

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos

Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção



Dissertação

**Ação do tipo antidepressiva do composto 2-fenil-3-(fenilselanil)benzofurano
em camundongos: evidências sobre o envolvimento de mecanismos
serotoninérgicos e de propriedades antioxidantes**

Jéssica Iara Gall

Pelotas, 2019

Jéssica Iara Gall

Ação do tipo antidepressiva do composto 2-fenil-3-(fenilselanil)benzofurano em camundongos: evidências sobre o envolvimento de mecanismos serotoninérgicos e de propriedades antioxidantes

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção do Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (Bioquímica e Bioprospecção).

Orientadora: Prof^{fa}. Dr^a. Cristiani Folharini Bortolatto

Coorientador: Prof. Dr. César Augusto Brüning

Pelotas, 2019

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

G162a Gall, Jéssica Iara

Ação do tipo antidepressiva do composto 2-fenil-3-(fenilselanil)benzofurano em camundongos : evidências sobre o envolvimento de mecanismos serotoninérgicos e de propriedades antioxidantes / Jéssica Iara Gall ; Cristiani Folharini Bortolatto, orientadora ; César Augusto Brüning, coorientador. — Pelotas, 2019.

96 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, 2019.

1. Selênio. 2. Benzofurano. 3. Transtorno psiquiátrico. 4. Serotonina. 5. Estresse oxidativo. I. Bortolatto, Cristiani Folharini, orient. II. Brüning, César Augusto, coorient. III. Título.

CDD : 574.192

Jéssica Iara Gall

Ação do tipo antidepressiva do composto 2-fenil-3-(fenilselanil)benzofurano em camundongos: evidências sobre o envolvimento de mecanismos serotoninérgicos e de propriedades antioxidantes

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

Data da Defesa: 27 de setembro de 2019

Banca examinadora:



Profª. Drª. Cristiani Folharini Bortolatto (Orientadora)

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



Profª. Drª. Cristina Wayne Nogueira

Doutora em Ciências Biológicas (Bioquímica) pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.



Profª. Drª. Ana Paula Pesarico

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

Agradecimentos

Agradeço primeiramente aos meus pais pela confiança, compreensão, apoio e pelo amor incondicional que permitiram que eu chegasse até aqui. Vocês são a razão de tudo, e todas minhas conquistas são por vocês.

Ao Danilo, pelo amor, amizade e pela cumplicidade que temos. Obrigada por ser a pessoa com quem posso contar em todos os momentos e que me motiva a seguir meus objetivos.

A Cris, por tudo que me ensinou durante esta etapa, pela paciência, amizade, confiança e pela dedicação para que esse trabalho fosse concluído. Saiba que tenho um enorme carinho e admiração por ti e me sinto privilegiada por tê-la como orientadora.

Ao César, por ser um co-orientador presente e sempre disposto a ajudar e esclarecer minhas dúvidas. Agradeço pelos ensinamentos e pela amizade.

A Melinda, pela amizade desde o início da graduação e pelo apoio durante o mestrado.

A todos os amigos que fiz no LABIONEM. Sou muito grata por fazer parte de um grupo composto por pessoas tão incríveis e que tornaram meus dias muito mais felizes. Em especial, agradeço a Amália, Taís e ao Cleisson, que são amigos que levarei para a vida toda.

A Ana Paula e Cristina pela disponibilidade para avaliação deste trabalho. Me sinto feliz e grata por poder contar com a contribuição de professoras/pesquisadoras que admiro tanto.

Ao PPGBBio e à UFPel pela oportunidade, e a todos os professores pelo aprendizado. Tenho muito orgulho em fazer parte desta universidade e espero que muitos outros ainda possam desfrutar das mesmas oportunidades.

Resumo

GALL, Jéssica Iara. **Ação do tipo antidepressiva do composto 2-fenil-3-(fenilselanil)benzofurano em camundongos: evidências sobre o envolvimento de mecanismos serotoninérgicos e de propriedades antioxidantes**. 2019. 95f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A depressão é o transtorno psiquiátrico mais grave e debilitante, porém os antidepressivos atualmente disponíveis apresentam limitações clínicas. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a ação do tipo antidepressiva do composto 2-fenil-3-(fenilselanil)benzofurano (SeBZF) e investigar a contribuição do sistema serotoninérgico e de propriedades antioxidantes nesta ação em camundongos machos. Inicialmente, compostos da classe 3-organoselenil benzofuranos foram testados no ensaio de lipoperoxidação em cérebro de camundongos, e o SeBZF foi selecionado por apresentar o melhor perfil antioxidante. A partir de curvas de tempo e dose-resposta em camundongos, foi constatado que o SeBZF, administrado por via intragástrica, apresenta efeitos anti-imobilidade a partir de 50 mg/kg no teste do nado forçado (TNF; 30 min de pré-tratamento) e a partir de 5 mg/kg no teste de suspensão pela cauda (TSC; 30 e 60 min). Ademais, o SeBZF não causou alterações da atividade locomotora dos animais. Posteriormente, foi estudada a contribuição de mecanismos serotoninérgicos na ação do tipo antidepressiva do SeBZF no TSC através da administração de SeBZF (50 mg/kg) a camundongos pré-tratados com diferentes antagonistas de receptores deste sistema: WAY100635 (0,1 mg/kg, via subcutânea; antagonista do receptor 5-HT_{1A}), cetanserina (1 mg/kg, via intraperitoneal, i.p.; antagonista 5-HT_{2A/2C}) e ondansetron (1 mg/kg, i.p.; antagonista 5-HT₃). A administração de WAY100635 e cetanserina bloqueou a ação do tipo antidepressiva do SeBZF, sugerindo que seu mecanismo de ação pode estar relacionado à modulação dos receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A/2C}. A interação com o sistema serotoninérgico também foi avaliada através da co-administração de doses sub-efetivas de SeBZF (1 mg/kg) e fluoxetina (5 mg/kg), sendo verificado que este tratamento conjunto produziu um significativo efeito anti-imobilidade no TSC. Além disso, SeBZF (50 mg/kg) não afetou a atividade da enzima monoamina oxidase-A em hipocampo. Uma avaliação complementar foi realizada com a administração de para-clorofenilalanina (pCPA; 100 mg/kg, i.p.), um inibidor da enzima triptofano hidroxilase, que participa da biossíntese de serotonina. Para isso, os animais foram tratados com pCPA durante quatro dias consecutivos, e 24h após o último tratamento receberam SeBZF (50 mg/kg). O hipocampo foi removido para análises bioquímicas, as quais incluíram parâmetros de estresse oxidativo e a atividade das enzimas acetilcolinesterase (AChE) e Na⁺/K⁺-ATPase. A administração de pCPA aboliu a ação do tipo antidepressiva do SeBZF no TSC, aumentou os níveis de TBARS e a atividade da catalase bem como reduziu o conteúdo tiólico total e a atividade da Na⁺/K⁺-ATPase. O tratamento com SeBZF protegeu contra o estresse oxidativo em hipocampo induzido por pCPA e demonstrou uma tendência em recuperar a atividade da Na⁺/K⁺-ATPase. A atividade da AChE não foi alterada pelos tratamentos com pCPA e/ou

SeBZF. A toxicidade do SeBZF foi avaliada através de sua administração na dose de 300 mg/kg (i.g.) a camundongos Swiss fêmeas. Quatorze dias após, foi realizada a coleta de sangue para realização de provas de função hepática e renal e remoção do fígado para determinação dos níveis de TBARS. Não houveram alterações nos parâmetros bioquímicos avaliados, apontando para um baixo potencial de toxicidade do SeBZF.

Palavras-chave: selênio; benzofurano; transtorno psiquiátrico; serotonina; estresse oxidativo; hipocampo.

Abstract

GALL, Jéssica Iara. **Antidepressant-like action of 2-phenyl-3-(phenylselenanyl)benzofuran in mice: evidences on the involvement of serotonergic mechanisms and antioxidant properties.** 2019. 95f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Depression is the most severe and debilitating psychiatric disorder, but currently available antidepressants have clinical limitations. Thus, the objective of this study was to evaluate the antidepressant-like action of 2-phenyl-3-(phenylselenanyl)benzofuran (SeBZF) and to investigate the contribution of the serotonergic system and antioxidant properties on this action in male mice. Initially, compounds of the class 3-organoselenyl benzofuran were tested in the mice brain lipoperoxidation assay, and SeBZF was selected for having the best antioxidant profile. From time- and dose-response curves in mice, it was found that SeBZF, administered intragastrically, has anti-immobility effects from the dose of 50 mg/kg in the forced swim test (FST; 30 min pre-treatment) and from the dose of 5 mg/kg in the tail suspension test (TST; 30 and 60 min). In addition, SeBZF did not cause changes in the locomotor activity of the animals. Posteriorly, the contribution of serotonergic mechanisms in SeBZF antidepressant action in the TST was studied by administering SeBZF (50 mg/kg) to mice pretreated with different receptor antagonists of that system: WAY100635 (0.1 mg/kg, subcutaneous route; 5-HT_{1A} receptor antagonist), ketanserin (1 mg/kg, intraperitoneal route, i.p.); 5-HT_{2A/2C} antagonist) and ondansetron (1 mg/kg, i.p.; 5-HT₃ antagonist). Administration of WAY100635 and ketanserin blocked the SeBZF antidepressant action, suggesting that its action mechanism may be related to modulation of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A/2C} receptors. Interaction with the serotonergic system was also assessed by co-administering sub-effective doses of SeBZF (1 mg/kg) and fluoxetine (5 mg/kg), this combined treatment had a significant anti-immobility effect on the TST. In addition, SeBZF (50 mg/kg) did not affect the activity of monoamine oxidase-A enzyme in the hippocampus. Another evaluation was performed with the administration of para-chlorophenylalanine (pCPA; 100 mg/kg, i.p.), a tryptophan hydroxylase enzyme inhibitor, which participates in serotonin biosynthesis. For this, mice were treated with pCPA for four consecutive days, and 24h after the last treatment received SeBZF (50 mg/kg). The hippocampus was removed for biochemical analyzes, which included oxidative stress parameters and the activity of acetylcholinesterase (AChE) and Na⁺/K⁺-ATPase enzymes. Administration of pCPA abolished SeBZF antidepressant-like action in the TST, increased TBARS levels and catalase activity as well as reduced total thiol content and Na⁺/K⁺-ATPase activity. SeBZF treatment protected against pCPA-induced hippocampal oxidative stress and demonstrated a tendency to recover Na⁺/K⁺-ATPase activity. AChE activity was not altered by pCPA and/or SeBZF treatments. SeBZF toxicity was assessed by its administration at a dose of 300 mg/kg (i.g.) to female Swiss mice. Fourteen days later, blood was collected for liver and kidney function tests and liver removal to determine TBARS levels. There were no changes in the biochemical parameters evaluated, pointing to a low toxicity potential of SeBZF.

Keywords: selenium; benzofuran; psychiatric disorder; serotonin; oxidative stress; hippocampus.

Lista de Figuras

Figura 1	Diagrama esquemático relacionando os efeitos da produção de EROs sobre o desenvolvimento da depressão.....	26
Figura 2	Representação das respostas comportamentais no TNF e TSC.....	28
Figura 3	Estrutura química do benzofurano.....	31
Figura 4	Estrutura química dos compostos da classe 3-organoselenil benzofuranos.....	86
Figura 5	Efeito dos compostos 3-organoselenil benzofuranos (1-5) e vitamina E (F) sobre os níveis de lipoperoxidação induzida por NPS em homogenato de cérebro de camundongos.....	88
Figura 6	Efeito do tratamento com SeBZF (300 mg/kg, i. g.) em parâmetros de toxicidade sistêmica em camundongos.....	92

Lista de Tabelas

Tabela 1	Sintomas da depressão.....	18
Tabela 2	Características básicas dos receptores 5-HT _{1A} , 5-HT _{2A/2C} e 5-HT ₃	22
Tabela 3	Valores de CI ₅₀ e I _{máx} para os compostos da classe 3-organoselenil benzofuranos (1-5) e no ensaio de TBARS em homogenato de cérebro de camundongos.....	89

Lista de Abreviaturas e Siglas

5-HT	Serotonina
AChE	Acetilcolinesterase
ADT	Antidepressivo tricíclico
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Adenosina trifosfato
CAT	Catalase
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EROs	Espécies reativas de oxigênio
HPA	Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal
i. g.	Intragástrica
i. p.	Intraperitoneal
IMAO	Inibidor da monoamina oxidase
ISRS	Inibidor seletivo da recaptação de dopamina
ISRN	Inibidor seletivo da recaptação de norepinefrina
ISRS	Inibidor seletivo da recaptação de serotonina
ISRSN	Inibidor seletivo da recaptação de serotonina e norepinefrina
MAO	Monoamina oxidase
MDA	Malondialdeído
NMDA	N-metil D-Aspartato
NPS	Nitroprussiato de sódio
pCPA	Paraclorofenilalanina

s. c.	Subcutânea
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SeBZF	2-fenil-3-(fenilselanil)benzofurano
SERT	Transportador de serotonina
TBARS	Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
TDM	Transtorno depressivo maior
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TSC	Teste de suspensão pela cauda
TNF	Teste do nado forçado

Lista de Fórmulas Químicas

H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
K^+	Íon potássio
Na^+	Íon sódio
$^1\text{O}_2$	Oxigênio singleto
$\text{O}_2^{\bullet-}$	Radical ânion superóxido
$\text{OH}^\bullet$	Radical hidroxila
$-\text{SH}$	Sulfidrila

Sumário

1 Introdução	15
2 Objetivos	17
Objetivo geral.....	17
Objetivos específicos.....	17
3 Revisão da literatura.....	18
Depressão.....	18
Teoria monoaminérgica	20
Estresse oxidativo.....	24
Uso de roedores	27
Selênio	29
Benzofurano	30
4 Manuscrito.....	32
5 Conclusões	73
Referências	74
Apêndices	85
Apêndice A	86
Apêndice B	90
Anexos	93
Anexo A	94
Anexo B	96

1 Introdução

A depressão é um transtorno psiquiátrico crônico, recorrente, debilitante e com elevada prevalência na população (HILLHOUSE e PORTER, 2015), sendo resultante da interação de diversos fatores genéticos e ambientais (SAVEANU e NEMEROFF, 2012). É caracterizada por deficiências na cognição, regulação emocional, memória e função motora. Além destes efeitos primários, também pode causar incapacidade secundária, uma vez que indivíduos depressivos são mais propensos a desenvolver doenças crônicas (DEAN e KESHAVAN, 2017; ZUCKERMAN *et al.*, 2018).

Segundo os dados mais recentes publicados pela Organização Mundial da Saúde, estima-se que mais de 300 milhões de pessoas sejam afetadas por este transtorno em todo o mundo (WHO, 2017). Fatores como o surgimento de efeitos adversos relevantes, o prazo estimado para o início da ação farmacológica e a significativa parcela de pacientes resistentes às terapias antidepressivas atualmente disponíveis podem levar ao abandono do tratamento e, em casos mais graves, à tentativa de suicídio (PERINI *et al.*, 2019; TACIAK *et al.*, 2018).

Sabe-se que a exposição prolongada ao estresse e a outros fatores pode precipitar a depressão em indivíduos que estão predispostos a doenças mentais (MARATHE *et al.*, 2018; SALIM *et al.*, 2014). No entanto, os mecanismos subjacentes à fisiopatologia da depressão ainda não estão totalmente elucidados. Diversos fatores parecem estar envolvidos, incluindo alterações serotoninérgicas, noradrenérgicas e dopaminérgicas, que são descritas pela teoria monoaminérgica, além de alterações glutamatérgicas, neuroinflamação, estresse oxidativo, aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias, anormalidades no eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), alterações e diminuição da neurogênese e neuroplasticidade (HUANG *et al.*, 2017; JEON e KIM, 2016). Apesar de não existir uma única hipótese elucidando esse transtorno, todas essas vias e mecanismos podem estar relacionados e interligados.

A pesquisa pré-clínica de novos antidepressivos compreende o uso de animais, especialmente roedores, que são ferramentas importantes para estudar diversos aspectos relacionados a este transtorno (YAN *et al.*, 2010). O propósito da pesquisa com animais não é reproduzir todas as características da depressão, mas investigar sua etiologia e avaliar novas alternativas de tratamento farmacológico (ABELAIRA *et al.*, 2013; RAMAKER e DULAWA, 2017). Protocolos usualmente empregados para avaliar o comportamento do tipo depressivo em animais baseiam-se na avaliação de

seu comportamento perante uma situação estressante ou adversa (WANG *et al.*, 2017). Sob essas condições, os roedores costumam apresentar uma reação inicial direcionada ao comportamento de fuga, seguida de uma postura imóvel. Antidepressivos clinicamente eficazes reduzem o tempo de imobilidade, e este parâmetro também pode ser utilizado para avaliação de novos agentes farmacológicos (SLATTERY e CRYAN, 2014).

Diversas classes de compostos têm sido estudadas como potenciais antidepressivos, e dentre estas os compostos orgânicos contendo selênio têm demonstrado um perfil farmacológico bastante promissor (NOGUEIRA e ROCHA, 2011). O selênio é um elemento essencial ao organismo que apresenta atividade antioxidante e também atua como neuromodulador (WANG *et al.*, 2018). Por outro lado, os benzofuranos têm sido experimentalmente testados como alternativas terapêuticas em modelos de doenças do sistema nervoso central, tais como depressão e doença de Alzheimer (RIZZO *et al.* 2008). Devido a estas propriedades, o composto 2-fenil-3-(fenilselanil)benzofurano (SeBZF), um composto híbrido apresentando em sua estrutura o átomo de selênio e o núcleo benzofurano, foi avaliado como um possível alvo farmacológico no tratamento da depressão.

2 Objetivos

Objetivo geral

- Avaliar a ação do tipo antidepressiva do SeBZF em camundongos machos, bem como investigar o envolvimento do sistema serotoninérgico e de propriedades antioxidantes para a sua ação neuroprotetora.

Objetivos específicos

- Estudar a ação do tipo antidepressiva do SeBZF através de diferentes testes comportamentais preditivos desta ação em camundongos;

- Investigar a possível contribuição do sistema serotoninérgico no efeito do tipo antidepressivo do SeBZF através das seguintes ferramentas farmacológicas: 1) uso de antagonistas dos receptores serotoninérgicos; 2) interação com um fármaco de referência com mecanismo de ação serotoninérgico; 3) dosagem da atividade da enzima MAO-A em hipocampo, e 4) bloqueio da síntese de serotonina por pCPA.

- Avaliar os possíveis efeitos protetores do SeBZF frente à indução de estresse oxidativo e inibição da atividade da Na^+/K^+ -ATPase em hipocampo de camundongos expostos a um agente depletor de serotonina;

- Realizar ensaios bioquímicos para determinação de toxicidade.

3 Revisão da literatura

Depressão

A depressão ou transtorno depressivo maior (TDM) é uma doença crônica e progressiva caracterizada por sintomas emocionais, cognitivos e físicos, que incluem tristeza, sentimento de culpa, lentidão na fala e raciocínio, falta de energia, incapacidade de concentração e alterações no padrão de sono (JESULOLA *et al.*, 2018; KATZUNG e TREVOR, 2017). De acordo com o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-5), o diagnóstico do TDM é realizado quando os pacientes exibem ao menos cinco dos sintomas característicos durante o período de duas semanas, e pelo menos um dos sintomas é humor deprimido ou perda de interesse/prazer (Tabela 1).

Tabela 1 – Sintomas da depressão.

Sintoma
Humor deprimido
Perda de interesse ou prazer
Perda ou ganho significativo de peso e apetite
Insônia ou hipersonia
Agitação ou retardo psicomotor
Fadiga ou perda de energia
Sentimentos de inutilidade ou culpa excessiva ou inapropriada
Diminuição na capacidade de concentração ou indecisão
Pensamentos recorrentes de morte ou suicídio

Fonte: DSM-5 (*American Psychiatric Association*, 2014)

Esses sintomas alteram substancialmente a qualidade de vida dos pacientes levando a uma perda considerável de produtividade, o que gera um alto ônus econômico (LAM *et al.*, 2014). Além destes sintomas característicos que podem levar à incapacidade, a depressão ainda está associada a condições secundárias, uma vez que pacientes deprimidos têm maior dificuldade em seguir o tratamento médico, o que

pode alterar outras condições de saúde já existentes, agravar seu prognóstico e/ou elevar a mortalidade relacionada a essas enfermidades (DEAN e KESHAVAN, 2017).

O TDM também pode elevar o risco para o desenvolvimento de outras doenças como, por exemplo, diabetes mellitus, doença cardíaca e acidente vascular cerebral, e ainda está associado a um aumento substancial no risco de morte por suicídio (OTTE *et al.*, 2016). O risco de suicídio em pacientes com depressão constitui um importante problema de saúde pública, uma vez que esta doença é a que mais contribui para estes óbitos, que chegam a cerca de 800.000 por ano em todo o mundo (WHO, 2017). Além disso, a depressão costuma estar acompanhada de outras condições psiquiátricas, incluindo ansiedade e distúrbios alimentares (PUCCIO *et al.*, 2016; RAPPENEAU e BÉROD, 2017).

Atualmente, estima-se que 322 milhões de pessoas apresentem o TDM em todo o mundo (WHO, 2017), sendo uma doença mais comum durante a juventude e início da idade adulta. A depressão afeta mais mulheres do que homens: aproximadamente 1 em cada 6 homens e 1 em cada 4 mulheres experimentarão pelo menos um episódio depressivo ao longo da vida. Contudo, não foi identificada uma relação socioeconômica específica, sendo uma doença que atinge indivíduos de todas as classes sociais (HILLHOUSE e PORTER, 2015).

A contribuição genética para o TDM é estimada em cerca de 35%, e o restante dos casos de desenvolvimento dessa doença está fortemente associado a fatores ambientais, como abuso sexual, físico ou emocional, especialmente durante a infância (OTTE *et al.*, 2016; SAVEANU e NEMEROFF, 2012). Fatores imunológicos, deficiência de monoaminas e alterações na neurogênese e neuroplasticidade foram identificados como mecanismos que fornecem explicações para o surgimento e progressão desse transtorno (HUANG *et al.*, 2017; MÉNARD *et al.*, 2016).

Regiões cerebrais relacionadas à regulação da memória, humor, sono, alimentação e respostas a estímulos recompensadores e adversos têm apresentado anormalidades em pacientes deprimidos (KIM, 2016). Essas regiões incluem diversas estruturas do sistema límbico, como hipocampo e amígdala, além do córtex pré-frontal (KUPFER *et al.*, 2012; PRICE e DREVETS, 2012). Destas, o hipocampo é a mais amplamente estudada quanto a seu envolvimento em mecanismos de estresse, depressão e antidepressivos. Como o hipocampo está associado ao aprendizado e à memória, consequentemente também está envolvido com o comprometimento

cognitivo apresentado por pacientes depressivos. Além disso, já foi estabelecido que o estresse crônico, um fator que pode desencadear a depressão, é capaz de induzir alterações atróficas no hipocampo podendo levar à redução de seu volume (JEON e KIM, 2016; OTTE *et al.*, 2016).

Apesar dos diversos estudos avaliando marcadores genéticos, moleculares e de neuroimagem, atualmente não existem marcadores diagnósticos objetivos e conclusivos disponíveis, tais como biópsias, biomarcadores e exames de neuroimagem. Isso acarreta tanto em limitações para o diagnóstico, que é baseado exclusivamente em observações clínicas, quanto para o desenvolvimento de modelos animais e investigações neuropatológicas mais abrangentes (KRISHNAN e NESTLER, 2011; POLLAK *et al.*, 2010).

Teoria monoaminérgica

Apesar dos avanços na compreensão da neurobiologia do TDM, nenhum dos mecanismos já descritos na literatura é capaz de explicar todos os aspectos desta doença. Dentre as teorias apresentadas para explicar este transtorno, a hipótese monoaminérgica tem sido reconhecida como um conceito central na patogênese da depressão (JEON e KIM, 2016). Sabe-se que a maioria das funções cerebrais depende da presença e ação de vários neurotransmissores, e há evidências que indicam o papel de neurotransmissores específicos no desenvolvimento e manifestação clínica da depressão. Assim, essa hipótese propõe que uma menor disponibilidade de neurotransmissores monoaminérgicos, como serotonina, norepinefrina e dopamina, resulta em prejuízos cognitivos que levam à depressão (MARATHE *et al.*, 2018; OTTE *et al.*, 2016).

O desenvolvimento da hipótese monoaminérgica ocorreu principalmente a partir do entendimento acerca do mecanismo de ação de dois fármacos: reserpina e iproiniazida (HILLHOUSE e PORTER, 2015). Nos anos 1950, observou-se que a reserpina, um fármaco utilizado para o tratamento da hipertensão arterial, induzia sintomas depressivos nos pacientes. Nos anos seguintes, estudos farmacológicos revelaram que o principal mecanismo de ação da reserpina era a inibição do armazenamento de monoaminas, esgotando as reservas destes neurotransmissores (PRYOR e SULSER, 1991). Nos anos seguintes, verificou-se que a administração de

iproniazida – um fármaco originalmente formulado para tratamento de tuberculose – causava efeitos semelhantes à euforia em alguns pacientes. O mecanismo de ação da iproniazida é a inibição da monoamina oxidase (MAO), uma enzima responsável pela degradação de monoaminas. Assim, a partir dessas observações, inferiu-se que a depressão deveria estar associada a uma diminuição da transmissão funcional dependente de monoaminas (ELHWUEGI, 2004).

Baixos níveis de dopamina e norepinefrina têm sido relacionados a diversos sintomas depressivos, incluindo alterações no comportamento motivacional, concentração e agressividade. Alterações nos níveis cerebrais de serotonina estão associadas a mudanças nas funções comportamentais e somáticas observadas na depressão, incluindo sono, apetite, libido, resposta à dor, temperatura corporal e ritmo circadiano (BERGER *et al.*, 2009; JESULOLA *et al.*, 2018). Evidências de análises cerebrais *post mortem* demonstram alterações nos níveis de serotonina e seus receptores em pacientes deprimidos em comparação aqueles não deprimidos (STOCKMEIER, 2003). Além disso, precursores da serotonina, como o L-triptofano, apresentam efeito antidepressivo leve em humanos (BECKMANN e KASPER, 1983), e uma redução na disponibilidade de triptofano está associada ao desenvolvimento da depressão (ANDERSON *et al.*, 1990).

A serotonina também tem sido estudada quanto à sua atividade antioxidante, e diversos estudos já demonstraram efeito protetor contra o estresse oxidativo (AZOUZI *et al.*, 2017; PARK *et al.*, 2002), e ação regulatória na atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase (PEÑA-RANGEL *et al.*, 1999), responsável por estabelecer o gradiente dos íons Na^+ e K^+ através da membrana (SKOU E ESMANN, 1992). A principal classe de antidepressivos que atua no metabolismo de serotonina é a dos inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRSs). Estes fármacos são considerados tratamentos de primeira linha para o TDM, e seu mecanismo de ação compreende o bloqueio do transportador de serotonina (SERT), uma proteína de membrana que transporta a serotonina da fenda sináptica para o neurônio pré-sináptico. Com o bloqueio do SERT, ocorre um aumento na concentração de serotonina extracelular, maximizando sua ação (DALE *et al.*, 2015; TACIAK *et al.*, 2018).

Além da ação no SERT, as propriedades excitatórias e inibitórias de diferentes subtipos de receptores de serotonina também apresentam participação complexa nos efeitos antidepressivos dos ISRSs (ARTIGAS, 2013; TACIAK *et al.*, 2018). Dessa

forma, esses diferentes receptores podem ser vistos como candidatos para uma nova geração de antidepressivos, que podem ser mais benéficos e eficientes do que os tradicionais. Os receptores de serotonina distribuem-se principalmente em regiões associadas com a regulação emocional e circuitos de processamento cognitivo, incluindo amígdala, hipotálamo, hipocampo e córtex pré-frontal (AMIDFAR, 2017). A desregulação desses circuitos cerebrais é uma característica marcante da depressão, conectando assim os comportamentos depressivos a alterações na transmissão serotoninérgica (NABESHIMA e KIM, 2013).

Já foram identificados pelo menos quinze receptores de serotonina, que estão divididos em sete famílias (5-HT₁₋₇) de acordo com seus mecanismos de sinalização (AMIDFAR, 2017). Destes, os receptores 5-HT₃ são os únicos tipos de receptores ionotrópicos, os demais são membros da família de receptores acoplados à proteína G (TACIAK *et al.*, 2018). A tabela 2 apresenta características referentes aos quatro subtipos de receptores de serotonina investigados neste trabalho.

Tabela 2 – Características básicas dos receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A/2C} e 5-HT₃.

Receptor	Estrutura	Tipo	Localização cerebral
5-HT _{1A}	Metabotrópico	Inibitório	Córtex cerebral, hipocampo, septo, amígdala, núcleo da rafe.
5-HT _{2A}	Metabotrópico	Excitatório	Córtex pré-frontal
5-HT _{2C}	Metabotrópico	Excitatório	Córtex pré-frontal, sistema límbico, gânglios basais
5-HT ₃	Ionotrópico	Excitatório	Áreas corticais, amígdala, tronco cerebral, hipocampo

Fonte: Amidfar *et al.*, 2017.

Contudo, existe certa resistência para a plena aceitação da hipótese monoaminérgica, especialmente pelo fato de que os medicamentos antidepressivos aumentam, de imediato, o nível de monoaminas na fenda sináptica, porém o efeito clínico só ocorre algumas semanas depois (AL-HARBI, 2012). Algumas substâncias psicoativas como cocaína e anfetaminas podem elevar os níveis de monoaminas através da interação com seus transportadores, como o SERT e o transportador de dopamina, bloqueando a recaptação de neurotransmissores sem, contudo, apresentar efeito antidepressivo (LIN *et al.*, 2011). Além disso, como os pacientes podem divergir quanto aos sintomas apresentados, a resposta aos antidepressivos é bastante

variável. Assim, a hipótese monoaminérgica revisada sugere que a depleção de monoaminas pode desempenhar um papel mais modulatório, de maneira a influenciar outros sistemas neurológicos (HILLHOUSE e PORTER, 2015).

Outras hipóteses atualmente reconhecidas que visam explicar a fisiopatologia da depressão incluem a hipótese da desregulação do eixo HPA e o aumento da secreção de citocinas pró-inflamatórias (JEON e KIM, 2016). A neurotransmissão glutamatérgica também já foi associada ao transtorno depressivo, com base na observação de que a cetamina (antagonista do receptor de glutamato N-metil D-Aspartato (NMDA) apresenta efeitos antidepressivos rápidos e persistentes (ZARATE *et al.*, 2006). Nesse sentido, o maior desafio é a inexistência de uma hipótese única que possa explicar e relacionar todos os aspectos da depressão (OTTE *et al.*, 2016).

Apesar disso, a hipótese monoaminérgica ainda é a base para os antidepressivos atualmente disponíveis (MORGESE e TRABACE, 2019), uma vez que os mesmos atuam restaurando os baixos níveis de monoaminas por meio de diferentes mecanismos de ação, através dos quais eles podem ser divididos nas seguintes classes: inibidores da MAO (IMAO), inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS), antidepressivos tricíclicos (ADT), inibidores seletivos da recaptação de serotonina e norepinefrina (ISRSN), inibidores seletivos da recaptação de dopamina (ISRD) e inibidores seletivos da recaptação de norepinefrina (ISRN) (HILLHOUSE e PORTER, 2015). Alguns exemplos de antidepressivos comumente utilizados e suas respectivas classes incluem: iproniazida e moclobemida (IMAO); fluoxetina, paroxetina e sertralina (ISRS); amitriptilina, nortriptilina e imipramina (ADT); duloxetina e venflaxina (ISRSN); bupropiona e amineptina (ISRD); reboxetina e desipramina (ISRN) (DUBOVSKY, 2018).

Tanto a psicoterapia quanto a psicofarmacologia são eficazes no tratamento da depressão, entretanto, aproximadamente 30% dos pacientes podem apresentar resistência ao tratamento, mesmo após diversas tentativas (OTTE *et al.*, 2016). Outra limitação referente a estes fármacos é o período relativamente longo para que seja observado o início dos efeitos antidepressivos (AL-HARBI, 2012). A remissão completa dos sintomas é difícil de ser alcançada, e os pacientes podem sofrer de manifestações depressivas residuais, não retornando totalmente ao seu estado funcional pré-mórbido (HUANG *et al.*, 2017; ZUCKERMAN *et al.*, 2018). Somado a isso, os efeitos adversos desses fármacos são frequentes e incluem dor de cabeça,

náusea, disfunção sexual, sedação, diminuição da acuidade mental e memória, ganho de peso e anormalidades metabólicas. Efeitos adversos mais graves incluem danos cardíacos, neurológicos e hepáticos (DODD *et al.*, 2017).

Estresse oxidativo

O estresse oxidativo tem sido associado ao desenvolvimento e progressão de diversas doenças, incluindo diabetes mellitus, câncer, aterosclerose, doença cardiovascular, doença de Alzheimer e transtornos psiquiátricos (MICHEL *et al.*, 2012; LOWE *et al.*, 2014). O termo estresse oxidativo refere-se a efeitos danosos ao organismo causados por espécies reativas, que podem ser radicais livres contendo um ou mais elétrons desemparelhados ou compostos não radicalares. Essas espécies podem ser geradas a partir de muitos elementos, porém as mais importantes ao organismo e principais contribuintes para o estresse oxidativo são aquelas gerados a partir do oxigênio, denominadas espécies reativas de oxigênio (EROs) (BETTERIDGE, 2000; BURTON e JAUNIAUX, 2011). As EROs incluem o radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxila ($OH^{\cdot}$) peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o oxigênio singleto (1O_2) (APEL e HIRT, 2004).

Em níveis moderados, as EROs são indispensáveis ao organismo, atuando como mediadores para a transferência de elétrons em diversas reações bioquímicas e participando de processos que incluem diferenciação celular, ativação de genes, apoptose e defesa contra micro-organismos (MATÉS *et al.*, 1999). Em condições normais, essas espécies são controladas pelo sistema de defesa antioxidante corporal, que pode ser dividido em enzimático e não enzimático. O sistema antioxidante enzimático compreende principalmente a atuação das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx). Essas enzimas atuam de maneira a evitar o acúmulo de $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 , catalisando a conversão destas moléculas em água e oxigênio. O sistema não enzimático é composto por pequenas moléculas que podem receber um elétron de um radical ou doar um elétron para um radical, levando à formação de subprodutos estáveis. Exemplos desse último grupo incluem vitamina E, vitamina C, flavonoides e carotenoides (HALLIWELL, 2012; YOUNG e WOODSIDE, 2001), além de elementos essenciais como selênio e zinco (BRENNEISEN *et al.*, 2005).

Quando há um desequilíbrio entre a produção de EROs e a atuação do sistema de defesa antioxidante tem-se um quadro de estresse oxidativo, ou seja, há uma superprodução de EROs e/ou insuficiência de moléculas antioxidantes (SALIM, 2014). Como consequência disso, ocorre a oxidação de componentes celulares, como ácido desoxirribonucleico (DNA), proteínas ou lipídios, o que pode levar à disfunção mitocondrial, apoptose, ativação das células gliais e neuroinflamação, que são condições relacionadas a transtornos neuropsiquiátricos, incluindo a depressão (AZOUZI *et al.*, 2017; YUSUF *et al.*, 2018).

O cérebro humano consome cerca de 20% do total de oxigênio basal para realizar suas funções neuronais que demandam extenso gasto de adenosina trifosfato (ATP), o que explica porque mesmo curtos períodos na ausência de oxigênio podem ocasionar dano cerebral (COBLEY *et al.*, 2018). Esse extenso consumo de oxigênio associado à presença de ácidos graxos poli-insaturados altamente peroxidáveis está relacionado a uma maior suscetibilidade ao estresse oxidativo, uma vez que o sistema de defesa antioxidante cerebral é limitado (MOCKING *et al.*, 2018; SALIM, 2014).

O hipocampo, a amígdala e as células granulares do cerebelo foram relatadas como as áreas cerebrais mais suscetíveis ao estresse oxidativo (WANG E MICHAELIS, 2010). Cabe ressaltar que os déficits comportamentais e cognitivos característicos do TDM estão associados a alterações em regiões cerebrais que incluem hipocampo e amígdala – além do córtex pré-frontal –, o que pode explicar porque o estresse oxidativo está tão relacionado a essa doença (SALIM *et al.*, 2017).

De maneira geral, as reações químicas envolvidas nos danos causados por radicais livres ocorrem de forma quase imediata, o que dificulta o processo de medição direta. Assim, o estresse oxidativo pode ser avaliado através de produtos formados como consequência do dano oxidativo, como a peroxidação lipídica (BETTERIDGE, 2000), que pode ser avaliada pelo método das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), onde é determinada a formação de malondialdeído (MDA) e outros produtos gerados pelo estresse oxidativo (MATÉS *et al.*, 1999).

O estresse oxidativo em pacientes com depressão já foi demonstrado através do aumento de produtos da peroxidação lipídica na corrente sanguínea, como é o caso do MDA (BILICI *et al.*, 2001), onde uma maior concentração desse marcador está associada com a gravidade dos sintomas (TALAROWSKA *et al.*, 2012). Além disso, o MDA exerce um efeito inibitório nas áreas de ligação dos receptores de

serotonina, o que estabelece uma relação entre o metabolismo da serotonina e o estresse oxidativo. Uma superprodução de EROs também pode causar a destruição dos fosfolípidios da membrana neuronal e, com isso, afetar as funções de diversos sistemas de neurotransmissão, incluindo o serotoninérgico (SCAPAGNINI *et al.*, 2012). A figura 1 apresenta um esquema demonstrando fatores relacionados ao estresse oxidativo e seu envolvimento com o TDM.

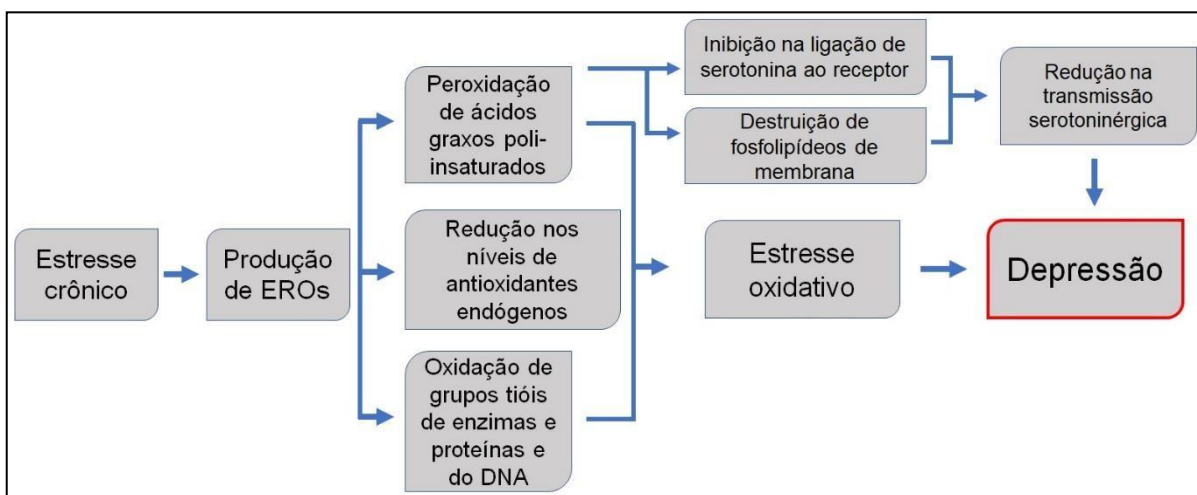


Figura 1 – Diagrama esquemático relacionando os efeitos da produção de EROs sobre o desenvolvimento da depressão.

Fonte: Adaptado de Scapagnini *et al.*, 2012.

Diversos antidepressivos já demonstraram efeitos antioxidantes em testes *in vitro*, em modelos animais e em estudos com humanos, incluindo citalopram, fluoxetina, amitriptilina e reboxetina. Estudos sobre o estresse oxidativo e os efeitos antioxidantes de antidepressivos sugerem que eles podem remover EROs, suprimindo assim o estresse oxidativo e protegendo contra danos neuronais, o que pode auxiliar na remissão e recuperação funcional dos sintomas depressivos (BEHR *et al.*, 2012).

Apesar dos grandes avanços na neurociência, o progresso no tratamento da depressão ocorreu de forma lenta nos últimos anos (SÖDERLUND E LINSKOG, 2018). Em razão disso, se faz necessária a pesquisa por fármacos antidepressivos que apresentem maior segurança e eficácia. Compostos com atividade antioxidante são alvos promissores para o tratamento do TDM, uma vez que a proteção contra EROs pode diminuir o aparecimento e progressão desta doença (MICHEL *et al.*, 2012). Nesse sentido, uma ferramenta importante é o uso de animais para a avaliação de novos alvos farmacológicos, especialmente roedores como ratos e camundongos (CASTAGNÉ *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2017).

Uso de roedores

O desenvolvimento de novos antidepressivos requer o uso de testes comportamentais de triagem em animais em uma etapa anterior a ensaios pré-clínicos ou clínicos (CASTAGNÉ *et al.*, 2011). Como a depressão é um distúrbio heterogêneo que apresenta sintomas tanto em nível fisiológico quanto psicológico e comportamental, é muito provável que alguns sintomas como culpa, tendência suicida e humor deprimido sejam características específicas de humanos (CRYAN *et al.*, 2005). Porém, alguns aspectos da depressão podem ser reproduzidos e avaliados em animais, incluindo alterações fisiológicas, endocrinológicas e neuroanatômicas, além de algumas características comportamentais (DEUSSING, 2006).

A utilização de testes comportamentais em roedores visa avaliar quantitativamente comportamentos de derrota ou desespero característicos do TDM, que são induzidos experimentalmente através de uma situação estressante, sendo assim uma ferramenta importante para investigar a etiologia da depressão, bem como no desenvolvimento de compostos eficazes para o seu tratamento (FERNANDO e ROBBINS, 2011). Os dois testes mais comumente usados para avaliação do comportamento do tipo depressivo em roedores são o teste do nado forçado (TNF) e teste de suspensão pela cauda (TSC) (SLATTERY e CRYAN, 2014). Estes testes apresentam boa validade preditiva (ou farmacológica), ou seja, os tratamentos farmacológicos e não farmacológicos usados atualmente para a depressão em humanos são capazes de modular as mudanças comportamentais observadas nos animais, e a resposta de um animal a um determinado tratamento pode prever seu efeito em humanos (SÖDERLUND e LINDSKOG, 2018).

Por razões ainda não compreendidas, os camundongos apresentam resposta ao tratamento com antidepressivos após uma única exposição em ambos os testes, o que permite a triagem rápida de novos compostos (CRYAN *et al.*, 2005; ROBINSON, 2018). Assim, o uso desses testes para a detecção de substâncias com potencial atividade antidepressiva pode ser feito de forma rápida, com baixo custo, e com resultados reprodutíveis (CASTAGNÉ *et al.*, 2011; RAMAKER e DULAWA, 2017).

Ambos protocolos são baseados na observação de que os roedores, quando submetidos a estímulos estressantes, apresentam uma reação inicial direcionada à

fuga seguida de uma postura imóvel (SLATTERY e CRYAN, 2014). No caso do TSC, o estímulo estressante envolve a suspensão pela cauda a cerca de 50 cm de altura do chão, o que causa um estresse hemodinâmico (CRYAN *et al.*, 2005), enquanto o agente estressor no TNF é um cilindro contendo água (figura 2). O comportamento natatório é mais característico de ratos do que de camundongos, por isso, o contato com a água pode ser mais aversivo para os camundongos (POLLAK *et al.*, 2010).

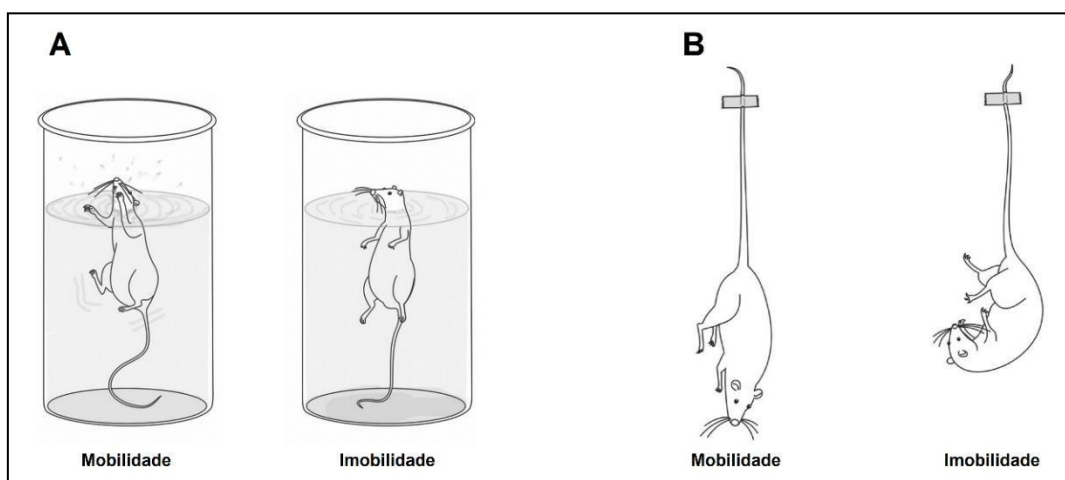


Figura 2 – Representação das respostas comportamentais no TNF e TSC (A) e TSC (B).

Fonte: Adaptado de Abelaira *et al.*, 2013.

Nestes testes, um maior período de imobilidade é interpretado como uma ação de desistência frente a uma situação estressante, sendo caracterizado como um comportamento do tipo depressivo. Essa postura de imobilidade foi originalmente descrita como desespero comportamental (PORSOLT *et al.*, 1977), uma vez que está associada a uma desistência na tentativa de escapar de uma situação adversa. Os antidepressivos clinicamente eficazes aumentam o tempo dispensado ao comportamento de fuga, ou seja, diminuem o comportamento de imobilidade, além de aumentar a latência para a imobilidade (KRISHNAN e NESTLER, 2011; WANG *et al.*, 2017). Já foi constatado que o TSC apresenta maior sensibilidade do que o TNF frente a antidepressivos da classe dos ISRSs (CASTAGNÉ *et al.*, 2011). Outra diferença é que no TNF os animais permanecem imóveis por períodos maiores que no TSC. Assim, o uso conjunto destes dois modelos comportamentais clássicos pode fornecer dados mais confiáveis para prever o efeito dos compostos testados (YAN *et al.*, 2010).

Compostos psicoestimulantes e alguns anticolinérgicos e antipsicóticos atípicos podem produzir resultados falso-positivos nestes testes. Embora já tenha sido

comprovado que estas classes podem melhorar alguns sintomas da depressão a curto prazo (CASTAGNÉ *et al.*, 2011), a avaliação da atividade locomotora é um parâmetro importante para descartar um efeito do tipo antidepressivo associado à hiperlocomução (YAN *et al.*, 2010). Nesse sentido, o teste do campo aberto (TCA) é utilizado de forma complementar ao TNF e TSC, com o objetivo de avaliar o comportamento dos roedores quanto a sua locomoção e exploração de um novo ambiente, sendo contabilizados o número de cruzamentos nos quadrantes da caixa de teste (“*crossings*”) e número de levantamentos sobre as patas posteriores (“*rearings*”) (GOULD *et al.*, 2009; WALSH e CUMMINGS, 1976).

Selênio

O selênio (Se) é um elemento químico essencial descoberto pelo químico sueco Jons Jacob Berzelius no ano de 1817. Em razão de sua baixa concentração na crosta terrestre, o selênio é considerado um elemento traço, e pode estar presente em compostos orgânicos e inorgânicos. As espécies inorgânicas incluem selênio elementar, selenetos de metais e selenatos, enquanto as orgânicas são aquelas nas quais o selênio encontra-se ligado ao carbono e ocorrem principalmente sob a forma de selenometionina e selenocisteína. Compostos orgânicos contendo selênio apresentam menor toxicidade e melhor absorção no organismo em comparação às formas inorgânicas (FOSTER E SUMAR, 1997; MEHDI *et al.*, 2013).

Durante muito tempo o selênio foi associado a efeitos tóxicos em animais e humanos. Somente em 1957, quando Schwartz e Foltz forneceram evidências de propriedades biológicas positivas do selênio em estudos com ratos, passou a existir um maior interesse pelo papel biológico deste elemento (BODNAR *et al.*, 2012). Posteriormente, com a descoberta e identificação de selenoenzimas e selenoproteínas (como a glutathione peroxidase, que atua no combate a radicais livres), foi evidenciada a importância do selênio para a saúde humana e ele foi incluído na lista de elementos essenciais (COMBS, 2015; WANG *et al.*, 2018).

A recomendação de ingestão diária de selênio é de aproximadamente 40-60 µg/dia para adultos (RAYMAN *et al.*, 2012) sendo considerado tolerável o consumo de até 400 µg/dia (WHO, 1998), enquanto uma dose entre 1540 a 1600 µg/dia pode causar toxicidade (KIELISZEK, 2019). Estima-se que uma em cada sete pessoas

tenha baixo nível de ingestão de selênio, o que está associado a diversas disfunções no organismo, incluindo doenças cardiovasculares, distúrbios inflamatórios e aumento no risco de desenvolvimento de hipertensão, câncer e depressão (BODNAR *et al.*, 2012). A deficiência de selênio também afeta o funcionamento da glândula tireoide, o que pode resultar em alterações no humor, no comportamento e em funções cognitivas (VENTURA *et al.*, 2017; KIELISZEK, 2019).

As principais fontes de selênio na dieta incluem alimentos como cereais, carnes, leite e outros derivados lácteos, peixes e nozes (RAYMAN, 2012), enquanto frutas e vegetais são caracterizados por um teor relativamente menor de selênio (FOSTER e SUMAR, 1997). Alimentos ricos em proteínas costumam apresentar níveis maiores de selênio em sua composição, porém estes níveis podem variar de uma região geográfica para outra (KIELISZEK, 2019).

Muitos compostos de selênio podem atuar como antioxidantes, convertendo EROs em compostos estáveis, além de apresentarem ação neuromoduladora em vários sistemas de neurotransmissores, como dopaminérgico, serotoninérgico e noradrenérgico, podendo influenciar na suscetibilidade ao desenvolvimento do TDM (BRENNEISEN *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2018). Considerando que compostos orgânicos contendo selênio apresentam menor toxicidade e melhor absorção pelo organismo (VENTURA *et al.*, 2017), a síntese de compostos com essas características vem sendo realizada e estes compostos têm se mostrado bastante promissores para o tratamento da depressão (HECK *et al.*, 2019; CASARIL *et al.*, 2019).

Exemplos de compostos desta classe com ação do tipo antidepressiva incluem 1-metil-3-(fenilselanil)-1H-indol (BAMPI *et al.*, 2019), 3-[(4-metoxifenil) selanil]-2-fenilimidazo[1,2-a] piridina (DOMINGUES *et al.*, 2019), 3-(4-clorofenilselanil)-1-metil-1H-indol (BIRMANN *et al.*, 2019), α -(fenilselanil) acetofenona (SOUSA *et al.*, 2018) e diseleneto de m-trifluorometil-difenil (ROSA *et al.*, 2017).

Benzofurano

Os compostos heterocíclicos contendo oxigênio, como é o caso dos benzofuranos, exibem diversas atividades farmacológicas, especialmente devido às semelhanças com muitas moléculas naturais e sintéticas com ação biológica conhecida (KHANAM e SHAMSUZZAMAN, 2015) Os benzofuranos (figura 3)

constituem o núcleo de vários produtos naturais biologicamente ativos, cujas aplicações inicialmente descobertas foram a ação antifúngica e inseticida. Essas características impulsionaram a pesquisa pelo uso medicinal de derivados sintéticos desta classe, que já foram estudados quanto a seus efeitos antioxidantes, anti-hiperglicêmicos, analgésicos, antimicrobianos e antitumorais (CHAND *et al.*, 2017). As aplicações biológicas também incluem compostos com atividade inibitória sobre o vírus da hepatite C e o vírus da imunodeficiência humana (DAWOOD, 2013).

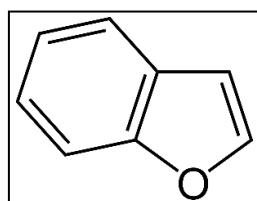


Figura 3 – Estrutura química do benzofurano.

Diversos fármacos comercializados apresentam o anel benzofurano, incluindo os de ação analgésica (nalbufina e morfina), para tratamento da tuberculose (rifampicina e rifabutina) e da doença de Alzheimer (galantamina) (NEVAGI *et al.*, 2015). Atualmente, dois antidepressivos da classe dos benzofuranos estão disponíveis comercialmente: vilazodona e citalopram. Ambos fármacos atuam na inibição da recaptação de serotonina, e constatou-se que a vilazodona também age como agonista parcial do receptor 5-HT_{1A} (DALE *et al.*, 2015; SAHLI, 2016). Além destes, vários compostos desta classe vem sendo estudados para o tratamento de diversas doenças, tais como 4,6-bis(benziloxi)-3-fenilbenzofurano (FAN *et al.*, 2019), e derivados de 2-arilbenzofuranos (MONTANARI *et al.*, 2019), de benzofurano-isatinas (GAO *et al.*, 2019) e de 2-fenilbenzofuranos (KUMAR *et al.*, 2018).

Devido às diversas propriedades relacionadas a compostos desta classe, derivados de benzofuranos têm sido sintetizados e podem representar potenciais candidatos a fármacos de ação no sistema nervoso central (RIZZO *et al.*, 2008), o que torna interessante do ponto de vista farmacológico a avaliação dos possíveis efeitos de compostos apresentando esta estrutura. Assim, o composto 2-fenil-3-(fenilselanil)benzofurano (SeBZF), que possui em sua estrutura tanto o átomo de selênio quanto o núcleo benzofurano, pode apresentar características importantes do ponto de vista farmacológico e na busca por novos compostos para o tratamento da depressão.

4 Manuscrito

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de um manuscrito científico. As seções “Materiais e Métodos”, “Resultados”, “Discussão” e “Referências” encontram-se no próprio manuscrito, que está estruturado de acordo com as normas do periódico científico para a qual foi submetido.

O item “Conclusões” encontra-se no final desta dissertação e apresenta comentários gerais sobre os resultados apresentados neste trabalho, acrescido da interpretação de alguns dados complementares.

As referências referem-se às citações que aparecem nos itens “Introdução”, “Revisão de literatura” e “Apêndices” desta dissertação.

O item “Apêndices” apresenta resultados complementares que não estão incluídos no manuscrito.

2-Phenyl-3-(phenylselanyl)benzofuran elicits antidepressant-like action by modulating serotonergic system and attenuates behavioral changes and hippocampal oxidative stress induced by serotonin depletion in mice

Jéssica Iara Gall^a, Amália Gonçalves Alves^a, Luiz Roberto Carraro Júnior^a, Taís da Silva Teixeira Rech^a, José Sebastião dos Santos Neto^b, Diego Alves^c, Mayara Sandrielly Pereira Soares^d, Luiza Spohr^d, Rosélia Maria Spanevello^d, César Augusto Brüning^{a*}, Cristiani Folharini Bortolatto^{a*}

^aPrograma de Pós-graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Laboratório de Bioquímica e Neurofarmacologia Molecular (LABIONEM), Grupo de Pesquisa em Neurobiotecnologia (GPN), Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos (CCQFA), Universidade Federal de Pelotas (UFPel), CEP 96010-900, Pelotas, RS, Brasil.

^bPrograma de Pós-graduação em Química (PPGQ), Laboratório de Síntese de Derivados de Selênio e Telúrio (LabSelen), Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, CEP 88040-900, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

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

^dPrograma de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção (PPGBBio), Laboratório de Neuroquímica, Inflamação e Câncer (NEUROCAN), Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), CEP 96010-900 Pelotas, RS, Brasil.

***Address for correspondence**

Cristiani Folharini Bortolatto - Post-Graduation Program in Biochemistry and Bioprospecting (PPGBBio), Center of Chemical, Pharmaceutical and Food Sciences (CCQFA), Federal University of Pelotas (UFPel), Capão do Leão Campus, Pelotas, RS, 96010-900, Brazil. Phone: 55-53-32757355. Electronic address: cbortolatto@gmail.com

César Augusto Brüning - Post-Graduation Program in Biochemistry and Bioprospecting (PPGBBio), Center of Chemical, Pharmaceutical and Food Sciences (CCQFA), Federal University of Pelotas (UFPel), Capão do Leão Campus, Pelotas, RS, 96010-900, Brazil. Phone: 55-53-32757355. Electronic address: cabruning@yahoo.com.br

Abstract

Depression has increased considerably worldwide, but the antidepressants currently prescribed have notable clinical limitations. The objective of this study was to investigate the antidepressant-like actions of the compound 2-phenyl-3-(phenylselanyl)benzofuran (SeBZF) in male Swiss mice focusing on the serotonergic system. Results of time- and dose-response curves in the forced swim test (FST) and tail suspension test (TST) revealed anti-immobility effects of SeBZF, with a higher sensitivity of TST. Antidepressant-like action of SeBZF (50 mg/kg, intragastric route, i.g.) was prevented by WAY100635 (selective 5-HT_{1A} receptor antagonist - 0.1 mg/kg, subcutaneous route), ketanserin (5-HT_{2A/2C} receptor antagonist - 1 mg/kg, intraperitoneal route, i.p.), and chlorophenylalaninemethyl ester (pCPA) (selective tryptophan hydroxylase inhibitor - 100 mg/kg, i.p., by 4 days), but not by ondansetron (selective 5-HT₃ receptor antagonist - 1 mg/kg, i.p.) in the TST. The administration of sub-effective doses of SeBZF (1 mg/kg, i.g.) and fluoxetine (5 mg/kg, i.p.) was effective in producing anti-immobility effects. SeBZF (50 mg/kg) did not modify hippocampal monoamine oxidase-A activity. In addition, pCPA induced oxidative stress in the hippocampus, characterized by an increase of lipoperoxidation, reduction of total thiols and stimulation of catalase activity, which was reverted by SeBZF treatment (50 mg/kg). However, hippocampal Na⁺/K⁺-ATPase activity inhibited by pCPA was not completely recovered by SeBZF treatment. Together, present findings reveal that SeBZF elicits antidepressant-like action in mice by modulating serotonergic system, especially 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A/C} receptors, in addition to a synergistic effect with fluoxetine. Furthermore, SeBZF elicits protective effects against the oxidative stress induced by pCPA in the mouse hippocampus.

Keywords: depression; selenium; benzofuran; antioxidant; 5-HT; hippocampus.

1. Introduction

Depression is a polygenic and highly complex psychiatric disorder that remains a major burden on society (Yohn et al., 2017). This disorder is characterized by affective and psychomotor symptoms as well as cognitive deficits (Perini et al., 2019). According to more recent data published by World Health Organization (WHO), the number of people affected by major depressive disorder (MDD) in the world is estimated at 322 million, and this number increased by 18.4% between 2005 and 2015. MDD is also the largest contributor to suicide cases, estimated at 800.000 per year (WHO, 2017).

The pathophysiology of MDD has not yet been fully elucidated. The most accepted theory is the monoaminergic hypothesis, which relates to the onset of MDD with a decrease in monoaminergic neurotransmitters (Marathe et al., 2018). This hypothesis is the basis for the currently available antidepressants, that act by restoring the monoamine levels through different action mechanisms (Hillhouse and Porter, 2015). However, the use of currently available antidepressants is limited by the appearance of adverse effects, pharmacological response delays, and ineffectiveness in some patients (Hillhouse and Porter, 2015). In addition to mechanisms based on monoamine levels, evidence indicates several roles for serotonin (5-HT) receptor subtypes in MDD pathogenesis as well as their interactions with antidepressant drugs, pointing out a way for the development of the new generation of antidepressants (Amidfar et al., 2018).

Alterations in other neurochemical pathways (*e.g* glutamate), neuroendocrine system, neurotrophic factors, neurogenesis, immune system, and epigenetic modifications are also part of the complex signaling networks underlying MDD disorder (Wang et al., 2017). Particularly, studies have suggested a link between depression and oxidative stress in humans (Black et al., 2015; Liu et al., 2015) or rodents (Bouvier et al., 2017). The brain is particularly vulnerable to oxidative damage due to its capacity to consume large amounts of oxygen and limited

antioxidant capacity (Cobley et al., 2018). Concerning this, Bouvier et al. (2017) demonstrated that depression vulnerability in rats exposed to intense stress condition arises from a persistent state of oxidative stress and can be reversed by antioxidants. Also, treatment with a selective 5-HT reuptake inhibitor (SSRI) or a 5-HT-norepinephrine reuptake inhibitor (SNRI) elicits protective effects against the oxidative stress through thioredoxin upregulation (Bharti et al., 2019).

Selenium-based compounds are promising candidates for depression treatment (Nogueira and Rocha, 2011). Selenium is an essential trace element and plays important physiological functions as antioxidant and neuromodulator (Wang et al., 2018). The possible relationship between depression and selenium deficiency has been investigated. Indeed, a study conducted by Conner et al. (2015) demonstrated that an optimal range of serum selenium was associated with a reduced risk of depressive symptomatology. At the same time, compounds presenting benzofuran nucleus have been experimentally tested in models of diseases of the central nervous system (CNS) (Khanam and Shamsuzzaman, 2015; Rizzo et al., 2008), including MDD (Sahli et al., 2016).

Based on the information provided, the aim of the present study was to investigate the antidepressant-like potential of the hybrid compound 2-phenyl-3-(phenylselanyl)benzofuran (SeBZF) in mice, focusing on the serotonergic system. Additionally, modulatory effects of SeBZF on hippocampal oxidative stress induced by a 5-HT-depleting agent were explored.

2. Material and methods

Animals

The experiments were carried out using male Swiss mice (25-35g) obtained from a local breeding colony. Animals were kept in a separate animal room, in controlled conditions with a constant temperature ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) and a 12 h light/dark cycle (with the light on at 6:00 a.m.) with

free access to water and food. The studies were performed in accordance with protocols approved by the Committee on Care and Use of Experimental Animal Resources at the Federal University of Pelotas, Brazil (4897-2017), affiliated to the Council for Control of Animal Experiments (CONCEA), and according to National Institutes of Health Guide for the care and use of laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978).

Chemicals

The compound 2-phenyl-3-(phenylselanyl)benzofuran (SeBZF) (Fig. 1) was synthesized and characterized in the Laboratory of Clean Organic Synthesis located at the Federal University of Pelotas employing the method previously described by Gay et al. (2010). Analysis of the ^1H nuclear magnetic resonance (NMR) and ^{13}C NMR spectra showed analytical and spectroscopic data in full agreement with its assigned structure. The chemical purity of SeBZF (99.9%) was determined by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC/MS). SeBZF was dissolved in canola oil. Fluoxetine oral solution was acquired from EMS Pharmaceuticals/Brazil and diluted in saline. All other chemicals were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA) or from other standard commercial suppliers. For all experiments, the drugs were administered to mice at a constant volume of 10 ml/kg body weight.

Experimental design

Dose- and time-response curves for SeBZF in the Forced Swim Test (FST)

Initially, behavioral experiments were performed to assess the dose-response curve of the antidepressant-like action of SeBZF in the FST. For this purpose, animals were separated into six groups (N=8-9 mice/group). Mice were treated by the intragastric (i.g.) route with SeBZF (5, 25, 50 and 100 mg/kg) or canola oil (vehicle). Fluoxetine (20 mg/kg, i.p.) was used as a positive control for antidepressant activity (Shakiba et al., 2019). Thirty min after drug

treatments, mice were submitted to the FST. The lower effective dose of SeBZF was chosen to be tested in a time-course of the antidepressant-like action. Therefore, SeBZF (50 mg/kg) was administered to mice at 15, 30 and 60 min before the FST (time-response curve). To rule out possible locomotor alterations as a result of possible psychostimulant actions, all animals also were tested in the open-field test (OFT) immediately before the FST.

Dose- and time-response curves for SeBZF in the Tail Suspension Test (TST)

To assess the dose-response curve for SeBZF in the TST, mice were divided into seven groups (N=8-9/group). Mice received SeBZF (1, 5, 25, 50 and 100 mg/kg, i.g.) or its vehicle 30 min before the TST. Again, fluoxetine (20 mg/kg, i.p.) was used as a reference antidepressant drug in this behavioral protocol (Shakiba et al., 2019). The SeBZF dose which presented antidepressant effectiveness in both behavioral tests (FST and TST) was chosen for time-course experiments. Accordingly, TST was performed at 15, 30, 60 and 120 min after SeBZF treatment (50 mg/kg, i.g.). The animals evaluated here also were tested in the open-field test (OFT) immediately before the TST.

Approaches to mechanistic studies of SeBZF antidepressant activity in mice

To investigate the possible contribution of the serotonergic system in the antidepressant-like action of SeBZF in the mice TST, different sets of behavioral experiments were initially performed from the employment of different 5-HT receptor antagonists (N = 8-10 mice/group). For this aim, mice were pretreated with ketanserin (1 mg/kg, i.p., a 5-HT_{2A/2C} receptor antagonist), WAY100635 (0.1 mg/kg, subcutaneous route, s.c., a selective 5-HT_{1A} receptor antagonist), or ondansetron (1 mg/kg, i.p., a 5-HT₃ receptor antagonist). Fifteen min later, they received SeBZF (50 mg/kg, i.g.) or its vehicle. After 30 min of SeBZF or vehicle administration,

the animals were submitted to the TST. Doses and pre-treatment time for 5-HT receptor antagonists were based in a previous study (Jesse et al., 2010).

In order to gain further support for the serotonergic hypothesis in the antidepressant-like action of SeBZF, the interaction between sub-effective doses of SeBZF and fluoxetine was investigated in the TST (N = 9 mice/group). In the first instance, a fluoxetine dose-response curve was carried out to find a sub-effective dose. For this, fluoxetine was administered at the doses of 2.5, 5, 10 and 20 mg/kg (i.p.) 30 min before the TST. To evaluate the interaction between fluoxetine and SeBZF, animals were pretreated with a sub-effective dose of fluoxetine (5 mg/kg, i.p.) or its vehicle (saline), and 10 min after received the compound at a dose sub-effective of 1 mg/kg (i.g.) or its vehicle. Thirty min later, the mice performed the TST.

In addition, the hippocampus of mice treated with vehicle or an effective dose SeBZF (50 mg/kg, i.g.), 30 and 60 min before TST, was dissected and separated for the monoamine oxidase-A (MAO-A activity) assay, which is described later (N = 8 mice/group).

Lastly, to complement the evaluation of the serotonergic system, animals were pretreated with p-chlorophenylalanine methyl ester (pCPA; 100 mg/kg, i.p) or its vehicle, once a day, for 4 consecutive days (Jesse et al., 2010). pCPA is known as a tryptophan hydroxylase inhibitor and 5-HT depleting agent. Twenty-four hours after the last pCPA injection, animals were treated with an effective dose of SeBZF (50 mg/kg, i.g.) or vehicle, and they were tested in the TST 30 min later (N =9 mice/group).

Taking into account that 1) 5-HT has modulatory effects on brain oxidative stress (Munoz-Castaneda et al., 2006) and Na^+/K^+ -ATPase activity (Hernandez, 1979; Pena-Rangel et al., 1999), 2) Na^+/K^+ -ATPase is a sulfhydryl enzyme sensitive to changes in oxidative status (including 5-HT depletion by pCPA) (Velasquez et al., 2017), and 3) the hippocampus plays an important role in emotional processing which is affected in patients with MDD (Dale et al., 2016), mice hippocampus were used for *ex vivo* experiments as lipoperoxidation and total thiol

contents, catalase (CAT) and Na^+/K^+ -ATPase activities. Given that the cholinergic system dysfunctions also have been studied in mood disorders like depression (Mineur et al., 2013), the hippocampal acetylcholinesterase (AChE) activity was also assayed. For this, animals were euthanized by isoflurane overdose after the behavioral assessments (7-8 mice/group), and their hippocampi were dissected. Hippocampal tissue was homogenized in 10 mM Tris-HCl buffer solution, pH 7.4. Homogenates were then centrifuged at $2,500 \times g$ at 4°C for 10 min and the supernatant (S_1) was separated for the assays.

Behavioral tests

Forced swim test (FST)

In this protocol originally described by Porsolt et al. (1977), each animal was placed in an open cylindrical container (10 cm in diameter and 25 cm in height), containing 19 cm of water at $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Total immobility time and latency for the first immobility episode were observed during a 6-min period. Immobility was considered when mice remained floating in the water without struggling or they made only enough movements to keep their head above the surface. This physical immobility is thought to be an indication of behavioral despair, while its reduction predicts the antidepressant activity.

Tail suspension test (TST)

TST is an alternative method in which mice are suspended by their tails 50 cm above the floor by adhesive tape placed approximately 1 cm from the tip of the tail (Steru et al., 1985). The experimental protocol was performed in an acoustically and visually isolated place. Latency time for the first immobility episode as well as total immobility time was manually recorded during 6 min. Animals were considered immobile when they ceased to perform

fugitive characteristics (hung passively) and remained immobile. Antidepressant drugs also act on this behavior, decreasing the immobility time.

Open-field test (OFT)

The OFT is a common measure of exploratory behavior and general activity in rodents. OFT was performed immediately before FST or TST according to the protocol of Walsh and Cummins (1976) with the aim of excluding possible sedative/stimulating activities or motor abnormalities. For this, mice were placed individually in the center of a box ($30 \times 30 \times 15$ cm) divided into nine quadrants and observed during 4 min. The total number of crossings and rearings were recorded. All animals tested in the FST or TST were also submitted to OFT.

***Ex vivo* experiments**

Monoamine oxidase-A (MAO-A) activity

For hippocampal MAO-A activity assay, a mitochondrial preparation was obtained by differential centrifugation as described by Soto-Otero et al. (2001). Briefly, hippocampi (both hemispheres) were homogenized with four volumes of the isolation medium (pH 7.4, $\text{Na}_2\text{PO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ isotonized with sucrose). Then, the homogenate was centrifuged at $900 \times g$ at 4°C for 5 min. The supernatant fraction (S_1) was centrifuged at $12,500 \times g$ for 15 min. Mitochondria pellet (P_1) was resuspended with isolation medium and recentrifuged under the same conditions. The final mitochondrial pellet (P_2) was carefully resuspended in a buffer solution ($\text{Na}_2\text{PO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ isotonized with KCl, pH 7.4). The protein content of each sample was adjusted with buffer solution to 1 mg/ml by the Bradford method (Bradford, 1976). The samples were stored at -80°C until the assay was performed.

MAO activity was assayed as described by Krajl (1965) with some modifications. Aliquots of samples were incubated at 37°C for 5 min in a medium containing buffer solution

(Na₂PO₄/KH₂PO₄ isotonized with KCl, pH 7.4) and pargyline (a specific MAO-B inhibitor, 250 nM) at a final volume of 600 µL. Then, kynuramine dihydrobromide was added to the reaction mixture as a substrate (final concentration: 90 µM). Samples were incubated at 37°C for 30 min. After incubation, the reaction was stopped by adding 10 % trichloroacetic acid (TCA). After refrigerated centrifugation at 3000 ×g for 15 min, an aliquot of the supernatant was added to 1 M NaOH solution. The fluorescence intensity was detected spectrofluorimetrically with excitation at 315 nm and emission at 380 nm. The concentration of 4-hydroxyquinoline formed was estimated from a standard fluorescence curve. MAO-A activity was expressed as nmol 4-hydroxyquinoline/mg protein/min.

Lipoperoxidation assay

Determination of the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in the hippocampus was used as an index for lipoperoxidation as described by Esterbauer and Cheeseman (1990). In this methodology, hippocampal S₁ were mixed with 15% trichloroacetic acid (TCA) and 0.67% thiobarbituric acid (TBA), followed by heating at 100°C for 30 min. Absorbance was measured at 532 nm and the results were expressed as nmol TBARS/mg of protein. Protein content was determined by the Lowry method (Lowry et al., 1951).

Total thiol content

The total level of thiol groups in hippocampal S₁ was measured by 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) method as described by Aksenov and Markesbery (2001). This method is based on the reduction of DTNB by thiols, followed by oxidation generating a yellow derivative (TNB). In this test, tissue homogenates were mixed with PBS–EDTA (1 mM), pH 7.4; and DTNB (10 mM) was added to start the reaction. Samples were incubated for 60 min at room temperature, and the absorbance was measured at 412 nm. Results were expressed as

nmol TNB/mg of protein. Protein content was determined by the Lowry method (Lowry et al., 1951).

Catalase (CAT) activity

The CAT activity was determined spectrophotometrically in hippocampal S₁ according to the method previously described by Aebi (1984). This assay is based on the ability of CAT to decompose hydrogen peroxide (H₂O₂), involving then monitoring the disappearance of H₂O₂ in the S₁ presence. For this assay, a reaction medium containing potassium phosphate buffer 10 mM (pH 7.0) and H₂O₂ was used. The absorbance was measured at 240 nm, and results were expressed as units/mg of protein (one Unit decomposes 1 mol of H₂O₂ per min at pH 7 at 25°C). Protein content was determined by the Lowry method (Lowry et al., 1951).

Na⁺/K⁺-ATPase activity

Hippocampal Na⁺/K⁺-ATPase activity was determined according to the methodology described by Carvalho et al. (2012). S₁ was mixed with 6 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.1 mM EDTA and 30 mM Tris-HCl (pH 7.4). The samples were incubated for 10 min at 37°C, and the reaction was started with the addition of 3 mM ATP, followed by incubation for 30 min. Control experiments were carried with the addition of 1 mM ouabain. Released inorganic phosphate (Pi) was measured using the malachite green method, as described by Chan et al. (1986). Protein content was determined by the Bradford method (Bradford, 1976). Na⁺/K⁺-ATPase activity was expressed as pg Pi/mg protein/min.

Acetylcholinesterase (AChE) activity

AChE activity was determined in hippocampus according to the methodology described by Ellman et al. (1961). S₁ was mixed with 10 mM 5,5'-dithiobis-acid-nitrobenzoic (DTNB)

and 100 mM phosphate buffer (pH 7.5), followed by incubation for 2 min at 27 °C. After incubation, 8 mM acetylthiocholine (AcSCh) was added. The absorbance was measured at 412 nm for 2 min at 27°C. Protein content was determined by Bradford method (Bradford, 1976). AChE activity was expressed as $\mu\text{mol AcSCh/h/mg}$ of protein.

2.6 Statistical analysis

Statistical analysis was performed by GraphPad Prism software version 7.04. D'Agostino-Pearson normality test was used to test if the data are normally distributed. Comparisons among the experimental groups for parametric data were performed using one-way or two-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Newman-Keuls *post hoc* test. In two-way ANOVA, the main effects are presented only when there is no interaction between treatments. For non-parametric data, Kruskal-Wallis followed by the Dunn's *post hoc* test was applied. When only two groups were statistically compared, an unpaired-*t* test was chosen. Parametric results are expressed as the mean $\pm$ standard error of the mean (S.E.M.), and non-parametric results as median with interquartile range. Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$.

3. Results

Antidepressant-like action of SeBZF in mice submitted to FST

Examining the dose-response curve for SeBZF, one-way ANOVA revealed that the treatment of mice with the compound at the doses of 50 and 100 mg/kg caused antidepressant-like effects in the FST, as evidenced by an increase in the latency for the first episode of immobility [$F_{(4,37)} = 9.35$, $p < 0.0001$] (Fig. 2A) and a reduction in the total immobility time [$F_{(4,37)} = 9.06$, $p < 0.0001$] (Fig. 2B). As expected, fluoxetine (20 mg/kg; positive control) also had anti-immobility properties [unpaired *t*-test, latency time: $t = 5.35$, $df = 15$, $p < 0.0001$;

immobility time: $t = 5.10$, $df = 15$, $p = 0.0001$] (Fig. 2A and 2B). In a time-response curve, Kruskal-Wallis test showed that SeBZF (50 mg/kg) significantly increased the latency to reach the first immobility episode (Fig. 2C) [$H = 11.69$; $p = 0.0085$] and decreased the time spent immobile (Fig. 2D) [$H = 12.38$; $p = 0.0062$] only when administered 30 min prior to the test. A tendency in increasing the latency time (around 28%) was observed in 15 min of SeBZF pre-treatment; however, it did not reach statistical significance (Fig. 2C). SeBZF, at all the tested conditions, did not alter the locomotor activity of mice ($p > 0.05$; data not shown).

Antidepressant-like action of SeBZF in mice submitted to TST

In a dose-response curve for SeBZF in the TST, one-way ANOVA analyses demonstrated that SeBZF increased the latency for the first episode immobility [$F_{(5,46)} = 14.36$, $p < 0.0001$] (Fig. 3A) and reduced the immobility time [$F_{(5,46)} = 10.4$, $p < 0.0001$] (Fig. 3B) at doses of 5, 25, 50 and 100 mg/kg. The anti-immobility effects were observed at 30 and 60 min after treatment with SeBZF at dose of 50 mg/kg, as shown by the latency time [$F_{(4,44)} = 20.47$, $p < 0.0001$] (Fig. 3C) and total immobility time [$F_{(4,44)} = 7.193$, $p = 0.0002$] (Fig. 3D). As foreseen, fluoxetine (20 mg/kg) caused antidepressant-like actions in the TST [unpaired t -test, latency time: $t = 9.10$, $df = 16$, $p < 0.0001$; immobility time: $t = 6.38$, $df = 16$, $p < 0.0001$] (Fig. 3A and 3B).

The statistical analyses of OFT data demonstrated that SeBZF did not cause changes in the number of crossings [$F_{(5,46)} = 2.96$, $p = 0.0212$] (Fig. 4A) and rearings [$F_{(5,46)} = 0.80$, $p = 0.5534$] (Fig. 4B) at all the doses tested. In addition, SeBZF did not alter the number of crossings [$F_{(4,44)} = 0.14$; $p = 0.9641$] (Fig. 4C) and rearings [$F_{(4,44)} = 1.04$, $P = 0.3960$] (Fig. 4D) when evaluating different time intervals of treatment. Fluoxetine did not modify the crossing number [unpaired t -test, $t = 0.31$, $df = 16$, $p = 0.7546$], but caused a decrease in the number of rearings [unpaired t -test, $t = 2.18$, $df = 16$, $p = 0.0442$] (Fig. 4A and B, respectively).

Effects of 5-HT receptor antagonists on the anti-immobility properties of SeBZF in the TST

The results of the experiments designed to investigate the involvement of different 5-HT receptors in the antidepressant-like action of SeBZF can be seen in Fig. 5. Two-way ANOVA test revealed a significant interaction between WAY100635 and SeBZF treatments when the latency time for the first episode immobility was analyzed [$F_{(1,28)} = 13.65$, $p = 0.0009$]. In addition, main effects of SeBZF [$F_{(1,28)} = 7.338$, $p = 0.0114$] and WAY100635 [$F_{(1,28)} = 12.72$; $p = 0.0013$] treatments were obtained in the total immobility time analysis. *Post-hoc* comparisons demonstrated that the pre-treatment of mice with WAY100635 (5-HT_{1A} receptor antagonist) blocked the anti-immobility effects of an effective dose of SeBZF (50 mg/kg) in the TST (Fig. 5A and 5B). The number of crossings and rearings in the OFT remained unaltered by the treatments ($p > 0.05$; Table 1).

In another set of experiments, two-way ANOVA test demonstrated a significant interaction between ketanserin and SeBZF treatments for the latency time [$F_{(1,35)} = 28.37$, $p < 0.0001$] and total immobility time [$F_{(1,35)} = 13.65$, $p = 0.0009$]. *Post-hoc* comparisons showed that the increase of the latency time (Fig 5C) and the reduction of total immobility time (Fig. 5D) caused by SeBZF in the TST were avoided by the pre-treatment of animals with ketanserin (5-HT_{2A/2C} receptor antagonist). The number of crossings in the OFT did not differ among the experimental groups ($p > 0.05$; table 1). A main effect of ketanserin treatment was found for rearing statistical analysis [$F_{(1,35)} = 21.37$, $p < 0.0001$], and *post hoc* comparisons revealed that ketanserin group had a decrease of rearing episodes when compared with the control group.

In parallel, two-way ANOVA revealed a main effect of SeBZF treatment when the latency time [$F_{(1,34)} = 83.75$, $p < 0.0001$] and total immobility time [$F_{(1,34)} = 46.55$, $p < 0.0001$] were evaluated in a TST experiment using ondansetron as 5-HT₃ receptor antagonist. SeBZF

elicited anti-immobility effects, but the pre-treatment of mice with ondansetron was ineffective in blocking these effects (Fig. 5E and F). In the OFT, no significant effects of tested treatments were found on locomotor activity ($P > 0.05$; table 1).

Behavioral effects resulting from a combination of sub-effective doses of SeBZF and fluoxetine in the mice TST

The results depicted in Fig. 6A and B represent a dose-response curve for fluoxetine (SSRI antidepressant drug) in the TST. As revealed by one-way ANOVA analyses, a longer latency to first immobility [$F_{(4,40)} = 26.47$, $p < 0.0001$] (Fig 6A) and a reduced immobility time [$F_{(4,40)} = 6.38$, $p = 0.0005$] (Fig. 6B) were verified in mice that received fluoxetine at the doses of 10 and 20 mg/kg. In the OFT, the locomotor activity of animals remained unaltered (data not shown).

The effects of the administration of sub-effective doses of fluoxetine (5 mg/kg) and SeBZF (1 mg/kg) are demonstrated in Fig. 6C and D. Two-way ANOVA revealed a significant fluoxetine x SeBZF interaction for the latency time [$F_{(1,32)} = 8.04$, $P = 0.0079$] and total immobility time [$F_{(1,32)} = 4.55$, $p = 0.0406$]. *Post hoc* analyses demonstrated that the combination of sub-effective doses of fluoxetine and SeBZF was effective in increasing the latency time for the first immobility posture as well as reducing the total immobility time in the TST. No significant changes were observed in the number of crossings and rearings of experimental groups (Table 1).

Hippocampal MAO-A activity

Results about MAO-A activity assay in the hippocampus of mice treated with SeBZF (50 mg/kg) are shown in Fig 7. Unpaired *t*-test revealed no statistical differences between the

control and SeBZF group for hippocampal MAO-A activity when 30 min [$t = 0.65$, $df = 14$, $p = 0.5213$] and 60 min [$t = 1.20$, $df = 14$, $p = 0.2473$] time points were tested.

Behavioral effects resulting from pCPA injections on the anti-immobility properties of SeBZF in the mice TST

Fig. 8 shows the experimental protocol designed to evaluate the impact of the brain 5-HT depletion by pCPA in mice treated with SeBZF (Fig. 8A) and the behavioral assessments in the TST (8B and C). Two-way ANOVA demonstrated significant main effects of SeBZF [$F_{(1,32)} = 40.04$, $p < 0.0001$] and pCPA [$F_{(1,32)} = 10.8$, $p = 0.0025$] treatments on latency time; it also demonstrated a significant pCPA x SeBZF interaction when the total immobility time was examined [$F_{(1,32)} = 7.19$, $p = 0.0115$]. *Post hoc* comparisons indicated that pre-treatment with pCPA during the four-day period blocked the anti-immobility effects of SeBZF in the TST (Fig. 8B and C). In the OFT, none of the treatments altered the locomotor activity (table 1).

Effects of SeBZF treatment on hippocampal oxidative stress induced by pCPA

Fig. 9 illustrates the effects of SeBZF treatment (50 mg/kg) on lipoperoxidation levels, total thiol content, CAT, Na^+/K^+ -ATPase and AChE activities in the hippocampus of mice exposed to pCPA. Two-way ANOVA revealed significant pCPA x SeBZF interactions for hippocampal lipoperoxidation levels [$F_{(1,26)} = 6.31$, $p = 0.0185$] and total thiol content [$F_{(1,26)} = 11.34$, $p = 0.0024$]. *Post hoc* comparisons demonstrated that pCPA exposure caused an increase of hippocampal TBARS levels (Fig. 9A) accompanied by a reduction of total thiols (Fig 9B). The treatment with SeBZF was effective in avoiding these changes ($p < 0.05$ and $p < 0.001$, respectively).

In addition, two-way ANOVA analysis demonstrated significant main effects of SeBZF [$F_{(1,26)} = 8.41$, $p = 0.0075$] and pCPA [$F_{(1,26)} = 5.89$, $p = 0.0224$] treatments for hippocampal

CAT activity (Fig. 9C). As revealed by *post hoc* tests, animals that received pCPA injections presented a stimulation of the hippocampal CAT activity, which was reversed by the SeBZF treatment ($p < 0.01$).

In hippocampal Na^+/K^+ -ATPase activity analysis, two-way ANOVA indicated a main effect of pCPA [$F_{(1,26)} = 6.65$, $p = 0.0159$]. The exposure to pCPA resulted in inhibition of the Na^+/K^+ -ATPase activity, but the SeBZF treatment failed to recover the enzyme activity to the control levels ($p > 0.05$). Lastly, neither pCPA nor SeBZF altered AChE activity (Fig. 9E) in the hippocampus of mice submitted to the present protocol ($p > 0.05$).

4. Discussion

Depression is a common mental disorder and the leading cause of disability worldwide affecting individuals of all ages, races and socioeconomic groups (WHO, 2017). Different medications are available but in addition to adverse effects, a large subset of patients is resistant to current antidepressant therapies, which drives the search for new drugs. The present study demonstrated, for the first time, the antidepressant-like action of SeBZF in mice. In addition, pharmacological tools suggest the involvement of the serotonergic system in the anti-immobility effects of SeBZF in TST. Equally important, hippocampal oxidative stress resulting from the exposure of mice to a 5-HT-depleting substance was attenuated by SeBZF treatment.

The development of new antidepressants involves simple behavioral tests as FST and TST for initial screening before more complex studies (Castagne et al., 2011). The antidepressant actions of drugs, including conventional antidepressants, are reflected in these tests by a reduction of the immobility when rodents are exposed to an inescapable situation (Castagne et al., 2011; Porsolt et al., 1977; Steru et al., 1985). In the present study, oral administration of SeBZF was effective in producing antidepressant-like actions in mice. Our results also demonstrated that lower doses of SeBZF (5 and 25 mg/kg) were needed to provoke

anti-immobility effects in the TST if compared with FST (50 mg/kg). These results are in accordance with literature findings which point to the higher TST sensitivity (Cryan et al., 2005; Velasquez et al., 2017), mainly for SSRI activity detection. Based on this information, we opted for TST and a dose of SeBZF with pronouncing anti-immobility effects for additional experiments (50 mg/kg – effective in both tests). Fluoxetine (20 mg/kg), an antidepressant of the SSRI class, evoked antidepressant-like actions, validating our behavioral trials. It is also important to note that SeBZF did not cause significant changes in overall locomotor activity, ruling out false-positive findings.

Here, the selenium atom was inserted into a molecule containing the benzofuran nucleus to obtain a hybrid compound. With respect to this, synthetic and natural compounds which contain benzofuran moiety elicit potential applications as pharmacological agents, some of them aiming to modulate brain pathways (Asif, 2016). Due to antioxidant effects, evidence indicates that introducing selenium in some molecules could enhance their pharmacological effects. Organoselenium compounds have been highlighted by antioxidant, neuroprotective and antidepressant activities in preclinical models (Bortolatto et al., 2012; Gai et al., 2014; Nogueira and Rocha, 2011). Indeed, due to the high lipophilicity of these compounds, the brain is described as a target tissue for their biological activities (Nogueira and Rocha, 2011; Prigol et al., 2012).

Depression treatment is based primarily on drugs that act on the monoaminergic system, especially on the serotonergic route (Morgese and Trabace, 2019; Taciak et al., 2018). Using 5-HT receptor antagonists as a pharmacological tool, our data indicated that the pre-treatment of mice with WAY100635 and ketanserin blocked the anti-immobility effects of SeBZF in the TST, suggesting that its antidepressant-like action may be mediated through an interaction with the serotonergic system, especially mediated by 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} or 5-HT_{2C} receptors. The postsynaptic 5-HT_{1A} receptor mediates responses to released 5-HT in several brain areas

including the hippocampus and has a critical role in the behavioral response to antidepressants (Yohn et al., 2017). In addition, alterations in 5-HT₂ receptor densities are likely a part of adaptive neuronal changes that occur after chronic administration of fluoxetine and may be related to its antidepressant effect (Hrdina and Vu, 1993). On the other hand, the anti-immobility effects of SeBZF were not abolished by ondansetron indicating that its pharmacological action in the TST is independent of 5-HT₃ receptor modulation.

Some compounds bearing the benzofuran nucleus also have their actions mediated by 5-HT receptors, as 5-(2-aminopropyl)benzofuran (5-APB) and 6-(2-aminopropyl)benzofuran (6-APB), that act as 5-HT_{2C} receptor agonists and vilazodone, an antidepressant of the SSRI class and 5-HT_{1A} receptor partial agonist (Asif, 2016). At the same time, evidence suggests that antidepressant action of selenium-based compounds can be mediated by interaction with different 5-HT receptors and inhibition of MAO-A activity or 5-HT uptake (Gai et al., 2014; Nogueira and Rocha, 2011). Further insights into therapeutic actions of SeBZF via serotonergic modulation were obtained from an experiment designed to investigate the effects of the interaction of sub-effective doses of SeBZF (1 mg/kg) and fluoxetine (5 mg/kg). As a result, we found a synergistic effect of SeBZF and fluoxetine administrations, evidenced by significant anti-immobility effects in the TST. The action mechanism of fluoxetine involves the serotonergic system through the presynaptic inhibition of the 5-HT reuptake transporter, causing an increase in 5-HT concentration in the synaptic cleft (Bharti et al., 2019). It is possible that SeBZF and fluoxetine may have similar action mechanisms. Besides, SeBZF could be useful as an antidepressant action enhancer, especially when adverse effects are present.

MAOs are flavoenzymes that catalyze the oxidation of monoamines; their aberrant expression or activation underlies the pathogenesis of monoamine neurotransmitter disorders, including neuropsychiatric diseases (Shi et al., 2019). Selective MAO-A inhibition produces increased levels of NA and 5-HT and a clinical antidepressant action (Velasquez et al., 2017).

In addition, the hippocampus is a well-studied brain structure implicated in the pathophysiology and development of depression (Belleau et al., 2019). Here, administration of a dose able to produce an antidepressant-like effect (50 mg/kg) did not affect hippocampal MAO-A activity, which leads us to believe that the action mechanisms of SeBZF are not related with inhibitory effects on enzymatic 5-HT degradation pathway.

The role of the serotonergic system in the antidepressant-like action of SeBZF in mice was further investigated through a 5-HT-depleting agent. pCPA, a tryptophan hydroxylase inhibitor, suppresses the 5-HT synthesis disrupting neurotransmitter signaling (Koe and Weissman, 1966). In this study, pCPA exposure at a dose known to lower 5-HT concentrations reversed the anti-immobility effects of SeBZF, suggesting that the presence of central 5-HT is essential for the pharmacological action of the compound. The absence of *per se* effects of pCPA suggests that 5-HT depletion does not precipitate depressive symptoms in healthy animals but blocks the antidepressant effect of serotonergic drugs (O'Leary et al., 2007).

It is noteworthy that 5-HT has powerful antioxidant properties (Azouzi et al., 2017) whereas the reduction of 5-HT concentration by pCPA induces neurotoxic effects accompanied by oxidative stress in brain tissue of rodents (Munoz-Castaneda et al., 2006). A link between 5-HT metabolism and oxidative stress has been reported in animals and humans. ROS may modulate the levels and activity of monoamines whilst depression is associated with lowered concentrations of endogenous antioxidants. Beyond that, MDA exerts inhibitory action on the ligand binding areas of the 5-HT receptor, and ROS may destroy neuronal membrane phospholipids affecting monoaminergic receptor functions (Scapagnini et al., 2012). Indeed, oxidative damage negatively impacts CNS functions and is involved in many neurotoxicity mechanisms (Salim, 2017). Brain structures as hippocampus and amygdala are reported to be the most susceptible to oxidative stress and are involved in characteristic changes of depression (Salim, 2017). Our results demonstrated that pCPA triggered hippocampal oxidative stress by

increasing the lipoperoxidation and altering the antioxidant response as indicated by reduced thiol content and stimulation of CAT activity.

CNS is especially susceptible to lipoperoxidation due to the large amounts of highly peroxidizable fatty acids (Cobley et al., 2018). On the other hand, thiols present in peptides and proteins are vulnerable to oxidation, which can cause changes in protein structure and function (Ying et al., 2007). Here, stimulation of CAT activity by pCPA could represent a way to compensate the higher RS levels through a regulatory mechanism. Corroborating our data, Munoz-Castaneda et al. (2006) showed that rats injected with pCPA display raised brain MDA levels, reduced GSH content, and perturbations of antioxidant enzyme activities. Furthermore, a previous study demonstrated that 5-HT deficiency by pCPA or Tph2 knockout (Tph2^{-/-}) animals resulted in increased oxidative markers as well as antioxidant defense changes by analyzing serum and brain of mice (Weng et al., 2015). Interestingly, SeBZF administration was effective in protecting against hippocampal oxidative stress in mice exposed to pCPA. The protection against the oxidative damage could represent an additional mechanism related with antidepressant-like actions of SeBZF.

5-HT has also been linked to the regulation of Na⁺/K⁺-ATPase activity (Pena-Rangel et al., 1999), an enzyme responsible for maintaining the Na⁺ and K⁺ gradients containing oxidizable sulfhydryl groups. Additionally, 5-HT precursors are able to increase Na⁺/K⁺-ATPase activity in rats (Hernandez, 1979). In this study, pCPA exposure inhibited hippocampal Na⁺/K⁺-ATPase activity, which can be explained by an oxidative status in the presence of low 5-HT concentrations. Although no statistical differences had been detected, it is possible to see a tendency of SeBZF in normalizing the Na⁺/K⁺-ATPase activity in those animals exposed to pCPA. Given that the cholinergic system dysfunctions also are studied in mood disorders like depression (Mineur et al., 2013), AChE activity assessed here. However, pCPA did not cause

changes in AChE activity, suggesting that the neurotoxic effects of pCPA did not affect the cholinergic system.

5. Conclusion

In conclusion, SeBZF exerts antidepressant-like actions in mice by modulating serotonergic system, especially 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A/C} receptors, and produces synergistic effects with fluoxetine. Furthermore, SeBZF elicits protective effects against hippocampal oxidative stress induced by pCPA, a 5-HT-depleting agent. Thus, studies focusing on SeBZF actions could contribute to the development of new effective and safe treatments for MDD, but more studies are necessary to better explain the mechanisms implicated in the antidepressant-like actions of this compound.

Conflicts of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/PROAP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, grant numbers 438384/2018-0 and 420386/2018-1) for the financial support. A.G.A. is the recipient of a FAPERGS fellowship and T.S.T.R. was the recipient of a CAPES fellowship. We are particularly grateful for the assistance given by Cristina W. Nogueira.

References

- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105, 121-126.
- Aksenov, M. Y., Markesbery, W. R., 2001. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 302, 141-145.
- Amidfar, M., Colic, L., Walter, M., Kim, Y. K., 2018. Complex Role of the Serotonin Receptors in Depression: Implications for Treatment. Springer, Singapore In: Kim YK. (eds) *Understanding Depression*, 83-95.
- Asif, M., 2016. Mini Review on Important Biological Properties of Benzofuran Derivatives. *Journal of Analytical & Pharmaceutical Research* 3, 00050.
- Azouzi, S., Santuz, H., Morandat, S., Pereira, C., Cote, F., Hermine, O., El Kirat, K., Colin, Y., Le Van Kim, C., Etchebest, C., Amireault, P., 2017. Antioxidant and Membrane Binding Properties of Serotonin Protect Lipids from Oxidation. *Biophys J* 112, 1863-1873.
- Belleau, E. L., Treadway, M. T., Pizzagalli, D. A., 2019. The Impact of Stress and Major Depressive Disorder on Hippocampal and Medial Prefrontal Cortex Morphology. *Biol Psychiatry* 85, 443-453.
- Bharti, V., Tan, H., Deol, J., Wu, Z., Wang, J. F., 2019. Upregulation of antioxidant thioredoxin by antidepressants fluoxetine and venlafaxine. *Psychopharmacology (Berl)*.
- Black, C. N., Bot, M., Scheffer, P. G., Cuijpers, P., Penninx, B. W., 2015. Is depression associated with increased oxidative stress? A systematic review and meta-analysis. *Psychoneuroendocrinology* 51, 164-175.
- Bortolatto, C. F., Wilhelm, E. A., Chagas, P. M., Nogueira, C. W., 2012. p-Chlorodiphenyl diselenide, an organoselenium compound, with antidepressant-like and memory enhancer actions in aging male rats. *Biogerontology* 13, 237-249.
- Bouvier, E., Brouillard, F., Molet, J., Claverie, D., Cabungcal, J. H., Cresto, N., Doligez, N., Rivat, C., Do, K. Q., Bernard, C., Benoliel, J. J., Becker, C., 2017. Nrf2-dependent persistent oxidative stress results in stress-induced vulnerability to depression. *Mol Psychiatry* 22, 1701-1713.
- Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Carvalho, F. B., Mello, C. F., Marisco, P. C., Tonello, R., Girardi, B. A., Ferreira, J., Oliveira, M. S., Rubin, M. A., 2012. Spermidine decreases Na(+),K(+)-ATPase activity through NMDA receptor and protein kinase G activation in the hippocampus of rats. *Eur J Pharmacol* 684, 79-86.
- Castagne, V., Moser, P., Roux, S., Porsolt, R. D., 2011. Rodent models of depression: forced swim and tail suspension behavioral despair tests in rats and mice. *Curr Protoc Neurosci* Chapter 8, Unit 8 10A.
- Cobley, J. N., Fiorello, M. L., Bailey, D. M., 2018. 13 reasons why the brain is susceptible to oxidative stress. *Redox Biol* 15, 490-503.
- Conner, T. S., Richardson, A. C., Miller, J. C., 2015. Optimal serum selenium concentrations are associated with lower depressive symptoms and negative mood among young adults. *J Nutr* 145, 59-65.
- Cryan, J. F., Mombereau, C., Vassout, A., 2005. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice. *Neurosci Biobehav Rev* 29, 571-625.
- Dale, E., Pehrson, A. L., Jeyarajah, T., Li, Y., Leiser, S. C., Smagin, G., Olsen, C. K., Sanchez, C., 2016. Effects of serotonin in the hippocampus: how SSRIs and multimodal antidepressants might regulate pyramidal cell function. *CNS Spectr* 21, 143-161.

- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., Jr., Feather-Stone, R. M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 7, 88-95.
- Esterbauer, H., Cheeseman, K. H., 1990. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol* 186, 407-421.
- Gai, B. M., Bortolatto, C. F., Heck, S. O., Stein, A. L., Duarte, M. M., Zeni, G., Nogueira, C. W., 2014. An organoselenium compound improves behavioral, endocrinal and neurochemical changes induced by corticosterone in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 231, 2119-2130.
- Gay, R. M., Manarin, F., Schneider, C. C., Barancelli, D. A., Costa, M. D., Zeni, G., 2010. FeCl(3)-Diorganyl dichalcogenides promoted cyclization of 2-alkynylanisoles to 3-chalcogen benzo[b]furans. *J Org Chem* 75, 5701-5706.
- Hernandez, R. J., 1979. Na⁺-K⁺-ATPase activity in the brain cortex of rats ontogenetically malnourished, and treated with serotonin precursors. *Brain Res* 162, 348-352.
- Hillhouse, T. M., Porter, J. H., 2015. A brief history of the development of antidepressant drugs: from monoamines to glutamate. *Exp Clin Psychopharmacol* 23, 1-21.
- Hrdina, P. D., Vu, T. B., 1993. Chronic fluoxetine treatment upregulates 5-HT uptake sites and 5-HT₂ receptors in rat brain: an autoradiographic study. *Synapse* 14, 324-331.
- Jesse, C. R., Wilhelm, E. A., Bortolatto, C. F., Nogueira, C. W., 2010. Evidence for the involvement of the serotonergic 5-HT_{2A/C} and 5-HT₃ receptors in the antidepressant-like effect caused by oral administration of bis selenide in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 34, 294-302.
- Khanam, H., Shamsuzzaman, 2015. Bioactive Benzofuran derivatives: A review. *Eur J Med Chem* 97, 483-504.
- Koe, B. K., Weissman, A., 1966. p-Chlorophenylalanine: a specific depletor of brain serotonin. *J Pharmacol Exp Ther* 154, 499-516.
- Krajl, M., 1965. A rapid microfluorimetric determination of monoamine oxidase. *Biochem Pharmacol* 14, 1684-1686.
- Liu, T., Zhong, S., Liao, X., Chen, J., He, T., Lai, S., Jia, Y., 2015. A Meta-Analysis of Oxidative Stress Markers in Depression. *PLoS One* 10, e0138904.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275.
- Marathe, S. V., D'Almeida P, L., Virmani, G., Bathini, P., Alberi, L., 2018. Effects of Monoamines and Antidepressants on Astrocyte Physiology: Implications for Monoamine Hypothesis of Depression. *J Exp Neurosci* 12, 1179069518789149.
- Mineur, Y. S., Obayemi, A., Wigstrand, M. B., Fote, G. M., Calarco, C. A., Li, A. M., Picciotto, M. R., 2013. Cholinergic signaling in the hippocampus regulates social stress resilience and anxiety- and depression-like behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 3573-3578.
- Morgese, M. G., Trabace, L., 2019. Monoaminergic System Modulation in Depression and Alzheimer's Disease: A New Standpoint? *Front Pharmacol* 10, 483.
- Munoz-Castaneda, J. R., Montilla, P., Padillo, F. J., Bujalance, I., Munoz, M. C., Muntane, J., Tunez, I., 2006. Role of serotonin in cerebral oxidative stress in rats. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 66, 1-6.
- Nogueira, C. W., Rocha, J. B., 2011. Toxicology and pharmacology of selenium: emphasis on synthetic organoselenium compounds. *Arch Toxicol* 85, 1313-1359.
- O'Leary, O. F., Bechtholt, A. J., Crowley, J. J., Hill, T. E., Page, M. E., Lucki, I., 2007. Depletion of serotonin and catecholamines block the acute behavioral response to different classes of antidepressant drugs in the mouse tail suspension test. *Psychopharmacology (Berl)* 192, 357-371.

Pena-Rangel, M. T., Mercado, R., Hernandez-Rodriguez, J., 1999. Regulation of glial Na⁺/K⁺-ATPase by serotonin: identification of participating receptors. *Neurochem Res* 24, 643-649.

Perini, G., Cotta Ramusino, M., Sinforiani, E., Bernini, S., Petrachi, R., Costa, A., 2019. Cognitive impairment in depression: recent advances and novel treatments. *Neuropsychiatr Dis Treat* 15, 1249-1258.

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

Prigol, M., Bruning, C. A., Martini, F., Nogueira, C. W., 2012. Comparative excretion and tissue distribution of selenium in mice and rats following treatment with diphenyl diselenide. *Biol Trace Elem Res* 150, 272-277.

Rizzo, S., Riviere, C., Piazzzi, L., Bisi, A., Gobbi, S., Bartolini, M., Andrisano, V., Morroni, F., Tarozzi, A., Monti, J. P., Rampa, A., 2008. Benzofuran-based hybrid compounds for the inhibition of cholinesterase activity, beta amyloid aggregation, and abeta neurotoxicity. *J Med Chem* 51, 2883-2886.

Sahli, Z. T., Banerjee, P., Tarazi, F. I., 2016. The Preclinical and Clinical Effects of Vilazodone for the Treatment of Major Depressive Disorder. *Expert Opin Drug Discov* 11, 515-523.

Salim, S., 2017. Oxidative Stress and the Central Nervous System. *J Pharmacol Exp Ther* 360, 201-205.

Scapagnini, G., Davinelli, S., Drago, F., De Lorenzo, A., Oriani, G., 2012. Antioxidants as antidepressants: fact or fiction? *CNS Drugs* 26, 477-490.

Shakiba, S., Rezaee, M., Afshari, K., Kazemi, K., Sharifi, K. A., Haddadi, N. S., Haj-Mirzaian, A., Kamalian, A., Jazaeri, S. Z., Richter, K., Dehpour, A. R., 2019. Evaluation of the pharmacological involvement of ATP-sensitive potassium (KATP) channels in the antidepressant-like effects of topiramate on mice. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 392, 833-842.

Shi, R., Wu, Q., Xin, C., Yu, H., Lim, K. L., Li, X., Shi, Z., Zhang, C. W., Qian, L., Li, L., Huang, W., 2019. Structure-Based Specific Detection and Inhibition of Monoamine Oxidases and Their Applications in Central Nervous System Diseases. *Chembiochem* 20, 1487-1497.

Soto-Otero, R., Mendez-Alvarez, E., Hermida-Ameijeiras, A., Sanchez-Sellero, I., Cruz-Landeira, A., Lamas, M. L., 2001. Inhibition of brain monoamine oxidase activity by the generation of hydroxyl radicals: potential implications in relation to oxidative stress. *Life Sci* 69, 879-889.

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

Taciak, P. P., Lysenko, N., Mazurek, A. P., 2018. Drugs which influence serotonin transporter and serotonergic receptors: Pharmacological and clinical properties in the treatment of depression. *Pharmacol Rep* 70, 37-46.

Velasquez, D., Quines, C., Pistoia, R., Zeni, G., Nogueira, C. W., 2017. Selective inhibition of MAO-A activity results in an antidepressant-like action of 2-benzoyl 4-iodoselenophene in mice. *Physiol Behav* 170, 100-105.

Walsh, R. N., Cummins, R. A., 1976. The Open-Field Test: a critical review. *Psychol Bull* 83, 482-504.

Wang, J., Um, P., Dickerman, B. A., Liu, J., 2018. Zinc, Magnesium, Selenium and Depression: A Review of the Evidence, Potential Mechanisms and Implications. *Nutrients* 10.

Wang, Q., Timberlake, M. A., 2nd, Prall, K., Dwivedi, Y., 2017. The recent progress in animal models of depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 77, 99-109.

Weng, R., Shen, S., Tian, Y., Burton, C., Xu, X., Liu, Y., Chang, C., Bai, Y., Liu, H., 2015. Metabolomics Approach Reveals Integrated Metabolic Network Associated with Serotonin Deficiency. *Sci Rep* 5, 11864.

WHO, 2017. Depression and other common mental disorders: Global health estimates. Geneva: World Health Organization.

Ying, J., Clavreul, N., Sethuraman, M., Adachi, T., Cohen, R. A., 2007. Thiol oxidation in signaling and response to stress: detection and quantification of physiological and pathophysiological thiol modifications. *Free Radic Biol Med* 43, 1099-1108.

Yohn, C. N., Gergues, M. M., Samuels, B. A., 2017. The role of 5-HT receptors in depression. *Mol Brain* 10, 28.

Figure Captions

Fig 1. Chemical structure of 2-phenyl-3-(phenylselanyl)benzofuran (SeBZF).

Fig 2. Effects of acute treatment with SeBZF and fluoxetine on despair behavior in the mice FST. (A) Latency time for the first episode of immobility and (B) Total immobility time in a SeBZF dose-response curve (5-100 mg/kg; i.g., 30 min of pre-treatment). Fluoxetine (20 mg/kg; i.p., 30 min) was used as a reference antidepressant drug. (C) Latency time for the first episode of immobility and (D) Total immobility time in a SeBZF time-response curve (15-60 min; 50 mg/kg; i.g.). Values are expressed as the mean $\pm$ S.E.M. (Fig. 2A and B) or median with interquartile range (Fig. 2C and D) ($n = 8-9$ mice/group). (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$ and (***) $p < 0.001$ in comparison with the control group (One-way Analysis of Variance/Newman-Keuls test); ### denotes $p < 0.001$ as compared with the control group (unpaired t -test); (†) $p < 0.01$ and (††) $p < 0.001$ as compared with the control group (Kruskal Wallis/Dunn's test).

Fig 3. Effects of acute treatment with SeBZF and fluoxetine on despair behavior in the mice TST. (A) Latency time for the first episode of immobility and (B) Total immobility time in a SeBZF dose-response curve (1-100 mg/kg; i.g., 30 min of pre-treatment). Fluoxetine (20 mg/kg; i.p., 30 min) was used as a reference antidepressant drug. (C) Latency time for the first episode of immobility and (D) total immobility time in a SeBZF time-response curve (15-120 min; 50 mg/kg; i.g.). Values are expressed as the mean $\pm$ S.E.M. ($n = 8-9$ mice/group). (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$ and (***) $p < 0.001$ in comparison with the control group (One-way Analysis of Variance/Newman-Keuls test); ### denotes $p < 0.001$ as compared with the control group (unpaired t -test).

Fig 4. Effects of acute treatment with SeBZF and fluoxetine on locomotor activity in the mice OFT. (A) Number of crossings and (B) Number of rearings in a SeBZF dose-response curve (1-100 mg/kg; i.g., 30 min of pre-treatment). (C) Number of crossings and (B) Number of

rearrings in a SeBZF time-response curve (15-120 min; 50 mg/kg; i.g.). OFT was performed immediately before TST. Values are expressed as the mean $\pm$ S.E.M. (n = 8-9 mice/group). Control *versus* SeBZF: not significant (n.s.; One-way Analysis of Variance). Control *versus* fluoxetine: ### denotes $p < 0.001$ as compared with the control group (unpaired *t*-test).

Fig 5. Effects of pre-treatments with WAY100635 (0.1 mg/kg, s.c., a selective 5-HT_{1A} receptor antagonist) (A and B), ketanserin (1 mg/kg, i.p., a 5-HT_{2A/2C} receptor antagonist) (C and D) and ondansetron (1 mg/kg, i.p., a 5-HT₃ receptor antagonist) (E and F) on antidepressant-like action of SeBZF (50 mg/kg, i.g.) in the mice TST. The left panel represents the latency time for the first episode of immobility and the right panel shows total immobility time. Data are reported as the mean $\pm$ S.E.M. (n = 8-10 mice/group). (*) $p < 0.05$ and (***) $p < 0.001$ in comparison with the control group (saline plus canola oil); # $p < 0.05$ as compared with SeBZF group (saline plus SeBZF) (Two-way Analysis of Variance/Newman-Keuls test).

Fig 6. Effects of co-administration of sub-effective doses of SeBZF and fluoxetine on despair behavior of mice in the TST. (A) Latency time for the first episode of immobility, and (B) Total immobility time in a dose-response curve of fluoxetine (2.5-20 mg/kg, i.p.) aiming to found a fluoxetine sub-effective dose. (C) Latency time for the first episode of immobility, and (D) Total immobility time obtained from a TST experiment using the sub-effective dose combination of SeBZF (1 mg/kg, i.g.) and fluoxetine (5 mg/kg; i.p.). Data are reported as the mean $\pm$ S.E.M. (n = 9 mice/group). (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$ and (***) $p < 0.001$ as compared with the control group. One-way or Two-way Analysis of Variance/Newman-Keuls test.

Fig 7. Hippocampal MAO-A activity of mice treated with an effective dose of SeBZF (50 mg/kg; i.g.). SeBZF was administered 30 and 60 min before the tissue extraction. Data are reported as the mean $\pm$ S.E.M. (n = 8 mice/group); n.s., unpaired *t*-test.

Fig 8. Effects of 5-HT depletion on antidepressant-like action of SeBZF in the mice TST. (A) Experimental design, (B) Latency time for the first episode of immobility and (C) Total immobility time. pCPA (a tryptophan hydroxylase inhibitor) was used to induce brain 5-HT depletion. Values are expressed as the mean $\pm$ S.E.M. (n = 9 mice/group). (***) $p < 0.001$ as compared with the control group (saline plus canola oil); $^{##}p < 0.001$ as compared with the pCPA group (pCPA plus canola oil); Two-way ANOVA/Newman-Keuls.

Fig 9. Effects of SeBZF treatment on hippocampal biochemical changes induced by 5-HT depletion in mice. (A) Lipoperoxidation levels (TBARS), (B) Sulfhydryl content (total -SH); (C) CAT, (D) Na^+/K^+ -ATPase and (E) AChE activities. Values are expressed as the mean $\pm$ S.E.M. (n = 7-8 mice/group). (*) $p < 0.05$ and (**) $p < 0.001$ as compared with the control group (saline plus canola oil); $^{\#}p < 0.05$ and $^{##}p < 0.001$ as compared with the pCPA group (pCPA plus canola oil); Two-way ANOVA/Newman-Keuls.

FIGURES

FIGURE 1

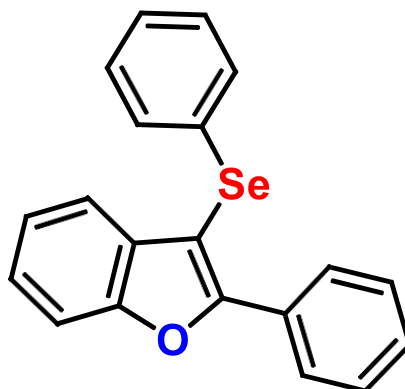


FIGURE 2

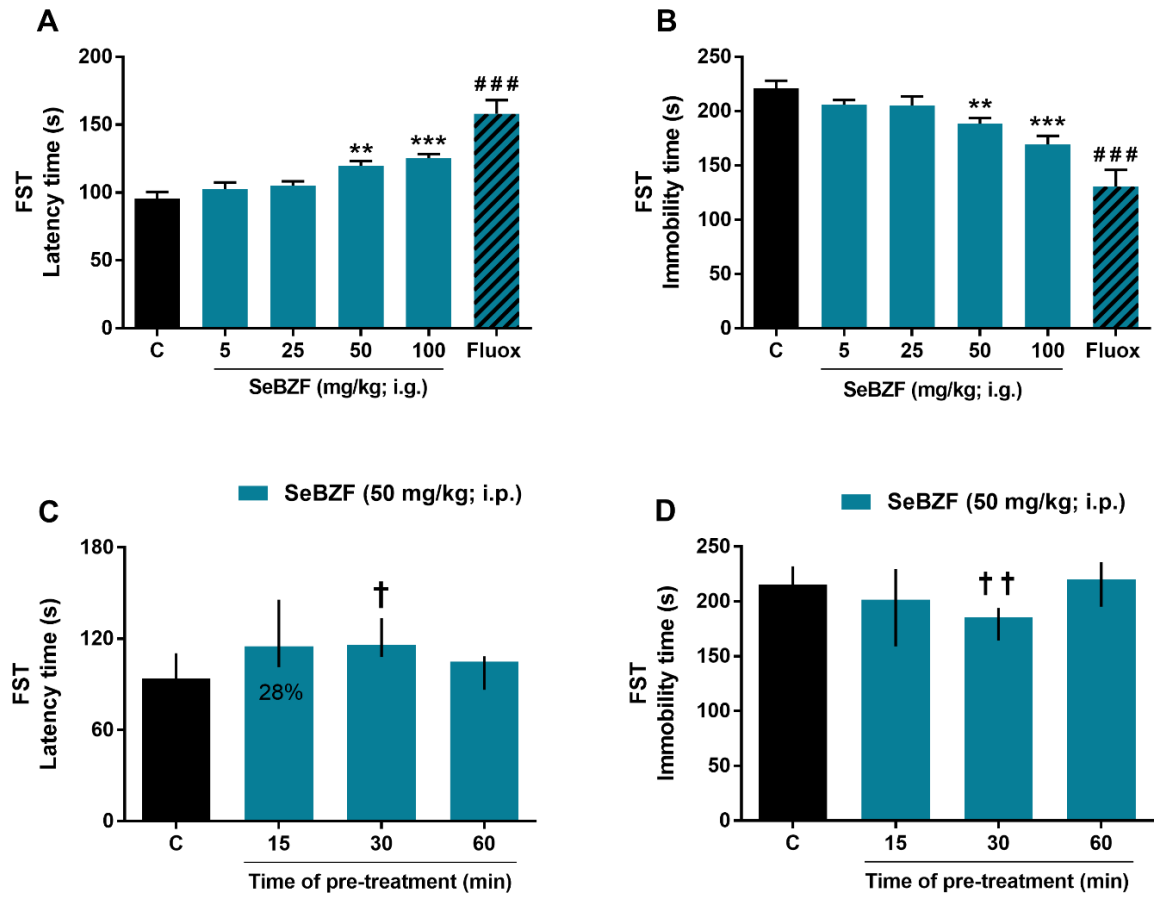


FIGURE 3

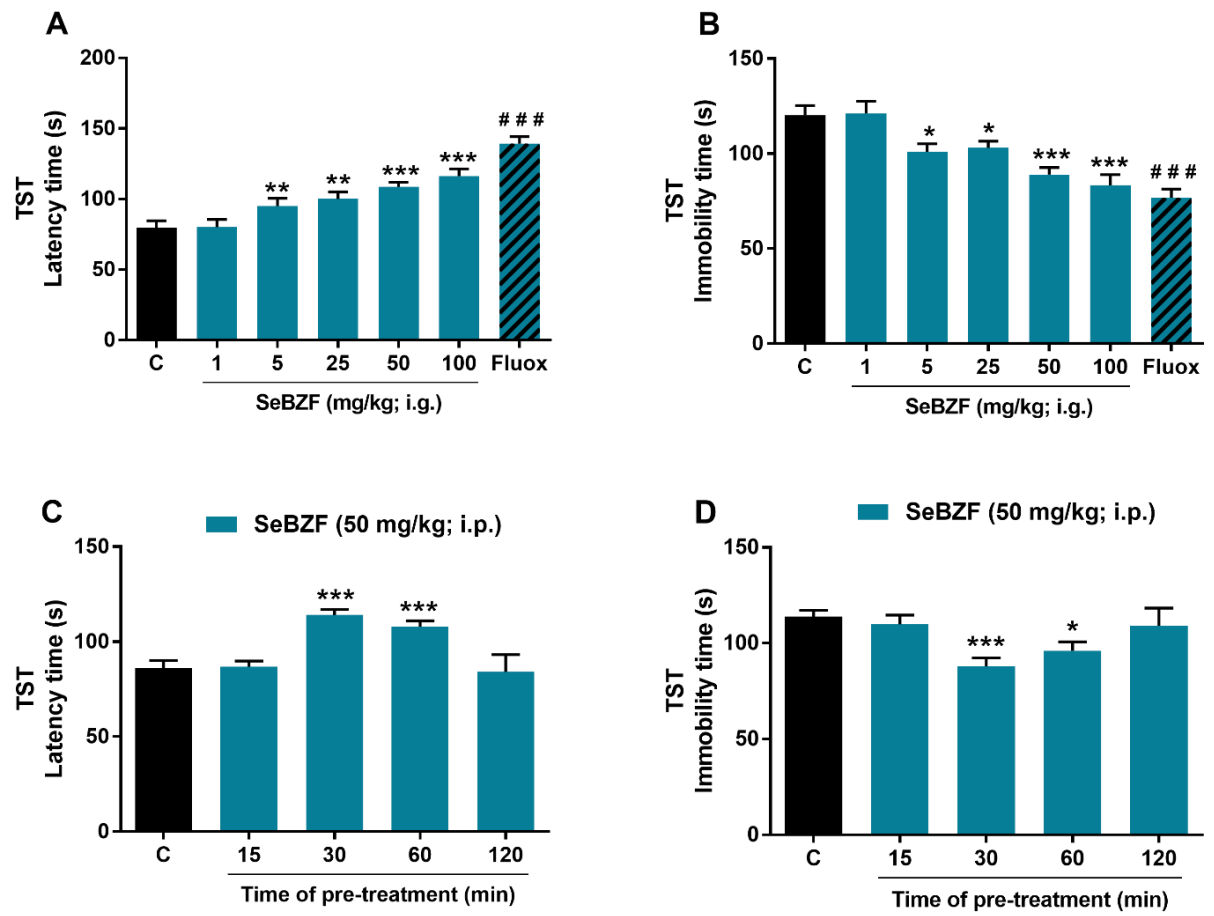


FIGURE 4

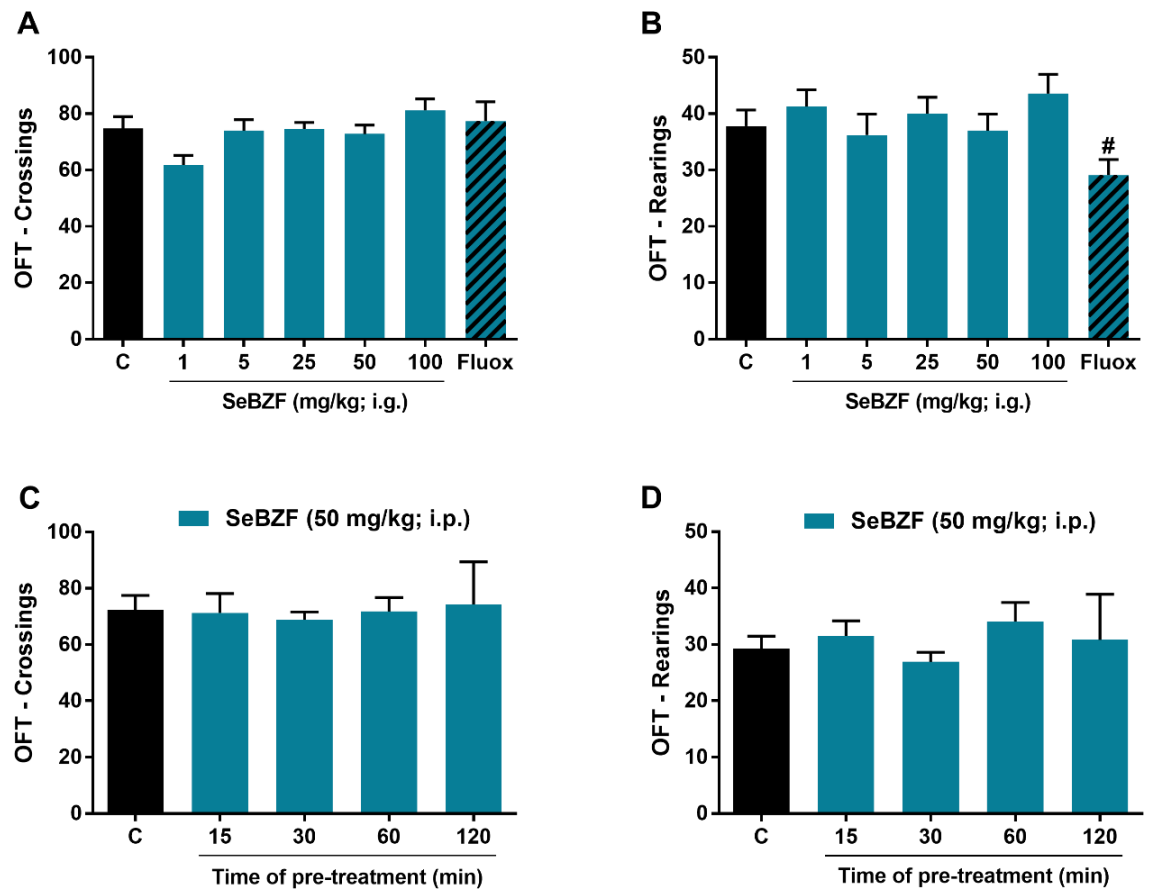


FIGURE 5

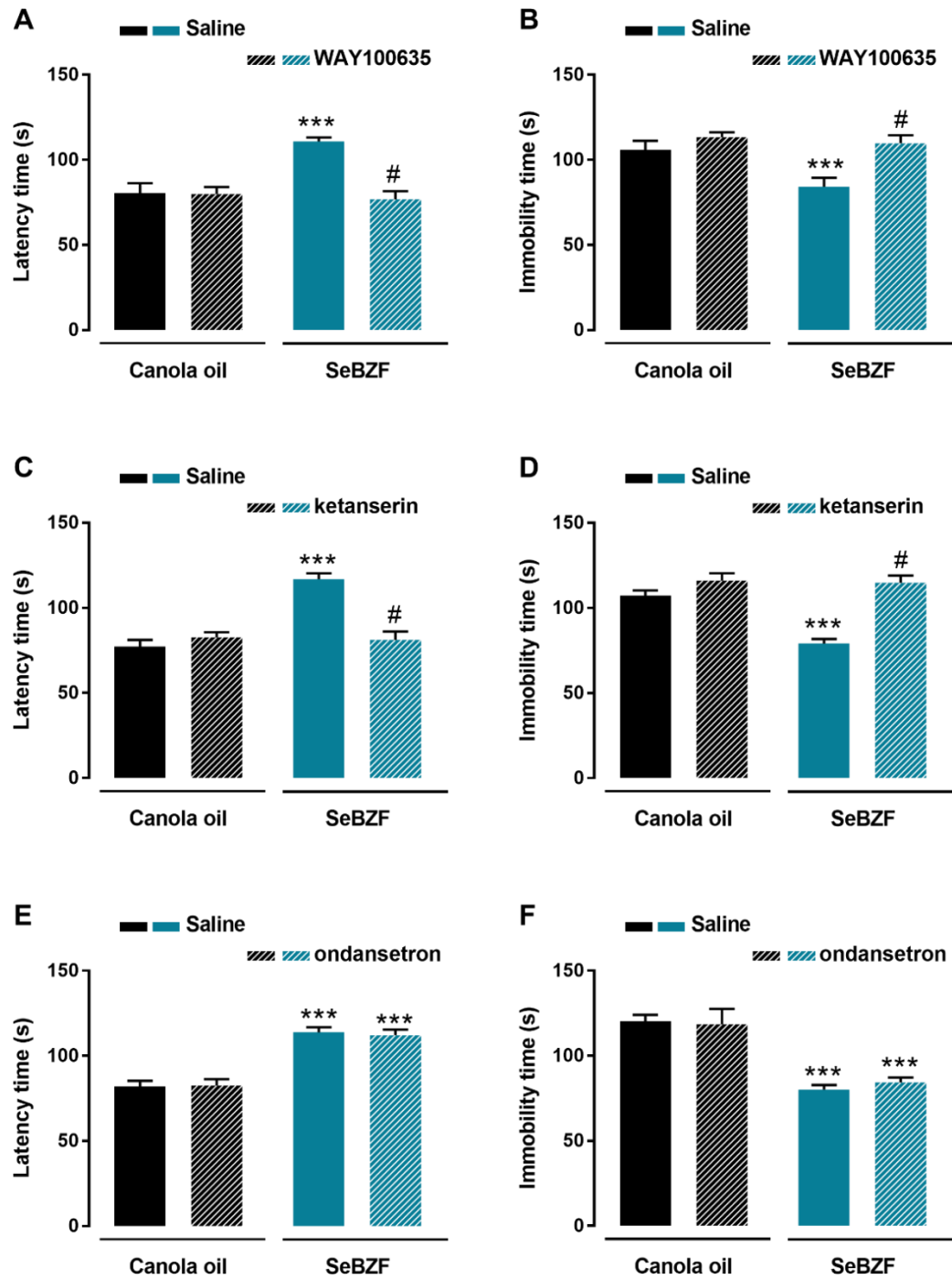


FIGURE 6

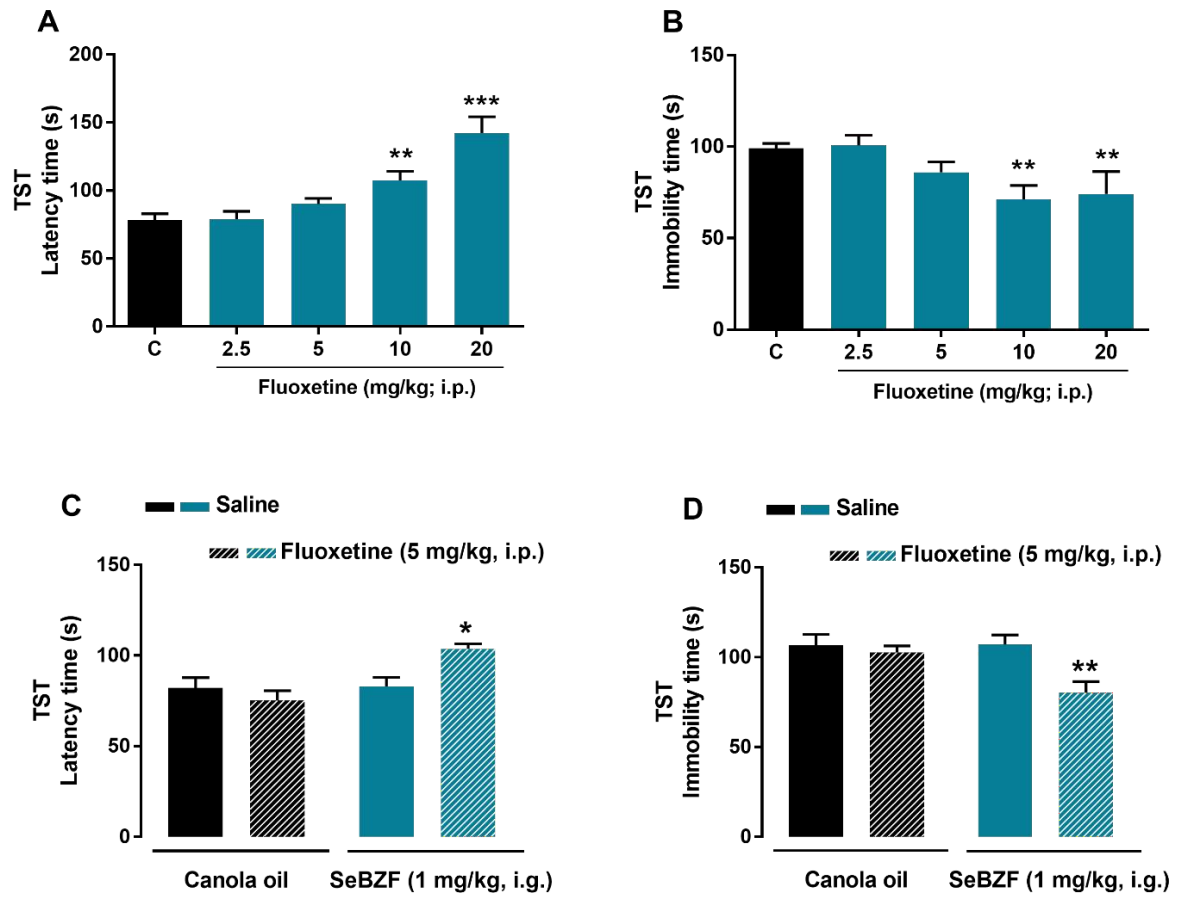


FIGURE 7

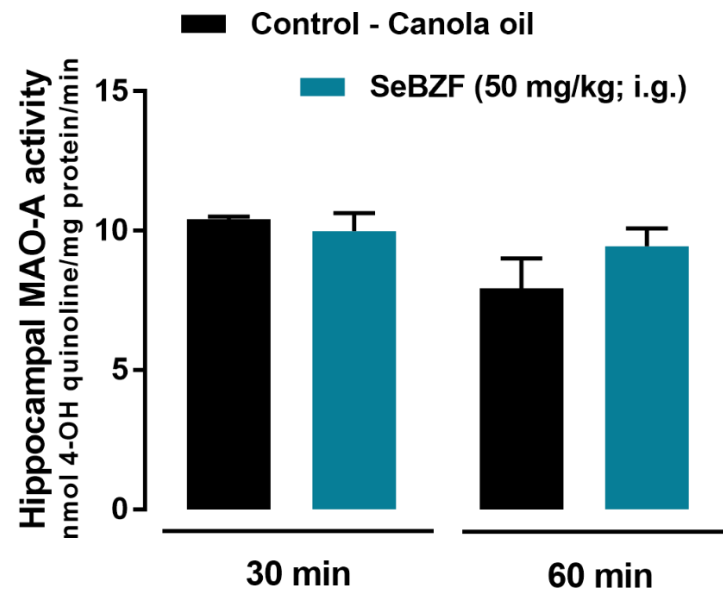


FIGURE 8

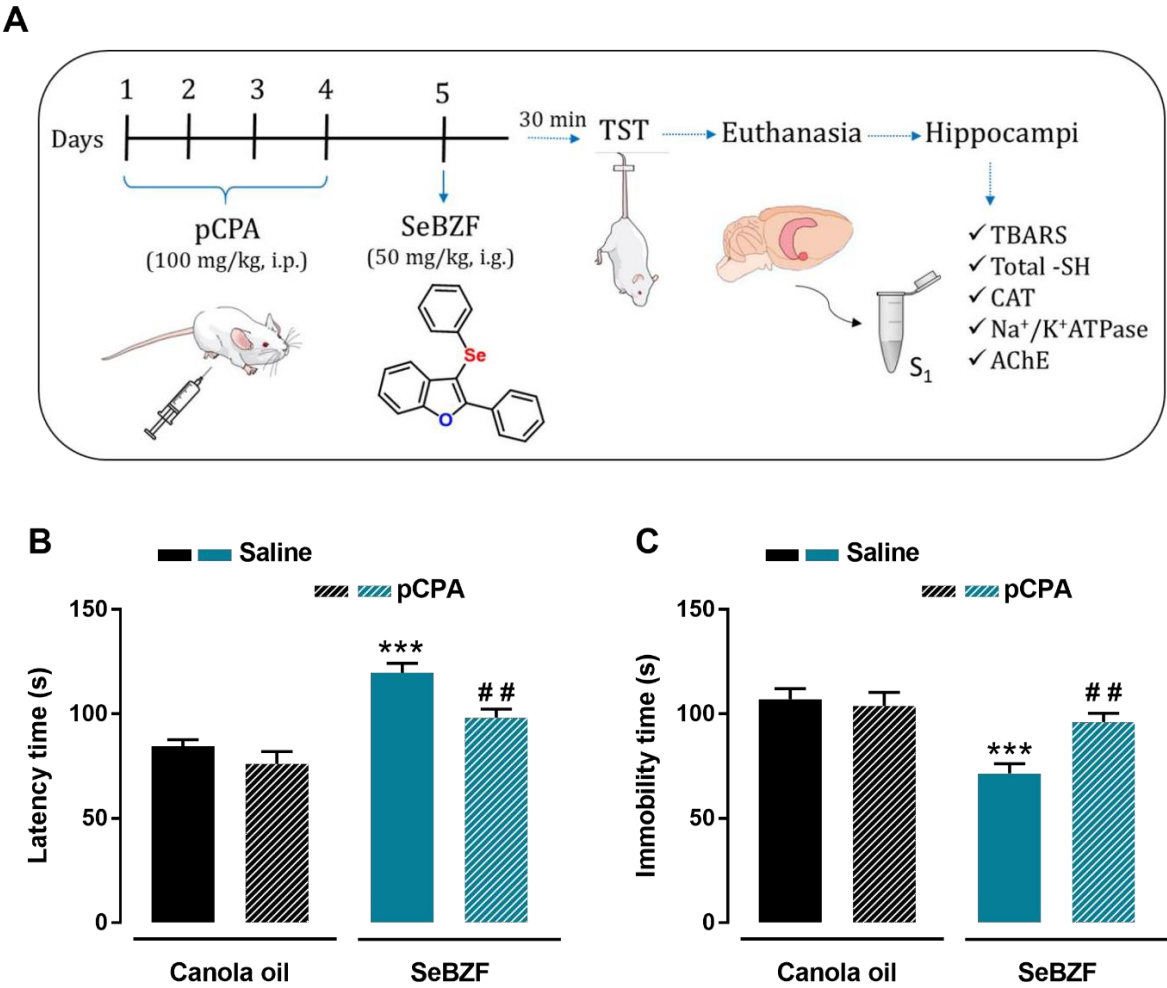


FIGURE 9

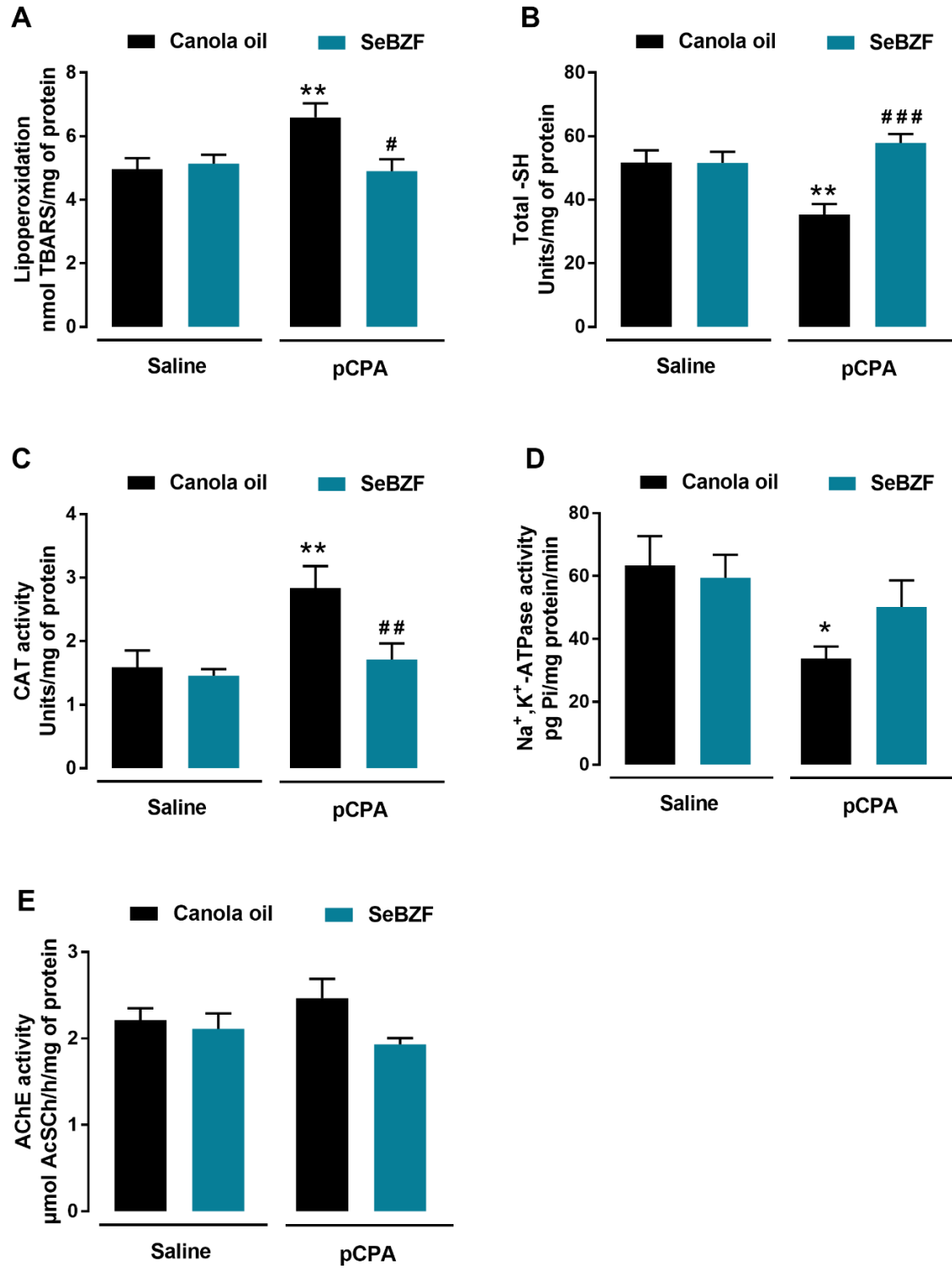


Table 1. Effects of different treatments in the OFT.

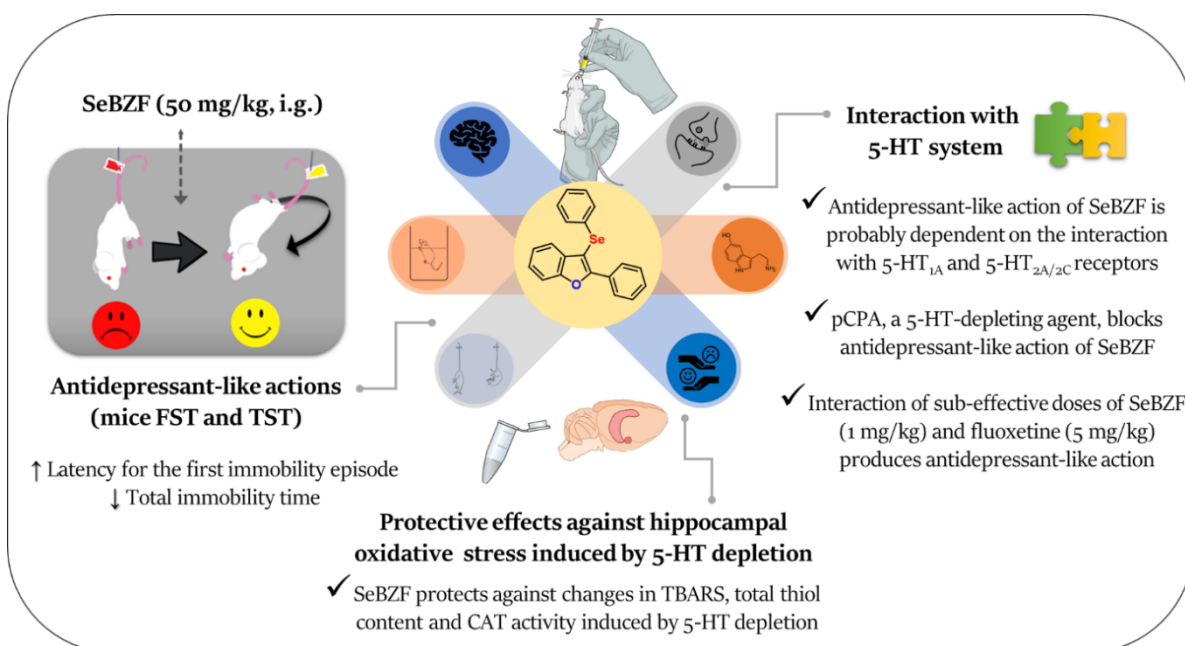
Treatment protocol	Groups	Number of crossings	Number of rearings
Ondansetron	Control	68.89 ± 5.41	22.11 ± 3.84
	Ondansetron	63.70 ± 6.70	18.00 ± 1.85
	SeBZF	73.50 ± 4.03	29.30 ± 2.10
	Ondansetron x SeBZF	71.56 ± 2.65	23.56 ± 1.86
Ketanserin	Control	64.33 ± 3.69	29.22 ± 2.39
	Ketanserin	57.60 ± 3.30	14.88 ± 2.69**
	SeBZF	62.40 ± 4.53	25.70 ± 2.69
	Ketanserin x SeBZF	51.20 ± 2.68	15.60 ± 2.74**
WAY100635	Control	63.75 ± 3.22	26.75 ± 2.67
	WAY100635	72.5 ± 3.66	30.88 ± 3.11
	SeBZF	69.00 ± 4.50	30.88 ± 2.01
	WAY100635 x SeBZF	72.88 ± 3.74	35.25 ± 2.38
pCPA	Control	71.22 ± 3.06	21.44 ± 2.48
	pCPA	63.89 ± 8.04	21.89 ± 3.94
	SeBZF	68.78 ± 5.72	28.33 ± 5.20
	pCPA x SeBZF	66.11 ± 7.60	24.44 ± 4.67
Fluoxetine (sub-effective)	Control	61.11 ± 4.12	30.22 ± 3.26
	Fluoxetine	78.89 ± 7.39	30.78 ± 4.70
	SeBZF	72.44 ± 6.62	28.33 ± 1.92
	Fluoxetine x SeBZF	73.22 ± 6.28	33.00 ± 5.02

The results represent the means ± S.E.M. of 8-10 mice/group. Data analyses were carried out through Two-way ANOVA/Newman-Keuls test. ** p < 0.01 as compared with the control group.

Highlights

- ✓ SeBZF elicits antidepressant-like action in mice.
- ✓ Serotonergic system mediates the anti-immobility effects of SeBZF in the TST.
- ✓ Hippocampal oxidative stress induced by a 5-HT-depleting agent is attenuated by SeBZF treatment.

Graphical abstract



5 Conclusões

Com base nos testes realizados, foi possível verificar que o composto SeBZF apresentou ação antioxidante *in vitro* e ação do tipo antidepressiva no TSC e TNF em camundongos. O bloqueio deste efeito pela administração de pCPA (inibidor da síntese de serotonina), cetanserina e WAY100635 (antagonistas dos receptores 5-HT_{2A/2C} e HT_{1A}, respectivamente), sugerem um possível envolvimento do sistema serotoninérgico no mecanismo de ação do SeBZF. Outro indicativo disto foi o efeito observado com a administração conjunta de doses sub-efetivas de SeBZF e fluoxetina. Por outro lado, os efeitos anti-imobilidade observados no TSC parecem não depender de modulações do SeBZF sobre a atividade da enzima MAO-A, ao menos, em hipocampo.

O modelo de depleção serotoninérgica induzida por pCPA foi capaz de causar alterações em parâmetros relacionados ao estresse oxidativo, como aumento dos níveis de lipoperoxidação, redução no conteúdo de tióis totais e aumento da atividade da catalase em hipocampo, assim como inibição da Na⁺/K⁺-ATAPase, demonstrando a relação entre a redução dos níveis de serotonina e alterações bioquímicas características do TDM. A administração de SeBZF foi eficiente na proteção contra a indução de dano oxidativo e demonstrou tendência em recuperar a atividade da enzima Na⁺/K⁺-ATPase, a qual foi inibida pela pCPA. A modulação da enzima AChE em hipocampo parece não estar envolvida na ação do tipo-antidepressiva do composto.

O tratamento com uma dose elevada de SeBZF (300 mg/kg) não produziu indícios de toxicidade sistêmica, sugerindo que este composto é seguro dentro das condições avaliadas. A partir disso, mais avaliações deverão ser realizadas com o intuito de determinar outros possíveis mecanismos envolvidos na ação do tipo depressiva do SeBZF e elucidar seu potencial terapêutico.

Referências

ABELAIRA, H. M.; RÉUS, G. Z.; QUEVEDO, J. Animal models as tools to study the pathophysiology of depression. **Brazilian Journal of Psychiatry**, v. 35, supl. 2, p. 112-120, 2013.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais (DSM-5)**. 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. 948p.

AL-HARBI, K. S. Treatment-resistant depression: therapeutic trends, challenges, and future directions. **Patient Preference and Adherence**, v. 6, p. 369-388, 2012.

AMIDFAR, M.; COLIC, L.; WALTER, M.; KIM, Y-K. Complex role of the serotonin receptors in depression: Implications for treatment. In: KIM, Y-K. (ed.) **Understanding Depression: Biomedical and Neurobiological Background**, v. 1. Singapore: Springer, 2017. p. 83-95.

ANDERSON, I. M.; PARRY-BILLINGS, M.; NEWSHOLME, E. A.; POORTMANS, J. R.; COWEN, P. J. Decreased plasma tryptophan concentration in major depression: relationship to melancholia and weight loss. **Journal of Affective Disorders**, v. 20, n. 3, p. 185-191, 1990.

APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, p. 373-399, 2004.

ARTIGAS, F. Serotonin receptors involved in antidepressant effects. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 137, n. 1, p. 119-131, 2013.

AZOUZI, S.; SANTUZ, H.; MORANDAT, S.; PEREIRA, C.; CÔTÉ, F.; HERMINE, O.; EL KIRAT, K.; COLIN, Y.; LE VAN KIM, C.; ETCHEBEST, C.; AMIREAULT, P. Antioxidant and membrane binding properties of serotonin protect lipids from oxidation. **Biophysical Journal**, v. 112, n. 9, p. 1863-1873, 2017.

BAMPI, S. R.; CASARIL, A. M.; SABEDRA SOUSA, F. S.; PESARICO, A. P.; VIEIRA, B.; LENARDÃO, E. J.; SAVEGNAGO, L. Repeated administration of a selenium-containing indolyl compound attenuates behavioural alterations by streptozotocin through modulation of oxidative stress in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 183, p. 46-55, 2019.

BECKMANN, H.; KASPER, S. Serotonin precursors as antidepressive agents: a review. **Fortschritte der Neurologie - Psychiatrie**, v. 51, n. 5, p. 176-182, 1983.

BEHR, G. A.; MOREIRA, J. C. F.; FREY, B. N. Preclinical and clinical evidence of antioxidant effects of antidepressant agents: implications for the pathophysiology of major depressive disorder. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2012, artigo 609421, 2012.

BERGER, M.; GRAY, J. A.; ROTH, B. L. The expanded biology of serotonin. **The Annual Review of Medicine**, v. 60, p. 355-366, 2009.

BETTERIDGE, D. J. What is oxidative stress? **Metabolism**, v. 49, n. 2, supl. 2, p. 3-8, 2000.

BILICI, M.; EFE, H.; KOROGU, A.; UYDU, H. A.; BEKAROGLU, M.; DEGER, O. Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in major depression: alterations by antidepressant treatments. **Journal of Affective Disorders**, v. 64, n. 1, p. 43-51, 2001.

BIRMANN, P. T.; SOUSA, F. S. S.; DOMINGUES, M.; BRÜNING, C. A.; VIEIRA, B. M.; LENARDÃO, E. J.; SAVEGNAGO, L. 3-(4-Chlorophenylselenyl)-1-methyl-1H-indole promotes recovery of neuropathic pain and depressive-like behavior induced by partial constriction of the sciatic nerve in mice. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 54, p. 126-133, 2019.

BODNAR, M.; KONIECZKA, P.; NAMIESNIK, J. The properties, functions, and use of selenium compounds in living organisms. **Journal of Environmental Science and Health, Part C: Environmental Carcinogenesis and Ecotoxicology Reviews**, v. 30, n. 3, p. 225-252, 2012.

BRENNEISEN, P.; STEINBRENNER, H.; SIES, H. Selenium, oxidative stress, and health aspects. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 26, n. 4-5, p. 256-267, 2005.

BURTON, G. J.; JAUNIAUX, E. Oxidative stress. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology**, v. 25, n. 3, p. 287-299, 2011.

CASARIL, A. M.; DOMINGUES, M.; LOURENÇO, D. A.; BIRMANN, P. T.; PADILHA, N.; VIEIRA, B.; BEGNINI, K.; SEIXAS, F. K.; COLLARES, T.; LENARDÃO, E. J.; SAVEGNAGO, L. Depression- and anxiogenic-like behaviors induced by lipopolysaccharide in mice are reversed by a selenium-containing indolyl compound: Behavioral, neurochemical and computational insights involving the serotonergic system. **Journal of Psychiatric Research**, v. 115, p. 1-12, 2019.

CASTAGNÉ, V.; MOSER, P.; ROUX, S.; PORSOLT, R. D. Rodent models of depression: Forced swim and tail suspension behavioral despair tests in rats and mice. **Current Protocols in Neuroscience**, v. 55, n. 1, p. 8.10A.1-8.10A.14, 2011.

CHAND, K.; HIEMATHAD, R. A.; SINGH, M.; SANTOS, A.; KERI, R. S. A review on antioxidant potential of bioactive heterocycle benzofuran: natural and synthetic derivatives. **Pharmacological Reports**, v. 69, n. 2, p. 281-295, 2017.

COBLEY, J. N.; FIORELLO, M. L.; BAILEY, D. M. 13 reasons why the brain is susceptible to oxidative stress. **Redox Biology**, v. 15, p. 490-503, 2018.

COMBS, G. F. Biomarkers of selenium status. **Nutrients**, v. 7, n. 4, p. 2209-2236, 2015.

CRYAN, J. F.; MOMBÉREAU, C.; VASSOUT, A. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 29, n. 4-5, p. 571-625, 2005.

DALE, E.; BANG-ANDERSEN, B.; SÁNCHEZ, C. Emerging mechanisms and treatments for depression beyond SSRIs and SNRIs. **Biochemical Pharmacology**, v. 95, n. 2, p. 81-97, 2015.

DAWOOD, K. M. Benzofuran derivatives: a patent review. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 23, n. 9, p. 1133-1156, 2013.

DODD, S.; MITCHELL, P. B.; BAUER, M.; YATHAM, L.; YOUNG, A. H.; KENNEDY, S. H.; WILLIAMS, L.; SUPPES, T.; JARAMILLO, C. L.; TRIVEDI, M. H.; FAVA, M.; RUSH, A. J.; MCINTYRE, R. S.; THASE, M. E.; LAM, R. W.; SEVERUS, E.; KASPER, S.; BERK, M. Monitoring for antidepressant-associated adverse events in the treatment of patients with major depressive disorder: an international consensus statement. **The World Journal of Biological Psychiatry**, v. 19, n. 5, p. 330-348, 2018.

DEAN, J.; KESHAVAN, M. The neurobiology of depression: an integrated view. **Asian Journal of Psychiatry**, v. 27, p. 101-111, 2017.

DEUSSING, J. M. Animal models of depression. **Drug Discovery Today: Disease Models**, v. 3, n. 4, p. 375-383, 2006.

DOMINGUES, M.; CASARIL, A. M.; BIRMANN, P. T.; BAMPI, S. R.; LOURENÇO, D. A.; VIEIRA, B. M.; DAPPER, L. H.; LENARDÃO, E. J.; SONEGO, M.; COLLARES, T.; SEIXAS, F. K.; BRÜNING, C. A.; SAVEGNAGO, L. Effects of a selanylimidazopyridine on the acute restraint stress-induced depressive- and anxiety-like behaviors and biological changes in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 366, p. 96-107, 2019.

DUBOVSKY, S. L. What is new about new antidepressants? **Psychotherapy and Psychosomatics**, v. 87, n. 3, p. 129-139, 2018.

ELHWUEGI, A. S. Central monoamines and their role in major depression. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 28, n. 3, p. 435-451, 2004.

FAN, X.; HE, H.; LI, J.; LUO, Z.; ZHENG, Y.; ZHOU, J-K.; HE, J.; PU, W.; ZHAO, Y. Discovery of 4,6-bis(benzyloxy)-3-phenylbenzofuran as a novel Pin1 inhibitor to suppress hepatocellular carcinoma via upregulating microRNA biogenesis. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 27, n. 11, p. 2235-2244, 2019.

FERGUSON, M. A.; WAIKAR, S. S. Established and emerging markers of kidney function. **Clinical Chemistry**, v. 58, n. 4, p. 680-689, 2012.

FERNANDO, A. B. P.; ROBBINS, T. W. Animal models of neuropsychiatric disorders. **Annual Review of Clinical Psychology**, v. 7, n. 1, p. 39-61, 2011.

FOSTER, L. H.; SUMAR, S. Selenium in health and disease: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 37, n. 3, p. 211-228, 1997.

GAO, F.; YE, L.; WANG, Y.; KONG, F.; ZHAO, S.; XIAO, J.; HUANG, G. Benzofuran-isatin hybrids and their in vitro anti-mycobacterial activities against multi-drug resistant Mycobacterium tuberculosis. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 183, artigo 111678, 2019.

GIANNINI, E. G.; TESTA, R.; SAVARINO, V. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. **Canadian Medical Association Journal**, v. 172, n. 3, p. 367-379, 2005.

GOULD, T. D.; TAO, D. T.; KOVACSICS, C. E. The open field test. In: GOULD, T. D. (ed.) **Mood and Anxiety Related Phenotypes in Mice**: Characterization using behavioral tests. Berlin: Humana Press, 2009. p. 1-20.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. **Nutrition Reviews**, v. 70, n. 5, p. 257-265, 2012.

HECK, S. O.; ZBOROWSKI, V. A.; QUINES, C. B.; NOGUEIRA, C. W. 4,4'-Dichlorodiphenyl diselenide reverses a depressive-like phenotype, modulates prefrontal cortical oxidative stress and dysregulated glutamatergic neurotransmission induced by subchronic dexamethasone exposure to mice. **Journal of Psychiatric Research**, v. 116, p. 61-68, 2019.

HILLHOUSE, T. M.; PORTER, J. H. A brief history of the development of antidepressant drugs: from monoamines to glutamate. **Experimental and Clinical Psychopharmacology**, v. 23, n. 1, p. 1-21, 2015.

HUANG, Y-J.; LANE, H-Y., LIN, C-H. New treatment strategies of depression: Based on mechanisms related to neuroplasticity. **Neural Plasticity**, v. 2017, artigo 4605971, 2017.

JEON, S. W.; KIM, Y-K. Molecular neurobiology and promising new treatment in depression. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 3, artigo 381, 2016.

JESULOLA, E.; MICALOS, P.; BAGULEY, I. J. Understanding the pathophysiology of depression: from monoamines to the neurogenesis hypothesis model - are we there yet? **Behavioural Brain Research**, v. 341, p. 79-90, 2018.

KATZUNG, B. G.; TREVOR, A. J. **Farmacologia básica e clínica**. 13.ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 2017. 1216p.

KHANAM, H.; SHAMSUZZAMAN. Bioactive benzofuran derivatives: a review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, p. 483-504, 2015.

KIELISZEK, M. Selenium—fascinating microelement, properties and sources in food. **Molecules**, v. 24, n. 7, artigo 1298, 2019.

KIM, Y-K. Molecular neurobiology of major depressive disorder. **Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 64, p. 275-276, 2015.

KRISHNAN, V.; NESTLER, E. J. Animal models of depression: molecular perspectives. **Current Topics in Behavioral Neurosciences**, v. 7, p. 121-147, 2011.

KUMAR, A.; PINTUS, F.; DI PETRILLO A.; MEDDA, R.; CARIA, P.; MATOS, M. J.; VIÑA, D.; PIERONI, E.; DELOGU, F.; ERA, B.; DELOGU, G. L.; FAIS, A. Novel 2-phenylbenzofuran derivatives as selective butyrylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, artigo 4424, 2018.

KUPFER, D. J.; FRANK, E.; PHILLIPS, M. L. Major depressive disorder: new clinical, neurobiological, and treatment perspectives. **The Lancet**, v. 379, n. 9820, p. 1045-1055, 2012.

LAM, R. W.; KENNEDY, S. H.; MCINTYRE, R. S.; KHULLAR, A. Cognitive dysfunction in major depressive disorder: effects on psychosocial functioning and implications for treatment. **The Canadian Journal of Psychiatry**, v. 59, n. 12, p. 649-654, 2014.

LIN, Z.; CANALES, J. J.; BJÖRGVINSSON, T.; THOMSEN, M. M.; QU, H.; LIU, Q-R.; TORRES, G. E.; CAINE, S. B. Monoamine transporters: vulnerable and vital doorkeepers. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**, v. 98, p. 1-46, 2011.

LOWE, F. Biomarkers of oxidative stress. In: LAHER, I. (ed.) **Systems biology of free radicals and antioxidants**, v. 2. Berlin: Springer, 2014. p. 65-87.

MARATHE, S. V.; D'ALMEIDA, P. L.; VIRMANI, G.; BATHINI, P.; ALBERI, L. Effects of monoamines and antidepressants on astrocyte physiology: Implications for monoamine hypothesis of depression. **Journal of Experimental Neuroscience**, v. 12, p. 1-7, 2018.

MATÉS, J. M.; PÉREZ-GÓMEZ, C.; CASTRO, I. N. Antioxidant enzymes and human diseases. **Clinical Biochemistry**, v. 32, n. 8, p. 595-603, 1999.

MEHDI, Y.; HORNICK, J-C.; ISTASSE, L.; DUFRASNE, I. Selenium in the environment, metabolism and involvement in body functions. **Molecules**, v. 18, n. 3, p. 3292-3311, 2013.

MÉNARD, C.; HODES, G. E.; RUSSO, S. J. Pathogenesis of depression: insights from human and rodent studies. **Neuroscience**, v. 321, p. 138-162, 2015.

MICHEL, T. M.; PÜLSCHEN, D.; JOHANNES, T. The role of oxidative stress in depressive disorders. **Current Pharmaceutical Design**, v. 18, n. 36, p. 5890-5899, 2012.

MOCKING, R. J. T.; ASSIES, J.; RUHÉ, H. G.; SCHENE, A. H. Focus on fatty acids in the neurometabolic pathophysiology of psychiatric disorders. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 41, n. 4, p. 597-611, 2018.

MONTANARI, S. MAHMOUD, A. M.; PRUCCOLI, L.; RABBITO, A.; NALDI, M.; PETRALLA, S.; MORALEDA, I.; BARTOLINI, M.; MONTI, B.; IRIEPA, I.; BELLUTI, F.; GOBBI, S.; DI MARZO, V.; BISI, A.; TAROZZI, A.; LIGRESTI, A.; RAMPA, A. Discovery of novel benzofuran-based compounds with neuroprotective and immunomodulatory properties for Alzheimer's disease treatment. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 178, p. 243-258, 2019.

MORGESE, M. G.; TRABACE, L. Monoaminergic system modulation in depression and Alzheimer's disease: a new standpoint? **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, artigo 483, 2019.

NABESHIMA, T.; KIM, H. Involvement of genetic and environmental factors in the onset of depression. **Experimental Neurobiology**, v. 22, n. 4, p. 235-243, 2013.

NEVAGI, R. J.; DIGHE, S. H.; DIGHE, S. N. Biological and medicinal significance of benzofuran. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, p. 561-581, 2015.

NOGUEIRA, C. W., ROCHA, J. B. Toxicology and pharmacology of selenium: emphasis on synthetic organoselenium compounds. **Archives of Toxicology**, v. 85, n. 11, p. 1313-1359, 2011.

OECD. **Test No. 422**: Combined repeated dose toxicity study with the reproduction/developmental toxicity screening test. Paris: OECD Publishing, 2015. Disponível em: < <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/Draft-Updated-Guideline-on-Combined-Repeated-Dose-Toxicity-Study.pdf>>. Acesso em 16 ago. 2019.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351-358, 1976.

OTTE, C.; GOLD, S. M.; PENNINX, B.; PARIANTE, W.; ETKIN, C. M.; FAVA, M.; SCHATZBERG, A. F. Major depressive disorder. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 2, artigo 16065, 2016.

PARK, J. W.; YOUN, Y. C.; KWON, O. S.; JANG, Y. Y.; HAN, E. S.; LEE, C. S. Protective effect of serotonin on 6-hydroxydopamine- and dopamine-induced oxidative damage of brain mitochondria and synaptosomes and PC12 cells. **Neurochemistry International**, v. 40, n. 3, p. 223-233, 2002.

PEÑA-RANGEL, M. T.; MERCADO, R.; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, J. Regulation of glial Na⁺/K⁺-ATPase by serotonin: Identification of participating receptors. **Neurochemical Research**, v. 24, n. 5, p. 643-649, 1999.

PERINI, G.; RAMUSINO, M. C.; SINFORIANI, E.; BERNINI, S.; PETRACHI, R.; COSTA, A. Cognitive impairment in depression: recent advances and novel treatments. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v. 15, p. 1249-1258, 2019.

POLLAK, D. D.; REY, C. E.; MONJIE, F. J. Rodent models in depression research: classical strategies and new directions. **Annals of Medicine**, v. 42, n. 4, p. 252–264, 2010.

PORSOLT, R. D.; LE PICHON, M.; JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature**, v. 266, n. 5604, p. 730-732, 1977.

PRICE, J. L.; DREVETS, W. C. Neural circuits underlying the pathophysiology of mood disorders. **Trends in Cognitive Sciences**, v. 16, n. 1, p. 61-71, 2012.

PRYOR, J. C.; SULSER, F. Evolution of the monoamine hypotheses of depression. In: HORTON, R. W.; KATONA, C. (eds.) **Biological aspects of affective disorders**. Cambridge: Academic Press, 1991. p. 77-94.

PUCCIO, F.; FULLER-TYSZKIEWICZ, M.; ONG, D.; KRUG, I. A systematic review and meta-analysis on the longitudinal relationship between eating pathology and depression. **International Journal of Eating Disorders**, v. 49, n. 5, p. 439-454, 2016.

RAMAKER, M. J.; DULAWA, S. C. Identifying fast-onset antidepressants using rodent models. **Molecular Psychiatry**, v. 22, n. 5, p. 656-665, 2017.

RAPPENEAU, V.; BÉROD, A. Reconsidering depression as a risk factor for substance use disorder: Insights from rodent models. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 77, p. 303-316, 2017.

RAYMAN, M. P. Selenium and human health. **The Lancet**, v. 379, n. 9822, p. 1256-1268, 2012.

RIZZO, S.; RIVIÈRE, C.; PIAZZI L.; BISI, A.; GOBBI, S.; BARTOLINI, M.; ANDRISANO, V.; MORRONI, F.; TAROZZI, A.; MONTI, J-P.; RAMPA. A. Benzofuran-based hybrid compounds for the inhibition of cholinesterase activity, β amyloid aggregation, and $\alpha\beta$ neurotoxicity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, n. 10, p. 2883-2886, 2008.

ROBINSON, E. S. Translational new approaches for investigating mood disorders in rodents and what they may reveal about the underlying neurobiology of major depressive disorder. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 373, n. 1742, artigo 20170036, 2018.

ROSA, S. G.; PESARICO, A. P.; TAGLIAPIETRA, C. F.; DA LUZ, S. C.; NOGUEIRA, C. W. Opioid system contribution to the antidepressant-like action of m-trifluoromethyl-diphenyl diselenide in mice: A compound devoid of tolerance and withdrawal syndrome. **Journal of Psychopharmacology**, v. 31, n. 9, p. 1250-1262, 2017.

SAHLI, Z. T.; BANERJEE, P.; TARAZI, F. I. The preclinical and clinical effects of vilazodone for the treatment of major depressive disorder. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 11, n. 5, p. 515-523, 2016.

SALIM, S. Oxidative stress and psychological disorders. **Current Neuropharmacology**, v. 12, n. 2, p. 140-147, 2014.

SALIM, S. Oxidative stress and the central nervous system. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 360, n. 1, p. 201-205, 2017.

SAVEANU, R. V.; NEMEROFF, C. B. Etiology of depression: Genetic and environmental factors. **Psychiatric Clinics of North America**, v. 35, n. 1, p. 51-71, 2012.

SCAPAGNINI, G.; DAVINELLI, S.; DRAGO, S.; DE LORENZO, A.; ORIANI, G. Antioxidants as antidepressants: fact or fiction? **CNS Drugs**, v. 26, n. 6, p. 477-490, 2012.

SLATTERY, D. A.; CRYAN, J. F. The ups and downs of modelling mood disorders in rodents. **ILAR Journal**, v. 55, n. 2, p. 297-309, 2014.

SOUSA, F. S. S.; BIRMANN, P. T.; BALDINOTTI, R.; FRONZA, M. G.; BALAGUEZ, R.; ALVES, D.; BRÜNING, C. A.; SAVEGNAGO, L. α - (phenylselenyl) acetophenone mitigates reserpine-induced pain-depression dyad: Behavioral, biochemical and molecular docking evidences. **Brain Research Bulletin**, v. 142, p. 129-137, 2018.

STOCKMEIER, C. A. Involvement of serotonin in depression: evidence from postmortem and imaging studies of serotonin receptors and the serotonin transporter. **Journal of Psychiatric Research**, v. 37, n. 5, p. 357-373, 2003.

SKOU, J. C.; ESMANN, M. The Na,K-ATPase. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 24, n. 3, p. 249-261, 1992.

SÖDERLUND, J.; LINDSKOG, M. Relevance of rodent models of depression in clinical practice: can we overcome the obstacles in translational neuropsychiatry? **The International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 21, n. 7, p. 668-676, 2018.

TACIAK, P. P.; LYSENKO, N.; MAZUREK, A. P. Drugs which influence serotonin transporter and serotonergic receptors: pharmacological and clinical properties in the treatment of depression. **Pharmacological Reports**, v. 70, n. 1, p. 37-46, 2018.

TALAROWSKA, M.; GALECKI, P.; MAES, M.; GARDNER, A.; CHAMIELEC, M.; ORZECZOWSKA, A.; BOBINSKA, K.; KOWALCZYK, E. Malondialdehyde plasma concentration correlates with declarative and working memory in patients with recurrent depressive disorder. **Molecular Biology Reports**, v. 39, n. 5, p. 5359-5366, 2012.

VENTURA, M.; MELO, M.; CARRILHO, F. Selenium and thyroid disease: from pathophysiology to treatment. **International Journal of Endocrinology**, v. 2017, artigo 1297658, 2017.

WALSH, R. N.; CUMMINS, R. A. The open-field test: a critical review. **Psychological Bulletin**, v. 83, n. 3, p. 482-504, 1976.

WANG, J.; UM, P.; DICKERMAN, B. A.; LIU, J. Zinc, magnesium, selenium and depression: a review of the evidence, potential mechanisms and implications. **Nutrients**, v. 10, n. 5, artigo E584, 2018.

WANG, Q.; TIMBERLAKE, M. A.; PRALL, K.; DWIVEDI, Y. The recent progress in animal models of depression. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 77, p. 99-109, 2017.

WANG, X.; MICHAELIS, E. K. Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 2, artigo 12, 2010.

WHO (World Health Organization). **Vitamin and mineral requirements in human nutrition**, 2.ed. Bangkok: World Health Organization, 1998. Disponível em: < <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42716/9241546123.pdf>>. Acesso em 12 ago. 2019.

WHO (World Health Organization). **Depression and other common mental disorders**: global health estimates. Geneva: World Health Organization, 2017. Disponível em: < <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/254610/WHO-MSD-MER-2017.2-eng.pdf>>. Acesso em 02 ago. 2019.

YAN, H-C.; CAO, X.; DAS, M.; ZHU, X-H.; GAO, T-M. Behavioral animal models of depression. **Neuroscience Bulletin**, v. 26, n. 4, p. 327-337, 2010.

YOUNG, I. S.; WOODSIDE, J. V. Antioxidants in health and disease. **Journal of Clinical Pathology**, v. 54, n. 3, p. 176-186, 2001.

YUSUF, M.; KHAN, M.; ROBAIAN, M. A.; KHAN, R. A. Biomechanistic insights into the roles of oxidative stress in generating complex neurological disorders. **Journal of Biological Chemistry**, v. 399, n. 4, p. 305-319, 2018.

ZARATE, C. A.; SINGH, J. B.; CARLSON, P. J.; BRUTSCHE, N. E.; AMELI, R.; LUCKENBAUGH, D. A.; CHARNEY, D. S.; MANJI, H. K. A randomized trial of an N-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant major depression. **Archives of General Psychiatry**, v. 63, n. 8, p. 856-864, 2006.

ZUCKERMAN, H.; PAN, Z.; PARK, C.; BRIETZKE, E.; MUSIAL, N.; SHARIQ, A. S.; IACOBUCCI, M.; YIM, S. J.; LUI, L. M. W.; RONG, C.; MCINTYRE, R. S. Recognition and treatment of cognitive dysfunction in major depressive disorder. **Frontiers in Psychiatry**, v. 9, artigo 655, 2018.

Apêndices

Apêndice A – Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* dos compostos 3-organoselenil benzofuranos

Inicialmente, foram avaliados cinco compostos da classe 3-organoselenil benzofuranos: 2-fenil-3-(fenilselenil)benzofurano (1), 3-(4-fluorofenil)selenil)-2-fenilbenzofurano (2), 3-((4-metoxifenil)selenil)-2-fenilbenzofurano (3), 3-(4-clorofenil)selenil)-2-fenilbenzofurano (4), 2-fenil-3-(p-tolilselenil)benzofurano (5) (figura 4). Os compostos foram testados quanto a suas atividades antioxidantes *in vitro* através do ensaio de TBARS, utilizado para quantificação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico que são formadas durante o processo de lipoperoxidação.

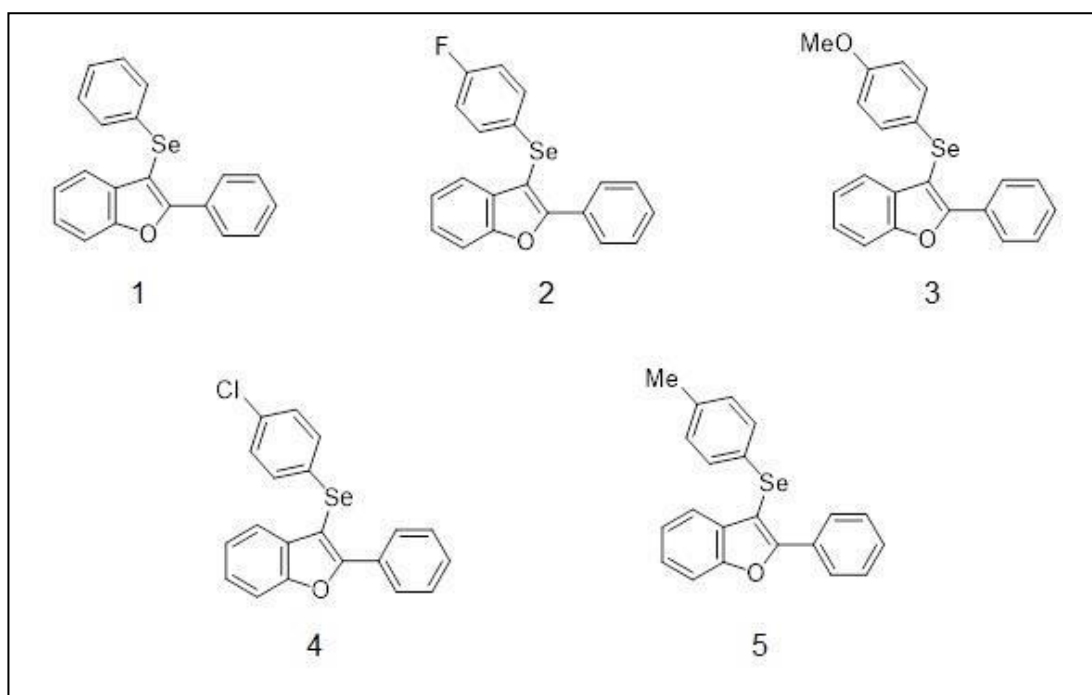


Figura 4 – Estrutura química dos compostos da classe 3-organoselenil benzofuranos.

Nestes testes, os níveis de TBARS foram determinados em cérebro de camundongos conforme o protocolo descrito por OHKAWA *et al.* (1979) utilizando nitroprussiato de sódio (NPS) como indutor da peroxidação lipídica. O tecido foi homogeneizado em Tris-HCl 50 mM (pH 7,4) e centrifugado para a obtenção do

sobrenadante (S₁). Uma alíquota das frações sobrenadantes (S₁) foi separada para o teste e incubada com NPS e os compostos testados ou vitamina E (controle positivo) a 37°C por 1 hora. A seguir, a mistura reacional foi incubada com ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,8%, tampão de ácido acético (pH 3,4) e dodecil sulfato de sódio (SDS) 8,1% a 95°C por 1 hora. A absorbância foi medida a 532 nm e os resultados foram expressos como nmol TBARS/g de tecido.

A análise estatística foi realizada pelo software GraphPad Prism 8.2.0. A distribuição dos dados foi avaliada com o teste D'Agostino-Pearson Omnibus, e as comparações entre os grupos foram realizadas através da análise de variância ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls. Os resultados podem ser visualizados na figura 5. Em comparação com o grupo veículo, o composto 1 (SeBZF) demonstrou efeito significativo na redução da peroxidação lipídica nas concentrações de 25, 50, 100 e 200 µM [$F_{(7,16)}=46,83$; $p<0,0001$], o composto 2 nas concentrações de 50, 100 e 200 µM [$F_{(7,16)}=56,35$; $p<0,0001$], o composto 3 nas concentrações de 100 e 200 µM [$F_{(7,16)}=11,09$; $p<0,0001$], o composto 4 na concentração de 200 µM [$F_{(7,16)}=9,053$; $p=0,0001$], e o composto 5 nas concentrações de 100 e 200 µM [$F_{(7,16)}=38,29$; $p<0,0001$]. A Vitamina E demonstrou efeito significativo nas concentrações de 100 e 200 µM [$F_{(7,16)}=32,38$; $p<0,0001$].

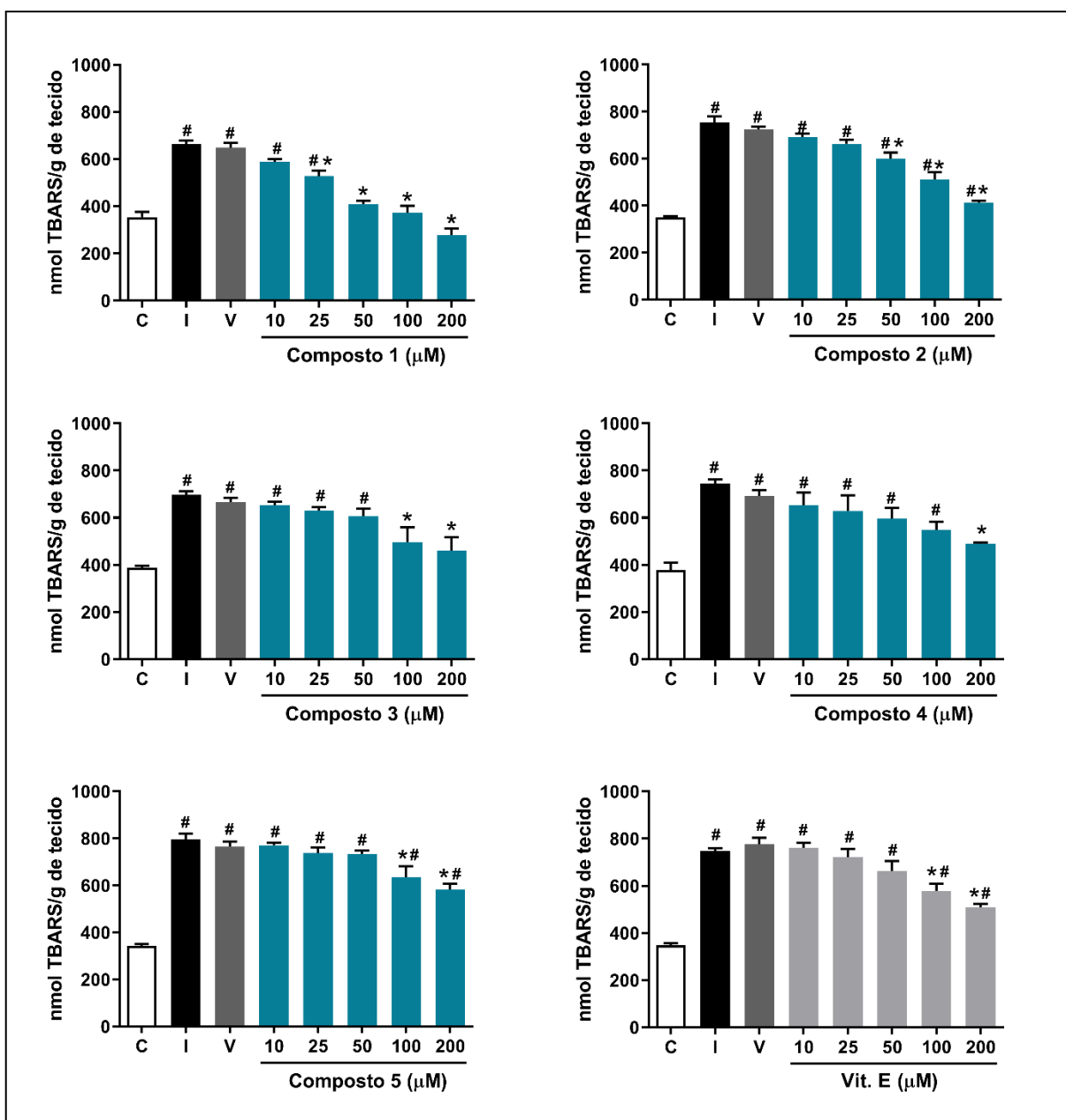


Figura 5 – Efeito dos compostos 3-organoselenil benzofuranos (1-5) e vitamina E sobre os níveis de lipoperoxidação induzida por NPS em homogenato de cérebro de camundongos. Cada coluna representa a média $\pm$ E.P.M. de 3 experimentos independentes. # $p < 0,05$ em comparação ao grupo controle. * $p < 0,05$ em comparação ao grupo veículo. ANOVA de uma via/Newman-Keuls.

A partir dos resultados obtidos com o ensaio de TBARS, foi calculada a concentração que inibe 50% da lipoperoxidação (CI_{50}) através do software GraphPad Prism 8.2.0. Foi realizada regressão não linear a partir de experimentos individuais, e os resultados foram expressos como média acompanhada dos limites de confiança

de 95%. A inibição máxima ($I_{\text{máx}}$) foi calculada para todos os compostos na concentração mais efetiva utilizada no ensaio (200 μM). Os resultados da CI_{50} e $I_{\text{máx}}$ estão apresentados na tabela 3.

Tabela 3 – Valores de CI_{50} e $I_{\text{máx}}$ para os compostos 3-organoselenil benzofuranos (1-5) e Vitamina E no ensaio de TBARS em homogenato de cérebro de camundongos.

	CI_{50} (μM)	$I_{\text{máx}}$ (%)
1 (SeBZF)	121,7 (97,09 - 162)	57 ± 4
2	264,8 (202,5 - 364,8)	43 ± 1
3	424 (236,4 - 2860)	31 ± 8
4	702 (275,7 - 922,36)	29 ± 1
5	510,4 (309,8 - 1708)	24 ± 3

Com base nos resultados obtidos, o composto 1 (SeBZF) foi escolhido para os ensaios *in vivo* e *ex vivo* realizados posteriormente em função de apresentar maior potencial antioxidante. Isto foi evidenciado no ensaio de TBARS, onde o SeBZF foi capaz de reduzir a lipoperoxidação em cérebro de camundongos em concentrações menores em relação aos demais compostos, e também pode ser visualizado nos valores de CI_{50} e $I_{\text{máx}}$. Nestes últimos, observa-se que este composto apresentou o menor valor de CI_{50} , ou seja, a concentração necessária para inibir 50% da lipoperoxidação é a menor dentre os compostos avaliados, além de apresentar maior valor para a $I_{\text{máx}}$ (57%).

Apêndice B – Avaliação da toxicidade do SeBZF

No presente estudo ainda foi realizada a avaliação de toxicidade do composto SeBZF em camundongos Swiss fêmeas, de acordo com o protocolo 422 da OECD (2015). Nesse procedimento, foi administrado SeBZF na dose de 300 mg/kg (i. g.) (uma dose seis vezes maior que a dose capaz de produzir efeito do tipo antidepressivo) ou veículo (óleo de canola). Os animais foram acompanhados durante o período de 14 dias, onde foram periodicamente pesados e avaliados quanto a alterações comportamentais, tais como piloereção, lacrimejamento, diarreia e letargia, de forma a determinar se a administração de uma dose elevada de SeBZF seria capaz de alterar esses parâmetros. Após 14 dias, os animais foram eutanasiados com isoflurano, sendo realizada coleta de sangue por punção cardíaca e remoção do fígado.

Visando ampliar a avaliação de uma possível toxicidade sobre o fígado, o principal órgão envolvido na detoxificação de xenobióticos, os níveis de TBARS foram dosados em homogenato de fígado conforme procedimento descrito por OHKAWA *et al.* (1979). As amostras de sangue foram centrifugadas por 10 minutos a 2500 rpm e o plasma obtido foi utilizado para determinação dos níveis de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), ureia e creatinina.

As enzimas ALT e AST estão presentes principalmente no fígado e são liberadas em consequência de lesão hepática, ou seja, níveis elevados dessas enzimas podem ser utilizados como marcadores de toxicidade hepática (GIANNINI *et al.*, 2005). Já a ureia e a creatinina são consideradas marcadores de função renal. Quando há um funcionamento inadequado dos rins e sua capacidade de filtrar sangue é comprometida, os níveis destas substâncias encontram-se elevados na corrente sanguínea (FERGUSON e WAIKAR, 2012). As dosagens de ALT e AST foram

realizadas através de kit cinético Labtest. Os níveis de ureia foram mensurados com uso de kit enzimático Bioclin, e para dosagem de creatinina foi utilizado o kit Labtest K VET.

Os resultados de todos os parâmetros avaliados para determinação de toxicidade foram analisados estatisticamente com o software GraphPad Prism 8.2.0, e as comparações entre os grupos foram realizadas utilizando teste t não pareado. Estes resultados estão apresentados na figura 4.

Não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas para o tratamento com SeBZF em relação ao grupo controle em nenhum dos seis parâmetros avaliados: variação de peso ($p=0,3624$), níveis de TBARS ($p=0,3642$), ALT ($p=0,4354$), AST ($p=0,6244$), ureia ($p=0,2555$) e creatinina ($p=0,3590$). Visualmente, também não foram observadas alterações indicativas de toxicidade após o tratamento com SeBZF.

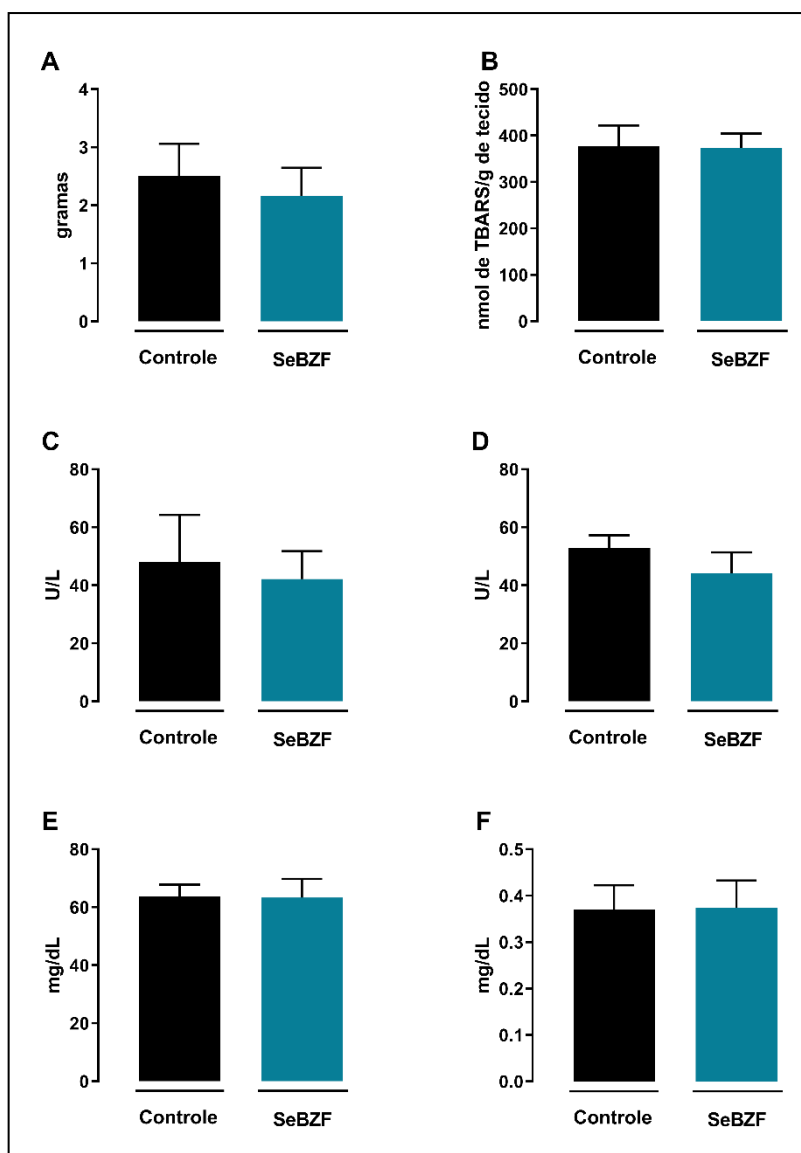


Figura 6 – Efeito do tratamento com SeBZF (300 mg/kg, i. g.) em parâmetros de toxicidade sistêmica em camundongos: variação de peso (A), TBARS (B), ALT (C), AST (D), ureia (E) e creatinina (F). Cada coluna representa a média $\pm$ E.P.M de 6 animais/grupo. Teste t não pareado.

A ausência de alterações nestes parâmetros sugere que o SeBZF apresenta baixa toxicidade sistêmica na dose avaliada de acordo com as condições utilizadas neste estudo.

Anexos

Anexo A - Carta de aprovação no Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA)

Pelotas, 05 de outubro de 2017

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada “**Estudo do potencial antioxidante, ansiolítico e antidepressivo de 3-organoselenil-benzofuranos em camundongos**” processo número 23110.004897/2017-55, de responsabilidade de **Cristiani Folharini Bortolatto** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e recebeu parecer **FAVORÁVEL** a sua complementação pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, em reunião de 02/10/2017.

Finalidade	(X) Pesquisa () Ensino
Vigência da autorização	05/10/2017 a 15/09/2020
Espécie/linhagem/raça	<i>Mus musculus</i> /Swiss
Nº de animais	456
Idade	60 dias
Sexo	450 machos e 6 fêmeas
Origem	Biotério Central - UFPel

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

Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao COBALTO para posterior registro no COCEPE (código para cadastro nº CEEA 4897-2017).


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

Ciente em: 24/10/2017

Assinatura do Professor Responsável: Cristiani Folharini Bortolatto



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Comissão de Ética em Experimentação Animal

FORMULÁRIO PARA SOLICITAÇÃO DE ADENDO E/OU MUDANÇA EM PROJETO

Título do Projeto: Estudo do potencial antioxidante, ansiolítico e antidepressivo de 3-organoselenil-benzofuranos em camundongos

Nº de registro na CEEA: 4897

Pesquisador responsável: Cristiani Folharini Bortolatto

Adendo ou modificação a ser executada na metodologia original (UTILIZE O ESPAÇO QUE FOR NECESSÁRIO):

Venho através deste, solicitar adendo ao projeto acima mencionado.

***Avaliação da toxicidade sistêmica (oral aguda) do 3-organoselenil-benzofurano em camundongos:** Solicitamos a adição de 12 camundongos fêmeas swiss adultas (30-35g) para o prosseguimento dos testes de toxicidade. Dentre estas, metade refere-se a repetição do tratamento conforme preconiza a OECD e metade para adição de algumas análises toxicológicas abaixo mencionadas.

Justificativa do pesquisador responsável para solicitação de adendo e/ou modificação no projeto (UTILIZE O ESPAÇO QUE FOR NECESSÁRIO):

A justificativa se dá para o prosseguimento da avaliação da toxicidade aguda do composto e adição de análises bioquímicas e comportamentais. Como preconizado, os animais novamente receberão uma única dose oral do composto selecionado na dose de 300 mg/kg (dose sugerida pela OECD) ou veículo em um volume de 1 ml/100g. Serão utilizadas fêmeas com jejum de 3-4h antes da administração e com variação de no máximo 20% do peso corporal, conforme preconizado pela OECD. Os animais serão observados a cada 30 min durante as primeiras 24h e depois diariamente por 14 dias (OECD) para determinar o potencial letal dos compostos. Após este tempo de exposição, os camundongos serão anestesiados com isoflurano para o procedimento de punção cardíaca e o sangue será coletado em tubos contendo heparina. O plasma será obtido após centrifugação e usado para ensaios bioquímicos através de kits comerciais. Além de AST, ALT e ureia, incluiremos as análises de creatinina, lactato desidrogenase, creatina quinase, fosfatase alcalina, albumina sérica, ácido úrico, colesterol, glicose e triglicerídeos e íons (Na⁺, K⁺, Cl⁻) para averiguar se o composto não afeta com outras rotas bioquímicas. Gostaríamos também de incluir a avaliação da atividade locomotora dos animais tratados com altas doses do composto através do teste do campo aberto e a dosagem da enzima δ-aminolevulinico desidratase (ALA-D) em fígado, um marcador de toxicidade a metais pesados e compostos de selênio (Ecker et al., 2018). Devido ao baixo rendimento das amostras de sangue, solicitamos para tanto, 6 animais controles e 6 animais para o tratamento.

OECD/OCDE 423. Adopted: 17th December 2001. OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS. Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method

MODELO ANIMAL						
- Procedência = (X) Biotério () Fazenda () Aviário () Outra = qual =						
- Tipo e característica						
Espécie	Linhagem	Idade	Peso	Quantidade		
				M	F	Total
<i>Mus musculus</i>	Swiss	60 dias	20-35g		X	12



Documento assinado eletronicamente por **CRISTIANI FOLHARINI BORTOLATTO**, Professor do Magistério Superior/Auxiliar, em 08/03/2019, às 12:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufpel.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0454778** e o código CRC **9513DB24**.

Anexo B – Carta de submissão do artigo

16/09/2019

Email – Jéssica Gall – Outlook

Fwd: Submission Confirmation

Cristiani Bortolatto <cbortolatto@gmail.com>

Seg, 16/09/2019 14:48

Para: Jéssica <je.gall@hotmail.com>; César Augusto Bruning <cabruning@yahoo.com.br>; Taís Teixeira <taisteixeira.r@gmail.com>; Luiz Roberto Carraro Junior <luizrobertocarraro@hotmail.com>; Amália Alves <amaliaalvs@gmail.com>; Roselia Spanevello <rspanevello@gmail.com>; Luiza Spohr <luizaspohr@hotmail.com>; Diego da Silva Alves <dsalves@gmail.com>; - Zé Neto <zeneto.qmc@gmail.com>; Mayara Sandrielly Pereira Soares <mspereirasoes@gmail.com>

Profª Drª Cristiani Folharini Bortolatto

Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção

Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos (CCQFA)

Universidade Federal de Pelotas (UFPEL)

----- Forwarded message -----

De: **Neuropharmacology** <eesserver@eesmail.elsevier.com>

Date: seg, 16 de set de 2019 às 14:43

Subject: Submission Confirmation

To: <cbortolatto@gmail.com>, <cristiani.bortolatto@ufpel.edu.br>

*** Automated email sent by the system ***

Neuropharmacology

Title: 2-Phenyl-3-(phenylselanyl)benzofuran elicits antidepressant-like action by modulating serotonergic system and attenuates behavioral changes and hippocampal oxidative stress induced by serotonin depletion in mice

Authors: Jéssica Iara Gall; Amália G Alves; Luiz Roberto C Júnior; Taís T Rech; José Sebastião S Neto; Diego Alves; Mayara Sandrielly P Soares; Luiza Spohr; Rosélia Maria Spanevello; César A Brüning; Cristiani F Bortolatto

Article Type: Research Paper

Dear Dr. Cristiani Folharini Bortolatto,

Your submission entitled "2-Phenyl-3-(phenylselanyl)benzofuran elicits antidepressant-like action by modulating serotonergic system and attenuates behavioral changes and hippocampal oxidative stress induced by serotonin depletion in mice" has been received by Neuropharmacology.

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <https://ees.elsevier.com/neuropharm/>.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal. Please do not hesitate to contact me if you have any queries.

Kind regards,

Neuropharmacology

<https://outlook.live.com/mail/inbox/id/AQMkADAwATZiZmYAZC1jOGI5LTc3AGUwLTAwAi0wMAoARgAAA%2BCp9FC%2BIV1Ng4oIkzmzNIYHAB...> 1/2