

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA**

**PERFIL FARMACOLÓGICO DO TIPO
ANTIDEPRESSIVO DO COMPOSTO 3-(4-
FLUOROFENILSELENIL)-2,5 DIFENILSELENOFENO:
ENVOLVIMENTO DO SISTEMA
SEROTONINÉRGICO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Bibiana Mozzaquatro Gai

**Santa Maria, RS, Brasil
2010**

**PERFIL FARMACOLÓGICO DO TIPO ANTIDEPRESSIVO
DO COMPOSTO 3-(4-FLUOROFENILSELENIL)-2,5
DIFENILSELENOFENO: ENVOLVIMENTO DO SISTEMA
SEROTONINÉRGICO**

por

Bibiana Mozzaquatro Gai

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas,
Área de Concentração em Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de
Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Bioquímica Toxicológica

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Cristina Wayne Nogueira

Co-orientador: Prof. Dr. Gilson Zeni

Santa Maria, RS, Brasil
2011

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica
Toxicológica**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado

**PERFIL FARMACOLÓGICO DO TIPO ANTIDEPRESSIVO DO
COMPOSTO 3-(4-FLUOROFENILSELENIL)-2,5
DIFENILSELENOFENO: ENVOLVIMENTO DO SISTEMA
SEROTONINÉRGICO**

elaborada por

Bibiana Mozzaquatro Gai

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Bioquímica Toxicológica

Comissão Examinadora

Cristina Wayne Nogueira, Dr^a
(Presidente/Orientadora)

Margareth Linde Athayde, Dr^a (UFSM)

Marilise Escobar Burger, Dr^a (UFSM)

Santa Maria, 23 de fevereiro de 2011.

Mãe e Pai,
pelo incentivo, apoio, coragem,
sacrifícios e amor incondicional,
dedico este trabalho a vocês,
com todo o meu amor!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades e me mostrar o caminho nas horas incertas.

À minha mãe, obrigada por estar ao meu lado nas horas mais difíceis; por compreender meus momentos de mau humor; pelas conversas e conselhos sempre certos; por tentar entender os meus trabalhos no laboratório e ser o motivo da minha constante busca por conhecimento. Te amo!

Pai, obrigada por você ser quem é: inteligente, sonhador, batalhador e vencedor. Conseguiu superar todas as dificuldades que a vida te impôs e essa é a maior lição de vida que eu carrego. Obrigada por sempre tentar nos dar o que há de melhor. Te amo!

Rafaella, quanto tempo faz que nos conhecemos, quanta coisa você fez por mim e eu nunca agradei! Obrigada pela amizade e amor sinceros; pelo companheirismo de sempre; pelas conversas fervorosas de final de semana sobre síntese orgânica. Mesmo que eu quase nunca diga, saiba que eu te amo e te admiro muito!

Ao meu amore, Ulisses, obrigada por estar comigo todos esses anos, por me realizar e fazer de mim uma pessoa mais completa e feliz; por ter me aguentado, apoiado e por ter ficado sempre ao meu lado durante a elaboração deste trabalho. Te amo, amore!

Aos meus avós, tios e primos, agradeço pela força que me dão a cada dia.

À minha madrinha, Inha, e ao meu padrinho, Márcio, por acreditarem e torcerem por mim.

Aos meus priminhos amados, Isabélly e Pietro, por darem um colorido especial à minha vida.

Aos meus amigos Cris, Jabu, Kika, Binho, Dani e Nelso, pelo incentivo e parceria.

À Cris, minha orientadora, agradeço por acreditar em mim, me aceitar por duas vezes no laboratório, por me mostrar o caminho da ciência e por ser um grande exemplo de profissional e de mulher que sempre fará parte da minha vida.

Ao GZ, agradeço pela amizade, conversas descontraídas, brincadeiras e risadas; por contribuir para o meu crescimento profissional e por ser também um exemplo de pesquisador a ser seguido.

A todo pessoal do Lab GZ, pelo companheirismo e amizade, em especial ao Maneco, pela síntese dos selenofenos.

À Ana, que esteve ao meu lado em todas as horas, desde a graduação, que me cativou com a sua maneira simples, seu sorriso diário e com seu jeito sincero e tão amigo. Te adoro!

À Marina, pelo carinho e pela amizade que cultivamos juntas; por ter enfrentado comigo a captação de serotonina e por ter se disposto a revisar minha dissertação.

À Carla, minha primeira e inesquecível IC, que me mostrou que a arte de ensinar e orientar, embora às vezes difícil, pode ser muito gratificante.

Aos demais amigos do Lab Cris, Carmine, César, Crisinha, Ethel, Juliana, Marlon, Michael, Silvane e Simone. E aos ICs, Ana Paula, Gláubia, Laís, Laiza, Marcel, Maurício, Michelly, Mayara, Pietro, Raphaela e Tuka. Vocês fazem e farão sempre parte da minha história!

Aos amigos que formam os laboratórios agregados ao Lab Cris, Cristiane, Cristiano e Ricardo, que já conseguem andar com suas próprias pernas, mas que sempre aparecem para matar a saudade.

Aos professores João, Nilda e Félix e os demais professores do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica e todos os seus alunos.

Às professoras Marilise e Margareth, por aceitarem participar da banca de avaliação do meu trabalho.

À Márcia, por estar sempre solícita a ajudar.

Ao Rinaldo e à tia Teresa, por facilitarem o nosso trabalho.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica pela possibilidade de realização desse curso.

À CAPES pelo apoio e financiamento concedidos.

Enfim, obrigada a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

“Quando você acha que sabe todas as perguntas,
vem a vida e muda todas as respostas.”

(Bob Marley)

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica
Universidade Federal de Santa Maria

PERFIL FARMACOLÓGICO DO TIPO ANTIDEPRESSIVO DO COMPOSTO 3-(4-FLUOROFENILSELENIL)-2,5 DIFENILSELENOFENO: ENVOLVIMENTO DO SISTEMA SEROTONINÉRGICO

AUTORA: BIBIANA MOZZAQUATRO GAI
ORIENTADORA: CRISTINA WAYNE NOGUEIRA
CO-ORIENTADOR: GILSON ZENI

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 2011

A depressão é uma doença grave, recorrente e uma condição psiquiátrica incapacitante que gera pesados custos sociais. A abordagem farmacológica dessa desordem é feita por meio do emprego de antidepressivos, os quais apresentam efeitos adversos e numerosas limitações. Tendo em vista as promissoras propriedades farmacológicas das moléculas contendo selênio, este estudo avaliou o efeito do 3-(4-fluorofenilselenil)-2,5-difenilselenofeno (DPS) no teste do nado forçado (TNF) e no teste da suspensão da cauda (TSC) em camundongos, dois modelos preditivos de comportamento depressivo. Uma vez que a serotonina (5-HT) desempenha um importante papel na patofisiologia dos transtornos depressivos, o envolvimento do sistema serotoninérgico e dos receptores de 5-HT na ação desenvolvida pelo DPS foi estudado. A ação do tipo antidepressiva do tratamento combinado com doses subefetivas de DPS e paroxetina, um inibidor seletivo da recaptção de serotonina (ISRS) foi investigada. Além disso, o possível mecanismo responsável pela ação do tipo antidepressiva do DPS também foi verificado. Os resultados mostram que o DPS (50 e 100 mg/kg) reduziu significativamente o tempo de imobilidade durante os TSC e TNF, sem causar alterações na atividade locomotora no teste do campo aberto (TCA). O efeito anti-imobilidade do DPS (50 mg/kg, i.g.) no TNF foi prevenido pelo pré-tratamento dos animais com *p*CPA (p-clorofenilalanina; 100 mg/kg, i.p., administrado uma vez ao dia durante 4 dias consecutivos, um inibidor da síntese de serotonina), WAY 100635 (N-[2-[4-(2-metoxifenil)-1-piperazinil]etil]-N-2-piridinilciclohexano carboxamida; 0,1 mg/kg, s.c., um antagonista seletivo de receptores 5-HT_{1A}), ritanserina (1 mg/kg, i.p., um antagonista seletivo de receptores 5-HT₂) ou ondansetrona (1 mg/kg, i.p., um antagonista seletivo de receptores 5-HT₃). O tratamento combinado com paroxetina e DPS reduziu o tempo de imobilidade no TNF. O DPS na dose

de 50 mg/kg não produziu nenhuma alteração na atividade dos subtipos da monoamino oxidase (MAO-A e MAO-B) cerebral. O DPS na dose de 50 mg/kg inibiu significativamente a captação de 5-HT em sinaptossoma de cérebro de camundongos. Esses resultados sugerem que o DPS produziu uma ação do tipo antidepressiva no TSC e no TNF em camundongos e esta ação parece ser mediada por uma interação com o sistema serotoninérgico, particularmente por uma inibição da recaptação de 5-HT.

Palavras-chave: compostos orgânicos de selênio, selenofenos, tipo antidepressivo, sistema serotoninérgico, teste do nado forçado, teste da suspensão da cauda.

ABSTRACT

Dissertation of Master's Degree
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

ANTIDEPRESSANT-LIKE PHARMACOLOGICAL PROFILE OF 3-(4-FLUOROPHENYLSELENYL)-2,5-DIPHENYLSELENOPHENE: INVOLVEMENT OF SEROTONERGIC SYSTEM

AUTHOR: BIBIANA MOZZAQUATRO GAI
ADVISOR: CRISTINA WAYNE NOGUEIRA
CO-ADVISOR: GILSON ZENI

Date and Place of the defense: Santa Maria, 2011

Depression is a serious, recurrent and incapacitating psychiatric condition with a heavy social burden. The pharmacological approach to this disorder employs therapy with antidepressant drugs, which have side effects and numerous limitations. In view of the promising pharmacological properties of containing-selenium molecules, this study evaluated the effect of 3-(4-fluorophenylselenyl)-2,5-diphenylselenophene (DPS) in the mouse forced swim test (FST) and tail suspension test (TST), two models predictive of depressant activity. Since serotonin (5-HT) plays an important role in the pathophysiology of depressive disorders, the involvement of serotonergic system and 5-HT receptors in the action caused by DPS was studied. The antidepressant-like action of combined treatment with subeffective doses of both DPS plus paroxetine, a selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) was investigated. Further, we verified the possible mechanism responsible for antidepressant-like action of DPS. The results showed that DPS (50 and 100 mg/kg, p.o.) significantly reduced the immobility time during the FST and TST, without accompanying changes in ambulation when assessed in the open-field test. The anti-immobility effect of DPS (50 mg/kg, i.g.) in the FST was prevented by pretreatment of mice with *p*CPA (p-chlorophenylalanine; an inhibitor of 5-HT synthesis, 100 mg/kg, i.p., once a day for 4 consecutive days), WAY 100635 (N-[2-[4-(2-methoxyphenyl)-1-piperazinyl]ethyl]-N-2-pyridinylcyclohexane carboxamide; 0.1 mg/kg, s.c., a selective 5-HT_{1A} receptor antagonist), ritanserin (1 mg/kg, i.p., a 5-HT₂ receptor antagonist) or ondansetron (1 mg/kg, i.p., a 5-HT₃ receptor antagonist). Combined treatment with paroxetine and DPS reduced the immobility time in the FST. DPS at the dose of 50 mg/kg did not produce any change in the cerebral activity of monoamine oxidase subtypes (MAO-A or MAO-B). DPS at the dose of 50 mg/kg inhibited significantly 5-HT uptake in mouse brain synaptosomes. These results suggest that DPS produced an antidepressant-like

action in the mouse FST and TST and this action seems most likely to be mediated through an interaction with serotonergic system, particularly by 5-HT reuptake inhibition.

Keywords: organoselenium compounds, selenophene, antidepressant-like, serotonergic system, forced swimming test, tail suspension test.

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

TABELA 1 – Effect of acute administration of DPS and its combined treatment with 5-HT antagonists on the mouse open-field test (OFT)	51
TABELA 2 – Effect of DPS on the mouse cerebral activity of MAO-A and MAO-B (nmol of 4-hydroxyquinoline/mg protein)	52

LISTA DE FIGURAS

Revisão Bibliográfica

FIGURA 1 – Síntese do neurotransmissor Serotonina (5-HT) a partir do aminoácido Triptofano	31
FIGURA 2 – Representação esquemática do transportador de 5-HT	32
FIGURA 3 – Variantes do gene SLC6A4.....	33
FIGURA 4 – Estrutura química de drogas que inibem seletivamente a recaptação de 5-HT (ISRSs): fluoxetina (A), paroxetina (B) e citalopram (C)	36

Capítulo 1

FIGURA 1 – Chemical structure of 3-(4-fluorophenylselenyl)-2,5-diphenylselenophene (DPS)	48
FIGURA 2 – Time-course of the antidepressant-like effect caused by DPS (50 mg/kg, i.g.) in the mouse TST	50
FIGURA 3 – Effect of an acute administration of paroxetine (Prx) in the mouse TST and FST	50
FIGURA 4 – Effect of pretreatment with on DPS-induced reduction in the immobility time in the mouse FST	50

Capítulo 1

FIGURA 5 – Effect of pretreatment with ondasetron, ritanserin or WAY 100635 on DPS-induced reduction in immobility time in the FST in mice	51
FIGURA 6 – Effect of subeffective doses of DPS and paroxetine (Prx) on the immobility time in the FST	51
FIGURA 7 – Effect of DPS on synaptosomal [3H] 5-HT uptake	52

Capítulo 2

FIGURA 1 – Estrutura química dos selenofenos (a-f) estudados	56
FIGURA 2 – Efeito dos selenofenos (a-f) sobre o tempo de imobilidade observado no TNF em camundongos	58

Discussão

FIGURA 1 – Mecanismo de ação proposto para o DPS	63
FIGURA 2 – Semelhança estrutural entre o DPS (A) e outras drogas que inibem a recaptação de 5-HT: paroxetina (B) e citalopram (C)	65

LISTA DE ABREVIATURAS

5HIAA – Ácido 5-hidroxitriptamina

5-HT – 5-Hidroxitriptamina, Serotonina

AAP – Associação Americana de Psiquiatria

CID – Classificação Internacional de Doenças

DA – Dopamina

DPS – 3 - (4 - fluorofenilselenil) - 2, 5 - difenilselenofeno, 3- (4 - *fluorophenylselenyl*) - 2, 5-
diphenylselenophene

DSM – *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*

FDA – *Food and Drug Administration*

FST – *Forced Swimming Test*

HVA – Ácido homovanílico

IMAOs – Inibidores da Monoamino oxidase

ISSRs – Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina

MAO – Monoamino oxidase

MHPG – 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol

NA – Noradrenalina

OFT – *Open-field Test*

OMS – Organização Mundial da Saúde

pCPA – p-clorofenilalanina, *p-chlorophenylalanine*

TCAs – Antidepressivos Tricíclicos

TNF – Teste do Nado Forçado

TrpOH – L-triptofano-5-monooxigenase

TSC – Teste da Suspensão da Cauda

TST – *Tail Suspension Test*

WAY 100635 – N - [2-[4- (2-metoxifenil)-1-piperazinil] etil] - N - 2-piridinilciclohexano carboxamida, *N - [2-[4- (2-methoxyphenyl)-1-piperazinyl] ethyl] - N - 2-pyridinylcyclohexane carboxamide*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo geral.....	18
2.1 Objetivos específicos.....	18
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1 Transtornos afetivos	19
3.1.1 Depressão	20
3.2 Modelos experimentais para o estudo da depressão.....	37
3.2.1 Teste do nado forçado (TNF)	38
3.2.2 Teste da suspensão da cauda (TSC)	38
3.3 Selênio	39
3.3.1 Características Químicas	39
3.3.2 Biodisponibilidade	40
3.3.3 O papel do selênio na regulação do humor	41
3.3.4 Compostos orgânicos de selênio	42
4 RESULTADOS	44
4.1 Capítulo 1	46
4.2 Capítulo 2	56
4.2.1 Materiais e Métodos	56
4.2.2 Resultados	58
5 DISCUSSÃO	60
6 CONCLUSÃO.....	68
7 PERSPECTIVAS.....	69
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

1 INTRODUÇÃO

Os sentimentos de tristeza e alegria colorem o fundo afetivo da vida psíquica normal. A depressão, no entanto, consiste de uma alteração psicológica em que a pessoa tem um sentimento de tristeza nunca bem definido e sem causa aparente. O estado depressivo diferencia-se do comportamento "triste" ou melancólico que afeta a maioria das pessoas por se tratar de uma condição duradoura de origem neurológica acompanhada de vários sintomas específicos. Essa doença é um dos transtornos comportamentais mais graves e recorrentes, muitas vezes manifestada com sintomas psicológicos, comportamentais e fisiológicos. Pode resultar em morte prematura por suicídio e prejuízo da vida social, e é também considerada um fator de risco para o desenvolvimento de outras doenças, por exemplo, câncer, diabetes e doenças cardiovasculares (Musselman et al., 2003; Lazure et al., 2009; Kendler et al., 2009; Neu, 2009). Por ser uma doença que acomete grande parte da população (McKenna et al., 2005), é crescente o número de pesquisas que buscam esclarecer suas causas, bem como terapias efetivas que possam ser empregadas no seu tratamento (Millan, 2004, 2006).

As principais teorias relacionadas à base biológica da depressão situam-se nos estudos sobre neurotransmissores cerebrais e seus receptores, embora outras áreas também estejam sob investigação. A hipótese das monoaminas, baseada na deficiência de monoaminas, como serotonina (5-HT), noradrenalina (NA) e dopamina (DA), é comumente utilizada para explicar a gênese dos transtornos depressivos (Millan, 2004; Altamura et al., 2008). Em 1965, o psiquiatra Joseph Schildkraut propôs em seu artigo intitulado "*The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence*" a hipótese das catecolaminas, sugerindo um déficit, principalmente de NA, em todas as formas de depressão (Schildkraut, 1965). A hipótese baseava-se em estudos farmacológicos, mostrando que a ação dos antidepressivos tricíclicos (ADTs) e inibidores da monoamina oxidase (IMAOs) era mediada pelo aumento de NA na fenda sináptica. Posteriormente, surgiu a hipótese serotoninérgica, impulsionada pelo desenvolvimento da classe dos antidepressivos denominados inibidores seletivos da recaptção de 5-HT (ISRSs) (Hyttel, 1978; Guerey, 1980; Koe, 1983) que, por sua vez, aumentam a disponibilidade de 5-HT na fenda sináptica. Completando o quadro da hipótese das monoaminas, Rampello et al. (1991), propôs a hipótese dopaminérgica, que se baseia no envolvimento da dopamina (DA) na patofisiologia da anedonia, sintoma comum das desordens depressivas. No entanto, atualmente sabe-se que a hipótese das monoaminas é insuficiente para uma explicação plausível da depressão.

Evidências têm sugerido que o estresse, juntamente com a predisposição genética do indivíduo, tem um papel importante no desencadeamento dessa desordem. Porém a manipulação farmacológica envolvendo a neurotransmissão das monoaminas NA, 5-HT e DA é ainda a melhor abordagem terapêutica da depressão.

Desse modo, a síndrome depressiva é tratada, na maioria das vezes, com uma variedade de medicamentos denominados antidepressivos, os quais exercem efeitos benéficos sobre os sintomas da depressão. Como mencionado acima, a maioria dessas drogas, dentre elas os ADTs, os ISRSs e os IMAOs, exerce ações importantes sobre a neurotransmissão monoaminérgica (Millan, 2004, 2006), principalmente pelo aumento das concentrações das monoaminas nas fendas sinápticas cerebrais (Abramets, 2008; Stahl, 1998). No entanto, embora sejam clinicamente efetivas, essas drogas apresentam uma série de efeitos colaterais e muitos pacientes apresentam-se refratários a essas terapias. Além disso, independentemente da escolha inicial do antidepressivo, cerca de 30% a 50% dos casos de depressão não respondem suficientemente ao tratamento disponível atualmente (Thase e Sullivan, 1995), sendo que a resistência à terapia atual é relativamente comum. Nesse sentido, torna-se importante a pesquisa por novas substâncias com efeito antidepressivo, que futuramente possam ser usadas como agente terapêutico principal, ou ainda em combinação com as drogas atualmente usadas, a fim de tornar a terapia mais efetiva, diminuindo os efeitos indesejáveis.

Diversos estudos demonstraram a importância do selênio na regulação do humor (Benton e Cook, 1991; Hawkes e Hornbostel, 1996; Sher, 2002; Benton, 2002). Baixos níveis de selênio na dieta têm sido associados com um aumento na incidência de depressão, ansiedade e agressividade. E ainda, altos níveis de selênio na dieta ou a suplementação da mesma com esse elemento melhoram o humor (Rayman et al., 2006). As propriedades farmacológicas de moléculas orgânicas contendo selênio têm sido amplamente estudadas (Nogueira et al., 2004; Nogueira e Rocha, 2010). Diversos trabalhos do nosso grupo de pesquisa já demonstraram que compostos heterocíclicos contendo esse elemento apresentam atividade do tipo antidepressiva em modelos animais (Savegnago et al., 2007a; Acker et al., 2009; Jesse et al., 2010a,b). Os selenofenos, uma classe específica de compostos contendo selênio, também despertam interesse por apresentarem outras atividades biológicas. Estudos prévios já demonstraram que esses compostos apresentam propriedades antimicrobianas, antiapoptóticas e antitumorais (Abdel-Hafez, 2005; Shiah et al., 2007; Juang et al., 2007). Além disso, estudos recentes do nosso grupo de pesquisa demonstraram os efeitos hepatoprotetores, anticonvulsivantes, antialodínicos, antinociceptivos e antioxidantes do composto 3-

alquinilselenofeno (Wilhelm et al., 2009a,b,c, 2010). No entanto, pouco se tem estudado sobre o efeito de compostos selenofenos sobre o comportamento depressivo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Tendo em vista as promissoras propriedades farmacológicas dos compostos orgânicos de selênio, o objetivo geral do presente trabalho foi investigar se o composto 3-(4-fluorofenilselenil)-2,5-difenilselenofeno (DPS), uma molécula orgânica de selênio da classe dos selenofenos, apresenta efeito do tipo antidepressivo em camundongos.

2.1 Objetivos específicos

Considerando os aspectos já mencionados, os objetivos específicos deste trabalho compreendem:

- Avaliar a ação do DPS no teste da Suspensão da Cauda (TSC) e no Teste do Nado Forçado (TNF) em camundongos, dois modelos preditivos de comportamento depressivo;
- Estudar a possível contribuição do sistema serotoninérgico nos efeitos comportamentais induzidos pelo DPS, incluindo o papel dos receptores de serotonina (5-HT), bem como a ação do tratamento combinado de doses sub-efetivas de DPS e paroxetina sobre comportamento do tipo-depressivo;
- Verificar o efeito do DPS sobre a atividade da enzima monoamino oxidase (MAO) cerebral;
- Investigar o efeito do DPS sobre a captação de 5-HT em sinaptossoma de camundongos;
- Verificar o efeito de modificações estruturais na molécula do DPS sobre a ação do tipo antidepressiva observada no TNF em camundongos.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Transtornos afetivos

Humor, do latim *humore*, consiste na capacidade humana de apreciar, perceber ou expressar o que é divertido ou cômico (Aurélio, 2009). As origens da palavra "humor" assentam-se na medicina dos antigos Gregos, que a define como sendo uma mistura de fluidos, ou humores, controlados pela saúde e emoção humanos. O humor de um indivíduo é caracterizado pela expressão verbal de sentimentos, que refletem seu estado emocional interior. O afeto diz respeito à expressão não verbal destes estados emocionais. As patologias do humor são aquelas que alteram de maneira constante estes estados emocionais.

Atualmente existem basicamente dois manuais mundialmente utilizados para o diagnóstico dos transtornos mentais, úteis também para classificar as alterações do humor: o Manual para Diagnóstico de Doenças Mentais da Associação Americana de Psiquiatria (AAP), o DSM-IV, e o capítulo V de Transtornos Mentais e de Comportamento da décima Classificação Internacional de Doenças (CID-10) da Organização Mundial da Saúde (OMS). Uma das características fundamentais destes manuais classificatórios é a utilização de critérios diagnósticos descritivos, hierarquizados, ateoréticos e de fácil observação.

Conforme o DSM-IV e a CID-10, os transtornos do humor são uma categoria diagnóstica que engloba os transtornos do humor bipolar (mania, depressão bipolar, entre outros) e os transtornos unipolares (depressão maior e distímia). Segundo a CID-10, os transtornos afetivos ou do humor dizem respeito ao desequilíbrio do tônus emocional, consistindo de desordens psiquiátricas nas quais a perturbação fundamental é uma alteração do humor ou do afeto, em geral acompanhados de uma modificação no nível global de atividade. A maioria destes transtornos tende a ser recorrente e a ocorrência dos episódios individuais pode frequentemente estar relacionada com situações ou fatos estressantes. Dentre os transtornos afetivos encontram-se os episódios maníacos (F30), transtorno afetivo bipolar (F31), episódios depressivos (F32) e episódios depressivos recorrentes (F33) e persistentes (F34). A CID-10 inclui ainda códigos para "outros" transtornos do humor e para "transtornos não identificados".

Diferentemente das disforias encontradas no cotidiano, as quais ocorrem em resposta aos eventos diários e não apresentam conotação psiquiátrica, os transtornos afetivos apresentam um quadro duradouro, com comprometimento das condutas adaptativas.

Alterações do humor com um forte componente de irritação, amargura, desgosto ou agressividade constituem quadros disfóricos que podem estar presentes nos transtornos afetivos (Dalgarrondo, 2000). Essas desordens se apresentam principalmente como estado de depressão e/ou comportamento maníaco, onde a depressão pode ser considerada o oposto da mania, constituindo, assim, os dois extremos: inércia e atividade em grau anormal, respectivamente.

Os episódios maníacos (F30) são caracterizados pela presença de uma elevação do humor que pode variar de uma jovialidade descuidada a uma agitação praticamente incontrolável, acompanhada de um aumento da energia, levando à hiperatividade, um desejo de falar e uma redução da necessidade de sono. O paciente que sofre de mania apresenta freqüentemente um aumento da auto-estima com idéias de grandeza e superestimativa de suas capacidades; a perda das inibições sociais pode levar a condutas imprudentes, irrazoáveis, inapropriadas ou deslocadas. Tais episódios podem ou não ser acompanhados de sintomas psicóticos, onde o paciente apresenta idéias delirantes (em geral de grandeza), alucinações ou agitação, com atividade motora excessiva e com fuga de idéias de uma gravidade tal que o sujeito se torna incompreensível ou inacessível a toda comunicação normal.

O transtorno bipolar (F31) é caracterizado por dois ou mais episódios nos quais o humor e o nível de atividade do paciente estão profundamente perturbados. Este distúrbio consiste em algumas ocasiões de elevação do humor e aumento da energia e da atividade (mania) e outras, de um rebaixamento do humor e de redução da energia e da atividade (depressão).

Por sua vez, os episódios depressivos ou depressão unipolar (F32) são caracterizados por um rebaixamento do humor, redução da energia e diminuição da atividade podendo ser recorrentes (F33) ou persistentes (F34).

A seguir, a depressão, um dos principais transtornos afetivos que acometem a população mundial na atualidade, receberá um enfoque especial. O comportamento depressivo, alteração patofisiológica bastante importante para o estudo da depressão, também será abordado.

3.1.1 Depressão

A tristeza constitui-se na resposta humana universal às situações de perda, derrota, desapontamento e outras adversidades. Resposta essa que tem valor adaptativo, do ponto de vista evolucionário, uma vez que, através do retraimento, o indivíduo poupa energia e

recursos para o futuro. As reações de luto, que se estabelecem em resposta à perda de pessoas queridas, caracterizam-se pelo sentimento de profunda tristeza, exacerbação da atividade simpática e inquietude. Essas reações são normais, podendo estender-se por um ou até dois anos, devendo ser diferenciadas dos quadros depressivos propriamente ditos. Nessas situações, a pessoa usualmente preserva certos interesses e reage positivamente ao ambiente, quando devidamente estimulada. Não se observa, nesses casos, a inibição psicomotora, que é característica dos estados melancólicos.

A depressão é uma doença heterogênea e multifatorial, que envolve uma complexa interação entre fatores genéticos, desenvolvimentais e ambientais (Millan, 2006). O estado depressivo é uma alteração psicológica em que a pessoa tem um sentimento de culpa, nunca bem definido, e se sente fracassada, desesperançosa, pessimista, com baixa auto-estima, triste, melancólica e anedônica, isto é, sem interesse nos prazeres da vida. O indivíduo apresenta também alterações cognitivas, perda de interesse, diminuição da capacidade de concentração, associado em geral à fadiga, mesmo após um esforço mínimo, e lentidão psicomotora (Associação Mundial de Psiquiatria, 1997). A par do humor depressivo, que varia pouco de dia para dia ou segundo as circunstâncias, o paciente pode apresentar sintomas somáticos como fraqueza muscular, perda do apetite, perda de peso, perda da libido, distúrbios do sono, cefaléia e aumento na sensação de dor (Demyttenaere et al., 2005).

Muitas funções circadianas encontram-se alteradas na depressão, a exemplo da regulação da temperatura corporal e do ritmo de produção do cortisol (Salomon et al., 2006). Entre as alterações mais comuns estão aquelas relacionadas ao ritmo do sono. Segundo Akiskal (1995), cerca de dois terços dos pacientes deprimidos têm diminuição da latência para o início do sono REM ("Rapid Eyes Movements"). As formas ditas "melancólicas" da depressão caracterizam-se, entre outros aspectos, pela piora matinal e pelo despertar precoce pela manhã. Além disso, em alguns casos, os transtornos depressivos podem ocorrer com padrões sazonais. Estes se caracterizam por aumento dos episódios em determinadas épocas do ano, ocorrendo classicamente nos meses de outono e inverno. Podem afetar também pessoas que passam os dias em ambientes com pouca claridade, devido a doenças ou limitações físicas.

Os pacientes deprimidos também podem apresentar distúrbios cognitivos, sendo os mais frequentes as alterações subjetivas da memória, atenção e velocidade do pensamento e do raciocínio. É comum que depressões que se iniciam na terceira idade sejam confundidas com demências orgânicas (pseudodemências). Outro tipo menos frequente de alterações cognitivas são os delírios e as alucinações, presentes nos quadros psicóticos.

Assim, devido à diversidade de apresentações clínicas existentes, citadas a seguir, e em função dos diferentes sintomas que podem ser apresentados, muitas vezes o diagnóstico da depressão torna-se complicado. Diferentes pacientes apresentam subconjuntos de sintomas individuais, que podem mudar no decorrer do curso da doença e, dessa forma, podem responder de modo diferente à terapia utilizada.

Dentre as terapias atualmente usadas para o tratamento da depressão encontram-se o tratamento farmacológico, com o uso de medicamentos antidepressivos, a psicoterapia, a associação entre psico e farmacoterapia, além da eletroconvulsioterapia (ECT). Cada modalidade de tratamento tem riscos e benefícios que devem ser cuidadosamente avaliados, na escolha da melhor opção para cada paciente.

3.1.1.1 Classificação dos episódios e transtornos depressivos

A depressão maior, segundo o DSM-IV (1994), abrange uma gama muito heterogênea de condições, que vão desde as fronteiras da normalidade (reações de luto ou tristeza normal) até àquelas formas mais graves de depressão. Como esse conceito é demasiado abrangente, outras formas de classificação de depressão são comumente utilizadas. Assim, devido à diversidade de apresentações clínicas existentes, é difícil descrever um tipo clássico de depressão, o que necessita a abordagem de vários tipos de depressões.

Inicialmente, torna-se necessário diferenciar o termo “episódio” de “transtorno depressivo”. Um indivíduo que apresenta sintomas depressivos em número suficiente para realizar o diagnóstico de depressão é caracterizado como sofrendo de um episódio depressivo e a ocorrência de sucessivos episódios se caracteriza como transtorno depressivo.

Segundo a CID-10 (1999), o número e a gravidade dos sintomas permitem determinar três graus de um episódio depressivo: leve, moderado e grave. Nos episódios leves (F32.0), o paciente apresenta geralmente um ou dois sintomas depressivos, sendo que usualmente sofre com a presença desses sintomas, mas é capaz de desempenhar a maioria de suas atividades diárias. Nos episódios moderados (F32.1), geralmente estão presentes quatro ou mais dos sintomas e o paciente aparentemente tem muita dificuldade para continuar a desempenhar as atividades de rotina. Finalmente, nos episódios depressivos graves, estão presentes vários sintomas, que são marcantes, sendo que tipicamente estão presentes a perda da auto-estima e as idéias de desvalia ou culpa; as idéias e os atos suicidas são comuns e observa-se em geral uma série de sintomas somáticos, citados anteriormente. Os episódios depressivos graves podem ou não estar acompanhados de sintomas psicóticos (F32.3 e F32.2, respectivamente).

Nos quadros psicóticos, a depressão grave é acompanhada por alucinações, idéias delirantes, de uma lentidão psicomotora ou de estupor de uma gravidade tal que todas as atividades sociais normais tornam-se impossíveis; pode existir o risco de morte por suicídio, desidratação ou desnutrição.

Quando os episódios acima descritos se repetem, temos caracterizado o transtorno depressivo, que pode ser recorrente ou persistente. O transtorno depressivo recorrente (F33) pode apresentar-se com um episódio atual leve (F33.0), moderado (F33.1), grave sem sintomas psicóticos (F33.2) ou grave com sintomas psicóticos (F33.3). O transtorno pode ainda apresentar-se na forma persistente (F34), perdurando por anos ou durante a maior parte da fase adulta do paciente.

A depressão unipolar (CID-10, 1999) ou depressão maior (DSM-IV, 1994) caracteriza-se pela ocorrência de um ou mais episódios depressivos de grau leve, moderado ou grave, sem a ocorrência de episódios de mania. A depressão maior crônica é caracterizada pela presença de um episódio depressivo grave de longa duração, ou seja, que perdura por mais de dois anos. A distímia (F 34.1) é uma depressão crônica de humor, com duração de pelo menos alguns anos (dois ou mais), que não é suficientemente grave ou cujo(s) episódio(s) individual(is) não é(são) suficientemente prolongado(s) para justificar um diagnóstico de transtorno depressivo recorrente leve, moderado ou grave. Em muitos casos de distímia, o paciente se encontra deprimido há tantos anos, que pode pensar que sua tristeza e desânimo fazem parte de seu “temperamento” ou “comportamento normal”. Não é incomum que os sintomas tenham se iniciado na infância ou adolescência e o paciente procure ajuda somente na idade adulta.

3.1.1.2 Epidemiologia da depressão

A depressão é uma das doenças psiquiátricas mais comuns da atualidade, afetando mais de 21% da população mundial (McKenna et al., 2005). Essa doença atinge 121 milhões de pessoas ao redor do mundo e está entre as principais causas que contribuem para a incapacitação de um indivíduo. A OMS prevê que até o ano de 2030 a depressão passe a ser a maior causa de incapacidade e perda de qualidade de vida, afetando mais pessoas do que qualquer outro problema de saúde, incluindo câncer e doenças cardíacas.

Segundo a OMS, a depressão será também a doença que mais gerará custos econômicos e sociais para os governos, devido aos gastos com tratamento para a população e às perdas de produção. Entre a população clínica, ou seja, os pacientes ambulatoriais e

internados, os quais são acometidos por outro tipo de doença, a prevalência de depressão é ainda maior, afetando cerca de 25 % dessas pessoas. Dessa forma, os custos médicos com os serviços primários de saúde podem ser maiores na comorbidade entre depressão e outras doenças clínicas (Katon, 2003).

Estima-se que cerca de 17 milhões de brasileiros sofram de depressão e de acordo com um levantamento feito pelo Instituto Nacional de Seguro Social (INSS), 74.418 trabalhadores foram afastados de suas atividades em 2008 em decorrência dessa doença. Segundo o Ministério da Previdência, só em junho de 2008 foram destinados cerca de R\$ 12 milhões no pagamento de benefícios aos afastados por depressão. Além disso, na fase aguda dessa doença, são comuns os pensamentos e/ou tentativas de suicídio. Estudos recentes indicam que os pacientes com transtornos afetivos apresentam risco de suicídio mais elevado que a população em geral (Rihmer et al., 2010) e estima-se que cerca de 50% dos pacientes depressivos façam pelo menos uma tentativa de suicídio durante a vida (Angst, 1999).

A depressão pode ocorrer tanto em homens como em mulheres, de todas as idades e de qualquer classe social. No entanto, a incidência é muito maior entre as mulheres do que entre os homens, sendo que a proporção é de dois casos entre elas para cada caso entre eles (Weissman et al., 1996; Bebbington, 2004). Essa desproporção homem/mulher ocorre no período reprodutivo, sendo as prevalências semelhantes antes da puberdade e também após alguns anos da transição menopausal (Demetrio e Vieira, 2001; Diflorio e Jones, 2010). Ainda não existe uma explicação científica que justifique o fato de a mulher ser mais sensível à depressão, mas embora fatores socioculturais tenham sua contribuição, é inegável a importância dos hormônios femininos (estrógeno e progesterona) na gênese desta vulnerabilidade (Mariko et al., 2010). O papel central do estrógeno nos ritmos biológicos femininos (menstruação e menopausa) pode desestabilizar ou sensibilizar mecanismos de neurotransmissão, neuroendocrinológicos e dos 'relógios biológicos', contribuindo para o desenvolvimento de transtornos cíclicos do humor (Demetrio e Vieira, 2001).

A associação de experiências precoces na vida e aparecimento posterior de um transtorno depressivo tem interessado os estudiosos. Os levantamentos epidemiológicos demonstram risco aumentado para depressão e sintomas depressivos em indivíduos que relatam acontecimentos negativos na vida (Mitchell et al., 2003; Spinhoven et al., 2010). Os separados e divorciados estão mais propensos a sintomas e quadros depressivos do que os solteiros e casados. A perda parental antes da adolescência, assim como um ambiente familiar disfuncional e com muitas privações são fatores de risco já estabelecidos (Mitchell et al., 2003). Há um achado considerável de história familiar de transtornos de humor em indivíduos

afetados, especialmente em parentes de 1º grau, assim como história familiar de suicídio e alcoolismo (Millan, 2004). No entanto, a transmissão genética de depressão ainda não está determinada.

3.1.1.3 Depressão associada a outras doenças humanas

A depressão pode estar relacionada à progressão e/ou desenvolvimento de outras doenças humanas como câncer (Lazure et al., 2009), doenças endócrinas (Musselman et al., 2003; Peyrot, 2003) e cardiovasculares (Musselman et al., 1998), e é considerada um importante fator de risco para o desenvolvimento de doença arterial coronária (Kendler et al., 2009) e isquemia cerebral (Neu, 2009).

Estudos demonstram que há uma elevada incidência de co-morbidade nos estados depressivos (Kessler et al., 1996), que podem estar acompanhados de outras desordens do Sistema Nervoso Central (SNC) como ansiedade, síndrome do pânico, doenças de Parkinson e Alzheimer, bem como de doenças somáticas como doenças cardiovasculares, diabetes, osteoporose, hepatite e dor crônica (Kessler et al., 1996; Millan, 2006). Assim, além de ser um importante fator de risco para o desenvolvimento de patologias, em muitos casos a depressão pode aparecer durante o curso de outras doenças, piorando diversos fatores relacionados à saúde dos pacientes.

É de grande importância o documentado aumento da mortalidade e morbidade de pacientes cardíacos deprimidos. A mortalidade destes pacientes pode ser 3,1 vezes maior comparado a cardiopatas não deprimidos, independentemente da gravidade cardiológica e da disfuncionalidade clínica. Interessantemente, em alguns estudos o tratamento adequado da depressão promoveu a melhora da morbimortalidade cardiovascular em pacientes com as respectivas co-morbidades (Glassman et al., 2002).

Os pacientes acometidos por diabetes mellitus que são depressivos apresentam pior controle glicêmico e maior prevalência de complicações múltiplas do diabetes, como retinopatia, nefropatia, neuropatia, disfunção sexual e complicações macrovasculares, em comparação aos pacientes não deprimidos (De Groot et al., 2001; Peyrot, 2003). Os mecanismos biológicos envolvidos nesta associação ainda não estão claros, mas algumas evidências sugerem que as alterações hormonais, principalmente a hipercortisolemia, além do aumento da ativação imunoinflamatória poderiam explicar o maior risco de diabetes em deprimidos, e alterações do transporte de glicose em regiões específicas do cérebro poderiam

ocorrer em pacientes diabéticos, favorecendo o desencadeamento da depressão (Musselmann et al., 2003).

A avaliação adequada dos sintomas depressivos em pacientes com condições médicas associadas é dificultada pela superposição dos sintomas da patologia clínica (fadiga, inapetência, dor, insônia, lentificação), bem como de condições associadas à internação e à percepção das consequências adversas das doenças (desalento e baixa auto-estima). Esses fatos podem, portanto, induzir a erros, podendo retardar o diagnóstico e o tratamento da depressão, postergando a melhora do paciente e a cura clínica.

3.1.1.4 Causas da depressão

As causas da depressão ainda permanecem desconhecidas. Estudos sugerem o envolvimento de várias vias neurais no desenvolvimento dessa doença, sendo que a hipótese das monoaminas, baseada na deficiência de monoaminas, como serotonina (5-HT), noradrenalina (NA), adrenalina (AD) e dopamina (DA), é comumente utilizada para explicar a gênese dos transtornos depressivos (Millan, 2006). Várias drogas que interferem com esses sistemas desempenham efeito antidepressivo e são atualmente utilizadas na terapia da depressão. Em contraste, recentemente descobriu-se novas drogas clinicamente efetivas que desempenham seu efeito antidepressivo por mecanismos não-monoaminérgicos (Bosker et al., 2004). Outros neurotransmissores, incluindo o L-glutamato, neuropeptídeos como a colecistocinina e o hormônio liberador de corticotropina, também parecem estar envolvidos com os transtornos depressivos (Millan, 2004). No entanto, o fato que culmina com a alteração nesses sistemas, sejam eles monoaminérgicos ou não, ainda não é bem entendido e é alvo de vários estudos sobre o assunto.

Os eventos desencadeantes da depressão são muito estudados e de fato encontrou-se relação entre certos acontecimentos estressantes na vida dos indivíduos e o início de um episódio depressivo (Mitchell et al., 2003). O desencadeamento de um transtorno depressivo é, muitas vezes, conseqüente a um fator estressante, que são denominados estressores sociais. Eles são os acontecimentos vitais, os estresses crônicos e os problemas cotidianos. Os acontecimentos vitais são mudanças claras nos padrões de vida que alteram o comportamento habitual e ameaçam o bem-estar do indivíduo. O luto é um exemplo típico de acontecimento vital, assim como a aposentadoria. Os estresses crônicos compreendem aquelas situações de longa duração que desafiam o indivíduo, tais como dificuldade financeira, perda do emprego, conflito interpessoal constante, como problemas matrimoniais, e ameaça persistente à

integridade, como viver em um ambiente perigoso e o acometimento por doenças graves. Os problemas cotidianos são acontecimentos comuns, porém estressantes, que fazem parte da vida moderna, como o trânsito, vizinhos desagradáveis, etc. No entanto, a percepção que o indivíduo tem de um acontecimento é provavelmente muito mais importante que o próprio acontecimento.

Os eventos estressantes da vida cotidiana provavelmente “disparam” o desenvolvimento da depressão em pessoas predispostas e/ou vulneráveis. O fato, no entanto, responsável por tornar as pessoas vulneráveis a esses eventos ainda é objeto de estudos. Trabalhos recentes mostraram a influência genética (Kendler et al., 2001; Smits et al., 2004) e de fatores ambientais durante a infância (Heim e Nemeroff, 2001; Mitchell et al., 2003; Spinhoven et al., 2010) na gênese da depressão. Outros trabalhos demonstraram que alguns tipos de depressão são mais frequentes em determinadas famílias, sugerindo que a vulnerabilidade biológica (isto é, a propensão ou sensibilidade do organismo à doença) seja transmitida geneticamente (Kendler et al., 2001; Caspi et al., 2003). Outra evidência que reforça um fator genético para o desenvolvimento de depressão é que indivíduos que apresentam histórico familiar de mania, depressão e alcoolismo tem uma maior probabilidade em desenvolver essa doença. Essa propensão genética também pode ser evidenciada em animais experimentais. Muitos trabalhos utilizam-se de modelos genéticos em roedores e primatas, principalmente, com a finalidade de estudar prováveis causas e terapias para essa doença (Willner e Mitchell, 2002). Os polimorfismos dos genes que codificam a síntese de 5-HT e de seus transportadores (5-HTT) são os mais estudados atualmente, e fortes evidências sugerem que eles podem estar associados com a vulnerabilidade da depressão (Lesch et al., 1996; Caspi et al., 2003; Millan, 2004; Canli and Lesch, 2007).

Outra possível causa de depressão são anomalias neuroendócrinas. Elas são encontradas em alguns pacientes deprimidos e incluem aumento da secreção de cortisol e alterações da função tireoidiana. Confirmando esta teoria, há o fato de que mulheres com tendência a depressão são particularmente vulneráveis ao desenvolvimento de depressão pós-parto, provavelmente em razão de alterações hormonais (Mariko et al., 2010).

Ainda, evidências provenientes de relatos de casos sugerem que determinados episódios depressivos podem ser secundários ao uso de determinados medicamentos (Millan, 2004). Há relatos de desenvolvimento de depressão após o uso de drogas que interferem com o sistema cardiovascular (como alfa-metildopa, reserpina, propranolol, clonidina, diuréticos tiazídicos e bloqueadores de canais de cálcio), bem como uso contínuo de hormônios (como anticoncepcionais orais, esteróides anabolizantes, hormônios tireoidianos e corticóides),

psicotrópicos (como benzodiazepínicos, neurolépticos, anfetaminas, anticonvulsivantes, L-Dopa e cocaína), além de antineoplásicos e antibióticos (Botega et al., 2002). No entanto, não há comprovação definitiva de tais efeitos por ensaios clínicos ou pré-clínicos.

3.1.1.4.1 A Hipótese das Monoaminas

A Hipótese Monoaminérgica da depressão postula que a depressão se deve à deficiência de neurotransmissores em sinapses monoaminérgicas (Schildkraut, 1965). Nos anos 60, após a introdução no mercado dos primeiros medicamentos com efeito antidepressivo, constatou-se que eles interagiam com sistemas de monoaminas (principalmente serotonina e noradrenalina), que atuam como neurotransmissores em sinapses nervosas. A serotonina (5-HT) e a noradrenalina (NA) são liberadas em todo o cérebro por neurônios de regiões específicas e interagem com múltiplos tipos de receptores cerebrais para regular a vigília, alerta, atenção, processos sensoriais, apetite e também o humor, dentre outras funções (Murphy et al., 2008).

Esses neurotransmissores são removidos das sinapses após sua liberação, por um processo de recaptação pelo neurônio pré-sináptico. Após a recaptação, são degradados no neurônio pré-sináptico pela ação da enzima monoaminoxidase (MAO), ou são "re-embaladas" em vesículas, para serem liberadas na fenda sináptica novamente. Os dois mecanismos produzem um controle nos níveis de neurotransmissores presentes na fenda sináptica. Esta constatação sugeriu inicialmente que os antidepressivos atuassem por aumento da transmissão serotoninérgica e noradrenérgica, compensando um possível estado de deficiência de neurotransmissores (Schildkraut, 1965; Van Praag e Korf, 1971).

O sistema dopaminérgico, embora menos estudado, também parece desempenhar um importante papel na patofisiologia da depressão. A hipótese dopaminérgica baseou-se no aumento da resposta comportamental devido ao uso continuado dos ADTs, que também atuam na neurotransmissão da dopamina (Muscat et al., 1990).

A partir de 1965, várias evidências reforçaram a hipótese das monoaminas na gênese da depressão. Por exemplo, drogas que depletam os níveis cerebrais desses neurotransmissores, como a reserpina, são capazes de induzir depressão. Além disso, estudos relataram anormalidades nos metabólitos das aminas biogênicas, como o 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol (MHPG), metabólito da NA, ácido 5-hidroxiindol acético (5HIAA), metabólito da 5-HT e ácido homovanílico (HVA), metabólito da DA, no sangue, urina e líquido de pacientes deprimidos. Trabalhos demonstraram que os precursores da 5-HT, L-

triptofano e 5-hidroxi-triptofano apresentam efeito antidepressivo leve e que a privação aguda de triptofano causa recidiva em 80% dos pacientes deprimidos (Akiskal., 1995; Gutierrez-Garcia e Contreras, 2008). Somando-se a isso, já foi demonstrada a redução da concentração de 5-HT e seu principal metabólito, o 5HIAA, no cérebro de vítimas de suicídio e no líquor de pacientes deprimidos (Ruhe et al., 2007).

Apesar da relevância da hipótese das monoaminas na investigação da depressão, atualmente existe certa resistência para sua plena aceitação, especialmente devido ao fato de que todos os medicamentos antidepressivos aumentam, de imediato, o nível desses neurotransmissores na fenda sináptica, porém seu efeito clínico só ocorre algumas semanas depois (Millan, 2004). Outras substâncias, como por exemplo, a cocaína, também elevam os níveis das monoaminas, mas não apresentam efeito antidepressivo (Stahl, 1998). Desse modo, o conhecimento atual da complexa inter-relação entre os sistemas de neurotransmissão cerebrais restringiu as hipóteses de déficits de neurotransmissores nas fendas sinápticas a concepções simplistas e uma de suas consequências foi que o foco das hipóteses biológicas da depressão também foi abrangido para os receptores dos neurotransmissores.

3.1.1.4.1.1 A Serotonina

A serotonina, quimicamente denominada 5-hidroxitriptamina (5-HT) (Figura 1, página 31), modula muitos processos do organismo envolvidos na saúde e na doença (Williams, 1994; Williams et al., 2001). Estudos que iniciaram na década de 40 identificaram a 5-HT como sendo uma substância endógena vasoconstritora (Rapport et al., 1948; Erspamer, 1954; Page, 1976; Rapport, 1997). Em 1948, foi pela primeira vez isolada, identificada e sintetizada (Rapport et al., 1948). A partir daí, estudos têm demonstrado o importante papel da 5-HT também a nível de SNC, atuando como um neurotransmissor. Hoje se sabe que como resultado da liberação de 5-HT dos terminais nervosos em praticamente todas as regiões do SNC, o sistema serotoninérgico está envolvido em muitas funções fisiológicas importantes como o controle da pressão arterial, temperatura corporal, apetite, liberação de hormônios, percepção da dor e comportamento emocional (Williams, 1994; Williams et al., 2001). Conseqüentemente, esse sistema também tem papel na patogênese de doenças onde há um distúrbio dessas funções, por exemplo, hipertensão, disfunção hormonal, ansiedade e depressão.

Um grande número de estudos experimentais e clínicos indica que o sistema da 5-HT está fortemente implicado na regulação neural do humor e várias evidências têm relacionado

as anormalidades da neurotransmissão serotoninérgica com a fisiopatologia da depressão (Wong e Licinio, 2001; Millan, 2006). Trabalhos em humanos sugerem que uma deficiência na função serotoninérgica cerebral pode induzir distúrbios emocionais similares àqueles observados na depressão, os quais podem ser visíveis mesmo na ausência de mudanças evidentes no humor (Harmer, 2008). Além disso, trabalhos recentes afirmam que a serotonina está envolvida na vulnerabilidade aos transtornos de humor (Ruhe et al., 2007). Vários trabalhos indicam que um aumento da neurotransmissão serotoninérgica ocorre em resposta a determinados tratamentos antidepressivos. Além disso, drogas que afetam a transmissão da 5-HT, seja inibindo sua recaptação ou seu metabolismo, são eficazes na depressão (Nemeroff e Owens, 2002).

A síntese da 5-HT no cérebro é dependente da disponibilidade do seu aminoácido precursor, o triptofano, a partir do plasma (Harmer, 2008). Esse neurotransmissor é formado pela hidroxilação e descarboxilação do triptofano, um processo que ocorre tanto no SNC como nas células entéricas do intestino, podendo ser dividido em dois passos: primeiro, o triptofano sofre uma hidroxilação no anel aromático catalizada pela enzima L-triptofano-5-monooxigenase (TrpOH); segundo, o 5-hidroxi-L-triptofano sofre uma descarboxilação, que é catalizada pela L-aminoácido descarboxilase (Figura 1, página 31). No entanto, uma pequena quantidade de triptofano atravessa a barreira-hematoencefálica, estando disponível para a síntese de 5-HT no cérebro. Dessa forma, a formação do 5-hidroxi-L-triptofano é o passo limitante da reação, uma vez que existe uma fraca disponibilidade de L-triptofano nos neurônios, devido a difícil transição por transporte ativo desse aminoácido pela barreira hemato-encefálica pela competição com outros aminoácidos neutros circulantes no sangue como leucina, lisina e metionina. Assim, a maioria da 5-HT sintetizada, cerca de 90%, é encontrada nas células enterocromafins da região gastrointestinal, sendo que uma menor concentração é encontrada nas plaquetas e no sistema nervoso central.

Embora o triptofano não apresente um efeito consistente sobre o humor em indivíduos saudáveis, a depleção desse precursor da síntese de 5-HT diminui transitoriamente o humor em indivíduos depressivos em recuperação (Ruhe et al., 2007). Dessa forma, recentemente a depleção de triptofano tem sido utilizada como ferramenta experimental para estudar o papel da 5-HT nos processos emocionais em humanos (Booij et al., 2003). Do mesmo modo, em animais, a inibição da síntese de 5-HT por determinadas drogas também pode ser usada para o estudo do envolvimento do sistema serotoninérgico no efeito antidepressivo de drogas (Nakatomi et al., 2008; Ulak et al., 2010).

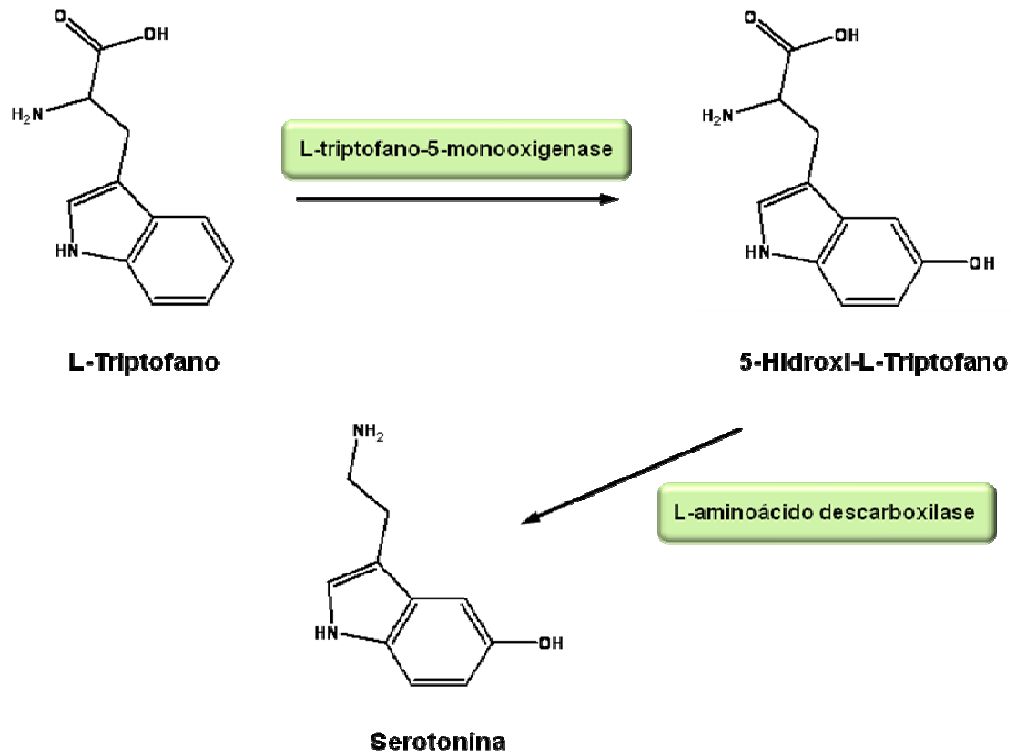


Figura 1. Síntese do neurotransmissor Serotonina (5-HT) a partir do aminoácido triptofano.

Após a síntese, o neurotransmissor 5-HT é armazenado em vesículas sinápticas. Com o potencial de ação, a 5-HT pode ser liberada do neurônio pré-sináptico na fenda sináptica, onde pode ser degradada enzimaticamente, ser recaptada por um transportador específico ou ainda desempenhar suas funções pela ligação a receptores pós ou pré-sinápticos.

Hoje se sabe que a 5-HT pode influenciar a atividade neuronal pela ativação de 14 subtipos de receptores de 5-HT que são genética-, farmacológica- e funcionalmente distintos, sendo, por este motivo, distribuídos em 7 famílias diferentes que vão desde a família 5-HT₁ até 5-HT₇ (Langer, 1980; Hoyer et al., 1994; Baumgarten and Göthert, 1997; Barnes e Sharp, 1999; Hoyer et al., 2002; Sari, 2004; Bockaert et al., 2006). A ligação da 5-HT a seus receptores promove efeito através da abertura dos canais de Ca⁺⁺ relacionados a essas proteínas. A ativação desses receptores resulta em grande parte dos efeitos centrais e periféricos desempenhados pela 5-HT e também pode estar envolvida no efeito de drogas antidepressivas (Millan 2006; Harmer, 2008). Além disso, muitos desses receptores podem ser encontrados em neurônios pré-sinápticos, modulando a liberação de outros neurotransmissores como NA, Acetilcolina (Ach), Dopamina (DA) e GABA (Harmer, 2008).

Após a liberação no terminal sináptico, a 5-HT pode ser recaptada novamente pelo neurônio pré-sináptico através de uma proteína transportadora. O transportador de 5-HT está

localizado tanto na porção terminal do axônio, quanto no corpo do neurônio, trazendo esse neurotransmissor de volta para dentro do neurônio, via um mecanismo de captação. Esse processo, denominado recaptação de serotonina, é um mecanismo muito importante que a célula utiliza para voltar à sua condição de descanso, se tornando capaz de ser estimulada de novo, e evitando a super-estimulação dos receptores (Kriegebaum et al., 2010). A captação de 5-HT é um dos principais alvos das terapias envolvendo a depressão. No entanto, os mecanismos moleculares pelos quais as drogas antidepressivas inibem o transportador de 5-HT ainda é objeto de estudos.

3.1.1.4.1.1.1 O Transportador de Serotonina

O transportador de 5-HT é codificado pelo gene SLC6A4, que está localizado no braço longo do cromossomo 17 (17q11.1-17q12) e organizado em 14 exons (Figura 3, página 33). A sequência transcrita do gene SLC6A4 produz uma proteína composta de 630 aminoácidos com 12 segmentos transmembrana, um *loop* extracelular e os domínios amino e carboxi-terminal situados na porção intracelular (Figura 2, página 33) (Murphy, 2008).

O polimorfismo do gene SLC6A4 pode afetar tanto a expressão como a função do transportador de 5-HT e tem sido alvo de estudos envolvendo a neurobiologia de muitas doenças psiquiátricas (Lesch et al., 1996; Canli and Lesch, 2007). Um dos principais polimorfismos envolvendo este gene está na sua região promotora, que é descrito como uma inserção/deleção de 44 pares de base (pb), pode se apresentar sob duas formas: a variante “longa” (**L**) do gene possui uma atividade basal cerca de três vezes maior que a variante “curta” (**S**), que apresenta a deleção de uma base do código, alterando a regulação deste gene (Lesch et al., 1996) (Figura 3, página 33). Assim, indivíduos com o genótipo **L/L** apresentam uma capacidade de captação de 5-HT máxima maior e, portanto, uma redução nos níveis de 5-HT extracelulares, quando comparados aos que apresentam os genótipos **L/S** ou **S/S** (Nobile et al., 1999, Greenberg et al., 1999). A baixa expressão da variante **S** está associada a um maior fator de risco para o desenvolvimento de doenças afetivas como ansiedade, depressão e transtorno bipolar (Canli e Lesch, 2007).

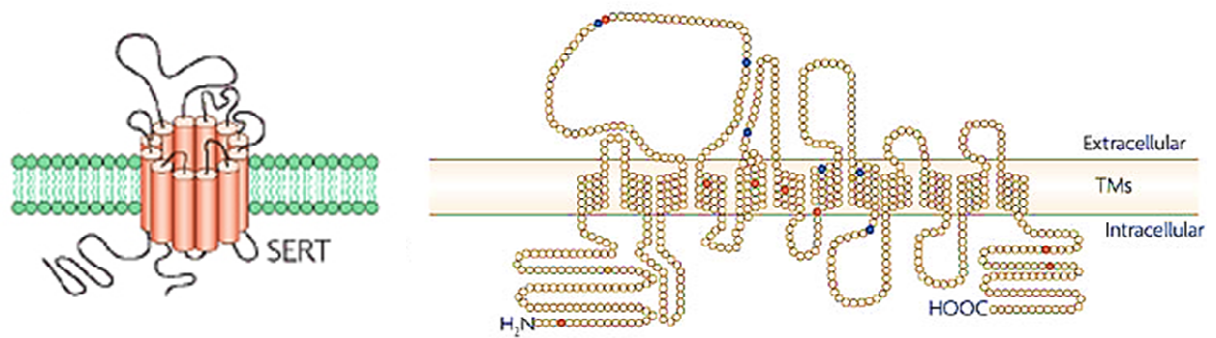


Figura 2. Representação esquemática do transportador de 5-HT, mostrando suas 12 porções transmembrana, o *loop* extracelular e os domínios amino e carboxi-terminal intracelulares. SERT: Transportador de 5-HT. FONTE: Murphy, 2008.

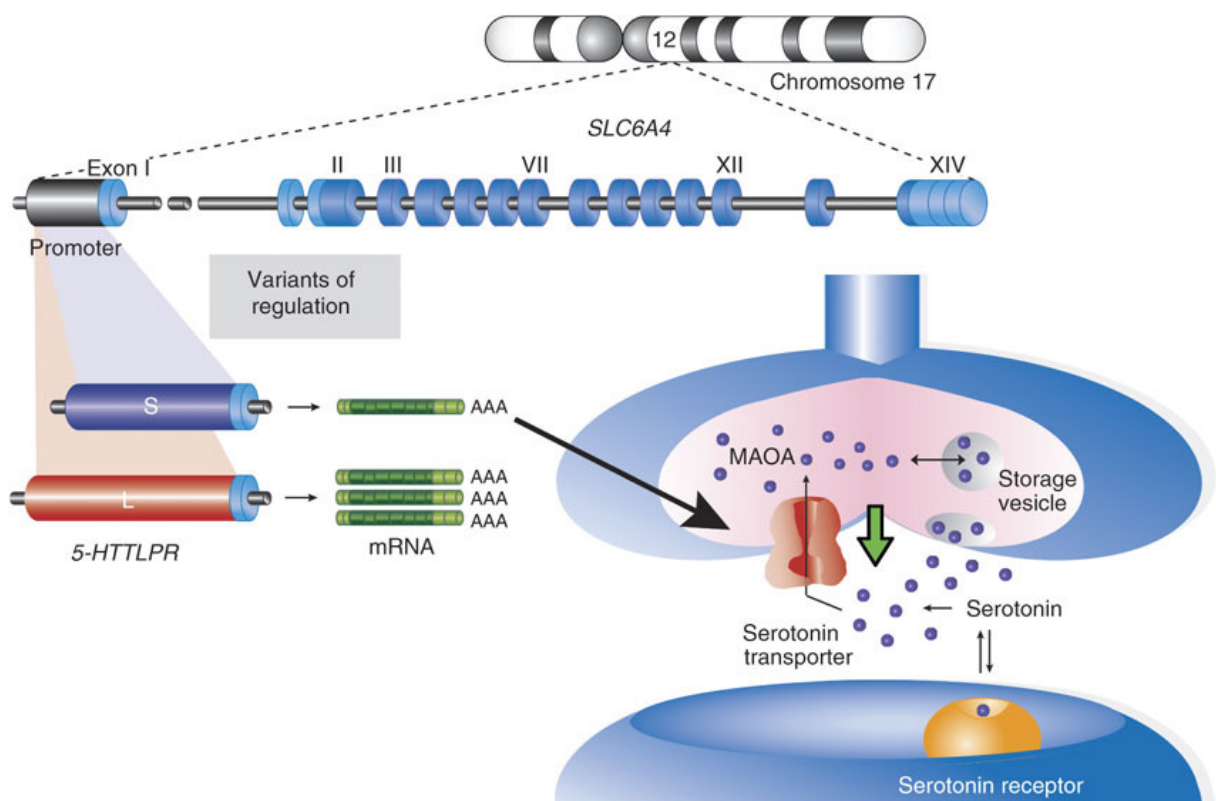


Figura 3. Variantes do gene SLC6A4. A variante S (lilás) produz significativamente menor quantidade de RNAm que codifica para o transportador de 5-HT, em comparação a variante L (vermelho), levando a maiores níveis de 5-HT na fenda sináptica. 5-HTTLPR: Variante polimórfica L do transportador de 5-HT. FONTE: Canli e Lesch, 2007.

3.1.1.5 Tratamento da depressão

Os principais objetivos do tratamento da depressão são eliminar os sintomas, restaurando a atividade psicossocial e ocupacional ao estado pré-sintomático, e reduzir a probabilidade de recaída e recorrência. O tratamento antidepressivo eficaz deve eliminar gradual e completamente os sintomas, melhorar o funcionamento ocupacional e interpessoal, reduzir o risco potencial de suicídio, racionalizar os recursos e reduzir o uso dos serviços de saúde (Millan, 2006).

Existem várias opções para o tratamento da depressão, incluindo terapia cognitiva comportamental, psicoterapia interpessoal, medicamentos, terapia eletroconvulsiva e a combinação das terapias com os antidepressivos. O tratamento psicoterápico é de grande importância no sentido de promover e auxiliar a reorganização psíquica do indivíduo, tanto pela abordagem psicológica como psiquiátrica, podendo ser associado com os medicamentos.

A terapia eletroconvulsiva, introduzida na década de 30, foi o primeiro tratamento efetivo no combate à depressão (UK ECT Review Group, 2003). O choque elétrico provoca uma convulsão de curto período, que induz a liberação de neurotransmissores, promovendo a estimulação direta de estruturas encefálicas. Todavia, hoje é utilizada como opção de tratamento se os medicamentos existentes não oferecerem uma resposta satisfatória. Em depressões graves com risco de suicídio, com características psicóticas e em grávidas, a eletroconvulsoterapia é uma excelente opção desde que seja administrada de forma ética com anestesia, pessoal treinado e ambiente apropriado (Kho et al., 2003). Outros medicamentos como, por exemplo, os anticonvulsivantes, não apresentam efeitos antidepressivos robustos, mas podem ser úteis em alguns casos em combinação com antidepressivos.

Atualmente, a terapia farmacológica é a forma mais utilizada para o tratamento da depressão (Millan, 2004, 2006). Os antidepressivos produzem, em média, uma melhora dos sintomas depressivos de 60% a 70% enquanto a taxa de placebo é em torno de 30%. Esta taxa de melhora dificilmente é encontrada em outras abordagens terapêuticas de depressão, motivo que faz com que a terapia medicamentosa seja a mais usada. A escolha do medicamento é baseada nas características da depressão, presença de efeitos colaterais, risco de suicídio, terapia concomitante, tolerabilidade, custo, danos cognitivos, etc. O antidepressivo ideal deveria ser eficaz em todas as formas de depressão, inclusive as severas, não ter qualquer efeito colateral, ter custo baixo, poucas interações medicamentosas, poder ser aplicado em todas as idades, melhorar a qualidade do sono, ter posologia fácil e efeito ansiolítico. No entanto, uma droga com todas essas atribuições ainda não está presente no mercado.

3.1.1.5.1 Drogas antidepressivas

Os antidepressivos são um grupo heterogêneo de medicamentos com efeitos terapêuticos em comum, sendo que os mais importantes estão relacionados à terapia da depressão. A maioria desses fármacos também é eficaz no tratamento de outros transtornos afetivos (Smits, 2010). No entanto, embora não se conheça o exato mecanismo de ação desses medicamentos, sabe-se que a maioria deles interage com sistemas de neurotransmissão monoaminérgica cerebral, particularmente com a 5-HT e a NA. Assim, a classificação mais usada dos antidepressivos tem sido baseada no neurotransmissor envolvido em seu mecanismo de ação.

O desenvolvimento de drogas específicas para o tratamento da depressão ocorreu no final da década de 50 do século passado, com a descoberta dos IMAO (Inibidores da Monoaminoxidase) e os antidepressivos tricíclicos (ADT). Ambos os mecanismos aumentam a disponibilidade de NA e 5-HT em certas estruturas do encéfalo, sendo mais potentes e mais eficazes em formas graves de depressão. Porém, estas duas classes de drogas antidepressivas, além de apresentarem muitos efeitos adversos estão associadas com efeitos secundários devido ao risco de interação com outros medicamentos e alimentos. Além dos efeitos colaterais, em superdose, são cardiotoxicos, e têm apresentado risco potencial em pacientes com tendência suicida. Além disso, têm posologia bastante variável, sendo que a dose é ajustada individualmente, e devem ser introduzidos de forma gradual e lenta. Particularmente os IMAOs, por causa de sua toxicidade e risco, são reservados a pacientes refratários (Millan, 2006).

O lítio, introduzido em 1949, e comumente conhecido como “estabilizador do humor” é utilizado para o tratamento agudo da mania e transtornos bipolares, além de ser utilizado em regimes combinados, ou quando pessoas com depressão não respondem ao tratamento com antidepressivos (Millan 2006).

A busca de novos medicamentos foi alcançada na década de 80, com os antidepressivos de segunda geração, denominados inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRSs), sendo atualmente os mais empregados para o tratamento da depressão. Os ISRSs e outros recentemente descobertos como bupropiona, mirtazapina, reboxetina e venlafaxina, têm um perfil mais favorável, com menos (porém não ausentes) efeitos colaterais e maior facilidade de administração, ou seja, menor variabilidade de doses (Chavez-Leon et al., 2008). Por isto, são preferíveis aos ADT como primeira opção, particularmente em

pacientes mais sensíveis ou de maior risco, como idosos ou pacientes com doenças físicas. Por outro lado, em geral, as drogas recentemente descobertas são mais caras.

3.1.1.5.1.1 Inibidores Seletivos da Recaptação de 5-HT (ISRSs)

Os ISRSs são a primeira classe de fármacos psicotrópicos a serem racionalmente desenhados, e representam a classe de antidepressivos amplamente prescritos atualmente em muitos países (Preskorn, 2004; Chavez-Leon et al., 2008). A fluoxetina (Figura 4A) foi o primeiro representante desta classe aprovada pela *Food and Drug Administration* - FDA em 1987, sob o nome comercial de Prozac[®]. A partir daí uma série de outros fármacos ganharam o mercado: Sertralina (Zoloft[®]), em 1991, citalopram (Cipramil[®], Figura 4C), em 1998, paroxetina (Aropax[®], Figura 4B) em 1992 e escitalopram (Lexapro[®]), em 2002.

Os ISRSs aumentam a concentração extracelular de 5-HT ao inibir a sua recaptação pelo neurônio pré-sináptico, aumentando o nível de 5-HT disponível para se ligar ao receptor pós-sináptico. Essas drogas não interferem ou interferem pouco com os demais neurotransmissores além da 5-HT (Chavez-Leon et al., 2008). De fato, muitos estudos pré-clínicos já demonstraram um aumento na concentração cerebral de 5-HT após o tratamento crônico ou agudo com fluoxetina, paroxetina e citalopram (Figura 4) (Invernizzi et al., 1997; Beyer et al., 2002; Koch et al., 2002; Nakayama, 2002).

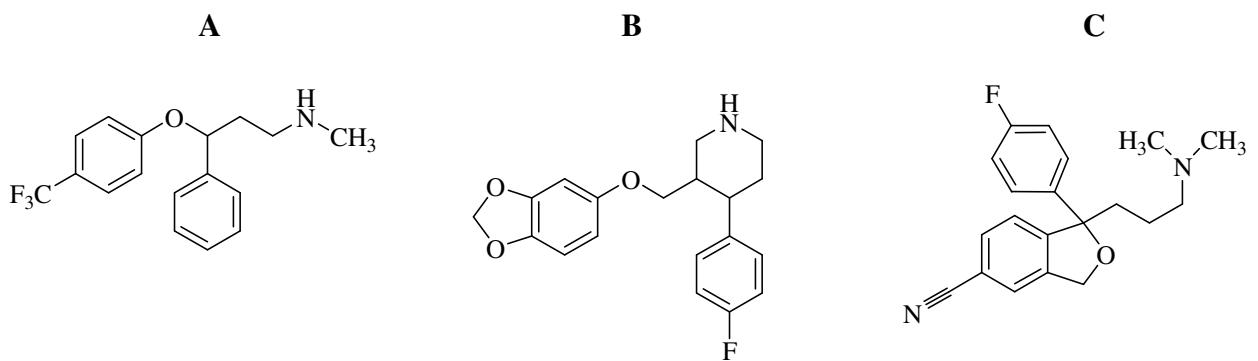


Figura 4. Estrutura química de drogas que inibem seletivamente a recaptação de 5-HT (ISRSs): fluoxetina (A), paroxetina (B) e citalopram (C).

O exato mecanismo pelo qual essas drogas inibem a recaptação de 5-HT ainda é desconhecido, mas a modulação da atividade do transportador de 5-HT tem sido proposta. Alguns autores sugerem que a inibição possa ocorrer por um mecanismo competitivo dos ISRSs pelo sítio de ligação da 5-HT (Apparsundaram et al., 2008; Chavez-Leon et al., 2008).

Outros trabalhos tem sugerido que o transportador também possui um sistema redox de regulação, que pode estar envolvido no mecanismo de ação de muitas drogas (Bosin e Schaltenbrand, 1991). Evidências já revelaram que o transportador de 5-HT também pode estar sujeito a uma modulação alostérica, capaz de controlar a taxa de associação e/ou dissociação dos ligantes a essa proteína (Chen et al., 2005). O citalopram (Figura 3C), a droga mais seletiva entre os inibidores da recaptação de 5-HT (Millan et al., 2001), apresenta pelo menos dois sítios de ligação ao transportador: um sítio primário, de maior afinidade, e um sítio secundário, que controla a ligação dos ligantes ao sítio principal (Plenge et al., 1991).

Recentes estudos tem demonstrado que a resposta ao tratamento com ISRSs depende da variabilidade de genes codificantes de proteínas envolvidas com o papel da serotonina no cérebro. Como já mencionado anteriormente, tem sido demonstrado que não são apenas os eventos estressantes que resultam em depressão, e, recentemente, percebeu-se que a sensibilidade a esses eventos tem relação com a genética individual. Então, interações entre diferentes genes podem resultar em uma mudança dramática tanto no risco de desenvolver a patologia, quanto na resposta farmacológica (Kendler et al., 2001; Caspi et al., 2003). Com os avanços conquistados a partir do Projeto Genoma Humano, foi possível detectar essas variações, e várias delas mostraram ter importância farmacogenética, sendo que alguns dos genes relacionados à farmacogenética dos ISRSs já são conhecidos (Lesch e Gutknecht, 2004). Essas modificações genéticas tem sido alvo de estudos acerca do desenvolvimento de novas drogas ISRSs para o tratamento da depressão no futuro (Weele et al., 2000).

3.2 Modelos experimentais para o estudo da depressão

Os sintomas da depressão em humanos, como descritos no DSM-IV, são muito difíceis de reproduzir em animais de laboratório. Considerar que um animal está deprimido não é tarefa fácil. Entretanto, existe a hipótese de que algumas espécies de animais podem exibir alterações de comportamento do tipo depressivo (do inglês, *depressive-like*), ou seja, parecido com alguns comportamentos apresentados pelos humanos e descritos nos manuais anteriormente apresentados.

Até a década de 90, mais de 20 modelos animais de depressão já tinham sido desenvolvidos e vários modelos experimentais têm sido validados para o estudo do comportamento depressivo, principalmente em roedores (Willner e Mitchell, 2002; Duman, 2010). Estes testes possibilitam a triagem de novas drogas com efeito antidepressivo e permitem o estudo de teorias relacionadas à etiologia de depressão. Os modelos diferem no

grau em que eles produzem características que se assemelham a um estado do tipo depressivo e testes que incluem a exposição ao estresse são amplamente utilizados (Duman, 2010). Em geral, os animais são expostos a um evento estressante inescapável e o comportamento deste animal frente a esse evento é avaliado.

Paradigmas que empregam a exposição ao estresse agudo ou subcrônico incluem o desamparo aprendido, o teste do nado forçado (TNF) e o teste da suspensão da cauda (TSC), que empregam a exposição a curto prazo ao estresse inevitável e incontrolável e podem prever a resposta dos animais a uma droga antidepressiva. Modelos a longo prazo incluem o estresse crônico moderado, estresse na infância e modelos de conflito social, que podem simular os processos que levam à depressão (Duman, 2010).

Dentre os modelos a curto prazo amplamente utilizados no estudo da depressão em roedores, o TSC e o TNF são os mais utilizados. Os critérios para validação desses modelos são adotados quanto à previsibilidade, semelhança e homologia. Outros modelos como, por exemplo, confronto, isolamento e interação social, que são modelos de estresse psicossocial, também são utilizados. Porém muitos destes modelos não respondem completamente aos antidepressivos com efeito comprovado e usados atualmente na clínica, requisito este que é essencial para a validação (Duman, 2010).

3.2.1 Teste do nado forçado (TNF)

O TNF é um dos modelos mais tradicionais para o estudo da depressão em animais de laboratório, por apresentar alto valor preditivo devido à resposta aos medicamentos antidepressivos existentes. Proposto por Porsolt e colaboradores, em 1977, neste teste os roedores são expostos a uma situação aversiva, nadar em um tanque cilíndrico com água, onde eles não podem tocar o fundo do cilindro ou fugir (escape). Com o tempo os animais percebem que não tem como sair do local e desenvolvem uma postura de imobilidade, que é observada durante um período total de teste de 6 min. Tanto ratos como camundongos podem ser usados para o estudo do efeito do tipo antidepressivo de drogas através do TNF.

3.2.2 Teste da suspensão da cauda (TSC)

O TSC apresenta um princípio semelhante ao do TNF. Esse teste possui alto valor preditivo para o efeito antidepressivo e também constitui um teste comum para o estudo de novas drogas. Neste teste, os roedores são pendurados pela cauda e após um período de

movimentos de tentativas de fuga, estes desenvolvem uma postura de imobilidade, que é resultado de uma situação estressante e inescapável (Steru et al., 1985; Porsolt et al., 1987). Assim como no TNF, o TSC geralmente tem duração de 6 minutos onde se observa o tempo total de imobilidade apresentado pelos animais. No entanto, diferentemente do TNF, apenas camundongos podem ser avaliados no TSC.

3.3 Selênio

O selênio (Se; do grego *σελήνιον*, que significa “resplendor da lua”), foi descoberto em 1817 por Jöns Jacob Berzelius. Ao visitar uma fábrica de ácido sulfúrico, o pesquisador observou um líquido pardo avermelhado que, ao ser aquecido com maçarico, desprendia um odor fétido que se considerava até então característico e exclusivo do elemento químico telúrio (Te). O resultado da investigação desse material levou ao descobrimento do selênio. Recebeu esse nome por ser muito parecido com o Telúrio (tellus, que significa “terra”). Mais tarde, o aperfeiçoamento de técnicas de análise permitiu detectar sua presença em diversos minerais, porém sempre em quantidades extraordinariamente pequenas. Esse elemento está amplamente distribuído na crosta terrestre, fazendo parte de solos e rochas, onde raramente é encontrado sob a forma nativa e principalmente formando ligas com cobre (Cu), junto com o Te.

3.3.1 Características Químicas

O Se é um não-metal pertencente à família dos calcogênios, grupo 16 da tabela periódica, número atômico 34 e massa atômica igual a 78 u, que pode apresentar-se sob quatro estados de oxidação diferentes: selenato (Se^{+6}), selenito (Se^{+4}), selênio elementar (Se^0) e seleneto (Se^{-2}).

Uma vez que o selênio compartilha propriedades físicas e químicas com o enxofre (S), pode substituí-lo em determinadas situações, promovendo importantes interações Se-S nos sistemas biológicos. Por outro lado, as diferenças nas propriedades físico-químicas entre Se e S constituem a base de seus papéis biológicos específicos (Stadtman, 1980). Os selenóis (R-SeH) são as formas correspondentes aos tióis (R-SH), em que ocorre a substituição do átomo de S pelo átomo de Se (Klayman e Günther, 1973).

3.3.2 Biodisponibilidade

Nos mamíferos, o selênio parece ser rapidamente absorvido no duodeno, seguido pelo jejuno e íleo. Além do trato gastrointestinal, o selênio pode ser absorvido por tecidos cutâneos e por inalação. Estas duas últimas vias de absorção de selênio estão relacionadas com a exposição e intoxicação ocupacional por compostos de selênio (Wanger et al., 1976). Após a absorção, os maiores níveis de selênio estão localizados nos eritrócitos, fígado, baço, coração, unhas e esmalte de dentes (Martin e Gerlack, 1972). Em animais intoxicados cronicamente, o selênio é depositado principalmente nos rins e fígado, seguido pelo pâncreas, baço e pulmões (Wilber, 1980). A primeira evidência de que os compostos de selênio são metabolizados em animais foi determinada após um longo período de tratamento com selenito de sódio. Os animais apresentavam odor gárlico característico, que posteriormente demonstrou ter sido causado pelo seleneto de dimetila (Klayman e Gunther, 1973). Esse composto pode ser resultado da detoxificação metabólica de muitos compostos de selênio, a qual envolve uma série de metilações dependentes da S-adenosilmetionina (Mozier, 1988).

A eliminação do selênio do organismo pode ocorrer por três vias excretoras: urina, fezes e ar expelido. Por ser excretado na urina essa pode ser usada como indicadora em casos de intoxicações ou de exposição a altos níveis do elemento (Valentine et al., 1978). Quando presente em níveis normais, ou seja, não tóxicos, a principal forma de selênio encontrada na urina é o seleno-açúcar; entretanto, a presença de trimetilselenônio na urina é o marcador biológico para os casos de intoxicação com esse elemento (Suzuki et al., 2006). A excreção de selênio pelo ar expirado ocorre basicamente sob a forma do composto volátil seleneto de dimetila que tem sido detectado na expiração de indivíduos expostos acidentalmente a níveis altos desse elemento (Mozier et al, 1988).

3.3.2 Atividade biológica

O selênio é um micronutriente essencial para todas as formas de vida (Schwartz e Foltz, 1957), cuja concentração pode ocasionar deficiência ou toxicidade. Esse elemento é encontrado principalmente em alimentos como a castanha-do-pará, alho, cebola, brócolis, cogumelos, cereais, pescados, ovos e carnes (Dumont et al., 2006). A ingestão diária recomendada pela Junta de Alimentação e Nutrição da Academia de Ciências dos Estados Unidos para adultos é de 50-200 µg; porém, de fato, quando a ingestão diária ultrapassa 400

µg, excedendo a capacidade corporal de eliminação, o selênio pode provocar efeito tóxicos, denominados selenoses.

No ano de 1930, o selênio foi reconhecido como uma substância tóxica quando cavalos do oeste da China, que se alimentaram de plantas com grande potencial de acumular este elemento, apresentaram sintomas de envenenamento, como perda de cascos, pêlos e anemia (Spallholz, 1993). No entanto, a partir da descoberta do papel essencial do selênio, o conceito sobre esse elemento modificou-se, sendo intensificada a pesquisa por suas propriedades farmacológicas.

Os efeitos neuroprotetores do selênio têm sido amplamente estudados, uma vez que esse elemento desempenha um importante papel para o cérebro. Trabalhos mostram que quando há depleção de selênio no organismo, o cérebro recebe uma oferta prioritária desse elemento com relação aos outros órgãos (Behne et al 1988; Buckman et al 1993; Whanger 2001). A deficiência de selênio no cérebro altera a taxa de *turnover* dos neurotransmissores (Castano et al., 1997). Baixos níveis desse elemento no plasma estão associados com déficit cognitivo e pacientes com doenças neurodegenerativas, como Doença de Alzheimer, apresentaram menores concentrações cerebrais de selênio quando comparados a grupos com níveis normais de selênio (Corrigan et al., 1991). Estudos de Weber et al. (1991) e Ramaekers (1994) demonstraram que a suplementação com selênio pode reduzir as convulsões epiléticas na infância. E ainda, em estudos pré-clínicos de dano cerebral, o selênio apresentou um efeito neuroprotetor (Crack et al., 2001; Zafar et al., 2003).

3.3.3 O papel do selênio na regulação do humor

Vários estudos demonstraram o papel do selênio nas desordens do humor (Benton e Cook, 1991; Hawkes e Hornbostel, 1996; Benton, 2002; Sher, 2008). Baixos níveis de selênio na dieta (32-36 µg/dia) têm sido associados com um aumento na incidência de depressão, ansiedade e agressividade (Finley e Penland, 1998). E altos níveis de selênio na dieta ou a suplementação da mesma com esse elemento (226 µg/dia) estão associados com a melhora o humor e a qualidade de vida (Benton e Cook, 1991; Rayman, 2000; Rayman et al., 2006; Rayman, 2008).

3.3.4 Compostos orgânicos de selênio

Nos últimos anos, os compostos orgânicos de selênio têm sido alvo de interesse em síntese orgânica em virtude da descoberta de suas aplicações sintéticas, de suas propriedades farmacológicas e por apresentar menor toxicidade em relação às espécies inorgânicas (Parnham e Graf, 1991; Nogueira et al., 2004). Nosso grupo e também outros grupos de pesquisa têm investigado as propriedades farmacológicas de moléculas contendo selênio, as quais incluem ação antioxidante (Miorelli et al., 2008), antinociceptiva (Savegnago et al., 2007b), ansiolítica (Brüning et al., 2008) e também antidepressiva (Savegnago et al., 2007a; Acker et al., 2009; Posser et al., 2009; Jesse et al., 2010a,b).

O disseleneto de difenila, $(\text{PhSe})_2$, e o ebselen são moléculas lipofílicas contendo selênio muito estudadas pelo nosso grupo de pesquisa. Dentre as inúmeras propriedades farmacológicas dessas moléculas (Nogueira et al., 2004; Nogueira e Rocha, 2010), com grande relevância destaca-se a atividade do tipo antidepressiva (Savegnago et al., 2007a; Acker et al., 2009; Posser et al., 2009). Além disso, dados não publicados do nosso grupo revelam que compostos dissustituídos derivados do $(\text{PhSe})_2$ também apresentam propriedades semelhantes.

Em modelos experimentais de depressão, utilizando os TSC e TNF, o efeito do tipo antidepressivo dos compostos acima citados parece ser mediado por uma interação com o sistema monoaminérgico (Savegnago et al., 2007a; Posser et al., 2009).

3.3.4.3 Selenofenos

Os selenofenos, outra classe de compostos orgânicos contendo selênio, também vêm sendo amplamente estudados por nosso grupo de pesquisa. São compostos heterocíclicos aromáticos cujo anel de cinco membros apresenta um átomo de selênio. São ferramentas sintéticas muito importantes em síntese orgânica, sendo bastante utilizadas como intermediários para a obtenção de moléculas biologicamente ativas, principalmente alguns derivados de produtos naturais (Rhoden e Zeni, 2011). Estudos prévios já demonstraram que esses compostos apresentam propriedades antimicrobianas, anti-apoptóticas e antitumorais (Abdel-Hafez, 2005; Shiah et al., 2007; Juang et al., 2007). Além disso, estudos recentes do nosso grupo demonstraram os efeitos hepatoprotetores, anticonvulsivantes, antinociceptivos, anti-alodínicos e antioxidantes do composto 3-alquinilselenofeno (Wilhelm et al., 2009a,b,c,

2010). No entanto, pouco se tem estudado sobre o efeito de compostos selenofenos no comportamento depressivo.

4 RESULTADOS

Os resultados que fazem parte dessa dissertação estão apresentados em dois capítulos. Os resultados do Capítulo 1 estão apresentados sob a forma de artigo científico. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas encontram-se no próprio artigo. O artigo está disposto da mesma forma que foi publicado na Revista *Neuropharmacology*. Os resultados do Capítulo 2 são complementares aos resultados do artigo científico e estão divididos em Materiais e Métodos e Resultados.

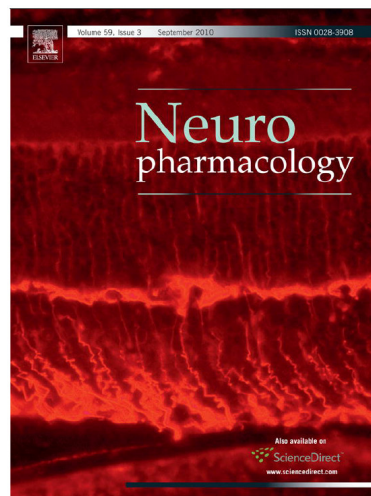
CAPÍTULO 1

4.1 Capítulo 1

Perfil Farmacológico do Tipo Antidepressivo do 3-(4-fluorofenilselenil)-2,5-difenilselenofeno: Envolvimento do Sistema Serotoninérgico

ANTIDEPRESSANT-LIKE PHARMACOLOGICAL PROFILE OF 3-(4-FLUOROPHENYLSELENYL)-2,5-DIPHENYLSELENOPHENE: INVOLVEMENT OF SEROTONERGIC SYSTEM

Bibiana M. Gay, Marina Prigol, André L. Stein, Cristina W. Nogueira

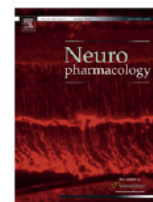


Neuropharmacology 59 (2010) 172-179



Contents lists available at ScienceDirect

Neuropharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/neuropharm

Antidepressant-like pharmacological profile of 3-(4-fluorophenylselenenyl)-2,5-diphenylselenophene: Involvement of serotonergic system

Bibiana M. Gay, Marina Prigol, André L. Stein, Cristina W. Nogueira*

Laboratório de Síntese, Reatividade e Avaliação Farmacológica e Toxicológica de Organocalcogênicos, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria CEP 97105-900, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 December 2009

Received in revised form

10 May 2010

Accepted 10 May 2010

Keywords:

Organoselenium

Selenophene

Antidepressant-like

Serotonergic system

Forced swimming test

Tail suspension test

ABSTRACT

This study evaluated the effect of 3-(4-fluorophenylselenenyl)-2,5-diphenylselenophene (DPS) in the mouse forced swim test (FST) and tail suspension test (TST), two assays predictive of depressant activity. The involvement of serotonergic system in the effect caused by DPS was studied. The antidepressant-like effect of combined treatment with subeffective doses of DPS and paroxetine, a selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) was investigated. Further, we verified the possible mechanism responsible for antidepressant-like effect of DPS. The results show that DPS (50 and 100 mg/kg, p.o.) significantly reduced the immobility time during the FST and TST, without accompanying changes in ambulation when assessed in the open-field test. The anti-immobility effect of DPS (50 mg/kg, p.o.) in the FST was prevented by pretreatment of mice with pCPA (100 mg/kg, i.p., once a day for 4 consecutive days, an inhibitor of 5-HT synthesis), WAY 100635 (0.1 mg/kg, s.c., a selective 5-HT_{1A} receptor antagonist), ritanserin (1 mg/kg, i.p., a 5-HT₂ receptor antagonist) or ondansetron (1 mg/kg, i.p., a 5-HT₃ receptor antagonist). Combined treatment with paroxetine and DPS reduced the immobility time in the FST. DPS at the doses of 10–100 mg/kg did not produce any change in the cerebral activity of MAO-A or MAO-B. DPS at the dose of 50 mg/kg inhibited significantly 5-HT uptake in synaptosomes. These results suggest that DPS produced an antidepressant-like effect in the mouse FST and TST and this effect seems most likely to be mediated through an interaction with serotonergic system, particularly by 5-HT reuptake inhibition.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Depression, one of the most prevalent psychiatric diseases, has been estimated to affect up to 21% of the world's population and according to WHO's prediction, it will be the second most common disease in 2020 (McKenna et al., 2005). Symptoms of depression include lowered mood and reduced interest and pleasure. This mental disorder has been implicated in the installation and/or progression of human diseases such as cancer (Lazure et al., 2009), cardiovascular (Musselman et al., 1998), and endocrine diseases (Peyrot, 2003). Further, depression is considered a significant risk factor for the development of coronary artery disease (Kendler et al., 2009) and stroke (Neu, 2009). Numerous neural pathways are involved in the pathophysiology of depression and a great number of neurotransmitters participate in the underlying

mechanisms of drugs (Altamura et al., 2008). The monoamine hypothesis based on the deficiency of monoamines such as 5-hydroxytryptamine (5-HT), noradrenaline (NA) and dopamine (DA) is commonly evoked to explain the pathophysiology of depression.

Up to now, the current antidepressants in use, including tricyclic antidepressants (TCAs), selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs), monoamine oxidase inhibitors (MAOIs), all exert their antidepressant effect by increasing the levels of monoamine neurotransmitters. However, despite antidepressant drugs being clinically effective, all of them also present numerous weaknesses such as slow onset and severe side effects (Páez-Pereda, 2005). Therefore, it is urgent to explore more promising antidepressant drugs.

Alteration of monoamine receptors or their functions was assumed to be involved, at least in part, in neurochemical mechanisms for antidepressant effects and this body of evidence is growing. All antidepressant treatments and especially SSRIs increase the efficacy of 5-HT transmission at the post-synaptic levels and finally induce post-synaptic 5-HT receptors activation.

* Corresponding author. Tel.: +55 55 3220 8140; fax: +55 55 3220 8978.
E-mail address: criswn@quimica.ufsm.br (C.W. Nogueira).

Seven families of 5-HT receptors (5-HT_{1A}, 5-HT_{2A/2C}, 5-HT_{2B}, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT₆, 5-HT₇) have been characterized and abundantly distributed in brain regions (Hochman et al., 2003; Bockaert et al., 2008). Lines of preclinical data suggest that post-synaptic 5-HT_{1A} receptors are important to the antidepressant response (Blier and de Montigny, 1994), and these receptors have been implicated in affective disorders (Aghajanian et al., 1990). Additionally, 5-HT₂ receptors are involved in the antidepressant effect of classical drugs (Palvimaki et al., 1999). Although 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT₄, 5-HT₆ and 5-HT₇ receptors are also involved in the pathophysiology of depression (Millan, 2006), a number of studies primarily use 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A/2C} and 5-HT₃ to screening new drugs on the serotonergic system (Brüning et al., 2008; Savegnago et al., 2007a; Machado et al., 2007; Posser et al., 2009).

Reactive oxygen species play an important role in the pathogenesis of many diseases, particularly in neurological and psychiatric disorders due to the actions of these species on cell function and the relatively high vulnerability of the central nervous system to oxidative stress (Eren et al., 2007). In previous studies authors have reported a positive correlation between oxidative stress and depression and normalization of oxidative stress markers with antidepressant treatment has been also demonstrated (Herken et al., 2007). Thus, drugs with potential antioxidant action could be an attractive target for treatment of depressive disorders.

Selenium is an essential trace element nutritionally important to mammals, with physiological roles as a structural component of several antioxidant enzymes involved in the peroxide decomposition (Ursini and Bindoli, 1987; Rayman, 2000). Studies have reported that insufficient selenium intake may affect some psychological parameters and that selenium supplementation was found to be associated with an improvement in mood and depression status (Benton and Cook, 1991, 2001). In this context, our research group and others have investigated pharmacological properties of organoselenium compounds, including antioxidant (Miorelli et al., 2008), antinociceptive (Savegnago et al., 2007b), anxiolytic (Brüning et al., 2008) and antidepressant (Savegnago et al., 2007a) actions. Accordingly, selenophene is a class of organoselenium heterocycles containing a five-membered ring in the structure, which has drawn the attention of researchers in view of its interesting biological activities. Recent studies of our research group have shown that selenophene compounds have hepatoprotective, anticonvulsant and antioxidant effects (Wilhelm et al., 2009a, 2009b).

In view of the above considerations, in this study we used two behavioral assays to examine if 3-(4-fluorophenylselenenyl)-2,5-diphenylselenophene (DPS), a selenophene, would exert antidepressant-like effect in mice. Moreover, as serotonergic system plays a major role in the actions of antidepressant drugs (Millan, 2004), we investigated the possible involvement of the serotonergic system in the antidepressant-like effect of DPS in mice. The contribution of the serotonin (5-HT) receptor subtypes in the effect caused by DPS was studied. We also investigated the possible mechanism responsible by antidepressant-like effect of DPS.

2. Materials and methods

2.1. Animals

The behavioral experiments were conducted using male Swiss mice (25–30 g) maintained at 22–25 °C with free access to water and food, under a 12:12 h light/dark cycle, with lights on at 6:00 a.m. All manipulations were carried out between 08.00 a.m. and 04.00 p.m. and the experiments were performed according to a randomized schedule. All tests were performed on separate groups of animals and each animal was used only once in each test. The behavioral analyses were performed by a blind evaluator to the treatment conditions. The animals were used according to the guidelines of the Committee on Care and Use of Experimental Animal Resources of the Federal University of Santa Maria, Brazil. The procedures in

this study were performed in accordance with the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. All efforts were made to minimize animals suffering and to reduce the number of animals used in the experiments.

2.2. Drugs

3-(4-Fluorophenylselenenyl)-2,5-diphenylselenophene (DPS, Fig. 1), was prepared and characterized in our laboratory by the method previously described by Stein et al. (2008). Analysis of the ¹H NMR and ¹³C NMR spectra showed analytical and spectroscopic data in full agreement with its assigned structure. The chemical purity of studied compound (99.9%) was determined by GC/HPLC. All other chemicals were of analytical grade and obtained from standard commercial suppliers. To behavioral assays, all drugs were dissolved in saline except DPS that was dissolved in canola oil. DPS was administered intragastrically (i.g.) via gavage. The mice received all drugs in a constant volume of 10 ml/kg of body weight. Appropriate vehicle-treated groups were also simultaneously assessed.

2.3. Behavioral analyses

2.3.1. Tail suspension test (TST)

The TST is a frequently used test for antidepressant activity (Porsolt et al., 1987). The total duration of immobility induced by tail suspension was measured according to the methods described by Steru et al. (1985). Briefly, animals both acoustically and visually isolated were suspended 50 cm above the floor by adhesive tape placed approximately 1 cm from the tip of the tail. Immobility time was recorded during a 6-min period. Mice were considered immobile only when they hung passively and were completely motionless. This test is reliable and rapid screening method for antidepressants including those involving the serotonergic system.

2.3.2. Forced Swimming Test (FST)

The FST, as originally described by Porsolt et al. (1977a,b), is the most widely used pharmacological assay for assessing antidepressant activity. In this test, mice were individually forced to swim in an open cylindrical container (diameter 10 cm, height 25 cm), containing 19 cm of water at 25 ± 1 °C. The total duration of immobility was recorded during the last 4 min of the 6-min period. Each mouse was judged to be immobile when it ceased struggling and remained floating motionless in the water, making only those movements necessary to keep its head above water. A decrease in the duration of immobility is indicative of an antidepressant-like effect (Porsolt et al., 1977a,b).

2.3.3. Open-field test (OFT)

To assess the possible effects of DPS on the locomotor and exploratory activities, mice were evaluated in an open-field. The open-field was made of plywood and surrounded by walls 30 cm in height. The floor of the open-field, 40 cm in length and 40 cm in width, was divided by masking tape markers into 9 squares (3 rows of 3). Each animal was placed individually at the center of the apparatus and observed for 6 min to record the locomotor (number of segments crossed with the four paws) and exploratory activities (expressed by the number of time rearing on the hind limbs).

2.4. Experimental procedure

To assess time-course of the antidepressant-like effect of DPS, mice were pre-treated with DPS (50 mg/kg, i.g.) or with canola oil (10 ml/kg, i.g.) 15, 30 and 60 min before the TST.

In order to assess the antidepressant-like effect of DPS, compound was administered (dose range: 1–100 mg/kg, i.g.) 30 min before the TST or FST. Paroxetine (2–16 mg/kg, intraperitoneal, i.p., route) 45 min before the TST or FST was used as a positive control. To evaluate locomotor and exploratory activities, mice were treated with DPS (1–100 mg/kg, i.g.) 30 min before the OFT. Control groups received canola oil (10 ml/kg, i.g.) before tests.

To test the hypothesis that the antidepressant-like effect of DPS in the FST is mediated through an interaction with the serotonergic system, mice were pre-treated with *p*-chlorophenylalanine (*p*CPA, Sigma). *p*CPA is known to reduce the concentration of brain 5-HT by inhibiting its biosynthesis (Koe and Weissman, 1966). In the present experiments, mice were injected i.p. either with saline (control group) or with *p*CPA. *p*CPA was administered at the dose of 100 mg/kg once daily for 4 consecutive days (O'Neill and Conway, 2001; Machado et al., 2007; Posser et al.,

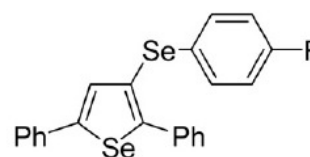


Fig. 1. Chemical structure of 3-(4-fluorophenylselenenyl)-2,5-diphenylselenophene (DPS).

2009). On the fifth day (24 h after the last pCPA administration), mice received canola oil (10 ml/kg, i.g.) or DPS (50 mg/kg, i.g.) 30 min before the test. To evaluate locomotor and exploratory activities, mice were tested in the OFT.

To study the possible contribution of the serotonergic receptors on reducing the immobility time, we investigated the involvement of 5-HT receptor subtypes in the effect caused by DPS in the FST. To this end, mice were pretreated with ondansetron (1 mg/kg, i.p., a 5-HT₃ receptor antagonist), ritanserin (1 mg/kg, i.p., a 5-HT_{2A/2C} receptor antagonist) or WAY 100635 (0.1 mg/kg, i.p., a 5-HT_{1A} receptor antagonist) and after 15 min they received DPS (50 mg/kg, i.g.) or vehicle and were tested in the FST 30 min later. In order to rule out any potential sedative effects, combined treatment of DPS and 5-HT antagonists were tested in the OFT.

In a separate series of experiments, we investigated the possible interaction between subeffective doses of DPS and paroxetine, a selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI), in the FST. To this end, mice were pretreated with paroxetine (4 mg/kg, i.p.) or vehicle and after 10 min they received DPS (10 mg/kg, i.g.) or canola oil. After 30 min mice were tested in the FST. The control group received canola oil (10 ml/kg, i.g.) and saline (10 ml/kg, i.p.).

Doses and administration schedule used to conduct these experiments were chosen on the basis of experiments previously performed (Savegnago et al., 2007a; Brüning et al., 2008) and the literature data confirm the selectivity and efficacy of the above-mentioned treatments at the doses used (O'Neill and Conway, 2001; Bourin et al., 2009; Taksande et al., 2009; Machado et al., 2007; Posser et al., 2009).

2.5. *Ex vivo* assays

2.5.1. Monoamine oxidase (MAO) activity

To test the hypothesis that the antidepressant effects of DPS is mediated through an inhibition of MAO-A or MAO-B activity, mice were pretreated with DPS (10, 50 and 100 mg/kg, i.g.) or vehicle (canola oil, i.g.), after 30 min, animals were killed by decapitation and the whole brains were removed.

2.5.1.1. Mitochondria preparation. A preparation of cortex mitochondria was used for MAO assay as previously described by Soto-Otero et al. (2001). Cerebral cortices were immediately removed and washed in ice-cold isolation medium (pH 7.4, Na₂PO₄/KH₂PO₄ isotonicized with sucrose). Mitochondria from cortex were then obtained by differential centrifugation. Briefly, after removing blood vessels and pial membranes, cerebral cortices were manually homogenized with four volumes (w/v) of the isolation medium. Then, the homogenate was centrifuged at 900×g at 4 °C for 5 min. The supernatant was centrifuged at 12,500×g for 15 min. The mitochondria pellet was then washed once with isolation medium and recentrifuged under the same conditions. Finally, the mitochondrial pellet was reconstituted in a buffer solution (Na₂PO₄/KH₂PO₄ isotonicized with KCl, pH 7.4) and stored in aliquots.

2.5.1.2. Enzyme assay. MAO activity was determined as described by Krajl (1965) with some modifications of Matsumoto et al. (1984). Aliquots of samples were incubated at 37 °C for 5 min in a medium containing buffer solution (Na₂PO₄/KH₂PO₄ isotonicized with KCl, pH 7.4) and specific inhibitors, selegiline (a MAO-B inhibitor, 250 nM) or clorgiline (a MAO-A inhibitor, 250 nM), at a final volume of 600 µl. Then kynuramine dihydrobromide (final concentration 90 mM to MAO-A assay and 60 mM to MAO-B assay) was added to the reaction mixture as substrate. Samples were then incubated at 37 °C for 30 min. After incubation, the reaction was terminated by adding of 10% TCA. After cooling and centrifugation at 3000×g for 15 min, an aliquot of supernatant was added to 1M NaOH. The fluorescence intensity was detected spectrofluorimetrically with excitation at 315 nm and emission at 380 nm. The concentration of 4-hydroxyquinoline was estimated from a corresponding standard fluorescence curve of 4-hydroxyquinoline. MAO-A and MAO-B activities were expressed as nmol of 4-hydroxyquinoline formed/mg protein.

2.5.2. Synaptosomal [³H] 5-HT uptake

To test the hypothesis that the antidepressant-like effect of DPS is mediated through an inhibition of 5-HT uptake, mice were pretreated with DPS (50 mg/kg, i.g.) or vehicle (canola oil, i.g.), after 30 min, animals were killed by decapitation and the whole brains were removed.

2.5.2.1. Preparation of crude synaptosomes. Crude synaptosomes were obtained as described by Gray and Whittaker (1962) with some modifications. The brain (minus the cerebellum) was placed into ice-cold sucrose solution (0.32 M, pH 7.4), cut into small pieces and homogenized using a glass Potter–Elvehjem tube with a teflon pestle (10 up and down strokes). The homogenate solution was centrifuged at 1000×g at 4 °C for 10 min in a refrigerated centrifuge. The pellet was discarded and the supernatant was subsequently centrifuged at 12000×g at 4 °C for 20 min. The final pellet of this centrifugation was suspended in ten volumes of ice-cold sucrose solution (0.32 M, pH 7.4) and then used as a crude synaptosome preparation in the [³H] 5-HT uptake assay.

2.5.2.2. [³H] 5-HT uptake assay. [³H] 5-HT uptake into synaptosomes was carried out as described by Yura et al. (1996) with some modifications. The synaptosomal suspension (100 µg of protein) was pre-incubated at 37 °C for 10 min in physiological

salt solution (pH 7.4, adjusted with Fosforic Acid 1%) of the following composition: 108 mM NaCl, 1 mM KCl, 27 mM NaHCO₃, 1.1 mM NaH₂PO₄, 0.1 mM Pargyline, 0.1 mM Ascorbic Acid, 0.1 mM EDTA, 10 mM Glucose, and, 5 mM CaCl₂. After pre-incubation, [³H] 5-HT uptake was initiated by the addition of 7 nM [³H] 5-HT (specific activity: 23 Ci/mmol) and 43 nM non-radioactive 5-HT (total 5-HT: 50 nM, final concentration). Synaptosomes were incubated for a further 2 min at 37 °C. 5-HT uptake was stopped by the immediate placement of assay tubes into ice, followed by centrifugation at 2000×g at 4 °C for 5 min. Final pellets were washed with cold incubation buffer. Radioactivity present in pellet was measured in a scintillation counter. The non-specific activity was obtained in the presence of 100 µM paroxetine at 4 °C. Specific [³H] 5-HT uptake was indirectly estimated by subtracting the non-specific uptake from the total uptake determined at 37 °C. Results were expressed as f mol of 5-HT uptake/mg of protein min⁻¹.

2.6. Protein determination

The protein concentration was measured by the method of Bradford (1976), using bovine serum albumin as the standard.

2.7. Statistical analysis

All experimental results are given as the mean ± S.E.M. Comparisons between experimental and control groups were performed by one-way or two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Newman–Keuls test for post-hoc comparison when appropriate. Probability values less than 0.05 ($P < 0.05$) were considered as statistically significant.

3. Results

3.1. Behavioral experiments

3.1.1. Effect of DPS in the mouse TST

A time-course analysis of the antidepressant profile of DPS in the TST was accomplished. The antidepressant effect of DPS reached its peak at 30 min after i.g. administration [$F(1,10) = 35.9597, P = 0.0001$] (Fig. 2A). Thus, the time point (30 min) of the maximum effect of DPS was chosen for all further studies.

The immobility time in the TST of animals treated with DPS is shown in Fig. 2B. DPS at the doses of 50 and 100 mg/kg, given 30 min earlier by i.g. route, decreased the immobility time in the TST [$F(5,36) = 45.8762, P < 0.00001$]. The effect of DPS on the TST has lack of dose-dependency. The positive control, paroxetine, at doses of 8 and 16 mg/kg, given 45 min earlier by i.p. route, decreased the immobility time in the TST [$F(4,25) = 203.1555, P < 0.00001$] (Fig. 3A)

3.1.2. Effect of DPS in the mouse FST

The immobility time in the FST of animals treated with DPS is shown in Fig. 2C. DPS at the doses of 50 and 100 mg/kg, given (30 min earlier) by i.g. route, decreased the immobility time in the FST [$F(5,24) = 110.9362, P < 0.00001$]. The effect of DPS on the FST has lack of dose-dependency. The dose of 50 mg/kg of DPS was chosen for all further studies. The positive control, paroxetine, at doses of 8 and 16 mg/kg, given 45 min earlier by i.p. route, decreased the immobility time in the FST [$F(4,25) = 64.2712, P < 0.00001$] (Fig. 3B)

3.1.2.1. Involvement of serotonergic system

3.1.2.1.1. Effect of pretreatment with pCPA on the antidepressant-like activity of DPS. Results depicted in Fig. 4 show that pretreatment of mice with an inhibitor of 5-HT synthesis, pCPA (100 mg/kg i.p. once a day for 4 consecutive days), was effective in reversing the antidepressant-like effect of DPS (50 mg/kg, i.g.) in the mouse FST [$F(1,20) = 59.7815, P < 0.0001$].

3.1.2.1.2. Role of the serotonergic receptors in the antidepressant-like effect of DPS. Fig. 5 shows that the pretreatment of mice with ondansetron (1 mg/kg, i.p., a 5-HT₃ receptor antagonist) blocked the effect of DPS (50 mg/kg, i.g.) in the FST [$F(1,20) = 27.8961, P < 0.0001$]. Pretreatment of mice with ritanserin (1 mg/kg, i.p., a 5-HT₂ receptor antagonist) prevented the antidepressant-like effect

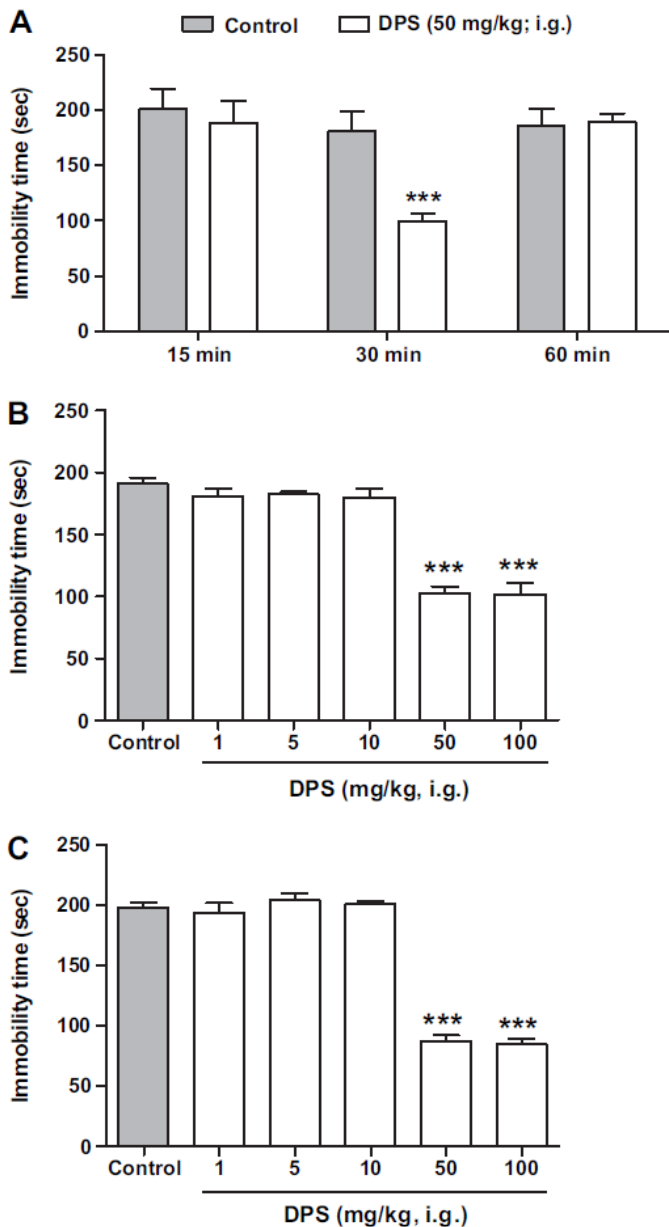


Fig. 2. Time-course of the antidepressant-like effect caused by DPS (50 mg/kg, i.g.) in the mouse TST; DPS was administered 15, 30 and 60 min before the TST (6 mice/group) (Panel A). Effect of an acute administration of DPS in the mouse TST (Panel B) and FST (Panel C); DPS (1–100 mg/kg) was intragastrically administered 30 min before the test (7 and 5 mice/group, respectively). Control values indicate the animal administered with canola oil. Values are expressed as mean \pm S.E.M and the asterisks denote the significance levels when compared to control group (one-way ANOVA followed by Newman–Keuls) *** $P < 0.0001$.

caused by DPS (50 mg/kg, i.g.) in the FST [$F(1,20) = 42.9864$, $P < 0.0001$] (Fig. 5). Pretreatment with WAY 100635 (0.1 mg/kg, s.c., a 5-HT_{1A} receptor antagonist) reversed the antidepressant-like effect of DPS (50 mg/kg, i.g.) in the FST [$F(1,20) = 37.0049$, $P < 0.0001$] (Fig. 5).

3.1.2.1.3. Effect of DPS and paroxetine combination on immobility time in the FST. The results depicted in Fig. 6 show the effect of paroxetine (4 mg/kg, i.p., a subeffective dose) and DPS (10 mg/kg, i.g., a subeffective dose) on the mice immobility time in the FST. Two-way ANOVA showed a significant effect of drug treatment on immobility time in the FST for groups of animals given subeffective

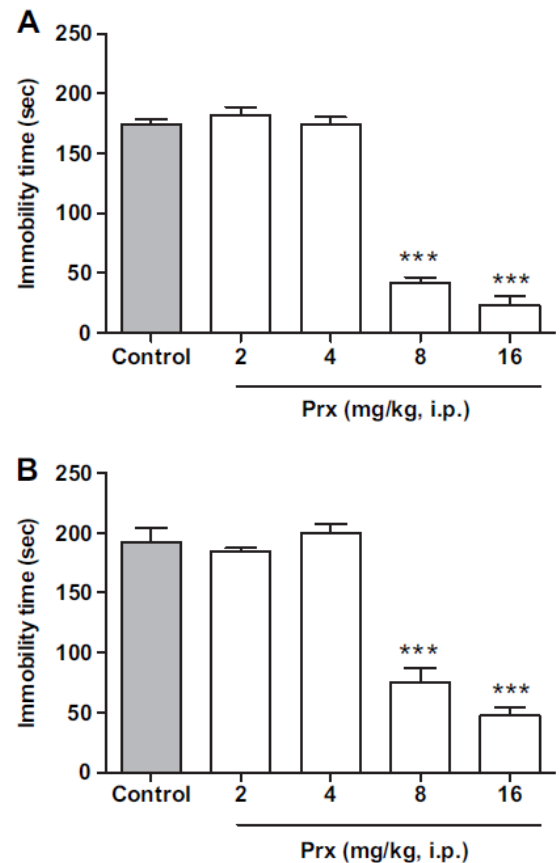


Fig. 3. Effect of an acute administration of paroxetine (Prx) in the mouse TST (Panel A) and FST (Panel B); Prx (2–16 mg/kg) was intraperitoneally administered 45 min before the test (6 mice/group, respectively). Control values indicate the animal administered with vehicle. Values are expressed as mean \pm S.E.M and the asterisks denote the significance levels when compared to the control group (one-way ANOVA followed by Newman–Keuls) *** $P < 0.0001$.

doses of paroxetine and DPS in combination [$F(1,20) = 152.84$, $P < 0.0001$]. Post-hoc comparisons revealed that neither paroxetine (4 mg/kg, i.p.) nor DPS (10 mg/kg, i.g.) alone reduced immobility time in the SFT compared to the vehicle-treated group.

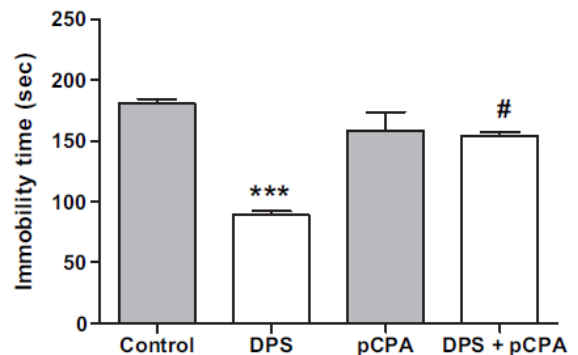


Fig. 4. Effect of pretreatment with pCPA (100 mg/kg, i.p. once a day per 4 consecutive days) on DPS-induced reduction in the immobility time in the mouse FST. DPS (50 mg/kg) was intragastrically administered 24 h after the last pCPA administration and 30 min before the test. Values are expressed as mean \pm S.E.M. of 7 animals. *** $P < 0.0001$ when compared to the vehicle-treated control; # $P < 0.0001$ as compared to the DPS group pretreated with vehicle (two-way ANOVA followed by Newman–Keuls).

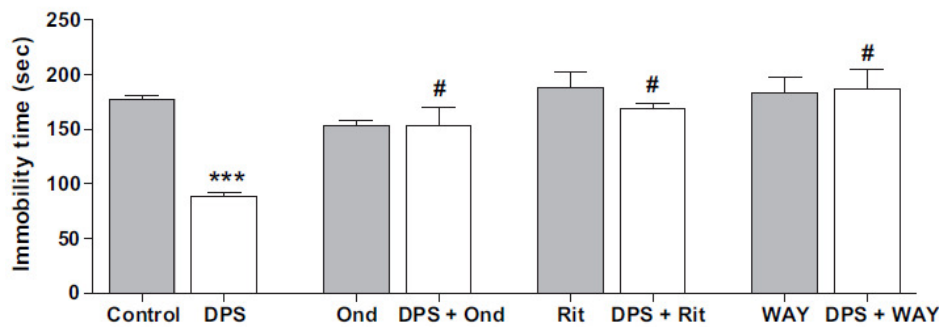


Fig. 5. Effect of pretreatment with ondansetron ("Ond"; 1 mg/kg, i.p.), ritanserin ("Rit"; 1 mg/kg, i.p.) or WAY 100635 ("WAY"; 0.1 mg/kg, i.p.) on DPS (50 mg/kg, i.g.)-induced reduction in the immobility time in the mouse FST. DPS was administered 15 min after antagonists and 30 min before the test. Values are expressed as mean \pm S.E.M. of 7 animals. Data were analyzed by two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Newman–Keuls test. *** P < 0.001 when compared to the vehicle-treated control; # P < 0.0001 as compared to the DPS group pretreated with vehicle.

3.1.3. Effect of DPS in the mouse OFT

Table 1 shows that DPS 1–100 mg/kg, given by i.g. route, did not produce any change in the number of crossings [$F(5,30) = 0.7996$, $P = 0.5587$] and rearings [$F(5,30) = 1.2942$, $P = 0.2926$] in the OFT.

pCPA 100 mg/kg i.p. [$F(1,20) = 1.6649$, $P = 0.2116$], ritanserin 1 mg/kg i.p. [$F(1,20) = 0.1080$, $P = 0.7458$], WAY 100635 0.1 mg/kg s.c. [$F(1,20) = 0.5058$, $P = 0.4851$] or ondansetron 1 mg/kg i.p. [$F(1,20) = 1.1627$, $P = 0.2937$] did not alter the locomotor activity of mice when compared to the vehicle-treated group. The number of rearings were not changed: $F(1,20) = 1.1815$, $P = 0.2899$ to pCPA, $F(1,20) = 0.1179$, $P = 0.7349$ to ritanserin, $F(1,20) = 0.0448$, $P = 0.8343$ to WAY 100635 and $F(1,20) = 0.5585$, $P = 0.4635$ to ondansetron.

Pretreatment with 50 mg/kg DPS and 5-HT antagonists did not produce any change in the locomotor activity: $F(1,20) = 0.0112$, $P = 0.9116$ to pCPA, $F(1,20) = 0.6813$, $P = 0.4188$ to ritanserin, $F(1,20) = 1.2720$, $P = 0.2727$ to WAY 100635 and $F(1,20) = 1.8186$, $P = 0.1925$ to ondansetron. Exploratory activity was not changed: $F(1,20) = 3.9463$, $P = 0.0608$ to pCPA, $F(1,20) = 0.1179$, $P = 0.7349$ to ritanserin, $F(1,20) = 1.1216$, $P = 0.3021$ to WAY 100635 and $F(1,20) = 0.2338$, $P = 0.6339$ to ondansetron.

3.2. Ex vivo assays

3.2.1. Effect of DPS on MAO-A and MAO-B activities

Table 2 shows the effect of DPS on the cerebral activity of MAO-A and MAO-B. DPS at the doses of 10, 50 or 100 mg/kg, given by i.g.

route, did not alter the cerebral activity of MAO-A [$F(2,30) = 0.2511$, $P = 0.8595$] or MAO-B [$F(2,30) = 0.1229$, $P = 0.9454$] in mice.

3.2.2. Effect of DPS on [^3H] 5-HT uptake

Fig. 7 shows the effect of DPS on the synaptosomal 5-HT uptake. A single dose of 50 mg/kg DPS, given by i.g. route, inhibited significantly [$F(1,4) = 11.7719$, $P = 0.0223$] the synaptosomal 5-HT uptake around of 55.6%.

4. Discussion

The TST and FST are well-established screening paradigms for antidepressants. In these tests, mice are induced to a characteristic behavior of immobility which has been proposed to reflect a state of despair which is reduced by several agents therapeutically effective in human depression. This immobility, referred to as behavioral despair in animals, is claimed to reproduce a condition similar to human depression (Steru et al., 1985).

The results presented here show that DPS, an organoselenium compound of the selenophene class, is effective in producing significant antidepressant-like effects, which were not dose-dependent, when assessed in the FST and in TST. Similarly, other organoselenium compounds are also effective in reducing immobility time in the FST and TST (Savegnago et al., 2007a). The present study showed that DPS, at doses that produced an antidepressant-

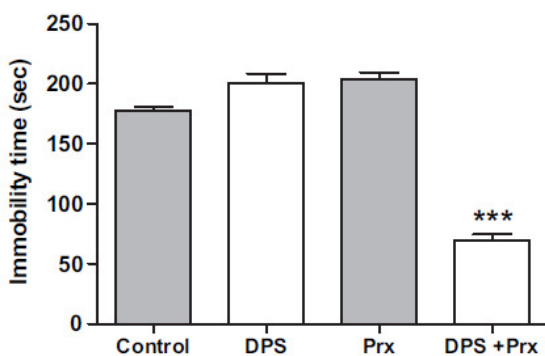


Fig. 6. Effect of subeffective doses of DPS (10 mg/kg, i.g.) and paroxetine (Prx; 4 mg/kg, i.p.) on the immobility time in the mouse FST. DPS was administered 10 min after paroxetine and 30 min before the test. Values are expressed as mean \pm S.E.M. of 6 animals. *** P < 0.0001 as compared to the DPS group pretreated with vehicle (two-way ANOVA followed by Newman–Keuls).

Table 1

Effect of acute administration of DPS and its combined treatment with 5-HT antagonists on the mouse open-field test (OFT).

Group	Crossing number	Rearing number
Control	66.52 \pm 2.83	38.16 \pm 2.19
DPS 1 mg/kg	72.16 \pm 4.81	35.00 \pm 2.52
DPS 5 mg/kg	71.66 \pm 1.02	34.67 \pm 1.68
DPS 10 mg/kg	64.33 \pm 3.85	31.50 \pm 2.98
DPS 50 mg/kg	71.66 \pm 3.93	32.50 \pm 1.22
DPS 100 mg/kg	69.33 \pm 3.91	35.33 \pm 0.95
pCPA 100 mg/kg	70.33 \pm 2.16	31.33 \pm 6.28
pCPA 100 mg/kg + DPS 50 mg/kg	76.16 \pm 10.16	34.50 \pm 6.41
Rit 1 mg/kg	68.16 \pm 8.13	34.33 \pm 7.32
Rit 1 mg/kg + DPS 50 mg/kg	67.83 \pm 7.57	34.83 \pm 4.62
WAY 100635 0.1 mg/kg	71.66 \pm 4.59	35.16 \pm 8.52
WAY 100635 0.1 mg/kg + DPS 50 mg/kg	70.50 \pm 5.09	34.50 \pm 4.80
Ond 1 mg/kg	74.00 \pm 8.29	35.83 \pm 5.63
Ond 1 mg/kg + DPS 50 mg/kg	70.83 \pm 4.26	32.00 \pm 4.04

DPS (dose range 1–100 mg/kg) was administered orally 30 min before the test. To interaction studies DPS 50 mg/kg was administered 15 min after antagonists and 30 min before the test. Values are expressed as mean \pm S.E.M. of 6 animals/group. The significance level was determined by one-way ANOVA followed by Newman–Keuls test.

Table 2
Effect of DPS on the mouse cerebral activity of MAO-A and MAO-B (nmol of 4-hydroxyquinoline/mg protein).

Group	MAO-A	MAO-B
Control	29.62 ± 2.57	139.04 ± 8.00
DPS 10 mg/kg	28.46 ± 1.49	133.65 ± 8.66
DPS 50 mg/kg	28.45 ± 1.27	139.65 ± 3.46
DPS 100 mg/kg	27.59 ± 0.81	137.52 ± 9.22

DPS (dose range 10–100 mg/kg) was intragastrically administered 30 min before ex vivo assay. Values are expressed as mean ± S.E.M of 6 animals/group. The significance level was determined by one-way ANOVA followed by Newman–Keuls test.

like effect, did not significantly change the behavioral performance of animals when evaluated in the OFT. This indicates that a psychostimulant effect is not responsible for the decrease in the immobility elicited by DPS in both tests, the FST and TST.

Depressive disorder has been associated with disturbances of brain 5-HT activity and data concerning 5-HT variations in depression have probably been the most widely studied. The serotonergic hypothesis of depression connected depressive symptoms with a reduced 5-HT concentration in the brain synapse and, on the other hand, the mechanism of antidepressant action with the enhancement of concentration of this neurotransmitter (Schildkraut, 1965). Drugs affecting 5-HT neurotransmission, such as those that inhibit 5-HT reuptake at nerve terminals or its catabolism (MAOIs), are effective in depression treatment (Millan, 2004). Further, it has been reported the involvement of 5-HT receptors in the mechanism of action of drugs with antidepressant-like effect in different behavior assays (Savegnago et al., 2007a). Thus, in this study the pharmacological involvement of serotonergic system in the anti-immobility effect caused by DPS in the FST was evaluated.

In order to investigate a possible contribution of the 5-HT transmission in the antidepressant-like effect of DPS in the FST, the animals were pretreated with pCPA, a tryptophan hydroxylase inhibitor, at a dose known to decrease the cortical content of 5-HT. The depletion of 5-HT by pCPA did not alter the baseline activity in the FST but completely antagonized the antidepressant-like action caused by DPS. The ability to eliminate the antidepressant-like effect of DPS by 5-HT depletion supports the hypothesis that the behavioral effects of DPS require the 5-HT system to be intact. Additionally, we also demonstrated that 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A/2C} and 5-HT₃ receptors are involved in the antidepressant-like effect of DPS in the FST. An evidence of the involvement of 5-HT_{1A} receptors in the antidepressant-like effect of DPS was given by the finding that the selective 5-HT_{1A} receptor antagonist, WAY 100635, was able to prevent its anti-immobility effect in the FST. It has been suggested an involvement of the 5-HT_{1A} receptors in the mechanism of action

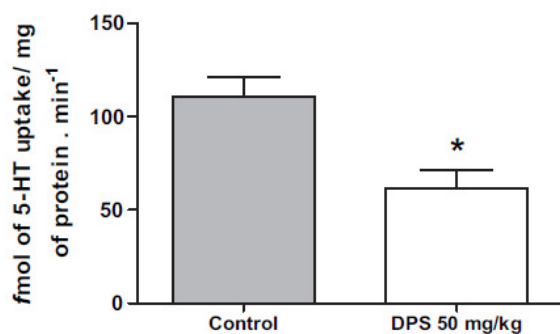


Fig. 7. Effect of DPS (50 mg/kg, i.g.) on synaptosomal [³H] 5-HT uptake. Values are expressed as mean ± S.E.M. of 3 animals. **P* < 0.05 when compared to the vehicle-treated control (one-way ANOVA followed by Newman–Keuls).

of several classes of antidepressant drugs, including TCAs, SSRIs and IMAOs (Hirvonen et al., 2008). Recent researches about novel drugs with antidepressant-like effect have shown that this can involve the 5-HT_{1A} receptors (Ago et al., 2003). Another interesting result of the present study was the fact that the antidepressant-like effect of DPS in the FST was prevented by pretreatment with ritanserin, a 5-HT_{2A/2C} receptor antagonist. Studies also showed that 5-HT_{2A/2C} receptor is involved in the antidepressant-like effect of different drugs in behavioral assays (Palvimaki et al., 1999; Savegnago et al., 2007a). In this study we demonstrated that the antidepressant-like effect of DPS in the FST was blocked by the pretreatment of mice with ondansetron, a 5-HT₃ receptor antagonist. These results are consistent with previous studies of our research group that showed the blockade of antidepressant-like effect of diphenyl diselenide, an organoselenium compound, by ondansetron (Savegnago et al., 2007a). Thus, the results demonstrated that selective antagonists of 5-HT_{1A} (WAY 100635), 5-HT₂ (ritanserin) and 5-HT₃ (ondansetron) receptors, consistently reversed the antidepressant-like effect caused by DPS when analyzed in the mouse FST. Therefore, the involvement of 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A/2C} and 5-HT₃, serotonergic receptors, in the antidepressant-like effect of DPS was evidenced.

In the present study, concomitant administration of DPS (10 mg/kg, i.g.) and paroxetine (4 mg/kg, i.p.), both given at subeffective doses, reduced the immobility time in the FST. SSRIs have been approved for the treatment of depression and several studies have shown that a single intraperitoneal injection of SSRIs increased the extracellular concentration of 5-HT in brain (Felton et al., 2003). The SSRIs drugs are believed to elicit their clinical antidepressant effects by blocking 5-HT reuptake at the synapse, resulting in an elevation of extracellular 5-HT concentrations in the limbic regions of brain which can act upon various post-synaptic 5-HT receptors (Bundgaard et al., 2006). Studies demonstrated that SSRIs causes marked and persistent occupancy of 5-HT receptors in the brain, which may be involved, in part, in the mechanism of action of this class of antidepressant drugs (Palvimaki et al., 1999).

In this study, we investigated the possible neurochemical mechanism responsible for the antidepressant-like effect of DPS in mice. To test the hypothesis that DPS acts by inhibiting the monoamine degradation, the effect of DPS (50 mg/kg, i.g.) on the cerebral MAO activity in mice was carried out. The mitochondrial protein MAO exists as two isoforms, MAO-A and MAO-B, that differ in tissue distribution, substrate specificity and drug sensitivity (Shih et al., 1999). MAO-A is responsible for the metabolism of both 5-HT and NA. DA is a common substrate for both subtypes (Krishnan, 2007). In general, inhibitors of MAO cause an increase in the amount of monoamines released from the nerve terminals, thus increasing monoaminergic activity. Previous studies showed that the pharmacological inhibition of MAO-A by antidepressant drugs, or its constitutive deletion, induces an increase in tissue and extracellular levels of both 5-HT and NA in various brain areas (Evrard et al., 2002; Finberg et al., 1993). An interesting finding of our study was that a single dose of DPS did not alter MAO-A or MAO-B activity in whole brain preparations. Thus the inhibition of MAO activity is not responsible for the anti-immobility effect elicited by DPS in the mouse FST, supporting the fact that another mechanism of action is related to the antidepressant-like effect of the studied compound.

Increasing synaptic availability of monoamines is a well-established mechanism of action of many antidepressants. Drugs that block 5-HT post-synaptic transporters are widely used in the depression treatment, since increase the 5-HT cerebral levels (Altamura et al., 2008). In order to evaluate whether action of DPS could be involved in a selective effect on 5-HT neurotransmission, inhibiting 5-HT reuptake at nerve terminals, we investigated the effect of a single dose of DPS (50 mg/kg, i.g.) on the synaptosomal

[³H] 5-HT uptake. Our present result shows that a single administration of DPS, 30 min before assay, produced a significant inhibition (around of 55.6%) of the synaptosomal [³H] 5-HT uptake. It suggests that a single dose of DPS elicited an antidepressant-like effect by interaction with 5-HT transporters, thereby increasing the levels of 5-HT and leading to the indiscriminate activation of all 5-HT receptors in the brains of mice. Further, this result could explain the additive effect produced by co-administration of DPS and paroxetine at subeffective doses.

The exact underlying mechanisms by which DPS elicits its antidepressant-like effect are not completely understood and require additional research using different animal and clinical models of depression. However, the results support that DPS induced an antidepressant-like action in both the mouse FST and TST, which is not due to any psychostimulant effect. The *in vivo* findings suggest that this effect is mediated through an interaction with central serotonergic system, most strongly associated with 5-HT reuptake. According to *ex vivo* results presented here, the antidepressant-like mechanism of DPS might be related to the increase in monoaminergic activity via inhibition of 5-HT uptake leading to an enhanced serotonergic transmission and an interaction with 5-HT receptor subtypes in the brain. Additional studies performing a full receptor binding screen across a variety of receptors are required to demonstrate if the effects of DPS seen on the 5-HT receptors are direct or indirect. Thus, DPS may have potential therapeutic value for the treatment of depressive disorders.

Acknowledgements

The financial support by UFSM, FAPERGS, CAPES and CNPq is gratefully acknowledged.

References

- Aghajanian, G.K., Sprouse, J.S., Sheldon, P., Rasmussen, K., 1990. Electrophysiology of the central serotonin system: receptor subtypes and transducer mechanisms. *Annals of New York Academy of Sciences* 600, 93–103.
- Ago, Y., Koyama, Y., Baba, A., Matsuda, T., 2003. Regulation by 5-HT_{1A} receptors of the *in vivo* release of 5-HT and DA in mouse frontal cortex. *Neuropharmacology* 45, 1050–1056.
- Altamura, A.C., Dell'Osso, B., Serati, M., Ciabatti, M., Buoli, M., 2008. Recent assessments on the neurobiology of major depression: a critical review. *Rivista di Psichiatria* 43, 185–207.
- Benton, D., Cook, R., 1991. The impact of selenium supplementation on mood. *Biological Psychiatry* 29, 1092–1098.
- Benton, D., 2001. Selenium intake, mood and other aspects of psychological functioning. *Nutritional Neuroscience* 5, 363–374.
- Blier, P., de Montigny, C., 1994. Current advances and trends in the treatment of depression. *Trends Pharmacological Science* 15, 220–226.
- Bockaert, J., Claeysen, S., Compan, V., Dumuis, A., 2008. 5-HT₄ receptors: history, molecular pharmacology and brain functions. *Neuropharmacology* 55, 922–931.
- Bourin, M., Chenu, F., Prica, C., Hascoët, M., 2009. Augmentation effect of combination therapy of aripiprazole and antidepressants on forced swimming test in mice. *Psychopharmacology* 206, 97–107.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein–dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248–254.
- Brüning, C.A., Prigol, M., Roehrs, J.U., Nogueira, C.W., Zeni, G., 2008. Involvement of the serotonergic system in the anxiolytic-like effect caused by *m*-trifluoromethyl-diphenyl diselenide in mice. *Behavioural Brain Research* 205, 511–517.
- Bundgaard, C., Larsen, F., Jorgensen, M., Gabrielsson, J., 2006. Mechanistic model of acute autoinhibitory feedback action after administration of SSRIs in rats: application to escitalopram-induced effects on brain serotonin levels. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 29, 394–404.
- Eren, I., Naziroglu, M., Demirdas, A., 2007. Protective effects of lamotrigine, aripiprazole and escitalopram on depression-induced oxidative stress in rat brain. *Neurochemical Research* 32, 1188–1195.
- Evrard, A., Malagie, I., Laporte, A.M., Boni, C., Hanoun, N., Trillat, A.C., Seif, I., De Maeyer, E., Gardier, A., Hamon, M., Adrien, J., 2002. Altered regulation of the 5-HT system in the brain of MAO-A knock-out mice. *European Journal of Neuroscience* 15, 841–851.
- Felton, T.M., Kang, T.B., Hjorth, S., Auerbach, S.B., 2003. Effects of selective serotonin and serotonin/noradrenaline reuptake inhibitors on extracellular serotonin in rat diencephalon and frontal cortex. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 367, 297–305.
- Finberg, J.P., Pacak, K., Kopin, I.J., Goldstein, D.S., 1993. Chronic inhibition of monoamine oxidase type A increases noradrenaline release in rat frontal cortex. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 347, 500–505.
- Gray, E.G., Whittaker, V.P., 1962. The isolation of nerve endings from brain: an electron-microscope study of cell fragments derived by homogenization and centrifugation. *Journal of Anatomy* 96, 79–87.
- Herken, H., Gurel, A., Selek, S., Armutcu, F., Ozen, M.E., Bulut, M., Kap, O., Yumru, M., Savas, H.A., Akyol, O., 2007. Adenosine deaminase, nitric oxide, superoxide dismutase, and xanthine oxidase in patients with major depression: impact of antidepressant treatment. *Archives of Medical Research* 38, 247–252.
- Hirvonen, J., Karlsson, H., Kajander, J., Lepola, A., Markkula, J., Rasi-Hakala, H., Nägren, K., Salmiinen, J.K., Hietala, J., 2008. Decreased brain serotonin 5-HT_{1A} receptor availability in medication naive patients with major depressive disorder: an *in vivo* imaging study using PET and [carbonyl-¹¹C] WAY-100635. *International Journal of Neuropsychopharmacology* 11, 65–76.
- Hochman, S., Garraway, S.M., Machacek, D.W., Shay, B.L., 2003. 5-HT receptors and the neuromodulatory control of spinal cord function. In: Cope, T.C. (Ed.), *Motor Neurobiology of the Spinal Cord*. CRC Press, Washington, pp. 47–87.
- Kendler, K.S., Gardner, C.O., Fiske, A., Gatz, M., 2009. Major depression and coronary artery disease in the Swedish Twin registry. *Archives of General Psychiatry* 66, 857–863.
- Koe, B.K., Weissman, A., 1966. *p*-Chlorophenylalanine: a specific depletor of brain serotonin. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 154, 499–516.
- Krajil, M., 1965. A rapid microfluorimetric determination of monoamine oxidase. *Biochemical Pharmacology* 14, 1684.
- Krishnan, K.R., 2007. Revisiting monoamine oxidase inhibitors. *Journal of Clinical Psychiatry* 68, 35–41.
- Lazure, K.E., Lydiatt, W.M., Denman, D., Burke, W.J., 2009. Association between depression and survival or disease recurrence in patients with head and neck cancer enrolled in a depression prevention trial. *Head Neck-Journal for Sciences Specialties Head Neck* 31, 888–892.
- Machado, D.G., Kaster, M.P., Binfare, R.W., Dias, M., Santos, A.R.S., Pizzolatti, M.G., Brighente, I.M., Rodrigues, A.L.S., 2007. Antidepressant-like effect of the extract from leaves of *Schinus molle* L. in mice: evidence for the involvement of the monoaminergic system. *Progress in Neuro-psychopharmacology and Biological Psychiatry* 31, 421–428.
- Matsumoto, T., Furuta, T., Nimura, Y., Suzuki, O., 1984. *p*-(3-Hydroxyphenyl) propionic acid as a new fluorogenic reagent for amine oxidase assays. *Analytical Biochemistry* 138, 133–136.
- McKenna, M.T., Michaud, C.M., Murray, C.J.L., Marks, J.S., 2005. Assessing the burden of disease in the United States using disability-adjusted life years. *Journal of Preventive Medicine* 28, 415–423.
- Millan, M.J., 2004. The role of monoamines in the actions of established and “novel” antidepressant agents: a critical review. *European Journal of Pharmacology* 500, 371–384.
- Millan, M.J., 2006. Multi-target strategies for the improved treatment of depressive states: conceptual foundations and neuronal substrates, drug discovery and therapeutic application. *Pharmacology & Therapeutics* 110, 135–370.
- Miorelli, S.T., Rosa, R.M., Moura, D.J., Rocha, J.C., Lobo, L.A.C., Henriques, J.A.P., Saffi, J., 2008. Antioxidant and anti-mutagenic effects of eblesen in yeast and in cultured mammalian V79 cells. *Mutagenesis* 23, 93–99.
- Musselman, D.L., Evans, D.L., Nemeroff, C.B., 1998. The relationship of depression to cardiovascular disease – epidemiology, biology, and treatment. *Archives of General Psychiatry* 55, 580–592.
- Neu, P., 2009. Correlation of depression with stroke. *Pathophysiological mechanisms. Nervenarzt* 80, 772.
- O'Neill, M.F., Conway, M.W., 2001. Role of 5-HT(1A) and 5-HT(1B) receptors in the mediation of behavior in the forced swim test in mice. *Neuropsychopharmacology* 24, 391–398.
- Páez-Pereda, M., 2005. New drug targets in the signalling pathways activated by antidepressants. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 29, 1010–1016.
- Palvimäki, E.P., Kuoppamäki, M., Syvalähti, E., Hietala, J., 1999. Differential effects of fluoxetine and citalopram treatments on serotonin 5-HT_{2C} receptor occupancy in rat brain. *International Journal of Neuropsychopharmacology* 2, 95–99.
- Peyrot, M., 2003. Depression: a quiet killer by any name. *Diabetes Care* 26, 2952–2953.
- Porsolt, R.D., Bertin, A., Jalfre, M., 1977a. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie* 299, 327–336.
- Porsolt, R.D., Le Pichon, M., Jalfre, M., 1977b. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 266, 730–732.
- Porsolt, R.D., Chermat, R., Lenegre, A., Avril, I., Janvier, S., Steru, L., 1987. Use of the automated tail suspension test for the primary screening of psychotropic agents. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie* 288, 11–30.
- Posser, T., Kaster, M.P., Baraúna, S.C., Rocha, J.B.T., Rodrigues, A.L.S., Leal, R.B., 2009. Antidepressant-like effect of the organoselenium compound eblesen in mice: evidence for the involvement of the monoaminergic system. *European Journal of Pharmacology* 602, 85–91.
- Rayman, M.P., 2000. The importance of selenium to human health. *Lancet* 356, 233–241.

- Savegnago, L., Jesse, C.R., Pinto, L.G., Rocha, J.B.T., Nogueira, C.E., Zeni, G., 2007a. Monoaminergic agents modulate antidepressant-like effect caused by diphenyl diselenide in rats. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 3, 1261–1269.
- Savegnago, L., Pinto, L.G., Jesse, C.R., Alves, D., Rocha, J.B.T., Nogueira, C.W., Zeni, G., 2007b. Antinociceptive properties of diphenyl diselenide: evidences for the mechanism of action. *European Journal of Pharmacology* 555, 129–138.
- Schildkraut, J.J., 1965. The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *American Journal of Psychiatry* 122, 509–522.
- Shih, J.C., Chen, K., Ridd, M.J., 1999. Monoamine oxidase: from genes to behavior. *Annual Review of Neuroscience* 22, 197–217.
- Soto-Otero, R., Mendez-Alvarez, E., Hermida-Ameijeiras, A., Sanchez-Sellero, I., Cruz-Landeira, A., Lamas, M.L., 2001. Inhibition of brain monoamine oxidase activity by the generation of hydroxyl radicals: potential implications in relation to oxidative stress. *Life Sciences* 69, 879–889.
- Stein, A.L., Alves, D., da Rocha, J.T., Nogueira, C.W., Zeni, G., 2008. Copper iodide-catalyzed cyclization of (Z)-chalcogenoynes. *Organic Letters* 10, 4983–4986.
- Steru, L., Chermat, R., Thierry, B., Simon, P., 1985. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology* 85, 367–370.
- Taksande, B.G., Kotagale, N.R., Tripathi, S.J., Ugale, R.R., Chopde, C.T., 2009. Antidepressant like effect of selective serotonin reuptake inhibitors involve modulation of imidazoline receptors by agmatine. *Neuropharmacology* 57, 415–424.
- Ursini, F., Bindoli, A., 1987. The role of selenium peroxidases in the protection against oxidative damage of membranes. *Chemistry and Physics of Lipids* 44, 255–276.
- Wilhelm, E.A., Jesse, C.R., Bortolatto, C.F., Nogueira, C.W., Savegnago, L., 2009a. Anticonvulsant and antioxidant effects of 3-alkynyl selenophene in 21-day-old rats on pilocarpine model of seizures. *Brain Research Bulletin* 79, 281–287.
- Wilhelm, E.A., Jesse, C.R., Roman, S.S., Nogueira, C.W., Savegnago, L., 2009b. Hepatoprotective effect of 3-alkynyl selenophene on acute liver injury induced by D-galactosamine and lipopolysaccharide. *Experimental and Molecular Pathology* 87, 20–26.
- Yura, A., Kiuchi, Y., Uchikawa, T., Uchida, J., Yamazaki, Y., Oguchi, K., 1996. Possible involvement of calmodulin-dependent kinases in Ca^{2+} -dependent enhancement of [3H]5-hydroxytryptamine uptake in rat cortex. *Brain Research* 738, 96–102.

CAPÍTULO 2

4.2 Capítulo 2

4.2.1 Materiais e Métodos

4.2.1.1 Drogas

Os compostos selenofenos, cujas fórmulas estruturais estão representadas na Figura 1, foram preparados e caracterizados em nosso laboratório pelo método previamente descrito por Stein et al. (2008). O composto DPS, estudado no Capítulo 1, por motivos didáticos, foi denominado selenofeno **d**. Os compostos foram diluídos em óleo de canola e administrados pela via intragástrica (i.g.) em volume fixo de 10 mL/kg de peso corporal. A paroxetina foi diluída em salina e administrada pela via intraperitoneal (i.p.). As doses, as vias de administração e os tempos de tratamento das drogas foram baseados no estudo apresentado no Capítulo 1.

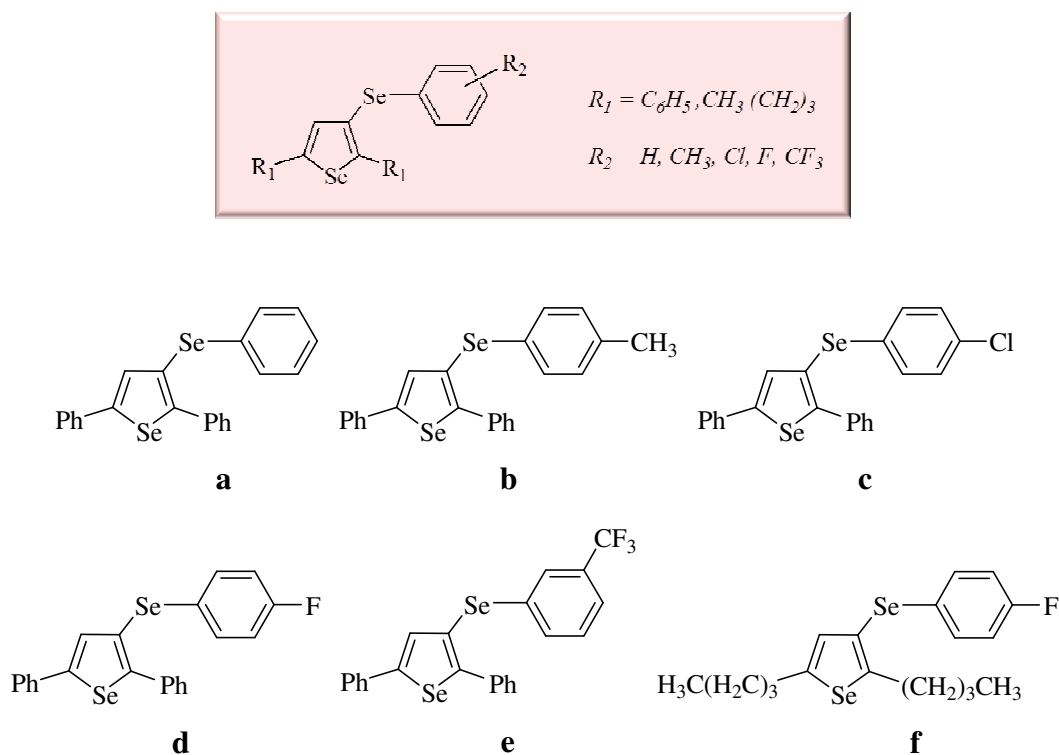


Figura 1. Estrutura química dos selenofenos (**a-f**) estudados.

4.2.1.2 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss machos, pesando entre 25 e 30g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Os animais foram acondicionados sob condições de temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e mantidos em um ciclo de 12h luz/12h escuro. A dieta foi constituída de ração comercial (GUABI, RS, Brasil) e água fresca *ad libitum*.

Todos os testes foram realizados com grupos separados de animais ($n = 6$) e cada animal foi usado apenas uma vez em cada teste. Todos os procedimentos foram realizados para minimizar o sofrimento e reduzir o número de animais usados nos experimentos. Após a realização dos testes comportamentais, os animais foram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical.

4.2.1.3 Teste do Nado Forçado (TNF)

O TNF, originalmente descrito por Porsolt et al. (1977a,b), é um modelo farmacológico comumente usado para verificar o efeito antidepressivo de novas drogas. Neste teste, os camundongos foram forçados a nadar individualmente em recipientes cilíndricos, de 10 cm de diâmetro e 25 cm de altura, contendo 19 cm de água a $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Os animais receberam os selenofenos (**a-f**) na dose de 50 mg/kg, via i.g., 30 minutos antes do teste. Esta dose e tempo de administração foram baseados nos resultados do Capítulo 1, onde o composto DPS (selenofeno **d**) apresentou efeito do tipo antidepressivo máximo. A paroxetina, na dose de 16 mg/kg, via i.p., foi administrada 45 minutos antes do teste e usada como controle positivo. O tempo de imobilidade foi observado durante os 4 últimos minutos de um período total de 6 minutos. Os animais do grupo controle receberam óleo de canola, i.g., e salina (i.p.), 30 e 45 minutos antes do teste, respectivamente. Neste teste, um decréscimo no tempo de imobilidade é um indicativo de efeito do tipo antidepressivo (Porsolt et al., 1977a,b).

4.2.1.4 Análise Estatística

Todos os resultados foram expressos como média \pm erro padrão (EP). Os dados foram analisados pelo teste de normalidade de D'Agostino seguido pela comparação dos grupos

experimentais usando o teste *t* para amostras independentes. Os valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.

4.2.2 Resultados

4.2.2.1 Efeito dos selenofenos **a-f** no TNF

O tratamento dos animais com paroxetina 16 mg/kg, administrada pela via i.p., causou uma significativa redução no tempo de imobilidade dos animais no TNF (68 %), quando comparado com os animais do grupo controle (Figura 2).

O teste *t* para amostras independentes revelou diferença significativa entre os grupos tratados com os difenilselenofenos **c** ($P < 0.01$), **d** ($P < 0.001$) e **e** ($P < 0.05$), quando comparados aos animais do grupo controle (Figura 2). Tais compostos, substituídos com cloro, flúor e triflúor, administrados pela via i.g. na dose de 50 mg/kg, 30 minutos antes do teste, reduziram significativamente o tempo de imobilidade dos camundongos no TNF cerca

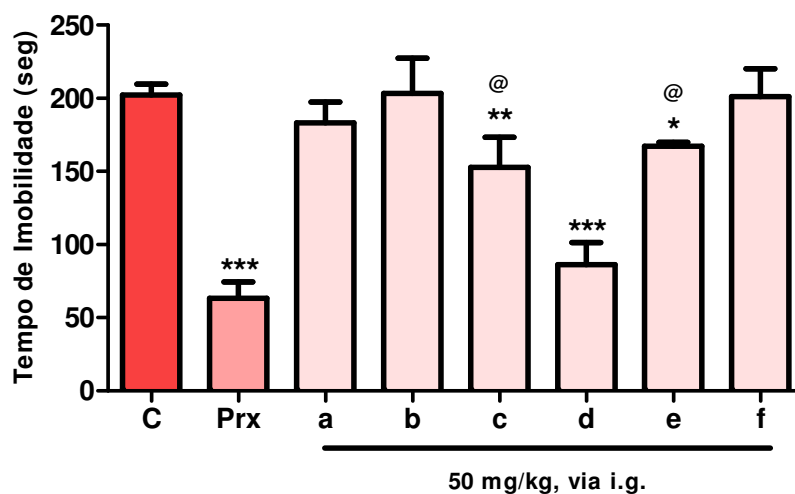


Figura 2. Efeito dos selenofenos (**a-f**) sobre o tempo de imobilidade observado no TNF em camundongos. Os compostos **a-f** foram administrados na dose de 50 mg/kg, pela via i.g., 30 minutos antes do teste. A paroxetina, na dose de 16 mg/kg, administrada pela via i.p. 45 minutos antes do teste, foi usada como controle positivo. Os animais do grupo controle receberam apenas óleo de canola. Os resultados foram expressos como média \pm EP ($n = 7$ animais por grupo). Os asteriscos denotam o nível de significância em comparação ao grupo controle *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$ e * $P < 0.05$ (teste *t*). @ denota $P < 0.05$ quando comparado ao grupo tratado com o difenilselenofeno **d** (teste *t*).

de 24 %, 57 % e 17 %, respectivamente. A análise estatística demonstrou uma diferença significativa entre os efeitos anti-imobilidade dos compostos **c** e **e** no TNF em comparação aos animais tratados com o difenilselenofeno **d**.

O tratamento dos camundongos com os difenilselenofenos **a** e **b**, e o dibutilselenofeno **f** não alterou o tempo de imobilidade dos animais no TNF em comparação ao grupo de animais tratado com veículo (Figura 2).

5 DISCUSSÃO

Os selenofenos são uma importante classe de compostos heterocíclicos contendo selênio. São intermediários sintéticos muito utilizados em química orgânica, consistindo numa ferramenta sintética bastante útil (Rhoden e Zeni, 2011). Muitos trabalhos têm demonstrado o efeito biológico e o potencial farmacológico de diferentes moléculas pertencentes a essa classe (Abdel-Hafez, 2005; Xiao e Parkin, 2006; Juang et al., 2007; Shiah et al., 2007; Wilhelm et al., 2009a,b,c, 2010). Este trabalho demonstrou, pela primeira vez, que o composto 3-(4-fluorofenilselenil)-2,5-difenilselenofeno, que foi genericamente denominado DPS (Capítulo 1) ou selenofeno **d** (Capítulo 2), apresentou efeito do tipo antidepressivo em camundongos, provavelmente por interagir com o sistema serotoninérgico (Capítulo 1). Além disso, os resultados complementares aqui mostrados sugerem que modificações na estrutura química dessa molécula parecem afetar de modo significativo o efeito comportamental observado.

Na primeira parte desse trabalho (Capítulo 1), avaliou-se o efeito do tipo antidepressivo do DPS usando dois modelos comportamentais de depressão em camundongos: TSC e TNF. Os resultados deste trabalho mostraram que o DPS produziu significativo efeito do tipo antidepressivo. O selenofeno, administrado pela via i.g. nas doses de 50 e 100 mg/kg, 30 minutos antes do teste, reduziu significativamente o tempo de imobilidade dos animais tanto no TSC como no TNF. Esses modelos são comumente usados para o *screening* pré-clínico de drogas com propriedades antidepressivas e respondem adequadamente aos antidepressivos com efeito comprovado e usados atualmente na clínica. De fato, o controle positivo usado neste trabalho, em ambos os testes, paroxetina (Figura 4, página 36 e Figura 2, página 65), antidepressivo pertencente à classe dos ISRSs, também reduziu significativamente o tempo de imobilidade dos animais, o que reforça que estes testes são preditivos de drogas com efeito antidepressivo.

O efeito observado nos testes comportamentais utilizados nesse trabalho poderia ser erroneamente interpretado caso o composto estudado apresentasse algum efeito psicoestimulante. No entanto, como a administração de DPS, nas doses em que apresentou efeito do tipo antidepressivo em camundongos, não alterou a atividade locomotora e/ou exploratória dos animais, pode-se afirmar que a redução no tempo de imobilidade observada no TSC e no TNF é um parâmetro válido que pode ser usado para demonstrar o efeito

comportamental do tipo antidepressivo do DPS, que não é devido a um efeito psicoestimulante do mesmo.

Sabendo-se que o composto estudado apresentou efeito do tipo antidepressivo em camundongos, escolheu-se o TNF para verificar o mecanismo pelo qual o DPS desempenha tal efeito. Um considerável número de trabalhos tem se dedicado ao estudo do mecanismo de ação dos antidepressivos e atualmente é amplamente aceito que um aumento na neurotransmissão serotoninérgica central constitui um fator terapêutico importante para o efeito farmacológico de tais drogas (Millan, 2004, 2006; Kriegebaum et al., 2010). Assim, a fim de testar a hipótese de que o sistema serotoninérgico está envolvido no mecanismo de ação do DPS, os animais foram tratados com pCPA. Esta droga é um inibidor da enzima TrpOH e, administrada na dose de 100 mg/kg durante 4 dias, é capaz de reduzir os níveis cerebrais de 5-HT (Koe e Weissman, 1966). Interessantemente, a administração de pCPA antagonizou completamente o efeito comportamental promovido pelo DPS no TNF. Esses resultados sugerem que, para desempenhar seu efeito do tipo antidepressivo, o DPS necessita que a transmissão serotoninérgica esteja intacta. Isto está de acordo com outros trabalhos que mostraram que o pCPA bloqueia o efeito do tipo antidepressivo de drogas comumente usadas na terapia da depressão, como a fluoxetina, por exemplo, e também de novas drogas com ação do tipo antidepressiva (Duarte et al., 2007; An et al., 2008), mostrando a importância da serotonina para o mecanismo de ação das mesmas.

Além disso, os resultados deste trabalho demonstraram que os receptores serotoninérgicos também estão envolvidos nos efeitos comportamentais promovidos pelo DPS em camundongos. O efeito do tipo antidepressivo do DPS no TNF foi completamente bloqueado pela pré-administração de antagonistas dos subtipos 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A/2C} e 5-HT₃. De acordo com esses resultados, diversos trabalhos tem mostrado o envolvimento dos receptores serotoninérgicos no efeito do tipo antidepressivo de diferentes drogas (Savegnago et al., 2007a; Sugimoto et al., 2010; Ulak et al., 2010; Jesse et al., 2010a,b). De fato, a maioria dos medicamentos antidepressivos pode interagir direta ou indiretamente com múltiplos receptores, resultando nos seus efeitos farmacológicos (Kent et al., 2000; Millan, 2004). Similarmente, drogas que interagem com o sistema serotoninérgico, aumentando os níveis cerebrais de 5-HT (Bundgaard et al., 2006), podem levar a ativação dos receptores de 5-HT, que estão associados, pelo menos em parte, aos efeitos terapêuticos dessas drogas (Stahl, 1998; Palvimaki et al., 1999). Os ISRSs, por exemplo, são as drogas mais utilizadas para o tratamento da depressão atualmente e sabe-se que, em animais, uma única administração é capaz de aumentar significativamente os níveis extracelulares de 5-HT (Felton et al., 2003).

Desse modo, uma vez que os resultados até aqui descritos levaram à hipótese de que a ação anti-imobilidade do DPS no TNF provavelmente está relacionado ao sistema serotoninérgico, o efeito comportamental da interação de doses subefetivas de DPS e paroxetina, o ISRS mais potente conhecido atualmente (Chavez-Leon et al., 2008), foi avaliado. Observou-se que a administração conjunta de DPS e paroxetina, em doses em que antes não desempenhavam nenhum efeito comportamental nos camundongos, foi capaz de reduzir o tempo total de imobilidade no TNF. Com base nos resultados desse experimento, pode-se supor que o composto estudado influencie de alguma forma as alterações neuroquímicas produzidas pela paroxetina, agindo sinergicamente com a mesma e resultando numa potencialização do seu efeito comportamental no TNF.

Partindo do pressuposto de que o DPS atuaria aumentando os níveis cerebrais de 5-HT, o possível mecanismo neuroquímico envolvido no efeito do tipo antidepressivo do DPS foi investigado. As drogas antidepressivas atualmente conhecidas, que afetam a transmissão serotoninérgica, aumentando os níveis cerebrais de 5-HT, podem agir por dois mecanismos: a) inibir o catabolismo da 5-HT, como no caso dos IMAOs, ou b) inibir a captação de 5-HT a nível de neurônio pré-sináptico, como os ISRSs. Os resultados deste trabalho mostraram que o DPS, em uma dose em que apresentou efeito do tipo antidepressivo em camundongos, não inibiu a atividade cerebral de nenhum dos subtipos da enzima MAO. A inibição do catabolismo da 5-HT não está relacionada, portanto, com o mecanismo de ação antidepressiva do DPS em camundongos, o que suporta o fato de que outro mecanismo está envolvido no efeito comportamental deste selenofeno.

Assim, testou-se a hipótese de que o DPS poderia interagir com o mecanismo de recaptação de 5-HT pelo neurônio pré-sináptico. Interessantemente, a administração de DPS foi capaz de reduzir cerca de 55,6% a captação de 5-HT pelos sinaptossomas de cérebro dos camundongos tratados com uma dose em que o composto produz efeito do tipo antidepressivo. Estes resultados sugerem que o DPS pode interagir com o transportador de 5-HT pré-sináptico e aumentar os níveis centrais de 5-HT, levando a ativação dos receptores serotoninérgicos e podendo ser o principal responsável pelo seu efeito do tipo antidepressivo. Este fato também pode ajudar a explicar o efeito sinérgico produzido pela co-administração de DPS e paroxetina, em doses subefetivas.

A Figura 1 (página 63) apresenta um esboço do possível mecanismo de ação proposto para o efeito do tipo antidepressivo promovido pelo DPS em camundongos. Provavelmente essa droga atua inibindo a recaptação de 5-HT pelo transportador pré-sináptico, promovendo um aumento dos níveis dessa monoamina na fenda sináptica. A elevação nas concentrações de

5-HT no espaço extracelular pode ativar indiscriminadamente todos os subtipos de receptores serotoninérgicos, transmitindo o sinal neuronal e sendo responsável por seu efeito farmacológico (Figura 1B). Não se pode descartar, no entanto, que o DPS também possa ativar os receptores serotoninérgicos pós-sinápticos ligando-se diretamente a eles (Figura 1C).

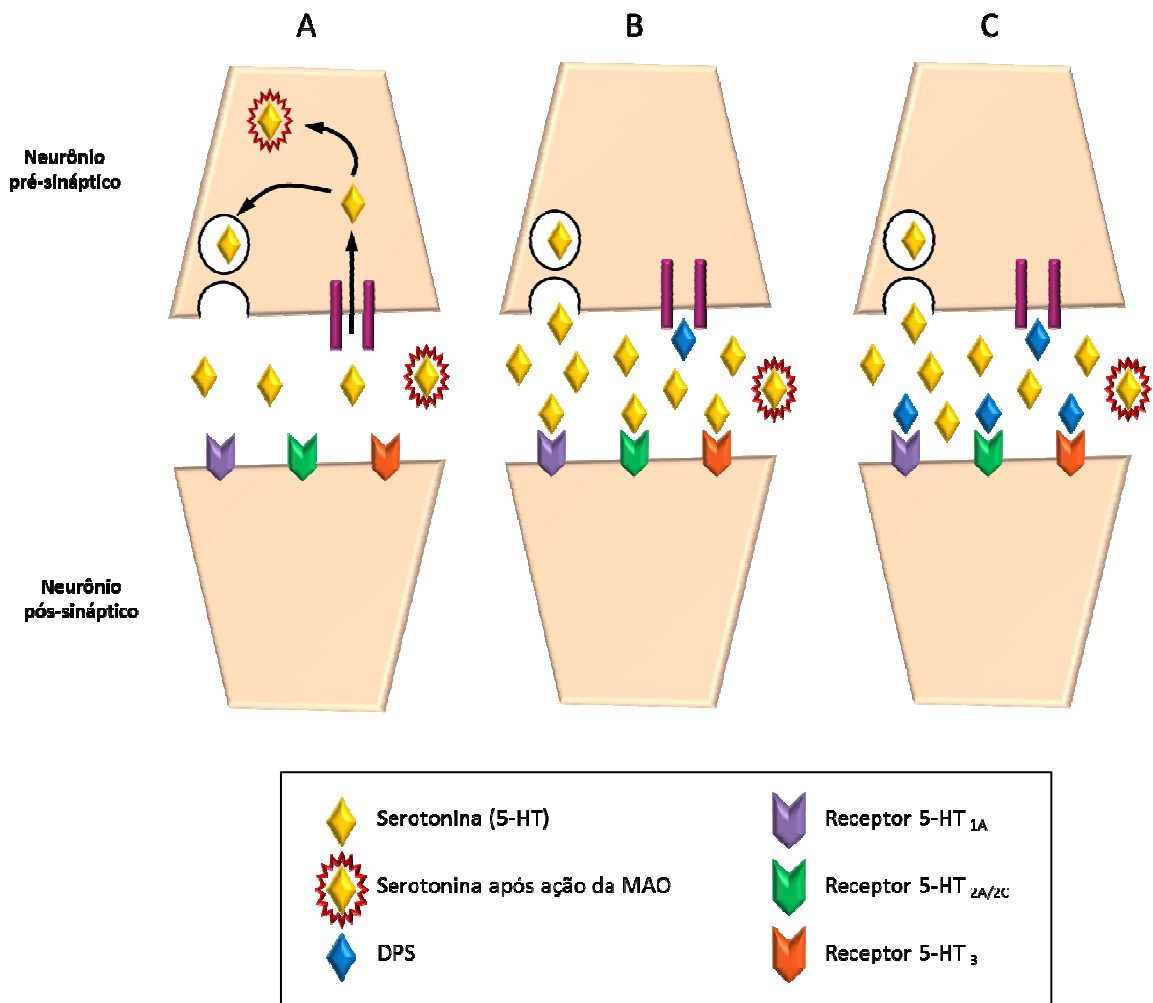


Figura 1. Mecanismo de ação proposto para o DPS (B e C). A representa uma sinapse neuronal em ausência de DPS.

A inibição da recaptação de 5-HT é o mecanismo que melhor explica os efeitos comportamentais promovidos pelo DPS, principalmente se levarmos em conta sua estrutura química. Além de o selênio estar presente como heteroátomo no anel de cinco membros do DPS, ele também está presente ligado ao carbono 3 desse anel. Nos organismos vivos, o selênio e também as moléculas orgânicas contendo esse elemento podem interagir com grupos funcionais das biomoléculas, modificando sua estrutura e/ou propriedades biológicas. Eles

ligam-se principalmente aos grupos tióis (SH), o que pode estar fortemente envolvido com as propriedades farmacológicas desses compostos (Nogueira et al., 2004; Nogueira e Rocha, 2010). Assim, a presença de dois átomos de selênio em sua estrutura pode levantar a hipótese de que o DPS inibe a atividade do transportador de 5-HT através de uma possível ligação aos sítios redox dessa proteína. Alterações estruturais na molécula de DPS poderiam prejudicar e/ou atrapalhar a interação do DPS com o transportador de 5-HT mediada pelo selênio.

Além disso, a fórmula estrutural do DPS possui uma porção “fluorofenil” que é comum a outras drogas que também inibem a captação de 5-HT. Essa porção também está presente na molécula da paroxetina e do citalopram, os ISRSs mais potente e seletivo, respectivamente (Figura 2, página 65) (Chavez-Leon et al., 2008). A porção “trifluorofenil”, com três átomos de flúor ligados à fenila, presente na molécula da fluoxetina (Figura 4, página 36), a primeira droga dessa classe descoberta, também lhe confere certa similaridade estrutural. A presença das porções “fluorofenil” ou “trifluorofenil” na estrutura química destes ISRSs está intimamente relacionada à seletividade destas drogas pelo transportador de 5-HT e à potência com que as mesmas o inibem (Silverman, 1992). Sabe-se que a presença de flúor em determinadas posições de uma molécula pode aumentar sua meia vida no organismo, ou modular suas propriedades físico-químicas, como acidez, basicidade e lipofilicidade, além de poder gerar mudanças conformacionais e aumentar a afinidade do fármaco por uma proteína-alvo, o que está diretamente ligado, portanto, aos seus efeitos farmacológicos (Silverman, 1992; Dolbier, 2005). No entanto, a existência de uma relação direta entre a estrutura química dos antidepressivos e a capacidade de ligação ao transportador de 5-HT, levando a sua inibição, ainda não está bem definida (Apparsundaram et al., 2008; Chavez-Leon et al., 2008). Desse modo, também a relação entre a porção “fluorofenil” e a inibição do transportador de 5-HT pelo DPS é ainda mera suposição. A coincidência estrutural pode, porém, constituir-se de um grande indício de que essa porção pode estar, pelo menos em parte, envolvida no mecanismo de ação dessas drogas. Para o DPS, o radical “fluorofenil” poderia comportar-se como uma porção que facilita a aproximação e/ou ligação da molécula ao transportador (ao sítio redox do transportador, por exemplo), principalmente devido a propriedades particulares do átomo de flúor como sua alta eletronegatividade e pequeno raio atômico (Silverman, 1992).

Somente a semelhança estrutural do DPS com os ISRSs e sua porção “fluorofenil” são responsáveis pelo seu efeito do tipo antidepressivo em camundongos? Os resultados apresentados no Capítulo 2 nos ajudaram a responder esta questão.

Na segunda parte deste trabalho foram testados diferentes compostos selenofenos, todos eles muito similares ao DPS (chamado aqui de selenofeno **d**), com pequenas modificações estruturais. O átomo de flúor na porção “fluorofenil” foi substituído por hidrogênio (H; selenofeno **a**), metila (CH₃; selenofeno **b**), cloro (Cl; selenofeno **c**) ou triflúor (CF₃; selenofeno **e**). A estrutura química do selenofeno **f** manteve o radical “fluorofenil” e substituiu as duas fenilas ligadas ao anel selenofeno por dois radicais alquílicos derivados do butil (Figura 1, página 56).

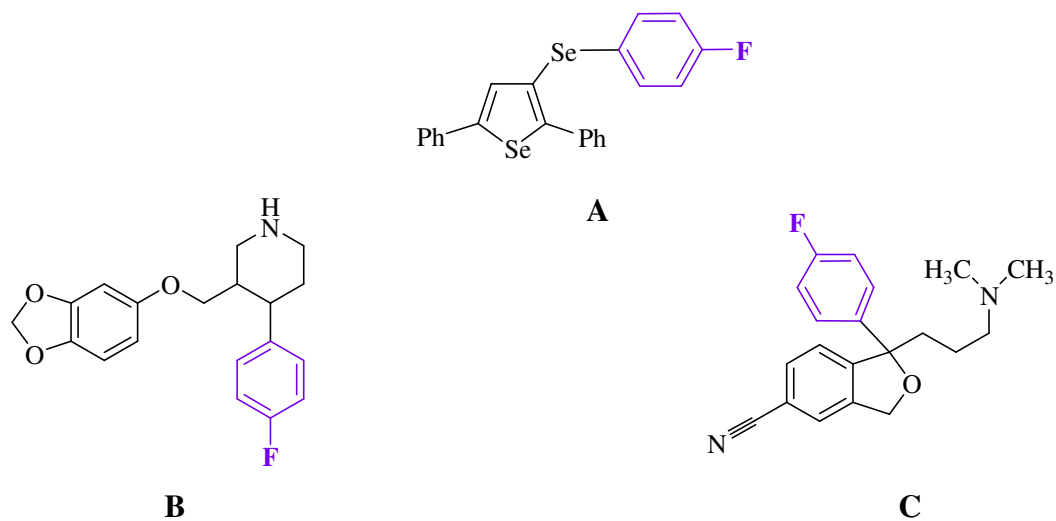


Figura 2. Semelhança estrutural entre o DPS (**A**) e outras drogas que inibem a recaptação de 5-HT: paroxetina (**B**) e citalopram (**C**). A porção “fluorofenil” é comum às três estruturas.

Os compostos derivados do DPS foram testados no TNF em camundongos. A dose e o tempo de pré-tratamento escolhidos foram baseados nos resultados do Capítulo 1 obtidos para o DPS. O DPS (ou selenofeno **d**), na dose de 50 mg/kg, administrado pela via i.g., 30 min antes do teste, apresentou efeito do tipo antidepressivo, reduzindo cerca de 57% o tempo total de imobilidade dos animais no TNF. Esse resultado está de acordo com os resultados apresentados no artigo científico, que revelaram o mesmo perfil. A substituição do átomo de flúor, no entanto, por hidrogênio (selenofeno **a**) ou por um grupo doador de elétrons, como a metila (selenofeno **b**), acarretou na total perda de efeito do tipo antidepressivo. Esse fato sugere que esse efeito comportamental do DPS parece ser dependente da presença de um grupo retirador de elétrons ligado a fenila, que por sua vez é ligada na posição 3 do anel selenofeno.

Os selenofenos **c** e **e** apresentam, respectivamente, um átomo de cloro e um grupo triflúor em substituição ao flúor do DPS. Esses compostos também reduziram o tempo total

de imobilidade dos animais no TNF, demonstrando certo efeito do tipo antidepressivo que, embora significativo, foi consideravelmente menor que o efeito do DPS (24% de efeito para selenofeno **c** e 17% para o **e**). O átomo de cloro é menos eletronegativo e possui um maior raio atômico que o flúor sendo, portanto, uma estrutura mais volumosa, com um maior impedimento espacial. Supondo-se que a porção “fluorofenila” seja a unidade da molécula de DPS que esteja envolvida na inibição do transportador de 5-HT, pode-se especular que a presença de uma porção mais volumosa poderia interferir de alguma forma com a ligação da molécula de selenofeno **c** ao sítio de ligação da proteína, reduzindo seus efeitos farmacológicos. De modo semelhante pode também ser explicada a menor eficiência do selenofeno **e**. Por apresentar três átomos de flúor, a princípio, poderíamos esperar que a molécula apresentasse um efeito farmacológico mais intenso, uma vez que esse grupo apresenta um poder retirador de elétrons bem maior. No entanto, com base na hipótese de que uma porção mais volumosa poderia prejudicar a ligação da molécula ao sítio do transportador, o efeito estérico desempenhado pelo radical “triflúor” também pode ser usado para explicar sua menor eficiência.

Assim, o impedimento espacial parece ser uma explicação plausível para o efeito farmacológico desempenhado pelo DPS. Não se pode descartar, porém, a hipótese de que as modificações em sua estrutura alterem também suas propriedades farmacocinéticas. Essas modificações estruturais poderiam alterar a absorção e distribuição da droga, reduzindo, portanto, a quantidade disponível para chegar ao local de ação e desempenhar seu efeito farmacológico. A halogenação de moléculas é uma alternativa bastante usada no desenvolvimento de drogas com características farmacocinéticas previamente desfavoráveis; a presença de um átomo de halogênio em posições específicas da molécula pode, por exemplo, alterar suas propriedades físico-químicas bem como reduzir seu metabolismo, aumentando sua meia vida no organismo. No entanto, a semelhança estrutural do DPS com os antidepressivos ISRS (Figura 2, página 65) fornece mais indícios de que as modificações estruturais alterem suas propriedades farmacodinâmicas em detrimento das farmacocinéticas.

Os resultados acima descritos nos fazem supor, portanto, que a porção “fluorofenila” é um grupo essencial para o efeito do tipo antidepressivo desempenhado pelo DPS (por alterar a interação da droga com transportador de 5-HT e/ou melhorar suas propriedades farmacocinéticas). Os resultados obtidos para o selenofeno **f**, no entanto, sugerem que os grupos ligados às posições 2 e 5 do anel selenofeno também desempenham um importante papel nas propriedades farmacológicas e/ou farmacocinéticas dessa molécula. A substituição das duas fenilas por dois radicais butila abole completamente o efeito comportamental antes

observado, embora a porção “fluorofenila” seja mantida. Os grupos fenila constituem uma porção bastante apolar de qualquer molécula. Estes grupos podem formar interações hidrofóbicas com outras porções apolares presentes na mesma molécula ou em uma proteína-alvo, que pode ser um receptor, enzima ou transportador. Essa interação apresenta alta energia de ligação, resultando numa diminuição da energia livre, que estabiliza o complexo formado entre a droga e a proteína-alvo (Silverman, 1992). Os radicais butila, presentes na molécula do selenofeno **f**, também apresentam características apolares, mas provavelmente interagem com a proteína-alvo por forças de *Van der Waals*. As forças de *Van der Waals* resultam da distribuição assimétrica da densidade eletrônica em moléculas apolares, principalmente alquílicas, resultando na geração de um dipolo temporário. No entanto, estas interações são mais fracas que as forças hidrofóbicas e só são significativas quando as superfícies das duas moléculas estão muito próximas (Silverman, 1992). A presença desse tipo de ligação, portanto, poderia dificultar a interação da molécula **f** com o transportador de 5-HT, motivo pelo qual ela pode não ter apresentado efeito do tipo antidepressivo.

Assim, embora a relação entre os efeitos farmacológicos e a estrutura dos compostos selenofenos aqui estudados seja apenas preliminar, a presença tanto da porção “fluorofenil” como das fenilas ligadas ao anel selenofeno do DPS parecem contribuir de maneira importante para o efeito do tipo antidepressivo apresentado por este composto em camundongos.

6 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados apresentados nesta dissertação, podemos concluir e/ou inferir o seguinte:

- O composto 3-(4-fluorofenilselenil)-2,5-difenilselenofeno (DPS, selenofeno **d**) apresentou efeito do tipo antidepressivo em camundongos quando avaliado no TSC e no TNF.

- O efeito comportamental promovido por este composto parece ser mediado por uma interação com o sistema serotoninérgico, envolvendo os receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A/2C} e 5-HT₃.

- A investigação do possível mecanismo envolvido no mecanismo de ação do tipo antidepressiva do DPS revelou que o composto não interfere no catabolismo das monoaminas, através de uma inibição da atividade da MAO.

- O mecanismo de efeito do tipo antidepressivo do DPS parece estar fortemente relacionado à inibição na recaptção de 5-HT, causando um aumento na neurotransmissão serotoninérgica.

- Modificações estruturais na molécula de DPS causam redução significativa no efeito do tipo antidepressivo observado no TNF em camundongos, sendo essencial a presença da porção fluorofenil e das fenilas ligadas ao anel selenofeno.

7 PERSPECTIVAS

Tendo em vista os resultados obtidos neste trabalho, as perspectivas para trabalhos posteriores são:

- Verificar o envolvimento de outros sistemas de neurotransmissão no efeito do tipo antidepressivo causado pelo DPS, incluindo sua interação com os sistemas Noradrenérgico, Dopaminérgico, Glutamatérgico e Gabaérgico.

- Avaliar o efeito do tipo antidepressivo dos tratamentos crônico e agudo com DPS em um modelo de depressão induzida pelo Estresse Crônico Imprevisível Leve em camundongos.

- Avaliar o efeito dos tratamentos crônico e agudo com DPS em um modelo de comportamento do tipo depressivo induzido pela dor crônica usando o protocolo de Constrição do Nervo Ciático em camundongos.

- Verificar a possível toxicidade causada pela administração aguda e crônica de DPS em camundongos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdel-Hafez, S.H., 2005. Selenium-Containing Heterocycles. Synthesis and Reactions of 2-Amino-4,5,6,7 tetrahydro-1-benzoselenophene-3-carbonitrile with Anticipated Biological Activity. *Russian Journal of Organic Chemistry* 41, 396-401.

Abramets, I. I., 2008. Neurophysiological and Neurochemical Aspects of the effects of Antidepressants and Mood Stabilizers. *Neurophysiology* 40, 64-78.

Acker, C.I., Luchese, C., Prigol, M. and Nogueira, C.W., 2009. Antidepressant-like effect of diphenyldiselenide on rats exposed to malathion: Involvement of Na⁺K⁺ ATPase activity, *Neuroscience Letters* 455, 168-172.

Akiskal, H. S., 1995. Mood disorders: clinical features. In: Kaplan HI, Sadock BJ, editors. *Comprehensive Textbook of Psychiatry*, 1995. 6th ed. Baltimore (MD): Williams & Wilkins.

Altamura, A. C., Dell'Osso, B., Serati, M. Ciabatti, M. Buoli, M., 2008. Recent assessments on the neurobiology of major depression: a critical review. *Rivista di Psichiatria* 43, 185-207.

An, L., Zhang, Y. Z., Yu, N. H., Liu, X. M., Zhao, N., Yuan, L., Li, Y. F., 2008. Role for serotonin in the antidepressant-like effect of a flavonoid extract of Xiaobuxin-Tang. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 89, 572-580.

Angst, J., 1999. Suicide risk in patients with major depressive disorder. *Journal of Clinical Psychiatry* 60, 57-62.

Apparsundaram, S., Stockdale, D. J., Henningsen, R. A., Milla, M. E., Martin, R. S., 2008. Antidepressants targeting the serotonin reuptake transporter act via a competitive mechanism. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 327, 982-990.

Barnes, N. M., Sharp, T., 1999. A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology* 38, 1083–1152.

Baumgarten, H. G., Göthert, M. 1997. Serotonergic Neurons and 5-HT Receptor in the CNS *Handbook of Experimental Pharmacology*, 129, Springer, Berlin.

Bebbington, P., 2004. The classification and epidemiology of unipolar depression. In: Power, M. (Ed.), *Mood Disorders: A Handbook of Science and Practice*. Wiley, Chichester, pp. 3–28.

Behne, D., Hilmert, H., Scheid, S., Gessner, H., Elger, W. 1988. Evidence for specific selenium target tissues and new biologically important selenoproteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 966, 12–21.

Benton, D., 2002. Selenium intake, mood and other aspects of psychological functioning. *Nutritional neuroscience* 5, 363–374.

Benton, D., Cook, R., 1991. The impact of selenium supplementation on mood. *Biological Psychiatry* 29, 1092–1098.

Beyer, C E., Boikess, S., Luo, B., Dawson, L. A., 2002. Comparison of the effects of antidepressants on norepinephrine and serotonin concentrations in the rat frontal cortex: an in-vivo microdialysis study. *Journal of Psychopharmacology* 16, 297-304.

Bockaert, J., Claeysen, S., Becamel, C., Dumuis, A., Marin, P., 2006. Neuronal 5-HT metabotropic receptors: fine-tuning of their structure, signaling, and roles in synaptic modulation. *Cell and Tissue Research* 326, 353–372.

Booij, L., Van der Does, A.J., Riedel, W.J., 2003. Monoamine depletion in psychiatric and healthy populations: review. *Molecular Psychiatry* 8, 951–973.

Bosin, T. R., Schaltenbrand, S. L., 1991. Stimulation of platelet serotonin transport by substituted 1,4-naphthoquinone-induced oxidant stress. *Biochemical Pharmacology* 41, 967-974.

Bosker, F. J., Westerink, B. H. C., Cremers, T. I. F. H., Gerrits, M., van der Hart, M. G. C., Kuipers, S. D., van der Pompe, G., ter Horst, G. J., den Boer, J. A., Korf, J., 2004. Future antidepressants - What is in the pipeline and what is missing? *CNS Drugs* 18, 705-732.

Botega, N. J., Furlanetto, L., Fráguas, Jr. R., 2002. Depressão no paciente clínico. In: Botega, N. J., 2002. *Prática psiquiátrica no hospital geral: interconsulta e emergência*. Porto Alegre: Artmed.

Brüning, C. A., Prigol, M., Roehrs, J. U., Nogueira, C.W., Zeni, G., 2008. Involvement of the Serotonergic System in the Anxiolytic-like Effect Caused by *m*-Trifluoromethyl-diphenyl Diselenide in Mice. *Behavioural Brain Research* 205, 511-517.

Buckman, T., Sutphin, M. S., Eckhert, C. D., 1993. A comparison of the effects of dietary selenium on selenoprotein expression in rat brain and liver. *Biochimica et Biophysica Acta* 1163, 176-184.

Bundgaard, C., Larsen, F., Jorgensen, M., Gabrielsson, J., 2006. Mechanistic model of acute auto inhibitory feed back action after administration of SSRIs in rats: application to escitalopram-induced effects on brain serotonin levels. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 29, 394-404.

Canli, T., Lesch, K. P., 2007. Long story short: the serotonin transporter in emotion regulation and social cognition. *Nature Neuroscience* 10, 1103-1109.

Caspi, A., Sugden, K., Moffitt, T.E., Taylor, A., Craig, I.W., Harrington, H., 2003. Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. *Science* 301, 386-389.

Castano, A., Ayala, A., Rodriguez-Gomez, J. A., Herrera, A. J., Cano, J., Machado, A., 1997. Low selenium diet increases the dopamine turnover in prefrontal cortex of the rat. *Neurochemistry International* 30, 549-555.

Chavez-Leon, E., Uribe, M. P. O., Gomez, C. S., 2008. Selective serotonin reuptake inhibitors antidepressants (SSRIs). *Salud Mental* 31, 307-319.

Chen, F., Larsen, M.B., Sánchez, C., Wiborg, O., 2005. The S-enantiomer of R,S-citalopram, increases inhibitor binding to the human serotonin transporter by an allosteric mechanism. Comparison with other serotonin transporter inhibitors. *European Neuropsychopharmacology* 15, 193–198.

Corrigan, F. M., Reynolds, G. P., Ward, N. I., 1991. Reductions of zinc and selenium in brain in Alzheimer's disease. *Journal Of Trace Elements In Experimental Medicine* 8, 1–5.

Crack, P. J., Taylor, J. M., Flentjar, N. J., Haan, J., Hertzog, P., Ianello, R. C., Kola, I., 2001. Increased infarct size and exacerbated apoptosis in the glutathione peroxidase-1 (Gpx-1) knockout mouse brain in response to ischemia/ reperfusion injury. *Journal of Neurochemistry* 78, 1389 –1399.

Dalgalarrodo, P., 2000. *Psicopatologia e semiologia dos transtornos mentais*. Porto Alegre: ArtesMédicas.

De Groot, M., Anderson, R., Freedland, K. E., 2001. Association of Depression and Diabetes Complications: a Meta-Analysis. *Psychosomatic Medicine* 63, 619-30.

Demetrio, F.N.; Vieira, F. A. H. G., 2001. Efeito da terapia de reposição estrogênica no humor em mulheres menopausadas: revisão da literatura. *Revista de Psiquiatria Clínica*, 28, 89-93.

Demyttenaere, K., De Fruyt, J., Stahl, S. M., 2005. The many faces of fatigue in major depressive disorder. *International Journal of Neuropsychopharmacology* 8, 93-105.

Dicionário Aurélio. *Novo Dicionário Aurélio da Língua Portuguesa*. Editora Positivo. 4ª ed.

Diflorio, A., Jones, I., 2010. Is sex important? Gender differences in bipolar disorder. The specificity of childhood adversities and negative life events across the life span to anxiety and depressive disorders. *International Review of Psychiatry* 22, 437-452.

Dolbier, W. R., 2005. Fluorine chemistry at the millennium. *Journal of fluorine chemistry* 126, 157-163.

DSM-IV, 1994. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, fourth ed. American Psychiatric Association, Washington, DC.

Duarte, F. S., Lach, G., Martins, P. R. C., Romeiro, G. A., Lima, T. C. M., 2008. Evidence for the involvement of the monoaminergic system in the antidepressant-like action of two 4-amine derivatives of 10, 11-dihydro-5H-dibenzo [a,d] cycloheptane in mice evaluated in the tail suspension test. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 32, 368–374.

Duman, C. H., 2010. *Models of Depression. Hormones of the Limbic System Book Series: Vitamins and Hormones Series* 82, 1-21.

Dumont, E., Vanhaecke, F., Cornelis, R., 2006. Selenium speciation from food source to metabolites: a critical review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 385, 1304-1343.

Ersparmer, V., 1954. Pharmacology of indolealkylamines. *Pharmacological Reviews* 6, 425–487.

Felton, T.M., Kang, T.B., Hjorth, S., Auerbach, S.B., 2003. Effects of selective serotonin and serotonin/noradrenaline reuptake inhibitors on extracellular serotonin in rat diencephalon and frontal cortex. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 367, 297-305.

Finley, J. W., Penland, J. G., 1998. Adequacy or deprivation of dietary selenium in healthy men: clinical and psychological findings. *Journal Of Trace Elements In Experimental Medicine* 11, 1–27.

Glassman, A. H., O'Connor, C. M., Califf, R. M., 2002. Sertraline Treatment of Major Depression in Patients with Acute MI or Unstable Angina. *Journal of the American Medical Association* 288, 701-709.

Greenberg, B.D., Tolliver, T.J., Huang, S.J. Li, Q., Bengel, D., Murphy D.L., 1999. Genetic variation in the serotonin transporter promoter region affects serotonin uptake in human blood platelets. *American Journal of Medical Genetics* 88, 83-87.

Gueremy, C., 1980. 3-(4-piperidinylalkyl)indoles, selective inhibitors of neuronal 5-hydroxytryptamine uptake. *Journal of Medicinal Chemistry* 23, 1306.

Gutierrez-Garcia, A. G., Contreras, C. M., 2008. Suicide and some neurobiologic correlates: First part. *Salud Mental* 31, 321-329.

Harmer, C. J., 2008. Serotonin and emotional processing: Does it help explain antidepressant drug action? *Neuropharmacology* 55, 1023-1028.

Hawkes, W. C., Hornbostel, L., 1996. Effects of dietary selenium on mood in healthy men living in a metabolic research unit. *Biological Psychiatry* 39, 121-128.

Heim, C., Nemeroff, C. B., 2001. The role of childhood trauma in the neurobiology of mood and anxiety disorders: preclinical and clinical studies. *Biological Psychiatry* 49, 1023–1039.

Hoyer, D., Clarke, D. E., Fozard, J. R., Hartig, P. R., Martin, G. R., Mylecharane, E. J., Saxena, P. R., Humphrey, P. P., 1994. International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (serotonin). *Pharmacological Reviews* 46, 157-203.

Hoyer, D., Hannon, J. P., Martin, G. R., 2002. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 71, 533–554.

Hyttel, J., 1978. Effect of specific 5-HT uptake inhibitor, citalopram (LU 10-171), on H-3-5-HT uptake in rat-brain synaptosomes in vitro. *Psychopharmacology* 60, 13.

Invernizzi, R., Velasco, C., Bramante, M., Longo, A., Samanin, R., 1997. Effect of 5-HT_{1A} receptor antagonist on citalopram-induced increase in extracellular serotonin in the frontal cortex, striatum and dorsal hippocampus. *Neuropharmacology* 36, 467–473.

Jesse, C. R., Wilhelm, E. A., Bortolatto, C. F., Rocha, J. B. T., Nogueira, C. W., 2010a. Involvement of L-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway in the antidepressant-like effect of bisphenol A in the mouse tail suspension test. *European Journal of Pharmacology* 635, 135-141.

Jesse, C. R., Wilhelm, E. A., Nogueira, C. W., 2010b. Depression-like behavior and mechanical allodynia are reduced by bisphenol A treatment in mice with chronic constriction injury: a comparison with fluoxetine, amitriptyline, and bupropion. *Psychopharmacology* 212.

Juang, S.H., Lung, C.C., Hsu, P.C., Hsu, K.S., Li, Y.C., Hong, P.C., Shiah, H.S., Kuo, C.C., Huang, C.W., Wang, Y.C., Huang, L., Chen, T.S., Chen, S.F., Fu, K.C., Hsu, C.L., Lin, M.J., Chang, C.J., Ashendel, C.L., Chan, T.C.K., Chou, K.M., Chang, J.Y., 2007. D-501036, a novel selenophene-based triheterocycle derivative, exhibits potent in vitro and in vivo antitumoral activity which involves DNA damage and ataxia telangiectasia-mutated nuclear protein kinase activation. *Molecular Cancer Therapeutics* 6, 193-202.

Katon, W. J., Lin, E., Russo, J., Unutzer, J., 2003. Increased medical costs of a population-based sample of depressed elderly patients. *Archives of General Psychiatry* 60, 897-903.

Kendler, K. S., Thornton, L. M., Gardner, C. O., 2001. Genetic risk, number of previous depressive episodes, and stressful life events in predicting onset of major depression. *American Journal of Psychiatry* 158, 582-586.

Kendler, K.S., Gardner, C.O., Fiske, A., Gatz, M., 2009. Major Depression and Coronary Artery Disease in the Swedish Twin Registry: Phenotypic, Genetic, and Environmental Sources of Comorbidity. *Archives of General Psychiatry* 66, 857-863.

Kent, J. M., 2000. SNaRIs, NaSSAs, and NaRIs: New agents for the treatment of depression. *Lancet* 355, 911-918.

Kessler, R. C., Nelson, C. B., McGonagle, K. A., Liu, J., Swartz, M., Blazer, D. C., 1996. Comorbidity of DSM-III-R major depressive disorder in the general population: Results from the US National Comorbidity Survey. *British Journal of Psychiatry* 168, 17-30.

Kho, K. H., Van Vreeswijk, M. F., Simpson, S., Zwinderman, A. H., 2003. A meta-analysis of electroconvulsive therapy efficacy in depression. *Journal of electroconvulsive therapy* 19, 139–147.

Klayman, D. L., Gunther, W. H., 1973. *Organic selenium compounds: their chemistry and biology*. New York: JohnWiley and sons, 68-157.

Koch, S., Perry, K. W., Nelson, D. L., Conway, R. G., Threlkeld, P. G., Bymaster, F. P., 2002. R-fluoxetine increases extracellular DA, NE, as well as 5-HT in rat prefrontal cortex and hypothalamus: an in vivo microdialysis and receptor binding study. *Neuropsychopharmacology* 27, 949-959.

Koe, B. K., 1983. Sertraline, 1S, 4S-N-Methyl-4-(3,4-dichlorophenyl)-1,2,3,4-tetrahydro-1-naphthylamine, a new uptake inhibitor with selectivity for serotonin. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 226, 686.

Koe, B.K., Weissman, A., 1966. p-chlorophenylalanine – a specific depletory of brain serotonin. *Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 154, 499-&.

Kriegebaum, C., Gutknecht, L., Schmitt, A., Lesch, K. P., Reif, A., 2010. Serotonin Now: Part 1 Neurobiology and Developmental Genetics. *Fortschritte der Neurologie Psychiatrie* 78, 319-331.

Langer, S. Z., 1980. Presynaptic regulation of the release of catecholamines. *Pharmacological Reviews* 32, 337–362.

Lazure, K. E., Lydiatt, W. M., Denman, D., Burke, W. J., 2009. Association between depression and survival or disease recurrence in patients with head and neck cancer enrolled in a depression prevention trial. *Head and neck-journal for the sciences and specialties of the head and neck* 31, 888-892.

Lesch, K. P., Bengel, D., Heils, A., Sabol, S. Z., Greenberg, B. D., Petri, S., Benjamin, J., Muller, C. R., Hamer, D. H., and Murphy, D. L., 1996. Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. *Science* **274**, 1527–1531.

Lesch, K.P., Gutknecht, L., 2004. Focus on the 5-HT_{1a} receptor: emerging role of a gene regulatory variant in psychopathology and pharmacogenetics. *International Journal of Neuropsychopharmacology* 7, 381-385.

Mariko, O., Horiguchi, F., Tokyo, K. T., 2010. Evaluation of anxiety and depression in infertile Japanese women undergoing treatment for infertility. *Journal of Psychosomatic obstetrics and gynecology* 31, 82-82.

Martin, J. L., Gerlack, M. L., 1972. Selenium metabolism in animals. *Annals of the New York Academy of Sciences* 192, 193-199.

McKenna, M. T., Michaud, C. M., Murray, C. J. L., Marks, J. S., 2005. Assessing the burden of disease in the United States using disability-adjusted life years. *American Journal of Preventive Medicine* 28, 415-423.

Millan, M. J., 2004. The role of monoamines in the actions of established and “novel” antidepressant agents: a critical review. *European Journal of Pharmacology* 500, 371– 384.

Millan, M. J., 2006. Multi-target strategies for the improved treatment of depressive states: Conceptual foundations and neuronal substrates, drug discovery and therapeutic application. *Pharmacology & Therapeutics* 110, 135-370.

Millan, M.J., Gorbett, A., Lejeune, F., Newman-Tancredi, A., Rivet, J.M., Auclair, A., Peglion, J.L., 2001. S33005, a novel ligand at both serotonin and norepinephrine transporters: I. receptor binding, electrophysiological, and neurochemical profile in comparison with venlafaxine, reboxetine, citalopram, and clomipramine. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 298, 565–580.

Miorelli, S. T., Rosa, R. M., Moura, D. J., Rocha, J. C., Lobo, L. A. C, Henriques, J. A. P., Saffi, J., 2008. Antioxidant and anti-mutagenic effects of ebselen in yeast and in cultured mammalian V79 cells. *Mutagenesis* 23, 93-99.

Mitchell, P.B., Parker, G.B., Gladstone, G.L., Wilhelm, K. Austin, M. P., 2003. Severity of stressful life events in first and subsequent episodes of depression: the relevance of depressive subtype. *Journal of Affective Disorders* 73, 245–252.

Mozier, N. M., McConnell, K. P., Hoffman, J. L., 1988. S-adenosyl-L-methionine-thioether S-methyltransferase, a new enzyme in sulfur and selenium metabolism. *Journal of Biological Chemistry* 263, 4527-4531.

Murphy, D .L., Fox, M. A., Timpano, K. R., Moya, P. R., Ren-Patterson, R., Andrews, A. M., Holmes, A., Lesch, K. P., Wendland, J. R., 2008. How the serotonin story is being rewritten by new gene-based discoveries principally related to SLC6A4, the serotonin transporter gene, which functions to influence all cellular serotonin systems. *Neuropharmacology* 55, 932–960.

Murphy, D. L., 2008. Targeting the murine serotonin transporter: insights into human neurobiology. *Nature Reviews Neuroscience* 9, 85-96.

Muscat, R., Sampson, D., Willner, P., 1990. Dopaminergic mechanism of imipramine action in an animal-model of depression. *Biological Psychiatry* 28, 223-230.

Musselman, D. L., Betan, E., Larsen, H., Phillips, L. S., 2003. Relationship of Depression to Diabetes Types 1 and 2: Epidemiology, Biology and Treatment. *Biological Psychiatry* 54, 317-29.

Musselman, D. L., Evans, D. L., Nemeroff, C. B., 1998. The relationship of depression to cardiovascular disease: epidemiology, biology, and treatment. *Archives of General Psychiatry* 55, 580–592.

Nakatomi, Y., Yokoyama, C., Kinoshita, S., Masaki, D., Tsuchida, H., Onoe, H., Yoshimoto, K., Fukui, K., 2008. Serotonergic mediation of the antidepressant-like effect of the green leaves odor in mice. *Neuroscience Letters* 436, 167-170.

Nakayama, K., 2002. Effect of paroxetine on extracellular serotonin and dopamine levels in the prefrontal cortex. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 365, 102-105.

Nemeroff, C.B., Owens, M.J., 2002. Treatment of mood disorders. *Nature Neurosciences* 5, 1068–1070.

Neu, P., 2009. Correlation of depression with stroke. Pathophysiological mechanisms. *Nervenarzt* 80, 772-+.

Nobile, M., Begni, B., Giorda, R., Frigerio, A., Marino, C., Molteni, M., Ferrarese, C., Battaglia, M.J., 1999. Effects of serotonin transporter promoter genotype on platelet serotonin transporter functionality in depressed children and adolescents. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry* 38, 1396-1402.

Nogueira, C. W., Rocha, J. B. T., 2010. Diphenyl Diselenide a Janus-Faced Molecule. *Journal of Brazilian Chemical Society* 00, 1-17.

Nogueira, C. W., Zeni, G., Rocha, J. B. T., 2004. Organoselenium and Organotellurium Compounds: Toxicology and Pharmacology. *Chemical Review* 104, 6255-6285.

Page, I.H., 1976. The discovery of serotonin. *Perspectives in Biology and Medicine* 20, 1–8.

Palvimaki, E.P., Kuoppamaki, M., Syvalahti, E., Hietala, J., 1999. Differential effects of fluoxetine and citalopram treatments on serotonin 5-HT_{2C} receptor occupancy in rat brain. *International Journal of Neuropsychopharmacology* 2, 95-99.

Parnham, M. J., Graf, E., 1991. Pharmacology of synthetic organic selenium compounds. *Progress in Drug Research* 36, 10-47.

Peyrot, M., 2003. Depression: a quiet killer by any name. *Diabetes Care* 26, 2952–2953.

Plenge, P., Møllerup, E.T., Laursen, H., 1991. Affinity modulation of [3H]imipramine, [3H]paroxetine and [3H]citalopram binding to the 5-HT transporter from brain and platelets. *European Journal of Pharmacology* 206, 243–250.

Porsolt, R.D., Bertin, A., Jalfre, M., 1977a. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie* 299, 327–336.

Porsolt, R.D., Chermat, R., Lenegre, A., Avril, I., Janvier, S., Steru, L., 1987. Use of the automated tail suspension test for the primary screening of psychotropic agents. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie* 288, 11–30.

Porsolt, R.D., Le Pichon, M., Jalfre, M., 1977b. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 266, 730–732.

Posser, T., Kaster, M. P., Baraúna, S. C., Rocha, J. B. T., Rodrigues, A. L. S., Leal, R. B., 2009. Antidepressant-like effect of the organoselenium compound ebselen in mice: Evidence for the involvement of the monoaminergic system. *European Journal of Pharmacology* 602, 85–91.

Preskorn, S. H., Stanga, C. Y., Ross, R., 2004. Selective serotonin reuptake inhibitor, *in* Preskorn, S. H., Stanga, C. Y., Feighner, J. P., Ross, R., 2004. *Antidepressants: Past, Present, and Future*. Springer.

Ramaekers, V. T., Calomme, N., Vandeberghe, D., Makropoulos, W., 1994. Selenium deficiency triggering intractable seizures. *Neuropediatrics* 25, 217–223.

Rampello, L., Nicoletti, G., Raffaele, R., 1991. Dopaminergic hypothesis for retarded depression- a symptom profile for predicting therapeutic responses. *Acta Psychiatrica Scandinavica* 84, 552–554.

Rapport, M.M., 1997. The discovery of serotonin. *Perspectives in Biology and Medicine* 40, 260–273.

Rapport, M.M., Green, A.R., Page, I.H., 1948. Crystalline serotonin. *Science* 108, 329–330.

Rayman, M. O., 2000. The importance of selenium to human health. *Lancet* 356, 233–241.

Rayman, M. P., 2008. Food-chain selenium and human health: emphasis on intake. *British Journal of Nutrition* 100, 254–268.

Rayman, M., Thompson, A., Warren-Perry, M., Galassini, R., Catterick, J., Hall, E., Lawrence, D., Bliss, J., 2006. Impact of Selenium on Mood and Quality of Life: A Randomized, Controlled Trial. *Biological Psychiatry* 59, 147–154.

Rhoden, C. R. B., Zeni, G., 2011. New Development of Synthesis and Reactivity of Seleno and Tellurophenes. *Organic & Biomolecular Chemistry*. Doi: 10.1039/C0OB00557F.

Rihmer, Z., Gonda, X., Rihmer, A., Fountoulakis, K. N., 2010. Suicidal and violent behaviour in mood disorders: A major public health problem. A review for the clinician. *International Journal of Psychiatry in Clinical Practice* 14, 88–94.

Ruhe, H.G., Mason, N.S., Schene, A.H., 2007. Mood is indirectly related to serotonin, norepinephrine and dopamine levels in humans: a meta-analysis of monoamine depletion studies. *Molecular Psychiatry* 12, 331–359.

Salomon, R. M., Johnson, B. W., Schmidt, D. E., 2006. Central neurochemical ultradian variability in depression. *Disease Markers* 22, 65–72.

Sari, Y., 2004. Serotonin1B receptors: from protein to physiological function and behavior. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 28, 565–582.

Savegnago, L., Jesse, C.R., Pinto, L.G., Rocha, J.B.T., Nogueira, C.E., Zeni, G., 2007a. Monoaminergic agents modulate antidepressant-like effect caused by diphenyldiselenide in rats. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 3, 1261–1269.

Savegnago, L., Pinto, L. G., Jesse, C. R., Rocha, J. B. T., Nogueira, C. W., Zeni, G., 2007b. Spinal mechanisms of antinociceptive action caused by diphenyldiselenide. *Brain research* 1162, 32-37.

Schildkraut, J. J., 1965. The catecholamine hypothesis of affective disorders – a review of supporting evidence. *American Journal of Psychiatry* 122, 509-522.

Schwartz, K., Foltz, P. J., 1957. Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. *Journal of the American Chemical Society* 79, 200-214.

Sher, L., 2002. Role of selenium depletion in the effects of dialysis on mood and behavior. *Medical hypothesis* 59, 89-91.

Sher, L., 2008. Depression and suicidal behavior in alcohol abusing adolescents: possible role of selenium deficiency. *Minerva Pediatrica* 60, 201-209.

Shiah, H.S., Lee, W.S., Juang, S.H., Hong, P.C., Lung, C.C., Chang, C.J., Chou, K.M., Chang, J.Y., 2007. Mitochondria-mediated and p53-associated apoptosis induced in human cancer cells by a novel selenophene derivative, D-501036. *Biochemical Pharmacology* 73, 610-619.

Silverman, R. B., 1992. *The organic chemistry of drug design and drug action*. 1 ed. Amsterdam; London: Elsevier Academic Press.

Smits, J. A. J., Rosenfield, D., Mather, A.A., Tart, C.D., Henriksen, C., Sareen, J., 2010. Psychotropic medication use mediates the relationship between mood and anxiety disorders and obesity Findings from a nationally representative sample. *Journal of Psychiatric Research* 44, 1010-1016.

Smits, K. M., Smits, L. J. M., Schouten, J. S. A. G., Stelma, F. F., Nelemans, P., Prins, M. H., 2004. Influence of SERTPR and STIn2 in the serotonin transporter gene on the effect of selective serotonin reuptake inhibitors in depression: a systematic review. *Molecular Psychiatry* 9, 433-441.

Spallholz, J. E., 1993. On the nature of selenium toxicity and carcinostatic activity. *Free Radical Biology and Medicine* 20, 131-143.

Spinhoven, P., Elzinga, B. M., Hovens, J. G. F. M., Roelofs, K., Zitman, F. G., van Oppenand, P., Penninx, B. W. J. H., 2010. The specificity of childhood adversities and negative life events across the life span to anxiety and depressive disorders. *Journal of Affective Disorders* 126, 103-112.

Stadtman, T. C., 1980. Selenium-dependent enzymes. *Annual Review of Biochemistry* 49, 93-110.

Stahl, S. M., 1998. Selecting an antidepressant by using mechanism of action to enhance efficacy and avoid side effects. *Journal of Clinical Psychiatry* 59, 23-29.

Stein, A.L., Alves, D., da Rocha, J. T., Nogueira, C.W., Zeni, G., 2008. Copper Iodide-Catalyzed Cyclization of (Z)-Chalcogenoenynes. *Organic Letters* 10, 4983-4986.

Steru, L., Chermat, R., Thierry, B., Simon, P., 1985. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology* 85, 367-370.

Sugimoto, Y., Furutani, S., Nishimura, K., Itoh, A., Tanahashi, T., Nakajima, H., Oshiro, H., Sun, S., Yamada, J., 2010. Antidepressant-like effects of neferine in the forced swimming test involve the serotonin(1A) (5-HT1A) receptor in mice. *European Journal of Pharmacology* 634, 62-67.

Suzuki, K.T., Ohta, Y., Suzuki, N., 2006. Availability and metabolism of Se-77-methylseleninic acid compared simultaneously with those of three related selenocompounds. *Toxicology and Applied Pharmacology* 217, 51-62.

Thase, M. E., Sullivan, L. R., 1995. Relapse and recurrence of depression – a practical approach for prevention. *CNS drugs*, 261-277.

UK ECT Review Group, 2003. Efficacy and safety of electroconvulsive therapy in depressive disorders: a systemic review and meta-analysis. *Lancet* 361, 799–808.

Ulak, G., Mutlu, O., Tanyeri, P., Komsuoglu, F. I., Akar, F. Y., Erden, B. F., 2010. Involvement of serotonin receptor subtypes in the antidepressant-like effect of trim in the rat forced swimming test. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 95, 308-314.

Valentine, J. L., Kang, H. K., Spivey, G. H., 1987. Selenium levels in human-blood, urine, and hair in response to exposure via drinking-water. *Environmental Research* 17, 347-355.

Van Praag, H. M., Korf, J., 1971. Endogenous depressions with and without disturbances in 5-hydroxytryptamine metabolism – biochemical classification. *Psychopharmacology* 19, 148-&.

Wanger, P. D., Pedersen, N. D., Hatfield, J., Weswing, P. H., 1976. Absorption of selenite and selenomethionine from ligated digestive tract segments in rats. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 153, 295.

Weber, G. F., Maertens, P., Meng, X., Pippenger, C. E., 1991. Glutathione-peroxidase deficiency and childhood seizures. *Lancet* 337, 1443-1444.

Weele, J. V. V., Anderson, G. M., Cook, E. W., 2000. Pharmacogenetics and the serotonin system: initial studies and future directions. *European Journal of Pharmacology* 410, 165-181.

Weissman, M.M., Bland, R.C., Canino, G.J., 1996. Cross-national epidemiologic of major depression and bipolar disorder. *Journal of the American Medical Association* 9, 276-293.

Whanger, P. D., 2001. Selenium and the brain: a review. *Nutritional neuroscience* 4, 81–97.

Wilber, C. G., 1980. Toxicology of selenium: a review. *Clinical Toxicology* 17, 171-230.

Wilhelm, E. A., Jesse, C. R., Prigol, M., Alves, D., Schumacher, R. F., Nogueira, C. W., 2010. 3-Alkynyl selenophene protects against carbon-tetrachloride-induced and 2 nitropropane-induced hepatic damage in rats. *Cell Biology and Toxicology* 26, 569–577.

Wilhelm, E.A., Jesse, C.R., Bortolatto, C.F., Nogueira, C.W., Savegnago, L., 2009a. Anticonvulsant and antioxidant effects of 3-alkynyl selenophene in 21-day-old rats on pilocarpine model of seizures. *Brain Research Bulletin* 79, 281–287.

Wilhelm, E.A., Jesse, C.R., Bortolatto, C.F., Nogueira, C.W., Savegnago, L., 2009b. Antinociceptive and anti-allodynic effects of 3-alkynyl selenophene on different models of nociception in mice. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 93, 419–425.

Wilhelm, E.A., Jesse, C.R., Roman, S.S, Nogueira, C.W., Savegnago, L., 2009c. Hepatoprotective effect of 3-alkynyl selenophene on acute liver injury induced by D galactosamine and lipopolysaccharide. *Experimental and Molecular Pathology* 87, 20–26.

Williams, R. B., 1994. Neurobiology, cellular and molecular biology, and psychosomatic medicine. *Psychosomatic Medicine* 56, 308–315.

Williams, R. B., Marchuk, D. A., Gadde, K. M., Barefoot, J. C., Grichnik, K., Helms, M. J., 2001. Central nervous system serotonin function and cardiovascular responses to stress. *Psychosomatic Medicine* 63, 300–305.

Willner, P., Mitchell, P. J., 2002. The validity of animal models of predisposition to depression. *Behavioral Pharmacology* 13, 169–188.

Wong, M. L., Licinio, J., 2001. Research and treatment approaches to depression. *Nature Reviews Neuroscience* 2, 343–351.

World Health Association, 1999. The ICD-10 Classification of Mental and Behavioural Disorders. Clinical descriptions and diagnostic guidelines. Geneva: World Health Organization.

World Psychiatric Association. Educational program on depressive disorders. Overview and fundamental aspects. New York: NCM; 1997.

Xiao, H., Parkin, K. L., 2006. Induction of Phase II enzyme activity by various selenium compounds. *Nutrition and Cancer – An International Journal* 55, 210-223.

Zafar, K. S., Siddiqui, A., Sayeed, I., Ahmad, M., Salim, S., Islam, F., 2003. Dose dependent protective effect of selenium in a rat model of Parkinson's disease: neurobehavioral and neurochemical evidences. *Journal of Neurochemistry* 84, 438–446.