

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção



Dissertação de mestrado

Investigação dos mecanismos envolvidos no efeito tipo-ansiolítico do 7-cloro-4-(fenilselanil) quinolina em camundongos

Jaini Janke Paltian

Pelotas, 2020

Jaini Janke Paltian

Investigação dos mecanismos envolvidos no efeito tipo-ansiolítico do 7-cloro-4-(fenilselanil) quinolina em camundongos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Bioprospecção.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ethel Antunes Wilhelm

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Cristiane Luchese

Pelotas, 2020

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

P183i Paltian, Jaini Janke

Investigação dos mecanismos envolvidos no efeito tipo-ansiolítico do 7-cloro-4-(fenilselelanil) quinolina em camundongos / Jaini Janke Paltian ; Ethel Antunes Wilhelm, orientadora ; Cristiane Luchese, coorientadora. — Pelotas, 2020.

103 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, 2020.

1. Ansiedade - Agentes terapêuticos. 2. Corticosterona. 3. GABA. 4. Serotonina. 5. Selênio. I. Wilhelm, Ethel Antunes, orient. II. Luchese, Cristiane, coorient. III. Título.

CDD : 574.192

Investigação dos mecanismos envolvidos no efeito tipo-ansiolítico do 7-cloro-4-(fenilselanil) quinolina em camundongos

Dissertação aprovada, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Bioprospecção, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 06 de março de 2020.

Banca examinadora:



Prof^a. Dr^a. Ethel Antunes Wilhelm (Orientadora)

Doutora em Ciências Biológicas (Bioquímica Toxicológica) pela Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, Brasil.



Prof. Dr. César Augusto Brüning

Doutor em Ciências Biológicas (Bioquímica Toxicológica) pela Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, Brasil.



Dr. Marcel Henrique Marcondes Sari

Doutor em Ciências Biológicas (Bioquímica Toxicológica) pela Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, Brasil.

Com imenso carinho dedico essa dissertação
à minha família e ao meu amor e
parceiro de todos os momentos Djulio

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus por me amparar, iluminar e conceder sabedoria para sempre seguir em frente com meus objetivos, mesmo nos momentos mais difíceis não me permitiu desistir mostrando que sou mais forte do que pensava.

Aos meus pais, Walter e Nara, e ao meu irmão Kauã, por todo apoio e incentivo em todos os aspectos da minha vida e principalmente pela paciência e compreensão nos momentos em que estive ausente. Agradeço imensamente por tudo que fazem por mim, pois sei que muitas vezes vocês deixaram de sonhar os seus sonhos para sonharem os meus. Não sei expressar o tamanho da importância de vocês na minha vida, sem o amor de vocês nada seria possível!

Ao meu amor, Djulio, por todo o companheirismo, paciência e compreensão no decorrer dessa caminhada, isso com certeza fez toda a diferença para que essa etapa fosse concluída com maior tranquilidade. Agradeço pelo teu amor e por sempre deixar meus dias mais alegres, tua companhia ao meu lado é essencial e me traz imensa tranquilidade. Por isso agradeço por sempre estar caminhando ao meu lado em busca dos nossos sonhos.

Às minhas orientadoras, Ethel e Cristiane, por todos os ensinamentos, auxílios e incentivos prestados para que eu pudesse concluir essa etapa. Agradeço pela disposição, compreensão, orientação e acima de tudo pela confiança depositada em mim. Vocês foram muito importantes na minha trajetória até aqui!

Aos meus colegas do LaFarBio, que de forma direta ou indireta contribuíram para a concretização deste trabalho. Especialmente a Caren, a Ane, a Angélica, a Mikaela, a Renata, a Karline e Guilherme por todos os momentos vividos dentro e fora do laboratório, vocês se tornaram mais que colegas se tornaram "*friends*". Agradeço por todos os momentos de reflexão, aprendizado, auxílio, descontração e acima de tudo por toda força e incentivo.

À Universidade Federal de Pelotas, ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, aos órgãos de fomento FAPERGS, CNPQ, e CAPES e ao Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas pelas oportunidades e auxílios apresentados no decorrer deste trabalho.

Enfim a todos que de uma forma ou de outra tornaram possível a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

*“ Se um dia tiver que escolher entre o mundo e o amor lembre-se:
se escolher o mundo ficará sem o amor, mas se escolher
o amor com ele você conquistará o mundo. ”*

(Albert Einstein)

RESUMO

PALTIAN, Jaini Janke. **Investigação dos mecanismos envolvidos no efeito tipo-ansiolítico do 7-cloro-4-(fenilselanil) quinolina em camundongos.** 2020. 103f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Bioprospecção) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2020.

A ansiedade é a doença psiquiátrica mais diagnosticada e tratada no mundo. Diante dessa situação, pesquisas para elucidar os mecanismos envolvidos na ansiedade e na busca de novos agentes terapêuticos têm despertado o interesse dos pesquisadores. Recentemente, demonstramos a promissora ação ansiolítica da 7-cloro-4- (fenilselanil) quinolina (4-PSQ) em camundongos. Por esse motivo, o primeiro objetivo deste estudo foi expandir nossas descobertas anteriores, investigando a contribuição dos sistemas serotoninérgico e GABAérgico na ação ansiolítica deste composto em camundongos machos adultos da raça *Swiss*. Inicialmente foi avaliado o envolvimento do sistema serotoninérgico, dessa forma os camundongos receberam o pré-tratamento com pindolol (1 mg/kg intraperitoneal (i.p.) um antagonista não seletivo do receptor 5-HT_{1A/1B}) ou WAY100635 (0,7 mg/kg, i.p., um antagonista seletivo do receptor 5-HT_{1A}) ou cetanserina (0,3 mg/kg, i.p., um antagonista não seletivo do receptor 5-HT_{2A/2C}), e após 15 min receberam o tratamento com o 4-PSQ (50 mg/kg, por via oral (v.o.)). O pré-tratamento com os antagonistas bloqueou o efeito ansiolítico causado pelo 4-PSQ no teste do labirinto em cruz elevado (LCE). A contribuição do sistema GABAérgico foi investigada nos animais através do pré-tratamento com o pentilenotetrazol (35 mg/kg, i.p., um antagonista do receptor GABA_A) (PTZ). Vinte quatro horas após a administração do PTZ, os animais receberam o tratamento com o 4-PSQ (50 mg/kg, v.o.). A administração do composto reduziu a ansiedade induzida pelo PTZ no teste do LCE. Posteriormente, esse grupo de animais foi submetido à eutanásia e o sangue foi coletado para determinar os níveis de corticosterona e o córtex cerebral e hipocampo foram removidos para determinar os níveis de expressão de RNAm da proteína de ligação responsiva ao AMPc (CREB), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e fator nuclear kappa B (NF-κB), bem como a atividade da enzima Na⁺, K⁺ ATPase e os níveis de espécies reativas (ERs). Uma dose única do 4-PSQ foi capaz de reverter significativamente o aumento dos níveis de ERs e corticosterona, bem como a diminuição da expressão de CREB e BDNF nas estruturas cerebrais e o aumento da expressão de NF-κB no hipocampo. Adicionalmente, o 4-PSQ também foi capaz de restaurar a atividade da Na⁺, K⁺ ATPase nas estruturas cerebrais avaliadas. Aqui, demonstramos que a modulação dos sistemas serotoninérgico e GABAérgico e fatores relacionados à neurogênese, status oxidativo e atividade da Na⁺, K⁺ ATPase, contribuem para o efeito ansiolítico do 4-PSQ, reforçando o potencial terapêutico desse composto no tratamento da ansiedade.

Palavras-chave: ansiedade, corticosterona, neurotrofina, GABA, serotonina, selênio.

ABSTRACT

PALTIAN, Jaini Janke. **Investigation of the mechanisms involved in the anxiolytic-like effect of 7-chloro-4- (phenylselanyl) quinoline in mice.** 2020. 103f. Dissertation (Master in Biochemistry and Bioprospecting) – Biochemistry and Bioprospecting Postgraduate Program. Federal University of Pelotas, Pelotas, 2020.

Anxiety is the most commonly diagnosed and treated psychiatric disease in the world. Faced with this situation, research to elucidate the mechanisms involved in anxiety and the search for new therapeutic agents has attracted the interest of researchers. Recently, we demonstrated the promising anxiolytic action of 7-chloro-4-(phenylselanyl) quinolone (4-PSQ) in mice. For this reason, the first objective of this study was to expand our previous findings by investigating the contribution of serotonergic and GABAergic systems in the anxiolytic action of this compound in male adult Swiss mice. Initially, the involvement of the serotonergic system was evaluated, so the mice received pretreatment with pindolol (1 mg/kg, intraperitoneal (i.p.), a non-selective 5-HT_{1A/1B} receptor antagonist) or WAY100635 (0.7 mg/kg, i.p., a non-selective 5-HT_{1A} receptor antagonist) or ketanserin (0.3 mg/kg, i.p., a selective 5-HT_{2A/2C} receptor antagonist), and after 15 min received treatment with 4-PSQ (50 mg/kg, per oral (p.o.)). Pretreatment with the antagonists blocked the anxiolytic effect caused by 4-PSQ in the elevated plus-maze (EPM) test. The contribution of the GABAergic system in animals was investigated by pretreatment with pentylenetetrazole (35 mg/kg, i.p., a GABA_A receptor antagonist) (PTZ). Twenty four hours after the animals received the treatment with 4-PSQ (50 mg/kg, p.o.). The administration of the compound reduced PTZ-induced anxiety in the EPM test. Later, this group of animals was euthanized and blood was collected to determine the levels of corticosterone and the cerebral cortex and hippocampus were removed to determine the mRNA expression levels of cAMP response element-binding protein (CREB), brain derived neurotrophic factor (BDNF) and nuclear factor kappa B (NF- κ B), as well as the Na⁺, K⁺ ATPase activity and reactive species levels (RS). A single dose of 4-PSQ was able to significantly reverse the increase in RS and corticosterone levels, as well as the decrease of CREB and BDNF expression in the cerebral structures and increase of NF- κ B expression in the hippocampus. Additionally, 4-PSQ was also able to restore Na⁺, K⁺ ATPase activity in the evaluated brain structures. Here, we showed that the modulation of serotonergic and GABAergic systems and factors related to neurogenesis, oxidative status, and Na⁺, K⁺ ATPase activity contributes to the anxiolytic effect of 4-PSQ and reinforces the therapeutical potential of this compound for the treatment of anxiety.

Keywords: anxiety, corticosterone, neurotrophin, serotonin, GABA, selenium.

LISTA DE FIGURAS

Revisão Bibliográfica

Figura 1	Representação esquemática da resposta do organismo frente ao estresse.....	26
Figura 2	Representação esquemática da neurotransmissão GABAérgica.....	28
Figura 3	Representação esquemática das vias de sinalização mediadas pelo BDNF.....	34
Figura 4	Representação esquemática da ativação do NF- κ B e subsequente translocação para o núcleo.....	36
Figura 5	Representação esquemática do mecanismo de troca iônica da Na^+ , K^+ ATPase.....	39

Figura 1	Chemical structure of 7-chloro-4-(phenylselanyl) quinoline (4-PSQ).....	83
Figura 2	Effect of serotonergic antagonists (A) pindolol, (B) WAY100635 and (C) ketanserin on the anxiolytic action of 7-chloro-4-(phenylselanyl) quinoline (4-PSQ) on the percentage of time spend in the open arms in the elevated plus maze test.....	83
Figura 3	Effect of serotonergic antagonists (A) pindolol, (B) WAY100635 and (C) ketanserin on the anxiolytic action of 7-chloro-4-(phenylselanyl) quinoline (4-PSQ) on the percentage of entry into the open arms in the elevated plus maze test.....	83
Figura 4	Effects of pentylenetetrazole (PTZ) and/or 7-chloro-4-(phenylselanyl) quinoline (4-PSQ) on behavioral parameters in the elevated plus maze test in mice. Data are represented as (A) percentage of time spend in the open arms and (B) percentage of entries in the open arms.....	83
Figura 5	Effects of 7-chloro-4-(phenylselanyl) quinoline (4-PSQ) administration on Na ⁺ , K ⁺ ATPase activity in (A) cerebral cortex and (B) hippocampus of mice after pentylenetetrazole (PTZ) treatment.....	84
Figura 6	Effects of 7-chloro-4-(phenylselanyl) quinoline (4-PSQ) on RS levels in (A) cerebral cortex and (B) hippocampus of mice after pentylenetetrazole (PTZ) treatment.....	84
Figura 7	Effects of 7-chloro-4-(phenylselanyl) quinoline (4-PSQ) on plasma corticosterone levels of mice after pentylenetetrazole (PTZ) treatment.....	84
Figura 8	Effects of pentylenetetrazole (PTZ) and 7-chloro-4-(phenylselanyl) quinoline (4-PSQ) on the mRNA expression levels of the (A) Camp response element binding (CREB), (B) brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and (C) nuclear factor kappa B (NF-κB) in the cerebral cortex of mice.....	85

	Effects of pentylenetetrazole (PTZ) and 7-chloro-4-(phenylselanyl) quinoline (4-PSQ) on the mRNA expression levels of the (A) Camp response element binding (CREB), (B) brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and (C) nuclear factor kappa B (NF- κ B) in the hippocampus of mice.....	85
--	--	----

LISTA DE TABELAS

Revisão Bibliográfica

	Compostos orgânicos de selênio como alternativa	
Tabela 1	terapêutica para o tratamento da	
	ansiedade.....	43

Manuscrito

Tabela 1	Primers used for quantitative real-time polymerase chain reaction.....	76
Tabela 2	Effect of 4-PSQ and/or antagonist treatments on behavioral parameters in the open field test in mice.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4-PSQ	7-cloro-4-(fenilselanil) quinolina
5-HT	Serotonina
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
ATP	Adenosina trifosfato
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
BDZs	Benzodiazepínicos
CaMKIV	Proteína quinase tipo IV dependente de cálcio/calmodulina
CREB	Proteína de ligação responsiva ao AMPc
CRH	Hormônio liberador de corticotrofina
DSM	Manual Diagnóstico de Transtornos Mentais
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
ERNs	Espécie reativa de nitrogênio
EROs	Espécie reativa de oxigênio
ERs	Espécies reativas
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GC	Glicocorticoide
HHA	Eixo hipotálamo hipófise-adrenal
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
ISRSs	Inibidores seletivos da receptação de serotonina
IkB	Proteína inibidora kappa B
IkK	Proteína Ikappa quinase
LCE	Labirinto em cruz elevado
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NGF	Fator de crescimento neural
NMDA	N-metil D-aspartato
OMS	Organização mundial da saúde
PI3k	Fosfatilinositol 3-quinase
PKA	Proteína quinase A
PLCy	Fosfolipase Cy
PTZ	Pentilenotetrazol
RG	Receptor glicocorticoide
RLs	Radicais livres

RM	Receptor mineralocorticoide
SH	Tiol
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
TrkB	Tropomiosina quinase B
(PhSe)₂	Disseleneto de difenila

SUMÁRIO

1. Introdução	18
2. Objetivos	20
2.1. Objetivo geral	20
2.2. Objetivos específicos	20
3. Revisão bibliográfica	21
3.1. Ansiedade	21
3.2. Fisiopatologia da ansiedade	23
3.2.1. O eixo HHA	25
3.2.2. Sistema GABAérgico	27
3.3. Alterações neuroquímicas envolvidas na ansiedade	32
3.3.1. CREB e BDNF	32
3.3.2. Fator de transcrição NF-κB	35
3.3.3. Espécies reativas	37
3.3.4. A enzima Na ⁺ , K ⁺ ATPase	38
3.4. Fármacos empregados no tratamento da ansiedade	39
3.4.1. Efeito farmacológico dos compostos orgânicos de selênio	42
4. Manuscrito	46
5. Conclusões	86
Perspectivas	87
Referências	88
Anexos	102

1. Introdução

A ansiedade é considerada uma reação normal do organismo atuando como um mecanismo de defesa, aumentando a conscientização e a capacidade de resposta para lidar com situações adversas e desconhecidas. Por outro lado, quando a ansiedade é persistente, frequente ou aparece em contextos inapropriados, a qualidade de vida é reduzida severamente e, portanto, pode ser considerada patológica (BELZUNG; GRIEBEL, 2001). Atualmente, essa doença psiquiátrica tem sido a mais diagnosticada e tratada em todo o mundo. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), essa patologia afeta aproximadamente 3,6% da população mundial, sendo o Brasil (9,3%) o país com maior incidência desse distúrbio (OMS, 2017). Diante dessa situação, estudos para elucidar os mecanismos envolvidos na ansiedade e que busquem novos agentes terapêuticos têm despertado o interesse dos pesquisadores.

O estresse tem sido o principal fator associado ao desenvolvimento dos transtornos de ansiedade, uma vez que sua persistência promove um desequilíbrio na homeostase corporal, resultando em alterações fisiológicas prejudiciais à saúde (MARIOTI, 2015). Desregulações na neurotransmissão GABAérgica e serotoninérgica têm demonstrado envolvimento significativo nos transtornos do humor e dos estados de ansiedade (NUSS, 2015; GARCIA-GARCIA et al., 2014). Dessa forma, os neurotransmissores ácido gama-aminobutírico (GABA) e serotonina (5-HT) são os principais alvos dentro da pesquisa por fármacos ansiolíticos, uma vez que a modulação destes demonstram eficácia no tratamento dos transtornos de ansiedade principalmente através da classe dos benzodiazepínicos (BDZs) e inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRSs), respectivamente (MÖHLER et al., 2005; LANZENBERGER et al., 2007). Com base nisso, é possível sugerir que moléculas que modulam esses sistemas podem ser importantes alternativas farmacológicas para tratar distúrbios psiquiátricos, como a ansiedade.

Dessa maneira, substâncias capazes de modular diferentes sistemas e vias de sinalização têm potencial significativo no tratamento dos transtornos de ansiedade. Nosso grupo de pesquisa dedicou atenção à pesquisa e elucidação das propriedades farmacológicas de um novo composto multi-alvo, 7-cloro-4-

(fenilselanil) quinolina (4-PSQ) (PINZ et al., 2016; SILVA et al., 2017; REIS et al., 2017; VOGT et al., 2018; PINZ et al., 2018; VOSS et al., 2018; BARTH et al., 2019). Entre os achados importantes, Reis e colaboradores (2017) demonstraram que o 4-PSQ provocou comportamento tipo ansiolítico em camundongos. O 4-PSQ reduziu a captação de glutamato nos córtices cerebrais e protegeu contra o comportamento relacionado à ansiedade induzida pelo cainato. Os resultados sugerem que a via glutamatérgica está implicada no efeito ansiolítico do 4-PSQ, propondo que esse derivado da quinolina possa modular direta ou indiretamente a ligação do glutamato ao seu receptor. Além disso, nosso trabalho recente contribuiu para esses esforços, revelando o efeito protetor do 4-PSQ na ação ansiogênica e no comprometimento da aprendizagem e da memória em um modelo da doença de Alzheimer em camundongos, por ações anticolinesterásicas e antioxidantes (PINZ et al., 2018).

Com base nas considerações acima e aliado ao fato do 4-PSQ apresentar propriedades farmacológicas promissoras, mais estudos devem ser realizados, a fim de compreender e reafirmar a ação desse composto como alternativa terapêutica no tratamento dos transtornos de ansiedade. Dessa forma, é de extrema relevância o estudo de outras vias e moléculas envolvidas na ação ansiolítica do 4-PSQ, principalmente aquelas relacionadas à desorden de ansiedade.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Diante da potencial utilidade do 4-PSQ como farmacoterapia para a ansiedade, além do interesse contínuo na farmacologia deste composto, o objetivo deste estudo é explorar os possíveis mecanismos subjacentes à ação ansiolítica do 4-PSQ.

2.2. Objetivos específicos

- Investigar o envolvimento do sistema serotoninérgico no mecanismo de ação ansiolítica causada pelo 4-PSQ via receptores 5-HT_{1A/1B} e 5-HT_{2A/2C}.
- Avaliar o envolvimento do sistema GABAérgico na ação ansiolítica do 4-PSQ.
- Verificar se a modulação da atividade da enzima Na⁺, K⁺ ATPase contribui para o efeito ansiolítico do 4-PSQ em camundongos expostos ao pentilenotetrazol (PTZ).
- Avaliar se modulação dos níveis de espécies reativas (ERs) contribuem para o efeito ansiolítico do 4-PSQ em camundongos expostos ao PTZ.
- Analisar se o efeito ansiogênico do PTZ envolve a hiperativação do eixo hipotalâmico da hipófise adrenal e identificar a possível modulação desse eixo pelo 4-PSQ.
- Investigar se a modulação dos níveis de moléculas envolvidas na neurogênese, como a proteína de ligação responsiva ao AMPc (CREB), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e o fator nuclear kappa B (NF-κB), contribuem para o efeito ansiolítico do 4-PSQ em camundongos expostos ao PTZ.

3. Revisão bibliográfica

3.1. Ansiedade

A ansiedade é uma emoção básica que resulta como uma resposta adaptativa a situações de estresse, facilitando a sobrevivência a riscos potenciais (LANG et al., 1998). No entanto, quando essa resposta torna-se excessivamente frequente ou aparece em contextos inapropriados pode alcançar grau patológico, constituindo-se, dessa forma, como um distúrbio psiquiátrico o qual pode gerar alterações em diferentes aspectos da vida (FUCHS et al., 2006). Os sintomas decorrentes dos transtornos de ansiedade são caracterizados por um desequilíbrio de humor e emoções, bem como por anomalias de estruturas cerebrais, além de ansiedade excessiva na ausência de perigo, irritabilidade e depressão decorrentes da incapacidade de lidar com alterações fisiológicas que ocorrem com o organismo em tais situações (GAZZANIGA; HEATHENTON, 2005).

Atualmente grande parte da população mundial sofre com algum distúrbio psiquiátrico, sendo que as desordens de ansiedade estão entre os transtornos psiquiátricos mais prevalentes no mundo. Estima-se que cerca de 264 milhões (3,6%) de pessoas no mundo experimentaram ao menos um episódio de ansiedade patológica (OMS, 2017). Além disso, a OMS destaca que o número de indivíduos com ansiedade cresceu cerca de 14,9% em 2015 em relação ao ano de 2005. Nesse sentido, o crescimento dessa patologia pode ser atribuído a diversas situações estressantes presenciadas no dia a dia. Sendo assim, fatores socioeconômicos, ambientais e eventos traumáticos são algumas das situações de estresse que contribuem para o surgimento das desordens de ansiedade.

As desordens de ansiedade podem ser classificadas de acordo com seu tipo de manifestação, tais como episódica ou persistente, sendo que na primeira o indivíduo experimenta algum evento traumático e vivencia o episódio com medo intenso, enquanto na ansiedade persistente os sintomas ansiosos são vivenciados diariamente. Com base nisso, os sintomas de ansiedade podem se manifestar através de fatores específicos, como nas fobias, ou serem inespecíficos detendo-se aos aspectos negativos e ameaçadores do cotidiano (ANDRADE; GORENSTEIN, 2000). Dessa forma, a quinta edição do Manual Diagnóstico de Transtornos Mentais (DSM-5) classifica os transtornos de

ansiedade em três categorias como, transtornos de ansiedade, transtornos obsessivos compulsivos e transtornos relacionados a traumas e estressores. Dentro da categoria dos transtornos de ansiedade estão inclusos os transtornos de ansiedade generalizada, transtornos de ansiedade social, transtorno do pânico e agorafobia. Por outro lado, a categoria de transtornos relacionados a traumas e estressores compreendem os distúrbios de ajuste, transtornos de estresse pós-traumático e transtornos de estresse agudo (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013).

Como a ansiedade faz parte do repertório comportamental normal, distinguir o momento em que a ansiedade passa de benéfica para prejudicial pode ser difícil em função da variabilidade dos traços de personalidade entre os indivíduos. Baseado nisso, o DSM-5 descreve que quando “a ansiedade, a preocupação ou sintomas físicos causam sofrimento ou prejuízo clinicamente significativo nas áreas sociais, ocupacionais ou outras áreas importantes do funcionamento” deve ser diagnosticada a ansiedade patológica (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013). Além disso, para o paciente receber o diagnóstico de ansiedade, o DSM-5 estabelece critérios para o diagnóstico de cada um dos transtornos de ansiedade, e se estes critérios estiverem presentes na rotina do paciente na maioria dos dias, durante os últimos 6 meses, o diagnóstico pode ser confirmado (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013).

Sabe-se que a exposição a estímulos estressores contribui para o aparecimento dos distúrbios de ansiedade, de modo que quando percebida pelo organismo ameaça a homeostase e provoca uma série de sintomas que envolvem aspectos bioquímicos, neurológicos e comportamentais (SHELTON, 2004). Nesse sentido, os episódios de estresse podem causar alterações neurofisiológicas como a diminuição da neurogênese, fazendo com que ocorra um prejuízo no desenvolvimento e formação de células neuronais (JOCA, 2003). O eixo hipotálamo hipófise adrenal (HHA) é ativado como resposta normal e fisiológica ao estresse, para manter a homeostase do organismo diante de estímulos estressores, entretanto, a hiperativativação deste eixo em situações de estresse crônico está relacionada a fisiopatologia da ansiedade (CHECKLEY, 1996). Dessa forma, Hammen (2005) relata que a resposta ao estresse é essencial para a adaptação do equilíbrio homeostático. No entanto, o estresse

crônico além de causar degeneração neuronal, pode levar a estados patológicos, que podem resultar no aparecimento de transtornos emocionais, tais como, os transtornos de ansiedade (HEIM; NEMEROFF, 2001; CHARNEY; MANJI, 2004; DE KLOET et al., 2005).

Os processos envolvidos no desenvolvimento da ansiedade e dos distúrbios relacionados ainda não são totalmente compreendidos, entretanto, para a maioria dos distúrbios foram identificadas alterações no sistema límbico, disfunção do eixo HHA e fatores genéticos. Adicionalmente, condições externas como traumas, fobias, fatores socioeconômicos e ambientais também podem predispor um indivíduo ao desenvolvimento da ansiedade patológica. Diante disso, a ansiedade não deve ser considerada uma doença única, com apenas uma causa, e sim como uma síndrome heterogênea composta de inúmeros fatores causadores (MARTIN et al., 2009).

3.2. Fisiopatologia da ansiedade

Embora diferentes estudos tenham sido realizados com a finalidade de elucidar os mecanismos fisiopatológicos e comportamentais na gênese da ansiedade, ainda não há uma hipótese totalmente consolidada, por se tratar de uma etiologia multifatorial envolvendo fatores genéticos, neurobiológicos e ambientais (MARTIN et al., 2009). As evidências sobre um gene específico associado à ansiedade ainda não foram elucidadas, porém indícios apontam que diferentes genes contribuem para a vulnerabilidade biológica do indivíduo deixando-o mais propenso a desenvolver desordens de ansiedade (HALLETT et al., 2009). De fato, fatores genéticos predispõem um indivíduo à ansiedade, no entanto, também deve-se lembrar que influências ambientais presenciadas ao longo da vida contribuem para o desenvolvimento desse transtorno.

Estudos experimentais sugerem que reações análogas ao medo são mediadas e integradas por substratos neuroanatômicos localizados no sistema límbico, como amígdala, septo e hipocampo (SANDFORD et al., 2000). O envolvimento do sistema endócrino tem recebido destaque na descrição da etiologia da ansiedade (CASTRÉN et al., 2007). Neste contexto, o envolvimento do eixo neuroendócrino HHA, está sendo melhor estudado nos transtornos psiquiátricos, assim como, suas conexões com estruturas do sistema límbico, como o hipocampo e a amígdala. Visto que o eixo HHA desempenha funções

relevantes no desenvolvimento e na expressão de numerosos comportamentos, suas disfunções podem estar relacionadas a fisiopatologia da ansiedade (CHECKLEY, 1996).

No aspecto neuroquímico, os neurotransmissores GABA e 5-HT tem demonstrado envolvimento na regulação da ansiedade (MÖHLER et al., 2005; LANZENBERGER et al., 2007). Assim, o GABA um importante neurotransmissor inibitório do SNC tem sido amplamente associado com os distúrbios de ansiedade, devido a eficácia demonstrada pelos BDZ que ao se ligarem ao receptor GABA_A potencializam a afinidade do GABA pelo seu receptor e, por consequência causam efeitos ansiolíticos (NUSS, 2015). A partir disso, o sistema GABAérgico começou a ser investigado e sua desregulação tem demonstrado relação com as desordens de ansiedade. Em paralelo, a 5-HT desempenha importante papel na regulação do humor, sono, apetite, libido, e funções cognitivas (AKIMOVA et al., 2009). Desse modo, anormalidades na liberação ou receptação da 5-HT têm sido atribuídas à ansiedade. Estudos demonstram que esse neurotransmissor pode exercer ação ansiogênica ou ansiolítica em animais (LI et al., 2012). Sendo assim, o papel da 5-HT na ansiedade ainda não está totalmente esclarecido, tendo em vista que seu efeito na ansiedade parece depender de vários fatores, incluindo a natureza do estímulo ameaçador, as estratégias defensivas disponíveis e as estruturas cerebrais envolvidas.

A neurogênese também tem demonstrado desempenhar um importante papel nos transtornos de humor e ansiedade, de forma que a supressão ou diminuição desse processo tem demonstrado produzir quadros de ansiedade. Baseado nisso, Revest e colaboradores (2009) demonstraram que os camundongos transgênicos que tiveram prejuízo na neurogênese hipocampal exibiram um aumento nos comportamentos semelhantes à ansiedade. Nesse sentido, cabe destacar que o prejuízo na formação de novos neurônios resulta em uma redução no tamanho de estruturas cerebrais, uma característica observada nos transtornos psiquiátricos (SHELIN et al., 2003).

Adicionalmente, devido a elevada vulnerabilidade do cérebro a processos oxidativos, tem sido estabelecida uma relação entre os transtornos de ansiedade com os danos oxidativos causadas pelas ERs. Essa hipótese tem sido realizada uma vez que o dano oxidativo causado aos lipídeos e proteínas de membrana

podem resultar em uma alteração na neurotransmissão e função neuronal (BOUAYED et al., 2009). Dessa forma, estudos tem demonstrado que pacientes com transtornos de ansiedade possuem níveis elevados de peroxidação lipídica na corrente sanguínea em comparação a pacientes saudáveis (KULOGLU et al., 2002; HOVATA et al., 2010). Sendo assim, o dano oxidativo também pode ser considerado um fator importante envolvido na regulação da ansiedade.

Apesar de sua alta prevalência e do impacto negativo causado na vida do paciente ansioso, as causas dos transtornos de ansiedade não são totalmente compreendidas, dessa forma, a elucidação dos mecanismos envolvidos na ansiedade é de grande relevância principalmente para o desenvolvimento de fármacos ansiolíticos cada vez mais eficazes e com menores efeito adversos.

3.2.1. O eixo HHA

O eixo HHA compreende um dos principais sistemas endócrinos que regulam a homeostase no organismo em situações de desafio ou estímulo ao estresse (CHECKLEY, 1996). Dessa forma, o eixo HHA pode ser ativado por diversos eventos de estresse, sejam eles físicos ou psicológicos, e por consequência ocorrerá um aumento da concentração sanguínea de glicocorticoides (GCs). Esses estímulos serão percebidos pelos neurônios do núcleo paraventricular do hipotálamo fazendo com que ocorra a secreção do hormônio liberador de corticotrofina (CRH). Esse hormônio estimulará a síntese do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) na hipófise anterior que, por sua vez, sinalizará ao córtex da glândula adrenal para que ocorra a síntese e liberação de GCs como o cortisol e corticosterona em humanos e roedores, respectivamente (JOHNSON et al., 1992; ULRICH-LAI; HERMAN, 2009) (Figura 1). Os GCs liberados na corrente sanguínea possuem a função de regular diferentes respostas fisiológicas principalmente as funções relacionadas ao metabolismo energético (GONZÁLEZ; ESCOBAR, 2002).

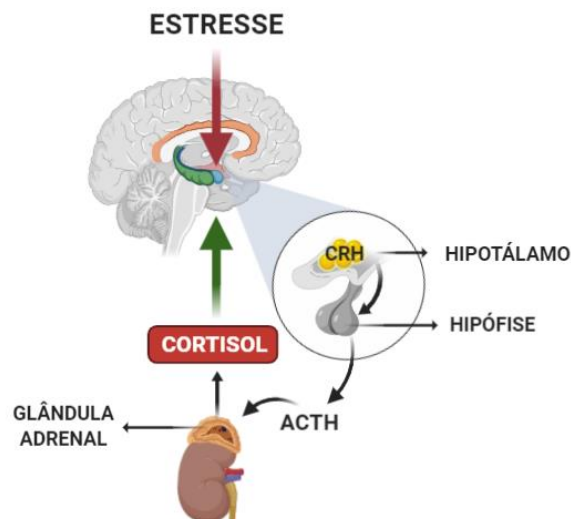


Figura 1. Representação esquemática da resposta do organismo frente ao estresse. CRH: hormônio liberador de corticotrofina, ACTH: hormônio adrenocorticotrófico. (Adaptado de Juruena e colaboradores, 2004).

Os níveis plasmáticos de GCs são regulados pelo mecanismo de *feedback* negativo exercido pelo próprio hormônio GC agindo nos receptores de glicocorticoides presentes no hipotálamo e hipófise. Esse controle ocorre com intuito de manter os níveis basais dos hormônios inibindo a liberação exacerbada destes durante a ativação do HHA. Nesse sentido, os receptores envolvidos no controle do eixo HHA incluem o receptor mineralocorticoide (RM) que responde a níveis basais de GCs, e o receptor glicocorticoide (RG) que responde a níveis mais altos desses hormônios (CHARMANDARI et al., 2005).

Entretanto, em situações de estresse crônico a constante ativação desse eixo tem sido relacionada com o desenvolvimento de transtornos psiquiátricos (JACOBSON, 2014; DU; PANG, 2015). Essa associação tem sido feita, uma vez que a produção em excesso de GCs, como o cortisol, podem resultar em danos a estruturas cerebrais essenciais para o controle do eixo HHA, além de danificar neurônios ocasionando um aumento na entrada de cálcio na célula, tornando-os mais suscetíveis a excitotoxicidade glutamatérgica e vulneráveis à ação de ERs (SAPOLSKY, 1986). Ademais, os elevados níveis de glicocorticoides na corrente sanguínea são capazes de prejudicar a neurogênese, acarretando uma menor produção celular e por consequência uma redução no tamanho de estruturas cerebrais como por exemplo, o hipocampo (KANDEL et al., 2014).

A secreção de CRH pelo hipotálamo é controlada por uma via excitatória encontrada na amígdala e uma via inibitória no hipocampo (KANDEL et al.,

2014). Baseado nisso, danos a estrutura do hipocampo parecem prejudicar o controle inibitório da secreção de CRH, e assim a secreção de cortisol continuará ocorrendo, conduzindo a um ciclo vicioso (KANDEL et al., 2014). Desse modo, a hiperatividade do eixo HHA contribui para o desenvolvimento de transtornos de ansiedade, uma vez que é demonstrado que em casos de ansiedade ocorre uma hiperexcitabilidade da amígdala, e esse processo pode acarretar na desregulação do eixo HHA diante da superprodução de GCs.

Além disso, as disfunções do eixo também podem estar relacionadas à redução da capacidade dos GCs exercerem seu *feedback* negativo. O comprometimento desse processo parece estar relacionado com a função prejudicada do RG, visto que desenvolverão resistência a esses hormônios fazendo com que o efeito inibitório à liberação hormonal não ocorra (LOWY et al., 1984). A ativação do eixo HHA é muito importante, no entanto é de extrema importância que sua desativação ocorra assim que a situação esteja controlada, tendo em vista que a ansiedade patológica ocorre quando esse sistema fica sobrecarregado, ou seja, embora não exista nada para o corpo lutar ou fugir, ele responde como se houvesse uma ameaça presente.

3.2.2. Sistema GABAérgico

O GABA é um importante neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central (SNC) sendo conhecido por modular o comportamento relacionado à ansiedade (NEMEROFF, 2003). Por ser o principal neurotransmissor inibitório no cérebro, o GABA é alvo de muitas drogas usadas clinicamente para tratar a ansiedade, que podem atuar em dois diferentes tipos de receptores o GABA_A (receptor ionotrópico), um canal iônico seletivo para os íons Cl⁻, e o GABA_B (receptor metabotrópico), um receptor acoplado à proteína G (MÖHLER, 2005; KURIYAMA et al., 1993). Baseado nisso, a neurotransmissão inibitória GABAérgica pode ser dividida em ação inibitória rápida, através do receptor ionotrópico GABA_A e de ação inibitória lenta, mediada pelo receptor metabotrópico GABA_B, cuja ativação inicia uma cascata de eventos intracelulares resultando na diminuição do influxo de Ca²⁺ e aumento do efluxo de K⁺, levando à hiperpolarização celular (MICHELS; MOSS, 2007; BETTLER; TIAO, 2006).

O receptor GABA_A é um complexo glicoproteico constituído de cinco subunidades polipeptídicas e composto por três subunidades diferentes α , β e γ que formam uma série de α -hélices agrupadas em torno de uma abertura central, correspondente ao canal iônico seletivo para os íons Cl^- (AKK et al., 2007). A ligação do GABA ao seu respectivo sítio de ligação no receptor GABA_A resultará em uma alteração conformacional no receptor, conduzindo a abertura dos canais de Cl^- , sinalizando o influxo de íons Cl^- para o meio intraneuronal. O influxo desses íons levará a hiperpolarização da membrana, e inibindo, consequentemente, a propagação do impulso elétrico, regulando dessa forma a excitabilidade neuronal (BORMANN, 2000; ZORUMSKI; ISENBERG, 1991) (Figura 2).

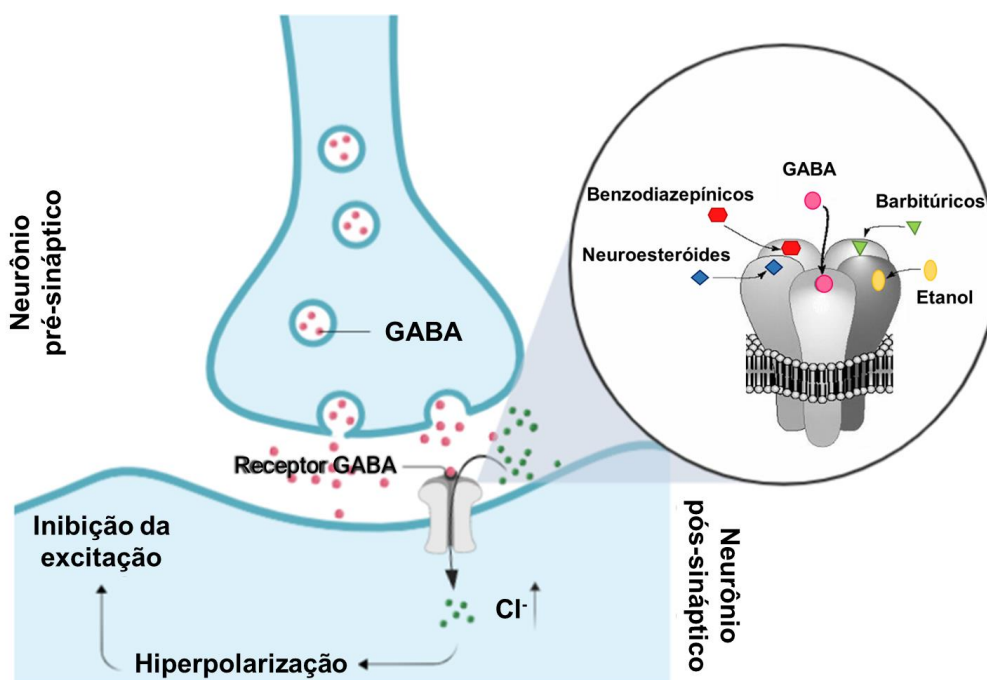


Figura 2. Representação esquemática da neurotransmissão GABAérgica. (Adaptado de Lüllmann e Wirth, 2000).

Outras moléculas também podem influenciar esse receptor, pois além dos sítios de ligação do GABA, esse receptor possui em sua estrutura diferentes sítios alostéricos específicos para diferentes ligantes (MICHELS; MOSS, 2007). Nesse sentido, substâncias como os barbitúricos, anestésicos, etanol e os BDZs quando interagem com seus respectivos sítios de ligação intensificam a ação do neurotransmissor GABA no SNC a nível pós-sináptico, aumentando sua afinidade pelos receptores GABA_A , e como consequência aumentando a frequência da abertura dos canais iônicos (CHERUBINI et al., 1991). Por outro

lado, moléculas como a picrotoxina e o PTZ ao se ligarem ao receptor GABA_A podem atenuar a neurotransmissão GABAérgica (MACDONALD; OLSEN, 1994; ZORUMSKI; ISENBERG, 1991; KALUEFF; NUTT, 1996). Com base nisso, podemos dizer que quando o equilíbrio entre a atividade excitatória e inibitória é mudado farmacologicamente em favor da transmissão GABAérgica serão induzidos estados de ansiólise e sedação. Entretanto, uma atenuação do sistema GABAérgico resulta em excitação, ansiedade, inquietação, insônia, e até crises convulsivas. Dessa forma, disfunções no sistema GABAérgico têm sido associadas à transtornos de ansiedade, epilepsia e esquizofrenia (OLSEN et al., 1999; MÖHLER, 2002; MÖHLER et al., 2005).

Nesse sentido, o PTZ, é considerado uma molécula ansiogênica, uma vez que por ser um antagonista do receptor GABA_A atua diminuindo a função GABAérgica e consequentemente aumentando a excitabilidade neuronal (KALUEFF; NUTT, 1996). Em humanos, o PTZ foi inicialmente descrito como convulsivante, mas posteriormente foi demonstrado produzir ansiedade intensa em doses subconvulsivas. Nesse sentido, o PTZ é considerado um protótipo de droga ansiogênica e tem sido amplamente utilizado em modelos de ansiedade em animais (JUNG, 2002).

Os receptores GABA_A estão presentes em todas as regiões cerebrais, porém encontram-se predominantemente em regiões envolvidas com a ansiedade, como o córtex pré-frontal, hipocampo e amígdala. Nesse sentido, tem sido destacado que a neurotransmissão GABAérgica na amígdala exerce um importante papel na modulação de respostas relacionadas a ansiedade (ETKIN, 2009). Estudos realizados em animais demonstraram que infusões na amígdala com agonistas de receptores GABA reduzem os comportamentos relacionados ao medo e ansiedade, enquanto infusões com antagonistas GABA produzem efeitos ansiogênicos (SANDERS; SHEKHAR, 1995; BARBALHO, et al., 2009). Paralelamente, também foi demonstrado que a supressão da expressão da enzima ácido glutâmico descarboxilase (enzima responsável pela síntese do GABA) na amígdala, acarreta a perda da resposta ansiolítica aos BDZs (HELDT et al., 2012). Além disso, estudos realizados em humanos revelam que a administração de BDZs reduz a ativação da amígdala frente a estímulos emocionais negativos (DEL-BEN et al., 2012; PAULUS et al., 2005).

A participação do GABA na ansiedade foi evidenciada no final dos anos 1960, através do estudo dos mecanismos de ação dos BDZs. Diante disso, o sistema GABAérgico tem sido associado aos transtornos de ansiedade devido a eficácia dos BDZs no tratamento da ansiedade. (NUSS, 2015). Por ser um neurotransmissor inibitório, o GABA atua contrabalanceando a ação do glutamato, além de suprimir a atividade neuronal dos sistemas serotoninérgico e noradrenérgico (SOODAN; ARYA, 2015). Dessa forma, acredita-se que o sistema GABAérgico seja um dos sistemas envolvidos integralmente nos transtornos de ansiedade.

3.2.3. Sistema serotoninérgico

A 5-HT é sintetizada a partir do aminoácido triptofano no cérebro, sobre a ação da enzima triptofano hidroxilase. Posteriormente a biossíntese, a 5-HT é armazenada em vesículas, e quando o potencial de ação atinge a porção terminal do neurônio, ocorre a despolarização da membrana levando a abertura dos canais de cálcio, e as vesículas contendo 5-HT se fundem com a membrana do neurônio (WONG et al., 2005). Assim, a 5-HT é liberada na fenda sináptica onde se liga aos receptores presentes nos neurônios pré e pós-sinápticos e os ativa iniciando a cascata de sinalização no interior da célula (SILVA, 2008).

Já está bem estabelecido que a 5-HT desempenha importante papel em diferentes processos fisiológicos e condições patológicas. Sua neurotransmissão está implicada na regulação do humor, controle de impulsos, funções cognitivas, além de demonstrar importante relação na modulação de comportamentos relacionados ao medo e ansiedade (ARANGO et al., 2001; LEMONDE et al., 2003). Esses efeitos são mediados por diversos receptores, encontrados em 7 classes distintas (5-HT₁₋₇) e diferentes subtipos (BARNES; SHARP, 1999).

A 5-HT tem sido apontada como um neurotransmissor importantíssimo no estudo neuroquímico da ansiedade. Sendo assim, as primeiras evidências do envolvimento do sistema serotoninérgico em comportamentos relacionados ao medo e ansiedade foram obtidas ainda na década de 60 em um modelo animal de conflito (GELLER; SEFTER, 1960). Também foi apontado que ansiolíticos BDZs reduzem a atividade dos neurônios serotoninérgicos, propondo uma relação entre o sistema serotoninérgico e a ansiedade, atribuindo uma função ansiogênica para a 5-HT (STEIN, 1973). De acordo com essa teoria, fármacos

que atuam reduzindo a ação desse neurotransmissor através do bloqueio de seus receptores e da sua síntese, produziram efeito ansiolítico. Por outro lado, estudos tem revelado que variações genéticas no transportador de 5-HT e no receptor 5-HT_{1A} produzem traços de ansiedade (HARIRI; HOLMES 2006), em paralelo a inativação dos genes que codificam o transportador 5-HT e o receptor 5-HT_{1A} resultaram em um aumento dos comportamentos ansiosos em camundongos (HOLMES, 2008; JACOBSON; CRYAN, 2009). Dessa forma, embora o envolvimento da 5-HT na ansiedade esteja bem estabelecido, seu exato papel nesses transtornos ainda é bastante controverso.

Entre os receptores de 5-HT, acredita-se que os de subtipo 5-HT_{1A} desempenham importante envolvimento na etiologia dos transtornos de ansiedade, estando distribuído em regiões do cérebro implicadas na regulação do humor e ansiedade como córtex frontal, amígdala e hipocampo (GARCIA-GARCIA et al., 2014). Seu importante papel pode ser demonstrado pelo efeito ansiolítico demonstrado pela buspirona, um agonista parcial do 5-HT_{1A}, um fármaco utilizado clinicamente no tratamento do transtorno de ansiedade generalizada, atuando preferencialmente nos receptores pré-sinápticos 5-HT_{1A} diminuindo a frequência de disparos do neurônio serotonérgico pré-sináptico (KOEN; STEIN, 2011). Além disso, o tratamento com ISRSs tem se tornando uma alternativa para os transtornos de ansiedade, tendo em vista que provou ter eficácia em uma variedade de transtornos de ansiedade. Essa classe atua bloqueando seletivamente a recaptção de 5-HT após a liberação dos neurônios, alterando a neurotransmissão de 5-HT no cérebro, incluindo a ligação ao receptor 5-HT_{1A} (VASWANI et al., 2003; NUTT, 2005).

Em relação aos receptores 5-HT₂, estes também são amplamente distribuídos no cérebro sendo altamente expressos na amígdala e no hipotálamo e, portanto, podem desempenhar um importante papel modulador na resposta ao medo e à ansiedade (MORILAK et al., 1994; POMPEIANO et al., 1994; WRIGHT et al., 1995), uma vez que alterações na sinalização do receptor nessas áreas podem estar diretamente relacionadas a certos sintomas associados a transtornos de ansiedade. Há relatos que a ativação do receptor 5-HT_{2A} produz efeitos ansiolíticos. Jiang e colaboradores (2009) mostraram que esse é o principal receptor responsável por facilitar a liberação de GABA nos neurônios da amígdala, sendo assim, qualquer mediador que facilite a transmissão

sináptica GABAérgica parece produzir um efeito ansiolítico, dessa forma acredita-se que a ativação do receptor 5-HT_{2A} induza a um estado de ansiólise. Ainda em relação a outro subtipo do receptor 5-HT₂, estudos realizados com animais demonstraram que a ativação do receptor 5-HT_{2C} induz efeitos semelhantes aos da ansiedade, sugerindo que a ativação do receptor 5-HT_{2C} aumenta a excitabilidade neuronal na amígdala (HACKLER et al., 2006; CAMPBELL; MERCHANT, 2003). Chen e colaboradores (2003) sugerem que a ativação do receptor 5-HT_{2C} pode induzir efeitos semelhantes à ansiedade em animais, principalmente pelo aumento da função do receptor N-metil D-Aspartato (NMDA) na amígdala.

Com base nisso, uma desregulação desses receptores 5-HT₂ em regiões como a amígdala e hipotálamo parecem estar envolvidas na fisiopatologia dos transtornos de ansiedade. Nesse sentido, fármacos capazes de modular a sinalização dos receptores 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C} nessas regiões cerebrais representam importante potencial no tratamento dos sintomas associados aos transtornos de ansiedade.

Tendo em vista o que foi exposto, a ativação da 5-HT pode estimular vias ansiogênicas e ansiolíticas no cérebro, dependendo da região envolvida e do subtipo de receptor 5-HT predominantemente estimulado. Desse modo, embora seu exato papel não esteja totalmente elucidado é impossível negar que esse neurotransmissor esteja envolvido nos transtornos de ansiedade.

3.3. Alterações neuroquímicas envolvidas na ansiedade

3.3.1. CREB e BDNF

O CREB é uma importante proteína envolvida no desenvolvimento cerebral e na neurogênese, pois atua como um fator de transcrição regulando moléculas envolvidas em diferentes processos neurológicos (GONZALEZ, G.A.; MONTMINY, 1989; MILETIC et al., 2002). A regulação dos processos de transcrição gênica ocorre quando proteínas quinases como a proteína quinase A (PKA) e a proteína quinase tipo IV dependente de cálcio/calmodulina (CaMKIV) fosforilam o CREB no resíduo Serina133, deixando-o na sua forma ativa (CARLEZON et al., 2005; RÉUS et al., 2011). Dessa forma, o CREB tem demonstrado importante envolvimento em processos biológicos, como sobrevivência celular, plasticidade, processos de aprendizado e memória, além

disso também tem sido proposto o envolvimento dessa proteína em vias de sinalização que levam ao desenvolvimento de transtornos psiquiátricos (REN et al., 2014).

Baseado nisso, disfunções na função ou expressão do CREB têm sido associados com o surgimento de comportamentos semelhantes à ansiedade em animais (BARROT et al., 2005; WALLACE et al., 2009; CARLEZON et al., 2005; PANDEY, et al., 2005). Estudos revelam que a função prejudicada do CREB na região do núcleo accumbens produz efeitos semelhantes à ansiedade, enquanto o aumento da sua função reduz esse comportamento (BARROT et al., 2005; WALLACE et al., 2009). Alfonso e colaboradores (2006) apontam para o fato de que a exposição ao estresse está associada à expressão reduzida de CREB no hipocampo. Também foi demonstrado que os roedores *knockout* do gene CREB exibiram um aumento nos comportamentos semelhantes à ansiedade (VOGT et al., 2014). Esses estudos levantam a possibilidade de que a modulação do CREB contribua para o desenvolvimento de transtornos psiquiátricos (CARLEZON et al., 2005).

O CREB tem sido apontado como importante fator de transcrição envolvido em diferentes vias de sinalização, que quando está em sua forma ativa sinaliza a transcrição gênica do BDNF, uma importante neurotrofina envolvida nos processos de neurodesenvolvimento, neurogênese e distúrbios de humor, como ansiedade e depressão (YOSHII; CONSTANTINE-PATON, 2010; GRATACÒS et al., 2007). De uma forma geral, os fatores neurotróficos são proteínas que regulam a sobrevivência, o crescimento, a plasticidade e a síntese de novos neurônios. Estas proteínas são conhecidas como neurotrofinas. A primeira neurotrofina caracterizada foi o fator de crescimento neural (NGF), seguido pela identificação de várias outras, incluindo o BDNF (ZHAO et al., 2005; SHIMIZU et al., 2003). O BDNF é uma das neurotrofinas mais abundantes presentes no cérebro responsável por promover a proliferação, sobrevivência e diferenciação de neurônios nos sistemas nervoso periférico e central (LINDSAY et al., 1994). A síntese do BDNF ocorre a partir de uma molécula precursora denominada pro-BDNF que é posteriormente clivada para gerar a forma madura da proteína (MOWLA et al., 2001). Estudos têm sugerido que o BDNF-maduro é a forma predominantemente encontrada, e a que apresenta maior atividade fisiológica no SNC (TECHE et al., 2013).

A sinalização mediada pelo BDNF ocorre por meio da sua ligação ao receptor tropomiosina quinase B (TrkB), formando o complexo BDNF-TrkB. Após a ligação ao receptor, ocorre a dimerização dos complexos, levando a autofosforilação e recrutamento de proteínas de ancoragem intracelulares. Esse processo pode desencadear a ativação de distintas vias de sinalização como a via da fosfolipase Cy (PLCy), fosfatilinositol 3-quinase (PI3K) e da quinase regulada por sinal extracelular (ERK) que levam a fosforilação e ativação do fator de transcrição CREB que medeia a transcrição de genes essenciais para a sobrevivência e diferenciação neuronal (REICHARDT, 2006) (Figura 3).

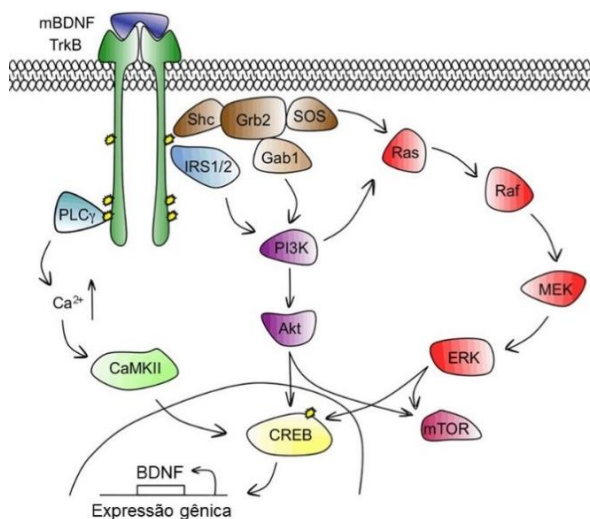


Figura 3. Representação esquemática das vias de sinalização mediadas pelo BDNF.
(Adaptado de Cunha e colaboradores 2010).

O desequilíbrio dos níveis do BDNF tem sido altamente associado aos transtornos de ansiedade. Recentemente, Shen e colaboradores (2019) demonstraram que os níveis séricos de BDNF foram menores em pacientes com transtorno de ansiedade generalizada do que em pacientes saudáveis. Outro importante resultado revelado no estudo de Rosa e colaboradores (2016) foi que ratos expostos precocemente ao glutamato monossódico desenvolveram comportamento semelhante à ansiedade, e mostraram redução dos níveis do BDNF no hipocampo, o que sugere que uma modulação dos níveis do BDNF pode estar envolvida no comportamento semelhante à ansiedade induzido pelo glutamato monossódico.

Embora muitos estudos relatem a diminuição dos níveis de BDNF em indivíduos com transtornos de ansiedade, poucas são as explicações de como esse desequilíbrio é provocado. Sabe-se que a produção do BDNF é influenciada

por um polimorfismo de nucleotídeo único, do alelo Val66Met, onde ocorre a substituição do aminoácido valina por uma metionina na posição 66 (Val66Met) da região codificadora do gene BDNF (EGAN et al., 2003). Dessa forma, indivíduos que possuem este polimorfismo são mais suscetíveis a desenvolver distúrbios psiquiátricos (GRÀTACOS et al., 2007). Chen e colaboradores (2006) demonstraram que camundongos geneticamente modificados com um alelo Met variante no gene BDNF exibiram um aumento dos comportamentos relacionados à ansiedade quando colocados em situações estressantes. Dessa forma, este achado sugere uma associação entre a fisiologia dessa neurotrofina com a fisiopatologia dos transtornos de ansiedade.

Estímulos estressores têm sido apontados como a principal causa destas alterações na expressão do BDNF (DUMAN; MONTEGGIA, 2006). Na ansiedade o eixo HHA é ativado em resposta a situações estressantes promovendo a liberação do hormônio cortisol na corrente sanguínea (GONZÁLEZ; ESCOBAR, 2002). Diante disso, outra hipótese que também parece afetar o papel do BDNF é a atividade do eixo HHA. Tendo em vista que estudos em cultura de neurônios demonstraram que o cortisol foi capaz de reduzir a expressão do BDNF no hipocampo, bem como prejudicar sua função (SMITH et al., 1995a; SCHAAF et al., 2000). Além disso, outros estudos revelaram que o estresse crônico e a administração a longo prazo de GCs reduziram os níveis do BDNF no cérebro de ratos (SMITH et al., 1995b, UYAMA et al., 1997). Com base nestes estudos é possível sugerir uma relação entre os estímulos provocados pelo estresse e a redução dos níveis e expressão do BDNF.

Com base no exposto, é possível observar que disfunções relacionadas ao CREB e BDNF contribuem para o desenvolvimento de distúrbios de ansiedade. Desse modo, torna-se interessante examinar se a expressão anormal de CREB também resulta na anormalidade de seus genes-alvo, como o BDNF, uma vez que se torna importante a busca de estratégias terapêuticas que atuem aumentando a transcrição mediada pelo CREB.

3.3.2. Fator de transcrição NF-κB

O NF-κB corresponde a uma família de proteínas e atua como fator de transcrição regulando a expressão de uma grande variedade de genes. Dessa

forma, essa via tem demonstrado importante envolvimento em processos fisiológicos e fisiopatológicos. O NF- κ B foi descrito em 1986 como uma proteína reguladora da expressão gênica de imunoglobulinas em linfócitos B (SEN; BALTIMORE, 1986). Sua função está principalmente relacionada à transcrição de genes envolvidos no processo inflamatório, no entanto também tem demonstrado participação na regulação de funções neurais como plasticidade, desenvolvimento neural, sinalização sináptica e sobrevivência celular (BLANCO e NETO, 2003; FRANCO, 2010).

O NF- κ B é um heterodímero constituído por duas subunidades, uma proteína de 50 kDa, conhecida como p50 e outra de 65 kDa, conhecida como p65, o heterodímero p50-p65 é considerado o protótipo clássico do NF- κ B, mas ainda essas subunidades podem-se homodimerizar (p50-p50) formando dímeros repressores (MÉMET, 2006; FRANCO, 2010). Na ausência de estímulos, o NF- κ B é encontrado no citoplasma acoplado a proteína inibidora kappa B (I κ B). Enquanto que na presença de estímulos como o estresse oxidativo, citocinas pró-inflamatórias, GCs, ERs entre outros fatores é sinalizada a rápida fosforilação da proteína I κ B pela I κ B quinase (I κ K) resultando no desacoplamento do NF- κ B com subsequente translocação para o núcleo da célula, onde irá promover ações nos genes alvo, atuando na inflamação, apoptose, proliferação e diferenciação celular (PEDRUZZI et al., 2012) (Figura 4).

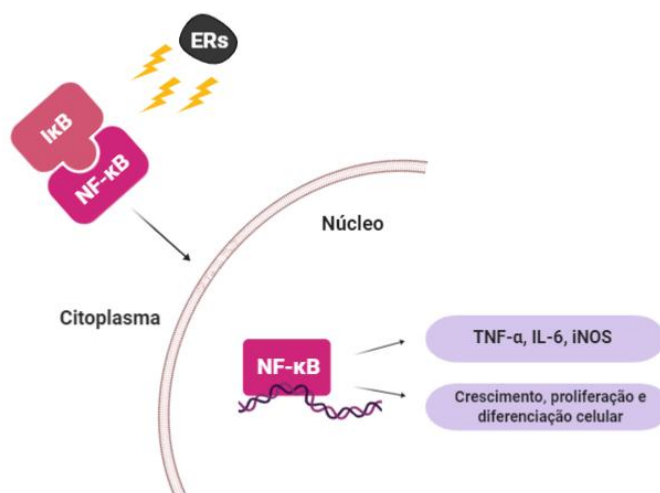


Figura 4. Representação esquemática da ativação do NF- κ B e subsequente translocação para o núcleo. I κ B: proteína inibitória kappa B, NF- κ B: fator nuclear kappa B, ERs: espécies reativas, TNF- α : fator de necrose tumoral alfa, IL-6: interleucina 6, iNOS: óxido nítrico sintase indúziuvel. (Adaptado de Pedruzzi e colaboradores, 2012).

Vários estímulos levam à fosforilação da I κ B e consequentemente a ativação do NF- κ B, e o que se observa é que independente do estímulo parece haver a contribuição da ERs nesse processo. De acordo com isso, quando ativado pelo estresse oxidativo através das ERs, o NF- κ B tem demonstrado intensificar o estresse oxidativo, por regular a expressão de genes como óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e citocinas pró-inflamatórias, levando à inflamação e dano neuronal (ELKS et al., 2009; MATTSON; CAMANDOLA, 2001). Sua ativação após a exposição ao estresse oxidativo em regiões cerebrais, como hipocampo, amígdala e locus coeruleus foi relacionada com comportamento semelhante a ansiedade em ratos (SALIM et al., 2011). Por outro lado, outro estudo revelou que a deleção do gene NF- κ B p50 reduz os comportamentos semelhantes a ansiedade em camundongos (KASSED; HERKENHAM, 2004). Com base nesses achados pode ser sugerido uma relação entre a ativação do fator de transcrição NF- κ B nos transtornos de ansiedade

3.3.3. Espécies reativas

As ERs são moléculas instáveis e extremamente reativas produzidas através de diferentes reações e em múltiplas regiões celulares. Essas moléculas podem ser encontradas na forma de radicais livres (RLs) ou compostos não radicalares, podendo serem derivadas tanto do oxigênio (EROs), como do nitrogênio (ERNs). Dentre as ERs estão os RLs, moléculas que apresentam um ou mais elétrons desemparelhados em seus orbitais externos. Por serem altamente instáveis os RLs interagem com inúmeras macromoléculas na busca da sua estabilização eletrônica, doando, extraindo ou até mesmo compartilhando elétrons de outras moléculas. A busca pela estabilidade destas moléculas desencadeia reações capazes de danificar e desestabilizar outras moléculas, fazendo com que ocorra a formação de novas espécies altamente reativas que continuam a propagar o dano oxidativo (HALLIWEL e GUTTERIDGE, 2015). Sendo assim, quando as ERs são encontradas em excesso, elas podem causar vários danos estruturais, e também exercer um papel fundamental no desenvolvimento de lesões teciduais, no envelhecimento e contribuir para o aparecimento de diversas doenças (RIZZO et al., 2010).

Nesse sentido, o dano oxidativo parece estar associado a distúrbios psiquiátricos e neurológicos. Essa relação deve-se à alta vulnerabilidade do cérebro a danos oxidativos, tendo em vista o seu elevado consumo de oxigênio, elevada quantidade de substratos lipídicos facilitando a peroxidação lipídica e a sua relativa carência de defesas antioxidantes. Esses fatores por sua vez, levarão à geração de ERs e, conseqüentemente, ao dano oxidativo (HALLIWELL, 2006; BOUAYED et al., 2009). Tem sido relatado que a exposição crônica ao estresse além de levar a vulnerabilidade em regiões cerebrais e alteração na defesa neuronal pode provocar danos a lipídios e proteínas devido à abundância de ERs que estão sendo liberados, resultando em danos oxidativos (BARREIROS, 2006). Nesse sentido, um estudo revelou que são encontrados níveis elevados de peroxidação lipídica, em amostras de soro e urina de pacientes com transtornos de ansiedade (HOVATA et al., 2010). Baseado nisso, evidências tem apoiado o envolvimento do dano oxidativo nos transtornos de ansiedade, no entanto, ainda não está bem compreendido se o dano oxidativo é a causa ou consequência destes distúrbios (FEDOCE et al., 2018).

3.3.4. A enzima Na⁺, K⁺ ATPase

A enzima Na⁺, K⁺ ATPase é uma proteína transmembrana, amplamente distribuída nos tecidos e sua função é atuar na manutenção do gradiente iônico necessário para a excitabilidade neuronal, através do transporte ativo de íons de Na⁺ para o meio extracelular e de íons K⁺ para o meio intracelular com concomitante hidrólise de adenosina trifosfato (ATP) que gera o potencial de membrana para as transmissões sinápticas (CORNELIUS et al., 2015) (Figura 5). Esta enzima encontra-se altamente expressa nas membranas das células cerebrais, consumindo em torno de 50% do ATP produzido neste tecido (ERECINSKA; SILVER, 1994). Desta maneira, alterações na atividade desta enzima podem ocasionar uma desregulação na função neuronal.

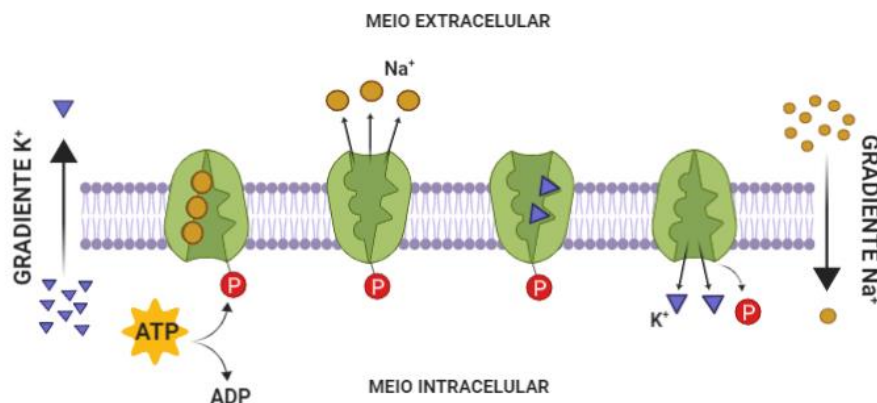


Figura 5. Representação esquemática do mecanismo de troca iônica da Na^+ , K^+ ATPase.

(Adaptado de Morth et al., 2011).

Alterações na atividade da enzima Na^+ , K^+ ATPase causam importantes variações na homeostase neuronal, prejudicando diretamente a sinalização de neurotransmissores envolvidos na fisiopatologia de doenças psiquiátricas, tendo em vista que seus transportadores fazem o uso do gradiente eletroquímico de íons Na^+ para realizarem o transporte de seus neurotransmissores para o ambiente intracelular (KANNER, 2006). Nesse sentido, o comprometimento da atividade da Na^+ , K^+ ATPase tem sido associado à hiperexcitabilidade neuronal e à despolarização celular (LEES, 1991). Em paralelo, estudos demonstraram que o comprometimento da homeostase iônica, desencadeado pela redução da atividade da Na^+ , K^+ ATPase, leva à disfunção neuronal e pode desencadear distúrbios psiquiátricos, como depressão e ansiedade (GAMARO, et al., 2003; MOSELEY et al., 2007; CREMA et al., 2010).

Portanto, o papel dessa enzima é importante nas sinapses e na formação de novas conexões neurais, além de atuar na transdução de sinal, alterando a função celular (APERIA et al., 2016). Sua funcionalidade é dada pela presença de grupos tióis (SH) na sua estrutura, entretanto esses grupos são facilmente oxidados na presença de ERs. Desta forma, a ação dessas moléculas reativas resultará em danos estruturais comprometendo a atividade da enzima Na^+ , K^+ ATPase. Com isso, muitos fatores podem alterar sua expressão e, dessa forma, sua atividade nos tecidos (SIMPSON; BROOKS, 1999; LI; LANGHANS, 2015).

3.4. Fármacos empregados no tratamento da ansiedade

A escolha do fármaco para tratar a ansiedade é feita de acordo com a intensidade e o tipo dos sintomas apresentados, os quais podem estar

associados à fatores genéticos, neurobiológicos, eventos traumáticos ou fobias. Dessa forma, a compreensão da fisiopatologia da doença e os mecanismos envolvidos no alívio dos sintomas são de extrema importância para um tratamento eficaz. A farmacoterapia utilizada para o tratamento das desordens de ansiedade consiste na classe de fármacos que atuam no SNC, destacando-se principalmente os BDZs, agonistas serotoninérgicos e ISRSs (KOEN; STEIN, 2011; RAVINDRAN; STEIN, 2010).

Os fármacos ansiolíticos que atuam no sistema GABAérgico têm sido referência no tratamento dessas desordens desde a sua descoberta na década de 1950. A terapia com esses fármacos promove a ativação alostérica de subtipos específicos de receptores GABA_A com intuito de favorecer a neurotransmissão inibitória no cérebro, resultando em efeitos como sedação, hipnose, miorelaxamento e atividade anticonvulsivante (KORPI et al., 2002; KRALIC et al., 2002). Os fármacos clordiazepóxido e diazepam pertencem a classe dos BDZs e são utilizados como ansiolíticos há mais de 50 anos. Essa classe de fármacos tem demonstrado eficácia no tratamento do transtorno de ansiedade generalizada, transtorno de ansiedade social e transtorno do pânico, entretanto seu efeito é limitado em outras condições de ansiedade (BLANCHARD et al., 2011).

A duração do tratamento depende de alguns fatores, como o tipo e a intensidade da desordem de ansiedade, mas sabe-se que a duração mínima do tratamento para qualquer quadro de ansiedade é de pelo menos 6 meses. Dessa forma, uma das limitações dos fármacos BDZs está associado aos seus diversos efeitos adversos, incluindo sedação, distúrbios de memória, tolerância e dependência, os quais são causados com seu uso prolongado (KORPI et al., 2002; KRALIC et al., 2002). Sendo assim, esses fatores comprometem o seu uso, o qual não é recomendando como tratamento de primeira linha em casos onde o período de tratamento exceder 4 meses (NORDON; HÜBNER, 2009).

A 5-HT é outro neurotransmissor frequentemente associado à ansiedade e fármacos ansiolíticos (GRIEBEL, 1995). Os receptores 5-HT_{1A} têm demonstrado desempenhar um papel importante na ansiedade. A buspirona é um agonista parcial do receptor 5-HT_{1A} e tem sido uma alternativa terapêutica para o tratamento do transtorno de ansiedade generalizada (GOLDBERG; FINNERTY, 1979). Esse fármaco assim como outros agonistas parciais do

receptor 5-HT_{1A} exerce seu efeito ansiolítico por meio da interação com os receptores pré-sinápticos diminuindo a frequência de excitação dos neurônios serotoninérgicos pré-sinápticos (KOEN; STEIN, 2011). Tendo em vista que esse fármaco não apresenta os típicos efeitos adversos causados pelos BDZs, seu uso torna-se vantajoso em relação a essa classe. Entretanto, não possui ação rápida sendo necessário 2 a 4 semanas para exercer efeito terapêutico semelhante aos BDZs (TYRER; BALDWIN, 2006). Além disso, a eficácia dos fármacos que atuam no receptor 5-HT_{1A} demonstraram falhar no tratamento de outros transtornos de ansiedade como transtorno obsessivo compulsivo e transtorno do pânico (CHESSICK et al., 2006).

Uma importante e acidental descoberta foi que os fármacos antidepressivos tricíclicos e inibidores da monoamina oxidase apresentavam propriedades ansiolíticas (NUTT, 2005). Nesse sentido, esse achado estimulou a pesquisa das propriedades ansiolíticas de antidepressivos, como os ISRSs (KENT et al., 1998; NUTT, 2005), os quais demonstraram eficácia em diferentes transtornos de ansiedade. Sendo assim, como cabe destacar que a fluoxetina foi o primeiro fármaco da classe a ser aprovado para o tratamento do transtorno de ansiedade generalizada (BALDWIN et al., 2009; BLANCHARD et al., 2011). O efeito ansiolítico dessa classe de fármacos é dado através do bloqueio do transportador de serotonina, promovendo um aumento dos níveis extracelulares de 5-HT (HOMBERG et al., 2010). Apesar dos ISRSs serem um tratamento de primeira linha para diversos transtornos de ansiedade, cerca de 40% dos pacientes não respondem ao tratamento e relatam efeitos adversos como disfunção sexual e início tardio da ação, dessa forma esses fatores reduzem a aceitabilidade dos ISRSs na clínica (VASWANI et al., 2003).

Diante de todas essas limitações, cabe destacar a importância de investigar os mecanismos subjacentes às condições psiquiátricas, principalmente na busca de novos marcadores bioquímicos que podem ser utilizados para diagnosticar distúrbios de ansiedade. Além disso, o conhecimento desses mecanismos também pode ser útil para elaboração de novas terapias. Esses fatos têm justificado o número considerável de estudos realizados com o intuito de desenvolver moléculas mais seletivas e com menores efeitos adversos para o tratamento da ansiedade (SAVEGNAGO et al., 2008; ROSA et al., 2016; REIS et al., 2017).

3.4.1. Efeito farmacológico dos compostos orgânicos de selênio

O selênio é um micronutriente essencial para o organismo, localizado no grupo 16 da tabela periódica. Esse elemento traço foi descoberto em 1817 pelo químico sueco Jöns Jacob Berzelius, podendo ser encontrado tanto na forma orgânica quanto inorgânica, sendo que, apresenta menor toxicidade e maior biodisponibilidade na sua forma orgânica (NARAJJI et al., 2007). Dada a sua importância no organismo, alterações nas suas concentrações parecem influenciar diferentes mecanismos biológicos, como neurodegeneração, resposta imune, doenças cardiovasculares e alterações de humor (HOFFMANN et al., 2008; HOFFMANN et al., 2011; ROMAN et al., 2014; EKRAMZADEH et al., 2015). Ainda, diante das suas variadas funções cabe destacar que o selênio atua na manutenção do equilíbrio redox fazendo parte da composição química de selenoproteínas, como a glutathione peroxidase, uma importante enzima do sistema de defesa antioxidante (STEINBRENNER; SIES, 2013).

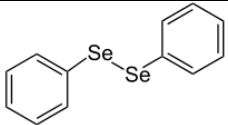
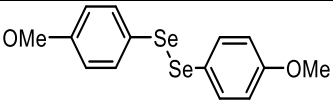
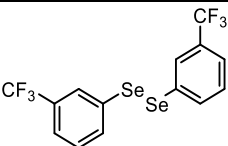
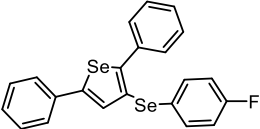
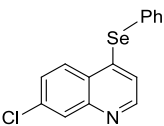
A vasta funcionalidade desse elemento químico, fez com que muitos pesquisadores se dedicassem à síntese e estudo das propriedades biológicas de moléculas que contenham selênio, devido às suas relevantes atividades farmacológicas em baixas doses, síntese simples e pouca ou nenhuma toxicidade (NOGUEIRA et al., 2004). Nesse sentido, as propriedades farmacológicas dos compostos orgânicos de selênio têm sido reveladas em diversos estudos, os quais demonstraram ações antioxidantes, anti-inflamatórias, neuroprotetoras, ansiolítica, anti-hiperglicêmica, anti-hipertensiva, anticâncer, antiviral, imunossupressora, antimicrobiana, antidepressiva, entre outras (LUCHESE et al., 2009; BRÜNING et al., 2012; BORTOLATTO et al., 2013; RIBEIRO et al., 2013; PETRONILHO et al., 2016; ROSA et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2017).

Diante do exposto, é possível observar que compostos orgânicos de selênio apresentam importante papel na manutenção de diferentes funções fisiológicas. Entretanto é importante destacar que o efeito produzido por esses compostos não se deve apenas a presença do átomo de selênio presente na estrutura química, as classes de moléculas escolhidas para a incorporação desse átomo possuem papel fundamental nos efeitos promovidos por essas moléculas. Corroborando com essa ideia, VOGT e colaboradores (2018)

revelaram que a porção fenilselanil presente na estrutura do 4-PSQ é fundamental para a atividade antioxidante desenvolvida por esse composto.

Considerando a importância biológica do selênio em diferentes aspectos fisiológicos, incluindo os transtornos relacionados ao humor, diferentes grupos de pesquisa têm estudado os efeitos farmacológicos de compostos orgânicos de selênio na tentativa de buscar moléculas mais seletivas e com menores efeitos adversos para o tratamento da ansiedade (Tabela 1).

Tabela 1. Compostos orgânicos de selênio como alternativa terapêutica para o tratamento da ansiedade.

Estrutura química	Espécie	Dose (nº de administrações)	Referência
 Disseleneto de difenila	Camundongo	50 mg/kg (1)	SAVEGNAGO et. al., 2008
	Rato	50 µmol/kg (1)	GHISLENI et. al., 2008
	Pinto	50 mg/kg (1)	PRIGOL et. al., 2011
	Rato	1 mg/kg (7)	ROSA et. al., 2016
 <i>p</i> -metoxi-difenil disseleneto	Camundongo	5 mg/kg (7)	OLIVEIRA et al., 2017
 <i>m</i> -trifluormetil-difenil disseleneto	Camundongo	100 mg/kg (1)	BRÜNING, et. al., 2009
	Camundongo	25 mg/kg (7)	ROSA et al., 2018
 3-(4-fluorofenilselenil)-2,5- difenilselenofeno	Camundongo	0,1 mg/kg (14)	GAI et. al., 2014
 7-cloro-4-(fenilselanil) quinolina	Camundongo	50 mg/kg (1)	REIS et al., 2017
	Camundongo	1 mg/kg (14)	PINZ et al., 2018

Nesse sentido, o composto disseleneto de difenila (PhSe)₂ demonstrou efeito tipo ansiolítico em mais de um modelo animal. Em 2008, Savegnago e colaboradores demonstraram o efeito ansiolítico e antidepressivo deste composto nos testes do labirinto em cruz elevado, claro e escuro e suspensão da cauda. Ainda, foi evidenciado um sinergismo entre o efeito antidepressivo do composto e da fluoxetina, fármaco antidepressivo de referência, em uma dose subefetiva. Neste mesmo ano, Ghisleni e colaboradores (2008), verificaram o envolvimento das vias serotoninérgica e GABAérgica na ação ansiolítica do (PhSe)₂, ressaltando o potencial farmacológico deste composto. Em 2016, Rosa e colaboradores demonstraram a ação ansiolítica de (PhSe)₂ em ratos expostos ao glutamato monossódico durante o período neonatal. Adicionalmente, o envolvimento da modulação hipocampal do GABA e da captação de 5-HT foram confirmadas como mecanismo envolvidos na ação do composto.

Recentemente, Reis e colaboradores (2017) demonstraram o efeito tipo-ansiolítico de outra promissora molécula contendo selênio, o 4-PSQ. Esse composto apresentou ação tipo-ansiolítica evidenciada no teste do labirinto em cruz elevado e no teste do claro-escuro. Importaneamente, o estudo de Reis e colaboradores (2017) verificou que o sistema glutamatérgico está envolvido no efeito tipo-ansiolítico do composto, uma vez que o tratamento com o 4-PSQ foi capaz de proteger contra a ansiedade induzida por cainato, um agonista dos receptores de glutamato do tipo cainato. Adicionalmente, outro recente estudo revelou o efeito protetor do 4-PSQ contra a ação ansiogênica, o comprometimento da aprendizagem e da memória em um modelo da doença de Alzheimer, esse efeito está relacionado com a sua ação anticolinesterásica e antioxidante (PINZ et al., 2018).

Além disso, o 4-PSQ também demonstrou outras importantes propriedades farmacológicas, como efeito anti-inflamatório e antinociceptivo, modulando os sistemas serotoninérgico, nitrérgico e glutamatérgico (PINZ et al., 2016; SILVA et al., 2017), efeito antioxidante (VOGT et al., 2018), potencial terapêutico no tratamento da dermatite atópica (VOSS et al., 2018) e restaurou o comprometimento cognitivo causado pelo envelhecimento em ratos (BARTH et al., 2019).

É importante destacar que os efeitos mediados pelo 4-PSQ parecem estar relacionados com a sua promissora propriedade antioxidante. Tendo em vista

que as diferentes doses empregadas desse composto demonstraram reduzir os parâmetros oxidativos avaliados em modelos animais de inflamação, nocicepção, ansiedade, dermatite atópica e doença de Alzheimer (PINZ et al., 2016; SILVA et al., 2017; REIS et al., 2017; VOSS et al., 2018; PINZ et al., 2018). Além disso, VOGT e colaboradores (2018) demonstraram o potencial efeito antioxidante do 4-PSQ contra o estresse oxidativo induzido pelo nitroprussiato de sódio em cérebro de camundongos. Nesse mesmo estudo foi demonstrado que o grupo fenilselanil presente na estrutura do 4-PSQ apresenta importante papel na atividade antioxidante desse composto.

Adicionalmente, cabe mencionar que Hovata e colaboradores (2010) observaram níveis elevados de peroxidação lipídica, em amostras de soro e urina de pacientes com transtornos de ansiedade. E, reafirmaram a possibilidade de uso de compostos orgânicos de selênio, nos distúrbios de ansiedade devido as suas propriedades antioxidantes.

Sendo assim, a busca e investigação das propriedades farmacológicas dos compostos orgânicos contendo selênio, têm crescido nos últimos anos, tendo em vista que estes têm apresentado promissoras ações farmacológicas. Desta forma, estes compostos podem vir a ser uma alternativa terapêutica promissora para o tratamento de transtornos psicológicos como a ansiedade.

4. Manuscrito

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de manuscrito. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências, encontram-se estruturados de acordo com as normas do periódico *Behavioural Brain Research*. O manuscrito encontra-se submetido neste periódico.

The anxiolytic effect of a promising quinoline containing selenium with the contribution of the serotonergic and GABAergic pathways: modulation of parameters associated with anxiety in mice

Jaini J. Paltian^a, Angélica S. dos Reis^a, Renata L. de Oliveira^a, Caren A. R. da Fonseca^a, William B. Domingues^b, Eduardo N. Dellagostin^b, Vinícius F. Campos^b, Roberta Kruger^c, Diego Alves^c, Cristiane Luchese^{a*}, Ethel A. Wilhelm^{a*}

^aPrograma de Pós-graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Laboratório de Pesquisa em Farmacologia Bioquímica (LaFarBio), Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil.

^bPrograma de Pós-graduação em Biotecnologia, Laboratório de Genômica Estrutural, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil.

^cPrograma de Pós-graduação em Química, Laboratório de Síntese Orgânica Limpa (LaSOL), Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil.

*** Address for correspondence**

Ethel Antunes Wilhelm

Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Bioprospecção (PPGBBio), Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Campus Capão do Leão, Pelotas, CEP 96010-900, RS, Brasil;

E-mail: ethelwilhelm@yahoo.com.br; Phone: 55-53-32757356

Cristiane Luchese

Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Bioprospecção (PPGBBio), Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Campus Capão do Leão, Pelotas, CEP 96010-900, RS, Brasil;

E-mail: cristiane_luchese@yahoo.com.br; Phone: 55-53-32757233

Abstract

Recently, we demonstrated the promising anxiolytic action of 7-chloro-4-(phenylselanyl)quinoline (4-PSQ) in mice. For this reason, the objective of this study was to expand our previous findings by investigating the contribution of serotonergic and GABAergic systems to the anxiolytic action of this compound. Pretreatment with different serotonergic antagonists (pindolol, WAY100635 and ketanserin) blocked the anxiolytic effect caused by 4-PSQ (50 mg/kg, per oral) in the elevated plus maze (EPM) test. The contribution of the GABAergic system was investigated by pretreatment with pentylentetrazole (35 mg/kg intraperitoneal (i.p.), a GABA_A receptor antagonist) (PTZ). 4-PSQ diminished the PTZ-induced anxiety. Later, this group of animals was euthanized and the blood was removed to determine the levels of corticosterone, and cerebral cortex and hippocampus to determine the mRNA expression levels of cAMP response element binding protein (CREB), brain derived neurotrophic factor (BDNF) and nuclear factor kappa B (NF- κ B), as well as the Na⁺, K⁺ ATPase activity and reactive species levels (RS). 4-PSQ was able to significantly reverse the increase in RS and corticosterone levels, as well as the decrease of CREB and BDNF expression in the cerebral structures and increase of NF- κ B expression in the hippocampus. Finally, 4-PSQ restored the Na⁺, K⁺ ATPase activity in the cerebral structures evaluated. Here, we showed that the modulation of serotonergic and GABAergic systems, factors related to neurogenesis, oxidative status and Na⁺, K⁺ ATPase activity contributes to the anxiolytic effect of 4-PSQ and reinforces the therapeutical potential of this compound for the treatment of anxiety.

Keywords: Anxiety; Corticosterone; Neurotrophin; Serotonergic system; GABAergic system; Selenium.

1. Introduction

Anxiety is described as a defensive mechanism exhibited by an organism in response to novelty. It is generally characterized by negative emotions and feeling of apprehension [1]. Physiological anxiety is essential for survival under variable environmental conditions, however persistent generalized anxiety or exaggerated inappropriate fear are pathological manifestations that severely reduce quality of life [2]. Currently, this psychiatric disease has been the most commonly prescribed and treated worldwide. According to the World Health Organization (WHO) this pathology affects approximately 3.6% of the world population, Brazil being (9.3%) the country with the highest incidence of this disorder [3]. Under these circumstances, research to elucidate the mechanisms involved in anxiety and the search for new therapeutic agents have attracted the interest of researchers.

Stress has been the main factor associated with the development of anxiety, since its persistence promotes an imbalance in body homeostasis, resulting in physiological changes harmful to health [4]. In this sense, oxidative stress, increased glucocorticoid levels and reduced neurotrophic factors have been associated with the pathophysiology of anxiety. Indeed, increased cortisol hormone secretion in the body is associated with stressful situations and the development of psychiatric disorders [5]. In parallel, brain derived neurotrophic factor (BDNF) has shown altered levels and consequently involvement in anxiety-like behaviors in animal models [6]. cAMP response element binding protein (CREB) in its phosphorylated form is an important transcription factor that regulates BDNF expression [7], and like BDNF, its decreased phosphorylation and expression have been related to anxiety [8,9]. On the other hand, nuclear factor kappa B (NF- κ B) can be activated by different stimuli, such as inflammatory and stress responses

[10]. Therefore it is highly relevant to evaluate these molecules as they may act as potential targets in the development of new anxiolytic drugs.

It is well-known that gamma-aminobutyric acid (GABA) has been involved in regulating and modulating anxiety behavior, and therefore it has been the main target of drugs used clinically to treat anxiety. Clinical studies relate the functioning of the GABA_A receptor to anxiety disorders, resulting in the successful use as a molecular target of anxiolytic drugs [1,11]. Furthermore, the serotonin (5-HT) neurotransmitter has also shown significant involvement in regulating mood and affective states. Based on this, molecules that modulate the serotonergic system can also be used to treat psychiatric disorders such as anxiety [12].

In this way, substances effective in modulating different systems and signaling pathways have a potential for anxiety disorder treatment. Our research group has dedicated attention to searching for and elucidating the pharmacological properties of a novel multi-target compound, 7-chloro-4- (phenylselanyl) quinoline (4-PSQ) [13–19]. Among the important findings, Reis et al. [15] demonstrated that 4-PSQ elicited anxiolytic-like behavior in mice. 4-PSQ reduced glutamate uptake in cerebral cortices and protected against kainate-induced anxiety-related behavior. The results suggest that the glutamatergic pathway is implicated in the anxiolytic-like effect of 4-PSQ, proposing that this quinoline derivative could directly or indirectly modulate glutamate binding to its receptor. In addition, our recent work contributed to these efforts by revealing the protective effect of 4-PSQ on the anxiogenic action and learning and memory impairment in a model of Alzheimer's disease in mice, by anticholinesterase and antioxidant actions [18].

Thus far, there have not been any studies investigating if the factors related to neurogenesis, serotonergic and GABAergic systems are involved in the anxiolytic effect

elicited by 4-PSQ. In this study we used pharmacological, biochemical and molecular approaches to explore potential mechanisms underlying 4-PSQ action. Our findings support the potential usefulness of 4-PSQ as pharmacotherapy for anxiety.

2. Materials and methods

2.1 Animals and ethical approval

All experiments were performed in accordance with the guidelines of the Committee on Care and Use of Experimental Animal Resources of the Federal University of Pelotas, Brazil (CEEAA 4224-2015). The experiments were carried out using male adult Swiss mice (25-30 g). The animals were maintained at $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ with free access to water and food, under a 12 h light/dark cycle (with lights on at 7:00 a.m.). Mice were acclimatized to the behavior room for at least 1 h before testing. Every effort was made to minimize the number of animals used and their discomfort.

2.2 Drugs

Pentylentetrazole (PTZ), WAY100635, ketanserin and pindolol were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). 4-PSQ (Fig. 1) was prepared and characterized in our laboratory using the method previously described by Duarte et al. [20]. Analysis of the ^1H nuclear magnetic resonance (NMR) and ^{13}C NMR spectra showed analytical and spectroscopic data in full agreement with its assigned structure. The chemical purity of 4-PSQ (99.9%) was determined by gas chromatography–mass spectrometry (GC/MS). PTZ, WAY100635, and ketanserin were dissolved in 0.9% saline solution, pindolol was dissolved in Tween 80 (10%), while 4-PSQ was dissolved in canola oil. All other chemicals were of analytical grade and obtained from standard commercial suppliers.

2.3. Behavioral tests

2.3.1. Open field test (OFT)

The OFT evaluated the general locomotor and exploratory behaviors of mice. The open-field was made of plywood and surrounded by 30 cm - high walls. The floor of the open-field, 45 cm long and 45 cm wide, was divided by masking tape markers into 9 squares (3 rows of 3). Thirty minutes after the treatments, each animal was placed at the center of the open field and observed for 4 min to record the locomotor (number of segments crossed with the four paws) and exploratory (number of rearings on the hind limbs) activities [21]. The arena was cleaned with 70% ethanol after each session and individual mice were tested only once.

2.3.2. Elevated plus-maze (EPM) test

The EPM test is widely validated to measure anxiety in rodents [22]. The EPM apparatus consists of two opposed open arms (16 x 5 cm) and two opposed closed arms (16 x 5 x 10 cm) mounted at a 90° angle, all facing a central platform (5 x 5 cm) elevated 50 cm from the floor. Each animal was placed individually at the center of the apparatus facing one of the open arms. The frequency of entries into either open or closed arms and the time spent in each type of arm were measured for 5 min. The data were expressed as percentage of entries (with the four paws) into, and time spent in the open arms in relation to the total number of entries and time, respectively, in both open and enclosed arms. The total number of entries into the enclosed arms was also recorded. The anxiolytic effectiveness of a drug is illustrated by a significant statistical augmentation of parameters in open arms.

2.3.3. The role of the serotonergic system in the anxiolytic effect of 4-PSQ on the EPM

The possible contribution of the serotonergic system to the anxiolytic action of 4-PSQ was investigated using pindolol (1 mg/kg, intraperitoneal injection (i.p.), a nonselective antagonist of 5-HT_{1A/1B} receptors), WAY100635 (0.7 mg/kg, i.p., a selective antagonist of 5-HT_{1A} receptor) and ketanserin (0.3 mg/kg, i.p., a selective antagonist of 5-HT_{2A/2C} receptor). Fifteen minutes after the antagonist or vehicle administration (10 mL/kg of body weight, i.p.), the animals received 4-PSQ (50 mg/kg, per oral, p.o.) and after 30 min, the mice were evaluated in OFT and EPM tests as described above. The doses of the antagonists used have no effect in the OFT and EPM.

2.3.4. The role of the GABAergic system in the anxiolytic effect of 4-PSQ on the EPM

It should be noted that the investigation of the involvement of the GABAergic system in the anxiolytic action of 4-PSQ was carried out with a different group of animals (7 animals per group). PTZ, a GABA_A receptor antagonist, was applied to induce anxiety-related behavior [23,24]. PTZ (35 mg/kg) or saline (10 mL/kg) was administered by i.p. injection. Twenty-four hours after PTZ administration, the mice received the treatment with 4-PSQ (50 mg/kg, p.o.) or vehicle (10 mL/kg). Behavioral tests were carried 30 min after drug administration. The animals were evaluated in OFT and EPM tests as described above. The dose of PTZ was based on a pilot study. These mice did not present seizure-like behaviors up to 24 h after the PTZ injection.

2.3.4.1. Ex vivo assays

2.3.4.1.1. Tissue processing

Mice were anesthetized with isoflurane and blood samples collected from the heart ventricle, using heparin as anticoagulant to obtain plasma to determine

corticosterone levels. Then, cerebral cortex and hippocampus were removed and immediately homogenized in cold 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 (1/10, weight/volume). The homogenates were centrifuged at 3000 rpm at 4 °C for 10 min and supernatant fractions (S1) were used to determine Na⁺, K⁺ ATPase activity and reactive species (RS) levels. Additionally, cerebral cortex and hippocampus were separated for the mRNA extraction and expression of CREB, BDNF and NF-kB. For this, the samples were immediately processed and adequately stored (-80 °C) until the evaluation of the mRNA expression levels.

2.3.4.1.2. Na⁺, K⁺ ATPase activity

For the Na⁺, K⁺ ATPase activity assay, a reaction mixture was used containing S1, 3 mM MgCl, 125 mM NaCl, 20 mM KCl and 50 mM Tris/HCl, pH 7.4, at a final volume of 500 µL. The reaction was initiated by the addition of ATP to a final concentration of 3.0 mM. Control samplings were performed under the same conditions with the addition of 0.1 mM ouabain. The samples were incubated at 37 °C for 30 min and the incubation was stopped by adding trichloroacetic acid solution (TCA) (10%) with 10 mM HgCl₂. Na⁺, K⁺ ATPase activity was calculated by the difference between the two assays. Released inorganic phosphate (Pi) was measured by the method of Fiske and Subbarow [25]. Enzyme activity was expressed as nmol Pi/mg protein/min.

2.3.4.1.3. RS levels

The RS levels in the cerebral cortex and hippocampus of animals were determined by a spectrofluorimetric method, using 2',7' dichlorofluorescein diacetate (DCHF-DA) assay [26]. The oxidation of DCHF-DA to fluorescent dichlorofluorescein (DCF) was measured for the detection of intracellular RS. The DCF fluorescence intensity emission was recorded at 520 nm (with 480 nm excitation), 60 min after the addition of DCHF-DA

to the medium (Shimadzu RF-5301 PC fluorometer). RS levels were expressed as arbitrary units of fluorescence.

2.3.4.1.4. Protein determination

The protein concentration was measured by the method of Bradford [27], using bovine serum albumin as the standard.

2.3.4.1.5. Plasma corticosterone level estimation

Corticosterone levels were estimated by the fluorescence method previously described by Zenker and Bernstein [28]. Corticosterone in plasma aliquot (200 μ L) was extracted with 2 mL of chloroform. The tubes were shaken for 15 s, centrifuged (5 min at 2500 rpm), and the aqueous layer was discharged. Then, 1 mL of 0.1 M NaOH was added to tubes and another round of agitation and centrifugation was performed. Lastly, after the addition of the fluorescence reagent (H_2SO_4 and 50% ethanol), samples were agitated and centrifuged (5 min at 2500 rpm) and incubated at room temperature for 2 h. After that, the fluorescence intensity emission was recorded at 540 nm (with 257 nm excitation). Corticosterone levels were expressed as ng corticosterone/mL plasma.

2.3.4.2. RNA extraction and expression of CREB, BDNF and NF- κ B by real-time PCR

Total mRNA was extracted from thawed samples of cerebral cortex and hippocampus ($n = 7$ for each experimental group) weighing between 50-70 mg using TRIzol reagent (Invitrogen™, Carlsbad, USA) followed by DNase treatment with DNase I Amplification Grade (Invitrogen™, Carlsbad, USA) in order to ensure minimum DNA contamination of the samples. The total RNA isolated was quantified and its purity (260/280 and 260/230 ratios) was examined by NanoVue spectrophotometer (GE, Fairfield, CT, USA).

The cDNA synthesis was performed using a High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (AppliedBiosystems™, UK) according to the manufacturer's protocol. For reverse transcription, 2 µg of total RNA were used in a reaction volume of 20 µl. The amplification was done with GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, Madison, WI) using the Agilent Mx3005P qPCR System (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA) and the sequence of primers used is indicated in Table 1. The qPCR conditions were as follows: 10 min at 95°C to activate the hot-start Taq polymerase, followed by 35 cycles of denaturation for 15 s at 95°C, primer annealing for 60 s at 60°C, and extension for 30 s at 72°C (fluorescence signals were detected at the end of every cycle). Baseline and threshold values were automatically set by the Stratagene MxPro software.

The number of PCR cycles required to reach the fluorescence threshold in each sample was defined as the Ct value, and each sample was analyzed in duplicate to obtain an average Ct for each sample. The $2^{-\Delta\Delta CT}$ method was used to normalize the fold change in gene expressions [29], using Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) as a housekeeping gene.

2.4. Statistical analysis

Data are expressed as means $\pm$ standard error of the mean (SEM). Data were analyzed by Graphpad Prism® 5. D'Agostino and Pearson omnibus normality tests evaluated data normality. Statistical analysis was performed using a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Newman-Keuls' test when appropriate. Values less than 0.05 ($P < 0.05$) were considered statistically significant.

3. Results

3.1. OFT

The possible effects of treatments on locomotor and exploratory activities of mice were evaluated in the OFT. The data analysis of OFT showed no change in the number of crossings and rearings after the different treatments of mice ($P > 0.05$) (Table 2).

3.2. The role played by the serotonergic system in the anxiolytic effect of 4-PSQ on the EPM

The results depicted in Figures 2 and 3 show the effect of 4-PSQ after treatment with the serotonergic antagonists pindolol, WAY100635 and ketanserin on the percentage of time spent in the open arms and percentage of open arms entries in the EPM test, respectively. One-way ANOVA followed by Newman–Keuls post-hoc test revealed that treatment with 4-PSQ increased the time spent in the open arms when compared with the control group. The anxiolytic effect exerted by 4-PSQ on the percentage of time spent in the open arms in the EPM test was altered by the pretreatment of mice with different serotonergic antagonists. Pretreatment of animals with pindolol ($F_{(3,24)} = 3.757$, $P < 0.05$) (Figure 2A), WAY100635 ($F_{(3,24)} = 3.395$, $P < 0.05$) (Figure 2B) and ketanserin ($F_{(3,24)} = 5.464$, $P < 0.01$) (Figure 2C) reversed the anxiolytic effect caused by 4-PSQ reducing the percentage of time spent in the open arms in the EPM test.

Figure 3 shows the effect of the serotonergic antagonists pindolol, WAY100635 and ketanserin on the percentage of open arms entries in the EPM test. One-way ANOVA followed by Newman-Keuls post-hoc test revealed that treatment with 4-PSQ increased the entries in the open arms when compared with the control group. The anxiolytic effect exerted by 4-PSQ on the percentage of entries in the open arms in the EPM test was altered by the pretreatment of mice with different serotonergic antagonists. Pretreatment of animals with pindolol ($F_{(3,24)} = 6.702$, $P < 0.01$) (Figure 3A), WAY100635 ($F_{(3,24)} = 8.524$, $P < 0.001$) (Figure 3B) and ketanserin ($F_{(3,24)} = 9.612$, $P < 0.001$) (Figure 3C)

reversed the anxiolytic effect caused by 4-PSQ reducing the percentage of entries in the open arms in the EPM test.

3.2. Role of the GABAergic system in the anxiolytic effect caused by 4-PSQ on the EPM

Effects of PTZ and 4-PSQ plus PTZ on behavioral parameters in the EPM test in mice are illustrated in Figure 4. One-way ANOVA followed by the Newman–Keuls test revealed that PTZ exposure decreased the percentage of time spent in the open arms and the percentage of entries in the open arms in the EPM test when compared with the control group. However, treatment with 4-PSQ increased the time spent in open arms ($F_{(2,18)} = 20.77$, $P < 0.0001$) (Figure 4A), reversing the change caused by PTZ. The results presented in Figure 4B demonstrate that treatment with 4-PSQ reversed the decrease of open arms entries induced by PTZ ($F_{(2,18)} = 29.73$, $P < 0.0001$). In addition, the time spent in the open arms and the open arms entries of animals exposed to 4-PSQ plus PTZ were higher than the control group.

3.3. Modulation of Na^+ , K^+ ATPase activity and reduction of oxidative damage contribute to 4-PSQ anxiolytic action on PTZ-induced anxiety-related behavior

Figures 5A and 5B illustrate the effects of treatments on Na^+ , K^+ ATPase activity in cerebral cortex and hippocampus of mice, respectively. Results demonstrated that PTZ inhibited the Na^+ , K^+ ATPase activity in the cerebral cortex and hippocampus of mice, when compared with the control group. 4-PSQ treatment significantly reversed the decrease of Na^+ , K^+ ATPase activity in the cerebral cortex (ANOVA: $F_{(2,18)} = 16.63$, $P < 0.0001$) (Figure 5A) and hippocampus (ANOVA: $F_{(2,18)} = 24.54$, $P < 0.0001$) (Figure 5B) when compared with the PTZ group.

Results in Figure 6 demonstrated that PTZ increased the RS levels in the cerebral cortex (Figure 6A) and hippocampus (Figure 6B) of mice, when compared with the

control group. 4-PSQ treatment significantly reversed the increase of RS levels in the cerebral cortex (ANOVA: $F_{(2,18)} = 20.15$, $P < 0.0001$) (Figure 6A) and hippocampus (ANOVA: $F_{(2,18)} = 10.17$, $P < 0.01$) (Figure 6B) of mice exposed to PTZ.

3.4. 4-PSQ exerts anxiolytic action on PTZ-induced anxiety-related behavior by reducing corticosterone levels

Figure 7 illustrates the effects of treatments on corticosterone levels in mice plasma. Results revealed that PTZ exposure increased plasma corticosterone levels when compared with the control group. However, treatment with 4-PSQ was able to significantly attenuate (ANOVA: ($F_{(2,18)} = 15.02$, $P = 0.0001$) this increase caused by PTZ (Figure 7).

3.5. Modulation of CREB, BDNF and NF- κ B levels contributes to the anxiolytic effect of 4-PSQ

Figures 8 and 9 illustrate the effects of treatment with 4-PSQ on CREB, BDNF and NF- κ B mRNA expression levels in the cerebral cortex and hippocampus of mice exposed to PTZ, respectively. PTZ decreased the mRNA expression levels of CREB in cerebral cortex (Figure 8A) and hippocampus (Figure 9A) when compared with the control group. 4-PSQ treatment reversed the decrease of CREB expression in the hippocampus (Figure 9A) (ANOVA: $F_{(2,18)} = 8.384$, $P < 0.01$) and cerebral cortex (Figure 8A) (ANOVA: $F_{(2,18)} = 78.07$, $P < 0.0001$), but in the cerebral cortex this reduction did not reach control levels.

The data demonstrated that administration of PTZ decreased BDNF expression in the cerebral cortex (Figure 8B) and hippocampus (Figure 9B) of the mice when compared with the control group. 4-PSQ treatment significantly reversed the decrease of mRNA expression levels of BDNF in the cerebral cortex (Figure 8B) (ANOVA: $F_{(2,18)} = 18.55$,

$P < 0.0001$) and hippocampus (Figure 9B) (ANOVA: $F_{(2,18)} = 44.11$, $P < 0.0001$) caused by PTZ.

PTZ decreased the mRNA expression levels of NF- κ B in cerebral cortex (Figure 8C), while in the hippocampus (Figure 9A) an increase of the NF- κ B expression was observed when compared with the control group. 4-PSQ treatment reversed this increase in the hippocampus (Figure 9C) (ANOVA: $F_{(2,18)} = 53.40$, $P < 0.0001$), but there was no change in the cerebral cortex (Figure 8C) (ANOVA: $F_{(2,18)} = 37.48$, $P < 0.0001$) of mice.

4. Discussion

In the present study, we extended previous data in the literature [15] by demonstrating that the anxiolytic effect of the 4-PSQ may be associated, at least in part, with its ability to modulate the serotonergic and GABAergic systems. We also revealed that a single 4-PSQ treatment was able to reduce oxidative damage and hyperactivity of the hypothalamic pituitary adrenal (HPA) axis, as well as normalize the mRNA expression levels of molecules involved in the processes of neurogenesis and restore the ionic gradient in anxious animals exposed to PTZ.

In agreement with the results obtained in the EPM test, pindolol, WAY100635 and ketanserin exhibited an inhibitory effect on the activity of 4-PSQ, suggesting that the modulation of 5-HT_{1A/1B}, 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A/2C} receptors could contribute to the anxiolytic effect demonstrated by the compound. These findings support the therapeutic utility of 4-PSQ for anxiety, since it has been suggested that 5-HT receptor blockade or stimulation may have anxiolytic effects [30]. As an example, selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) have demonstrated efficacy for long-term treatment of anxiety [31]. This supports the idea that changes in the serotonergic system have been related in a range of behaviors and behavioral disorders, including anxiety.

Studies on anxiety disorder have focused predominantly on the GABAergic system. GABA is an important inhibitory neurotransmitter of the central nervous system (CNS) and it is known to modulate anxiety-related behavior [32]. Attenuation of the GABAergic system results in excitement, anxiety, restlessness, insomnia, and even convulsions. Thus, dysfunctions in the GABAergic system have been associated with disorders of anxiety, epilepsy and schizophrenia [33]. Therefore, in our following experiments, we investigated the role of the GABAergic system in the anxiolytic effect caused by 4-PSQ. PTZ (a GABA_A receptor antagonist) has been widely used in animal models of anxiety because of its potential anxiogenic effect [23]. Different studies have used this model to induce anxiety-related behaviors in animals [24,34]. These findings emphasize the anxiogenic nature of PTZ and indicate a GABA_A related mechanism. Indeed, our results indicated that 24 h after treatment, PTZ induced the typical feature of anxiety-related behaviors in mice, so that they spend less time in the open arms and have less entries into the open arms. Consistent with our previous results that indicate the multi-target action of 4-PSQ, it is worth mentioning that this compound reversed the anxiety induced by PTZ, suggesting that it seems to exert its effect by directly or indirectly modulating the GABAergic system.

Given the fact that stress has been suggested as one of the causal factors that trigger different mental disorders [35], we also measured corticosterone stress hormone levels in rodents to investigate the response of HPA to 4-PSQ treatment. Indeed, it is suggested that deregulation of the HPA axis contributes directly to the development of stress-related disorders, such as anxiety and depression [36]. The HPA axis is activated in response to stressful situations by promoting the release of cortisol hormone into the bloodstream that produces adaptive physiological responses to the presence of stressors [37]. However, excess cortisol in the bloodstream compromises negative feedback since

the glucocorticoid receptor (GR) will develop resistance to glucocorticoids contributing to the development of pathological anxiety [38]. Here, we demonstrated that animals receiving treatment with PTZ had increased plasmatic corticosterone levels. In accordance with our results, Bartanusz et al. [39] demonstrated that blocking GABAergic neurotransmission increased corticotropin release, suggesting the involvement of GABA neuronal function in regulating HPA activity. On the other hand, our data also showed that single-dose 4-PSQ treatment produced anxiolytic activity in the EPM test, as well as attenuated plasma corticosterone levels. These results indicate that decreased anxiety-related behavior following 4-PSQ treatment may be related to attenuation of plasma corticosterone levels and/or to GABAergic system modulation. In addition, it should be noted that activation of HPA progressively generates an inflammatory [40] environment and based on that we can also suggest that 4-PSQ may be exerting its anxiolytic effect from its promising set of anti-inflammatory and antioxidant effects [13,14].

In this sense, another important finding of the present study is that animals exposed to PTZ increased RS levels in the cerebral cortex and hippocampus of mice and 4-PSQ treatment, in a single dose, was able to reverse it. Vogt et al. [16] had already demonstrated the potential antioxidant effect of 4-PSQ, which was attributed to the presence of the organoselenium group in the molecule. Indeed, oxidative damage appears to be associated with psychiatric and neurological disorders [41,42]. Genetic or pharmacological changes in the redox balance seem to produce behavioral changes related to anxiety disorders [43,44]. In this sense, treatment with antioxidant molecules appears to improve many of these anxiety effects.

In line with results of the present study, to better understand the mechanisms involved in the action of 4-PSQ, we evaluated Na^+ , K^+ ATPase activity, an enzyme that plays an important role in regulating neuronal excitability by maintaining and restoring

the electrochemical gradient of the CNS through the active transport of sodium and potassium ions across the plasma membrane [45]. Our study revealed that PTZ, the antagonist used to induce anxious behaviors, reduced the activity of this enzyme in the cerebral cortex and hippocampus of mice. This finding corroborates studies that showed that impairment in ionic homeostasis by reducing Na^+ , K^+ ATPase activity leads to neuronal dysfunction and may trigger psychiatric disorders such as anxiety [46]. In addition, it is known that the functionality of Na^+ , K^+ ATPase is compromised in the presence of RS, since the sulfhydryl groups that regulate this enzyme are sensitive to oxidizing agents [47]. Therefore, considering the sensitivity of Na^+ , K^+ ATPase to RS-induced damage, we believe that the reduction in the activity of this enzyme in our study may be related to the high level of RS found in the cerebral cortex and hippocampus of mice. For this reason, we can suggest that the activity of this enzyme appears to be impaired by the administration of PTZ through the formation of RS and thus contributes to neuronal hyperexcitability triggering anxiety. Conversely, a single administration of 4-PSQ reversed the decrease of Na^+ , K^+ ATPase activity caused by PTZ. Based on the above, we can suggest that the restoration of Na^+ , K^+ ATPase activity seems to be associated with the reversal of RS formation after administration of 4-PSQ confirming once again the antioxidant property of this compound. However, we can not discount that 4-PSQ exerts a direct modulation of Na^+ , K^+ ATPase.

Another biomolecule that has been shown to be involved in anxiety disorders is CREB, an important protein involved in brain development and neurogenesis, since it acts as a transcription factor regulating molecules involved in different neurological processes [48]. In this sense, we evaluated the mRNA expression levels of this transcription factor and we observed that the CREB levels were reduced in anxious mice exposed to PTZ. Our finding corroborates other studies that point to the fact that exposure

to stress is associated with reduced CREB expression in the hippocampus, and its reduced function and expression are associated with rodent anxiety-like behaviors [9,48,49]. On the other hand, other important data revealed in our study showed that treatment with 4-PSQ reversed the reduction in the mRNA expression levels of CREB in anxious animals. Thus, we can suggest that the modulation of this transcription factor appears to contribute to the anxiolytic effect of the 4-PSQ.

Given that CREB is an important transcription factor, we also highlight the BDNF that is regulated by CREB. BDNF is an important neurotrophin involved in neurodevelopmental and neurogenesis processes and mood disorders such as anxiety and depression [6,50]. Here, we demonstrated that mRNA expression levels of CREB and BDNF were decreased in anxious animals exposed to PTZ. The data obtained in the present study confirm the involvement of CREB in the regulation of BDNF, since in both the levels of mRNA are reduced. The imbalance of BDNF levels has been strongly associated with anxiety, the main source of this alteration being the stimuli caused by stress [6]. In this sense, the release of the hormone cortisol released into the bloodstream in the face of stressful stimuli seems to affect the role of BDNF [51]. In accordance with this, our results revealed that the PTZ increased plasma corticosterone levels and reduced BDNF mRNA expression in the cerebral cortex and hippocampus of mice. In this sense, we can suggest that decreased BDNF expression may be related to the elevated plasma corticosterone levels. Our results corroborate other studies that demonstrated that the administration of glucocorticoids negatively influenced the expression of BDNF in regions of the cerebral cortex and hippocampus [51,52]. In addition, Suri and Vaidya [53] suggested in their review study that the glucocorticoid system can regulate BDNF translation, trafficking and secretion and, consequently, compromise its signaling. It can thus be suggested that stimuli caused by stress are associated with changes in BDNF

levels. On the other hand, an important finding revealed in the present study was that a single dose of 4-PSQ was able to normalize BDNF levels in the cerebral cortex and hippocampus, suggesting that the effect of this organoselenium compound appears to be associated with its capacity to normalize corticosterone levels in PTZ-induced animals.

Several neurobiological changes have been associated with the pathophysiology of psychiatric disorders. Increasing evidence suggests that NF- κ B has significant implications in anxiety and depressive disorders. This transcription factor can be activated by different stimuli often associated with the presence of pathogens, stress and especially in the presence of RS [10,54]. It has been shown that NF- κ B is found activated in animals that exhibit anxiety-like behavior, correlating this activation mainly to the presence of oxidative stress [55]. Our results corroborate these findings, since we observed that mRNA expression levels of this transcription factor are increased in the hippocampus of the animals exposed to PTZ, namely, those that showed behavior similar to anxiety. As demonstrated in other studies [54,55], we suggest that this increase is due to the elevation of RS levels in this structure. In addition, an important finding was that treatment with 4-PSQ was able to reverse the increase of NF- κ B in the hippocampus. On the other hand, a decrease was observed in the expression of the NF- κ B in the cerebral cortex of the animals that received only the PTZ. As most studies reveal the activation of this transcription factor in anxiety disorders, we do not know for sure the reason for this decrease. However, a recent study published by Linggapan [56] revealed that RS can activate or repress NF- κ B signaling. The initial phase of oxidative stress is associated with the activation of the NF- κ B pathway, while the permanence of oxidative stress can lead to decreased activity. Thus, although there are a large number of studies indicating that NF- κ B is involved in the regulation of anxiety behavior, the mechanisms involved in modulating this disorder are not yet fully understood.

5. Conclusion

In summary, the biological changes investigated in our study have been attributed to the development of psychiatric disorders. Since increased RS and glucocorticoids contribute to the development of anxiety disorders as they activate, inhibit or modulate other molecules involved in the pathophysiology of anxiety, the search for a therapeutic alternative that can attenuate this biochemical imbalance may be a good alternative for the treatment of these disorders. In this sense, the 4-PSQ has demonstrated different pharmacological actions that are associated with its antioxidant property [13,16,18]. In addition, our study demonstrated that single-dose treatment with 4-PSQ was able to significantly regularize all evaluated parameters. Therefore, its promising antioxidant effect, as well as the possible modulation of serotonergic and GABAergic pathways and neurobiological changes involved in the pathophysiology of anxiety may make 4-PSQ a therapeutic alternative for anxiety treatment. We believe that there are other mechanisms implicated in 4-PSQ anxiolytic action, and this provides a motivation to continue investigating the potential of this compound. It is necessary to understand how this multi-target action leads to the anxiolytic effect.

Authors' contribution

J.J.P. and A.S.R. performed the experiments, the analysis of data and wrote the manuscript. R.L.O. and C.A.R.F. performed the experiments. J.J.P., A.S.R. and E.A.W. designed the project. W.B.D., E.N.D. and V.F.C. performed the genetic expression. R.K. and D.A. synthesized the compound 4-PSQ. C.L. and E.A.W. supervised the experiments. All authors critically reviewed the content and approved the final version for publication.

Acknowledgments

We are grateful to UFPel, CAPES (Financial code 001), CNPq (429859/2018-0), L'ORÉAL-UNESCO-ABC "Para Mulheres na Ciência", and FAPERGS (PqG 17/2551-0001013-2, PRONEM 16/2551-0000240-1) for financial support. CNPq is also acknowledged for the fellowship to C.L., V.F.C., D.A. and E.A.W.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- [1] P. Nuss, Anxiety disorders and GABA neurotransmission: A disturbance of modulation, *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 11 (2015) 165–175.
- [2] C. Belzung, G. Griebel, Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: A review, in: *Behav. Brain Res.*, 2001: pp. 141–149.
- [3] World Health Organization, Depression and Other Common Mental Disorders, WHO. (2017).
- [4] A. Mariotti, The effects of chronic stress on health: New insights into the molecular mechanisms of brain-body communication, *Futur. Sci. OA.* 1 (2015).
- [5] H.Y. Elnazer, D.S. Baldwin, Investigation of cortisol levels in patients with anxiety disorders: a structured review., *Curr. Top. Behav. Neurosci.* 18 (2014) 191–216.
- [6] R.S. Duman, L.M. Monteggia, A Neurotrophic Model for Stress-Related Mood Disorders, *Biol. Psychiatry.* 59 (2006) 1116–1127.
- [7] L.F. Reichardt, Neurotrophin-regulated signalling pathways, *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 361 (2006) 1545–1564.
- [8] G. Wand, The anxious amygdala: CREB signaling and predisposition to anxiety and alcoholism, *J. Clin. Invest.* 115 (2005) 2697–2699.
- [9] D.L. Wallace, M.H. Han, D.L. Graham, T.A. Green, V. Vialou, S.D. Íguez, J.L. Cao, A. Kirk, S. Chakravarty, A. Kumar, V. Krishnan, R.L. Neve, D.C. Cooper, C.A. Bolões, M. Barrot, C.A. McClung, E.J. Nestler, CREB regulation of nucleus accumbens excitability mediates social isolation-induced behavioral deficits, *Nat. Neurosci.* 12 (2009) 200–209.
- [10] A. Oeckinghaus, S. Ghosh, The NF-kappaB family of transcription factors and its

- regulation., Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 1 (2009) a000034.
- [11] H. Möhler, J.M. Fritschy, K. Vogt, F. Crestani, U. Rudolph, Pathophysiology and pharmacology of GABA(A) receptors., *Handb. Exp. Pharmacol.* (2005) 225–47.
 - [12] R.R. Lanzenberger, M. Mitterhauser, C. Spindelegger, W. Wadsak, N. Klein, L.K. Mien, A. Holik, T. Attarbaschi, N. Mossaheb, J. Sacher, T. Geiss-Granadia, K. Kletter, S. Kasper, J. Tauscher, Reduced Serotonin-1A Receptor Binding in Social Anxiety Disorder, *Biol. Psychiatry*. 61 (2007) 1081–1089.
 - [13] M. Pinz, A.S. Reis, V. Duarte, M.J. da Rocha, B.S. Goldani, D. Alves, L. Savegnago, C. Luchese, E.A. Wilhelm, 4-Phenylselenyl-7-chloroquinoline, a new quinoline derivative containing selenium, has potential antinociceptive and anti-inflammatory actions., *Eur. J. Pharmacol.* 780 (2016) 122–8.
 - [14] V.D.G. Silva, A.S. Reis, M.P. Pinz, C.A.R. da Fonseca, L.F.B. Duarte, J.A. Roehrs, D. Alves, C. Luchese, E.A. Wilhelm, Further analysis of acute antinociceptive and anti-inflammatory actions of 4-phenylselenyl-7-chloroquinoline in mice., *Fundam. Clin. Pharmacol.* 31 (2017) 513–525.
 - [15] A.S. Reis, M. Pinz, L.F.B. Duarte, J.A. Roehrs, D. Alves, C. Luchese, E.A. Wilhelm, 4-phenylselenyl-7-chloroquinoline, a novel multitarget compound with anxiolytic activity: Contribution of the glutamatergic system, *J. Psychiatr. Res.* 84 (2017) 191–199.
 - [16] A.G. Vogt, G.T. Voss, R.L. de Oliveira, J.J. Paltian, L.F.B. Duarte, D. Alves, C.R. Jesse, S.S. Roman, J.A. Roehrs, E.A. Wilhelm, C. Luchese, Organoselenium group is critical for antioxidant activity of 7-chloro-4-phenylselenyl-quinoline, *Chem. Biol. Interact.* 282 (2018) 7–12.
 - [17] G.T. Voss, R.L. Oliveira, J.F. de Souza, L.F.B. Duarte, A.R. Fajardo, D. Alves, C.

- Luchese, E.A. Wilhelm, Therapeutic and technological potential of 7-chloro-4-phenylselanyl quinoline for the treatment of atopic dermatitis-like skin lesions in mice., *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.* 84 (2018) 90–98.
- [18] M.P. Pinz, A.S. Dos Reis, A.G. Vogt, R. Krüger, D. Alves, C.R. Jesse, S.S. Roman, M.P. Soares, E.A. Wilhelm, C. Luchese, Current advances of pharmacological properties of 7-chloro-4-(phenylselanyl) quinoline: Prevention of cognitive deficit and anxiety in Alzheimer's disease model., *Biomed. Pharmacother.* 105 (2018) 1006–1014.
- [19] A. Barth, A.G. Vogt, A.S. dos Reis, M.P. Pinz, R. Krüger, W.B. Domingues, D. Alves, V.F. Campos, S. Pinton, N. Paroul, E.A. Wilhelm, C. Luchese, 7-Chloro-4-(Phenylselanyl) Quinoline with Memory Enhancer Action in Aging Rats: Modulation of Neuroplasticity, Acetylcholinesterase Activity, and Cholesterol Levels, *Mol. Neurobiol.* 56 (2019) 6398–6408.
- [20] L.F.B. Duarte, E.S. Barbosa, R.L. Oliveira, M.P. Pinz, B. Godoi, R.F. Schumacher, C. Luchese, E.A. Wilhelm, D. Alves, A simple method for the synthesis of 4-aryl-selanyl-7-chloroquinolines used as in vitro acetylcholinesterase inhibitors and in vivo memory improvement, *Tetrahedron Lett.* 58 (2017) 3319–3322.
- [21] R.N. Walsh, R.A. Cummins, The open-field test: A critical review, *Psychol. Bull.* 83 (1976) 482–504.
- [22] S. Pellow, P. Chopin, S.E. File, M. Briley, Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat, *J. Neurosci. Methods.* 14 (1985) 149–167.
- [23] M.E. Jung, H. Lal, M.B. Gatch, The discriminative stimulus effects of pentylenetetrazol as a model of anxiety: Recent developments, *Neurosci.*

- Biobehav. Rev. 26 (2002) 429–439.
- [24] M. Rostampour, E. Hadipour, S. Oryan, B. Soltani, F. Saadat, Anxiolytic-like effect of hydroalcoholic extract of ripe pistachio hulls in adult female Wistar rats and its possible mechanisms, *Res. Pharm. Sci.* 11 (2016) 454–460.
- [25] Y.J. Fiske, C. H. and Subbarow, The colorimetric determination of phosphorus., *J. Biol. Chem.* (1925) 375–400.
- [26] C. Loetchutinat, S. Kothan, S. Dechsupa, J. Meesungnoen, J.P. Jay-Gerin, S. Mankhetkorn, Spectrofluorometric determination of intracellular levels of reactive oxygen species in drug-sensitive and drug-resistant cancer cells using the 2',7'-dichlorofluorescein diacetate assay, *Radiat. Phys. Chem.* 72 (2005) 323–331.
- [27] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [28] N. Zenker, D.E. Bernstein, The estimation of small amounts of corticosterone in rat plasma., *J. Biol. Chem.* 231 (1958) 695–701.
- [29] K.J. Livak, T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method, *Methods.* 25 (2001) 402–408.
- [30] E. Żmudzka, K. Sałaciak, J. Sapa, K. Pytko, Serotonin receptors in depression and anxiety: Insights from animal studies., *Life Sci.* 210 (2018) 106–124.
- [31] B. Bandelow, S. Michaelis, D. Wedekind, Treatment of anxiety disorders, *Dialogues Clin. Neurosci.* 19 (2017) 93–106.
- [32] C.B. Nemeroff, The role of GABA in the pathophysiology and treatment of anxiety disorders., *Psychopharmacol. Bull.* 37 (2003) 133–146.

- [33] H. Möhler, Pathophysiological aspects of diversity in neuronal inhibition: a new benzodiazepine pharmacology., *Dialogues Clin. Neurosci.* 4 (2002) 261–9.
- [34] K. Sharma, M. Parle, Methanol extract of *Artocarpus heterophyllus* attenuates pentylenetetrazole induced anxiety like behaviours in mice., *J. Med. Plants Stud.* 5 (2017) 181–186.
- [35] H. Anisman, K. Matheson, Stress, depression, and anhedonia: Caveats concerning animal models, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 29 (2005) 525–546.
- [36] L. Jacobson, Hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis: Neuropsychiatric aspects, *Compr. Physiol.* 4 (2014) 715–738.
- [37] A. Escobar, B. Gómez González, Neuroanatomía del estrés, *Rer. Mex. Neurosci.* 3 (2002) 273-282.
- [38] M.T. Lowy, A.T. Reder, J.P. Antel, H.Y. Meltzer, Glucocorticoid resistance in depression: The dexamethasone suppression test and lymphocyte sensitivity to dexamethasone, *Am. J. Psychiatry.* 141 (1984) 1365–1370.
- [39] V. Bartanusz, D. Muller, R.C. Gaillard, P. Streit, L. Vutskits, J.Z. Kiss, Local γ -aminobutyric acid and glutamate circuit control of hypophyseotrophic corticotropin-releasing factor neuron activity in the paraventricular nucleus of the hypothalamus, *Eur. J. Neurosci.* 19 (2004) 777–782.
- [40] A. de Baumont, A. Bortoluzzi, B. Wollenhaupt de Aguiar, E. Scotton, L.S. Pinto Guimarães, F. Kapczinski, C.T. Belem da Silva, G.G. Manfro, Anxiety disorders in childhood are associated with youth IL-6 levels: A mediation study including metabolic stress and childhood traumatic events, *J. Psychiatr. Res.* 115 (2019) 43–50.
- [41] B. Halliwell, Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now?, *J.*

- Neurochem. 97 (2006) 1634–58.
- [42] J. Bouayed, H. Rammal, R. Soulimani, Oxidative stress and anxiety Relationship and cellular pathways, *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2 (2009) 63–67.
 - [43] A. Berry, A. Greco, M. Giorgio, P.G. Pelicci, R. de Kloet, E. Alleva, L. Minghetti, F. Cirulli, Deletion of the lifespan determinant p66(Shc) improves performance in a spatial memory task, decreases levels of oxidative stress markers in the hippocampus and increases levels of the neurotrophin BDNF in adult mice., *Exp. Gerontol.* 43 (2008) 200–8.
 - [44] A. Kumar, G. Kaur, P. Rinwa, Buspirone along with melatonin attenuates oxidative damage and anxiety-like behavior in a mouse model of immobilization stress., *Chin. J. Nat. Med.* 12 (2014) 582–9.
 - [45] J.C. Skou, M. Esmann, The Na,K-ATPase., *J. Bioenerg. Biomembr.* 24 (1992) 249–61.
 - [46] L. Crema, M. Schlabitz, B. Tagliari, A. Cunha, F. Simão, R. Krolow, L. Pettenuzzo, C. Salbego, D. Vendite, A.T.S. Wyse, C. Dalmaz, Na⁺, K⁺ ATPase activity is reduced in Amygdala of rats with chronic stress-induced anxiety-like behavior, *Neurochem. Res.* 35 (2010) 1787–1795.
 - [47] P. Morel, C. Tallineau, R. Pontcharraud, A. Piriou, F. Huguet, Effects of 4-hydroxynonenal, a lipid peroxidation product, on dopamine transport and Na⁺/K⁺ ATPase in rat striatal synaptosomes., *Neurochem. Int.* 33 (1998) 531–40.
 - [48] W.A. Carlezon, R.S. Duman, E.J. Nestler, The many faces of CREB, *Trends Neurosci.* 28 (2005) 436–445.
 - [49] S.C. Pandey, H. Zhang, A. Roy, T. Xu, Deficits in amygdaloid cAMP-responsive element-binding protein signaling play a role in genetic predisposition to anxiety

- and alcoholism, *J. Clin. Invest.* 115 (2005) 2762–2773.
- [50] A. Yoshii, M. Constantine-Paton, Postsynaptic BDNF-TrkB signaling in synapse maturation, plasticity, and disease., *Dev. Neurobiol.* 70 (2010) 304–22.
- [51] M.A. Smith, S. Makino, R. Kvetnansky, R.M. Post, Stress and glucocorticoids affect the expression of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs in the hippocampus, *J. Neurosci.* 15 (1995) 1768–1777.
- [52] S.L. Gourley, A.T. Kedves, P. Olausson, J.R. Taylor, A history of corticosterone exposure regulates fear extinction and cortical NR2B, GluR2/3, and BDNF, *Neuropsychopharmacology.* 34 (2009) 707–716.
- [53] D. Suri, V.A. Vaidya, Glucocorticoid regulation of brain-derived neurotrophic factor: Relevance to hippocampal structural and functional plasticity, *Neuroscience.* 239 (2013) 196–213.
- [54] A. Siomek, NF- κ B signaling pathway and free radical impact, *Acta Biochim. Pol.* 59 (2012) 323–331.
- [55] B. Gargouri, H.S. Bhatia, M. Bouchard, B.L. Fiebich, H. Fetoui, Inflammatory and oxidative mechanisms potentiate bifenthrin-induced neurological alterations and anxiety-like behavior in adult rats, *Toxicol. Lett.* 294 (2018) 73–86.
- [56] K. Lingappan, NF- κ B in oxidative stress, *Curr. Opin. Toxicol.* 7 (2018) 81–86.
- [57] X. Li, L. Su, X. Zhang, C. Zhang, L. Wang, Y. Li, Y. Zhang, T. He, X. Zhu, L. Cui, Ulinastatin downregulates TLR4 and NF- κ B expression and protects mouse brains against ischemia/reperfusion injury., *Neurol. Res.* 39 (2017) 367–373.
- [58] M. Fukuchi, H. Izumi, H. Mori, M. Kiyama, S. Otsuka, S. Maki, Y. Maehata, A. Tabuchi, M. Tsuda, Visualizing changes in brain-derived neurotrophic factor

- (BDNF) expression using bioluminescence imaging in living mice., *Sci. Rep.* 7 (2017) 4949.
- [59] D.B. Shankar, J.C. Cheng, K. Kinjo, N. Federman, T.B. Moore, A. Gill, N.P. Rao, E.M. Landaw, K.M. Sakamoto, The role of CREB as a proto-oncogene in hematopoiesis and in acute myeloid leukemia., *Cancer Cell.* 7 (2005) 351–62.
- [60] G. Bruckert, D. Vivien, F. Docagne, B.D. Roussel, Normalization of Reverse Transcription Quantitative PCR Data During Ageing in Distinct Cerebral Structures., *Mol. Neurobiol.* 53 (2016) 1540–1550.

Tables

Table 1. Primers used for quantitative real-time polymerase chain reaction. Listed are the forward and reverse primer sequences used to amplify each target gene as well as the GAPDH endogenous control.

Primer Name	Sequence	Reference
NF- κ B Forward	5' AGAGAAGCACAGATACCACTAAG 3'	[57]
NF- κ B Reverse	5' CAGCCTCATAGAAGCCATCC 3'	
BDNF Forward	5' AAGGACGCGGACTTGTACAC 3'	[58]
BDNF Reverse	5' CGCTAATACTGTCACACACGC 3'	
CREB Forward	5' AAGCTGAAAGTCAACAAATGACAGTT 3'	[59]
CREB Reverse	5' TGGACTGTCTGCCCATTGG 3'	
GAPDH Forward	5' TGC GACTTCAACAGCAACTC 3'	[60]
GAPDH Reverse	5' ATGTAGGCAATGAGGTCCAC 3'	

Table 2. Effect of 4-PSQ and/or antagonist treatments on behavioral parameters in the open field test in mice.

Experimental groups	Number of crossing	Number of rearings
Control	57 ± 2	26 ± 2
4-PSQ (50 mg/kg)	61 ± 4	29 ± 1
Pindolol (1 mg/kg)	60 ± 4	26 ± 1
Pindolol + 4-PSQ	57 ± 5	27 ± 2
Control	68 ± 3	26 ± 2
4-PSQ (50 mg/kg)	66 ± 4	27 ± 1
WAY100635 (0.7 mg/kg)	76 ± 4	29 ± 2
WAY100635 + 4-PSQ	75 ± 3	24 ± 1
Control	56 ± 2	22 ± 1
4-PSQ (50 mg/kg)	61 ± 4	23 ± 2
Ketanserin (0.3 mg/kg)	50 ± 3	20 ± 2
Ketanserin + 4-PSQ	50 ± 5	16 ± 2
Control	68 ± 3	22 ± 2
PTZ (35 mg/kg)	76 ± 2	21 ± 2
PTZ + 4-PSQ	62 ± 7	16 ± 3

One-way ANOVA followed by Newman–Keuls' test. Data are reported as the mean ± standard error of the mean (SEM) of 7 animals in each group.

Legend of Figures

Fig. 1. Chemical structure of 7-chloro-4-(phenylselanyl) quinoline (4-PSQ).

Fig. 2. Effect of serotonergic antagonists (**A**) pindolol, (**B**) WAY100635 and (**C**) ketanserin on the anxiolytic action of 7-chloro-4-(phenylselanyl) quinoline (4-PSQ) on the percentage of time spend in the open arms in the elevated plus maze test. Each column represents mean $\pm$ standard error of the mean (SEM) of seven animals per group. (*) $P < 0.05$ when compared with the control. (#) $P < 0.05$ and (##) $P < 0.01$ when compared with the 4-PSQ group. (One-way ANOVA followed by the Newman-Keuls test).

Fig. 3. Effect of serotonergic antagonists (**A**) pindolol, (**B**) WAY100635 and (**C**) ketanserin on the anxiolytic action of 7-chloro-4-(phenylselanyl) quinoline (4-PSQ) on the percentage of entry into the open arms in the elevated plus maze test. Each column represents mean $\pm$ standard error of the mean (SEM) of seven animals per group. (**) $P < 0.01$ and (***) $P < 0.001$ when compared with the control. (##) $P < 0.01$ and (###) $P < 0.001$ when compared with the 4-PSQ group. (One-way ANOVA followed by the Newman-Keuls test).

Fig. 4. Effects of pentylenetetrazole (PTZ) and/or 7-chloro-4-(phenylselanyl) quinoline (4-PSQ) on behavioral parameters in the elevated plus maze test in mice. Data are represented as (**A**) percentage of time spend in the open arms and (**B**) percentage of entries in the open arms. Each column represents mean $\pm$ standard error of the mean (SEM) of seven animals per group. (*) $P < 0.05$, (**) $P < 0.01$ and (***) $P < 0.001$ when compared with the control group. (#####) $P < 0.0001$ when compared with the PTZ group (One-way ANOVA followed by the Newman-Keuls test).

Fig. 5. Effects of 7-chloro-4-(phenylselanyl) quinoline (4-PSQ) administration on Na^+ , K^+ ATPase activity in (**A**) cerebral cortex and (**B**) hippocampus of mice after

pentylentetrazole (PTZ) treatment. Each column represents mean $\pm$ standard error of the mean (SEM) of seven animals per group. (***) $P < 0.001$ and (****) $P < 0.0001$ when compared with the control group. (####) $P < 0.0001$ when compared with the PTZ group (One-way ANOVA followed by the Newman-Keuls test).

Fig. 6. Effects of 7-chloro-4-(phenylselanyl) quinoline (4-PSQ) on RS levels in (A) cerebral cortex and (B) hippocampus of mice after pentylentetrazole (PTZ) treatment. Each column represents the mean $\pm$ standard error of the mean (SEM) of seven animals per group. (***) $P < 0.001$ when compared with the control group. (##) $P < 0.01$ and (####) $P < 0.0001$ when compared with the PTZ group (One-way ANOVA followed by the Newman-Keuls test).

Fig. 7. Effects of 7-chloro-4-(phenylselanyl) quinoline (4-PSQ) on plasma corticosterone levels of mice after pentylentetrazole (PTZ) treatment. Each column represents the mean $\pm$ standard error of the mean (SEM) of seven animals per group. (***) $P < 0.001$ when compared with the control group. (##) $P < 0.01$ when compared with the PTZ group (One-way ANOVA followed by the Newman-Keuls test).

Fig. 8. Effects of pentylentetrazole (PTZ) and 7-chloro-4-(phenylselanyl) quinoline (4-PSQ) on the mRNA expression levels of the (A) cAMP response element binding (CREB), (B) brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and (C) nuclear factor kappa B (NF- κ B) in the cerebral cortex of mice. Each column represents mean $\pm$ standard error of the mean (SEM) of seven animals per group. (***) $P < 0.001$ and (****) $P < 0.0001$ when compared with the control group. (####) $P < 0.0001$ when compared with the PTZ group (One-way ANOVA followed by the Newman-Keuls test).

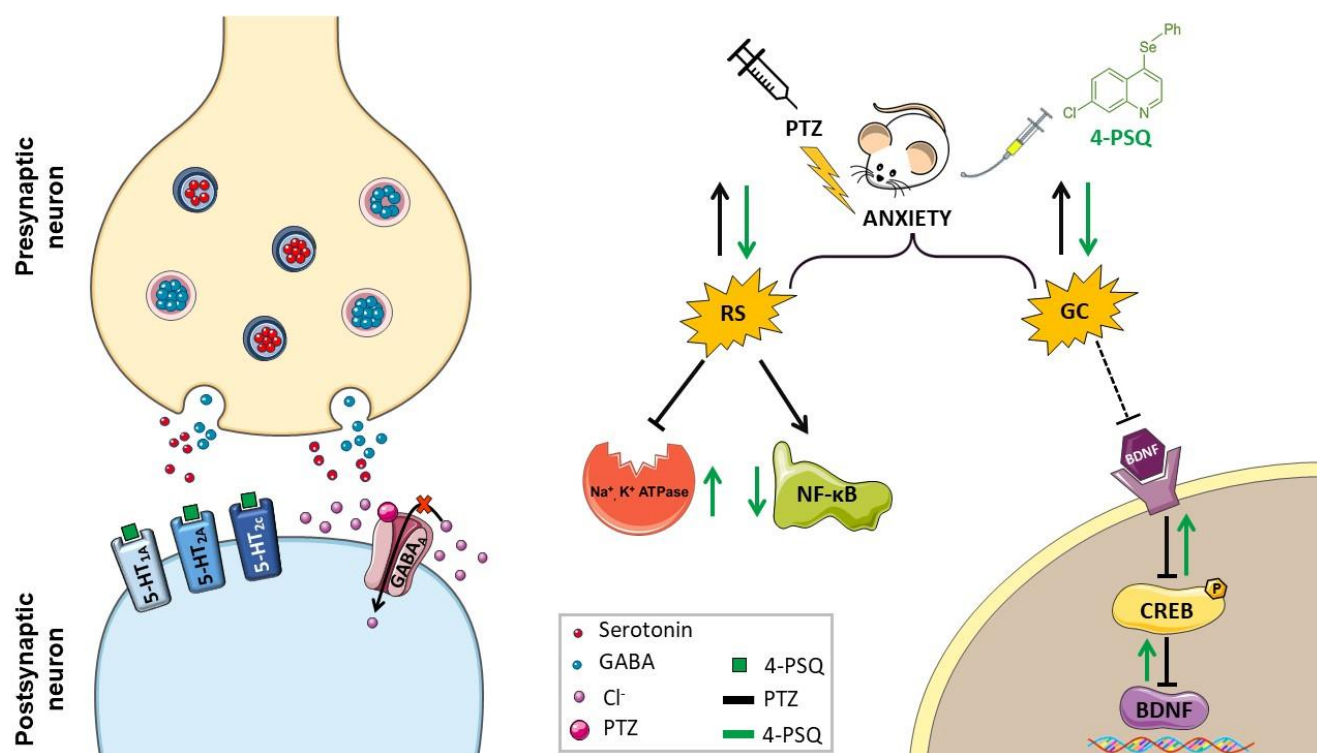
Fig. 9. Effects of pentylentetrazole (PTZ) and 7-chloro-4-(phenylselanyl) quinoline (4-PSQ) on the mRNA expression levels of the (A) cAMP response element binding

(CREB), **(B)** brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and **(C)** nuclear factor kappa B (NF- κ B) in the hippocampus of mice. Each column represents mean $\pm$ standard error of the mean (SEM) of seven animals per group. (**) $P < 0.01$, (***) $P < 0.001$ and (****) $P < 0.0001$ when compared with the control group. (##) $P < 0.01$ and (####) $P < 0.0001$ when compared with the PTZ group (One-way ANOVA followed by the Newman-Keuls test).

Highlights

- 4-PSQ abolished the anxiogenic effect of PTZ.
- 4-PSQ reduced RS and corticosterone levels.
- 4-PSQ normalized CREB, BDNF and NF- κ B expression altered by PTZ.
- 4-PSQ restored Na⁺, K⁺ ATPase activity inhibited by PTZ exposure.
- Serotonergic and GABAergic systems are involved in the 4-PSQ anxiolytic effect.

Graphical abstract



Figures

Fig. 1

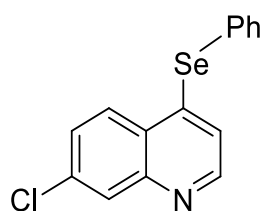


Fig. 2

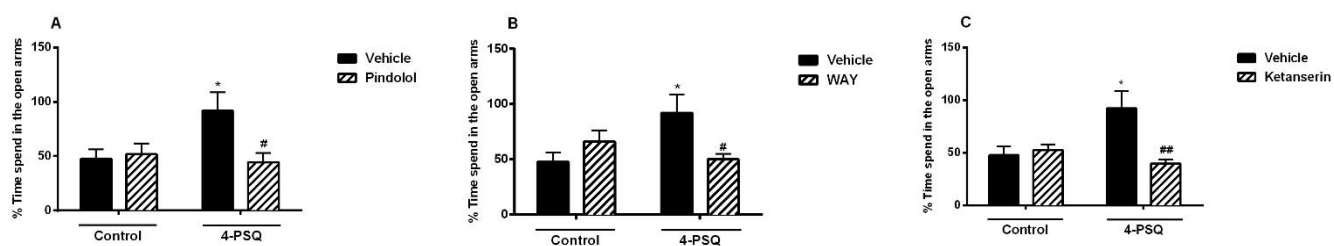


Fig. 3

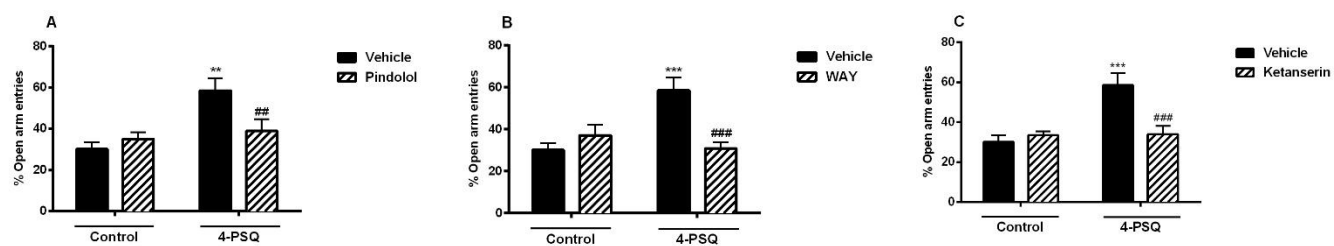


Fig. 4

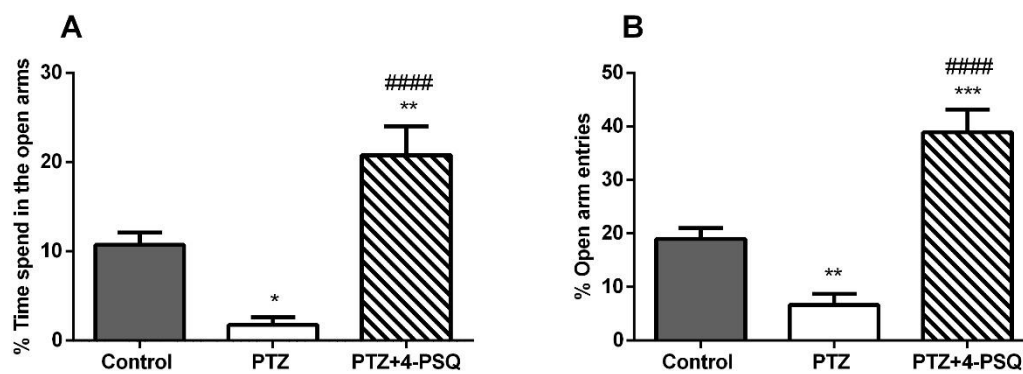


Fig. 5

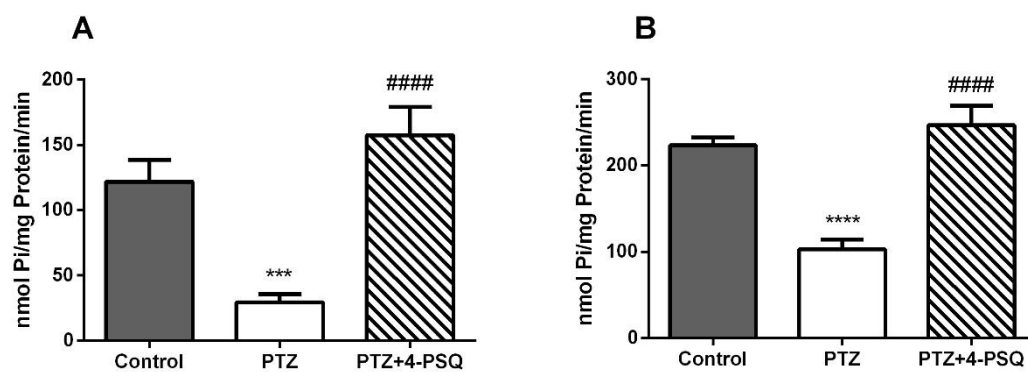


Fig. 6

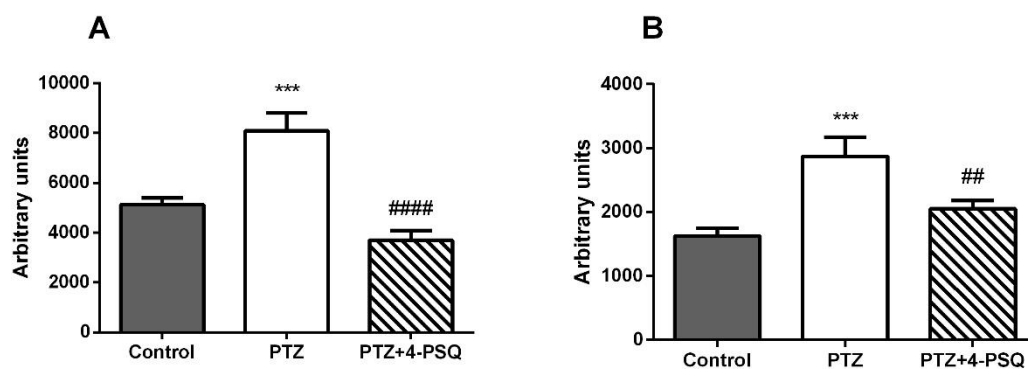


Fig. 7

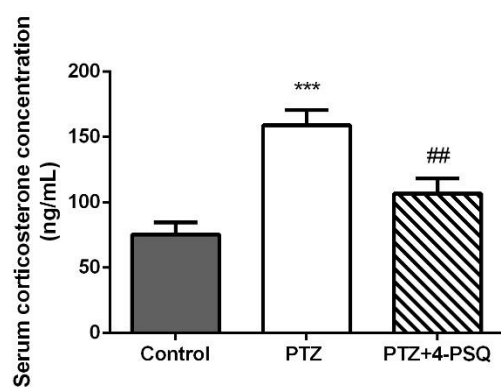
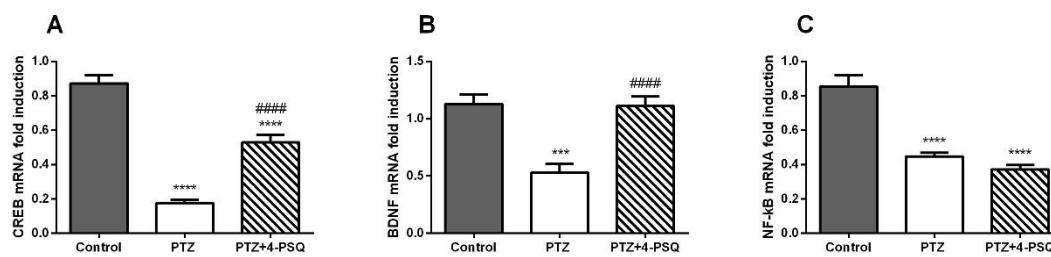
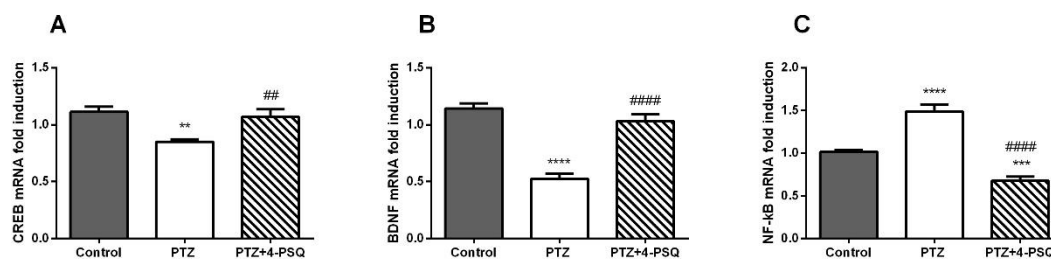


Fig. 8**Fig. 9**

5. Conclusões

Baseado nos resultados obtidos pode-se sugerir que:

- A modulação dos sistemas serotoninérgico e GABAérgico está envolvida na ação ansiolítica exercida pelo 4-PSQ.
- A hiperativação do eixo hipotalâmico da hipófise adrenal contribui para o efeito ansiogênico do PTZ e o tratamento com uma única dose de 4-PSQ foi capaz de reestabelecer este equilíbrio.
- A ação ansiolítica do 4-PSQ pode estar relacionada com a sua capacidade antioxidante, uma vez que este composto reduziu os níveis de ERs com consequente normalização da atividade da Na⁺, K⁺ ATPase.
- A modulação dos níveis de RNAm de importantes moléculas envolvidas nos processos de neurogênese, como CREB, BDNF e NF-κB, contribui para o efeito ansiolítico do 4-PSQ em camundongos expostos ao PTZ.

Frente a isto, os resultados inferiram que o 4-PSQ é um composto multialvo. Assim, acreditamos que existem outros mecanismos implicados na ação ansiolítica do 4-PSQ, e isso fornece uma motivação para continuarmos investigando o potencial desse composto e a inter-relação destas vias.

Perspectivas

Considerando os resultados obtidos e o interesse do nosso grupo de pesquisa na farmacologia do 4-PSQ, pretende-se ampliar o conhecimento a respeito deste composto, de forma a entender melhor como essa ação multialvo leva ao efeito ansiolítico. Com base nisso, pretendemos investigar seu efeito em modelos de estresse social uma vez que, os fármacos utilizados para o tratamento de transtornos relacionados ao estresse – como o bullying – na maioria dos casos não possuem eficácia. Também planejamos determinar as características físico-químicas, bem como o processo de biodistribuição desse composto. Adicionalmente, pretendemos investigar a possível toxicidade após exposição crônica ao 4-PSQ e se este derivado de quinolina induz dependência e/ou tolerância em animais.

REFERÊNCIAS

- AKIMOVA, E.; LANZENBERGER, R.; KASPER, S. The serotonin-1A receptor in anxiety disorders. **Biological psychiatry**, v. 66, n. 7, p. 627-635, 2009.
- AKK, G.; COVEY, D.F.; EVERS, A.S.; STEINBACH, J.H.; ZORUMSKI, C.F.; MENNERICK, S. Mechanisms of neurosteroid interactions with GABAA receptors. **Pharmacology & therapeutics**, v. 116, n. 1, p. 35-57, 2007.
- ALFONSO, J.; FRICK, L.R.; SILBERMAN, D.M.; PALUMBO, M.L.; GENARO, A.M.; FRASCH, A.C. Regulation of hippocampal gene expression is conserved in two species subjected to different stressors and antidepressant treatments. **Biological psychiatry**, v. 59, n. 3, p. 244-251, 2006.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition: DSM-V. Arlington, VA: **American Psychiatric Association**; 2013.
- ANDRADE, L.H.S.G.; GORENSTEIN, C. Aspectos gerais das escalas de avaliação de ansiedade. **Revista de Psiquiatria clínica**, v. 25, n. 6, p. 285-290, 1998.
- APERIA, A.; AKKURATOV, E.E.; FONTANA, J.M.; BRISMAR, H. Na⁺,K⁺-ATPase, a new class of plasma membrane receptors. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v.310, p.491–495, 2016.
- ARANGO, V.; UNDERWOOD, M.D.; BOLDRINI, M.; TAMIR, H.; KASSIR, S.A.; HSIUNG, S.C.; CHEN, J.J.; MANN, J.J. Serotonin 1A receptors, serotonin transporter binding and serotonin transporter mRNA expression in the brainstem of depressed suicide victims. **Neuropsychopharmacology**, v. 25, n. 6, p. 892-903, 2001.
- BALDWIN, D.S.; AJEL, K.I.; GARNER, M. Pharmacological treatment of generalized anxiety disorder. In: **Behavioral Neurobiology of Anxiety and Its Treatment**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2009. p. 453-467.
- BARBALHO, C.A.; NUNES-DE-SOUZA, R.L.; CANTO-DE-SOUZA, A. Similar anxiolytic-like effects following intra-amygdala infusions of benzodiazepine receptor agonist and antagonist: evidence for the release of an endogenous benzodiazepine inverse agonist in mice exposed to elevated plus-maze test. **Brain research**, v. 1267, p. 65-76, 2009.
- BARNES, N.M.; SHARP, T. A review of central 5-HT receptors and their function. **Neuropharmacology**, v. 38, n. 8, p. 1083-1152, 1999.
- BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.
- BARROT, M.; WALLACE, D.L.; BOLAÑOS, C.A.; GRAHAM, D.L.; PERROTTI, L.I.; NEVE, R.L.; CHAMBLISS, H.; YIN, J.C.; NESTLER, E.J. Regulation of

anxiety and initiation of sexual behavior by CREB in the nucleus accumbens. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 23, p. 8357-8362, 2005.

BARTH, A.; VOGT, A.G.; DOS REIS, A.S.; PINZ, M.P.; KRÜGER, R.; DOMINGUES, W.B.; ALVES, D.; CAMPOS, V.F.; PINTON, S.; PAROUL, N.; WILHELM, E.A.; LUCHESE, C. 7-Chloro-4-(Phenylselenanyl) Quinoline with Memory Enhancer Action in Aging Rats: Modulation of Neuroplasticity, Acetylcholinesterase Activity, and Cholesterol Levels. **Molecular neurobiology**, v. 56, n. 9, p. 6398-6408, 2019.

BELZUNG, Catherine; GRIEBEL, Guy. Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: a review. **Behavioural brain research**, v. 125, n. 1-2, p. 141-149, 2001.

BETTLER, Bernhard; TIAO, Jim Yu-Hsiang. Molecular diversity, trafficking and subcellular localization of GABAB receptors. **Pharmacology & therapeutics**, v. 110, n. 3, p. 533-543, 2006.

BLANCHARD, D.C.; GRIEBEL, G.; NUTT, D.J. **Handbook of anxiety and fear**. Elsevier, 2011.

BLANCO, M.L.; NETO, A.C. O fator nuclear Kappa B: uma nova perspectiva para o estudo de drogas antiinflamatórias. **Revista de Ciências Médicas**, v. 12, n. 4, 2003.

BORMANN, Joachim. The 'ABC' of GABA receptors. **Trends in pharmacological sciences**, v. 21, n. 1, p. 16-19, 2000.

BORTOLATTO, C.F.; CHAGAS, P.M.; WILHELM, E.A.; ZENI, G; NOGUEIRA, C. W. 2, 2'-dithienyl diselenide, an organoselenium compound, elicits antioxidant action and inhibits monoamine oxidase activity in vitro. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicine Chemistry**. v. 28, p. 677-684, 2013.

BOUAYED, J.; RAMMAL, H.; SOULIMANI, R. Oxidative stress and anxiety: relationship and cellular pathways. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. v. 2, n. 2, p. 63-67, 2009.

BRÜNING, C.A.; PRIGOL, M.; ROEHRS, J.A.; NOGUEIRA, C.W.; ZENI, G. Involvement of the serotonergic system in the anxiolytic-like effect caused by m-trifluoromethyl-diphenyl diselenide in mice. **Behavioural brain research**, v. 205, n. 2, p. 511-517, 2009.

BRÜNING, C.A.; PRIGOL, M.; LUCHESE, C; JESSE, C.R.; DUARTE, M.M.; ROMAN, S.S.; NOGUEIRA, C.W. Protective effect of diphenyl diselenide on ischemia and reperfusion-induced cerebral injury: involvement of oxidative stress and pro-inflammatory cytokines. **Neurochemical Research**. V. 37, p. 2249-2258, 2012.

CAMPBELL, B.M.; MERCHANT, K.M. Serotonin 2C receptors within the basolateral amygdala induce acute fear-like responses in an open-field environment. **Brain research**, v. 993, n. 1-2, p. 1-9, 2003.

CARLEZON J.R.; WILLIAM A.; DUMAN, R.S.; NESTLER, E.J. The many faces of CREB. **Trends in neurosciences**, v. 28, n. 8, p. 436-445, 2005.

CASTRÉN, E.; VÖIKAR, V.; RANTAMÄKI, T. Role of neurotrophic factors in depression. **Current opinion in pharmacology**, v. 7, n. 1, p. 18-21, 2007.

CHARMANDARI, E.; TSIGOS, C.; CHROUSOS, G. Endocrinology of the stress response. **Annual Review of Physiology**, v. 67, p. 259-284, 2005.

CHARNEY, D.S.; MANJI, H.K. Life stress, genes, and depression: multiple pathways lead to increased risk and new opportunities for intervention. **Science Signaling**, v. 2004, n. 225, p. re5-re5, 2004.

CHECKLEY, Stuart. The neuroendocrinology of depression and chronic stress. **British medical bulletin**, v. 52, n. 3, p. 597-617, 1996.

CHEN, A.; HOUGH, C.J.; LI, H. Serotonin type II receptor activation facilitates synaptic plasticity via N-methyl-D-aspartate-mediated mechanism in the rat basolateral amygdala. **Neuroscience**, v. 119, n. 1, p. 53-63, 2003.

CHEN, Z.; JING, D.; BATH, K.G.; IERACI, A.; KHAN, T.; SIAO, C.J.; HERRERA, D.G.; TOTH, M.; YANG, C.; MCEWEN, B.S.; HEMPSTEAD, B.L.; LEE, F. Genetic variant BDNF (Val66Met) polymorphism alters anxiety-related behavior. **Science**, v. 314, n. 5796, p. 140-143, 2006.

CHERUBINI, E.; GAIARSA, J.L.; BEN-ARI, Y. GABA: an excitatory transmitter in early postnatal life. **Trends in neurosciences**, v. 14, n. 12, p. 515-519, 1991.

CHESSICK, C.A.; ALLEN, M.H.; THASE, M.E.; da CUNHA, A.A.B.M.; KAPCZINSKI, F.; de LIMA, M.S.; dos SANTOS, J.J.S. Azapirones for generalized anxiety disorder. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 3, 2006.

CORNELIUS, F.; HABECK, M.; KANAI, R.; TOYOSHIMA, C.; KARLISH, S.J.; General and specific lipid-protein interactions in Na,K-TPase. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v.1848, p.1729–1743, 2015.

CREMA, L.; SCHLABITZ, M.; TAGLIARI, B.; CUNHA, A.; SIMÃO, F.; KROLOW, R.; PETTENUZZO, L.; SALBEGO, C.; VENDITE, D.; WYSE, A.T.S.; DALMAZ, C. Na⁺, K⁺ ATPase activity is reduced in amygdala of rats with chronic stress-induced anxiety-like behavior. **Neurochemical research**, v. 35, n. 11, p. 1787-1795, 2010.

CUNHA, C.; BRAMBILLA, R.; THOMAS, K.L. A simple role for BDNF in learning and memory?. **Frontiers in molecular neuroscience**, v. 3, p. 1, 2010.

DE KLOET, E.R.; JOËLS, M.; HOLSBOER, F. Stress and the brain: from adaptation to disease. **Nature reviews neuroscience**, v. 6, n. 6, p. 463-475, 2005.

DEL-BEN, C.M.; FERREIRA, C.A.; SANCHEZ, T.A.; ALVES-NETO, W.C.; GUAPO, V.G.; DE ARAUJO, D.B.; GRAEFF, F.G. Effects of diazepam on BOLD activation during the processing of aversive faces. **Journal of Psychopharmacology**, v. 26, n. 4, p. 443-451, 2012.

DU, X.; PANG, T.Y. Is dysregulation of the HPA-axis a core pathophysiology mediating co-morbid depression in neurodegenerative diseases?. **Frontiers in psychiatry**, v. 6, p. 32, 2015.

DUMAN, R.S.; MONTEGGIA, L.M. A neurotrophic model for stress-related mood disorders. **Biological psychiatry**, v. 59, n. 12, p. 1116-1127, 2006.

EGAN, M.F.; KOJIMA, M.; CALLICOTT, J.H.; GOLDBERG, T.E.; KOLACHANA, B.S.; BERTOLINO, A.; ZAITSEV, E.; GOLD, B.; GOLDMAN, D.; DEAN, M.; LU, B.; WEINBERGER, D.R. The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. **Cell**, v. 112, n. 2, p. 257-269, 2003.

EKRAMZADEH, M.; MAZLOOM, Z.; SAGHEB, M. Association of depression with selenium deficiency and nutritional markers in the patients with end-stage renal disease on hemodialysis. **Journal of Renal Nutrition**, v. 25, n. 4, p. 381-387, 2015.

ELKS, C.M.; MARIAPPAN, N.; HAQUE, M.; GUGGILAM, A.; MAJID, D.S.; FRANCIS, J. Chronic NF- κ B blockade reduces cytosolic and mitochondrial oxidative stress and attenuates renal injury and hypertension in SHR. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 296, n. 2, p. F298-F305, 2009.

ERECIŃSKA, M.; SILVER, I.A. Ions and energy in mammalian brain. **Progress in Neurobiology**, v.43, p.37-71, 1994.

ETKIN, A. Functional neuroanatomy of anxiety: a neural circuit perspective. In: **Behavioral neurobiology of anxiety and its treatment**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2009. p. 251-277.

FEDOCE, A.G.; FERREIRA, F.; BOTA, R.G.; BONET-COSTA, V.; SUN, P.Y.; DAVIES, K.J. The role of oxidative stress in anxiety disorder: cause or consequence?. **Free radical research**, v. 52, n. 7, p. 737-750, 2018.

FRANCO, D.G. Fator de transcrição Nuclear Kappa B no sistema nervoso central: do fisiológico ao patológico. **Revista da Biologia**, v. 4, p. 35-39, 2010.

FUCHS, E.; FLÜGGE, G. Experimental animal models for the simulation of depression and anxiety. **Dialogues in clinical neuroscience**, v. 8, n. 3, p. 323, 2006.

GAI, B.M.; BORTOLATTO, C.F.; BRÜNING, C.A.; ZBOROWSKI, V.A.; STEIN, A.L.; ZENI, G.; NOGUEIRA, C.W. Depression-related behavior and mechanical allodynia are blocked by 3-(4-fluorophenylselenyl)-2, 5-diphenylselenophene in a mouse model of neuropathic pain induced by partial sciatic nerve ligation. **Neuropharmacology**, v. 79, p. 580-589, 2014.

GAMARO, G.D.; STRECK, E.L.; MATTÉ, C.; PREDIGER, M.E.; WYSE, A.T.; DALMAZ, C. Reduction of hippocampal Na⁺, K⁺-ATPase activity in rats subjected to an experimental model of depression. **Neurochemical research**, v. 28, n. 9, p. 1339-1344, 2003.

GARCIA-GARCIA, A.L.; NEWMAN-TANCREDI, A.; LEONARDO, E.D. 5-HT_{1A} receptors in mood and anxiety: recent insights into autoreceptor versus heteroreceptor function. **Psychopharmacology**, v. 231, n. 4, p. 623-636, 2014.

GAZZANIGA, M.; HEATHERTON, T.; HALPERN, D. **Ciência psicológica**. Artmed Editora, 2005.

GELLER, I.; SEIFTER, J. The effects of meprobamate, barbiturates, d-amphetamine and promazine on experimentally induced conflict in the rat. **Psychopharmacologia**, v. 1, n. 6, p. 482-492, 1960.

GHISLENI, G.; KAZLAUCKAS, V.; BOTH, F.L.; PAGNUSSAT, N.; MIORANZZA, S.; ROCHA, J.B.T.; SOUZA, D.O.; PORCIÚNCULA, L.O. Diphenyl diselenide exerts anxiolytic-like effect in Wistar rats: putative roles of GABAA and 5HT receptors. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 32, n. 6, p. 1508-1515, 2008.

GOLDBERG, H.L.; FINNERTY, R.J. The comparative efficacy of buspirone and diazepam in the treatment of anxiety. **The American journal of psychiatry**, 1979.

GONZÁLEZ, B.G.; ESCOBAR, A. Neuroanatomía del estrés. **Revista Mexicana de Neurociencia**, v. 3, n. 5, p. 273-282, 2002.

GONZALEZ, G.A.; MONTMINY, M.R. Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. **Cell**, v. 59, n. 4, p. 675-680, 1989.

GRATACÒS, M.; GONZÁLEZ, J.R.; MERCADER, J.M.; DE CID, R.; URRETAVIZCAYA, M.; ESTIVILL, X. Brain-derived neurotrophic factor Val66Met and psychiatric disorders: meta-analysis of case-control studies confirm association to substance-related disorders, eating disorders, and schizophrenia. **Biological psychiatry**, v. 61, n. 7, p. 911-922, 2007.

GRIEBEL, G. 5-Hydroxytryptamine-interacting drugs in animal models of anxiety disorders: more than 30 years of research. **Pharmacology & therapeutics**, v. 65, n. 3, p. 319-395, 1995.

HACKLER, E.A.; AIREY, D.C.; SHANNON, C.C.; SODHI, M.S.; SANDERS-BUSH, E. 5-HT_{2C} receptor RNA editing in the amygdala of C57BL/6J, DBA/2J, and BALB/cJ mice. **Neuroscience research**, v. 55, n. 1, p. 96-104, 2006.

HALLETT, V.; RONALD, A.; RIJSDIJK, F.; ELEY, T.C. Phenotypic and genetic differentiation of anxiety-related behaviors in middle childhood. **Depression and Anxiety**, v. 26, n. 4, p. 316-324, 2009.

HALLIWELL, B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now?. **Journal of neurochemistry**, v. 97, n. 6, p. 1634-1658, 2006.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford University Press, USA, 2015.

HAMMEN, C. Stress and depression. **Annual Review of Clinical Psychology**, v. 1, p. 293-319, 2005.

HARIRI, A.R.; HOLMES, A. Genetics of emotional regulation: the role of the serotonin transporter in neural function. **Trends in cognitive sciences**, v. 10, n. 4, p. 182-191, 2006.

HEIM, C.; NEMEROFF, C.B. The role of childhood trauma in the neurobiology of mood and anxiety disorders: preclinical and clinical studies. **Biological psychiatry**, v. 49, n. 12, p. 1023-1039, 2001.

HELDT, S.A.; MOU, L.; RESSLER, K.J. In vivo knockdown of GAD67 in the amygdala disrupts fear extinction and the anxiolytic-like effect of diazepam in mice. **Translational psychiatry**, v. 2, n. 11, p. e181-e181, 2012.

HOFFMANN, F.W.; HASHIMOTO, A.S.; LEE, B.C.; ROSE, A.H.; SHOHET, R.V.; HOFFMANN, P.R. Specific antioxidant selenoproteins are induced in the heart during hypertrophy. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 512, n. 1, p. 38-44, 2011.

HOFFMANN, P.R.; BERRY, M.J. The influence of selenium on immune responses. **Molecular nutrition & food research**, v. 52, n. 11, p. 1273-1280, 2008.

HOLMES, A. Genetic variation in cortico-amygdala serotonin function and risk for stress-related disease. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 32, n. 7, p. 1293-1314, 2008.

HOMBERG, JR.; SCHUBERT, D.; GASPAR, P. New perspectives on the neurodevelopmental effects of SSRIs. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.31, p.60-65, 2010.

HOVATTA, I.; JUHILA, J.; DONNER, J. Oxidative stress in anxiety and comorbid disorders. **Neuroscience research**, v. 68, n. 4, p. 261-275, 2010.

JACOBSON, L. Hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis: Neuropsychiatric aspects. **Comprehensive Physiology**, v. 4, n. 2, p. 715-738, 2011.

JACOBSON, L.H.; CRYAN, J.F. Genetic approaches to modeling anxiety in animals. In: **Behavioral neurobiology of anxiety and its treatment**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2009. p. 161-201.

JIANG, X.; XING, G.; YANG, C.; VERMA, A.; ZHANG, L.; LI, H. Stress impairs 5-HT 2A receptor-mediated serotonergic facilitation of GABA release in juvenile rat basolateral amygdala. **Neuropsychopharmacology**, v. 34, n. 2, p. 410-423, 2009.

JOCA, S.R.L.; PADOVAN, C.M.; GUIMARÃES, F.S. Estresse, depressão e hipocampo. **Brazilian Journal of Psychiatry**, v. 25, p. 46-51, 2003.

JOHNSON, E.O.; KAMILARIS, T.C.; CHROUSOS, G.P.; GOLD, P.W. Mechanisms of stress: a dynamic overview of hormonal and behavioral

homeostasis. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 16, n. 2, p. 115-130, 1992.

JUNG, M.E.; LAL, H.; GATCH, M.B. The discriminative stimulus effects of pentylentetrazol as a model of anxiety: recent developments. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 26, n. 4, p. 429-439, 2002.

JURUENA, M.F.; CLEARE, A.J.; PARIANTE, C.M. O eixo hipotálamo-pituitária-adrenal, a função dos receptores de glicocorticóides e sua importância na depressão. **Brazilian Journal of Psychiatry**, v. 26, n. 3, p. 189-201, 2004.

KALUEFF, A.; NUTT, D.J. Role of GABA in memory and anxiety. **Depression and Anxiety**, v. 4, n. 3, p. 100-110, 1996.

KANDEL, E.; SCHWARTZ, J.; JESSELL, T.; SIEGELBAUM, S.; HUDSPETH, 9A.J. **Princípios de neurociências**, 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. p. 1496.

KANNER, B.I. Structure and function of sodium-coupled GABA and glutamate transporters. **The Journal of membrane biology**, v. 213, n. 2, p. 89-100, 2006.

KASSED, C.A.; HERKENHAM, M. NF- κ B p50-deficient mice show reduced anxiety-like behaviors in tests of exploratory drive and anxiety. **Behavioural brain research**, v. 154, n. 2, p. 577-584, 2004.

KENT, J.M.; COPLAN, J.D.; GORMAN, J.M. Clinical utility of the selective serotonin reuptake inhibitors in the spectrum of anxiety. **Biological psychiatry**, v. 44, n. 9, p. 812-824, 1998.

KOEN, N.; STEIN, D.J. Pharmacotherapy of anxiety disorders: a critical review. **Dialogues in clinical neuroscience**, v. 13, n. 4, p. 423, 2011.

KORPI, E.R.; GRÜNDER, G.; LÜDDENS, H. Drug interactions at GABAA receptors. **Progress in neurobiology**, v. 67, n. 2, p. 113-159, 2002.

KRALIC, J.E.; O'BUCKLEY, T.K.; KHISTI, R.T.; HODGE, C.W.; HOMANICS, G.E.; MORROW, A.L. GABAA receptor alpha-1 subunit deletion alters receptor subtype assembly, pharmacological and behavioral responses to benzodiazepines and zolpidem. **Neuropharmacology**, v. 43, n. 4, p. 685-694, 2002.

KULOGLU, M.; ATMACA, M.; TEZCAN, E.; GECICI, Ö.; TUNCKOL, H.; USTUNDAG, B. Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde levels in patients with obsessive-compulsive disorder. **Neuropsychobiology**, v. 46, n. 1, p. 27-32, 2002.

KURIYAMA, K.; HIROUCHI, M.; NAKAYASU, H. Structure and function of cerebral GABAA and GABAB receptors. **Neuroscience research**, v. 17, n. 2, p. 91-99, 1993.

LANG, P.J.; BRADLEY, M.M.; CUTHBERT, B.N. Emotion, motivation, and anxiety: Brain mechanisms and psychophysiology. **Biological psychiatry**, v. 44, n. 12, p. 1248-1263, 1998.

LANZENBERGER, R.R.; MITTERHAUSER, M.; SPINDELEGGGER, C.; WADSAK, W.; KLEIN, N.; MIEN, L.K.; HOLIK, A.; ATTARBASCHI, T.; MOSSAHEB, N.; SACHER, J.; GEISS-GRANADIA, T.; KLETTER, K.; KASPER, S.; TAUSCHER, J. Reduced serotonin-1A receptor binding in social anxiety disorder. **Biological psychiatry**, v. 61, n. 9, p. 1081-1089, 2007.

LEES, G.J. Inhibition of sodium-potassium-ATPase: a potentially ubiquitous mechanism contributing to central nervous system neuropathology. **Brain Research Reviews**, v. 16, n. 3, p. 283-300, 1991.

LEMONDE, S.; TURECKI, G.; BAKISH, D.; DU, L.; HRDINA, P.D.; BOWN, C.D.; SEQUEIRA, A.; KUSHWARA, N.; MORRIS, S.J.; BASAK, A.; OU, X.M. Impaired repression at a 5-hydroxytryptamine 1A receptor gene polymorphism associated with major depression and suicide. **Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 25, p. 8788-8799, 2003.

LI, Q.; LUO, T.; JIANG, X.; WANG, J. Anxiolytic effects of 5-HT_{1A} receptors and anxiogenic effects of 5-HT_{2C} receptors in the amygdala of mice. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 1, p. 474-484, 2012.

LI, Z.; LANGHANS, S.A. Transcriptional regulators of Na⁺,K⁺-ATPase subunits. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v.3, p.164-170, 2015.

LINDSAY, R.M. Neurotrophins and receptors. In: **Progress in brain research**. Elsevier, 1994. p. 3-14.

LOWY, M.T.; REDER, A.T.; ANTEL, J.P.; MELTZER, H.Y. Glucocorticoid resistance in depression: the dexamethasone suppression test and lymphocyte sensitivity to dexamethasone. **The American journal of psychiatry**, v. 141, n. 11, p. 1365-1370, 1984.

LUCHESI, C.; STANGHERLIN, E.C.; GAY, B.M.; NOGUEIRA, C.W. Antioxidant effect of diphenyl diselenide on oxidative damage induced by smoke in rats: involvement of glutathione. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 72, p. 248-254, 2009.

LÜLLMANN, H.; WIRTH, J. **Color atlas of pharmacology**. New York: Thieme, 2000.

MACDONALD, R.L.; OLSEN, R.W. GABA_A receptor channels. **Annual review of neuroscience**, v. 17, n. 1, p. 569-602, 1994.

MARIOTTI, Agnese. The effects of chronic stress on health: new insights into the molecular mechanisms of brain–body communication. **Future science OA**, v. 1, n. 3, 2015.

MARTIN, E.I.; RESSLER, K.J.; BINDER, E.; NEMEROFF, C.B. The neurobiology of anxiety disorders: brain imaging, genetics, and psychoneuroendocrinology. **Psychiatric Clinics**, v. 32, n. 3, p. 549-575, 2009.

MATTSON, M.P.; CAMANDOLA, S. NF- κ B in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. **The Journal of clinical investigation**, v. 107, n. 3, p. 247-254, 2001.

MÉMET, S. NF- κ B functions in the nervous system: from development to disease. **Biochemical pharmacology**, v. 72, n. 9, p. 1180-1195, 2006.

MICHELS, G.; MOSS, S.J. GABAA receptors: properties and trafficking. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 42, n. 1, p. 3-14, 2007.

MILETIC, G.; PANKRATZ, M.T.; MILETIC, V. Increases in the phosphorylation of cyclic AMP response element binding protein (CREB) and decreases in the content of calcineurin accompany thermal hyperalgesia following chronic constriction injury in rats. **Pain**, v. 99, n. 3, p. 493-500, 2002.

MÖHLER, H. Pathophysiological aspects of diversity in neuronal inhibition: a new benzodiazepine pharmacology. **Dialogues in clinical neuroscience**, v. 4, n. 3, p. 261, 2002.

MÖHLER, H.; FRITSCHY, J. M.; VOGT, K.; CRESTANI, F.; RUDOLPH, U. Pathophysiology and pharmacology of GABA A receptors. In: **Anxiety and Anxiolytic Drugs**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2005. p. 225-247.

MORILAK, D.A.; SOMOGYI, P.; LUJAN-MIRAS, R.; CIARANELLO, R.D. Neurons expressing 5-HT₂ receptors in the rat brain: neurochemical identification of cell types by immunocytochemistry. **Neuropsychopharmacology**, v. 11, n. 3, p. 157, 1994.

MORTH, J.P.; PEDERSEN, B.P.; BUCH-PEDERSEN, M.J.; ANDERSEN, J.P.; VILSEN, B.; PALMGREN, M.G.; NISSEN, P. A structural overview of the plasma membrane Na⁺, K⁺-ATPase and H⁺-ATPase ion pumps. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 12, n. 1, p. 60-70, 2011.

MOSELEY, A.E.; WILLIAMS, M.T.; SCHAEFER, T.L.; BOHANAN, C.S.; NEUMANN, J.C.; BEHBEHANI, M.M.; VORHEES, C.V.; LINGREL, J.B. Deficiency in Na, K-ATPase α isoform genes alters spatial learning, motor activity, and anxiety in mice. **Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 3, p. 616-626, 2007.

MOWLA, S.J.; FARHADI, H.F.; PAREEK, S.; ATWAL, J.K.; MORRIS, S.J.; SEIDAH, N.G.; MURPHY, R.A. Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to brain-derived neurotrophic factor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 16, p. 12660-12666, 2001.

NARAJJI, C.; KARVEKAR, M.D.; DAS, A.K. Biological importance of organoselenium compounds. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 69, p. 344–351, 2007.

NEMEROFF, C.B. The role of GABA in the pathophysiology and treatment of anxiety disorders. **Psychopharmacology bulletin**, v. 37, n. 4, p. 133-146, 2003.

NOGUEIRA, C.W.; ZENI, G.; ROCHA, J.B.T. Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology. **Chemical Reviews**, v. 104, n. 12, p. 6255-6286, 2004.

NORDON, D.G.; HÜBNER, C.K. Prescrição de benzodiazepínicos por clínicos gerais. **Diagn Tratamento**, v. 14, n. 2, p. 66-9, 2009.

NUSS, P. Anxiety disorders and GABA neurotransmission: a disturbance of modulation. **Neuropsychiatric disease and treatment**, v. 11, p. 165, 2015.

NUTT, D.J. Overview of diagnosis and drug treatments of anxiety disorders. **CNS spectrums**, v. 10, n. 1, p. 49-56, 2005.

OLIVEIRA, C.E.S.; SARI, M.H.M.; ZBOROWSKI, V.A.; ARAUJO, P.C.O.; NOGUEIRA, C.W.; ZENI, G. p, p'-Methoxyl-diphenyl diselenide elicits an antidepressant-like effect in mice without discontinuation anxiety phenotype. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**. v. 154, p. 31-38, 2017.

OLSEN, R.W.; DELOREY, T.M.; G.M.; KANG, M.H. GABA receptor function and epilepsy. **Advances in neurology**, v. 79, p. 499-510, 1999.

PANDEY, S.C.; ZHANG, H.; ROY, A.; XU, T. Deficits in amygdaloid cAMP-responsive element-binding protein signaling play a role in genetic predisposition to anxiety and alcoholism. **The Journal of clinical investigation**, v. 115, n. 10, p. 2762-2773, 2005.

PAULUS, M.P.; FEINSTEIN, J.S.; CASTILLO, G.; SIMMONS, A.N.; STEIN, M.B. Dose-dependent decrease of activation in bilateral amygdala and insula by lorazepam during emotion processing. **Archives of general psychiatry**, v. 62, n. 3, p. 282-288, 2005.

PEDRUZZI, L.M.; STOCKLER-PINTO, M.B.; LEITE JR, M.; MAFRA, D. Nrf2-keap1 system versus NF-κB: the good and the evil in chronic kidney disease?. **Biochimie**, v. 94, n. 12, p. 2461-2466, 2012.

PETRONILHO, F; MICHELS, M; DANIELSKI, L.G.; GOLDIM, M.P.; FLORENTINO, D.; VIEIRA, A; MENDONÇA, M.G; TOURNIER, M; PIACENTINI, B; GIUSTINA A. D. Diphenyl diselenide attenuates oxidative stress and inflammatory parameters in ulcerative colitis: A comparison with ebselen. **Pathology - Research and Practice**. v. 212, p. 755-760, 2016.

PINZ, M.; REIS, A.S.; DUARTE, V.; DA ROCHA, M.J.; GOLDANI, B S.; ALVES, D.; SAVEGNAGNO, L.; LUCHESE, C.; WILHELM, E.A. 4-Phenylselenenyl-7-chloroquinoline, a new quinoline derivative containing selenium, has potential antinociceptive and anti-inflammatory actions. **European journal of pharmacology**, v. 780, p. 122-128, 2016.

PINZ, M.P.; DOS REIS, A.S.; VOGT, A.G.; KRÜGER, R.; ALVES, D.; JESSE, C.R.; ROMAN, S.S.; SOARES, M.P.; WILHELM, E.A.; LUCHESE, C. Current advances of pharmacological properties of 7-chloro-4-(phenylselenenyl) quinoline: Prevention of cognitive deficit and anxiety in Alzheimer's disease model. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 105, p. 1006-1014, 2018.

POMPEIANO, M.; PALACIOS, J.M.; MENGOD, G. Distribution of the serotonin 5-HT₂ receptor family mRNAs: comparison between 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors. **Molecular brain research**, v. 23, n. 1-2, p. 163-178, 1994.

PRIGOL, M.; LUCHESE, C.; PINTON, S.; FERREIRA, M.; SANTOS, J.P.A.; KARKOW, A.K.; NOGUEIRA, C.W. Diphenyl diselenide induces anxiolytic-like and sedative effects on the chick social separation-stress behavior. **Neuroscience letters**, v. 495, n. 2, p. 140-143, 2011.

RAVINDRAN, L.N.; STEIN, M.B. The pharmacologic treatment of anxiety disorders: a review of progress. **The Journal of clinical psychiatry**, v. 71, n. 7, p. 839-854, 2010.

REICHARDT, L.F. Neurotrophin-regulated signalling pathways. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 361, n. 1473, p. 1545-1564, 2006.

REIS, A. S.; PINZ, M; DUARTE, L. F. B.; ROEHRS, J. A.; ALVES, D; LUCHESE, C.; WILHELM, E. A. 4-phenylselenyl-7-chloroquinoline, a novel multitarget compound with anxiolytic activity: Contribution of the glutamatergic system. **Journal of Psychiatric Research**. v. 84, p. 191-199, 2017.

REN, X.; RIZAVI, H.S.; KHAN, M.A.; BHAUMIK, R.; DWIVEDI, Y.; PANDEY, G.N. Alteration of cyclic-AMP response element binding protein in the postmortem brain of subjects with bipolar disorder and schizophrenia. **Journal of affective disorders**, v. 152, p. 326-333, 2014.

RÉUS, G.Z.; STRINGARI, R.B.; RIBEIRO, K.F.; FERRARO, A.K.; VITTO, M.F.; CESCONETTO, P.; SOUZA, C.; QUEVEDO, J. Ketamine plus imipramine treatment induces antidepressant-like behavior and increases CREB and BDNF protein levels and PKA and PKC phosphorylation in rat brain. **Behavioural brain research**, v. 221, n. 1, p. 166-171, 2011.

REVEST, J.M.; DUPRET, D.; KOEHL, M.; FUNK-REITER, C.; GROSJEAN, N.; PIAZZA, P. V.; ABROUS, D.N. Adult hippocampal neurogenesis is involved in anxiety-related behaviors. **Molecular psychiatry**, v. 14, n. 10, p. 959-967, 2009.

RIBEIRO, M.C.P.; ÁVILA, D.S.; SCHIAR, V.P.P.; SANTOS, D.B.; MEINERZ, D.F.; DUARTE, M.M.F.; MONTEIRO, R.; PUNTEL, R.; BEM, A.F.; HASSAN W. Diphenyl diselenide supplementation reduces biochemical alterations associated with oxidative stress in rats fed with fructose and hydrochlorothiazide. **Chemico-Biological Interactions**. v. 204, p.191-199, 2013.

RIZZO, A.M.; BERSELLI, P.; ZAVA, S.; MONTORFANO, G.; NEGRONI, M.; CORSETTO, P.; BERRA, B. Endogenous antioxidants and radical scavengers. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. v. 698, p. 52-67, 2010.

ROMAN, M.; JITARU, P.; BARBANTE, C. Selenium biochemistry and its role for human health. **Metallomics**, v. 6, n. 1, p. 25-54, 2014.

ROSA, S.G.; PESARICO, A.P.; NOGUEIRA, C.W. m-Trifluoromethyl-diphenyl diselenide promotes resilience to social avoidance induced by social defeat stress in mice: contribution of opioid receptors and MAPKs. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 82, p. 123-135, 2018.

ROSA, S.G.; QUINES, C.B.; STANGHERLIN, E.C.; NOGUEIRA, C.W. Diphenyl diselenide ameliorates monosodium glutamate induced anxiety-like behavior in rats by modulating hippocampal BDNF-Akt pathway and uptake of GABA and serotonin neurotransmitters. **Physiology & behavior**, v. 155, p. 1-8, 2016.

SALIM, S.; ASGHAR, M.; TANEJA, M.; HOVATTA, I.; CHUGH, G.; VOLLERT, C.; VU, A. Potential contribution of oxidative stress and inflammation to anxiety and hypertension. **Brain research**, v. 1404, p. 63-71, 2011.

SANDERS, S.K.; SHEKHAR, A. Regulation of anxiety by GABAA receptors in the rat amygdala. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 52, n. 4, p. 701-706, 1995.

SANDFORD, J.J.; ARGYROPOULOS, S.V.; NUTT, D.J. The psychobiology of anxiolytic drugs: Part 1: Basic neurobiology. **Pharmacology & therapeutics**, v. 88, n. 3, p. 197-212, 2000.

SAPOLSKY, R.M. Glucocorticoid toxicity in the hippocampus: reversal by supplementation with brain fuels. **Journal of Neuroscience**, v. 6, n. 8, p. 2240-2244, 1986.

SAVEGNAGO, L.; JESSE, C.R.; PINTO, L.G.; ROCHA, J.B.T.; BARANCELLI, D.A.; NOGUEIRA, C.W.; ZENI, G. Diphenyl diselenide exerts antidepressant-like and anxiolytic-like effects in mice: involvement of L-arginine-nitric oxide-soluble guanylate cyclase pathway in its antidepressant-like action. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 88, n. 4, p. 418-426, 2008.

SCHAAF, M.J.M.; DE KLOET, E.R.; VREUGDENHIL, E. Corticosterone effects on BDNF expression in the hippocampus implications for memory formation. **Stress**, v. 3, n. 3, p. 201-208, 2000.

SEN, R.; BALTIMORE, D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. **Cell**, v. 46, n. 5, p. 705-716, 1986.

SHELIN, Y.I.; GADO, M.H.; KRAEMER, H.C. Untreated depression and hippocampal volume loss. **American Journal of Psychiatry**, v. 160, n. 8, p. 1516-1518, 2003.

SHELTON, C.I. Diagnosis and management of anxiety disorders. **Journal of the American Osteopathic Association**, v. 104, n. 3 supplement 1, p. S2, 2004.

SHEN, Z.; Zhu, J.; Yuan, Y.; Ren, L.; Qian, M.; Lin, M.; Min, C.; Zhen, Z.; Shen, X. The roles of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in predicting treatment remission in a Chinese Han population with generalized anxiety disorder. **Psychiatry research**, v. 271, p. 319-324, 2019.

SHIMIZU, E.; HASHIMOTO, K.; OKAMURA, N.; KOIKE, K.; KOMATSU, N.; KUMAKIRI, C.; NAKAZATO, M.; WATANABE, H.; SHINODA, N.; OKADA, S.; IYO, M. Alterations of serum levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in depressed patients with or without antidepressants. **Biological psychiatry**, v. 54, n. 1, p. 70-75, 2003.

SILVA, D.K.; ANDRADE, F.M. Farmacogenética de inibidores seletivos de recaptação de serotonina: uma revisão. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v.30, p.1, 2008.

SILVA, V.D.; REIS, A.S.; PINZ, M.; DA FONSECA, C.A.; DUARTE, L.F.B.; ROEHRS, J.A.; ALVES, D.; LUCHESE, C.; WILHELM, E.A. Further analysis of acute antinociceptive and anti-inflammatory actions of 4-phenylselenyl-7-chloroquinoline in mice. **Fundamental & clinical pharmacology**, v. 31, n. 5, p. 513-525, 2017.

SIMPSON, D.L.; BROOKS, C.L. Tailoring the structural integrity process to meet the challenges of aging aircraft. **International journal of Fatigue**, v. 21, p. S1-S14, 1999.

SMITH, M.A.; Makino, S.; Kvetňanský, R.; Post, R.M. Effects of stress on neurotrophic factor expression in the rat brain. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 771, n. 1, p. 234-239, 1995b.

SMITH, M.A.; MAKINO, S.; KVETNANSKY, R.; POST, R.M. Stress and glucocorticoids affect the expression of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs in the hippocampus. **Journal of Neuroscience**, v. 15, n. 3, p. 1768-1777, 1995a.

SOODAN, S.; ARYA, A. Understanding the Pathophysiology and Management of the Anxiety Disorders. **International Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Research**, v. 4, n. 3, p. 251-278, 2015.

STEIN, L. Antianxiety of action of benzodiazepine: decrease in activity of serotonin neurons in the punishment system. **The benzodiazepines**, p. 229-321, 1973.

STEINBRENNER, H.; SIES, H. Selenium homeostasis and antioxidant selenoproteins in brain: implications for disorders in the central nervous system. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 536, n. 2, p. 152-157, 2013.

TECHE, S.P.; NUERNBERG, G.L.; SORDI, A.O.; DE SOUZA, L.H.; REMY, L., CERESÉR, K.M.M.; ROCHA, N.S. Measurement methods of BDNF levels in major depression: a qualitative systematic review of clinical trials. **Psychiatric Quarterly**, v. 84, n. 4, p. 485-497, 2013.

TYRER, P.; BALDWIN, D. Generalised anxiety disorder. **The Lancet**, v. 368, n. 9553, p. 2156-2166, 2006.

ULRICH-LAI, Y.M.; HERMAN, J.P. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. **Nature reviews neuroscience**, v. 10, n. 6, p. 397-409, 2009.

VASWANI, M.; LINDA, F.K.; RAMESH, S. Role of selective serotonin reuptake inhibitors in psychiatric disorders: a comprehensive review. **Progress in neuro-psychopharmacology and biological psychiatry**, v. 27, n. 1, p. 85-102, 2003.

VOGT, A.G.; VOSS, G.T.; DE OLIVEIRA, R.L.; PALTIAN, J.J.; DUARTE, L.F.; ALVES, D.; JESSE, C.R.; ROMAN, J.A.; ROEHRS, J.A.; WILHELM, E.A.; LUCHESE, C. Organoselenium group is critical for antioxidant activity of 7-chloro-4-phenylselenyl-quinoline. **Chemico-biological interactions**, v. 282, p. 7-12, 2018.

VOGT, M.A.; INTA, D.; LUONI, A.; ELKIN, H.; PFEIFFER, N.; RIVA, M.A.; GASS, P. Inducible forebrain-specific ablation of the transcription factor Creb during adulthood induces anxiety but no spatial/contextual learning deficits. **Frontiers in behavioral neuroscience**, v. 8, p. 407, 2014.

VOSS, G.T.; OLIVEIRA, R.L.; DE SOUZA, J.F.; DUARTE, L.F.; FAJARDO, A.R.; ALVES, D.; LUCHESE, C.; WILHELM, E.A. Therapeutic and technological potential of 7-chloro-4-phenylselenyl quinoline for the treatment of atopic dermatitis-like skin lesions in mice. **Materials Science and Engineering: C**, v. 84, p. 90-98, 2018.

WALLACE, D.L.; HAN, M.H.; GRAHAM, D.L.; GREEN, T.A.; VIALOU, V.; INIGUEZ, S.D.; CAO, J.; KIRK, A.; CHAKRAVARTY, S.; KUMAR, A.; KRISHNAN, V.; NEVE R.L.; COOPER, D.C.; BOLAÑOS, C.A.; BARROT, M.; MCCLUNG, C.A.; NESTLER, E.J. CREB regulation of nucleus accumbens excitability mediates social isolation-induced behavioral deficits. **Nature neuroscience**, v. 12, n. 2, p. 200, 2009.

WONG, D.T.; PERRY, K.W.; BYMASTER, F.P. Case history: the discovery of fluoxetine hydrochloride (Prozac). **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 9, p. 764-774, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Depression and other common mental disorders: global health estimates**. World Health Organization, 2017.

WRIGHT, D.E.; SEROOGY, K.B.; LUNDGREN, K.H.; DAVIS, B.M.; JENNES, L. Comparative localization of serotonin1A, 1C, and 2 receptor subtype mRNAs in rat brain. **Journal of Comparative Neurology**, v. 351, n. 3, p. 357-373, 1995.

YOSHII, A.; CONSTANTINE-PATON, M. Postsynaptic BDNF-TrkB signaling in synapse maturation, plasticity, and disease. **Developmental neurobiology**, v. 70, n. 5, p. 304-322, 2010.

ZHAO, L.Y.; YE, T.H.; ZHANG, Y.Z.; ZHAO, H. Combination of morphine with low-dose naloxone for intravenous patient-controlled analgesia. **Zhongguo yi xue ke xue yuan xue bao. Acta Academiae Medicinae Sinicae**, v. 27, n. 2, p. 228-231, 2005.

ZORUMSKI, C.F.; ISENBERG, K.E. Insights into the structure and function of GABA-benzodiazepine receptors: ion channels and psychiatry. **American Journal of Psychiatry**, v. 148, n. 2, p. 162-173, 1991.

ANEXOS

Anexo A – Comprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal



Pelotas, 13 de julho de 2015

De: M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix*Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA)***Para:** Profa. Dra. Ethel Antunes Wilhelm*Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos*

Senhora Professora:

A **CEEA** analisou o projeto intitulado: “**Avaliação da atividade do tipo-ansiolítica de 7-cloro-4-(fenilseleno) quinolina em camundongos**”, processo nº23110.004224/2015-33 que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, Subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino, sendo de parecer **FAVORÁVEL** a sua execução, pois está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA).

Solicitamos, após tomar ciência do parecer, reenviar o processo à CEEA.

Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao **COBALTO** para posterior registro no **COCEPE** (código para cadastro nº **CEEA 4224-2015**).

Vigência do Projeto: 15/07/2015 a 15/12/2017

Espécie/Linhagem: *Mus musculus*/Swiss

Nº de animais: 572

Idade: 60 dias

Sexo: Machos

Origem: Biotério Central/UFPEL

M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix*Presidente da CEEA*

Ciente em: ____/____/2015

Assinatura do Professor Responsável: _____