

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

Luíza Schneider Fortes

**INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS INTERATIVOS DE NAC E
DIAZEPAM EM MODELOS DE ANSIEDADE EM CAMUNDONGOS**

Porto Alegre

2016

Luíza Schneider Fortes

INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS INTERATIVOS DE NAC E DIAZEPAM EM MODELOS DE ANSIEDADE EM CAMUNDONGOS

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

Orientadora: Prof. Dra. Elaine Elisabetsky
Coorientadora: Msc Patrícia Santos

Porto Alegre

2016

CIP - Catalogação na Publicação

Schneider Fortes, Luiza

INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS INTERATIVOS DE NAC E
DIAZEPAM EM MODELOS DE ANSIEDADE EM CAMUNDONGOS /
Luiza Schneider Fortes. -- 2016.
41 f.

Orientadora: Elaine Elisabetsky.
Coorientadora: Patrícia Santos.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto
de Ciências Básicas da Saúde, Curso de Biomedicina,
Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. Ansiedade. 2. Interação. 3. Farmacologia. 4. N-
Acetilcisteína. 5. Diazepam. I. Elisabetsky, Elaine,
orient. II. Santos, Patrícia, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Luíza Schneider Fortes

**INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS INTERATIVOS DE NAC E
DIAZEPAM EM MODELOS DE ANSIEDADE EM CAMUNDONGOS**

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

Aprovado em: ____ de _____ de ____.

BANCA EXAMINADORA

Nome do professor - instituição

Nome do professor - instituição

Nome do professor - instituição (orientador)

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora Elaine Elisabetsky não somente pela orientação, mas também pelo aprendizado ao longo desses anos.

Agradeço à minha coorientadora Patrícia Santos por toda a ajuda, pela paciência, vontade de orientar e ensinar e pelas muitas horas de dedicação doadas para a realização desse trabalho.

Agradeço à Franciele Giongo, colega de laboratório e amiga, que sempre esteve disposta a me ajudar e continuar persistindo no curso mesmo quando tudo parecia muito difícil.

Agradeço às demais professoras e professores que me transmitiram conhecimento ao longo do curso e de alguma forma me inspiraram.

Agradeço aos colegas de curso, pela ajuda e amizade, que foram de grande importância nessa trajetória.

Agradeço à minha família pelo apoio e por sempre acreditarem em mim, sem ela eu não teria chegado aqui.

Agradeço às minhas amigas por estarem sempre do meu lado, me empoderando e me apoiando.

Por fim, agradeço a todas as pessoas que, de alguma forma, fizeram parte dessa trajetória. Cada uma delas foi essencial para que eu esteja aqui agora.

SUMÁRIO

RESUMO	7
1. INTRODUÇÃO COMPREENSIVA.....	9
1.1. Transtornos de Ansiedade	9
1.2. Transtorno de Ansiedade Generalizada	10
1.3 Bases neurais envolvidas nos Transtornos de Ansiedade	10
1.4 Tratamentos farmacológicos nos Transtornos de Ansiedade	12
1.5 Benzodiazepínicos e ansiedade	13
1.6 Teste claro-escuro e sua relação com diferentes drogas.....	14
1.7 N-Acetilcisteína	15
1.8 Associações medicamentosas para tratamento de ansiedade	16
2. OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo geral.....	18
2.2 Objetivos específicos.....	18
3. ARTIGO CIENTÍFICO	19
4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	37
REFERÊNCIAS.....	38
ANEXO A - NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA NEUROPHARMACOLOGY.....	42

RESUMO

Transtornos de ansiedade são patologias crônicas debilitantes, que resultam em um prejuízo considerável da qualidade de vida dos pacientes. Estas patologias afetam milhões de pessoas ao redor do mundo, sendo a forma mais comum de transtorno psiquiátrico. A farmacoterapia é de grande importância no tratamento dessas patologias, sendo os fármacos disponíveis para o tratamento desses transtornos os ansiolíticos e antidepressivos. Entretanto, estes podem ocasionar diversos efeitos adversos, como disfunção sexual, sedação, prejuízo da coordenação motora e distúrbios de sono, especialmente quando administrados em doses mais altas. Estima-se que 40-50% dos pacientes são refratários a esses tratamentos, justificando o grande interesse no desenvolvimento de fármacos mais efetivos. O aumento da transmissão glutamatérgica no hipocampo e em regiões corticais é um componente chave em transtornos de ansiedade e, por isso, o sistema glutamatérgico tem sido considerado como fonte de novos alvos farmacológicos em transtornos psiquiátricos. A N-acetilcisteína (NAC) é um modulador glutamatérgico que demonstrou efeitos positivos para o tratamento de transtornos de ansiedade tanto em modelos pré-clínicos como em testes clínicos. Sua utilidade como ansiolítico em humanos já foi evidenciada em transtornos onde a ansiedade é prevalente, tais como a tricotilomania e TOC; em modelos animais de ansiedade com peixe-zebra; bem como em modelos experimentais em camundongos, incluindo o teste *marble-burying*. Enquanto a necessidade do desenvolvimento de medicamentos mais efetivos e com menos efeitos adversos para o manejo de transtornos de ansiedade seja consenso, estratégias alternativas têm sido exploradas. O uso concomitante de dois fármacos visando o efeito sinérgico, além de possibilitar a utilização de doses menores dos mesmos, diminuindo os efeitos adversos e aumentando a tolerabilidade e aderência ao tratamento, tem sido amplamente utilizado e recomendado para melhorar o prognóstico dos pacientes refratários aos tratamentos convencionais. A ação sinérgica entre NAC e certos antidepressivos já foi verificada por nosso grupo, logo, o objetivo desse trabalho foi investigar se o mesmo ocorre em relação à atividade ansiolítica. Esse estudo demonstrou que a combinação de uma dose sub-efetiva de NAC (150 mg/kg) com uma dose sub-efetiva de diazepam (1 mg/kg) induziu efeito ansiolítico no teste de claro-escuro, sugerindo uma possível interação clinicamente útil entre esses dois fármacos. No entanto, a NAC nas duas doses administradas (100 e 150 mg/kg) prejudicou a atividade locomotora dos animais no teste de campo aberto, sugerindo que o efeito da NAC associada ao diazepam no teste claro-escuro pode não ser exclusivamente ansiolítico, mas

também estar associado a um efeito sedativo de NAC, apesar de o número de cruzamentos entre os compartimentos claro e escuro não ter sido alterado pela associação.

Palavras-chave: ansiedade, N-acetilcisteína, diazepam, claro-escuro, campo aberto, interação.

1. INTRODUÇÃO COMPREENSIVA

1.1 Transtornos de Ansiedade

Transtornos de ansiedade são doenças crônicas e debilitantes, representando um alto custo em nível social e individual (Griebel e Holmes, 2013). Esses transtornos são o grupo mais comum de transtornos psiquiátricos, afetando milhões de pessoas ao redor do mundo e ocorrendo em pelo menos um episódio durante a vida (Kessler et al., 2007). Transtornos de ansiedade desencadeiam respostas fisiológicas, psicológicas, hormonais e autônomas, tendo como sintomas preocupação excessiva, sudorese, tremores e comportamentos repetitivos, afetando a qualidade de vida dos indivíduos (Tovote et al., 2015; Griebel e Holmes, 2013). Sintomas físicos desses transtornos ocorrem devido à liberação de hormônios do estresse, como cortisol e adrenalina, que exercem seus efeitos em quase todos os órgãos do corpo (Kumar, 2013). Quando não tratados, os sintomas de ansiedade persistem e podem ocasionar aumento da pressão arterial, palpitações cardíacas, dores no peito, aumento na frequência respiratória ou falta de ar, aumento da tensão muscular, irritabilidade, diminuição do fluxo sanguíneo intestinal, náusea e diarreia, o que pode resultar em problemas cardiovasculares, neurais e auto-ímmunes, entre outros (Kumar, 2013).

O DSM-5 reconhece sete subtipos de transtornos de ansiedade: transtorno de ansiedade de separação, mutismo seletivo, fobia específica, transtorno de ansiedade social (fobia social), transtorno de pânico, agorafobia e transtorno de ansiedade generalizada (American Psychiatric Association, 2013). É bastante comum a comorbidade entre esses transtornos, estimando-se que mais da metade das pessoas diagnosticadas com algum transtorno de ansiedade também preenchem os critérios para outras destas patologias (Kessler, 1995). Ainda, há evidências de que transtornos de ansiedade apresentam maior comorbidade do que outros transtornos psiquiátricos tanto entre si quanto entre outras desordens físicas e mentais, como abuso de álcool e outras substâncias e transtornos afetivos (Toft et al., 2005).

Transtornos de ansiedade incluem patologias que compreendem medo excessivo e ansiedade e distúrbios comportamentais associados. Os transtornos de ansiedade diferem do medo e da ansiedade desenvolvidos normalmente por serem excessivos ou persistirem além de períodos apropriados. Ainda, diferem entre si nos tipos de objetos e situações que induzem medo, ansiedade ou comportamentos de esquiva, e na ideação cognitiva associada (American Psychiatric Association, 2013).

1.2 Transtorno de Ansiedade Generalizada (TAG)

O transtorno de ansiedade generalizada é caracterizado por sintomas como ansiedade e preocupação excessiva, e os indivíduos que sofrem dessa patologia encontram dificuldade em controlá-los. A ansiedade e preocupação são associadas com três ou mais destes sintomas, sendo que eles devem estar presentes ao longo de um período de seis meses: inquietação, cansaço fácil, dificuldade de concentração, irritabilidade, tensão muscular e distúrbios do sono. A ansiedade, preocupação ou sintomas físicos causam sofrimento clínico significativo ou prejuízos sociais, ocupacionais ou em outras áreas importantes do funcionamento. É importante salientar que essas perturbações não devem ser devido aos efeitos fisiológicos diretos de substâncias (drogas de abuso ou medicamentos) ou de condição médica geral (p. ex., hipertireoidismo), nem ocorrer exclusivamente durante transtornos de humor, transtorno psicótico ou transtorno do desenvolvimento (American Psychiatric Association, 2013).

1.3 Bases neurais envolvidas nos Transtornos de Ansiedade

Apesar do extenso estudo sobre transtornos de ansiedade, a literatura acerca dos mecanismos neurais envolvidos nessas patologias ainda permanece escassa (Duval, 2015). Estudos clínicos e em modelos animais de ansiedade têm sido muito importantes para uma melhor caracterização das bases neurais envolvidas nos transtornos de ansiedade e demais patologias associadas. Estudos de neuroimagem utilizando ressonância magnética funcional (fMRI) têm sido essenciais para a associação entre comportamentos e cognição humana à neuropatologia da ansiedade e de transtornos relacionados (Brooks e Stein, 2015). Ainda, estudos em optogenética que usam como alvo subpopulações neuronais têm revelado aspectos novos de circuitos específicos que compreendem comportamentos do tipo ansioso em roedores (Tovote et al., 2015).

Estados de ansiedade são mediados por conexões locais e de longo alcance entre múltiplas áreas cerebrais. Algumas regiões que tem um papel importante nos transtornos de ansiedade, como a amígdala basolateral (BLA) e o núcleo leito da estria terminal mediam tanto comportamentos ansiolíticos como ansiogênicos, indicando a presença de circuitos neuronais distintos na ansiedade, cujas funções são determinadas por alvos ou conexões específicas entre células. Por exemplo, a ativação do circuito BLA-hipocampo ventral é ansiogênica, enquanto que a ativação da projeção da amígdala basolateral para a central é ansiolítica (Tovote et al., 2015).

O hipocampo desempenha um papel importante na ansiedade. Através de projeções para áreas como a amígdala basolateral, o hipocampo ventral regula o medo contextual, enquanto que o sistema septo-hipocampal está fortemente envolvido na ansiedade induzida pelo estresse, mediando funções ansiolíticas e ansiogênicas e promovendo atenção e inibição comportamental (Tovote et al., 2015). Através do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), regulado pelo hipotálamo e amígdala, ocorre a secreção de cortisol pela glândula adrenal, sendo que o cortisol contribui para a resposta fisiológica do corpo ao estresse (Bear et al., 2007). Visto que a ativação inadequada da amígdala e a diminuição de resposta do hipocampo têm sido relacionadas com transtornos de ansiedade, o eixo HPA estaria desregulado nessas patologias, assim como a liberação do cortisol (Bear et al., 2007).

Por serem caracterizados como uma expressão prolongada e inadequada ao medo, os transtornos de ansiedade se correlacionam ao medo em nível comportamental, físico e neurobiológico. Em transtornos de ansiedade, ocorre uma hiperativação do “circuito do medo”, este que compreende o tálamo, a amígdala, o hipocampo, o córtex anterior cingulado, o estriado, o córtex sensorial e motor e a ínsula, regiões envolvidas no processamento e geração de emoções e de informações sensoriais. Enquanto isso, há uma hipoativação do córtex pré-frontal, área relacionada ao planejamento de comportamentos e pensamentos complexos, expressão da personalidade, tomadas de decisões e modulação de comportamento social. Diferentes áreas cerebrais têm maior ou menor envolvimento dependendo do transtorno de ansiedade ao qual estão associadas. No transtorno de ansiedade generalizada, por exemplo, ocorre uma hipoativação do córtex anterior cingulado e do córtex pré-frontal diante de situações ameaçadoras e hiperativação a emoções via um processamento não efetivo do córtex pré-frontal. Já no transtorno de estresse pós-traumático, há hiperativação da ínsula e da amígdala lateral e basal, para a consolidação e expressão do medo; e hipoativação e regulação ineficiente da ativação límbica pelo córtex anterior cingulado e córtex pré-frontal (Brooks e Stein, 2015).

Entre os neurotransmissores envolvidos nos transtornos de ansiedade estão a noradrenalina, serotonina, peptídeos opióides, endocanabinóides, ácido gama-aminobutírico (GABA) e glutamato, os quais são alvos farmacológicos nos tratamentos dessas patologias (Griebel e Holmes, 2013; Nuss, 2015). O glutamato é um neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central, e níveis anormais de glutamato e receptores glutamatérgicos são encontrados no cérebro de pacientes com transtornos de ansiedade (Bergink et al., 2004; Cortese e Phan, 2005; Krystal et al., 2010). Por outro lado, o sistema gabaérgico também apresenta um papel bastante importante nos transtornos de ansiedade. O GABA é o principal

neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central, e sua conexão com os transtornos de ansiedade deve-se à sua ação inibitória em estruturas do sistema límbico responsáveis por respostas de medo e ansiedade, como amígdala e hipocampo. Dessa forma, infusões de GABA ou de agonistas dos receptores GABA na amígdala, por exemplo, reduzem medo e ansiedade em diversas espécies animais (Nuss, 2015).

1.4 Tratamentos farmacológicos nos Transtornos de Ansiedade

O tratamento de transtornos de ansiedade é comumente realizado através da combinação de farmacoterapia e psicoterapia. A farmacoterapia é muito importante para o manejo de transtornos psiquiátricos, tendo uma gama bastante diversa de fármacos de escolha para o tratamento dessas patologias. Entre os principais fármacos utilizados, estão:

Inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS): Os ISRS atuam através da inibição da recaptação de serotonina, aumentando esse neurotransmissor na fenda sináptica (Griebel e Holmes, 2013). Estes são os fármacos de primeira escolha para tratamento do transtorno do pânico e são muito utilizados no tratamento de transtorno de ansiedade generalizada e outras subclasses de transtornos de ansiedade, como fobias específicas e transtorno de estresse pós-traumático. Entre os principais fármacos dessa classe estão a fluoxetina, a sertralina e o citalopram.

Inibidores da recaptação de noradrenalina (IRNA): Os IRNA atuam através da inibição da recaptação de noradrenalina, aumentando este neurotransmissor na fenda sináptica. O principal fármaco dessa classe é a venlafaxina.

Antidepressivos tricíclicos (ADTs): Os antidepressivos tricíclicos são fármacos eficazes no tratamento dos transtornos de ansiedade. No entanto, estes apresentam como desvantagens menor tolerabilidade e efeitos adversos graves como sonolência, náusea e insônia, além de um risco de superdosagem que pode levar a arritmias cardíacas e ao coma. Como exemplos podemos citar imipramina e amitriptilina.

Benzodiazepínicos (BZDs): Essas drogas agem através da ativação alostérica de subtipos específicos de receptores GABA_A, promovendo a neurotransmissão inibitória no cérebro. Além de muito eficazes no tratamento do TAG, também são utilizados no tratamento da fobia social e no transtorno do pânico. Como exemplos principais estão o diazepam, o alprazolam e o clonazepam (Rang et al., 2012).

Apesar dessa diversidade de fármacos, estima-se que 40-50% dos pacientes são refratários a esses tratamentos (Wu et al., 2012), justificando, assim o grande interesse no desenvolvimento de novos fármacos que sejam mais efetivos.

1.5 Benzodiazepínicos e ansiedade

Os benzodiazepínicos são drogas que agem através da ativação alostérica de subtipos específicos de receptores GABA_A, potencializando a neurotransmissão inibitória no cérebro. Os benzodiazepínicos têm sido ansiolíticos de referência há mais de 50 anos, sendo muito eficazes no tratamento do TAG, também sendo utilizados no tratamento da fobia social e no transtorno do pânico (Rang et al., 2012; Griebel e Holmes, 2013).

O diazepam é um benzodiazepínico de referência, que foi utilizado por décadas como primeira linha no tratamento de transtornos de ansiedade (Tone, 2009) e, junto com outros benzodiazepínicos, ainda é extensivamente utilizado para o controle dessas patologias (Baldwin et al., 2014). Em uma revisão feita com 172 artigos em que foi avaliada a eficácia do diazepam no labirinto em cruz elevado (*Plus-Maze*), campo aberto (*Open Field*) e claro-escuro, foi constatado que o mesmo apresenta efeito ansiolítico bastante robusto (Mohammad, 2015). Tendo isso em vista, o diazepam é muito usado como controle positivo em testes comportamentais, por mostrar forte efeito ansiolítico nesses modelos (Chaouloff et al., 1997; Costall et al., 1990; Crawley, 1985; Crawley e Goodwin, 1980; Pellow et al., 1985; Lepicard et al., 2000; Hascoet e Bourin, 1998; Mechan et al., 2002; Colla et al., 2015).

Entretanto, essa classe de fármacos também apresenta certas desvantagens. O uso de benzodiazepínicos em longo prazo pode desencadear efeitos adversos que incluem sedação, problemas de memória, tolerância e dependência (Griebel e Holmes, 2013). Devido à ocorrência desses efeitos adversos, nos últimos anos esses fármacos têm sido substituídos pelo uso de antidepressivos e outros medicamentos. Apesar disso, os benzodiazepínicos continuam sendo muito utilizados em modelos de ansiedade como controle positivo, e para o alívio de ansiedade intensa e incapacitante ou em estágios iniciais do tratamento com antidepressivos (Rang et al., 2012).

1.6 Teste claro-escuro e sua relação com diferentes drogas

O teste claro-escuro é comumente utilizado como um modelo de ansiedade e se baseia na aversão inata dos roedores a áreas fortemente iluminadas, e no comportamento exploratório

espontâneo dos roedores frente a estressores, como um ambiente novo ou a luz. Esse modelo é relacionado ao transtorno de ansiedade generalizada, sendo que o aparato é dividido em dois compartimentos, um claro e outro escuro, que permitem com que o animal se mova livremente de um a outro. Em situações nas quais os animais não estão sob efeito de algum tratamento, os mesmos tendem a rapidamente se mover para o compartimento escuro após serem colocados na área iluminada (Bourin, 2015).

Os efeitos dos benzodiazepínicos são detectados com segurança nesse teste; logo, se os animais forem submetidos a um tratamento com um agonista benzodiazepínico, a apreensão de permanecer ou de entrar na área iluminada é abolida. O diazepam é um benzodiazepínico frequentemente utilizado nesse teste, mostrando forte efeito ansiolítico e sendo usado como controle positivo (Crawley, 1981; Hascoet e Bourin, 1998; Onaivi and Martin, 1989; Young e Johnson, 1991; Costall et al., 1990; Imaizumi et al., 1994). Outros benzodiazepínicos apresentam também forte efeito ansiolítico nesse teste, como o flurazepam (Crawley, 1981) e lorazepam (De Angelis, 1992). No entanto, certos antagonistas benzodiazepínicos, como flumazenil, não apresentam efeito ansiolítico nem ansiogênico (Crawley, 1985; Shimada et al., 1995), enquanto que agonistas inversos como o etil β -carbolina-3-carboxilato (β -CCM) (Crawley et al., 1984; Imaizumi et al., 1994) e metil β -carbolina-3-carboxilato (β -CCE) (Shimada et al., 1995; Imaizumi et al., 1994) apresentam efeito ansiogênico.

Além dos benzodiazepínicos, outras drogas ansiolíticas também apresentam efeito nesse teste comportamental (Bourin, 2015). O envolvimento do sistema serotoninérgico, por exemplo, tanto em transtornos de ansiedade como nesse teste comportamental é bastante complexo. Alguns estudos sugerem que um aumento na transmissão de serotonina, ou 5-hidroxitriptamina (5-HT), promoveria a ansiedade, enquanto que uma redução nesse neurotransmissor iria diminuí-la (Bourin, 2015). Tendo isso em vista, os fármacos de primeira escolha no tratamento de transtornos de ansiedade são os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS), que atuam inicialmente aumentando esse neurotransmissor na fenda sináptica (Griebel e Holmes, 2013). No entanto, a existência de diferentes receptores torna o quadro mais complexo e atribui efeitos distintos dependendo do tipo de receptor alvo de ação da droga, se o mesmo está localizado pré ou pós sinápticamente, e do teste comportamental utilizado. No teste claro-escuro, por exemplo, agonistas do receptor 5-HT_{1A}, como a buspirona, que é um agonista parcial do receptor, apresentam forte efeito ansiolítico, enquanto antagonistas do receptor 5-HT_{2A/2C}, como a ritanserina e a ketanserina, e agonistas 5-HT₃ apresentam somente potencial ansiolítico. Além disso, há uma carência de fármacos que atuem nesses receptores de forma seletiva (Bourin, 2015).

Antagonistas colecistoquinina-2 (CCK-2), por sua vez, apresentam potencial ansiolítico no teste claro-escuro, enquanto que agentes adrenérgicos apresentam potencial ansiogênico (Bourin, 2015).

1.7 N-acetilcisteína

A N-acetilcisteína (NAC) tem sido usada nos últimos 30 anos como um tratamento para overdose por paracetamol, como um mucolítico em pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), agente terapêutico no tratamento de HIV e na nefropatia induzida por contraste (Dodd et al., 2008). Nos últimos anos, tem, ainda, surgido uma gama bastante alta de evidências que sugerem o uso da NAC no tratamento de doenças psiquiátricas, visto que o seu mecanismo de ação se sobrepõe à patofisiologia de vários transtornos neuropsiquiátricos, como autismo, depressão, adição a drogas, esquizofrenia, transtorno bipolar, transtornos de ansiedade, doença de Alzheimer e Parkinson (Dean et al., 2011).

NAC é o derivado N-acetil do aminoácido L-cisteína e é rapidamente absorvido por via oral (Arakawa et al., 2007). L-cisteína é, então, rapidamente oxidada à cistina no meio pró-oxidante do cérebro. Cistina é o substrato do antiporter cistina-glutamato, o qual transporta glutamato para fora da célula em troca de cistina, regulando, assim, os níveis extracelulares de glutamato e facilitando a entrada de cisteína no interior da célula (Kau et al., 2008). Dentro da célula, cistina pode ser reduzida à cisteína, que é o componente limitante da síntese da molécula endógena antioxidante glutathiona (Lushchak, 2012). NAC tem, ainda, a capacidade de modular a atividade dos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) via glutathiona e seus derivados (Gilbert, 1991; Leslie et al., 1992; Varga et al., 1997) e de dopamina (Berk et al., 2013).

Tendo em vista a gama bastante alta e diversa de efeitos adversos ligados ao uso dos ansiolíticos atuais, há um crescente número de estudos na literatura explorando o uso de NAC no tratamento de desordens psiquiátricas, mostrando evidências de um potencial benefício da NAC nesses transtornos (Dean et al., 2011). Em relação ao transtorno obsessivo-compulsivo resistente ao tratamento monoterápico, NAC reduziu os sintomas em um paciente tratado diariamente por várias semanas com NAC adjunto à fluvoxamina (Lafleur et al., 2006), e inibiu significativamente o comportamento de *marble-burying* em camundongos (Egashira, 2012). Ainda, reduziu os sintomas em pacientes com tricotilomania (Grant et al., 2009) e escoriação neurótica (*skin-picking*) (Odlaug e Grant, 2007). Além disso, NAC mostrou-se efetiva em ensaios clínicos no tratamento de pacientes com esquizofrenia (Lavoie et al., 2008;

Bulut et al., 2009) e transtorno bipolar (Berk et al., 2008; Berk et al., 2011); e apresentou efeito do tipo-ansiolítico em peixe-zebra no teste claro-escuro (Mocelin et al., 2015).

1.8 Associações medicamentosas para tratamento de ansiedade

Apesar de a terapêutica medicamentosa atual incluir muitos fármacos que isoladamente são eficazes em muitas doenças, é extremamente comum a prescrição simultânea de dois fármacos. Quando isso acontece e uma das drogas interfere com a outra alterando o efeito esperado, ocorre uma interação medicamentosa. Se a alteração for quantitativa, o efeito próprio do fármaco pode aumentar (sinergia), diminuir (antagonismo parcial) ou cessar (antagonismo total). O efeito sinérgico, quando benéfico, pode apresentar diversas vantagens, como o aumento da eficácia terapêutica; redução dos efeitos adversos devido à possibilidade de uso de menores doses dos fármacos associados sem prejuízo da intensidade do efeito; obtenção de maior duração de efeito pelo impedimento, por exemplo, da excreção do fármaco; combinação de latência curta com duração de efeito prolongada, entre outras. As desvantagens da interação medicamentosa, no entanto, consistem na soma de efeitos indesejáveis quando os fármacos associados têm o mesmo perfil toxicológico. Por isso, deve-se atentar para que medicamentos em uso simultâneo tenham diferente espectro de efeitos adversos (Fuchs e Wannmacher, 2010).

A adição de uma segunda droga com um mecanismo de ação diferente para o manejo e tratamento de pacientes que são resistentes ao medicamento atual é uma estratégia bastante sustentada na literatura (Ipser, 2006). A associação de inibidores da recaptação de serotonina com antipsicóticos atípicos como risperidona, aripiprazol e olanzapina no tratamento de transtornos de ansiedade resistentes tem recebido atenção nos últimos tempos e tem se mostrado efetiva em diversos estudos (Brawman-Mintzer, 2005; Sepede et al., 2006; Worthington et al., 2005; Blier et al., 2005; Nemeroff et al., 2005). Para o tratamento do transtorno de ansiedade generalizada, a eficácia da combinação de antipsicóticos atípicos com outros fármacos foi confirmada em dois estudos. No primeiro, a associação de fluoxetina e olanzapina diminuiu os sintomas em pacientes com TAG (Pollack, 2006) e no segundo estudo, por sua vez, a associação de risperidona com o tratamento inicial dos pacientes melhorou significativamente os sintomas (Brawman-Mintzer, 2005). Schwartz e colaboradores (2005) demonstrou, ainda, uma diminuição nos sintomas de ansiedade após a associação de tiagabina com ISRS e benzodiazepínicos. No entanto, vale ressaltar que vários destes medicamentos que têm sido utilizados em associação com medicamentos ansiolíticos,

como antipsicóticos atípicos, estão associados a um aumento significativo de efeitos adversos como sedação, hipotensão postural, cefaleia, disfunções sexuais, taquicardia e ganho de peso (Rang et al., 2012).

Com relação à avaliação dos efeitos da NAC em associação com psicofármacos, Costa-Campos e colaboradores (2013) demonstraram que a administração de uma dose sub-efetiva de NAC foi capaz de reduzir a dose mínima efetiva de uma série de antidepressivos, como fluoxetina, escitalopram e imipramina. Ainda, Lafleur (2006) obteve melhora clínica significativa nos sintomas obsessivo-compulsivos com a associação de NAC e fluvoxamina. Considerando o anteriormente exposto, a associação de NAC com medicamentos ansiolíticos parece ser uma estratégia interessante, pois a NAC apresenta um perfil bastante favorável de efeitos adversos, bem como um mecanismo de ação envolvendo a modulação de vias glutamatérgicas que possuem um papel importante na fisiopatologia da ansiedade.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Verificar o efeito da combinação de NAC e diazepam quanto ao efeito ansiolítico em modelos de ansiedade em camundongos.

2.2 Objetivos específicos

(i) Avaliar o efeito da combinação de doses sub-efetivas de NAC e diazepam no teste claro-escuro em camundongos CF1;

(ii) Avaliar o efeito da combinação de doses sub-efetivas de NAC e diazepam no teste de campo aberto (*Open Field*) em camundongos CF1;

3. ARTIGO CIENTÍFICO

Artigo preparado segundo as normas da revista NEUROPHARMACOLOGY.

<http://www.elsevier.com/journals/neuropharmacology/0028-3908/guide-for-authors>

INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS INTERATIVOS DE NAC E DIAZEPAM EM MODELOS DE ANSIEDADE EM CAMUNDONGOS

Luiza Fortes ¹, Patrícia Santos ¹, Franciele Giongo ¹, Elaine Elisabetsky ¹

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

Autora correspondente:

Email: lufortes8@hotmail.com (Luíza Fortes)

RESUMO

Introdução: Transtornos de ansiedade são crônicos e debilitantes, afetando a qualidade de vida de milhões de pessoas ao redor do mundo. Entre os fármacos utilizados no manejo dessas patologias, destacam-se os benzodiazepínicos, como o diazepam, ansiolíticos de referência extensivamente utilizados para o tratamento dos transtornos de ansiedade. No entanto, essa classe de medicamento apresenta efeitos adversos bastante prejudiciais, o que justifica a procura por fármacos com mecanismo de ação diferenciado e outras estratégias alternativas. A N-acetilcisteína (NAC), um modulador glutamatérgico, tem demonstrado efeitos positivos pré-clínicos e clínicos em diversos transtornos psiquiátricos, como ansiedade e transtorno obsessivo-compulsivo. Além disso, a administração de NAC com outros medicamentos, a fim de se obter um efeito sinérgico, demonstrou resultados bastante favoráveis no tratamento da depressão e de sintomas obsessivo-compulsivos. **Objetivo:** verificar o efeito da combinação de NAC e diazepam quanto ao efeito ansiolítico em modelos de ansiedade em camundongos. **Métodos:** foram realizados os testes de claro-escuro (*Light and Dark*) e campo aberto (*Open Field*) em camundongos CF1. Os dados foram analisados utilizando-se ANOVA de uma via e o teste *post hoc* de Tukey. **Resultados:** somente a NAC na dose sub-efetiva de 150 mg/kg quando administrada em combinação com uma dose sub-efetiva de diazepam (1 mg/kg) foi capaz de aumentar o tempo gasto pelos animais no compartimento claro e a latência para sair do compartimento claro no teste claro-escuro. Ainda, no teste de campo aberto, as duas doses de NAC (100 mg/kg e 150 mg/kg), tanto em combinação com salina quanto quando administradas com diazepam, diminuíram significativamente a distância total percorrida pelos animais. **Conclusão:** a associação de NAC na dose de 150 mg/kg e diazepam demonstrou efeito ansiolítico no teste claro escuro, sugerindo uma possível interação clinicamente útil entre esses dois fármacos; no entanto, NAC prejudicou a atividade locomotora dos animais no campo aberto. Mais estudos são necessários para que seja verificada se há correlação entre esses resultados, e para melhor caracterizar as bases moleculares da interação.

Palavras-chave: ansiedade, N-acetilcisteína, diazepam, claro-escuro, campo aberto, interação.

1. INTRODUÇÃO

Transtornos de ansiedade são patologias crônicas e debilitantes, representando um alto custo em nível social e individual (Griebel e Holmes, 2013). Esses transtornos são o grupo mais comum de transtornos psiquiátricos, afetando milhões de pessoas ao redor do mundo e ocorrendo em pelo menos um episódio durante a vida (Kessler, 2007). Os mesmos desencadeiam respostas fisiológicas, psicológicas, hormonais e autônomas, tendo como sintomas preocupação excessiva, elevação da pressão arterial, sudorese, tremores e comportamentos repetitivos, afetando a qualidade de vida dos indivíduos (Tovote et al., 2015; Griebel e Holmes, 2013).

O manejo desses transtornos é comumente realizado através da combinação de farmacoterapia e psicoterapia, sendo a primeira de essencial importância. Os fármacos de primeira escolha para o tratamento dos transtornos de ansiedade são os antidepressivos (inibidores seletivos da recaptação de serotonina, os inibidores da recaptação de serotonina e noradrenalina e os antidepressivos tricíclicos) e os ansiolíticos (benzodiazepínicos e não benzodiazepínicos) (Rang et al., 2012). Entre essas classes de fármacos, os benzodiazepínicos têm sido ansiolíticos de referência, sendo muito eficazes no tratamento do TAG e também sendo utilizados no tratamento da fobia social e no transtorno do pânico (Rang et al., 2012). O diazepam foi utilizado por décadas como um fármaco de primeira linha no tratamento de transtornos de ansiedade (Tone, 2009) e, junto com outros benzodiazepínicos, ainda é extensivamente utilizado para o controle dessa patologia (Baldwin et al., 2014), apresentando efeito ansiolítico bastante robusto e sendo utilizado como controle positivo em testes comportamentais como campo aberto, labirinto em cruz elevado (*Plus-Maze*) e claro-escuro (Mohammad, 2015; Chaouloff et al., 1997; Costall et al., 1990; Crawley, 1985; Crawley e Goodwin, 1980; Pellow, et al., 1985; Lepicard et al., 2000; Hascoet e Bourin, 1998; Mechan et al., 2002; Colla et al., 2015).

Entretanto, essa classe de fármacos também apresenta certas desvantagens. O uso de benzodiazepínicos em longo prazo pode desencadear efeitos adversos que incluem sedação, problemas de memória, tolerância e dependência (Griebel e Holmes, 2013). Tendo isso em vista, há um grande interesse no desenvolvimento de novos fármacos que sejam mais efetivos. O aumento da transmissão glutamatérgica no hipocampo e em regiões corticais é um componente chave em transtornos de ansiedade (Bergink et al., 2004; Cortese e Phan, 2005; Krystal et al., 2010) e, por isso, o sistema glutamatérgico tem sido considerado como fonte de novos alvos farmacológicos em transtornos psiquiátricos. A N-acetilcisteína (NAC) é um

modulador glutamatérgico que tem demonstrado um crescente número de estudos na literatura explorando o seu uso no tratamento de transtornos psiquiátricos, mostrando evidências de um potencial benefício (Dean et al., 2011). Entre esses transtornos psiquiátricos, a NAC mostrou efeitos positivos para o tratamento de transtornos de ansiedade, tanto em modelos pré-clínicos como em testes clínicos (Dean et al., 2011). Sua utilidade como ansiolítico em humanos foi evidenciado em transtornos onde a ansiedade é prevalente tais como a tricotilomania (Grant et al., 2009); em peixe-zebra (Mocelin et al., 2015); bem como em modelos experimentais em camundongos, incluindo o teste *marble-burying* (Egashira, 2012).

Enquanto isso, estratégias alternativas têm sido utilizadas para reduzir os efeitos adversos associados ao uso de medicamentos ansiolíticos. Uma delas é a administração simultânea de dois medicamentos com mecanismos de ação diferentes, a fim de se obter um efeito sinérgico. Lafleur (2006) obteve melhora clínica significativa nos sintomas obsessivo-compulsivos com a associação de NAC e fluvoxamina e, ainda, ação sinérgica entre NAC e certos antidepressivos já foi verificada por nosso grupo (Costa-Campos et al., 2013). Logo, o objetivo desse trabalho é investigar o efeito da interação de NAC e diazepam quanto ao efeito ansiolítico nos modelos de claro-escuro (*Light and Dark*) e campo aberto (*Open Field*) em camundongos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Animais: Foram utilizados camundongos machos adultos (2-3 meses) da linhagem CF1, criados no CREAL/UFRGS, vinculados ao projeto 30119, aprovado pela Comissão de Pesquisa de Ciências Básicas da Saúde. Os animais foram mantidos (4-5 por gaiola 30 x 20 x 13 cm) no camundongário do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em ambiente controlado (20-24°C, ciclo claro/escuro de 12h, comida e água ad libitum) por pelo menos 15 dias antes dos experimentos. A limpeza e manutenção foram realizadas pela equipe contratada pela universidade e corresponderam aos padrões da mesma.

2.2 Drogas: N-acetilcisteína (NAC) foi adquirida da Sigma-Aldrich (St Louis, USA) e o diazepam da Teuto Brasil (Goiás, Brasil). Todos os fármacos foram diluídos em solução salina. As soluções foram administradas por injeção i.p. no volume de 0,1 mL/10 g de peso corporal. Os animais foram divididos nos seguintes grupos experimentais (n = 17-18/grupo): salina + salina, salina + diazepam dose sub-efetiva (1 mg/kg), NAC dose sub-efetiva (100 mg/kg) + salina, NAC (100 mg/kg) + diazepam (1 mg/kg), NAC dose sub-efetiva (150

mg/kg) + salina e NAC (150 mg/kg) + diazepam (1 mg/kg). Os grupos foram pré-tratados com uma injeção de salina, NAC 100 mg/kg ou NAC 150 mg/kg uma hora antes do teste e, após, foram tratados com uma segunda injeção de salina ou diazepam (1 mg/kg) 30 minutos antes do teste. As doses sub-efetivas de NAC e diazepam foram determinadas através de experimentos realizados anteriormente pelo grupo de pesquisa.

2.3 Testes comportamentais

2.3.1 Claro-escuro (*Light and Dark*): O aparato consiste em uma caixa de madeira retangular (46 x 27 x 30 cm), dividida em uma área menor (18 x 27 cm) e uma área maior (27 x 27 cm) com uma abertura (7.5 x 7.5 cm) entre elas. O compartimento menor é pintado de preto e não é iluminado, enquanto que o compartimento maior é pintado de branco e iluminado com uma luz de 60 W. A sala foi iluminada apenas por luz vermelha e os experimentos foram realizados entre 8h-12h. Os animais foram colocados individualmente no compartimento claro com a face virada para a abertura e o experimento foi gravado por 5 minutos por uma câmera digital. O tempo gasto por cada animal no compartimento claro, a latência para a primeira entrada no lado escuro e os cruzamentos entre o lado claro e escuro foram avaliados.

2.3.2 Campo aberto (*Open Field*): A fim de descartar reações não-específicas aos tratamentos farmacológicos ou mudanças na locomoção, os animais foram colocados em um aparato de madeira cinza (40 x 40 x 40 cm), no qual foi analisada a atividade locomotora (locomoção) dos mesmos. Ainda, como uma medida de ansiedade, foi observado o tempo gasto no centro em relação à periferia. O experimento foi gravado por 5 minutos por uma câmera digital instalada acima da arena e os vídeos foram analisados utilizando o software ANY-Maze (Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA).

2.4 Análise Estatística: Os dados foram analisados por ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Tukey. Foram considerados significativos valores de $p < 0,05$. Foi utilizado o programa Prism GraphPad Prism 6.0.

3. RESULTADOS

A figura 1 mostra os resultados do teste claro escuro. Com relação ao parâmetro tempo gasto no compartimento claro, a ANOVA de uma via revelou que houve diferença significativa entre os grupos [F(5,97) = 4,503; p = 0,001]. O teste *post hoc* de Tukey demonstrou que a combinação de NAC 150 mg/kg e a dose sub efetiva de diazepam (1 mg/kg) aumentou significativamente o tempo gasto no compartimento claro em relação ao grupo controle (salina + salina) (p < 0,01), em relação ao grupo NAC 150 mg/kg + salina (p < 0,05) e também em comparação ao grupo salina + diazepam (p < 0,05), sugerindo um efeito do tipo ansiolítico da combinação de diazepam e NAC 150 mg/kg neste modelo (Fig 1A). Já a figura 1B mostra a latência para os animais saírem do compartimento claro. Em relação a esse parâmetro, a ANOVA de uma via demonstrou diferença significativa entre os grupos [F(5,97) = 3,45; p = 0,0066]. O teste *post hoc* de Tukey revelou que apenas NAC 150 mg/kg + diazepam (1 mg/kg) foi capaz de aumentar a latência para saída do compartimento claro em comparação com os animais tratados com salina + salina (p < 0,05). Em relação ao número de cruzamentos entre os lados claro e escuro, a ANOVA de uma via não revelou diferença significativa entre os grupos [F(5,97) = 1,06; p = 0,39] (Fig. 1C).

A figura 2 mostra os resultados do teste de campo aberto. Em relação à distância percorrida, a ANOVA de uma via revelou que houve diferença significativa entre os grupos [F (5,96) = 13,09; p < 0,0001]. O teste *post hoc* de Tukey demonstrou uma diminuição significativa da distância percorrida nos animais tratados com NAC 150 mg/kg + salina (p < 0,01) e NAC 150 mg/kg + diazepam (p < 0,001) em comparação com os animais tratados com salina + salina (Fig 2A). Em comparação aos animais tratados com salina + diazepam, tanto as doses de NAC 100 mg/kg + salina (p < 0,05) e NAC 150 mg/kg + salina (p < 0,001) quanto a combinação de NAC 100 mg/kg + diazepam (p < 0,001) e NAC 150 mg/kg + diazepam (p < 0,001) reduziram a atividade locomotora dos animais (Fig 2A). Sendo assim, é possível concluir que as duas doses de NAC prejudicaram a atividade locomotora dos animais.

Em relação ao tempo de exploração no centro (Fig. 2B) e na periferia (Fig. 2C), a ANOVA de uma via não demonstrou diferença significativa entre os grupos nesses dois parâmetros [F(5,96) = 1,4; p = 0,23 e F(5,96) = 1,43; p = 0,22; respectivamente].

4. DISCUSSÃO

Este estudo traz como principal resultado o potencial ansiolítico da interação entre uma dose sub-efetiva de NAC (150 mg/kg) e uma dose sub-efetiva de diazepam (1 mg/kg). Considerando-se a gama bastante alta de efeitos adversos associados à utilização de benzodiazepínicos, e levando-se em conta que o efeito sinérgico da interação de doses diminuídas de dois fármacos é capaz de reduzir os efeitos adversos relacionados à utilização de doses mais altas de cada um destes fármacos isoladamente, esse estudo sugere uma interação clínica possivelmente útil entre NAC e diazepam.

No teste claro-escuro, a interação entre a maior dose sub-efetiva de NAC (150 mg/kg) e a dose sub-efetiva de diazepam demonstrou efeito ansiolítico no tempo gasto no compartimento claro pelos animais e na latência para sair do compartimento claro, mas não houve alteração do número de cruzamentos entre os compartimentos claro e escuro. O tempo gasto no compartimento claro é o principal indicativo de efeito ansiolítico ou ansiogênico de drogas no teste claro-escuro, visto que uma área intensamente iluminada é extremamente aversiva para roedores (Costa-Campos et al., 2004). Ainda, um aumento na latência para o primeiro cruzamento é considerado um parâmetro confiável para medir um comportamento desinibitório e diminuição da ansiedade (Costa-Campos et al., 2004; Bourin e Hascoet, 2003). Tendo isso em vista, a medida desses dois parâmetros por si só sugere o potencial ansiolítico da interação entre NAC e diazepam nesse teste.

No teste de campo aberto, no entanto, as duas doses de NAC (100 mg/kg e 150 mg/kg), tanto em combinação com salina quanto quando administradas com diazepam, diminuíram significativamente a distância total percorrida pelos animais. Uma redução nesse parâmetro pode indicar um prejuízo na atividade locomotora dos animais, associado à administração de drogas. No entanto, não é possível afirmar que o efeito ansiolítico demonstrado pela interação de NAC + diazepam no teste claro-escuro esteja diretamente relacionado ao prejuízo na atividade locomotora, visto que o número de cruzamentos de um compartimento a outro no teste claro-escuro não se alterou. Uma das explicações para a diminuição na distância total percorrida seria o efeito da sedação causada por algumas drogas, mas se este tivesse sido o caso, o número de cruzamentos estaria diminuído, visto que uma diminuição no número de cruzamentos pode detectar efeito sedativo relacionado à administração de altas doses de certas substâncias (Crawley, 1981). Ainda, experimentos prévios do nosso grupo utilizando a mesma dose de NAC (150 mg/kg) não haviam demonstrado prejuízo locomotor no teste campo aberto (Noetzold, 2013). Por isso, mais testes são necessários para se certificar que há correlação

entre o prejuízo locomotor, o potencial ansiolítico da interação entre NAC e diazepam e a administração de NAC. Em relação à ausência de efeito ansiolítico no teste de campo aberto, experimentos realizados pelo nosso grupo já haviam demonstrado que a administração aguda de NAC na dose de 150 mg/kg não altera o tempo de exploração do centro em relação à periferia (Noetzold, 2013).

Experimentos prévios do nosso grupo já haviam demonstrado o potencial ansiolítico de NAC em diferentes modelos comportamentais, incluindo nos testes claro-escuro e campo aberto. No teste claro-escuro, NAC per se demonstrou efeito ansiolítico em uma dose aguda de 150 mg/kg (Noetzold, 2013), o que não foi reproduzido no presente estudo, visto que essa mesma dose apresentou efeito ansiolítico somente quando em combinação com uma dose sub-efetiva de diazepam. Diferenças entre o tipo e severidade dos estressores externos (como condições de moradia, barulho, transporte e condições de alojamento) podem ser responsáveis por resultados variáveis, visto que o estresse afeta a atividade motora e diferentes tipos de estressores podem afetar parâmetros psicológicos e resultar em respostas comportamentais distintas (Sanchez, 1996; Conour et al., 2006). Apesar do nosso protocolo experimental não envolver estresse proposital, condições desfavoráveis nas quais os presentes testes foram realizados, como a sala de experimentos utilizada atualmente pelo nosso grupo de pesquisa, que está sujeita a perturbações como barulhos e odores (devido à ausência de isolamento acústico e exaustão), certamente estão relacionadas à grande variabilidade demonstrada pelos animais nos parâmetros medidos nos testes comportamentais e à divergência nos resultados encontrados em comparação com experimentos anteriores do grupo. Além disso, diferenças de local de fornecimento dos animais e condições de alojamento dos mesmos também foram fatores que certamente influenciaram na discrepância dos resultados encontrados.

Além disso, estudos indicam que a realização de um teste logo após o outro podem alterar o comportamento e desempenho dos animais. A exposição prévia ao labirinto em cruz elevado, por exemplo, elimina a resposta ansiolítica do diazepam no teste claro-escuro, enquanto que o teste de suspensão pela cauda imediatamente antes desse teste pode aumentar a sensibilidade a uma resposta do tipo ansiolítica (Rodgers et al., 1993). Visto isso, há a possibilidade de que a realização do teste de campo aberto logo após o teste claro-escuro tenha interferido no comportamento exploratório dos animais, resultando na diminuição da distância percorrida pelos animais no segundo teste, como foi observado no presente estudo.

O GABA é o principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central, enquanto o glutamato é o principal neurotransmissor excitatório. Esse balanço entre excitação e inibição garante a excitabilidade cortical, e mudanças no metabolismo desses neurotransmissores

desempenham papéis importantes no controle dessa excitabilidade cortical. O ciclo de transformações GABA/Glutamato é fechado na sinapse tripartite e, em condições fisiológicas, o conteúdo no neurônio gabaérgico está em equilíbrio com as concentrações intraterminais de glutamato (Mathews e Diamond, 2003). O glutamato é sintetizado nos neurônios glutamatérgicos, liberado na fenda sináptica e, posteriormente, é capturado pelo astrócito, onde é convertido em glutamina pela glutamina sintetase. A glutamina é, então, tanto nos neurônios gabaérgicos como glutamatérgicos, convertida a glutamato e este é posteriormente convertido em GABA nos neurônios gabaérgicos pela ação da enzima glutamato descarboxilase (Liang et al., 2006). GABA é, então, metabolizado à succinato pela ação da GABA-transaminase (GABA-T) e da semialdeído succínico descarboxilase (SSADH), e este entra no ciclo de Krebs e é novamente transformado em glutamato, que é liberado e recapturado pelo astrócito (Liang et al., 2006).

O balanço entre esses dois neurotransmissores e suas forças inibitórias e excitatórias é interrompido por um aumento na excitação glutamatérgica, levando à um aumento na ansiedade (Wierońska et al., 2011). Um aumento no efluxo de glutamato no córtex pré-frontal e hipocampo foi observado após uma situação de estresse (Moghaddam et al., 1993; Bagley e Moghaddam, 1997), e comportamentos ansiogênicos foram observados em animais que não possuíam a enzima GAD65, responsável pela conversão de glutamato em GABA (Kash et al., 1999). Além disso, neurônios glutamatérgicos parecem expressar transportadores GABA (GAT1) e GABA-T/SSADH (Roettger e Amara, 1999; Martin e Tobin, 2000). O GABA liberado pelas células que contém GABA pode ser capturado pelas células glutamatérgicas e reciclado para formar glutamato e, similarmente, neurônios gabaérgicos podem capturar glutamato extracelular (Roettger e Amara, 1999). O glutamato capturado por esses neurônios gabaérgicos aumenta a glutamato descarboxilase e, conseqüentemente, a síntese de GABA, aumentando, dessa forma, os níveis de GABA. Dadas todas as conseqüências da interação entre o sistema gabaérgico e glutamatérgico, uma das hipóteses é de que a NAC, através da modulação glutamatérgica, aumentaria agudamente a liberação de glutamato pela sua ação no antiporter cistina-glutamato, e esse glutamato aumentado na fenda sináptica forneceria substrato para o aumento da síntese de GABA nos neurônios gabaérgicos. Como o diazepam é um modulador de receptores GABA_A que aumenta os efeitos depressores do GABA, essas duas drogas agiriam em sinergismo aumentando a atividade inibitória cerebral e, assim, diminuindo o comportamento do tipo-ansioso dos animais no teste claro-escuro

5. CONCLUSÃO

Esse estudo demonstrou efeito ansiolítico da combinação de uma dose sub-efetiva de NAC (150 mg/kg) com uma dose sub-efetiva de diazepam (1 mg/kg) no teste claro-escuro. Além disso, o mesmo foi capaz de verificar um prejuízo na atividade locomotora dos animais relacionado à administração de NAC no teste de campo aberto, sugerindo que o efeito da administração de NAC + diazepam pode não ser exclusivamente ansiolítico, mas também estar associado a um efeito sedativo de NAC. Devido à série de efeitos adversos associados à utilização de benzodiazepínicos, e considerando-se que o efeito sinérgico da interação de duas substâncias é capaz de reduzir os efeitos adversos relacionadas a elas, esse estudo sugere uma interação clínica possivelmente útil entre NAC e diazepam. No entanto, mais estudos são necessários para que seja verificada se há relação direta entre o prejuízo locomotor e o efeito ansiolítico verificado após a administração de NAC 150 mg/kg + diazepam, visto que o número de cruzamentos – medida de ansiedade - não se alterou no teste claro-escuro; além de melhor caracterizar as bases moleculares da interação entre essas duas substâncias.

6. REFERÊNCIAS

Bagley, J.; Moghaddam, B. (1997). Temporal dynamics of glutamate efflux in the prefrontal cortex and in the hippocampus following repeated stress: effects of pretreatment with saline or diazepam. *Neuroscience*. 77 (1): 65-73.

Baldwin, D.S.; Anderson, I.M.; Nutt, D.J.; Allgulander, C.; Bandelow, B.; Boerden, J.A.; Christmas, D.M.; Davies, S.; Fineberg, N.; Lidbetter, N.; Malizia, A.; McCrone, P.; Nabarro, D.; O'Neill, C.; Scott, J.; van der Wee, N.; Wittchen, H.U. (2014). Evidence based pharmacological treatment of anxiety disorders, post-traumatic stress disorder and obsessive-compulsive disorder: A revision of the 2005 guidelines from the British Association for Psychopharmacology. *J Psychopharmacol*. 28: 403–439

Bergink, V.; van Meegen, H.J.G.M.; Westenberg, H.G.M. (2004). Glutamate and anxiety. *Eur. Neuropsychopharmacol*. 14 (3): 175–183.

Bourin, M.; Hascoet, M. (2003). The mouse light/dark box test. *European Journal of Pharmacology*. 463: 55-65.

Chaouloff, F.; Durand, M.; Mormede, P. (1997). Anxiety- and activity-related effects of diazepam and chlordiazepoxide in the rat light/dark and dark/light tests. *Behav Brain Res*. 85 (1): 27-35.

Colla, A.R.S.; Rosa, J.M.; Cunha, M.P.; Rodrigues, A.L.S. (2015). Anxiolytic-like effects of ursolic acid in mice. *Eur J Pharmacol*. 758: 171–176.

Conour, L.A.; Murray, K.A.; Brown, M.J. (2006). Preparation of Animals for Research Issues to Consider for Rodents and Rabbits. *ILAR J*. 47 (4): 283-293.

Cortese, B.M.; Phan, K.L. (2005). The role of glutamate in anxiety and related disorders. *CNS Spectr*. 10 (10): 820–830.

Costa-Campos, L; Herrmann, A.P.; Pilz, L.K.; Michels, M.; Noetzold, G.; Elisabetsky, E. (2013). Interactive effects of N-acetylcysteine and antidepressants. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*. 44: 125–130.

Costall, B.; Jones, B.J.; Kelly, M.E.; Naylor, R.J.; Onaivi, E.S.; Tyers, M.B. (1990). Sites of action of ondansetron to inhibit withdrawal from drugs of abuse. *Pharmacol. Biochem. Behav*. 36, 97–104.

Crawley, J.N. (1981). Neuropharmacologic specificity of a simple model for the behavioural actions of benzodiazepines. *Pharmacol. Biochem. Behav*. 15: 695– 699.

Crawley, J.N. (1985). Exploratory behaviour models of anxiety in mice. *Neurosci. Biobehav. Rev*. 9: 37– 44.

Crawley, J.N.; Goodwin, F.K. (1980). Preliminary report of a simple animal behaviour for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 13: 167–170.

Dean, O.; Giorlando, F.; Berk, M. (2011). N-Acetylcysteine in psychiatry: current therapeutic evidence and potential mechanisms of action. *J. Psychiatry Neurosci.* 36, 78–86.

Egashira, N.; Shirakawa, A.; Abe, M.; Niki, T.; Mishima, K.; Iwasaki, K.; Oishi, R.; Fujiwara, M. (2012). N-Acetyl-L-Cysteine Inhibits Marble-Burying Behavior in Mice. *J Pharmacol Sci.* 119: 97 – 101.

Grant, J.E.; Odlaug, B.L.; Kim, S.W. (2009). N-Acetylcysteine, a glutamate modulator, in the treatment of trichotillomania: a double-blind, placebo-controlled study. *Arch. Gen. Psychiatry.* 66: 756–763.

Griebel, G.; Holmes, A. (2013). 50 years of hurdles and hope in anxiolytic drug discovery. [*Nat Rev Drug Discov.*](#) 12 (9): 667-87.

Hascoet, M.; Bourin, M. (1998). A new approach to the light/dark procedure in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 60: 645– 653.

Kash, S.F.; Tecott, L.H.; Hodge, C.; Baekkeskov, S. (1999). Increased anxiety and altered responses to anxiolytics in mice deficient in the 65-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96 (4): 1698–1703.

Kessler, R.C. (2007). The global burden of anxiety and mood disorders: putting the European Study of the Epidemiology of Mental Disorders (ESEMeD) findings into perspective. *J. Clin. Psychiatry.* 68 (2): 10–19.

Krystal, J.H.; Mathew, S.J.; D'Souza, D.C.; Garakani, A.; Gunduz-Bruce, H.; Charney, D.S. (2010). Potential psychiatric applications of metabotropic glutamate receptor agonists and antagonists. *CNS Drugs.* 24 (8): 669–693.

Lafleur, D.L.; Pittenger, C.; Gardner, T.; Kelmendi, B.; Wasyluk, S.; Malison, R.T.; Sanacora, G.; Krystal, J.H.; Coric, V. (2006). N-acetylcysteine augmentation in serotonin reuptake inhibitor refractory obsessive-compulsive disorder. [*Psychopharmacology.*](#) 184 (2): 254-6.

Lepicard, E. M.; Joubert, C.; Hagneau, I.; Perez-Diaz, F.; Chapouthier, G. (2000). Differences in anxiety-related behavior and response to diazepam in BALB/cByJ and C57BL/6J strains of mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 67: 739–748.

Liang, S.L.; Carlson, G.C.; Coulter, D.A. (2006). Dynamic regulation of synaptic GABA release by the glutamate-glutamine cycle in hippocampal area CA1. *J Neurosci.* 26 (33): 8537-48.

Martin, D.L.; Tobin, A.J. Mechanisms controlling GABA synthesis and degradation in the brain. In: *GABA in the nervous system: the view at fifty years*. Lippincott Williams and Wilkins: Philadelphia, 2000. P. 25–41.

Mathews, G.C.; Diamond, J.S. (2003). Neuronal glutamate uptake contributes to GABA synthesis and inhibitory synaptic strength. *J Neurosci.* 23 (6): 2040-8.

Mechan, A.O.; Moran, P.M.; Elliott, M.; Young, A.J.; Joseph, M.H.; Green R. (2002) A comparison between Dark Agouti and Sprague-Dawley rats in their behaviour on the elevated plus-maze, open-field apparatus and activity meters and their response to diazepam. *Psychopharmacology.* 159: 188-195.

Mocelin, R.; Herrmann, A.P.; Marcon, M.; Rambo, C.L.; Rohden, A.; Bevilaqua, F.; de Abreu, M.S.; Zanatta, L.; Elisabetsky, E.; Barcellos, L.J.G.; Lara, D.R.; Piato, A. (2015). N-acetylcysteine prevents stress-induced anxiety behavior in zebrafish. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior.* 139: 121–126.

Moghaddam, B. (1993). Stress preferentially increases extraneuronal levels of excitatory amino acids in the prefrontal cortex: comparison to hippocampus and basal ganglia. *J Neurochem.* 60 (5): 1650-7.

Mohammad, F.; Ho, J.; Lim, C.L.; Woo, J.H.; Poon, D.J.J.; Lamba, B.; Claridge-Chang, A. (2015). Anxiety-related interventions in rodent defense behaviors: systematic review and meta-analyses.

Noetzold G. (2013). Efeitos da N-acetilcisteína em modelos experimentais de ansiedade (TCC- UFRGS). 1-31.

Pellow, S.; Chopin, P.; File, S.E.; Briley, M. (1985). Validation of open/ closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Methods.* 14: 145–167.

Rang H.P.; Dale M.M.; Ritter J.M.; Flower R.J.; Henderson G. *Farmacologia.* 7 ed. Elsevier Editora: Rio de Janeiro, 2012.

Rodgers, R.J.; Shepherd, J.K (1993). Influence of prior maze experience on behaviour and response to diazepam in the elevated plus-maze and light/dark tests of anxiety in mice. *Psychopharmacology (Berl).* 113: 237-242.

[Roettger](#), V.R.; [Amara S.G.](#) (1999). GABA and glutamate transporters: therapeutic and etiologic implications for epilepsy. *Adv Neurol.* 79: 551-60.

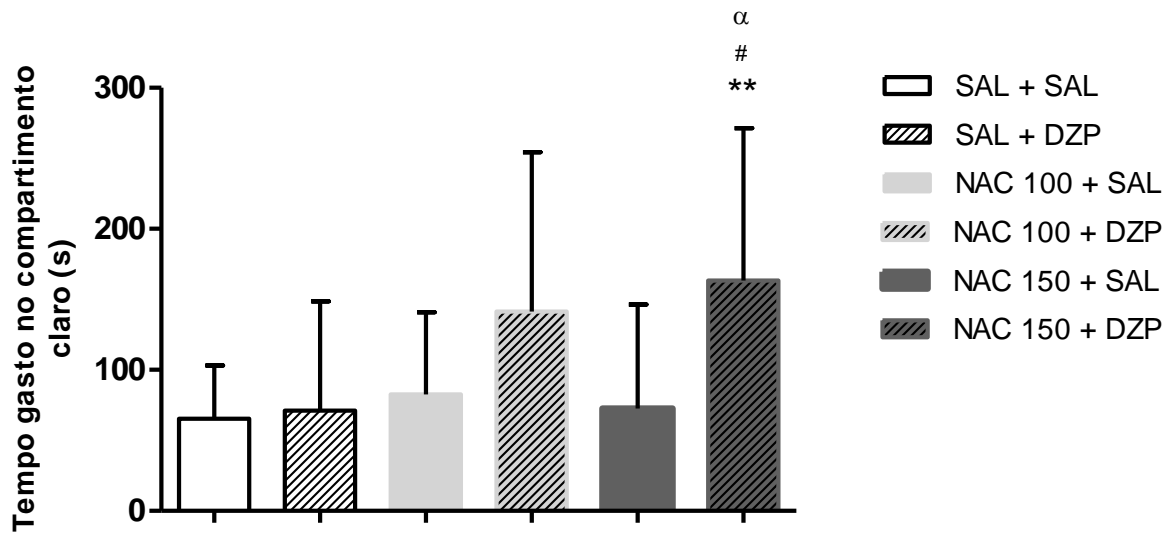
Sanchez, C. (1996). 5HT1A receptors play an important role in modulation of behaviour of rats in a two-compartment black and white box. *Behav. Pharmacol.* 7: 788–797.

Tone, A. *The Age of Anxiety: A History of America's Turbulent Affair with Tranquilizers*. Basic Books: New York, 2009.

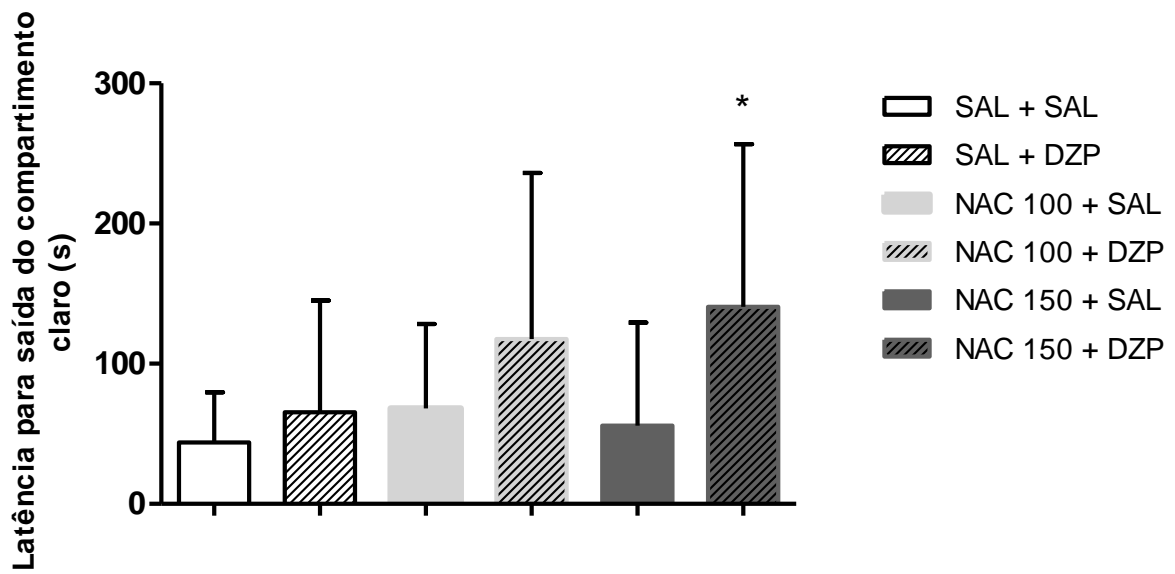
Tovote, P.; Fadok, J.P.; Luthi, A. (2015). Neuronal circuits for fear and anxiety. *Nature Reviews Neuroscience*.

Wierońska, J.M; Stachowicz, K.; Nowak, G.; Pilc, A. (2011). The Loss of Glutamate-GABA Harmony in Anxiety Disorders. In: *Anxiety Disorders*, Prof. Vladimir Kalinin (Ed.), InTech. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/anxiety-disorders/the-loss-of-glutamate-gaba-harmony-in-anxiety-disorders>

A



B



C

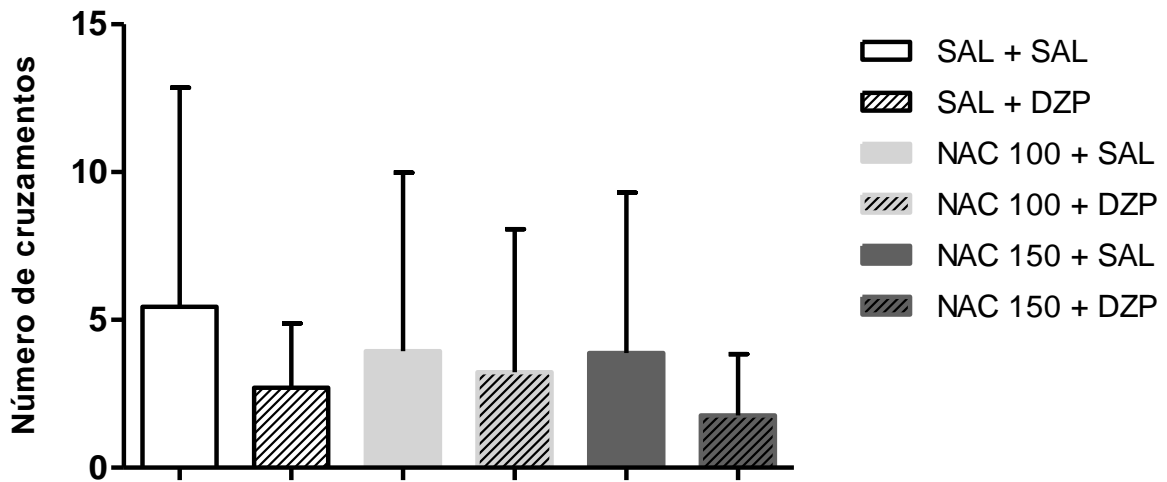
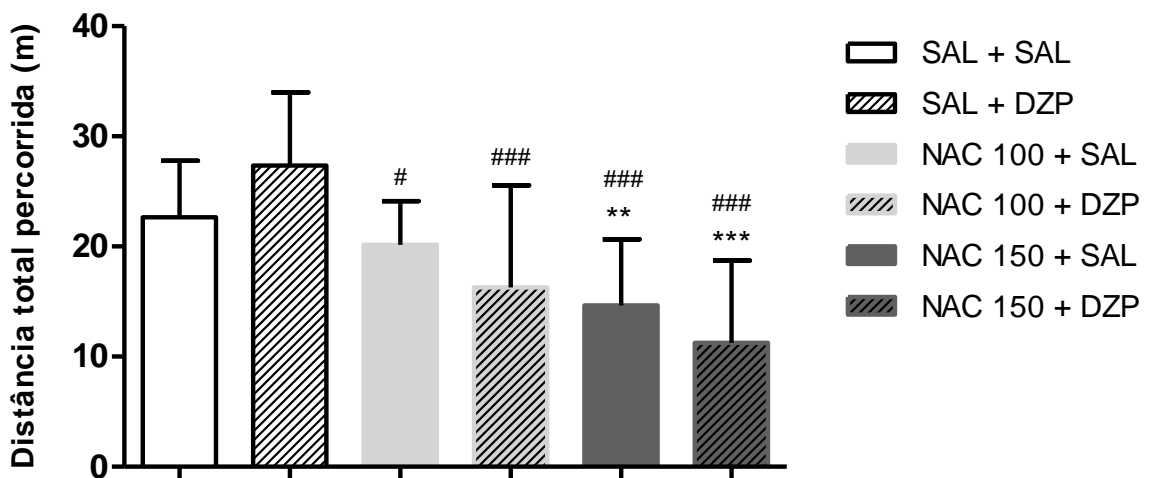
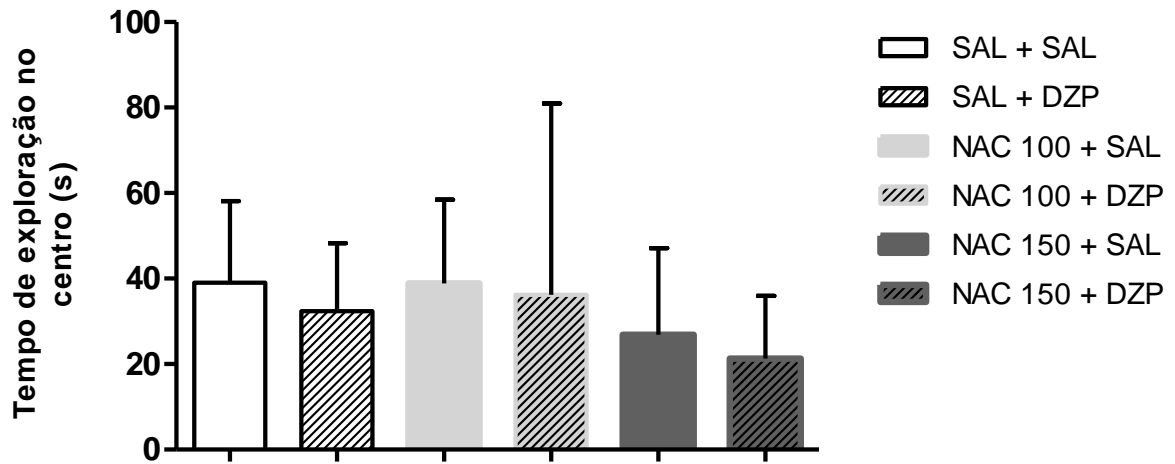


Figura 1 – Efeito interativo de doses sub-efetivas de NAC e uma dose sub-efetiva de diazepam no teste claro-escuro. NAC 100 mg/kg (NAC100), salina (SAL) e NAC 150 mg/kg (NAC150) foram administradas 1 hora antes do teste. Diazepam 1 mg/kg (DZP) e Salina (SAL) foram administradas 30 min antes do teste. Média \pm desvio padrão * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ comparado a salina + salina; # $p < 0,05$ comparado a salina + diazepam (1 mg/kg); $^{\alpha}$ $p < 0,05$ comparado a NAC 150 mg/kg + salina. *One Way ANOVA/Tukey's multiple comparison test.*

A



B



C

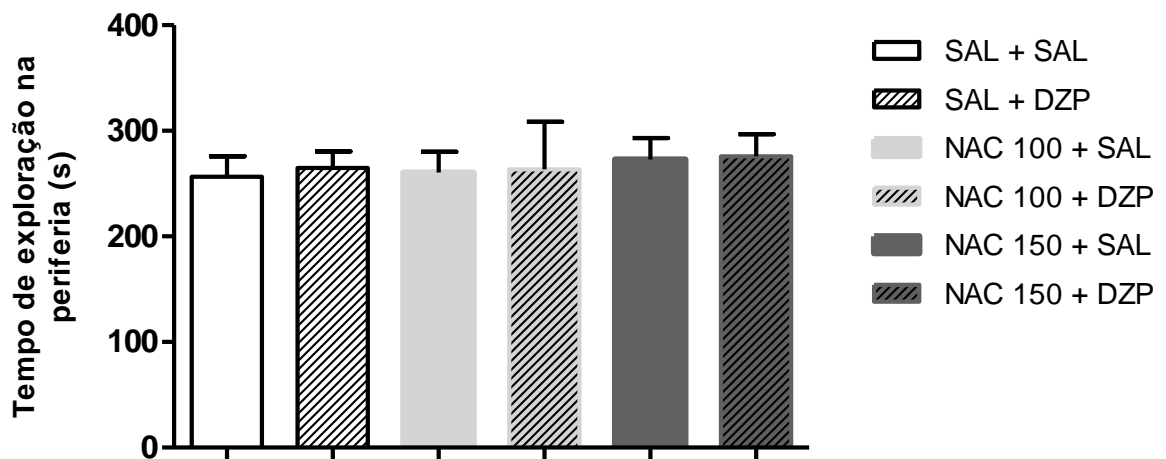


Figura 2 – Efeito interativo de doses sub-efetivas de NAC e uma dose sub-efetiva de diazepam no teste de campo aberto. NAC 100 mg/kg (NAC100), salina (SAL) e NAC 150 mg/kg (NAC150) foram administradas 1 hora antes do teste. Diazepam 1 mg/kg (DZP) e Salina (SAL) foram administradas 30 min antes do teste. Média \pm desvio padrão * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ comparado a salina + salina; # $p < 0,05$; ### $p < 0,001$ comparado a salina + diazepam (1 mg/kg). *One Way ANOVA/Tukey's multiple comparison test.*

4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Esse estudo foi capaz de verificar efeito ansiolítico da interação de uma dose sub-efetiva de NAC (150 mg/kg) com uma dose sub-efetiva de diazepam (1 mg/kg) nos parâmetros de tempo gasto no compartimento claro e latência para sair do compartimento claro no teste claro escuro. Esse resultado, apesar de preliminar, aponta para uma possível interação clinicamente útil entre essas duas substâncias. Ainda, NAC nas duas doses (100 mg/kg e 150 mg/kg), tanto em combinação com salina quanto em combinação com diazepam, diminuiu a distância percorrida pelos animais no teste campo aberto, o que sugere que a mesma ocasionou um prejuízo locomotor.

Dessa forma, pretende-se realizar mais estudos para que haja uma melhor caracterização da interação entre essas duas substâncias, além de outros testes para que seja verificada se há relação entre o efeito ansiolítico causado pela administração de NAC 150 mg/kg + diazepam e o prejuízo locomotor. Adicionalmente, pretende-se realizar mais testes comportamentais para que seja verificado o efeito da interação entre NAC e diazepam em outros modelos de ansiedade.

REFERÊNCIAS

American Psychiatric Association: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. 5 ed. American Psychiatric Association: Arlington, VA, 2013.

Arakawa, M.; Ito, Y. (2007). N-Acetylcysteine and neurodegenerative diseases: basic and clinical pharmacology. *Cerebellum*. 6: 308–314.

Bear M.F.; Connors B.W.; Paradiso M.A. Neurociências. 3 ed. Artmed editora S.A: São Paulo, 2007.

Berk, M.; [Dean, O.](#); [Cotton, S.M.](#); [Gama, C.S.](#); [Kapczinski, F.](#); [Fernandes, B.S.](#); [Kohlmann, K.](#); [Jeavons, S.](#); [Hewitt, K.](#); [Allwang, C.](#); [Cobb, H.](#); [Bush, A.I.](#); [Schapkaitz, I.](#); [Dodd, S.](#); [Malhi, G.S.](#) (2011). The efficacy of N-acetylcysteine as an adjunctive treatment in bipolar depression: an open label trial. *J. Affect. Disord.* 135: 389–394.

Berk, M.; Malhi, G.S.; Gray, L.J.; Dean, O.M. (2013). The promise of N-acetylcysteine in neuropsychiatry. *Trends in Pharmacological Sciences*. 34 (3).

Berk, M.; [Copolov, D.L.](#); [Dean, O.](#); [Lu, K.](#); [Jeavons, S.](#); [Schapkaitz, I.](#); [Anderson-Hunt, M.](#); [Bush A.I.](#) (2008) N-Acetyl cysteine for depressive symptoms in bipolar disorder – a double-blind randomized placebo-controlled trial. *Biol. Psychiatry*. 64: 468–475.

Blier, P.; Szabo, S.T. (2005). Potential mechanisms of action of atypical antipsychotic medications in treatment-resistant depression and anxiety. *J Clin Psychiatry*. 66 (Suppl 8): 30-40.

Bourin, M. (2015). Animal models for screening anxiolytic-like drugs: a perspective. *Dialogues Clin Neurosci*. 17 (3): 295-303.

Brawman-Mintzer, O.; Knapp, R.; Nietert, P. (2005). Adjunctive risperidone in generalized anxiety disorder: a double-blind, placebo-controlled study. *J Clin Psychiatry*. 66 (10): 1321-5.

Brooks, S.J.; Stein, D.J. (2015). A systematic review of the neural bases of psychotherapy for anxiety and related disorders. *Dialogues in Clinical Neuroscience*. 17 (3).

Bulut, M.; Altindag, A.; Savas, H.A.; Virit, O.; Dalkilic, A. (2009). Beneficial effects of N-acetylcysteine in treatment resistant schizophrenia. *World J. Biol. Psychiatry*. 10: 626–628.

Crawley, J.N.; Skolnick, P.; Paul, S.M. (1984). Absence of intrinsic antagonist actions of benzodiazepine antagonist on an exploratory model of anxiety in the mouse. *Neuropharmacology*. 5: 531– 537.

De Angelis, L. (1992). The anxiogenic-like effects of pentylentetrazole in mice treated chronically with carbamazepine or valproate. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 14: 767–771.

Dodd S.; Dean O.; Copolov D.L.; Malhi G.S.; Berk, M. (2008). N-acetylcysteine for antioxidant therapy: pharmacology and clinical utility. *Expert Opin Biol Ther.* 8: 1955-62.

[Duval](#), E.R.; [Javanbakht](#), A.; [Liberzon](#), I. (2015). Neural circuits in anxiety and stress disorders: a focused review. *Ther Clin Risk Manag.* 11: 115–126.

Fuchs, F., Wannmacher, L. *Farmacologia Clínica: fundamentos da terapêutica racional.* 4 ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2010.

Gilbert, K.R.; Aizeman E.; Reynolds I.J. (1991). Oxidized glutathione modulates N-methyl-D-aspartate- and depolarization-induced increases in intracellular Ca²⁺ in cultured rat forebrain neurons. *Neurosci. Lett.* 133 (1) : 11–14

Imaizumi, M.; Suzuki, T.; Machida, H.; Onodera, K. (1994). A fully automated apparatus for a light/dark test measuring anxiolytic or anxiogenic effects of drugs in mice. *Jpn. J. Psychopharmacol.* 14, 83–91.

Ipsier J.C.; Carey P.; Dhansay Y.; Fakier N.; Seedat S.; Stein D.J. (2006). Pharmacotherapy augmentation strategies in treatment-resistant anxiety disorders. *Cochrane Database Syst Rev.* 4.

Kau, K.S.; Madayag A.; Mantsch J.R.; Grier M.D.; Abdulhameed O.; Baker D.A. (2008). Blunted cysteine–glutamate antiporter function in the nucleus accumbens promotes cocaine-induced drug seeking. *Neuroscience.* 155 (2): 530–537.

Kessler R.C. Epidemiology of psychiatric comorbidity. In: Tsuang M.T.; Tohen M.; Zahner G.E.P. *Textbook in Psychiatric Epidemiology.* Wiley, New York, 1995: 179–197.

Kumar, V.; Bhat Z.A.; Kumar, D. (2013). Animal models of anxiety: a comprehensive review. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2013. 68 (2): 175-83.

Lavoie, S.; [Murray, M.M.](#); [Deppen, P.](#); [Knyazeva, M.G.](#); [Berk, M.](#); [Boulat, O.](#); [Bovet, P.](#); [Bush, A.I.](#); [Conus, P.](#); [Copolov, D.](#); [Fornari, E.](#); [Meuli, R.](#); [Solida, A.](#); [Vianin, P.](#); [Cuénod, M.](#); [Buclin, T.](#); [Do, K.Q.](#) (2008). Glutathione precursor, N-acetyl-cysteine, improves mismatch negativity in schizophrenia patients. *Neuropsychopharmacology.* 33: 2187–2199.

Leslie, S.W.; [Brown L.M.](#); [Trent R.D.](#); [Lee Y.H.](#); [Morris J.L.](#); [Jones T.W.](#); [Randall P.K.](#); [Lau S.S.](#); [Monks T.J.](#) (1992). Stimulation of N-methyl-D-aspartate receptor-mediated calcium entry into dissociated neurons by reduced and oxidized glutathione. *Mol. Pharmacol.* 41: 308–314.

Lushchak, V.I. (2012). Glutathione homeostasis and functions: potential targets for medical interventions. *J. Amino Acids*.

Nemeroff, C.B. (2005). Use of atypical antipsychotic in refractory depression and anxiety. *J Clin Psychiatry*. 66 (Suppl 8): 13-21.

Nuss, P. (2015). Anxiety disorders and GABA neurotransmission: a disturbance of modulation. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 11: 165–175.

Odlaug, B.L.; Grant, J.E. (2007). N-Acetyl cysteine in the treatment of grooming disorders. *J. Clin. Psychopharmacol*. 27 : 227–229.

Onaivi, E.S.; Martin, B.R. (1989). Neuropharmacological and physiological validation of a computer-controlled two compartment black and White box for the assessment of anxiety. *Prog. Neuro-psychopharmacol. Biol. Psychiatry*. 13: 963– 976.

Pollack, M.H.; Simon, N.M.; Zalta, A.K.; Worthington, J.J.; Hoge, E.A.; Mick, E.; Kinrys, G.; Oppenheimer, J. (2006). Olanzapine augmentation of fluoxetine for refractory generalized anxiety disorder: a placebo controlled study. *Biol Psychiatry*. 59 (3): 211- 5.

Schwartz, T.L.; Azhar, N.; Husain, J.; Nihalani, N.; Simionescu, M.; Coover, D.; Jindal, S.; Tirmazi, S. (2005). An open-label study of tiagabine as augmentation therapy for anxiety. *Ann Clin Psychiatry*. 17 (3): 167–172.

Sepede, G.; De Berardis, D.; Gambi, F.; Campanella, D.; La Rovere, R.; D'Amico, M.; Cicconetti, A.; Penna, L.; Peca, S.; Carano, A.; Mancini, E.; Salerno, R.M.; Ferro, F.M. (2006). Olanzapine augmentation in treatment resistant panic disorder: a 12-week, fixed-dose, open-label trial. *J Clin Psychopharmacol*. 26 (1): 45-9.

Shimada, T.; Matsumoto, K.; Osanai, M.; Matsuda, H.; Terasawa, K.; Watanabe, H. (1995). The modified light/dark transition test in mice: evaluation of classic and putative anxiolytic and anxiogenic drugs. [*Gen Pharmacol*](#). 26 (1): 205-10.

Toft T.; Fink P.; Oernboel E.; Christensen K.; Frostholm L.; Olesen F. (2005) Mental disorders in primary care: prevalence and co-morbidity among disorders, results from the functional illness in primary care (FIP) study. *Psychol Med*. 35: 1175–1184.

Varga, V.; Jenei, Z.; Janáky, R.; Saransaari, P.; Oja, S.S. (1997). Glutathione is an endogenous ligand of rat brain N-methyl-D-aspartate (NMDA) and 2-amino-3-hydroxy-5-methyl-4- isoxazolepropionate (AMPA) receptors. *Neurochem. Res*. 22: 1165–1171.

Worthington J.J.; Kinrys, G.; Wygant, L.E.; Pollack, M.H. (2005). Aripiprazole as an augmentor of selective serotonin reuptake inhibitors in depression and anxiety disorder patients. *Int Clin Psychopharmacol*. 20 (1): 9-11.

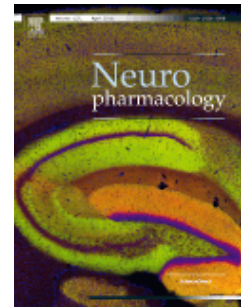
Wu, K.; Hanna G.L.; Rosenberg D.R.; Arnold P.D. (2012). The role of glutamate signaling in the pathogenesis and treatment of obsessive-compulsive disorder. *Pharmacol Biochem Behav.* 100: 726-735.

Young, R.; Johnson, D.N. (1991). A fully automated light/dark apparatus useful for comparing anxiolytic agents. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 40, 739– 743.

ANEXO A - NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA NEUROPHARMACOLOGY



TABLE OF CONTENTS



●	Description	p.1
●	Audience	p.1
●	Impact Factor	p.1
●	Abstracting and Indexing	p.2
●	Editorial Board	p.2
●	Guide for Authors	p.4

ISSN: 0028-3908

DESCRIPTION

Neuropharmacology publishes high quality, original research within the discipline of **neuroscience**. The emphasis of *Neuropharmacology* is on the study and understanding of the actions of known exogenous and endogenous chemical agents on neurobiological processes in the mammalian nervous system. Work with non-mammalian and invertebrate species may be considered in exceptional circumstances. The journal does not usually accept clinical research, although **neuropharmacological studies** in humans may be considered on the condition that they provide novel insight into either the actions of drugs and/or neurobiological mechanisms. The journal only considers submissions in which the chemical structures and compositions of experimental agents are readily available in the literature or disclosed by the authors in the submitted manuscript. Similarly, manuscripts describing the use of natural products will only be considered if the active ingredient is known and disclosed.

Neuropharmacology also publishes succinct topical reviews on subjects within its remit. These reviews (of between 3000 and 5000 words) are commissioned by the Editorial Team or arise after correspondence with potential authors. Unsolicited reviews are considered, but authors are encouraged to contact the Editor-in-Chief ahead of time and to indicate clearly how the review differs from, and adds to, recent published reviews on related topics.

The journal publishes Special Issues in which leading experts are invited to serve as Guest Editors to compile a collection of reviews, and occasionally original articles, around a particular topical theme in **neuroscience** research. The list of recent Special Issues can be found [here](#). Suggestions for Special Issues can be made directly to the Editor-in-Chief.

AUDIENCE

Neuroscientists and neuropharmacologists, particularly in the field of cellular and molecular neuroscience.

IMPACT FACTOR

2014: 5.106 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2015

ABSTRACTING AND INDEXING

BIOSIS

Elsevier BIOBASE

Chemical Abstracts

Current Contents/BIOMED Database Current

Contents/Life Sciences Current

Contents/SciSearch Database

Current Contents/Science Citation Index

MEDLINE®

EMBASE

PASCAL/CNRS

Psychology Abstracts

Research Alert Scopus

EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief

Bruno Frenguelli, School of Life Sciences, University of Warwick, Coventry, CV4 7AL, England, UK

Senior Editors

Stuart Allan, Manchester, England, UK

John Cryan, Cork, Ireland

Thomas Gould, Philadelphia, Pennsylvania, USA

Josef Kittler, London, UK

Michaela Kress, Wilten, Austria

Bitu Moghaddam, Pittsburgh, Pennsylvania, USA

Christopher Parsons, Frankfurt am Main, Germany **Heikki**

Tanila, Kuopio, Finland

Danny Winder, Nashville, Tennessee, USA

Editorial Board

Carine Ali, Caen Cedex, France

Vaishali Bakshi, Madison, Wisconsin, USA

Nicholas Barnes, Birmingham, UK

Frank Barone, New York, New York, USA

Alasdair Barr, Vancouver, British Columbia, Canada **David**

Bleakman, Indianapolis, Indiana, USA **Angelique Bordey**,

New Haven, Connecticut, USA **Martine Cadot**, Bordeaux, France

Regina Carelli, Chapel Hill, North Carolina, USA

Gemma Casadesus, Cleveland, Ohio, USA **Hwei-**

Hsien Chen, Hualien, Taiwan, ROC

Maria Isabel Colado, Madrid, Spain **Jeff Conn**, Nashville, Tennessee, USA **Anis Contractor**, Chicago, Illinois, USA **Peter Crack**, Parkville, Victoria, Australia **Elisabetta Daré**, Stockholm, Sweden **Ceri Davies**, Singapore, Singapore
Thérèse Di Paolo, Quebec City, Quebec, Canada **Chris Dulla**, Medford, Massachusetts, USA **Fabrizio Gasparini**, Basel, Switzerland
Yukiko Goda, London, UK
Timothy Greenamyre, Pittsburgh, Pennsylvania, USA
Robert Greene, Dallas, Texas, USA
David Heal, Nottingham, UK
Ray Hill, Harlow, UK
Peter Hutson, Wayne, Pennsylvania, USA
Kazutaka Ikeda, Tokyo, Japan **Masanobu Kano**, Chiba, Japan
Thomas Kash, Chapel Hill, North Carolina, USA
Áine Kelly, Dublin, Ireland
Paul Kenny, New York, New York, USA

Baljit Khakh, Los Angeles, California, USA
Gavin Kilpatrick, Histon, UK
Chul-Hoon Kim, Seoul, South Korea **Jennifer Laird**, Montréal, Quebec, Canada **Wolfgang Löscher**, Hannover, Germany **David Lovinger**, Rockville, Maryland, USA **Lan Ma**, Shanghai, China
Robert Malenka, Palo Alto, California, USA
Carina Mallard, Sweden
Olivier Manzoni, Marseille, France
Hélène Marie, Valbonne, France
Athina Markou, La Jolla, California, USA **Charles Marsden**, Nottingham, UK **Francesco Matrisciano**, Chicago, Illinois, USA **Daniel McGehee**, Chicago, Illinois, USA
Stephen Moss, Philadelphia, Pennsylvania, USA
Ferdinando Nicoletti, Pozzilli, Italy
Michael Ossipov, Tucson, Arizona, USA **Menelas Pangolas**, Princeton, New Jersey, USA **Loren Parsons**, La Jolla, California, USA
Gavril Pasternak, New York, New York, USA
Diana Pettit, Bronx, New York, USA **Andrzej Pilc**, Kraków, Poland
Graziano Pinna, Chicago, Illinois, USA
Anna Pittaluga, Genoa, Italy
Andrew Plested, Bethesda, Maryland, USA **Victoria Risbrough**, San Diego, California, USA **Marisa Roberto**, La Jolla, California, USA
Michael Robinson, Philadelphia, Pennsylvania, USA
Patricia Robledo, Barcelona, Spain
David Rossi, Pullman, Washington, USA **Jerome Sanes**, Providence, Rhode Island, USA **Stephanie Schorge**, London, England, UK **Yael Stern-Bach**, Jerusalem, Israel
Geoffrey T. Swanson, Chicago, Illinois, USA **Andrew Tapper**, Worcester, Massachusetts, USA **Anne-Marie van Dam**, Amsterdam, Netherlands
Maarten van den Buuse, Melbourne, Victoria, Australia
Mark Wall, Coventry, England, UK
Jarda Wroblewski, Washington DC, District of Columbia, USA
Jared Young, La Jolla, California, USA
Xiang Yu, Shanghai, China
Xiongwei Zhu, Cleveland, Ohio, USA

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

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

Human and animal rights

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

All animal experiments should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, [EU Directive 2010/63/EU for animal experiments](#), or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed. **All animal studies need to ensure they comply with the ARRIVE guidelines.** More information can be found at <http://www.nc3rs.org.uk/page.asp?id=1357>.

Conflict of interest

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

Submission declaration and verification

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

Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Article transfer service

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal. More information about this can be found here: <https://www.elsevier.com/authors/article-transfer-service>.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see <https://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <https://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <https://www.elsevier.com/permissions>.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see <https://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <https://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

Author rights

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

Role of the funding source

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

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

US National Institutes of Health (NIH) voluntary posting ("Public Access") policy

Elsevier facilitates author response to the NIH voluntary posting request (referred to as the NIH "Public Access Policy"; see <http://www.nih.gov/about/publicaccess/index.htm>) by posting the peer-reviewed author's manuscript directly to PubMed Central on request from the author, 12 months after formal publication. Upon notification from Elsevier of acceptance, we will ask you to confirm via e-mail (by e-mailing us at NIHauthorrequest@elsevier.com) that your work has received NIH funding and that you intend to respond to the NIH policy request, along with your NIH award number to facilitate processing. Upon such confirmation, Elsevier will submit to PubMed Central on your behalf a version of your manuscript that will include peer-review comments, for posting 12 months after formal publication. This will ensure that you will have responded fully to the NIH request policy. There will be no need for you to post your manuscript directly with PubMed Central, and any such posting is prohibited.

Exceptions: It is the policy of Elsevier that authors need not obtain permission in the following cases only: (1) to use their original figures or tables in their future works; (2) to make copies of their papers for use in their classroom teaching; and (3) to include their papers as part of their dissertations

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open access

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

Subscription

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

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution (CC BY)

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

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

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The open access publication fee for this journal is **USD 2600**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <https://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our green open access page for further information (<http://elsevier.com/greenopenaccess>). Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form.

This journal has an embargo period of 12 months.

Elsevier Publishing Campus

The Elsevier Publishing Campus (www.publishingcampus.com) is an online platform offering free lectures, interactive training and professional advice to support you in publishing your research. The College of Skills training offers modules on how to prepare, write and structure your article and explains how editors will look at your paper when it is submitted for publication. Use these resources, and more, to ensure that your submission will be the best that you can make it.

Language (usage and editing services)

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

Submission

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

Referees

Please submit the names and institutional e-mail addresses of several potential referees. For more details, visit our [Support site](#). Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

Additional information

The Neuroscience Peer Review Consortium

Neuropharmacology is a member of the Neuroscience Peer Review Consortium (NPRC). The NPRC has been formed to reduce the time expended and, in particular, the duplication of effort by, and associated burden on reviewers involved in the peer review of original neuroscience research papers. It is an alliance of neuroscience journals that have agreed to accept manuscript reviews from other Consortium journals. By reducing the number of times that a manuscript is reviewed, the Consortium will reduce the load on reviewers and Editors, and speed the publication of research results.

If a manuscript has been rejected by another journal in the Consortium, authors can submit the manuscript to *Neuropharmacology* and indicate that the referees' reports from the first journal will be made available to the Editors of *Neuropharmacology*.

It is the authors' decision as to whether or not to indicate that a set of referee's reports should be forwarded from the first journal to *Neuropharmacology*. If an author does not wish for this to happen, the manuscript can be submitted to *Neuropharmacology* without reference to the previous submission. No information will be exchanged between journals except at the request of authors. However, if the original referees' reports suggested that the paper is of high quality, but not suitable for the first journal, then it will often be to an author's advantage to indicate that referees' reports should be made available.

Authors should revise the original submission in accordance with the first journal's set of referee reports, and submit the paper to *Neuropharmacology* with a covering letter describing the changes that have been made, and informing the Editors that the authors will ask for the referee's reports to be forwarded from the Consortium journal. The authors then must contact the first journal, and ask that reviews be forwarded, indicating they have submitted to *Neuropharmacology*, providing the new manuscript ID number.

The Editors of *Neuropharmacology* will use forwarded referee's reports at their discretion. The Editors may use the reports directly to make a decision, or they may request further reviews if they feel such are necessary.

Visit <http://nprc.incf.org> for a list of Consortium journals, as well as further information on the scheme.

PREPARATION

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <https://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered

1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower- case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a

separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <https://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples. Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements: [Illustration Service](#).

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <https://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Chemical compounds

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

Chemical compounds studied in this article

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

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

Abbreviations

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

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Math formulae

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

Footnotes

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

Artwork *Electronic*

artwork *General*

points

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

A detailed guide on electronic artwork is available on our website: <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

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

Formats

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

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

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

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

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

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

Please do not:

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

Color artwork

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

Illustration services

Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/illustrationservices>) offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical- style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

Figure captions

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

Tables

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

References

Citation in text

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

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

A DOI can be used to cite and link to electronic articles where an article is in-press and full citation details are not yet known, but the article is available online. A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <http://dx.doi.org/10.1029/2001JB000884i>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

Web references

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

References in a special issue

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

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles (<http://citationstyles.org>), such as Mendeley (<http://www.mendeley.com/features/reference-manager>) and Zotero (<https://www.zotero.org/>), as well as EndNote (<http://endnote.com/downloads/styles>). Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their

article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/neuropharmacology>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication. Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown'

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

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York. Reference to a chapter in an edited book:

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

Reference to a website:

Cancer Research UK, 1975. Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> (accessed 13.03.03).

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations: <http://www.issn.org/services/online-services/access-to-the-ltwa/>.

Video data

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

Supplementary material

Supplementary material can support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Please note that such items are published online exactly as they are submitted; there is no typesetting involved (supplementary data supplied as an Excel file or as a PowerPoint slide will appear as such online). Please submit the material together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. If you wish to make any changes to supplementary data during any stage of the process, then please make sure to provide an updated file, and do not annotate any corrections on a previous version. Please also make sure to switch off the 'Track Changes' option in any Microsoft Office files as these will

appear in the published supplementary file(s). For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Database linking

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

AudioSlides

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

Submission checklist

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

Ensure that the following items are present:

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

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded, and contain:

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

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

- Indicate clearly whether or not color or black-and-white in print is required.

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

AFTER ACCEPTANCE

Proofs

For all accepted manuscripts, page proofs will be sent to the corresponding author (or the first-named author) for checking. **Corrections to the proofs must be restricted to printer's errors.** Any substantial alterations other than these may be charged to the author. Authors are particularly requested to return their corrected proofs as quickly as possible in order to facilitate rapid publication. Please note that **authors are urged to check their proofs carefully before return, since late corrections cannot be guaranteed for inclusion in the printed journal.** Reprints and copies of the issue (at a specially reduced rate) can be ordered on the form which will accompany the proofs. These should be returned to: Elsevier Ltd, Bampfylde Street, Exeter, EX1 2AH, U.K.

Disclaimer:

Whilst every effort is made by the publishers and editorial board to see that no inaccurate or misleading data, opinion or statement appears in this journal, they wish to make it clear that the data and opinions appearing in the articles and advertisements herein are the sole responsibility of the contributor or advertiser concerned. Accordingly, the publishers, the editorial board and editors and their respective employees, officers and agents accept no responsibility or liability.

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Webshop](#). Corresponding authors who have published their article open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

AUTHOR INQUIRIES

You can track your submitted article at <https://www.elsevier.com/track-submission>. You can track your accepted article at <https://www.elsevier.com/trackarticle>. You are also welcome to contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.

© Copyright 2014 Elsevier | <http://www.elsevier.com>

