

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

Franciele Kich Giongo

**EFEITOS DA N-ACETILISTEÍNA EM MODELO DE ESTRESSE SUB-
CRÔNICO POR CONTENÇÃO EM CAMUNDONGOS BALB/c**

Porto Alegre

2016

Franciele Kich Giongo

**EFEITOS DA N-ACETILISTEÍNA EM MODELO DE ESTRESSE SUB-CRÔNICO
POR CONTENÇÃO EM CAMUNDONGOS BALB/c**

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

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Elaine Elisabetsky

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Ana Paula Herrmann

Porto Alegre

2016

CIP - Catalogação na Publicação

Kich Giongo, Franciele
EFEITOS DA N-ACETILISTEÍNA EM MODELO DE ESTRESSE
SUB-CRÔNICO POR CONTENÇÃO EM CAMUNDONGOS BALB/C /
Franciele Kich Giongo. -- 2016.
34 f.

Orientadora: Elaine Elisabetsky.
Coorientadora: Ana Paula Herrmann.

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

1. N-acetilcisteína. 2. Estresse sub-crônico. I.
Elisabetsky, Elaine, orient. II. Herrmann, Ana
Paula, coorient. III. Título.

Franciele Kich Giongo

**EFEITOS DA N-ACETILISTEÍNA EM MODELO DE ESTRESSE SUB-CRÔNICO
POR CONTENÇÃO EM CAMUNDONGOS BALB/c**

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

Aprovado em: ____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA

Prof^o. Dr. Angelo Piato - UFRGS

Prof^a. Dr^a. Mirna Leal - UFRGS

Prof^a. Dr^a. Elaine Elisabetsky - UFRGS

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Décio e Ivone, por todo incentivo e suporte ao longo dos anos. Vocês, sem sombra de dúvida, são os principais responsáveis pela minha curiosidade e interesse na ciência.

À minha orientadora, Elaine Elisabetsky, por todo conhecimento transmitido e por toda sua singularidade como pessoa. Obrigada por todo pelo incentivo e fundamentalmente por acreditar em minha capacidade para fazer ciência.

À minha coorientadora, Ana Paula Herrmann, obrigada pela amizade e por todo apoio ao longo deste trabalho.

Ao meu amor, obrigada por tudo. Pelo ombro amigo a cada dificuldade, por toda motivação e incentivo à cada vez em que eu achei que não daria conta do que me propus a fazer, por toda compreensão a cada final de semana em que eu passei estudando ou no laboratório, obrigada por minimizar as dificuldades e por deixar minha rotina mais leve.

Aos membros do Laboratório de Etnofarmacologia, especialmente Luíza e Patrícia, obrigada pelo companheirismo e pela disponibilidade em resolver os meus problemas como se fossem seus. Esse trabalho não seria possível sem o apoio físico e mental de vocês.

Às funcionárias do Biotério Setorial de Farmacologia do ICBS, Vanda e Camila, por todo amor dedicado aos animais e por toda ajuda prestada.

Aos amigos da turma 9, obrigada por todas as gargalhadas e desabafos ao longo desta jornada. Dividir com vocês os sofrimentos e as angústias do dia-dia tornaram tudo menos nebuloso.

Aos amigos fora da universidade, pela compreensão e amizade de longa data.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para minha formação acadêmica e pessoal ao longo deste curso, muito obrigada.

SUMÁRIO

	RESUMO.....	6
1.	INTRODUÇÃO	7
	1.1 Estresse	7
	1.2 Transtornos de Ansiedade	8
	1.3 Depressão Maior	10
	1.4 N-acetilcisteína	11
2.	OBJETIVOS	13
	2.1 Objetivo Geral.....	13
	2.2 Objetivos Específicos	13
3.	ARTIGO CIENTÍFICO.....	14
4.	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	33
	REFERÊNCIAS.....	34
	ANEXO A - NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA <i>NEUROPHARMACOLOGY</i>	39

RESUMO

Somos confrontados diariamente com situações estressantes: apresentando trabalhos em congressos, cumprindo prazos no trabalho ou simplesmente enfrentando o trânsito diário. Quando somos submetidos a eventos estressores dois sistemas são ativados: o sistema nervoso simpático, o qual libera noradrenalina e adrenalina; o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (eixo HPA), o qual levará – em última análise – à liberação de glicocorticóides. Disfunções no eixo HPA, relacionadas a estresse sustentado ou mesmo agudo quando severo, tem sido relacionadas a diversas patologias, incluindo transtornos de ansiedade e depressão maior. Transtornos de ansiedade e depressão maior caracterizam-se por serem condições de importante morbidade neuropsicológica e afetarem parte significativa da população. Estes transtornos tem seu tratamento baseado em abordagens psicológicas e/ou farmacológicas, nem sempre eficazes e acompanhados de efeitos adversos indesejados. Desta maneira, o estudo de novos sistemas mediadores, como o sistema glutamatérgico, vem ganhando espaço na compreensão destes transtornos, bem como o desenvolvimento de novos fármacos que sejam farmacodinamicamente diferenciados dos atualmente disponíveis. A N-acetilcisteína (NAC), usada classicamente como agente mucolítico e na intoxicação por paracetamol, vem sendo usado na neuropsiquiatria, um fenômeno conhecido na indústria farmacêutica como *repurposing*. No presente estudo, camundongos BALB/c foram submetidos a 10 dias de estresse por contenção, e tratados (por via intraperitoneal) com salina, imipramina (20 mg/kg) ou NAC (30 mg/kg ou 100 mg/kg) durante os últimos cinco dias de estresse. Os animais foram testados quanto ao comportamento tipo ansioso (claro-escuro e campo aberto) e quanto ao comportamento tipo depressivo (teste de suspensão pela cauda). O peso dos animais foi monitorado diariamente. O estresse foi capaz de induzir comportamento tipo ansioso no teste de campo aberto e diminuição no ganho de peso. Não foram observados resultados relevantes quanto ao comportamento tipo depressivo. Os dados não foram suficientemente claros para concluir sobre a ação das drogas testadas. Os resultados sugerem que alterações no tempo de estresse, testes comportamentais e esquema de tratamento são necessárias para que o modelo seja adequadamente validado.

Palavras-chave: N-acetilcisteína, estresse por contenção, ansiedade, depressão maior, teste de suspensão pela cauda, claro-escuro.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Estresse

Walter Cannon, o qual nunca usou de fato o termo estresse, estudou os efeitos de estímulos ambientais no organismo. Em 1932, o então professor de fisiologia da Universidade Harvard usou pela primeira vez o termo “*homeostasis*” para descrever a manutenção do equilíbrio interno dos animais (Cannon, 1932). A famosa expressão “fuga ou luta” também é de autoria de Cannon (Cannon, 1915). Walter Cannon descreveu que situações que sejam de alguma maneira desafiadoras para os animais levam à ativação do sistema nervoso simpático (SNS) para lutar ou fugir da situação estressante e, posteriormente, restabelecer a homeostase. De acordo com Cannon, a doença seria o resultado do mal funcionamento do restabelecimento da homeostase.

Em 1936, Hans Selye introduz pela primeira vez o termo estresse no contexto biomédico para descrever o efeito de agentes nocivos ao organismo (Selye, 1936). Originalmente, o termo “*stress*” vem da mecânica e é usado como uma medida da pressão em um corpo deformável. Selye introduz a Síndrome de Adaptação Geral (SAG), dividida em três estágios: fase de alerta, fase de resistência e fase de exaustão (Selye, 1946). A fase de alerta corresponde ao estresse agudo e envolve a clássica reação de fuga ou luta, na qual o sistema nervoso autônomo está altamente envolvido e as funções corporais começam a apresentar alterações. Na segunda fase, o organismo tenta combater e superar a situação estressante ou reage de maneira inapropriada, levando ao aparecimento dos primeiros sintomas patológicos (aumento da glândula adrenal, atrofia tímica e úlceras gástricas). Na terceira fase, a fase de exaustão, o organismo não consegue mais compensar e suprir as demandas energéticas. Nesta fase, o estresse contínuo é prejudicial e até mesmo fatal. Mais recentemente, McEwen (2002) redefiniu estes conceitos, criando o termo alostase (do grego *allos* = diferente; *stasis* = estabilidade) para definir a condição de constante modificação do meio interno dos organismos vivos. Esse termo também é utilizado para se referir aos processos de adaptação utilizados para manter a estabilidade de um organismo (sua homeostase) através de processos ativos que, quando acionados, implicam em uma série de modificações adaptativas a serem feitas pelo organismo. Quando a resposta alostática é excessiva ou ineficaz, o organismo desenvolve uma “carga alostática”, que pode ou não se seguir de falha alostática, o que corresponderia a fase de exaustão descrita por Selye.

Como estabelecido por Cannon e Selye, os mecanismos envolvidos na resposta a estímulos estressores são principalmente adaptativos, visando facilitar o restabelecimento da homeostase fisiológica e comportamental. Dois principais sistemas estão envolvidos nessa resposta: o sistema nervoso autônomo simpático e o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA). Estes dois sistemas atuarão em conjunto impulsionando a secreção de catecolaminas e glicocorticóides em circuitos de *feedback* negativo, resultando nas primeiras respostas fisiológicas ao estresse. Estímulos estressores ativam o eixo HPA pela secreção do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e vasopressina pelo núcleo paraventricular do hipotálamo (de Kloet et al., 2005), levando a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) na circulação sanguínea pela hipófise anterior. O ACTH irá atuar na glândula adrenal, onde o cortisol (ou corticosterona, no caso dos roedores) é sintetizado e secretado em resposta ao estímulo do ACTH, levando a alterações imunológicas, metabólicas, de crescimento, entre outros processos fisiológicos importantes (de Kloet, 2003, Sapolsky et al., 2000).

Estudos realizados em adultos mostram evidências de que os níveis de cortisol encontram-se de fato aumentados em situações estressantes (Kirschbaum et al., 1993, Tian et al., 2016, van Eck et al., 1996), e defende-se a hipótese de que o aumento de cortisol ocasionado por estresse sustentado, ou ocasional mas severo, poderia vir a causar a *down-regulation* do eixo HPA (de Kloet, 2003, Sapolsky et al., 2000). O eixo HPA, além do principal mediador do estresse, é também considerado como um dos fatores envolvidos em diversos transtornos neuropsiquiátricos.

Estudos envolvendo estresse e ansiedade evidenciam papel relevante das disfunções no eixo HPA. Chaudieu et al. realizaram um estudo avaliando os níveis de cortisol em indivíduos idosos com ou sem transtornos de ansiedade após uma situação estressante. Foi constatado que após o estímulo estressor os níveis de cortisol dos indivíduos ansiosos foi significativamente maior do que o aumento observado no grupo controle. Além disso, o grupo com transtorno de ansiedade apresentou menor capacidade de recuperação do estresse. Outros estudos envolvendo estresse e ansiedade mostram que crianças e adolescentes apresentam níveis elevados de cortisol em situações de ansiedade persistente (Chaudieu et al., 2008, Greaves-Lord et al., 2007, Kallen et al., 2008). A hiperatividade do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal vem sendo extensivamente estudada como um fator causal da depressão maior (Stetler & Miller, 2011), sendo presumidamente relacionada ao mal funcionamento dos receptores de glicocorticóides e culminando em um prejuízo no *loop* de *feedback* negativo do eixo HPA (Pariante & Lightman, 2008). Ainda, a hiperatividade do eixo HPA é um mecanismo importante que explicaria tanto a fisiopatologia da depressão em si, como a sua

relação com condições clínicas, tais como hipertensão, doenças cardíacas, acidente vascular cerebral, deficiência cognitiva, diabetes, obesidade e osteoporose (Brown et al., 2004).

1.2. Transtornos de Ansiedade

Transtornos de ansiedade são caracterizados por ansiedade excessiva e incontrolável e constante preocupação sobre eventos cotidianos, gerando um sofrimento subjetivo (American Psychiatric Association, 2013). Afetam cerca de 25 a 30% da população, podendo ser um problema contínuo ou acometendo o indivíduo de maneira pontual (Kessler et al., 2005). Trata-se de patologias incapacitantes e altamente custosas tanto para os indivíduos quanto para a sociedade (Kessler, 2007). Enquanto o medo é definido como uma resposta a ameaças percebidas ou de fato reais, a ansiedade segue o caminho anterior ao medo – é a expectativa de futuras ameaças (American Psychiatric Association, 2013). Evolutivamente o sentimento de ansiedade moderada é benéfico ao indivíduo, pois atuará sobre respostas comportamentais agindo para aumentar a capacidade de lidar com o estresse e explorar mais plenamente as oportunidades. Por outro lado, quando este sentimento de ansiedade se torna prevalente, e, portanto, patológico, o indivíduo começa a experimentar comprometimento na sua qualidade de vida (American Psychiatric Association, 2013).

De acordo com o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-5), o transtorno de ansiedade é dividido em quatro principais patologias: transtorno de ansiedade generalizada (TAG), transtorno do pânico, transtorno de ansiedade social (TAS) e fobias específicas. O diagnóstico de transtornos relacionados a ansiedade pode ser feito tanto de acordo com o DSM-5 quanto pela Classificação Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde (CID 10), publicada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (World Health Organization, 1992). Os critérios de diagnóstico incluem sintomas tais como: tensão, preocupação e medo, taquicardia, desconforto ou aperto no peito, diaforese, tremores e boca seca, os quais devem estar presentes diariamente e por pelo menos 6 meses para o indivíduo ser diagnosticado com transtorno ansioso.

Nos transtornos de ansiedade, que compartilham com a depressão maior características neurobiológicas e opções de tratamento (Clark & Beck, 2010), 40% da população afetada é constituída por pacientes com respostas inadequadas tanto para o tratamento farmacológico quanto para o não farmacológico (Bystritsky, 2006). Os fármacos disponíveis para o tratamento de transtornos de ansiedade são, principalmente, ansiolíticos (benzodiazepínicos e

não-benzodiazepínicos) e antidepressivos (inibidores seletivos da recaptação de serotonina e antidepressivos tricíclicos). Entretanto, estes tratamentos apresentam diversos efeitos adversos já conhecidos, como: sedação, sonolência, diminuição da coordenação motora, no caso dos benzodiazepínicos, e disfunções sexuais, gastrointestinais e de sono, no caso dos antidepressivos. A fim de atender mais adequadamente os pacientes acometidos por transtornos de ansiedade, em especial os que não respondem aos tratamentos disponíveis, é imprescindível continuar procurando novas estratégias terapêuticas com melhor eficácia.

1.3. Depressão Maior

A depressão maior é atualmente um dos transtornos psiquiátricos mais incapacitantes e com prevalência crescente em nações desenvolvidas; atinge mais de 350 milhões de pessoas no mundo e é responsável por 1 milhão de mortes todos os anos (Belzung et al., 2015, Bschor et al., 2014, Kessler et al., 1994, Kuo et al., 2015). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que a depressão maior se torne até 2020 a segunda doença mais debilitante, com um custo aproximado de 80 bilhões de dólares por ano nos Estados Unidos. De acordo com o Manual de Diagnóstico e Estatística dos Transtornos Mentais (DSM-5), a depressão maior é caracterizada por alterações comportamentais e biológicas, tais como humor deprimido, anedonia, apatia, pessimismo, perda de motivação, distúrbios do sono (insônia ou hipersonia), alteração do apetite e, muitas vezes, ideação suicida.

Os tratamentos utilizados atualmente para depressão maior são ainda baseados na descoberta dos antidepressivos tricíclicos e inibidores da monoamina oxidase, os quais bloqueiam a recaptação ou degradação de monoaminas (Slattery et al., 2004). Embora acredite-se que estas farmacoterapias são razoavelmente eficazes (Horder et al., 2011), em comparação com as crescentes necessidades da medicina atual, as terapias antidepressivas modernas ainda estão longe do ideal, ainda mais se considerarmos seu início de ação lento e sua alta taxa de pacientes não responsivos (cerca de 25-35%). Ainda, embora os efeitos adversos tenham diminuído com a chegada dos antidepressivos inibidores seletivos da recaptação de serotonina, melhorias são claramente necessárias (Horder et al., 2011).

Uma vez que existem tanto problemas de eficácia quanto de segurança e efetividade com os antidepressivos moduladores do sistema monoaminérgico, tem se buscado entender o papel de outros sistemas na doença, dentre eles o sistema glutamatérgico. Evidências recentes sugerem o envolvimento do sistema glutamatérgico na patofisiologia da depressão maior (Sanacora et al., 2008). *Hashimoto* et al. relatam aumento nos níveis de glutamato no córtex

pré-frontal e occipital de pacientes com depressão maior, bem como maiores níveis de glutamina no córtex occipital (Hashimoto et al., 2007, Hashimoto, 2009). Além disso, vários estudos envolvendo fármacos com atividade moduladora da função glutamatérgica, como lamotrigina (Barbee & Jamhour, 2002, Barbosa et al., 2003, Normann et al., 2002, Rocha & Hara, 2003) e riluzol (Coric et al., 2003, Sanacora et al., 2004, Zarate et al., 2004), mostram eficácia no tratamento de pacientes depressivos resistentes a farmacoterapia tradicional.

Entre os vários receptores de glutamato presentes no sistema nervoso central, as evidências sugerem particularmente o envolvimento dos receptores N-Metil-D-Aspartato (NMDA) na patofisiologia da depressão maior. Desde 1959 foi relatado que agentes que modulam a função do receptor NMDA mostram atividade antidepressiva (Crane, 1959). Estudos mais recentes relatam o efeito singular do antagonista NMDA cetamina (Berman et al., 2000, Kudoh et al., 2002, Ostroff et al., 2005), que mostra atividade antidepressiva com início rápido, de, em média, 4h após sua administração por via intravenosa (Berman et al., 2000). Normalmente, os sintomas depressivos voltam a sua *baseline* em 1 a 2 semanas (Aan Het Rot et al., 2012, Ibrahim et al., 2012). Essas novas observações chamaram novamente a atenção dos pesquisadores para o envolvimento do sistema glutamatérgico na patofisiologia da depressão maior, onde acredita-se cada vez mais que esteja a chave para uma grande melhora na farmacoterapia atualmente disponível para esse transtorno. A descoberta mais recente (Zanos et al., 2016) nesse contexto foi a identificação de um metabólito de cetamina, o qual seria o verdadeiro responsável pelos seus efeitos tipo-antidepressivos – independentes do bloqueio de receptores NMDA e dependentes da ativação de receptores AMPA. De todo modo, ainda há um longo caminho a ser percorrido para que haja uma efetiva melhora na qualidade de vida dos pacientes com depressão maior.

1.4. N-acetilcisteína

Derivada do aminoácido cisteína, a N-acetilcisteína (NAC) é considerada um fármaco bem tolerado e com ampla margem de segurança, e tem sido usado em uma ampla gama de patologias do sistema nervoso central nas últimas décadas (LaRowe et al., 2006). É tradicionalmente reconhecida por seu papel como antídoto em quadros de intoxicação por paracetamol (Green et al., 2013), tendo sido aprovada nos Estados Unidos como protocolo oral desde 1985 (Yarema et al., 2009). Além disso, NAC também é usada como agente mucolítico em quadros de doença pulmonar obstrutiva crônica (Dekhuijzen & van Beurden,

2006), como protetor da função renal em nefropatias induzidas por contraste (Quintavalle et al., 2013), agente preventivo de fibrilação atrial (Liu et al., 2014) e como terapia adjunta em infecções por HIV (De Rosa et al., 2000).

A N-acetilcisteína possui um mecanismo de ação multifacetado, atuando tanto como precursor de glutathione, um dos principais antioxidantes endógenos, quanto no trocador de cistina-glutamato presente em astrócitos, aumentando os níveis de glutamato extrassináptico (Baker et al., 2008). A elevação de glutamato extrassináptico promoverá maior ativação dos receptores metabotrópicos mGlu_{2/3}, levando a uma menor liberação de glutamato e consequente redução na ativação de receptores glutamatérgicos pós sinápticos, especialmente do tipo NMDA (Dean et al., 2011).

Na última década o interesse pelo uso da NAC em transtornos neuropsiquiátricos tem crescido. Evidências baseadas em estudos pré-clínicos sugerem que NAC pode modular processos patofisiológicos que estão envolvidos em diversos transtornos psiquiátricos, incluindo estresse oxidativo, neurogênese e apoptose, disfunção mitocondrial, neuroinflamação e desequilíbrio do sistema desregulação dos sistemas glutamatérgico e dopaminérgico (Dean et al., 2011; Samuni et al., 2013). Sua ação benéfica já foi relatada em transtorno bipolar, esquizofrenia, drogadição e depressão (Berk et al., 2013). Seu mecanismo de ação ao mesmo tempo diversificado e complementar, atuando de forma direta e indireta na neurotransmissão glutamatérgica e dopaminérgica, além das propriedades antioxidante e anti-inflamatório, é compatível com os achados clínicos em várias categorias de transtornos psiquiátricos. Este trabalho visa contribuir com a construção do perfil ansiolítico e antidepressivo de NAC em modelos experimentais, em última análise contribuindo com a elucidação do potencial terapêutico da N-acetilcisteína tanto em transtornos de ansiedade quanto em estados depressivos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Verificar os efeitos da N-acetilcisteína nas alterações comportamentais induzidas por estresse sub-crônico por contenção em camundongos.

2.2. Objetivos Específico

São objetivos específicos deste projeto trabalho verificar os efeitos da N-acetilcisteína em camundongos BALB/c submetidos a estresse por contenção quanto a:

- (i). Tempo de imobilidade no teste de suspensão pela cauda (TST);
- (ii). Parâmetros de ansiedade no teste claro-escuro (TCE);
- (iii). Parâmetros de ansiedade e locomoção no teste de campo aberto (TCA);
- (iv). Variação de peso corporal.

3. ARTIGO CIENTÍFICO

Artigo elaborado segundo as normas da revista NEUROPHARMACOLOGY. Disponível em:
<<http://www.elsevier.com/journals/neuropharmacology/0028-3908/guide-for-authors>>.

EFEITOS DA N-ACETILCISTEÍNA NO MODELO DE ESTRESSE SUB-CRÔNICO POR CONTENÇÃO EM CAMUNDONGOS BALB/c

**Franciele Kich Giongo^{1*}, Luíza Schneider Fortes¹, Patrícia Santos¹, Ana Paula Herrmann²,
Elaine Elisabetsky ¹**

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

2. Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Chapecó. Rodovia SC-484, km 2, Chapecó, SC, 89801-001, Brasil.

*Autor correspondente:

Tel: (51) 83494865; Email: franciele.giongo@gmail.com (Franciele Kich Giongo)

RESUMO

Introdução: Estresse vem sendo associado à patogênese de diversos transtornos neuropsiquiátricos, incluindo transtornos de ansiedade e depressão maior. Estima-se que estes transtornos afetem parcela significativa da população, sendo altamente debilitantes afetando a qualidade de vida do indivíduo de forma pontual ou contínua. Nas últimas décadas, o sistema glutamatérgico tem se destacado como alvo de novos fármacos em psiquiatria. A N-acetilcisteína (NAC) é um modulador glutamatérgico com ampla margem de segurança, tendo sido aprovado para uso como antídoto em casos de intoxicação por paracetamol e como mucolítico. Recentemente, devido a sua ação também como modulador glutamatérgico, NAC vem mostrando efeitos benéficos em diversos transtornos neuropsiquiátricos. No entanto há poucos estudos relacionados à ansiedade. **Objetivo:** Verificar se a NAC protege camundongos contra alterações comportamentais (tipo depressão e ansiedade) no modelo de estresse sub crônico por contenção. **Métodos:** Camundongos BALB/c foram submetidos a estresse por contenção durante 10 dias com administração por via intraperitoneal de imipramina (20 mg/kg) ou NAC (30 e 100 mg/kg) durante os últimos 5 dias. No 11º dia foram realizados os testes de suspensão pela cauda (TST), campo aberto e claro-escuro. O peso dos animais foi monitorado diariamente. Os resultados foram analisados por ANOVA de duas ou três vias, conforme apropriado. **Resultados:** O estresse induziu diminuição do tempo despendido no centro da arena de campo aberto e ganho de peso em relação aos controles não estressados. Não houve diferença relevante entre os grupos nos testes de suspensão pela cauda e/ou claro-escuro. **Discussão:** O estresse não foi capaz de produzir comportamento tipo ansioso e tipo depressivo de maneira consistente. Embora os resultados sejam estatisticamente significativos no teste de campo aberto e ganho de peso, estes apresentam alta variabilidade e não puderam ser validados com as drogas conhecidas. Alterações no tempo de estresse, testes comportamentais e esquema de tratamento são necessárias para a validação do modelo.

Palavras-chave: N-acetilcisteína, estresse por contenção, ansiedade, depressão maior, teste de suspensão pela cauda, claro-escuro.

1. Introdução

O relatório anual da Organização Mundial da Saúde mostra que aproximadamente 450 milhões de pessoas sofrem de transtornos psiquiátricos, e estima que até 2020 estes representem 15% do número total de doenças (Mangala et al., 2011). Mundialmente, há cerca de 10 a 20 milhões de tentativas de suicídio anualmente associadas a transtornos mentais (Mangala et al., 2011). Infelizmente, transtornos tais como ansiedade e depressão maior são, além de mal diagnosticados, tratados muitas vezes de forma equivocada (Katzman et al., 2014). Somado a isso, a maioria dos ansiolíticos e antidepressivos clinicamente disponíveis não demonstram eficácia em boa parte dos pacientes, além de possuírem diversos efeitos adversos, início de ação lento e baixa adesão (Mesfin et al., 2014, Sulakhiya et al., 2014).

O estresse vem sendo extensivamente associado à patogenia de diversos transtornos neuropsiquiátricos, incluindo transtornos de ansiedade e depressão maior (Calabrese et al., 2011, Kumar et al., 2010, Singh & Yadav, 2014). Estresse pode ser definido como um estado em que o corpo tenta restabelecer a homeostase através de mudanças adaptativas tanto fisiológicas como comportamentais, as quais dependerão da severidade, tipo e duração do evento estressor (Budni et al., 2013). Eventos estressores também estão ligados à indução de respostas imunológicas e neurocomportamentais, como ansiedade, depressão, prejuízo cognitivo, insônia, anorexia e ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), resultando em níveis elevados de corticosterona/cortisol em animais e humanos (Umadevi & Subakanmani, 2012, Tabassum et al., 2010). Além disso, o estresse exerce efeitos prejudiciais às funções celulares devido ao aumento da produção de radicais livres e consequente dano oxidativo (Kumar et al., 2010). Enquanto os transtornos de ansiedade vêm sendo relacionados tanto com a diminuição quanto com o aumento dos níveis de cortisol (Bonne et al., 2003; Chaudieu et al., 2008, Greaves-Lord et al., 2007, Kallen et al., 2008), a depressão maior se correlaciona exclusivamente com níveis elevados de cortisol (hipercortisolemia) (Brown et al., 2004, Gunnar & Vazquez, 2001, Egeland et al., 2005, Stetler & Miller, 2011).

A N-acetilcisteína (NAC) é um modulador glutamatérgico que tem sido apontado recentemente como um fármaco com diversos benefícios terapêuticos, inclusive em transtornos neuropsiquiátricos. Há um crescente número de estudos na literatura envolvendo NAC e transtornos neuropsiquiátricos, os quais demonstram a sua ação benéfica em transtorno bipolar, esquizofrenia, drogadição a uma variedade de drogas de abuso e depressão (Berk et al., 2013; Deepmala et al., 2015). O efeito positivo de NAC em transtornos psiquiátricos variados provavelmente está associado ao mecanismo de ação distinto da NAC, que atua de forma direta e indireta na neurotransmissão glutamatérgica e dopaminérgica,

além de ser um potente antioxidante e anti-inflamatório inclusive no sistema nervoso central. O objetivo deste trabalho é contribuir para a construção do perfil psicofarmacológico da NAC, verificando o efeito de NAC num modelo de estresse sub agudo em camundongos.

2. Materiais e Métodos

2.1. Animais

Camundongos machos adultos da linhagem BALB/c (60 dias) foram obtidos da Universidade Federal de Pelotas (UFPel) e alojados no biotério setorial do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) durante as duas semanas que precederam os experimentos. Os animais foram mantidos em ambiente controlado com temperatura entre 20 e 24°C, umidade relativa do ar entre 40-60% e ciclo claro/escuro de 12h/12h (luzes acesas às 07:00). Os animais foram alimentados com ração padrão para espécie e água *ad libitum*. Este projeto foi aprovado (# 30118) pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Os animais foram tratados de acordo com as normas da Universidade para projetos desta natureza.

2.2. Drogas

Foram utilizadas N-acetilcisteína (Sigma; St Louis, USA), imipramina (Sigma; St Louis, USA) e solução salina (NaCl 0,9%). As drogas foram diluídas em solução salina e administradas no volume de 0,1 mL/10 g de peso corporal, por via intraperitoneal.

2.3. Desenho Experimental

Após o período de aclimação, os animais foram divididos aleatoriamente entre os grupos. Os animais do grupo estresse foram isolados (1 animal/caixa moradia) no primeiro dia de experimento, permanecendo assim, quando foram submetidos diariamente ao protocolo de estresse por contenção, até o final dos experimentos. Os animais do grupo controle permaneceram agrupados (5 animais/caixa moradia). A partir do 6º dia os animais foram tratados diariamente por 5 dias com solução salina, imipramina 20 mg/kg, NAC 30 mg/kg ou NAC 100 mg/kg. Os experimentos comportamentais foram realizados no décimo primeiro dia de experimentos. O teste de suspensão pela cauda (TST) foi realizado entre 9h-11h da manhã, seguido pelo teste de campo aberto (TCA) com um intervalo de no mínimo 15 minutos do TST. O teste de claro-escuro (TCE) foi realizado no período da tarde, entre as 16h-18h. Os animais foram pesados todos os dias antes do início da contenção.

2.4. Estresse sub-crônico por contenção

Baseado na metodologia descrita por Ramirez *et al* (2015), o estresse por contenção foi realizado durante 10 dias e consistiu em deixar os animais em contenção em sacos plásticos usados em confeitaria e similares a DecapiCones durante 3h/dia. As sessões de estresse foram realizadas entre 12h-16h. Os animais do grupo controle permaneceram em suas caixas-moradia em uma sala diferente da utilizada pelos animais submetidos aos estresse, sem acesso a água e comida durante as mesmas 3h durante as quais os animais não controle ficavam em contenção.

2.5. Testes comportamentais

2.5.1. Teste de suspensão pela cauda (TST)

A metodologia utilizada no teste de suspensão pela cauda (*tail suspension test*) foi a relatada por Steru *et al.* (1985) e adaptada para o nosso laboratório (Linck *et al.*, 2012, Costa-Campos *et al.*, 2013). Os animais foram suspensos pela porção terminal de suas caudas (com uma fita adesiva) em um aparato a uma altura de 50 cm acima de uma superfície. Foi avaliada a duração da imobilidade durante 6 minutos; os animais foram considerados imóveis apenas quando se balançavam passivamente ou permaneceram com movimentação mínima. Após os experimentos, os animais retornaram à caixa moradia.

2.5.2. Campo Aberto

Para descartar falsos positivos no teste de suspensão pela cauda e reações não-específicas dos tratamentos farmacológicos, os animais foram testados quanto a atividade locomotora em arenas de campo aberto feitas de melamina na cor cinza (40 x 40 x 40 cm). A atividade locomotora total (locomoção) dos camundongos foi avaliada no 11^o dia de experimentos, no período da manhã, durante 10 minutos. Além disso, foram avaliados os tempos despendidos na periferia e parte central da arena já que os animais naturalmente tendem a passar mais tempo explorando a periferia da arena por se tratar de um ambiente mais protegido, normalmente em contato com as paredes (tigmotaxia). Alterações no tempo despendido no centro são correlacionáveis com estados de maior (menor tempo no centro) ou menor (maior tempo no centro) ansiedade e usados para caracterizar efeitos ansiogênicos e/ou ansiolíticos (Holmes *et al.*, 2003). O teste foi filmado e os comportamentos posteriormente analisado com o software ANY-Maze (Stoelting Co).

2.5.3. Claro-escuro

Seguiu-se a metodologia descrita por *Piato et al.* (2010). O aparato consiste em uma caixa de madeira retangular (46 x 27 x 30 cm), dividida em uma área menor (18 x 27 cm) e uma área maior (27 x 27cm) com uma abertura (7.5 x 7.5 cm) entre elas. O compartimento menor consiste em um ambiente de cor preta não iluminado, enquanto que o compartimento maior é de cor branca e iluminado com uma lâmpada de 60W. Os animais foram colocados individualmente no compartimento claro de costas para a abertura e o experimento foi gravado por 5 minutos por uma câmera digital. A latência para o primeiro cruzamento entre os compartimentos, o tempo de permanência no compartimento claro e o número de cruzamentos entre compartimentos foram avaliados.

2.6 Análise estatística

Os dados foram analisados pelo teste de análise de variância (ANOVA) de duas ou três vias, conforme apropriado. Foi utilizado o programa GraphPad Prism 7.0 e SPSS 8.0 para Windows. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$. Os valores foram expressos em média \pm erro padrão da média (EPM).

3. Resultados

Os animais estressados mostraram uma diminuição significativa no tempo de imobilidade no Teste de Suspensão pela Cauda (TST) em comparação ao grupo controle ($F_{1,71} = 35.36$, $P < 0.0001$, Fig 2); os tratamentos não apresentaram nenhuma influência neste resultado ($F_{3,71} = 1.947$, $P = 0.1299$, Fig 2) e não houve interação entre os fatores ($F_{3,71} = 0.3683$, $P = 0.7761$).

Não houve diferença significativa entre os grupos quanto ao tempo no claro por influência do fator estresse ($F_{1,67} = 0.3054$, $P = 0.5823$, Fig 3), tratamento ($F_{3,67} = 1.696$, $P = 0.1763$, Fig 3) ou interação entre os fatores ($F_{3,67} = 0.3379$, $P = 0.7980$).

No teste de campo aberto os animais estressados apresentaram uma diminuição significativa no tempo gasto no centro em relação ao grupo controle ($F_{1,71} = 13.13$, $P = 0.0005$, Fig 4A), bem como um aumento do tempo gasto na periferia ($F_{1,71} = 11.99$, $P = 0.0009$, Fig 4B). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos quanto à distância total percorrida por influência do fator estresse ($F_{1,71} = 3.229$, $P = 0.0766$, Fig 4C) e tampouco pelos tratamentos ($F_{3,71} = 0.2877$, $P = 0.8341$).

Observaram-se alterações significativas no peso corporal dos animais ao longo dos 11 dias de experimento ($F_{10, 710} = 15.49$, $P < 0.0001$, Fig. 5), sendo que os animais estressados

perderam peso, enquanto os grupos não-estressados ganharam peso ($F_{1, 710} = 49.06$, $P < 0.0001$). Também foi observada interação entre os fatores estresse \times tempo ($F_{10, 710} = 38.02$, $P < 0.0001$).

4. Discussão

O estresse sub-crônico por contenção executado neste trabalho tinha por objetivo disponibilizar um modelo de estresse sustentado. O modelo proposto por Ramirez et al. (2015), embora focado em optogenética, apresenta resultados relevantes a este trabalho, como um aumento robusto no tempo de imobilidade dos animais estressados, diminuição do ganho de peso, além do aumento do comportamento ansioso no teste de campo aberto e labirinto em cruz elevado. Em nosso laboratório, ao final dos 10 dias de estresse por contenção os animais estressados apresentaram uma significativa diminuição no ganho de peso, bem como um aumento significativo do comportamento tipo ansioso no teste de campo aberto. No entanto, os animais estressados mostram uma diminuição significativa no tempo de imobilidade.

O estresse sustentado tem sido extensivamente relacionado a patogênese de diversas doenças, incluindo transtornos psiquiátricos tais como ansiedade e depressão (de Kloet, 2003, Sapolsky et al., 2000). Estímulos estressores desencadeiam mecanismos adaptativos, visando o restabelecimento tanto da homeostase fisiológica quanto comportamental; entretanto diversos estudos mostram que disfunções no eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) poderiam estar envolvidas com a manifestação dos sintomas depressivos e com o transtorno de ansiedade (Brown et al., 2004, Chaudieu et al., 2008, Stetler & Miller, 2011).

O teste de suspensão pela cauda (TST) mostrou que os animais do grupo estresse, independente do tratamento, apresentaram uma diminuição no tempo de imobilidade. Esse resultado é contrário ao esperado, já que estresse sustentado é considerado fator desencadeante de quadros depressivos e também o oposto do relatado pelos autores do trabalho de referência (Ramirez et al., 2015). Algumas variáveis podem ter contribuído para o resultado inesperado. O modelo consagrado de estresse crônico imprevisível requer 6 semanas de estresse variável para induzir comportamento tipo depressivo (Willner et al., 1992), portanto, os 10 dias deste modelo podem ter sido insuficientes. De todo modo, este fato não explica a diminuição do tempo de imobilidade dos animais estressados, a não ser que se considere que a ansiedade destes animais (vide abaixo) tenha interferido decisivamente no comportamento do TST. Ademais, os animais estressados podem estar na primeira fase da Síndrome de Adaptação Geral (SAG) descrita por Selye (1946), reforçando o fato de que o estresse produzido pode não ter sido suficiente para produzir comportamento tipo-depressivo.

Na primeira fase da SAG, ocorre ativação do sistema simpático, o que, comparativamente, pode ser visto neste trabalho pela tendência de aumento da distância total percorrida no teste de campo aberto dos animais estressados (Figura 4C). Quanto ao resultado de imipramina, a diminuição do tempo de imobilidade não foi significativa, insuficiente, portanto, para validação do modelo. Entre as razões possíveis para esse resultado podemos elencar a inadequação do laboratório disponível para este trabalho que certamente contribuiu para a variabilidade dos resultados, além do tempo de administração de imipramina.

Quanto ao comportamento tipo ansioso, os animais submetidos ao estresse não mostraram nenhuma diferença em comparação aos animais controle no teste de claro-escuro. Muito se vem discutindo sobre o comportamento dos animais BALB/c em testes comportamentais: ao mesmo tempo que esta linhagem é naturalmente mais sensível ao estresse (Browne et al., 2011, Shanks et al., 1990), *Kastenberger et al.* (2012) afirma que esta linhagem é muito tímida no teste de claro-escuro, não sendo a mais adequada para avaliação de tempo no claro. Os resultados obtidos, além de não apresentarem nenhuma diferença significativa entre os grupos (fator estresse ou tratamento) mostram alta variabilidade, sendo, desta maneira, inconclusivos. Por outro lado, o estresse sustentado foi capaz de produzir comportamento ansiogênico consistente expresso na diminuição do tempo dispendido no centro no teste de campo aberto. Nenhum dos tratamentos foi capaz de amenizar o efeito ansiogênico do estresse; não se pode descartar que outros esquemas de tratamentos levassem a resultado diverso. O fato do comportamento ansiogênico ter sido observado no teste de campo aberto pode ser considerado mais um motivo para se acreditar que o teste de claro-escuro não foi mais adequado para mensurar a ansiedade nos camundongos BALB/c. Há ainda que se considerar que outros testes comportamentais, tais como labirinto em cruz elevado e placa perfurada, foram capazes de documentar que o estresse – sustentado ou não – induziu comportamento tipo ansioso em roedores (Biala et al., 2016, Mesa-Gresa et al., 2016, Sulakhiya et al., 2016). Em relação ao peso corporal os animais submetidos ao estresse apresentaram uma significativa diminuição do ganho de peso, tal como observado por *Ramirez et al.* (2015).

O efeito patogênico do estresse vem sendo associado a mudanças cerebrais de longo termo, como a cascata de eventos ocasionada pela liberação de cortisol/corticosterona (Magariños et al., 1996, Vyas et al., 2002, Cook & Wellman, 2004) e ao excesso da produção de espécies reativas de oxigênio (Abidin et al., 2004, Garcia-Bueno et al., 2005), essas mudanças cerebrais levariam a disfunções cerebrais ligadas ao comportamento ansioso e ao comportamento tipo depressivo. *Kim & Han* (2006) discutem a importância da duração do

estresse por contenção em camundongos, e afirmam que o fator crucial para que o comportamento ansioso e tipo depressivo se manifestem é a repetição dos dias de estresse, e não sua duração total em horas ou a duração diária do estresse. Segundo os autores um protocolo de estresse por contenção de 2h/dia com duração de 14 dias, mostrou-se mais eficaz em comparação a um protocolo de estresse de 6h/dia com duração de 10 dias, 2h/dia com duração de 7 dias ou 2h/dia durante 10 dias. Pertinente a esse trabalho, discutem ainda a heterogeneidade de protocolos de estresse por contenção, sobre os quais não há uma clara explicação do porquê diferentes parâmetros são utilizados e porque um estresse de 2h/dia de 7 dias difere de outro de 2h/dia com duração de 14 dias. Os autores acreditam que o comportamento ansioso e tipo depressivo podem ser considerados indicadores de que o estresse foi induzido qualitativamente, e, portanto, consideram que 14 dias de estresse por contenção seja o tempo mínimo para que esses comportamentos se manifestassem.

NAC se mostrou ansiolítico em vários outros modelos com administração aguda ou por 4 dias (Noetzold, 2014). Clinicamente tem se sugerido o efeito do NAC em condições onde a ansiedade é prevalente, como em indivíduos que sofrem de ansiedade generalizada e fobia social (Strawn & Saldana, 2012) e em casos de *nail-biting* (Berk et al., 2009, Ghanizadeh et al., 2013). Assim, acreditamos que os resultados negativos desse trabalho, por estarem associados a vários problemas metodológicos, não devem ser considerados como evidência da ausência de efeito ansiolítico do NAC.

5. Agradecimentos

Os autores são gratos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (F.K.G. e E.E.).

6. Referências

- Abidin, I., Yargicoglu, P., Agar, A., Gumuslu, S., Aydin, S., Ozturk, O., Sahin, E., 2004. The effect of chronic restraint stress on spatial learning and memory: relation to oxidant stress. *Int J Neurosci.* 114, 683-699.
- Berk, M., Jeavons, S., Dean, O.M., Dodd, S., Moss, K., Gama, C.S., Malhi, G.S., 2009. Nail-biting stuff? The effect of N-acetyl cysteine on nail-biting. *CNS Spectr.* 14, 357-360.
- Berk, M., Malhi, G.S., Gray, L.J., Dean, O.M., 2013. The promise of N-acetylcysteine in neuropsychiatry. *Trends Pharmacol Sci.* 34, 167-177.
- Biala, G., Pekala, K., Boguszewska-Czubara, A., Michalak, A., Kruk-Slomka, M., Budzynska, B., 2016. Behavioral and Biochemical Interaction Between Nicotine and Chronic Unpredictable Mild Stress in Mice. *Mol Neurobiol.* [Epub ahead of print].
- Bonne, O., Brandes, D., Segman, R., Piman, R.K., Yehuda, R., Shalev, A., 2003. Prospective evaluation of plasma cortisol in recent trauma survivors with posttraumatic stress disorder. *Psychiatry Res.* 119, 71-175.
- Brown, E.S., Varghese, F.P., McEwen, B.S., 2004. Association of depression with medical illness: does cortisol play a role? *Biol Psychiatry.* 55, 1-9.
- Browne, C.A., Clarke, G., Dinan, T.G., Cryan, J.F., 2011. Differential stress-induced alterations in tryptophan hydroxylase activity and serotonin turnover in two inbred mouse strains. *Neuropharmacology.* 60, 683-691.
- Budni, J., Zomkowski, A.D., Engel, D., Santos, D.B., dos Santos, A.A., Moretti, M., Valvassori, S.S., Ornell, F., Quevedo, J., Farina, M., Rodrigues, A.L., 2013. Folic acid prevents depressive-like behavior and hippocampal antioxidant imbalance induced by restraint stress in mice. *Exp Neurol.* 240, 112-121.
- Calabrese, F., Molteni, R., Riva, M.A., 2011. Antistress properties of antidepressant drugs and their clinical implications. *Pharmacol Ther.* 132, 39-56.
- Chaudieu, I., Beluche, I., Norton, J., Boulenger, J.P., Ritchie, K., Ancelin, M.L., 2008. Abnormal reactions to environmental stress in elderly persons with anxiety disorders: evidence from a population study of diurnal cortisol changes. *J Affect Disord.* 106, 307-313.
- Cook, S.C., Wellman, C.L., 2004. Chronic stress alters dendritic morphology in rat medial prefrontal cortex. *J Neurobiol.* 60, 236-248.

- Costa-Campos, L., Herrmann, A.P., Pilz, L.K., Michels, M., Noetzold, G., Elisabetsky, E., 2013. Interactive effects of N-acetylcysteine and antidepressants. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 44, 125-130.
- de Kloet, E.R., 2003. Hormones, brain and stress. *Endocr Regul*. 37, 51-68.
- Egeland, J., Lund, A., Landro, N.I., Rund, B.R., Sundet, K., Asbjornsen, A., Mjelle, N., Roness, A., Stordal, K.I., 2005. Cortisol level predicts executive and memory function in depression, symptom level predicts psychomotor speed. *Acta Psychiatr Scand*. 112, 434-441.
- Garcia-Bueno, B., Madrigal, J.L., Lizasoain, I., Moro, M.A., Lorenzo, P., Leza, J.C., 2005. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation decreases neuroinflammation in brain after stress in rats. *Biol Psychiatry*. 57, 885-894.
- Ghanizadeh, A., Derakhshan, N., Berk, M., 2013. N-acetylcysteine versus placebo for treating nail biting, a double blind randomized placebo controlled clinical trial. *Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem*. 12, 223-228.
- Greaves-Lord, K., Ferdinand, R.F., Oldehinkel, A.J., Sondeijker, F.E., Ormel, J., Verhulst, F.C., 2007. Higher cortisol awakening response in young adolescents with persistent anxiety problems. *Acta Psychiatr Scand*. 116, 137-144.
- Gunnar, M.R., Vazquez, D.M., 2001. Low cortisol and a flattening of expected daytime rhythm: potential indices of risk in human development. *Dev Psychopathol*. 13, 515-538.
- Holmes, A., Kinney, J.W., Wrenn, C.C., Li, Q., Yang, R.J., Ma, L., Vishwanath, J., Saavedra, M.C., Innerfield, C.E., Jacoby, A.S., Shine, J., Iismaa, T.P., Crawley, J.N., 2003. Galanin GAL-R1 receptor null mutant mice display increased anxiety-like behavior specific to the elevated plus-maze. *Neuropsychopharmacology*. 28, 1031-1044.
- Kallen, V.L., Tulen, J.H., Utens, E.M., Treffers, P.D., De Jong, F.H., Ferdinand, R.F., 2008. Associations between HPA axis functioning and level of anxiety in children and adolescents with an anxiety disorder. *Depress Anxiety*. 25, 131-41.
- Kastenberger, I., Lutsch, C., Herzog, H., Schwarzer, C., 2012. Influence of sex and genetic background on anxiety-related and stress-induced behaviour of prodynorphin-deficient mice. *PLoS One*. 7, e34251.
- Katzman, M.A., Bleau, P., Blier, P., Chokka, P., Kjernisted, K., Van Ameringen, M., Canadian Anxiety Guidelines Initiative Group on behalf of the Anxiety Disorders Association of Canada/Association Canadienne des troubles anxieux and McGill University., Antony, M.M., Bouchard, S., Brunet, A., Flament, M., Grigoriadis, S.,

- Mendlowitz, S., O'Connor, K., Rabheru, K., Richter, P.M., Robichaud, M., Walker, J.R., 2014. Canadian clinical practice guidelines for the management of anxiety, posttraumatic stress and obsessive-compulsive disorders. *BMC Psychiatry*. 14, Suppl 1:S1.
- Kim, K.S., Han, P.L., 2006. Optimization of chronic stress paradigms using anxiety- and depression-like behavioral parameters. *J Neurosci Res*. 83, 497-507.
- Kumar, A., Garg, R., Prakash, A.K., 2010. Effect of St. John's Wort (*Hypericum perforatum*) treatment on restraint stress-induced behavioral and biochemical alteration in mice. *BMC Complement Altern Med*. 10, 18.
- Linck, V.M., Costa-Campos, L., Pilz, L.K., Garcia, C.R., Elisabetsky, E., 2012. AMPA glutamate receptors mediate the antidepressant-like effects of N-acetylcysteine in the mouse tail suspension test. *Behav Pharmacol*. 23, 171-177.
- Magariños, A.M., McEwen, B.S., Flugge, G., Fuchs, E., 1996. Chronic psychosocial stress causes apical dendritic atrophy of hippocampal CA3 pyramidal neurons in subordinate tree shrews. *J Neurosci*. 16, 3534-3540.
- Mangala, L., Santosh, P., Venugopl, R., Nilakash, A.S., Kunjibhari, S., 2011. Antidepressant activity of methanolic extract of *Passiflora foetida* leaves in mice. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 3, 112-115.
- Mesa-Gresa, P., Ramos-Campos, M., Redolat, R., 2016. Corticosterone levels and behavioral changes induced by simultaneous exposure to chronic social stress and enriched environments in NMRI male mice. *Physiol Behav*. 158, 6-17.
- Mesfin, M., Asres, K., Shibeshi, W., 2014. Evaluation of anxiolytic activity of the essential oil of the aerial part of *Foeniculum vulgare* Miller in mice. *BMC Complement Altern Med*. 14, 310.
- Noetzold, G., 2014. Efeitos da N-acetilcisteína em modelos experimentais de ansiedade. In. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 1-31.
- Piato, A.L., Detanico, B.C., Linck, V.M., Herrmann, A.P., Nunes, D.S., Elisabetsky, E., 2010. Anti-stress effects of the "tonic" *Ptychopetalum olacoides* (Marapuama) in mice. *Phytomedicine*. 17, 248-253.
- Ramirez, S., Liu, X., MacDonald, C.J., Moffa, A., Zhou, J., Redondo, R.L., Tonegawa, S., 2015. Activating positive memory engrams suppresses depression-like behaviour. *Nature*. 522, 335-339.

- Sapolsky, R.M., Romero, L.M., Munck, A.U., 2000. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr Rev.* 21, 55-89.
- Selye, H., 1946. The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation. *The Journal of Clinical Endocrinology.* 6, 117-230.
- Shanks, N., Griffiths, J., Zalzman, S., Zacharko, R.M., Anisman, H., 1990. Mouse strain differences in plasma corticosterone following uncontrollable footshock. *Pharmacol Biochem Behav.* 36, 515-519.
- Singh, S., Yadav, A.K., 2014. Protection of stress induced behavioural and physiological alteration by *Marsilea quadrifolia* in rodents. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research.* 6, 2207-2217.
- 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.
- Stetler C., Miller, G.E., 2011. Depression and hypothalamic-pituitary-adrenal activation: a quantitative summary of four decades of research. *Psychosom Med.* 73, 114-126.
- Strawn, J.R., Saldana, S.N., 2012. Treatment with adjunctive N-acetylcysteine in an adolescent with selective serotonin reuptake inhibitor-resistant anxiety. *J Child Adolesc Psychopharmacol.* 22, 472-473.
- Sulakhiya, K., Kumar, P., Jangra, A., Dwivedi, S., Hazarika, N.K., Baruah, C.C., Lahkar, M., 2014. Honokiol abrogates lipopolysaccharide-induced depressive like behavior by impeding neuroinflammation and oxido-nitrosative stress in mice. *Eur J Pharmacol.* 744, 124-131.
- Sulakhiya, K., Patel, V.K., Saxena, R., Dashore, J., Srivastava, A.K., Rathore, M., 2016. Effect of *Beta vulgaris* Linn. Leaves Extract on Anxiety- and Depressive-like Behavior and Oxidative Stress in Mice after Acute Restraint Stress. *Pharmacognosy Res.* 8, 1-7.
- Tabassum, I., Siddiqui, Z.N., Rizvi, S.J., 2010. Effects of *Ocimum sanctum* and *Camellia sinensis* on stress-induced anxiety and depression in male albino *Rattus norvegicus*. *Indian J Pharmacol.* 42, 283-288.
- Umadevi, P., Subakanmani, S., 2012. Evaluation of Anxiolytic potential of ethanolic extract of *Hypericum hookerianum* in stress induced Swiss albino mice. *International Research Journal of Pharmacy.* 3, 219-225.

- Vyas, A., Mitra, R., Shankaranarayana Rao, B.S., Chattarji, S., 2002. Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons. *J Neurosci.* 22, 6810-6818.
- Willner, P., Muscat, R., Papp, M., 1992. Chronic mild stress-induced anhedonia: a realistic animal model of depression. *Neurosci Biobehav Rev.* 16:525-534.

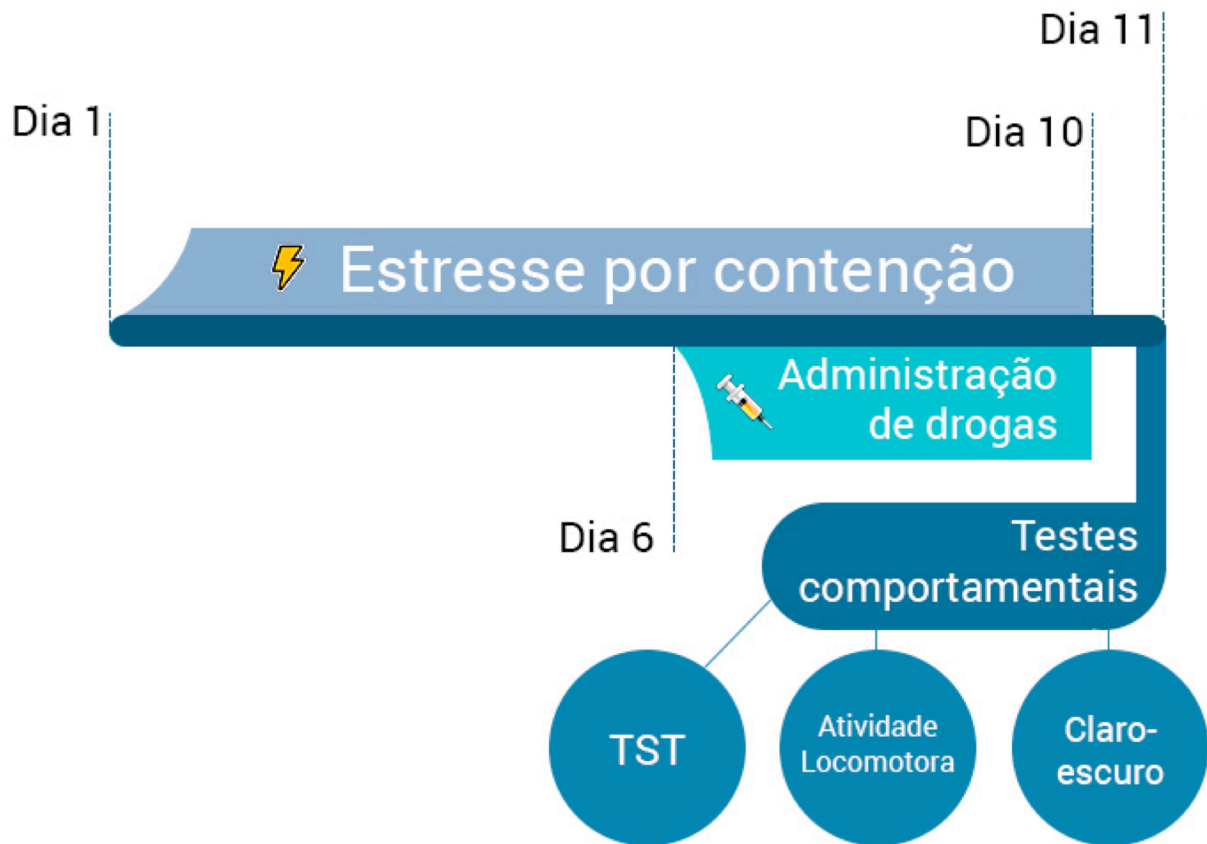


Figura 1. Desenho experimental. Após duas semanas de habituação, os animais do grupo estresse foram isolados e submetidos a 10 dias de estresse por contenção. Os animais do grupo controle permaneceram agrupados e em sua caixa-moradia durante todo experimento. Após o quinto dia de estresse, os animais receberam tratamento diário de solução salina, imipramina (20 mg/kg) ou N-acetilcisteína (30 mg/kg ou 100 mg/kg). Os testes comportamentais foram realizados no décimo primeiro dia na ordem em que são mostrados acima. TST = teste de suspensão pela cauda.

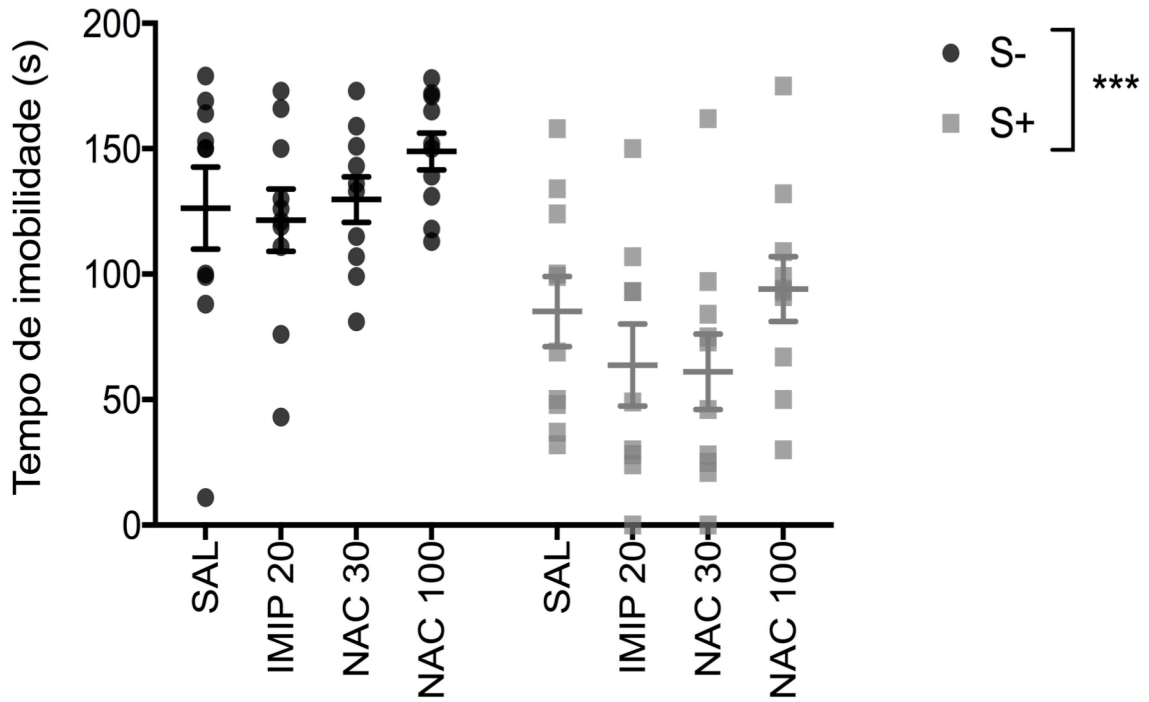


Figura 2. Efeitos do estresse por contenção e tratamentos no teste de suspensão pela causa (TST). Dados expressos em média \pm EPM. n= 9-10. IMIP = imipramina (20 mg/kg) e NAC = N-acetilcisteína (30 e 100 mg/kg). ***P< 0.001 vs. grupo S-. ANOVA de duas vias.

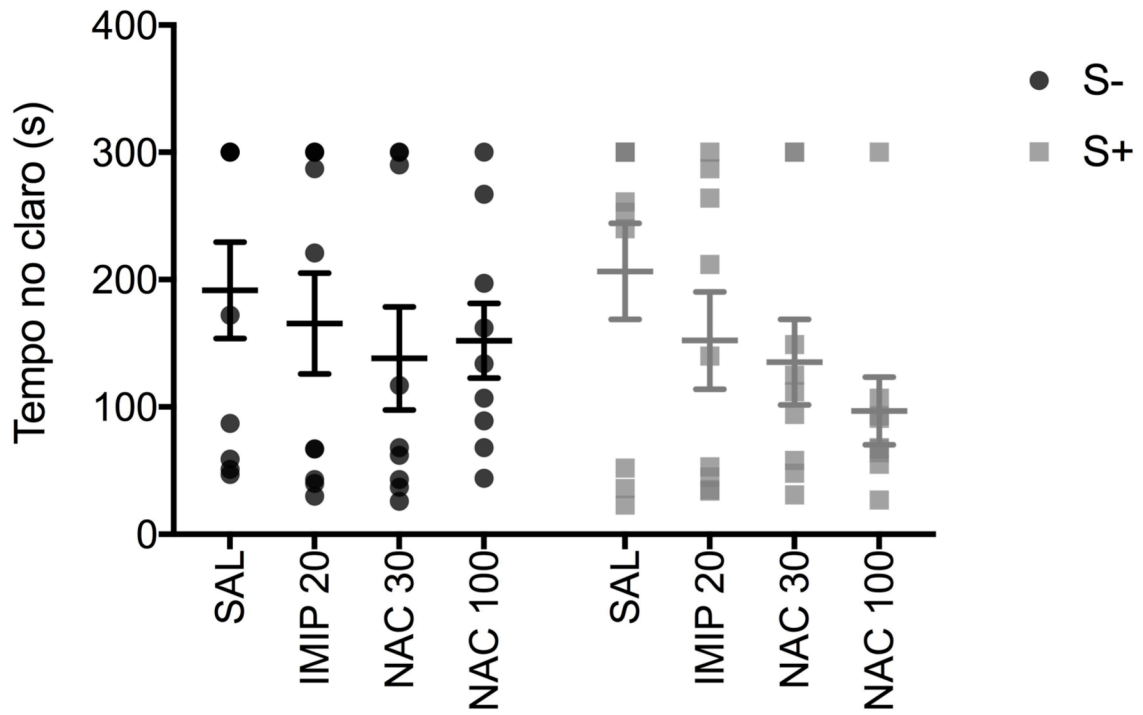


Figura 3. Efeitos do estresse por contenção e tratamentos no teste de claro-escuro. Dados expressos em média \pm EPM. $n= 9-10$. IMIP = Imipramina (20 mg/kg) e NAC = N-acetilcisteína (30 e 100 mg/kg). ANOVA de duas vias.

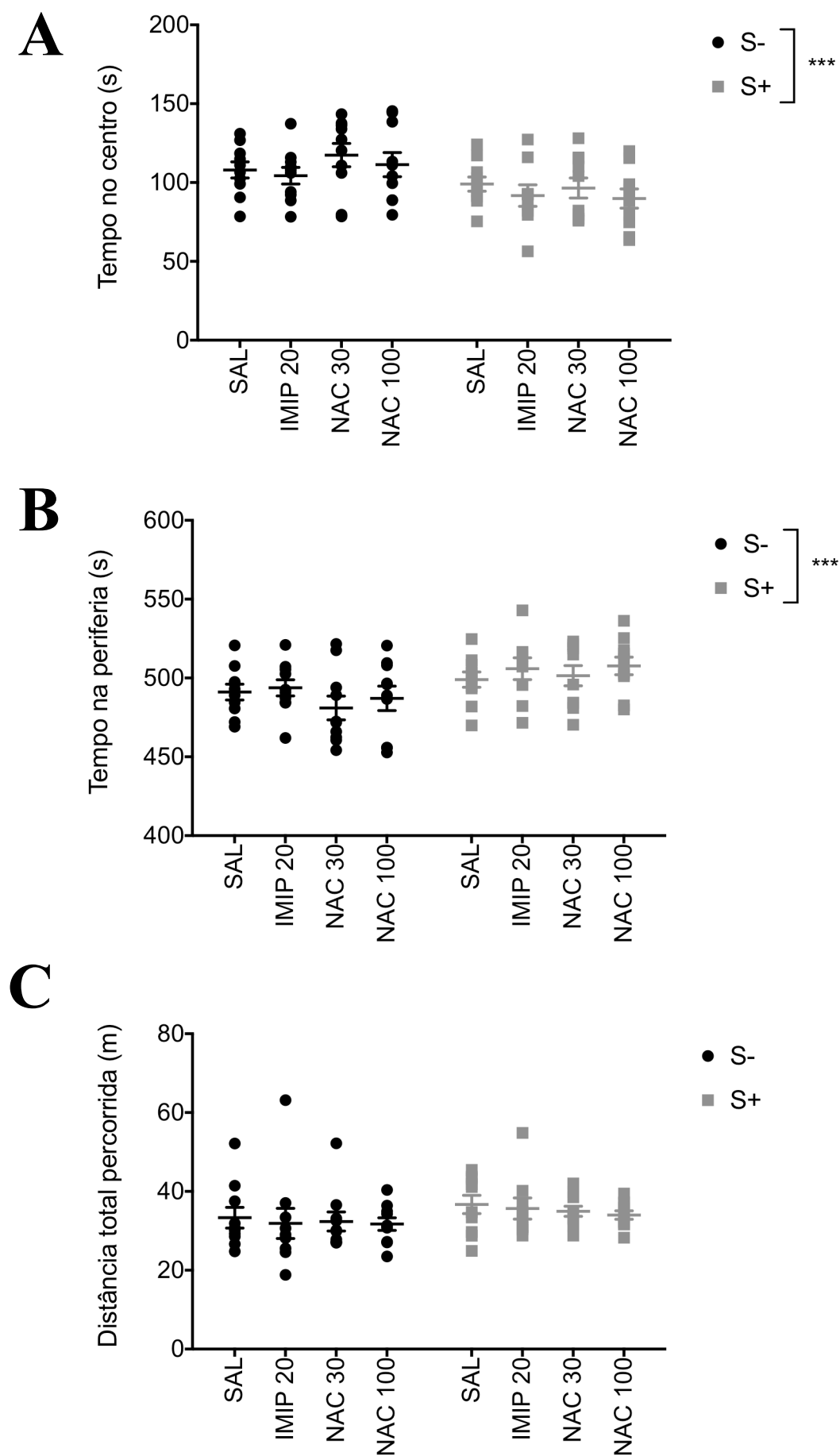


Figura 4. Efeitos do estresse por contenção e tratamentos no teste de campo aberto. (A) Tempo no centro. (B) Tempo na periferia. (C) Distância percorrida total. Dados expressos em média \pm EPM. $n = 9-10$. IMIP = imipramina (20 mg/kg) e NAC = N-acetilcisteína (30 e 100 mg/kg). *** $P < 0.001$ vs. grupo S-. ANOVA de duas vias.

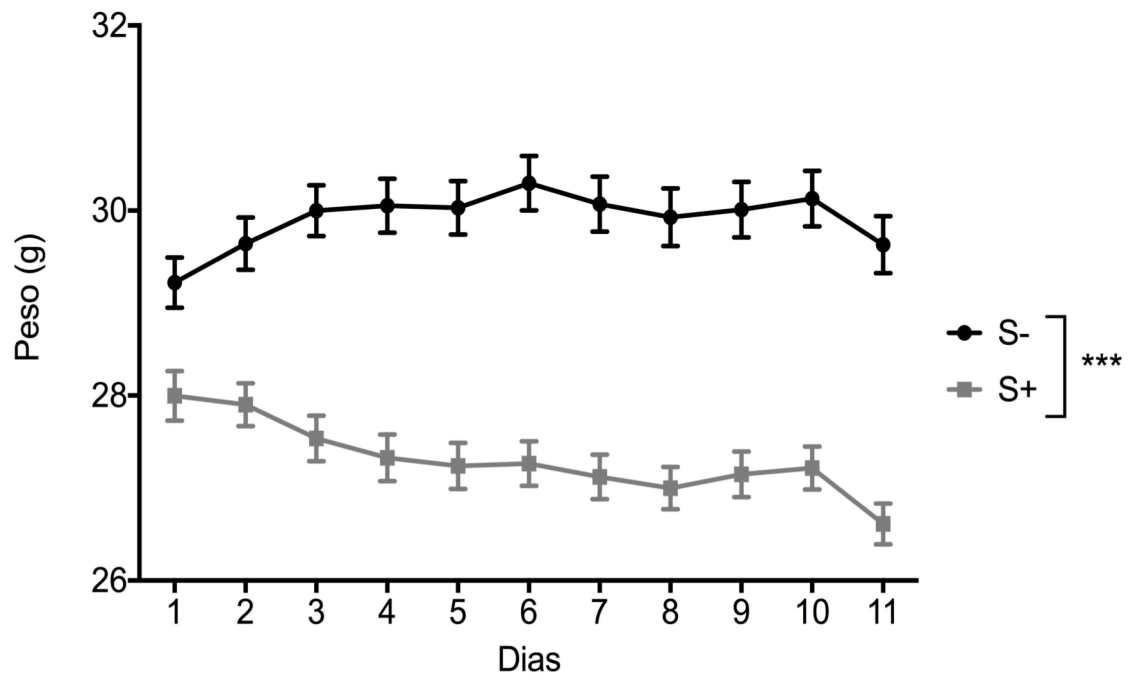


Figura 5. Efeitos do estresse por contenção no peso. Dados expressos em média \pm EPM. $n= 9-10$. *** $P < 0.001$ vs. grupo S-. ANOVA de três vias.

4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Este estudo mostrou que, apesar do estresse ter mostrado resultados significativos nos testes utilizados, o modelo não foi capaz de induzir sintomas tipo depressivos e tipo ansiosos de maneira consistente. Dentre os vários problemas do modelo, julga-se imprescindível a disponibilidade de laboratório adequado, e o aumento do tempo de estresse para indução consistente de comportamento tipo ansioso e depressivo, melhora no esquema de tratamento, e o uso de cepas diferentes de camundongos compatíveis com a variedade de testes comportamentais. Uma vez estabelecido o modelo, a perspectiva é testar o efeito do NAC, associado ou não a fármacos tradicionais, a fim de contribuir com a construção de seu perfil psicofarmacológico relevante a transtornos de ansiedade e depressão.

REFERÊNCIAS

- Aan Het Rot, M., Zarate, C.A. Jr., Charney, D.S., Mathew, S.J., 2012. Ketamine for depression: where do we go from here? *Biol Psychiatry*. 72, 537-547.
- Association AP., 2000. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. 4 ed. Washington, DC: American Psychiatric Association.
- Association AP., 2013. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. 5 ed. Arlington, VA: American Psychiatric Publishing.
- Baker, D.A., Madayag, A., Kristiansen, L.V., Meador-Woodruff, J.H., Haroutunian, V., Raju, I., 2008. Contribution of cystine–glutamate antiporters to the psychotomimetic effects of phencyclidine. *Neuropsychopharmacology* 33, 1760–1772.
- Barbee, J.G., Jamhour, N.J., 2002. Lamotrigine as an augmentation agent in treatment-resistant depression. *J Clin Psychiatry*. 63, 737-741.
- Barbosa, L., Berk, M., Vorster, M., 2003. A double-blind, randomized, placebo-controlled trial of augmentation with lamotrigine or placebo in patients concomitantly treated with fluoxetine for resistant major depressive episodes. *J Clin Psychiatry*. 64, 403-407.
- Belzung, C., Willner, P., Philippot, P., 2015. Depression: from psychopathology to pathophysiology. *Curr Opin Neurobiol*. 30, 24-30.
- Berk, M., Malhi, G.S., Gray, L.J., Dean, O.M., 2013. The promise of N-acetylcysteine in neuropsychiatry. *Trends Pharmacol. Sci*. 34, 167–177.
- Berman, R.M., Cappiello, A., Anand, A., Oren, D.A., Heninger, G.R., Charney, D.S., Krystal, J.H., 2000. Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. *Biol Psychiatry*. 47, 351-354.
- Brown, E.S., Varghese, F.P., McEwen, B.S., 2004. Association of depression with medical illness: does cortisol play a role? *Biol Psychiatry*. 55, 1-9.
- Bschor, T., Bauer, M., Adli, M., 2014. Chronic and treatment resistant depression: diagnosis and stepwise therapy. *Dtsch Arztebl Int*. 111, 766-775; quiz 775.
- Bystritsky, A., 2006. Treatment-resistant anxiety disorders. *Mol Psychiatry*. 11, 805-814.
- Cannon, W.B., editor., 1932. *The Wisdom of the Body*. New York: W. W. Norton Co.
- Cannon, W.B., editor., 1915. *Changes in Pain, Hunger, Fear and Rage: An Account of Recent Researches into the Function of Emotional Excitement*. New York Appleton.
- Chaudieu, I., Beluche, I., Norton, J., Boulenger, J.P., Ritchie, K., Ancelin, M.L., 2008. Abnormal reactions to environmental stress in elderly persons with anxiety disorders:

- evidence from a population study of diurnal cortisol changes. *J Affect Disord.* 106, 307-313.
- Clark, D.A., Beck, A.T., 2010. Cognitive theory and therapy of anxiety and depression: convergence with neurobiological findings. *Trends Cogn Sci.* 14, 418-424.
- Coric, V., Milanovic, S., Wasylink, S., Patel, P., Malison, R., Krystal, J.H., 2003. Beneficial effects of the ant glutamatergic agent riluzole in a patient diagnosed with obsessive-compulsive disorder and major depressive disorder. *Psychopharmacology (Berl).* 167, 219-220.
- Crane, G.E., 1959. Cyloserine as an antidepressant agent. *Am J Psychiatry.* 115, 1025-1026.
- de Kloet, E.R., 2003. Hormones, brain and stress. *Endocr Regul.* 37, 51-68.
- de Kloet, E.R., Joels, M., Holsboer, F., 2005. Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci.* 6, 463-475.
- De Rosa, S.C., Zaretsky, M.D., Dubs, J.G., Roederer, M., Anderson, M., Green, A., Mitra, D., Watanabe, N., Nakamura, H., Tjioe, I., Deresinski, S.C., Moore, W.A., Ela, S.W., Parks, D., Herzenberg, L.A., Herzenberg, L.A., 2000. N-acetylcysteine replenishes glutathione in HIV infection. *Eur. J. Clin. Investig.* 30, 915-929.
- Dean, O., Giorlando, F., Berk, M., 2011. N-acetylcysteine in psychiatry: current therapeutic evidence and potential mechanisms of action. *J. Psychiatry Neurosci.* 36, 78-86.
- Dekhuijzen, P.N., van Beurden, W.J., 2006. The role for N-acetylcysteine in the management of COPD. *Int. J. Chronic Obstr. Pulm. Dis.* 1, 99-106.
- Deepmala, Slattery, J, Kumar, N., Delhey, L., Berk, M., Dean, O., Spielholz, C., Frye, R. Clinical trials of N-acetylcysteine in psychiatry and neurology: A systematic review. *Neurosci Biobehav Rev.* 2015 Aug;55:294-321.
- Greaves-Lord, K., Ferdinand, R.F., Oldehinkel, A.J., Sondejker, F.E., Ormel, J., Verhulst, F.C., 2007. Higher cortisol awakening response in young adolescents with persistent anxiety problems. *Acta Psychiatr Scand.* 116, 137-144.
- Green, J.L., Heard, K.J., Reynolds, K.M., Albert, D., 2013. Oral and Intravenous Acetylcysteine for Treatment of Acetaminophen Toxicity: A Systematic Review and Meta-analysis. *West J Emerg Med.* 14, 218.
- Hashimoto, K., 2009. Emerging role of glutamate in the pathophysiology of major depressive disorder. *Brain Res Rev.* 61, 105-123.
- Hashimoto, K., Sawa, A., Iyo, M., 2007. Increased levels of glutamate in brains from patients with mood disorders. *Biol Psychiatry.* 62, 1310-1316.

- Horder, J., Matthews, P., Waldmann, R., 2011. Placebo, prozac and PLoS: significant lessons for psychopharmacology. *J Psychopharmacol.* 25, 1277-1288.
- Ibrahim, L., Diaz Granados, N., Jolkovsky, L., Brutsche, N., Luckenbaugh, D.A., Herring, W.J., Potter, W.Z., Zarate, C.A.Jr., 2012. A Randomized, placebo-controlled, crossover pilot trial of the oral selective NR2B antagonist MK-0657 in patients with treatment-resistant major depressive disorder. *J Clin Psychopharmacol.* 32, 551-557.
- Kallen, V.L., Tulen, J.H., Utens, E.M., Treffers, P.D., De Jong, F.H., Ferdinand, R.F., 2008. Associations between HPA axis functioning and level of anxiety in children and adolescents with an anxiety disorder. *Depress Anxiety.* 25, 131-141.
- Kessler, R.C., 2007. The global burden of anxiety and mood disorders: putting the European Study of the Epidemiology of Mental Disorders (ESEMeD) findings into perspective. *J Clin Psychiatry.* 2, 10-19, 68 Suppl.
- Kessler, R.C., Demler, O., Frank, R.G., Olfson, M., Pincus, H.A., Walters, E.E., Wang, P., Wells, K.B., Zaslavsky, A.M., 2005. Prevalence and treatment of mental disorders, 1990 to 2003. *N Engl J Med.* 352, 2515-2523.
- Kessler, R.C., McGonagle, K.A., Zhao, S., Nelson, C.B., Hughes, M., Eshleman, S., Wittchen, H.U., Kendler, K.S., 1994. Lifetime and 12-month prevalence of DSM-III-R psychiatric disorders in the United States. Results from the National Comorbidity Survey. *Arch Gen Psychiatry.* 51, 8-19.
- Kirschbaum, C., Pirke, K.M., Hellhammer, D.H., 1993. The 'Trier Social Stress Test'--a tool for investigating psychobiological stress responses in a laboratory setting. *Neuropsychobiology.* 28, 76-81.
- Kudoh, A., Takahira, Y., Katagai, H., Takazawa, T., 2002. Small-dose ketamine improves the postoperative state of depressed patients. *Anesth Analg.* 95, 114-118, table of contents.
- Kuo, D.C., Tran, M., Shah, A.A., Matorin, A., 2015. Depression and the Suicidal Patient. *Emerg Med Clin North Am.* 33, 765-778.
- LaRowe SD, Mardikian P, Malcolm R, Myrick H, Kalivas P, McFarland K, et al. Safety and tolerability of N-acetylcysteine in cocaine-dependent individuals. *Am J Addict* 2006,15:105-110.
- Liu, X.H., Xu, C.Y., Fan, G.H., 2014. Efficacy of N-acetylcysteine in preventing atrial fibrillation after cardiac surgery: a meta-analysis of published randomized controlled trials. *BMC Cardiovasc. Disord.* 14, 52.

- McEwen, B. S. 2002. Sex, stress and the hippocampus: Allostasis, allostatic load and the aging process. *Neurobiology of Aging*, 23(5), 921-39.
- Normann, C., Hummel, B., Scharer, L.O., Horn, M., Grunze, H., Walden, J., 2002. Lamotrigine as adjunct to paroxetine in acute depression: a placebo-controlled, double-blind study. *J Clin Psychiatry*. 63, 337-344.
- Organization WH., 1992. ICD-10 Classifications of Mental and Behavioural Disorder: Clinical Descriptions and Diagnostic Guidelines. In. Geneva: World Health Organization.
- Ostroff, R., Gonzales, M., Sanacora, G., 2005. Antidepressant effect of ketamine during ECT. *Am J Psychiatry*. 162, 1385-1386.
- Pariante, C.M., Lightman, S.L., 2008 The HPA axis in major depression: classical theories and new developments. *Trends Neurosci*. 31, 464-468.
- Quintavalle, C., Donnarumma, E., Fiore, D., Briguori, C., Condorelli, G., 2013. Therapeutic strategies to prevent contrast-induced acute kidney injury. *Curr. Opin. Cardiol*. 28, 676–682.
- Rocha, F.L., Hara, C., 2003. Lamotrigine augmentation in unipolar depression. *Int Clin Psychopharmacol*. 18, 97-99.
- Samuni, Y., Goldstein, S., Dean, O.M., Berk, M, 2013. The chemistry and biological activities of N-acetylcysteine. *Biochim. Biophys. Acta* 1830, 4117–4129.
- Sanacora, G., Kendell, S.F., Fenton, L., Coric, V., Krystal, J.H., 2004. Riluzole augmentation for treatment-resistant depression. *Am J Psychiatry*. 161, 2132.
- Sanacora, G., Zarate, C.A., Krystal, J.H., Manji, H.K., 2008. Targeting the glutamatergic system to develop novel, improved therapeutics for mood disorders. *Nat Rev Drug Discov*. 7, 426-437.
- Sapolsky, R.M., Romero, L.M., Munck, A.U., 2000. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr Rev*. 21, 55-89.
- Selye, H., 1936. A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature*. 138, 32-32.
- Selye, H., 1946. The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation. *The Journal of Clinical Endocrinology*. 6, 117-230.
- Slattery, D.A., Hudson, A.L., Nutt, D.J., 2004. Invited review: the evolution of antidepressant mechanisms. *Fundam Clin Pharmacol*. 18, 1-21.
- Stetler, C., Miller, G.E., 2011. Depression and hypothalamic-pituitary-adrenal activation: a quantitative summary of four decades of research. *Psychosom Med*. 73, 114-126.

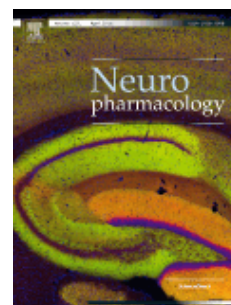
- Tian, H.E., Ma, L., Liu, L.L., Zhang, H., Liu, K.Y., Zhang, Q.D., Zhu, X.Y., Zhu, H.B., 2016. [Correlation between occupational stress and salivary cortisol concentration in employees]. *Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi*. 34, 121-123.
- van Eck, M., Berkhof, H., Nicolson, N., Sulon, J., 1996. The effects of perceived stress, traits, mood states, and stressful daily events on salivary cortisol. *Psychosom Med*. 58, 447-458.
- Zanos, P., Moaddel, R., Morris, P.J., Georgiou, P., Fischell, J., Elmer, G.I., Alkondon, M., Yuan, P., Pribut, H.J., Singh, N.S., Dossou, K.S., Fang, Y., Huang, X.P., Mayo, C.L., Wainer, I.W., Albuquerque, E.X., Thompson, S.M., Thomas, C.J., Zarate, C.A.Jr, Gould, T.D., 2016. NMDAR inhibition-independent antidepressant actions of ketamine metabolites. *Nature*. [Epub ahead of print].
- Zarate, C.A.Jr., Payne, J.L., Quiroz, J., Sporn, J., Denicoff, K.K., Luckenbaugh, D., Charney, D.S., Manji, H.K., 2004. An open-label trial of riluzole in patients with treatment-resistant major depression. *Am J Psychiatry*. 161, 171-174.
- Yarema, M.C., Johnson, D.W., Berlin, R.J., Sivilotti, M.L., Nettel-Aguirre, A., Brant, R.F., Spyker, D.A., Bailey, B., Chalut, D., Lee, J.S., Plint, A.C., Purssell, R.A., Rutledge, T., Seviour, C.A., Stiell, I.G., Thompson, M., Tyberg, J., Dart, R.C., Rumack, B.H., 2009. Comparison of the 20-hour intravenous and 72-hour oral acetylcysteine protocols for the treatment of acute acetaminophen poisoning. *Ann Emerg Med*. 54, 606-614.

ANEXO A - NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA *NEUROPHARMACOLOGY*



TABLE OF CONTENTS

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



ISSN: 0028-3908

DESCRIPTION

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

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

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

AUDIENCE

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

IMPACT FACTOR

2014: 5.106 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2015

ABSTRACTING AND INDEXING

BIOSIS
Elsevier BIOBASE
Chemical Abstracts
Current Contents/BIOMED Database
Current Contents/Life Sciences
Current Contents/SciSearch Database
Current Contents/Science Citation Index
MEDLINE®
EMBASE
PASCAL/CNRS
Psychology Abstracts
Research Alert
Scopus

EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief

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

Senior Editors

Stuart Allan, Manchester, England, UK
John Cryan, Cork, Ireland
Thomas Gould, Philadelphia, Pennsylvania, USA
Josef Kittler, London, UK
Michaela Kress, Wilten, Austria
Bita Moghaddam, Pittsburgh, Pennsylvania, USA
Christopher Parsons, Frankfurt am Main, Germany
Heikki Tanila, Kuopio, Finland
Danny Winder, Nashville, Tennessee, USA

Editorial Board

Carine Ali, Caen Cedex, France
Vaishali Bakshi, Madison, Wisconsin, USA
Nicholas Barnes, Birmingham, UK
Frank Barone, New York, New York, USA
Alasdair Barr, Vancouver, British Columbia, Canada
David Bleakman, Indianapolis, Indiana, USA
Angeliqe Bordey, New Haven, Connecticut, USA
Martine Cadot, Bordeaux, France
Regina Carelli, Chapel Hill, North Carolina, USA
Gemma Casadesus, Cleveland, Ohio, USA
Hwei-Hsien Chen, Hualien, Taiwan, ROC
Maria Isabel Colado, Madrid, Spain
Jeff Conn, Nashville, Tennessee, USA
Anis Contractor, Chicago, Illinois, USA
Peter Crack, Parkville, Victoria, Australia
Elisabetta Daré, Stockholm, Sweden
Ceri Davies, Singapore, Singapore
Thérèse Di Paolo, Quebec City, Quebec, Canada
Chris Dulla, Medford, Massachusetts, USA
Fabrizio Gasparini, Basel, Switzerland
Yukiko Goda, London, UK
Timothy Greenamyre, Pittsburgh, Pennsylvania, USA
Robert Greene, Dallas, Texas, USA
David Heal, Nottingham, UK
Ray Hill, Harlow, UK
Peter Hutson, Wayne, Pennsylvania, USA
Kazutaka Ikeda, Tokyo, Japan
Masanobu Kano, Chiba, Japan
Thomas Kash, Chapel Hill, North Carolina, USA
Aine Kelly, Dublin, Ireland
Paul Kenny, New York, New York, USA

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

GUIDE FOR AUTHORS

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

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

Human and animal rights

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

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

Conflict of interest

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

Submission declaration and verification

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

Authorship

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

Changes to authorship

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

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

Article transfer service

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

Copyright

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

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

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

Author rights

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

Role of the funding source

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

Funding body agreements and policies

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

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

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

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

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open access

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

Subscription

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

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

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

Creative Commons Attribution (CC BY)

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

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

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

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

Green open access

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

This journal has an embargo period of 12 months.

Elsevier Publishing Campus

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

Language (usage and editing services)

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

Submission

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

Referees

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

Additional information

The Neuroscience Peer Review Consortium

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

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

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

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

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

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

PREPARATION

Use of word processing software

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

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

Article structure

Subdivision - numbered sections

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

Introduction

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

Material and methods

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

Theory/calculation

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

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

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

Conclusions

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

Appendices

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

Essential title page information

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

Abstract

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

Graphical abstract

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

separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <https://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements: [Illustration Service](#).

Highlights

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

Keywords

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

Chemical compounds

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

Chemical compounds studied in this article

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

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

Abbreviations

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

Acknowledgements

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

Formatting of funding sources

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

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

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

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

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

Units

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

Math formulae

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

Footnotes

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

Artwork

Electronic artwork

General points

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

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<https://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

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

Formats

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

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

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

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

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

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

Please do not:

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

Color artwork

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

Illustration services

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

Figure captions

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

Tables

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

References

Citation in text

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

Reference links

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

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

Web references

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

References in a special issue

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

Reference management software

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

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

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

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

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

Reference formatting

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

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

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

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

Examples:

Reference to a journal publication:

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

Reference to a book:

Strunk Jr, W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

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

Reference to a website:

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

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations:

<http://www.issn.org/services/online-services/access-to-the-ltwa/>.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at

<https://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary material

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

Database linking

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

AudioSlides

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

Submission checklist

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

Ensure that the following items are present:

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

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

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

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

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

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

AFTER ACCEPTANCE

Proofs

For all accepted manuscripts, page proofs will be sent to the corresponding author (or the first-named author) for checking. **Corrections to the proofs must be restricted to printer's errors.** Any substantial alterations other than these may be charged to the author. Authors are particularly requested to return their corrected proofs as quickly as possible in order to facilitate rapid publication. Please note that **authors are urged to check their proofs carefully before return, since late**

corrections cannot be guaranteed for inclusion in the printed journal. Reprints and copies of the issue (at a specially reduced rate) can be ordered on the form which will accompany the proofs. These should be returned to: Elsevier Ltd, Bampfylde Street, Exeter, EX1 2AH, U.K.

Disclaimer:

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

Online proof correction

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

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

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

Offprints

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

AUTHOR INQUIRIES

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

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