benzeri etkinin göstergesi olarak değerlendirilmektedir^(14,15). Bu çalışmada da, referans bileşik olarak kullanılan trisiklik anti-depresan imipramin ve selektif serotonin geri alım inhibitörü sertralin, zorunlu yüzdürme testinde immobilité süresini antidepresan etkinlikle tutarlı olarak azalttı. Sildenafil 10 mg/kg verildiğinde lokomotor aktiviteyi etkilemeden immobilitéyi artırıcı, yani depresyon benzeri etki gösterdi. Bu etki, sertralin ve imipramin ile birlikte verildiğinde önlenildi.

Sildenafil, terapötik etkilerini periferde oluşturmakla birlikte, kan beyin bariyerini de geçebildiği bildirilmiştir⁽¹⁶⁻¹⁸⁾. Sildenafil, cGMP'yi yıkan PDE5 enzimini inhibe eder ve cGMP düzeyini artırır. cGMP agonistleri uygulanmasının, striatal serotoninin ekstrasellüler düzeyini azalttığı ve cGMP'nin antidepresan ilaçların etkilerinin oluşmasında önemli rolü olabileceği ileri sürülmektedir⁽¹⁹⁾. cGMP'nin oluşumu, NOS tarafından sentezlenen NO'nun guanilat siklazı uyarmasına bağlıdır. NOS, guanilat siklaz ve PDE5'in; hipokampus, serebral korteks ve bazal ganglionlarda yüksek aktivite gösterdikleri bildirilmiştir^(20,21). Bu bölgeler beyinde yoğun serotonerjik uzantılar alan bölgelerdir. Raphe nukleusundan kaynaklanan serotonerjik nöronlar ve uzantılarında da NOS ekspresyonu bildirilmiştir⁽²²⁾. Başka bir çalışmada da serotonin seviyesinde azalmanın NOS salıverilmesini artırdığı gösterilmiştir⁽²³⁾. Bu durum, NOS'un stimülasyonunun, seroto-

nerjik nöronlarda guanilat siklaz aktivasyonu ve cGMP artışına neden olabileceğini düşündürmektedir. cGMP artışının da PKG aracılığıyla serotonin taşıyıcılarının aktivitesini artırdığı bildirilmiştir⁽²⁴⁾. Sildenafil, cGMP seviyesini artırarak serotonin geri alımını artırabilmektedir⁽²⁵⁾. Böylece SSRI' lara zıt bir etki yaparak depresyon benzeri etki ortaya çıkarabilir.

Sildenafil muhtemel depresyon benzeri etkisinin başka bir sebebi de cGMP artışına bağlı olarak NOS aktivitesi üzerine negatif feedback etki ve buna bağlı olarak NO sentezinin azalması olabilir. NO'nun farklı beyin bölgelerinde serotonin seviyesini azalttığı bilinmektedir⁽²⁶⁾. Ratlarda posterior hipotalamusta yapılan bir çalışmada, NO'nun cGMP'ye bağlı bir yol üzerinden serotonin saliverilmesini düzenlediği, düşük NO seviyelerinin serotonin saliverilmesini artırdığı, buna karşılık yüksek NO seviyelerinin ise tam tersi etki yaptığı bildirilmiştir⁽²⁷⁾. NOS inhibisyonu ile serotonin saliverilmesinde artış olduğu, buna karşılık NO prekürsörü L-arjinin uygulaması ile hipokampal serotonin saliverilmesinde azalma olduğu gösterilmiştir⁽²⁸⁾. Birçok çalışmada NOS inhibitörlerinin hem antidepresan benzeri etki gösterdiği, hem de antidepresanların etkilerini artırdıkları tespit edilmiş⁽²⁹⁾, hipokampal NOS inhibisyonu antidepresan benzeri etki ortaya çıkartırken⁽³⁰⁾, serotonerjik antidepresanların lokal perfüzyonunun ise hipokampal NOS aktivitesini azalttığı saptanmıştır⁽³¹⁾. Sildenafil, NOS aktivitesine negatif feedback etki ile NO sentezini, dolayısı ile de serotonin saliverilmesini azaltarak depresyon benzeri etki gösterdiği düşünülebilir.

Çalışmada kullanılan ilaçlar depresyon oluşmasında önemli işlevi olduğu bilinen serotoninin geri alımını inhibe etmektedir. Sertralin seçici olarak serotonin geri alımını inhibe ederken, trisiklik antidepresanların prototipi olan imipramin, serotoninle birlikte diğer nöromedyatörlerin geri alımını da inhibe etmektedir. Bu çalışmada sildenafilin depresyon benzeri etkisi, hem sertralin hem de imipramin ile önlenmiştir. Bu bulgu, sertralin ve

imipraminin serotonin geri alımını inhibe ederek, sildenafilin sinaptik aralıkta serotonerjik aktiviteyi azaltarak oluşturduğu depresyonu önleyebileceğini düşündürmektedir. Bu çalışmada elde edilen bulgular, sildenafille bağlı serotonerjik aktivite azalmasının NO-cGMP yolağı üzerinden gerçekleşebileceğini, bu nedenle söz konusu yolağın depresyon oluşmasında önemli rolünün olabileceğini düşündürmektedir.

Geliş Tarihi : 18.05.2006

Yayına kabul tarihi : 11.05.2007

Yazışma adresi :

Dr. Elif AKSÖZ

Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Tıp Fakültesi

Farmakoloji Anabilim Dalı

55139 Kurupelit / SAMSUN

Tel. : 0362 312 19 19 / 3453

Faks : 0362 457 60 41

KAYNAKLAR

1. Manganiello V. Cyclic nucleotide phosphodiesterase 5 and sildenafil: promises realized. *Mol Pharmacol.* 2003; 63: 1209-1211.
2. Kukreja RC, Salloum F, Das A, et al. Pharmacological preconditioning with sildenafil: Basic mechanisms and clinical implications. *Vascul Pharmacol.* 2005; 42: 219-232.
3. Hotchkiss AK, Pyter LM, Gatién ML, et al. Aggressive behavior increases after termination of chronic sildenafil treatment in mice. *Physiol Behav.* 2005; 83: 683-688.
4. Canteros G, Rettori V, Genaro A, et al. Nitric oxide synthase content of hypothalamic explants: increase by norepinephrine and inactivated by NO and cGMP. *Proc Natl Acad Sci.* 1996; 93: 4246-4250.
5. Yanık M, Vural H, Tutkun H, ve ark. The role of the arginine-nitric oxide pathway in the pathogenesis of bipolar affective disorder. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 2004; 254: 43-47.
6. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 1991; 43: 109-142.
7. Yıldız F, Erden BF, Ulak G, ve ark. Antidepressant-like effect of 7-nitroindazole in the forced swimming test in rats. *Psychopharmacology.* 2000; 149: 41-44.
8. Eroğlu L, Çağlayan B. Anxiolytic and antidepressant

- properties of methylene blue in animal models. *Pharmacol Res.* 1997; 36: 381–385.
9. Heiberg IL, Wegener G, Rosenberg R. Reduction of cGMP and nitric oxide has antidepressant-like effects in the forced swimming test in rats. *Behav Brain Res.* 2002; 134: 479–484.
 10. Suzuki E, Yagi G, Nakaki T, et al. Elevated plasma nitrate levels in depressive states. *J Affect Disord.* 2001; 63: 221–224.
 11. Chrapko WE, Jurasz P, Radoski MW, et al. Decreased platelet nitric oxide synthase activity and plasma nitric oxide metabolites in major depressive disorder. *Biol Psychiatry.* 2004; 56: 129–134.
 12. Bernstein HG, Stanarius A, Baumann B, et al. Nitric oxide synthase-containing neurons in the human hypothalamus: reduced number of immunoreactive cells in the paraventricular nucleus of depressive patients and schizophrenics. *Neuroscience.* 1998; 83: 867–875.
 13. Karolewicz B, Szebeni K, Stockmeier CA, et al. Low nNOS protein in the locus coeruleus in major depression. *J Neurochem.* 2004; 91: 1057–1066.
 14. Porsolt RD, Le Pichon M., Jalfre M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature.* 1977; 266: 730–32.
 15. Bourin M, Mocaer E, Porsolt R. Antidepressant-like activity of S 20098 (agomelatine) in the forced swimming test in rodents: involvement of melatonin and serotonin receptors. *J Psychiatry Neurosci.* 2004; 29: 126–133.
 16. Schultheiss D, Muller SV, Nager W, et al. Central effects of sildenafil (Viagra) on auditory selective attention and verbal recognition memory in humans: a study with event-related brain potentials. *World J Urol.* 2001; 19: 46–50.
 17. Zhang R, Wang Y, Zhang L, et al. Sildenafil (Viagra) induces neurogenesis and promotes functional recovery after stroke in rats. *Stroke.* 2002; 33: 2675–2680.
 18. Rutten K, Vente JD, Sik A, et al. The selective PDE5 inhibitor, sildenafil, improves object memory in Swiss mice and increases cGMP levels in hippocampal slices. *Behav Brain Res.* 2005; 164: 11–16.
 19. Heiberg IL, Wegener G, Rosenberg R. Reduction of cGMP and nitric oxide has antidepressant-like effects in the forced swimming test in rats. *Behav Brain Res.* 2002; 134: 479–484.
 20. Garthwaite J, Boulton CL. Nitric oxide signaling in the central nervous system. *Annu Rev Physiol.* 1995; 57: 683–706.
 21. Molina JA, Jimenez-Jimenez FJ, Orti-Pareja M, et al. The role of nitric oxide in neurodegeneration. Potential for pharmacological intervention. *Drugs Aging.* 1998; 12: 251–259.
 22. Simpson KL, Waterhouse BD, Lin RC. Differential expression of nitric oxide in serotonergic projection neurons: neurochemical identification of dorsal raphe inputs to rodent trigeminal somatosensory targets. *J Comp Neurol.* 2003 ;466: 495–512.
 23. Ramos AJ, Tagliaferro P, Lopez-Costa JJ, et al. Neuronal and inducible nitric oxide synthase immunoreactivity following serotonin depletion. *Brain Res.* 2002; 958: 112–121.
 24. Prasad HC, Zhu CB, McCauley JL, et al. Human serotonin transporter variants display altered sensitivity to protein kinase G and p38 mitogen-activated protein kinase. *Proc Natl Acad Sci.* 2005; 102: 11545–11550.
 25. Zhu CB, Hewlett WA, Francis SH, et al. Stimulation of serotonin transport by the cyclic GMP phosphodiesterase-5 inhibitor sildenafil. *Eur J Pharmacol.* 2004; 504: 1–6.
 26. Kiss JP. Role of nitric oxide in the regulation of monoaminergic neurotransmission. *Brain Res Bull.* 2000; 52: 459–466.
 27. Kaehler ST, Singewald N, Sinner C, et al. Nitric oxide modulates the release of serotonin in the rat hypothalamus. *Brain Res.* 1999; 835: 346–349.
 28. Wegener G, Volke V, Rosenberg R. Endogenous nitric oxide decreases hippocampal levels of serotonin and dopamine in vivo. *Br J Pharmacol.* 2000; 130: 575–580.
 29. Harkin A, Connor TJ, Burns MP, et al. Nitric oxide synthase inhibitors augment the effects of serotonin re-uptake inhibitors in the forced swimming test. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2004; 14: 274–281.
 30. Joca SR, Guimaraes FS. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase in the rat hippocampus induces antidepressant-like effects. *Psychopharmacology.* 2006; 185: 298–305.
 31. Wegener G, Volke V, Harvey BH, et al. Local, but not systemic, administration of serotonergic antidepressants decreases hippocampal nitric oxide synthase activity. *Brain Res.* 2003; 959: 128–134.