

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de ciências farmacêuticas
Programa de pós-graduação em tecnologia bioquímico-farmacêutica
Área de Tecnologia químico-farmacêutica

Misleide Elizabeth Falbel

**Peptídeos bioativos ansiolíticos moduladores de receptores
GABA A**

SÃO PAULO

2024

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de ciências farmacêuticas

Programa de pós-graduação em tecnologia bioquímico-farmacêutica

Área de Tecnologia químico-farmacêutica

Misleide Elizabeth Falbel

**Peptídeos biativos ansiolíticos moduladores de receptores
GABA A**

Versão corrigida

Dissertação para obtenção de título de Mestre. Faculdade de ciências farmacêuticas da
Universidade de São Paulo; 9135.

Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio Stephano

SÃO PAULO

2024

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação: Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

F177p Falbel, Misleide Elizabeth
Peptídeos Bioativos Ansiolíticos Moduladores de
Receptores GABA A / Misleide Elizabeth Falbel. -
São Paulo, 2024.
63 p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
Departamento de Tecnologia Bioquímico-
Farmacêutica.
Orientador: Stephano, Marco Antonio

1. Transtornos de Ansiedade. 2. Peptídeos
Bioativos ansiolíticos. 3. Receptores GABA A. I. T.
II. Stephano, Marco Antonio, orientador.

Misleide Elizabeth Falbel

Peptídeos biativos ansiolíticos moduladores de receptores GABA A

Dissertação para obtenção de título de Mestre. Faculdade de ciências farmacêuticas da
Universidade de São Paulo; 9135.

Comissão Julgadora
Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Professor Dr. Orientado/Presidente

1o. examinador

2o. examinador

3o. examinador

4o. examinador

São Paulo, 31 de maio de 2024

Agradecimentos

Agradeço ao movimento universal que parece somar forças transcendentais às imanentes gerando um vetor final de superação. Agradeço aos agentes conhecidos e desconhecidos que direta ou indiretamente contribuíram para o estabelecimento do efeito das forças imanentes, sendo alguns deles: cientistas que se debruçaram ao desenvolvimento de fármacos que viabilizam o meu processo de reabilitação neurológica, familiares, amigos, colegas da profissão ``pesquisador``, orientadores acadêmicos que me acompanharam, e aos seus modos peculiares vêm me preparando para que um dia eu melhor possa orientar dentro da academia científica, equipe de limpeza FCF-USP que por tantas vezes ativou em mim através de essências e imagens circuitos neurais que sinalizam bem-estar. Enfatizo que agradeço a cada um que tem cruzado o meu caminho, pois sei que me oferecem o melhor que possuem no momento apresentado. Quanto às forças transcendentais, parecem contribuir sobretudo para que eu permaneça obtendo significativas aprendizagens mediante cada encontro ou desencontro. Um nome necessito mencionar, pois tem sido suporte constante nos momentos mais delicados: Mislene da Silva, minha amada irmã.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001 de 01/06/2020 a 28/02/2022 e do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) processo número 131106/2023-6 de 06/2023 a 08/2023.

Epígrafe

“It was in the desert of Pietralata, during the time when he lived as a hermit, that Joachim wrote *Concordia novi et veteris Testamenti, Expositio in Apocalypsim and Psalterium decem chordarum*, the three basic scripts used in the study of his life and work.”

Nachman Falbel

Resumo

Falbel, M. E. Peptídeos bioativos ansiolíticos moduladores de receptores GABA A. 2024. 63f. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2024.

A alta incidência global de Transtornos de Ansiedade somada aos efeitos colaterais oriundos dos tratamentos farmacológicos convencionais mais prescritos, nos inclina a buscar ativos com potentes efeitos biológicos e baixa toxicidade para a saúde humana, como peptídeos bioativos ansiolíticos. O sistema gabaérgico mostrou-se capaz de modular a sintomatologia dos Transtornos de Ansiedade através de atividade agonista aos receptores GABA A, pois estes quando ativados reduzem a excitabilidade central, um dos principais marcadores biológicos desta categoria de transtornos neuropsiquiátricos. Este trabalho apresenta 8 peptídeos bioativos que desempenharam efeito ansiolítico *in vitro* e-ou em paradigmas comportamentais animais através de ação direta ou indireta aos receptores GABA A, são eles: Selank, Alpha-casozepina, YL, YLG, Ovolina, Weylin 1, Weylin 2 e Rubimetida.

Descritores: Transtornos de Ansiedade, peptídeos bioativos ansiolíticos, peptídeos bioativos gabaérgicos, Receptores GABA A, efeito ansiolítico.

Abstract

Falbel, M. E. Anxiolytic bioactive peptides modulators of GABA-A receptors. 2024. 63f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2024.

The high global incidence of Anxiety Disorders, added to the side effects arising from the most prescribed conventional pharmacological treatments, inclines us to look for active ingredients with potent biological effects and low toxicity for human health, such as anxiolytic bioactive peptides. The GABAergic system has been shown to be capable of modulating the symptoms of Anxiety Disorders through agonistic activity at GABA A receptors, as these when activated decrease the central excitability, one of the main biomarkers of this category of neuropsychiatric disorders. This work presents 8 bioactive peptides that had an anxiolytic effect *in vitro* and/or in animal behavioral paradigms through direct or indirect action on GABA A receptors, they are: Selank, Alpha-casozepine, YL, YLG, Ovolina, Weylin 1, Weylin 2 and Rubimetide.

Keywords: Anxiety Disorders, anxiolytic bioactive peptides, GABAergic bioactive peptides, GABA A Receptors, anxiolytic effect.

Sumário

1- Introdução	10
1.1- Epidemiologia dos Transtornos de Ansiedade	10
1.2- Transtornos de Ansiedade: definição	10
1.3- Transtornos de Ansiedade: subtipos e sintomatologia	10
1.4- Mecanismos envolvidos com os Transtornos de Ansiedade	15
1.5- Tratamentos farmacológicos com ênfase em benzodiazepínicos	19
1.6- Novos tratamentos: peptídeos bioativos (PBs) e PBs gabaérgicos	19
1.7- O sistema gabaérgico	22
1.8- Os receptores GABA A: distintas composições	29
2- Objetivos	35
2.1- Objetivo geral	35
2.2- Objetivos específicos	35
3- Metodologia	35
4- Docking Molecular	36
5- Resultados	37
6- Discussão	49
7- Referências	51

1- Introdução

1.1- Epidemiologia dos Transtornos de Ansiedade

1 a cada 3 pessoas, segundo Hafeez et al.(2021), mais de 33.7%, segundo Bandelow e Michaelis (2022), são estimativas globais para a incidência de Transtornos de Ansiedade, cujos sintomas necessariamente permanecem por no mínimo 6 meses.

Ainda escasseiam-se os estudos que investigaram a incidência de Transtornos de Ansiedade no contexto nacional, tal como o fez o Estudo de Bem-estar e Saúde Mental São Paulo Megacity, possibilitando evidenciar que em um país emergente de renda média, como o Brasil, o perfil epidemiológico tende a se assemelhar ao dos países desenvolvidos (VIANA, 2009).

De acordo com estudos estadunidenses como o ECA (Epidemiological Catchment Area) e o NCS (Nacional Comorbidity Survey), e outros estudos semelhantes conduzidos em distintos países, os Transtornos de Ansiedade compõem a categoria de Transtornos Neuropsiquiátricos mais prevalente nestas regiões desenvolvidas (STEIN, et al., 2022).

Além da marcante frequência verificada nos Transtornos Ansiosos, os Transtornos de Ansiedade atrelam-se a um início precoce, persistência ao longo da vida e à segunda maior causa de incapacitação dentre todos os transtornos mentais (INSTITUTE FOR HEALTH METRICS AND EVALUATION, 2016; BANDELOW e MICHAELIS, 2022; STEIN et al., 2022).

1.2- Transtornos de Ansiedade: definição

Conceitualmente, ansiedade trata-se de uma resposta fisiológica ante um medo real ou imaginário, acompanhada de um comportamento de esquiva ou fuga (DSM-5, 2014).

A ansiedade varia em intensidade e qualidade, e há diferenças notáveis entre ansiedade psicofisiológica e ansiedade patológica, pois no segundo caso, ela apresenta-se como um estado (mutável de acordo com diferentes níveis de estresse), e não como um traço de personalidade, perene, conforme ela se apresenta no primeiro caso (GRILLON, 2008).

1.3- Transtornos de Ansiedade: subtipos e sintomatologia

Segundo o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais, quinta edição (DSM-5), as 9 subpatologias que compõem a categoria Transtornos de Ansiedade são: transtorno de ansiedade de separação, mutismo seletivo, fobias específicas, transtorno de ansiedade social, Transtorno de pânico, agorafobia, transtorno de ansiedade generalizada, transtorno de ansiedade induzido por substância/medicamento e transtorno de ansiedade devido a outra condição médica.

Transtorno de Ansiedade de Separação

Este Transtorno é caracterizado por medo ou ansiedade impróprios e excessivos em relação ao estágio de desenvolvimento, envolvendo a separação daqueles com quem o indivíduo tem apego.

Entre adultos estadunidenses a prevalência do Transtorno de Ansiedade de Separação com duração mínima de 12 meses é de 0,9 a 1,9%, sendo a prevalência em crianças maior, e em se tratando da prevalência de Transtorno de Ansiedade a incidência é maior em crianças com menos de 12 anos. Não foi verificada através de análises clínicas variabilidade de incidência entre os sexos, porém na sociedade parece haver prevalência entre as mulheres.

Mutismo seletivo

“Fracasso persistente para falar em situações sociais específicas nas quais existe a expectativa para tal (p. ex., na escola), apesar de falar em outras situações.” (American Psychiatric Association, 2014).

O mutismo seletivo é um transtorno relativamente raro e não foi incluído como categoria diagnóstica em estudos epidemiológicos de prevalência dos transtornos na infância. Através de observações clínicas e em escolas, parece manifestar-se com maior frequência em crianças menores do que em adolescentes e adultos.

Fobia específica

Medo ou ansiedade acentuados acerca de um objeto ou situação (p. ex., voar, alturas, animais, tomar uma injeção, ver sangue) caracterizam o transtorno. Em crianças, o medo ou ansiedade pode ser expresso por choro, ataques de raiva, imobilidade ou comportamento de agarrar-se. O objeto ou situação fóbica quase invariavelmente provoca uma resposta imediata de medo ou ansiedade.

A taxa de prevalência estimada de Fobia Específica com duração mínima de 12 meses se assemelham entre Europa e EUA sendo de 6% e 7 a 9% respectivamente, todavia em países asiáticos, africanos e latino-americanos varia entre 2 a 4%, sendo a incidência significativamente menor entre crianças cerca de 5% em comparação com jovens entre 13 a 17 anos que apresentam uma taxa de 16%. Também foi verificada uma incidência menor em faixas etárias mais elevadas, 3 a 5%, e maior em indivíduos do sexo feminino do que do masculino (razão de cerca de 2:1), embora as taxas variem entre os diferentes estímulos fóbicos. Fobias específicas de animais, ambiente natural e situacionais são predominantemente experimentadas por indivíduos do sexo feminino, enquanto a fobia por sangue-injeção-ferimentos é experimentada quase de forma igual por ambos os gêneros.

Transtorno de ansiedade social (Fobia social)

Medo ou ansiedade acentuados acerca de uma ou mais situações sociais em que o indivíduo é exposto à possibilidade de ser avaliado por terceiros, a saber: interações sociais (manter uma conversa, encontrar pessoas que não são familiares), ser observado (comendo ou bebendo, por exemplo) e situações de desempenho diante de outros. O diagnóstico em crianças deve atender o critério de que a ansiedade deve ocorrer em contextos que envolvem seus pares, e não apenas em interações com adultos.

Foi estimada para a população Estadunidense um prevalência de 7% de Transtorno de Ansiedade Social com duração mínima de 12 meses. Com duração menor do que 12 meses foi observada uma taxa de prevalência de 0,5 a 2% em diversas partes do mundo, e 2,3% para a Europa. Em relação a faixas etárias mais elevadas a taxa de prevalência varia entre 2 e 5%, tendo sido verificada uma incidência maior entre mulheres do que entre homens. Nos EUA foi verificado também maior incidência entre índios, do que em pessoas de descendência asiática, latina, afro-americana e afro-caribenha em comparação com brancos não hispânicos habitantes.

Transtorno de pânico

Ataques de pânico recorrentes e inesperados sendo estes considerados surtos abruptos de medo intenso ou desconforto intenso que podem ocorrer a partir de um estado calmo ou ansioso, e que alcançam um pico em minutos durante o qual ocorrem quatro, ou mais dos seguintes sintomas: palpitações, coração acelerado, taquicardia; sudorese; tremores ou abalos; sensações de falta de ar ou sufocamento; sensações de asfixia; dor ou desconforto torácico; náusea ou desconforto abdominal; sensação de

tontura, instabilidade, vertigem ou desmaio; calafrios ou ondas de calor, parestesias (anestesia ou sensações de formigamento); desrealização (sensações de irrealidade) ou despersonalização (sensação de estar distanciado de si mesmo); medo de perder o controle ou “enlouquecer”; medo de morrer. Também podem ser vistos sintomas como tinido, dor na nuca, cefaleia, gritos, ou choro incontrolável, sendo que estes sintomas não devem contar como um dos quatro sintomas exigidos.

A taxa de prevalência estimada do Transtorno de pânico com duração mínima de 1 mês para adolescentes e adultos Estadunidenses e Europeus é de 2 a 3%, tendo sido relatada uma incidência menor entre latinos, afro-americanos, negros caribenhos e asiáticos americanos em comparação com brancos não latinos; em contrapartida, os índios americanos, apresentam taxas significativamente mais elevadas. Estimativas mais baixas foram estabelecidas para países asiáticos, africanos e latino-americanos, variando de 0,1 a 0,8% e há indícios de que mulheres são afetadas com maior frequência em relação aos homens (razão em torno de 2:1).

A estimativa de prevalência do sintoma Ataque de pânico com durabilidade mínima de 12 meses é de 11,2% em adultos Estadunidenses, não tendo sido verificado variabilidade entre afro-americanos, asiáticos americanos e latinos. Já entre a população europeia a taxa de prevalência estimada é de 2,7 e 3,3%, sendo que indivíduos do sexo feminino parecem ser mais afetados do que os do sexo masculino, embora essa diferença de gênero seja mais pronunciada para o transtorno de pânico. Ataques de pânico podem ocorrer em crianças, mas são relativamente raros até a puberdade, quando a prevalência aumenta, e passa a declinar em faixas etárias mais altas.

Agorafobia

Medo ou ansiedade marcantes acerca de duas (ou mais) das cinco situações seguintes: uso de transporte público (p. ex., automóveis, ônibus, trens, navios, aviões), permanecer em espaços abertos (áreas de estacionamento, mercados, pontes), permanecer em locais fechados (p. ex., lojas, teatros, cinemas), permanecer em uma fila ou ficar em meio a uma multidão, sair de casa sozinho.

1,7% dos adolescentes e adultos têm um diagnóstico de agorafobia a cada ano. Foi verificado que mulheres apresentam uma probabilidade duas vezes maior de apresentar o transtorno do que homens. A agorafobia pode ocorrer na infância, mas foi descrito que sua incidência atinge o pico no fim da adolescência e início da idade adulta. Em indivíduos com mais de 65 anos a prevalência mínima de 12 meses ocorre 0,4% em média, não tendo sido verificada variação entre grupos culturais - raciais

Transtorno de Ansiedade Generalizada (TAG)

Este transtorno é marcado por ansiedade e preocupação excessivas (expectativa apreensiva), ocorrendo na maioria dos dias por pelo menos seis meses precedendo distintos eventos como desempenho escolar ou profissional. O indivíduo considera difícil controlar a preocupação, bem como a ansiedade e a preocupação estão associadas com três, ou mais dos seguintes seis sintomas para adultos (com pelo menos alguns deles presentes na maioria dos dias nos últimos seis meses), já para diagnóstico infantil apenas um deles é exigido: . Inquietação ou sensação de estar com os nervos à flor da pele, fadigabilidade, dificuldade em concentrar-se ou sensações de “branco” na mente, irritabilidade, tensão muscular, perturbação do sono (dificuldade em conciliar ou manter o sono, ou sono insatisfatório e inquieto, a ansiedade, a preocupação ou os sintomas físicos causam sofrimento clinicamente significativo ou prejuízo no funcionamento social, profissional ou em outras áreas importantes da vida do indivíduo.

A taxa de prevalência é de 2,9% entre adultos Estadunidenses, e de 0,4 a 3,9% entre adultos de outros países.

Transtorno de Ansiedade induzido por substância ou medicamento

Ataques de pânico ou ansiedade proeminente predominam no quadro clínico quando existem evidências, a partir da história, do exame físico ou de achados laboratoriais, de que os sintomas desenvolveram-se durante ou logo após a intoxicação, ou abstinência, de substância, ou após exposição a um medicamento, ou evidências de que a substância/medicamento envolvida é capaz de produzir os sintomas de ataques de pânico ou ansiedade. As substâncias podem ser Álcool, Cafeína, *Cannabis*, Fenciclidina, outro alucinógeno, inalante, opioide, sedativo, hipnótico ou ansiolítico, anfetamina (ou outro estimulante), cocaína dentre outras substâncias, inclusive desconhecidas.

A prevalência do transtorno de ansiedade induzido por substância/medicamento não foi muito bem evidenciada, todavia dados referentes à população em geral sugerem que ela pode ser rara, com prevalência de 0,002% por no mínimo 12 meses.

Transtorno de Ansiedade devido a outra condição médica

Ataques de pânico ou ansiedade predominam no quadro clínico existindo evidências, a partir da história, do exame físico ou de achados laboratoriais, de que a perturbação é a consequência fisiopatológica direta de outra condição médica. A prevalência do transtorno de ansiedade devido a outra condição médica não está clara,

porém parece haver prevalência elevada entre indivíduos que apresentam determinadas condições médicas, como asma, hipertensão, úlcera e artrite (American Psychiatric Association, 2014).

1.4 – Mecanismos envolvidos com os Transtornos de Ansiedade

Diferentes mecanismos deflagram a sintomatologia dos Transtornos de Ansiedade, cuja etiologia relaciona-se com fatores neurofisiológicos, genéticos e epigenéticos. Contudo, de modo geral, devido à configuração neuropatológica que se estabelece podemos afirmar que há comprometimento do sistema nervoso autônomo, levando à exacerbação do funcionamento do eixo simpático e limitação do funcionamento do eixo parassimpático, desdobrando em sintomas que perpassam percepção subjetiva de sofrimento acompanhada de distúrbios de sono e concentração, comprometimentos sociais, e-ou limitações ocupacionais atreladas à tensão muscular, fadiga, inquietação e irritabilidade. Apesar de similaridades, os 9 subtipos de Transtornos de Ansiedade diferenciam-se quanto à sintomatologia, prognóstico e tratamento (Adwas, et al., 2019; American Psychiatric Association, 2014).

Sociologia dos Transtornos de Ansiedade

Do ponto de vista sociológico, a compreensão da ansiedade remonta aos seus primórdios quando periferistas (defensores de alterações metabólicas periféricas perfazerem a gênese da ansiedade) conduziram um experimento para avaliar o efeito de alteração fisiológica periférica através de administração intravenosa de epinefrina no humor aquoso (tal dosagem não atravessou a barreira hemato-encefálica). Os voluntários após recebimento de adrenalina foram expostos a ambientes diferentes, um que emitia sinais de ansiedade, o outro de fúria, notou-se que as respostas subjetivas à alteração fisiológica variaram de acordo com o estímulo oferecido, ficando claro que o ambiente interferia na manifestação da resposta ansiosa (JAMES, 1890; LANGE, 1885; ROBBINS, 1983; SCHACHTER, et al.,1962). A partir de então, a compreensão da origem dos Transtornos de Ansiedade se amparou em teorias Behaviouristas e Cognitivistas (EHLERS AND CLARK, 2000; MARGRAF, et al., 1986).

Neuroanatomia dos Transtornos de Ansiedade

Com relação a neuroanatomia da ansiedade é possível demarcarmos anatomicamente os circuitos envolvidos com os distintos transtornos de ansiedade, pois eles são capazes de conferir ao organismo humano emoções que são acompanhadas de

comportamentos específicos. Alguns marcadores neuroanatômicos considerados são: sistema Límbico, que apresenta papel central na gênese das emoções, especialmente ansiedade. Neste sistema destaca-se a amígdala que exerce controle locomotor, neuroendócrino, autonômico e controle de respostas respiratórias, tendo estudos lesivos, estimulatórios e neuroquímicos relacionado a amígdala com a extinção do medo e da ansiedade aguda. Conforme já consolidado, nos transtornos de ansiedade há hiperativação desta região, dado consonante com o fato de que em todas as patologias da categoria Transtornos de Ansiedade encontramos a antecipação de ameaças reais, e-ou imaginárias (LEDOUX, 1992; LEDOUX, 1996; LEDOUX, 1998).

Alterações estruturais na Amígdala Basolateral estão estreitamente relacionadas com ansiedade. Estudos têm demonstrado que ativação direta de corpos celulares ou suas projeções na Amígdala Basolateral está envolvida com respostas ansiogênicas e socialmente aversivas. Evidências sugerem que um ambiente estressante, elevados níveis de hormônios do estresse, e ansiedade podem culminar na hipertrofia da Amígdala Basolateral (DAVIS, et al., 1997; .WU, et al., 2022).

O hipocampo é envolvido com a capacidade de discriminar se a ameaça é familiar requerendo, portanto, resposta condicionada, ou se é nova, exigindo uma resposta com processamento mais complexo. O septo medial e o hipocampo dorsal estão sobremaneira envolvidos com o comum comportamento de esquiva atrelado à percepção disfuncional de ameaça presente nos Transtornos de Ansiedade. Ressonâncias magnéticas de pacientes com os Transtornos de Ansiedade (subtipo transtorno de pânico) exibiram anormalidades no lobo temporal especialmente na área parahipocampal direita (GRAY, 1988).

O Locus Coeruleus (LC) vem a ser outro importante marcador neuroanatômico, pois estimulação direta do LC em modelos animais desencadeou comportamento de ansiedade que pode ser bloqueado com drogas ansiolíticas e anti-adrenérgicas, indicando que o LC é ativado por estresse (REDMOND, 1986).

Neuropsicologia dos Transtornos de Ansiedade

Do ponto de vista psicológico, a ansiedade surgiu como uma maneira de controlar a resposta animal frente a ameaça ou estímulo potencialmente ameaçador. Mentalmente, a ansiedade caracteriza-se por apreensão, tensão ou preocupação sobre adversidades que podem ocorrer no futuro (YERKES, 1921; SAVIOLA, et al., 2020).

Sigmund Freud descreveu cientificamente pela primeira vez a resposta ansiosa psicofisiológica (adaptativa) humana como um sentimento de perigo iminente e premente pautado em perigo objetivo ou moral (FREUD, 1936).

Fisiologia dos Transtornos de Ansiedade

Os principais mecanismos fisiológicos descritos envolvidos com a manifestação dos Transtornos de Ansiedade são: elétrico neuronal íons-dependente com propriedades excitatórias e inibitórias, mecanismo de monoaminas (serotonina, dopamina, noradrenalina, acetilcolina e glutamato); neuromodulatório mediado por ácido gama-amino-butírico (GABA), eixo hipotálamo-pituitária-adrenal, eixo Amígdala-Córtex-Cerúleo, eixo intestino-cérebro. Estes mecanismos permeiam a neuroquímica, neuroanatomia e neuropsicologia da ansiedade (IMPERATORE, et al., 2015; ZARRINDAST, 2015; LEE, et al., 2021).

Neuroquímica dos Transtornos de Ansiedade

Com relação ao aspecto neuroquímico da ansiedade os estudos estão centrados na neurotransmissão das monoaminas, Serotonina (5-HT), noradrenalina (NA), e Ácido Gama aminobutírico mediada por receptores GABA A, tendo sido verificado que a intervenção com agonistas e antagonistas de neurotransmissores e neuromoduladores podem prevenir ou ocasionar os Transtornos de Ansiedade (SANDFORD, et al., 2000).

A seguir abordaremos apenas algumas informações acerca de diferentes mecanismos relacionados com os Transtornos de Ansiedade, mas é importante enfatizar que outros mecanismos também relacionados com os Transtornos de Ansiedade não serão abordados, como mecanismos envolvendo peptídeos opióides, endocanabinoides, neuropeptídeo Y, ocitocina e hormônio liberador de corticotrofina. Esta revisão visa focalizar o sistema Gabaérgico, visto que é um dos principais alvos farmacoterapêuticos, e cujos fármacos aliados geram efeitos colaterais mais graves.

Em se tratando do funcionamento adrenérgico periférico há evidências de que receptores beta-adrenérgicos desta região são hipersensíveis em pacientes com Transtorno de Ansiedade subtipo Transtorno de pânico, sendo passíveis de neuromodulação por substâncias antagonistas sem a necessidade de atravessarem a barreira-hematoencefálica. Já a compreensão do funcionamento adrenérgico no SNC voltou-se aos receptores alfa-adrenérgicos, tendo sido verificado que substâncias antagonistas destes receptores pré-sinápticos são capazes de gerar sintomas de ansiedade, logo, espera-se que agonistas possam reduzir tais sintomas (NUTT, 1989; NUTT, 1992).

Há também compostos antagonistas como o flumazenil capazes de bloquear tanto agonistas (BDZ) quanto agonistas inversos como a B-carbolina FG 7142 e BDZ Ro15-

3505 que são ansiogênicas em humanos. Isto levanta a hipótese de que agonistas e agonistas inversos endógenos podem estar envolvidos com a gênese dos transtornos de ansiedade, bem como anormalidades em receptores gabaérgicos.

Sobre o sistema adrenérgico foi postulado que a adrenalina em quantidade supra-funcional, bem como outras substâncias simpatomiméticas (anfetaminas, cocaína, imipramina, ioimbina, bicarbonato, lactato, etc.) são capazes de desencadear sintomas de Transtornos de ansiedade através de excitabilidade excessiva. Foi verificado que a elevação dos níveis de ansiedade relativa à exposição a estressores aumenta a atividade simpática, e que drogas noradrenérgicas seletivas com ação central apresentam propriedades ansiogênicas e ansiolíticas. (SANDFORD, et al., 2000)

Já com relação ao sistema serotoninérgico está bastante consolidada a eficácia clínica de drogas voltadas a este sistema para tratamento da ansiedade. Todavia, deve-se enfatizar que existem fármacos específicos para determinados subtipos de ansiedade, visto que mecanismos distintos envolvem-se e caracterizam as distintas patologias que compõem o grupo Transtornos de Ansiedade. Parte disto deve-se ao fato do sistema serotoninérgico apresentar dois processamentos distintos, um encontrado no núcleo da rafe medial, e o outro no núcleo da rafe dorsal (CHARNEY et al., 1987).

5-HT na substância cinza periaquedutal (PAG) inibe sintomas de pânico, já doses na amígdala são ansiogênicas. Tem sido postulado que 5-HT desempenha um papel central no organismo humano ao que concerne a capacidade de resposta às adversidades e estresse, sendo tanto o processamento que ocorre no Núcleo da Rafe Dorsal, quanto o que ocorre no Núcleo da Rafe medial, adaptações para lidarmos com adversidades agudas e crônicas, e tem sido sugerido que podem ser responsáveis por diferentes Transtornos mentais, incluindo os Transtornos de Ansiedade

Doses de agonista de 5-HT (m-clorofenilpiperazina, mCPP) são capazes de gerar efeitos ansiogênicos em pacientes com Transtorno de Ansiedade subgênero transtorno de pânico, já em pacientes com Transtorno de Ansiedade Generalizada são capazes de gerar efeitos ansiolíticos. Foi verificado também que precursores de serotonina como 5-HTP e L-triptofano geram sedação e efeitos ansiolíticos, e que a disponibilidade de 5-HT em distintas regiões gera diferentes respostas (NUTT AND COWEN, 1987; DEN BOER et al., 1989; GRAEFF, et al., 1996; DEAKIN, et al., 1991).

Ao que concerne ao sistema dopaminérgico, a amígdala basolateral recebe informações principalmente de neurônios glutamatérgicos no córtex pré-frontal medial (mPFC), e informações de neurônios dopaminérgicos da área tegmental ventral (VTA, núcleo que contém 60% de neurônios dopaminérgicos), estes, por sua vez, se dividem em duas classes diferentes de receptores metabotrópicos acoplados à proteína G: a

subfamília D1 (DRD1 e DRD5), e a subfamília D2 (DRD2, DRD3 e DRD4) (BRANDÃO, et al. 2019).

As descobertas atuais indicam que a via de sinalização do receptor de dopamina D2 que conecta a área tegmental ventral (VTA) à amígdala basolateral, modula o medo e a ansiedade, tendo sido proposto também que a origem destes neurônios é o núcleo A13 da Zona Incerta havendo projeções para estruturas caudais do sistema cerebral de aversão (esquiva). Um estudo recente que investigou os efeitos *in vivo* de electroacupuntura sobre a ansiedade, constatou que houve atenuação de comportamentos ansiosos devido a ativação de receptores D1 e antagonismo de receptores D2 (WU, et al., 2022).

1.5- Tratamentos farmacológicos com ênfase em benzodiazepínicos

Os benzodiazepínicos, embora pouco recomendados, ainda são prescritos, sendo considerados psicofármacos de primeira geração porque compõem as primeiras drogas disponíveis para tratamento de Transtornos de Ansiedade. Esta classe de ativos através da afinidade por receptores gabaérgicos promove maior entrada de cloreto no neurônio fazendo com que haja estímulo neuronal inibitório (hiperpolarização), logo efeito ansiolítico (mecanismo apresentado pelo Diazepam, por exemplo). Todavia, incorrem em efeitos colaterais leves, moderados e graves, além de que a recidiva de sintomas em decorrência da retirada desta medicação é significativa mesmo após longo período de tratamento (BANDELOW, 2020; ARGYROPOULOS, et al., 2000; FLUYAU, et al., 2018).

Outros significativos efeitos colaterais oriundos dos benzodiazepínicos têm sido relatados, como: maior propensão a comportamentos de risco, comprometimento da cognição, mobilidade e habilidade de direção, aumento de risco de quedas, e desenvolvimento de tolerância após administração aproximada de 3 meses. Recentemente, o desenvolvimento da doença de Alzheimer também foi indicado (VOTAW, et al., 2019; DEAKIN, et al., 2004; LANE, 2005; OLFSON, et al., 2015; ENDRES, et al., 2015).

1.6- Novos tratamentos: peptídeos bioativos (PBs) e PBs gabaérgicos

Visando a superação das limitações apresentadas por fármacos convencionais, terapias com peptídeos vêm sendo administradas com sucesso há pouco mais de 1 séc (CABRAL, 2021).

Em meados da década de 20 a indústria farmacêutica experimentou inovação com o surgimento de drogas peptídicas subsequentes ao isolamento e comercialização de um peptídeo que apresenta 51 aminoácidos em sua estrutura, a insulina. Em 1950, peptídeos bioativos foram relatados por Mellander, indicando aumento de calcificação óssea dependente de Vitamina D em lactentes devido a ação de um conjunto de fosfopeptídeos derivados de caseína (CABRAL, 2021).

Com relação às limitações decorrentes de benzodiazepínicos, peptídeos com ação direta ou indireta em receptores Gaba A têm sido investigados, e a estes estamos chamando ``peptídeos bioativos gabaérgicos``.

São considerados peptídeos bioativos substâncias orgânicas à base de aminoácidos ligados por ligações covalentes do tipo amida, ou peptídica (nitrogênio ligado a uma acila), que geralmente apresentam de 2 a 20 aminoácidos. Muitos são os peptídeos bioativos oriundos de fontes naturais, estando a maioria deles codificados em moléculas proteicas, sendo liberados após tratamento enzimático, geralmente através de enzimas proteolíticas que provocam a hidrólise de paredes celulares. Uma vez os peptídeos bioativos até então criptografados liberados após tratamento enzimático, a caracterização sequencial e estrutural da molécula (extensão, hidrofobicidade, carga, etc.) ditará suas funcionalidades biológicas (Ahmed et al., 2022)..

A característica multifuncional dos peptídeos bioativos os permite agir em distintos sistemas biológicos tendo sido evidenciada a ação de peptídeos bioativos no sistema neurológico sugerindo grande potencial terapêutico para tratamento de transtornos mentais na medida em que são capazes de ativar ou antagonizar receptores específicos de células-alvo (LEMES, et al., 2016).

Em 1974 a encefalina, pentapeptídeo opióide endógeno, foi descoberta a partir de homogenatos cerebrais, e em 1979 Brantl et al. identificaram um peptídeo com função opióide através do isolamento da peptona de caseína do leite, a beta-casomorfina (MIZUSHIGE, 2021).

Diversos peptídeos bioativos ansiolíticos têm demonstrado interagir com receptores de ligantes endógenos. A Rubiscolina, um peptídeo delta-opióide derivado da planta Rubisco, exibiu efeito ansiolítico. A Sojamorfina, um mi-opióide derivado da beta-conglicina, também exibiu capacidade modulatória positiva sobre o sintoma de ansiedade (YOSHIKAWA, 2015).

Efeitos ansiolíticos mediados por peptídeos bioativos animais, como hidrolisados de alphaS1-caseína e hidrolisado de peixe, vem sendo evidenciados através de testes comportamentais como teste de labirinto em cruz elevado, teste de campo aberto, teste de enterramento defensivo, teste de privação condicionada de luz, etc. Em humanos, efeitos ansiolíticos oriundos destes peptídeos também foram evidenciados

através de um novo questionário baseado na mistura de outros dois questionários convencionais (Escala de ansiedade de Hamilton e Diagrama Ferreri para classificação de ansiedade) (BERNET, et al., 2000; MESSAUDI, et al.; 2008; MESSAUDI, et al., 2009; VIOLLE, et al., 2006; LANDSBERG, et al., 2015; DORMAN, et al., 1995).

Outros diversos peptídeos bioativos como o peptídeo bovino beta-Lactotensina (His-Ile-Arg-Leu), derivado da beta-lactoglobulina, exibiu efeito ansiolítico através de mecanismos relacionados com a ativação do receptor NTS2, e antagonismo dos receptores dopaminérgicos D1, segundo os ensaios conduzidos (HOU, et al., 2011).

Outro peptídeo bioativo, alfa-casozepina, derivado da alfa-S1caseína bovina, exibiu ação ansiolítica semelhante à ação benzodiazepínica em ratos após administração intraperitoneal, todavia o mecanismo de ação envolvido parece diferenciar-se do mecanismo benzodiazepínico, pois foi verificado nos ratos de experimentação que determinado marcador de atividade neuronal (FOS) aumentou 300% apenas na amígdala das cobaias que foram tratadas com o peptídeo bioativo, não daquelas tratadas com Diazepam. Estes dados talvez expliquem parte dos efeitos colaterais atrelados aos benzodiazepínicos (BENOIT, et al., 2016).

Através de predição *in silico*, após hidrólise de proteínas oriundas de grãos de soja, ultrafiltração e purificação, constatou-se que frações peptídicas que apresentaram entre 0 e 3Kda exerceram maiores atividades inibitórias sobre receptores da enzima Monoamina Oxidase (enzima que degrada neurotransmissores cuja depleção relaciona-se com os Transtornos de Ansiedade) tanto sobre o receptor MAO-A, quanto sobre o receptor MAO-B, com os respectivos scores IC50 de 3.211+-0.125 mg/ml e 1.622 +-0.025. O peptídeo que exibiu maior inibição sobre o receptor MAO-A foi o YSPYPQ, e sobre o receptor MAO-B foi PLYSN (YING, et al., 2021).

Fazem-se notórios tanto o potencial de peptídeos bioativos para aplicação psicofarmacoterapêutica contra os Transtornos de Ansiedade, quanto a necessidade de identificação dos peptídeos bioativos mais promissores para futuro desenvolvimento de novo psicofármaco que supere as limitações apresentadas pelas opções disponíveis no mercado atualmente (BERNET, et al., 2000).

Podemos mencionar como vantagens de fármacos à base de peptídeos: baixa toxicidade, devido as suas metabolizações partirem de aminoácidos, e apresentação de uma réplica de oligopeptídeos reguladores endógenos desenvolvidos naturalmente pela evolução das espécies otimizados para uma complexa rede de regulação do sistema nervoso central, por conseguinte desaparecem efeitos negativos que poderiam ser desencadeados mediante penetração na esfera endógena (Koroleva, 2019).

1.7- O sistema gabaérgico

Os peptídeos bioativos sobre os quais trataremos adiante geram efeito ansiolítico na medida em que modulam o sistema gabaérgico de modo direto ou indireto.

O sistema gabaérgico é controlado pelo neurotransmissor ácido Gama aminobutírico (GABA), principal responsável pelas sinapses inibitórias do sistema nervoso central de mamíferos, a dinâmica deste ligante endógeno mediador das sinapses gabaérgicas apresenta um papel fundamental na modulação de respostas relativas à ansiedade, tanto em estados sadios quanto patológicos (WATANABE et al., 2002).

Na medida em que a inibição gabaérgica controla a temporalidade e a atividade oscilatória das redes neurais, ela vem a ser um elemento central não apenas no controle da ansiedade, mas na regulação central de funções mentais e somáticas.

O GABA gera um efeito calmante, hipo-excitatório, hipotensivo, redutor de frequência cardíaca, anti-convulsivante, anti-hipóxico, além de promover produtividade cognitiva, atuar na reabilitação de movimentos e fala, e otimização de memória. O lançamento do neurotransmissor pelo terminal pré-sináptico é negativamente regulado por autoreceptores GABA B, e é removido do espaço extracelular por transportadores de GABA (GATs) localizados tanto no terminal pré-sináptico quanto em células gliais vizinhas (KOROLEVA AND MJASOEDOV, 2019; WATANABE et al., 2002).

A identificação do GABA deu-se pela primeira vez em cérebros de mamíferos por Awapara et al., e por Roberts e Frankel (1950). Os pesquisadores sugeriram que determinada enzima foi responsável por catalisar a conversão de glutamato em GABA, pois homogeneizados de cérebro de rato e coelho foram incubados com glutamato, e a redução dos níveis de glutamato acompanhou a elevação nos níveis de GABA, demonstrando então que o glutamato é um precursor de GABA.

O metabolismo da glicose está intimamente ligado à biossíntese de glutamato no cérebro, pois, conforme estabelecido, o cérebro é separado do sistema vascular pela barreira hematoencefálica (BHE), e nem o aminoácido não essencial glutamato, nem seu precursor, glutamina, tão pouco transportadores são capazes de atravessarem, apenas os aminoácidos essenciais e a glicose, logo, no cérebro, o glutamato é sintetizado a partir da glicose através de glicólise citoplasmática seguida pelo ciclo do ácido tricarbóxico (TCA) na mitocôndria. Nesta via, o alpha-cetoglutarato, que é um intermediário do ciclo do TCA é um importante precursor do glutamato gerado (Fig. 2). Nota-se que embora o glutamato seja um importante neurotransmissor excitatório, ele é precursor de um neurotransmissor inibitório, o GABA (WATANABE, et al., 2002).

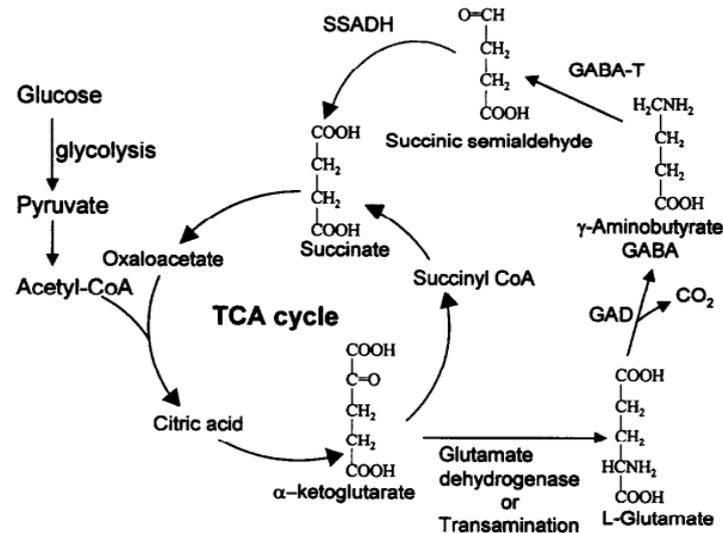


Fig. 1: Principal via metabólica de GABA, GAD, glutamato descaboxilase, GABA-T, gama-aminobutirato transaminase; SSADH; semialdeído succínico desidrogenase (WATANABE e al., 2002).

Conforme exibido na figura anterior, e exposto por Watanabe et al., (2002), a principal via do metabolismo do GABA envolve uma rota de alpha-cetoglutarato gerado pelo ciclo do TCA e é chamada de "shunt GABA", ou conforme tradução para o português, "desvio-GABA". A primeira etapa dessa via é a produção de glutamato a partir do alpha-cetoglutarato. O glutamato é convertido em GABA por uma reação de descarboxilação catalisada por GAD. GAD, então, é uma enzima limitante da taxa de síntese de GABA, e requer fosfato de piridoxal (PLP) como seu cofator (Roberts e Kuriyama, 1968). A reação de conversão do glutamato ao GABA é essencialmente irreversível. O catabolismo do GABA é catalisado pela GABA transaminase (GABA-T), que produz semialdeído succínico (SSA) a partir de GABA com conversão estequiométrica de alpha-cetoglutarato a glutamato. Na segunda etapa do catabolismo do GABA, o SSA é rapidamente oxidado pela succínica semialdeído desidrogenase (SSADH) e entra no ciclo do TCA como succinato. GABA-T e SSADH estão localizados nas mitocôndrias. O GABA-T catalisa uma reação reversível, mas a atividade do SSADH é tipicamente maior que a do GABA-T.

A enzima limitante da taxa de síntese de GABA, GAD, é encontrada quase exclusivamente nos neurônios inibitórios que liberam GABA como um neurotransmissor. Como descrito anteriormente, o GABA é sintetizado apenas por neurônios cerebrais Gabaérgicos. Já, a enzima catabólica GABA-T é encontrada principalmente em células gliais e endoteliais. O glutamato liberado pelos neurônios glutamatérgicos é metabolizado em glutamina nos astrócitos, e esta glutamina é então transportada para neurônios

GABAérgicos, nos quais é usado na síntese de GABA. Esses achados sugerem que a ativação de neurônios excitatórios é seguida pela ativação de neurônios inibitórios. Deve-se enfatizar que as células gliais fornecem esqueletos de carbono e nitrogênio aos neurônios para a síntese de GABA. Um resumo do compartimento metabólico GABA entre neurônios e células gliais é mostrado na figura abaixo (Kugler, 1993).

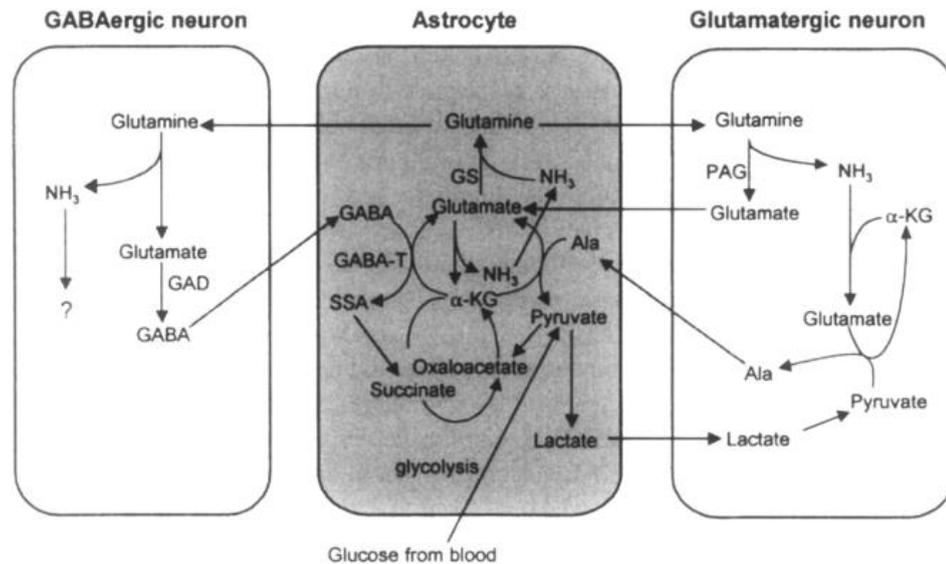


Fig. 2: Possíveis interações metabólicas entre neurônios Gabaérgicos, astrócitos e neurônios glutamatérgicos. GS, glutamina sintetase; GABA-T, GABA transaminase; PAG, glutaminase ativada por fosfato; GAD, ácido glutâmico descarboxilase; SSA, semialdeído succínico; GDH, ácido glutâmico desidroxinase (WATANABE et al. 2002).

Na atualidade os receptores GABA passaram a ser foco de atenção devido ao enorme progresso em pesquisas neurológicas que têm revelado uma diversidade de receptores GABA e distintas funções fisiológicas, bem como uma diversidade de moduladores alostéricos com propriedades semelhantes aos do ligante endógeno, a exemplo apresentaremos um peptídeo bioativo ansiolítico chamado Selank (Tanaka and Bowery, 1996).

Os receptores GABA são regulados por mecanismos de fosforilação que afetam suas propriedades funcionais e sua mobilidade pela superfície celular.

Uma vez lançado na fenda sináptica, o GABA se liga a 3 principais classes de receptores: GABA A, GABA B e GABA C, sendo o GABA B um tipo de receptor metabotrópico, responsável por mediar respostas inibitórias de longo prazo através da ativação de proteínas de ligação ao GTP, e influência de segundo mensageiros, regulando o K⁺ e canais de Ca⁺. Os outros 2 receptores, GABA A e GABA C, são ionotrópicos, e medeiam respostas rápidas ao GABA através da abertura de canais de cloro controlados por uma superfamília de ligantes (Macdonald e Olsen, 1994; Rabow et

al., 1995; Sieghart, 1995). <https://www.genome.jp/pathway/map04727>. Acesso em <04/07/23>

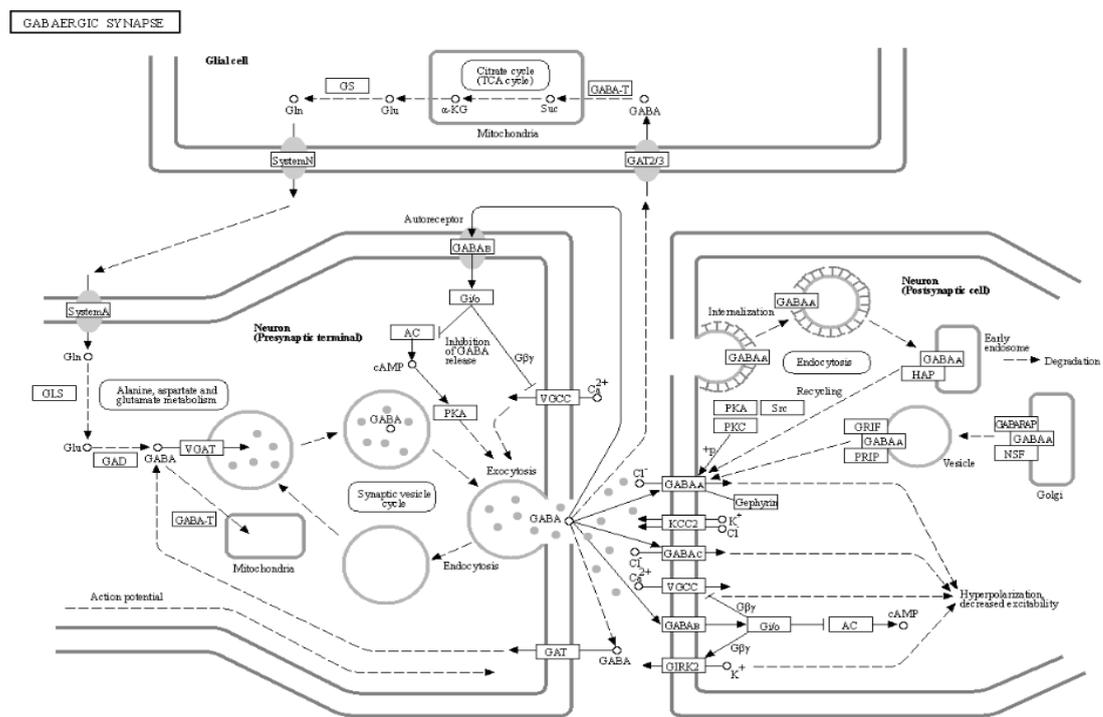


Fig.3: Sinapse Gabaérgica: (<https://www.genome.jp/pathway/map04727>).

Embora o sistema gabaérgico seja composto pelos receptores GABA A, GABA B e GABA C, o foco de atenção deste artigo são os receptores GABA do tipo ``A``, não apenas porque são os principais sítios para neurotransmissão rápida no SNC, mas porque são alvos dos benzodiazepínicos, fármacos convencionais que incorrem em efeitos colaterais graves para muitos pacientes, conforme supracitado em tópicos anteriores. Ademais, compilamos neste artigo alguns dos principais estudos sobre a modulação dos Transtornos de Ansiedade através da administração de peptídeos gabaérgicos, e todos eles atuam em receptores GABA A (Sieghart, 1995).

Receptores GABA A e as suas subunidades:

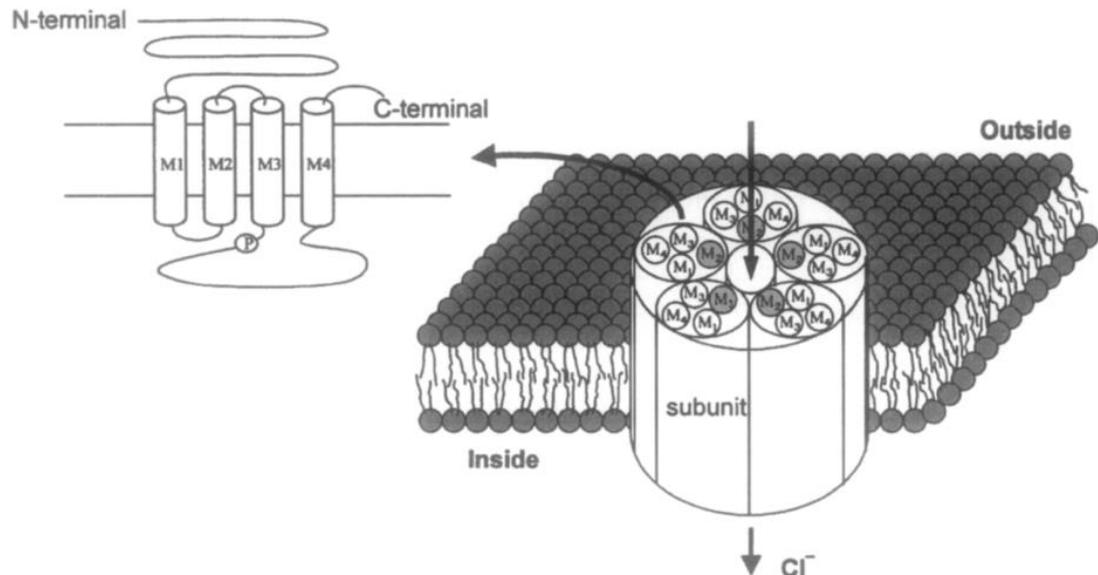


Fig. 4: Esquema do complexo receptor GABA A- canal iônico Cl⁻ e suas subunidades (WATANABE, et al. 2002).

O receptor GABA A é um pentâmero que é uma combinação de várias subunidades. Cada subunidade é composta por um grande domínio N-terminal extracelular e quatro membranas hidrofóbicas domínios (M1-M4) seguidos pelo domínio C-terminal extracelular. Essa estrutura se assemelha àquelas dos receptores nicotínicos de acetilcolina, receptores de glicina e receptores de 5-hidroxitriptamina. As cinco subunidades do receptor GABAA formam uma estrutura quase simétrica ao redor do canal iônico, e acredita-se que a região M2 reveste a parede do poro do canal (Chebib e Johnston, 2000).

Cada subunidade do receptor GABA A também possui um grande loop intracelular que pode ser um alvo para proteínas quinases e pode ser necessário para direcionamento subcelular e agrupamento de membrana dos receptores, talvez por ancorar o receptor ao citoesqueleto (Chebib e Johnston, 2000).

Como os receptores GABA A são conjuntos pentaméricos derivados de uma combinação de várias subunidades, um número muito grande de subtipos de receptores pode ser formado. Estudos de sistemas de expressão heterólogos mostraram que os receptores GABA A funcionais contêm pelo menos uma isoforma com subunidade alpha,

uma gama e uma beta) (Levitan et al., 1988; Malherbe et al., 1990^a) e que a maioria das combinações pentaméricas são 2alpha2beta1gama, 2alpha1beta2gama ou 1alpha2beta2gama (Sieghart, 1995). Acredita-se que as subunidades sigma e theta sejam montadas em receptores GABA A em lugar das subunidades y. A subunidade Pi é encontrada fora do SNC em órgãos como útero, próstata, timo e pulmão (Hedblom e Kirkness, 1997).

A ligação do GABA aos receptores GABA A abre um canal de Cl⁻. Locais de ligação GABA de alta e baixa afinidade foram encontrados no receptor GABA A, e os Kd correspondem aos valores de 10 a 240 nanômetros, respectivamente (Van Ness et al., 1982). No entanto, porque concentrações micromolares de GABA ligado ao receptor GABA A podem ser necessárias para efeitos fisiológicos (Cash e Subbarao 1987a,b) a existência de sítios adicionais de ligação GABA de afinidade muito baixa é assumido (Sieghart, 1995). Um receptor GABA A pode possuir até cinco sítios de ligação GABA. Esses locais de ligação mostram altas afinidades para o GABA no estado desocupado, mas com a crescente ocupação desses locais com GABA as afinidades dos locais desocupados remanescentes podem ser reduzidas por causa de restrições alostéricas. Sob condições fisiológicas, na fenda sináptica a ligação de GABA aos sítios de ligação de alta e baixa afinidade pode ocorrer sem a abertura de canais de Cl⁻. Sob condições fisiológicas, apenas dois ou três sítios de ligação GABA com afinidades de aproximadamente 100 microMolares estão desocupadas por receptor GABA A (Cash e Subbarao 1987a,b).

A concentração de GABA na fenda sináptica pode chegar a 500 microMolares. Assume-se que nos locais de ligação do GABA nos receptores GABA A contenha nos domínios extracelulares N terminal as subunidades alpha e beta (Amin e Weiss, 1993; Smith e Olsen, 1995).

Modulação de receptores GABA A por fosforilação

Mecanismos alternativos podem criar diversidade no receptor GABA A. A fosforilação é um mecanismo comum para a regulação da função do receptor e pode desempenhar um papel importante na plasticidade sináptica. Todos os subtipos de subunidades do receptor GABA A contêm sequências de substrato para algumas quinases, incluindo proteína quinase A dependente de CAMP (PKA), proteína quinase C dependente de fosfolípídeos (PKC) ativada por cálcio, proteína tirosina quinase e Ca²⁺/quinase tipo II dependente de calmodulina. Esses sítios estão localizados no grande loop citoplasmático entre o terceiro e o quarto domínios transmembrana, embora as sequências de consenso de fosforilação dependam do subtipo e da espécie da

subunidade (Rabow et al., 1995). As funções do receptor GABA A podem ser moduladas por fosforilação, e isso parece aumentar ou reduzir as correntes ativadas por GABA (Browning et al., 1990; Kirkness et al., 1989). Essas diferenças nos efeitos funcionais podem refletir a heterogeneidade subjacente às estruturas do receptor GABA A. Um papel crítico para as subunidades Beta na mediação ou regulação negativa do receptor GABA A após a fosforilação induzida por PKA foi demonstrada (Smart, 1997).

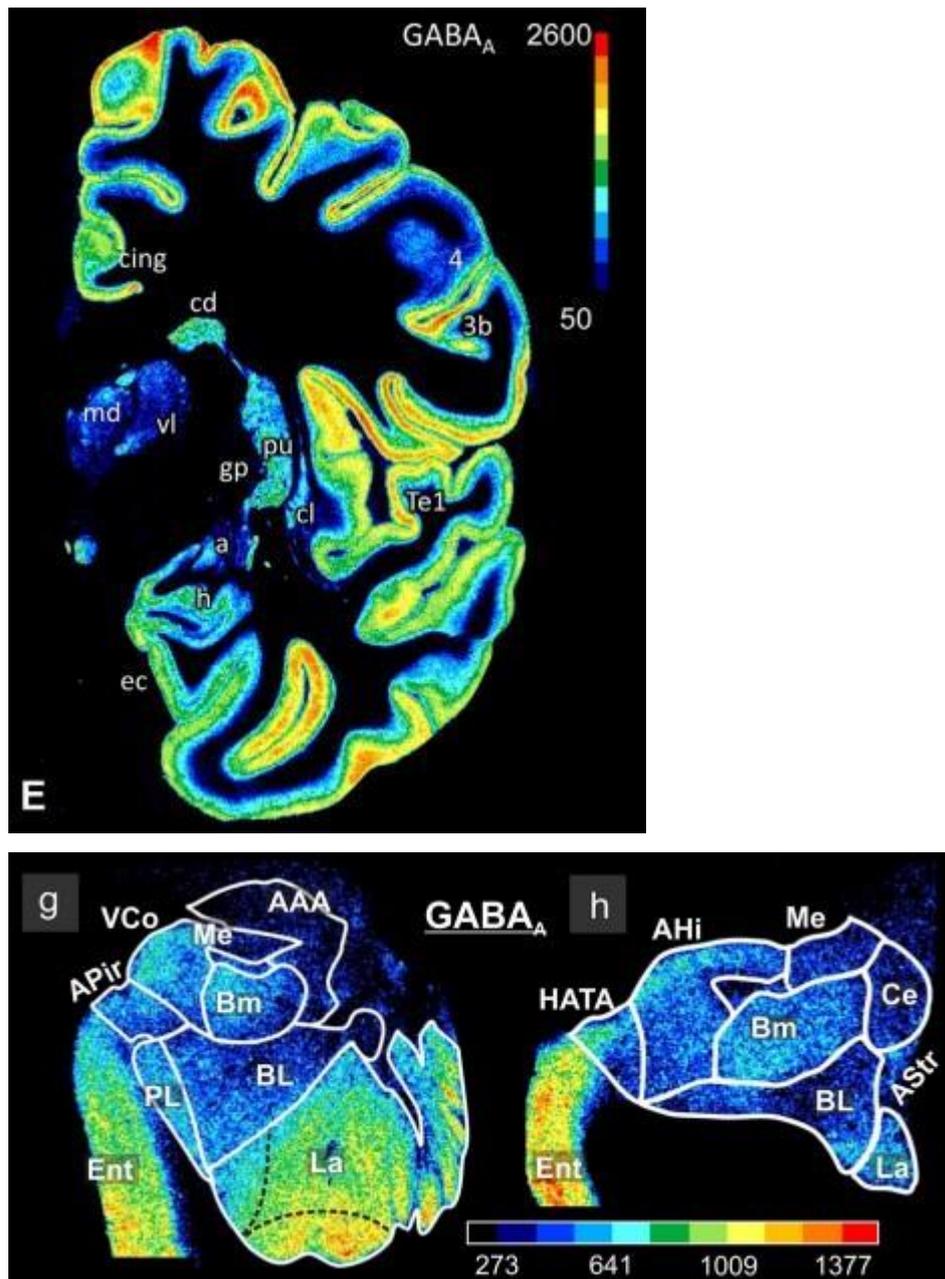
Consequentemente, o receptor GABA A pode ser regulado por níveis intracelulares de CAMP. A PKC é amplamente distribuída em vários tecidos, e a enzima é mais concentrada no SNC (Minakuchi et al., 1981).

Foi demonstrado que a fosforilação endógena é necessária para evitar diminuições nas correntes de Cl⁻ mediadas por GABA (Gyenes et al., 1994). Os tipos de fosfatases e quinases envolvidas nesses mecanismos não são claros, mas as atividades endógenas da quinase parecem estar associadas às subunidades alpha e gama 2 (Bureau et al., 1999). Dados recentes sugeriram que uma doença associada à fosfatase de membrana diferente da calcineurina neutraliza a fosforilação endógena de receptores GABA A. A atividade da quinase endógena depende estritamente da presença de cátions bivalentes: Mg²⁺, Mn²⁺ e Ca²⁺. Além disso, a fosforilação endógena do receptor GABA A é modulada por poliaminas. Espermina e, em menor grau, a espermidina e a putrescina modulam a fosforilação endógena de receptores GABA A purificados (Minier et al., 2000; Bureau et al., 1999).

Os receptores de glicina e os receptores GABA A pertencem à mesma superfamília de proteínas, embora esses receptores difiram uns dos outros farmacologicamente. No SNC dos vertebrados, a glicina e GABA têm principalmente ações inibitórias, mas a transmissão GABAérgica é usada em todo o SNC, e a inibição mediada por glicina tem uma distribuição mais limitada que predomina no tronco encefálico e na medula espinhal (Vannier e Triller, 1997).

Os receptores de glicina no SNC dos vertebrados estão ligados a um receptor intracelular específico, a proteína chamada gefirina que é uma proteína de 93 kDa originalmente identificada por copurificação com receptores de glicina sensíveis à estricnina (Bowery and Smart, 2006).

Há evidências crescentes de que a gefirina também desempenha um papel no agrupamento de receptores GABA A em locais sinápticos (Todd et al., 1996).



Figuras 5 e 6, respectivamente: Distribuição de receptores GABA A nas duas principais regiões relacionadas com regulação passiva e ativa das emoções, logo regulação dos Transtornos de Ansiedade. (E) Córtex cerebral. (G) Amígdala rostral e ventral (Kedo et al., 2018; Palomero-Gallagher and Zilles, 2018) . Para melhor entendimento sobre a teoria de regulações passiva e ativa dos Transtornos de Ansiedade, ler (Falbel, 2023b).

Deve-se ressaltar que distintas variáveis interferem na disponibilidade de receptores, como expressão genética e ação de transportadores (Hansen, et al., 2022).

1.8- Os receptores GABA A: distintas composições

A diversidade de receptores GABA encontrada parece ter sido evolutivamente desenvolvida em consonância com as demandas de controle de temporalidade das

células principais. Este controle de temporalidade é realizado através de características como: 1) O potencial de ação dos interneurônios inibitórios é mais rápido do que o das células piramidais e a cinética de eventos sinápticos que excitam células inibitórias é mais veloz do que a cinética de eventos que excitam células piramidais. 2) Interneurônios gabaérgicos são morfologicamente muito diversos, refletindo suas múltiplas funções em redes neurais. 3) Estes interneurônios inibitórios apresentam uma inervação de células piramidais com domínio específico que podem ser especificamente reguladas por interneurônios gabaérgicos de modo axo-axônico. 4) As propriedades das respostas geradas pela sinalização dos interneurônios inibitórios é formatada pelo tipo de receptor GABA A expresso sináptica ou extrasinapticamente. Além disso, o corpo de células piramidais hipocampais é inervado por 2 tipos de células: as células rápidas com formato de cesta contendo parvalbumina que formam sinapses contendo receptores Alpha1 GABA A, e que geram rápidas cinéticas de despolarização. Enquanto, sinapses de células positivas em forma de cesta contendo colecistoquinina contém receptores Alpha 2 GABA A, que operam cinéticas mais lentas do que a cinética que envolve receptores Alpha 1 GABA A.

Em suma, devido ao fato dos interneurônios gabaérgicos serem operacionais em todas as regiões cerebrais, um vasto repertório de receptores GABA A é requerido, logo, os interneurônios inibitórios apresentam subtipos específicos para operar com a cinética apropriada e regular as redes que envolvem as mais distintas respostas.

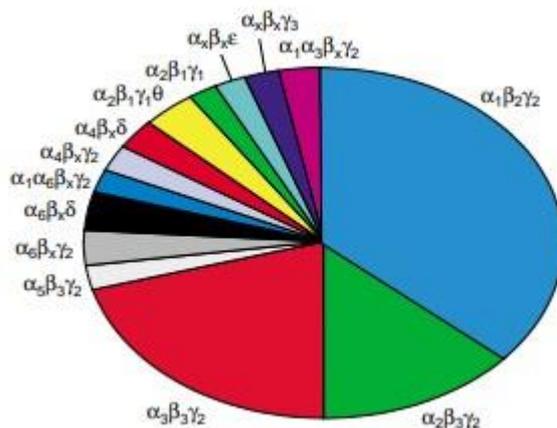


Fig. 7- Um gráfico de pizza representando a abundância aproximada dos subtipos de receptor do ácido γ -aminobutírico (GABA) -A em cérebro de rato (Whiting, 2003).

O receptor GABA A trata-se de um receptor ionotrópico que medeia respostas rápidas ao GABA através da abertura de canais de cloro controlados por uma superfamília de ligantes (Macdonald e Olsen, 1994; Rabow et al., 1995; Sieghart, 1995).

Na maioria dos casos, o potencial eletroquímico do Cl⁻ nos neurônios é baixo em comparação com o do ambiente extracelular.

Quando o GABA se liga ao receptor GABA A, ele abre o canal Cl⁻ associado e permite o fluxo de Cl⁻ para dentro do neurônio. Portanto, o GABA hiperpolariza a membrana neuronal tornando a célula menos reativa aos neurotransmissores excitatórios, propiciando, assim, o efeito ansiolítico (Sieghart, 1995).

Faz-se necessário esclarecer que os receptores GABA A são conjuntos pentaméricos derivados de uma composição de várias subunidades, portanto apresentam distintas composições devido a esta diversidade de subunidades e variantes de subunidades, composições estas que geralmente não são descritas pelos estudos conduzidos.

Repertório de subunidades: Alpha (1-6), Beta (1-3), Gama (1-3), Delta (1), Épsilon (1), Teta (1), Rô (1-3).

Estudos de sistemas de expressão heterólogos mostraram que os receptores GABA A funcionais contêm pelo menos uma isoforma com subunidade alpha, uma gama e uma beta e que a maioria das combinações pentaméricas são 2alpha 2beta 1gama, 2alpha 1beta 2gama, ou 1alpha 2beta 2gama (Levitan et al., 1988; Malherbe et al., 1990; Sieghart, 1995).

Nenhum dos estudos encontrados até o momento atentou-se para esta questão, o que vem a ser uma significativa limitação, pois quando determinado artigo menciona que um peptídeo bioativo específico não apresentou afinidade direta ao receptor GABA A, não se sabe ao certo se os pesquisadores administraram as composições consideradas funcionais. Ademais, conforme postulado cientificamente, benzodiazepínicos apresentam altas afinidades por variantes 1,2,3 e 5 de subunidades Alpha, já barbitúricos apresentam maiores afinidades por variantes 4 e 6 de subunidades Alpha, tornando a combinação de ambos os fármacos desaconselhável em decorrência da potencialização de efeitos colaterais. Assim sendo, quando determinado estudo relata em seus resultados que um peptídeo bioativo específico apresentou afinidade direta ao receptor gabaérgico do tipo "A", necessitamos conhecer a descrição da composição deste receptor para melhor predizermos efeitos conjuntos entre diferentes ativos (Skibiski and Abdijadid, 2022).

Vale ressaltar também que os sítios de ligação do ácido Gama-aminobutírico nos receptores GABA A situam-se nos domínios extracelulares N terminal entre as subunidades Alpha e Beta, já os sítios de ligação dos benzodiazepínicos situam-se entre as subunidades Alpha e Gama (Amin e Weiss, 1993; Smith e Olsen, 1995; Lorenz-Guertin, 2018). Nenhum dos ensaios de afinidade direta do peptídeo bioativo ao receptor GABA A com o qual nos deparamos contemplou a identificação dos sítios de ligação do peptídeo bioativo específico presentes nos receptores GABA A.

Com o passar dos anos, estudos relacionados às propriedades farmacológicas da diversidade dos receptores GABA A, demonstraram que a composição de receptores Alpha2 GABA A é a maior mediadora de ansiólise, a composição Alpha3 GABA A também tem exibido modulação positiva da ansiedade, porém com ligantes sob alta ocupação dos receptores, enquanto benzodiazepínicos clássicos demonstraram exercer ansiólise a baixas ocupações dos receptores Alpha2 GABA A.

Vale ressaltar que esta composição Alpha 2 de receptor GABA A que conforme mencionado, destaca-se por sua propriedade ansiolítica, localiza-se preponderantemente no seguimento inicial axônico das principais células do córtex cerebral e hipocampo podendo controlar as saídas de sinais destas células. Além disso, dentre as composições Alpha 1, Alpha 2 e Alpha 3 de receptores GABA A, justamente a composição mais ansiolítica, Alpha 2, é proeminente na amígdala, área mais relacionada com controle de emoções, incluindo, obviamente, medo e ansiedade, já a composição Alpha 1 é completamente inexistente nesta região cerebral. Enfatiza-se que devido ao posicionamento estratégico de composições ansiolíticas de receptores Alpha2 GABA A, elas se tornaram substratos-chave para fármacos cuja finalidade é modular os Transtornos de Ansiedade.

A composição Alpha2Beta3Gama2 (mais ansiolítica) é o segundo subtipo mais abundante no cérebro (15-20%), o primeiro subtipo mais abundante é a Alpha1 Beta2 Gama2 (60%), esta medeia efeito sedativo, amnésico, e anti-convulsivante de agonistas benzodiazepínicos. Apresentam alta afinidade por benzodiazepínicos, Zolpidem e antagonista flumazenil. O segundo subtipo mais abundante apresenta alta afinidade por agonistas benzodiazepínicos e antagonista flumazenil, e afinidade intermediária por Zolpidem. Este subtipo de especial interesse à modulação dos Transtornos de Ansiedade encontra-se sobretudo distribuído no córtex cerebral, na formação hipocampal (células principais principalmente no segmento inicial do axônio); bulbo olfatório (células granulares), estriado (células estelares espinhais), neurônios olivares inferiores (principalmente nos dendritos), hipotálamo, amígdala (células principais); colígulo superior e moto-neurônios. Subcelularmente localizam-se sobretudo em regiões sinápticas, enriquecendo os seguimentos iniciais dos axônios de células piramidais hipocampais e corticais (MÖHLER, 2006).

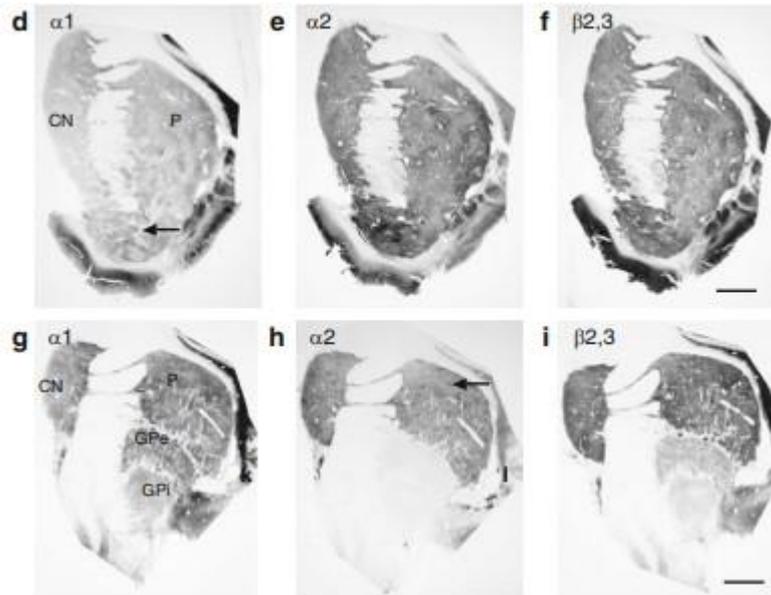


Fig. 8: (d-i) Lâminas do córtex com subunidades específicas de receptores GABA A coradas. No córtex visual (área 17) dos humanos e primatas, estudos imunohistoquímicos descobriram que as subunidades Alpha 1, Beta 2, Gama 2 eram preponderantes nas camadas II-III, e formou uma faixa densa de marcação em IVA e IVC] no córtex visual primário (Fig. 1a, b para subunidades Beta 2, 3, Gama 2). Em estudos com roedores, essas subunidades também são as mais expressas nas regiões corticais equivalentes. Nos córtices frontal e entorrinal, as subunidades Alpha 2 e Alpha 3 estão localizadas principalmente nas camadas II, III, V e VI, embora diferenças na intensidade da lâmina ocorra entre as duas regiões; além disso, nota-se que estas duas subunidades são proeminentes no segmento inicial do axônio dos neurônios piramidais. Essas observações são consonantes com aquelas derivadas do córtex de rato. As subunidades Alpha 4, Alpha 5, Gama 3 e Delta também foram detectados no córtex de roedores. A marcação imunohistoquímica das subunidades Alpha 1, Beta 2, 3, Gama 2 foram consistentemente as subunidades mais encontradas em todas as diferentes regiões do córtex cerebral humano investigadas. Os receptores são concentrados em redes densas de rótulos de neurópilos dentro dos quais células piramidais e também os interneurônios podem ser distinguidos; As subunidades Alpha 2 estavam localizadas principalmente no neurópilo de cada camada. A subunidade Alpha 3 delineou principalmente neurônios piramidais cujos corpos celulares estavam localizados nas camadas III e V com seus dendritos apicais estendendo-se até as camadas superiores do córtex (Waldvogel et al., 2010).

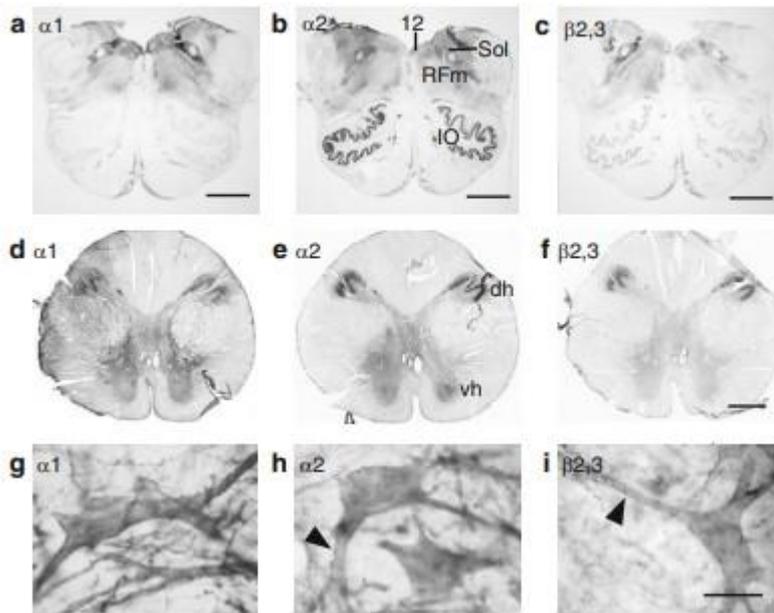


Fig.9: (a–c) Série de seções da medula oblonga média marcada para subunidades, (a) Alpha 1, (b) Alpha 2 e (c) Beta 2, 3 exibindo variação de distribuição. (d–f) Série de sessões coronais da medula espinhal marcada para as subunidades (d) Alpha 1, (e) Alpha 2 and (f) Beta 2,3. (g–i) Imagens de neurônios motores em corno ventral da medula espinhal marcado com subunidades (g) Alpha 1, (h) Alpha 2 e (i) Beta 2,3 (Waldvogel et al., 2010).

2- Objetivos

2.1- Objetivo geral

Identificar na literatura científica peptídeos bioativos gabaérgicos com potencial ansiolítico (PBGs) e realizar o Docking molecular dos mesmos.

2.2- Objetivos específicos

Listar PBs ansiolíticos com ação em receptores do ácido gama-aminobutírico (GABA), descrever seus principais mecanismos de ação à luz da produção científica vigente, e comparar entre eles as afinidades de ligação aos receptores GABA A.

3- Metodologia

A estratégia de busca inicial incluiu banco de dados que concentram artigos científicos originais, teses, dissertações, abstracts, entre outros, incluindo cinco bases relacionadas diretamente com a área da saúde, contribuindo para o melhor controle e minimização de vieses de seleção: PubMed, Scopus, Web of Science, Cochrane Controlled Trials Register (CCTR) – Cochrane Central e Lilacs, teses USP e CAPES.

Segundo os critérios de elegibilidade foram contemplados na análise apenas artigos publicados a partir de 2000, visto que os peptídeos bioativos oriundos de fontes vegetais e animais para aplicação psicofarmacológica passaram a ser mais assiduamente investigados a partir deste período, até 2022. Foram incluídos também artigos em português, inglês, espanhol e francês, artigos sobre PBs relacionados com mecanismos envolvidos com Transtornos de Ansiedade, artigos sobre mecanismos relacionados com transtornos de ansiedade, e artigos relacionados com os termos de busca: transtornos de ansiedade, peptídeos bioativos ansiolíticos, Peptídeos Bioativos Gabaérgicos, Peptídeos Bioativos Benzodiazepínicos; anxiety disorders, anxiolytic bioactive peptides, Gabaergic Bioactive Peptides, Benzodiazepine Bioactive Peptides; trastornos de ansiedad, péptidos bioactivos ansiolíticos, péptidos bioactivos gabaérgicos, péptidos bioactivos de benzodiazepinas; troubles anxieux, peptides bioactifs anxiolytiques, peptides bioactifs gabaergiques, peptides bioactifs benzodiazépines.

Foram excluídos artigos sobre peptídeos que não apresentam relação direta com mecanismos envolvidos com os Transtornos de Ansiedade, estudos abertos e relatos de caso.

4- Docking molecular

O método de docking foi realizado utilizando o software Gold onde a proteína foi sendo extraído do banco de dados de proteínas (PDB), código= 4COF, sem conter moléculas de água ele foi separado de seu ligante nativo usando Chimera. A proteína e o ligante nativo foram preparados pela ferramenta de preparação de doca do Chimera. Esta etapa inclui a adição de átomos de hidrogênio e cargas padrão. Além disso, foi aplicada margem extra de 5 Å em todas as seis direções para apoiar a caixa ao redor do sítio ativo. Na última etapa, todos os peptídeos, Alpha Casozepina (YLGYLEQLLR), Rubimetida (MRW), Ovolin (VYLRP), Selank (TKPRPGP), Weylin 1 (MH), Weylin 2 (MKG), YL, YLG foram desenhados em chemdraw e a energia foi minimizada através de chemdraw 3D usando MM2. Em seguida, esses ligantes foram encaixados nas configurações padrão usando Gold com uma caixa de grade de 13 Å centrada em $x = 3,355$, $y = -1,120$, $z = 139,497$.

O programa Gold baseia-se na afinidade de ligação, em kcal/mol, fornecendo informações mais realistas em relação à potência. Jones et al., 1995a, criaram o GOLD ((Genetic Optimization for Ligand Docking), que automatiza o docking na área do sítio ativo da proteína com flexibilidade completa do ligante acíclico, flexibilidade parcial do ligante cíclico e flexibilidade parcial da proteína. Ele codifica explicitamente motivos de ligações de hidrogênio no GA para procurar efetivamente por modos de ligação. Os modos de ligação resultantes, que incluíam termos para ligações de hidrogênio, potenciais de dispersão aos pares e termos da mecânica molecular para a energia interna do ligante, foram classificados usando um sistema de pontuação. Este método leva em conta a essencial necessidade de deslocamento de água antes da criação de vínculos (Jones et al., 1995).

5- Resultados

Em uma revisão de 10 artigos que investigaram o potencial ansiolítico de Peptídeos Bioativos Gabaérgicos, identificou-se um total de 8 peptídeos gabaérgicos. Estes são: Selank (TKPRPGP), Alpha-casozepina (YLGYLEQLLR), YL, YLG, Ovolina (VYLPR), Weylin 1 (MH), Weylin 2 (MKG) e Rubimetida (MRW). Esta pesquisa foi relatada em diversos estudos, incluindo Vyunova et al. (2018), Benoit et al. (2017), Misushige et al. (2013), Oda et al. (2012), Yamada et al. (2014) e Zhao et al. (2016).

Todos os estudos analisados chegaram à conclusão de que os Peptídeos Bioativos investigados demonstram atividade ansiolítica. Essa atividade está associada à modulação do sistema gabaérgico. No entanto, um dos estudos destacou que, ao comparar o efeito ansiolítico de um peptídeo bioativo específico com o do fármaco Diazepam, o benzodiazepínico exibiu um potencial ansiolítico superior. A maioria dos estudos utilizou testes comportamentais em ratos como método de avaliação. Apenas um se concentrou exclusivamente em marcadores biológicos. Notavelmente, o estudo de Oda et al. (2012) se destacou ao replicar experimentos em duas cepas diferentes de ratos, visando minimizar limitações relacionadas a variações interespecies. Neste cenário, é importante destacar a extensa pesquisa científica que questiona a eficácia de testes comportamentais em animais não humanos para avaliar o potencial ansiolítico de substâncias destinadas ao uso humano, um tópico que será abordado mais detalhadamente no próximo subtópico.

Na maioria dos estudos analisados, os autores concluíram que ocorre uma modulação indireta dos receptores GABA A. Essa conclusão baseia-se no fato de que a bicuculina, um antagonista dos receptores GABA A, foi capaz de inibir o efeito ansiolítico dos peptídeos bioativos em testes comportamentais com animais. Entretanto, em uma revisão de 10 estudos focados em peptídeos bioativos ansiolíticos gabaérgicos, identificou-se modulações diretas nos receptores em dois desses estudos, especificamente nos trabalhos de Vyunova et al. (2018) e Benoit et al. (2016).

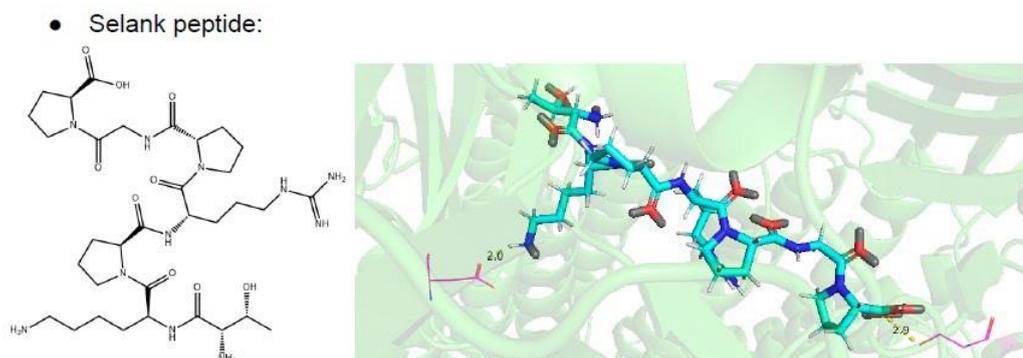
No estudo de Vyunova et al. (2018), foi demonstrado através de um ensaio radio-ligante que o peptídeo bioativo Selank, já comercializado na Rússia como fármaco ansiolítico, possui a capacidade de modular alostericamente os receptores GABA A. Esse ensaio, que marcou o efeito ansiolítico do peptídeo pela sua influência na ligação do radio-ligante ao receptor GABA A, revelou que o aumento das concentrações do peptídeo bioativo incrementava a capacidade

de ligação do trítio-GABA ao receptor. Contudo, a partir de uma certa concentração, observou-se uma diminuição dessa capacidade, sugerindo que um dos sítios de ligação do Selank no receptor GABA A coincide com o do radioligante. Esta modulação direta e alostérica foi investigada em membranas plasmáticas de células corticais de ratos, mas a composição específica dos receptores GABA A não foi detalhada, o que dificulta comparações e previsões de interações farmacológicas com outras substâncias, como os benzodiazepínicos.

Selank é um peptídeo regulatório que corresponde aos resíduos de aminoácidos de números 289-292, trata-se de um sintético análogo da tuftsina (curto fragmento de Thr-Lys-Pro-Arg da cadeia pesada da imunoglobulina G humana, alongado com uma parte C-terminal contendo 1 peptídeo com 3 aminoácidos (Pro-Gly-Pro) que aumentam a estabilidade metabólica e elevam a duração da ação biológica do peptídeo. Conforme dados encontrados, o Selank apresenta efeito ansiolítico significativo, mas também apresenta efeito nootrópico sendo um ativo efetivo no tratamento da ansiedade e e transtornos asténicos da ansiedade, culminando a otimização de funções mnésicas e cognitivas (Kolomin et al., 2023; Ashmarin et al., 2005; Ashmarin IP, 2007; Zozulia et al., 2008; Kozlovskii II, Danchev ND, 2002).

A análise de acoplamento molecular do Selank com o receptor GABA A, realizado nas coordenadas $x=3.355$, $y=-1.120$ e $z=139.497$ (em uma caixa de grade de tamanho 13), foi efetuada utilizando o programa GOLD (Genetic Optimisation for Ligand Docking). Os resultados dessa análise são apresentados na Figura 1.

Figura 10. Acoplamento molecular do peptídeo Selank com o receptor GABA A nas coordenadas $x=3.355$, $y=-1.120$ e $z=139.497$ (caixa de grade tamanho 13) utilizando o programa GOLD.



Possíveis interações foram encontradas: (I) ligação de hidrogênio (2 angstroms) entre o oxigênio do aminoácido ASP 56 da cadeia A e o grupo NH do peptídeo e (II) ligação de hidrogênio (2,9 Å) entre o oxigênio do aminoácido THR 133 da cadeia D e o grupo OH do peptídeo.

Fonte: Prof. Dr. Gustavo Henrique Goulart Trossini.

Outro peptídeo bioativo que demonstrou ter uma modulação direta, embora fraca, dos receptores GABA A, é a Alpha-casozepina. Este peptídeo é o fragmento aminoacídico 91-100 da proteína láctea AlphaS1-Caseína, obtido por digestão triptica, conforme descrito por Benoit et al. (2016).

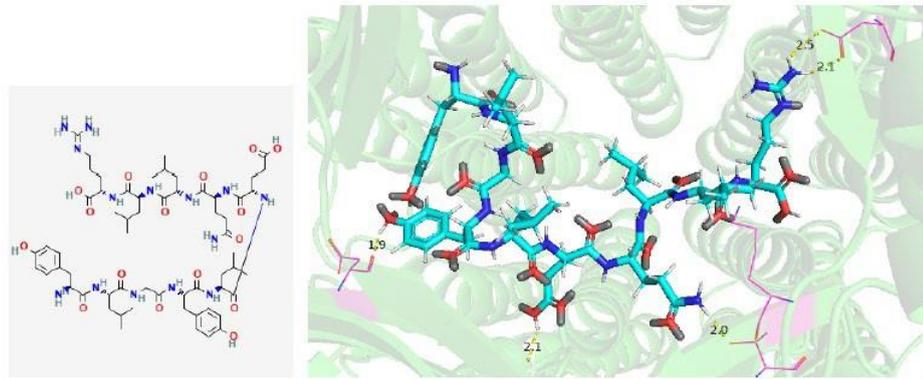
No estudo de Benoit et al. (2016), a afinidade da Alpha-casozepina pelos sítios benzodiazepínicos dos receptores GABA A foi testada in vitro. Esta análise foi realizada em competição com o metil-trítio-flunitrazepam e comparada com a proteína-matriz alphaS1-caseína bovina. Observou-se que a competição entre o peptídeo bioativo (PB) e o benzodiazepínico resultou em respectivos valores de IC₅₀ de 88mM e apenas 8,2nM. Adicionalmente, a afinidade da Alpha-casozepina pelo sítio benzodiazepínico do receptor GABA A foi quatro vezes menor do que a afinidade expressa pela alphaS1-caseína bovina.

Além disso, a atividade ansiolítica da Alpha-casozepina foi testada in vivo através do teste comportamental de Enterramento Defensivo. Os efeitos ansiolíticos decorrentes do Diazepam e do PB mostraram-se comparáveis, embora a quantidade administrada de benzodiazepínico tenha sido 2,5 vezes maior.

O estudo também incluiu uma análise de acoplamento molecular da Alpha-casozepina com o receptor GABA A, realizada nas coordenadas $x=3.355$, $y=-1.120$ e $z=139.497$ (em uma caixa de grade de tamanho 13) usando o programa GOLD (Genetic Optimisation for Ligand Docking). Os resultados dessa análise podem ser encontrados na Figura 2.

Figura 11. Acoplamento molecular do peptídeo Alpha-casozepina com o receptor GABA A nas coordenadas $x=3.355$, $y=-1.120$ e $z=139.497$ (caixa de grade tamanho 13) utilizando o programa GOLD.

- Alpha Casozepine



Possíveis interações foram encontradas: (I) ligação de hidrogênio (2 Å) entre o oxigênio do aminoácido THR 133 da cadeia A e o grupo NH do peptídeo; (II) ligação de hidrogênio (1,9 Å) entre o oxigênio do aminoácido ASP 48 da cadeia B e o grupo OH do peptídeo e (III) duas ligações de hidrogênio (2,1 Å/2,5 Å) entre o oxigênio do aminoácido ASP 56 da cadeia E e o grupo NH do peptídeo.

Fonte: Prof. Dr. Gustavo Henrique Goulart Trossini

Mizushige et al. (2013) conduziram uma pesquisa para investigar se o peptídeo YL, ou algum de seus análogos, seria liberado da proteína láctea alphaS1-caseína por meio da digestão com pepsina e pancreatina. Descobriu-se que o peptídeo YLG era mais facilmente liberado da proteína-matriz do que a sequência YL isolada, e que a combinação de Y com L não exibia efeito biológico significativo

Os mesmos autores exploraram a relação do tripeptídeo YLG com os sistemas serotoninérgico, dopaminérgico e gabaérgico. Para isso, administraram antagonistas específicos para receptores de cada um destes sistemas: WAY100135 para o sistema serotoninérgico, SCH23390 para o dopaminérgico e bicuculina para o gabaérgico. A atividade ansiolítica do YLG foi inibida por esses antagonistas, sugerindo que seu mecanismo de ação é mediado pela ativação dos receptores mencionados. Interessantemente, em uma concentração de 100 mM, o YLG não demonstrou afinidade direta pelos receptores supracitados, indicando que sua atividade ansiolítica poderia derivar de uma modulação indireta que resulta no aumento endógeno de serotonina, dopamina e GABA. Os autores propuseram que, em doses mais elevadas, a atividade ansiolítica do peptídeo poderia ser devida a uma modulação direta,

com afinidade pelos receptores GABA A. No entanto, o estudo não forneceu dados que confirmassem essa hipótese.

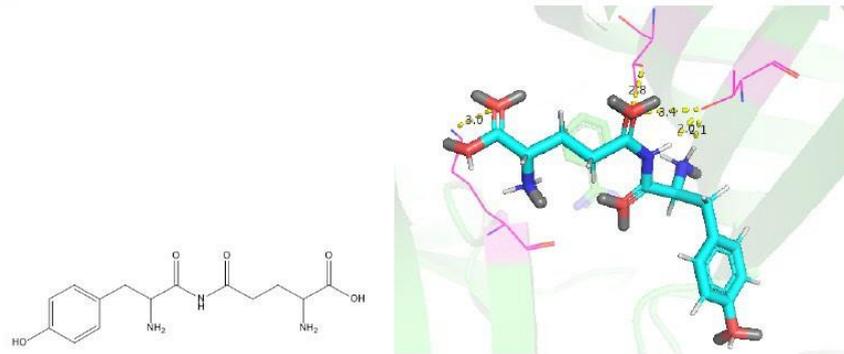
A atividade biológica ansiolítica do peptídeo YL foi investigada por Oda et al. (2012), que utilizaram um inibidor de ciclooxigenase (COX) durante seus estudos. No entanto, esse inibidor não conseguiu bloquear o efeito ansiolítico do YL, indicando que os mecanismos de ação do peptídeo não estão relacionados a esse caminho.

Outros pesquisadores que examinaram a atividade ansiolítica do YL incluem Kanegawa et al. (2009). Eles realizaram testes comportamentais, como o Labirinto em Cruz Elevado e o Campo Aberto, usando métodos como injeções intraperitoneais, gavagem e injeções intracerebroventriculares. Descobriu-se uma potente atividade ansiolítica do YL que era dose-dependente, variando de 0,1g a 1g por Kg de peso corporal dos roedores. Utilizando agonistas e antagonistas dos receptores 5HT1A, D1, e sítios benzodiazepínicos e gabaérgicos nos receptores GABA A, os autores sugeriram um mecanismo de ação envolvendo uma sequência de ativação dos sistemas serotoninérgico, dopaminérgico e gabaérgico. A hipótese é que o peptídeo YL aumenta a produção de serotonina, ativando os receptores 5HT1A, o que por sua vez estimula o sistema dopaminérgico a aumentar a produção de dopamina e ativar os receptores D1. Em seguida, o sistema gabaérgico, estando acoplado aos outros dois sistemas, responderia ao aumento da atividade deles, elevando a síntese de ácido Gama-aminobutírico, que ativaria os sítios gabaérgicos nos receptores GABA A.

O estudo também incluiu uma análise de acoplamento molecular dos peptídeos YL e YLG com o receptor GABA A, realizada nas coordenadas $x=3.355$, $y=-1.120$ e $z=139.497$ (em uma caixa de grade de tamanho 13) usando o programa GOLD (Genetic Optimisation for Ligand Docking). Os resultados dessas análises podem ser encontrados na Figura 3 para o YL e na Figura 4 para o YLG.

Figura 12. Acoplamento molecular do peptídeo YL com o receptor GABA A nas coordenadas $x=3.355$, $y=-1.120$ e $z=139.497$ (caixa de grade tamanho 13) utilizando o programa GOLD.

- YL:

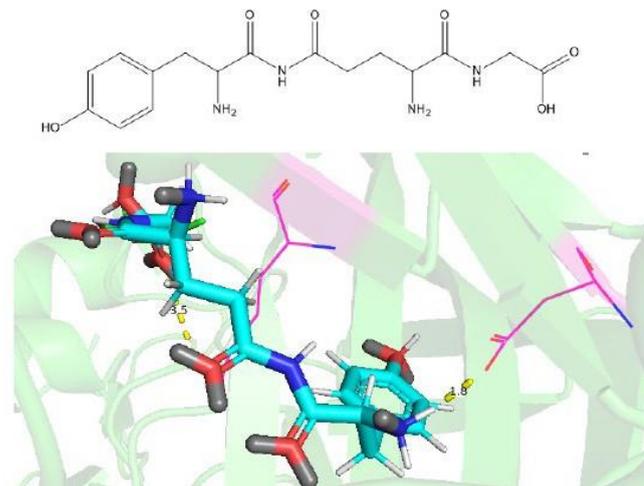


Possíveis interações foram encontradas: (I) duas ligações de hidrogênio (2 A/2,1 A) entre o oxigênio do aminoácido THR 133 da cadeia B e o grupo NH do peptídeo; (II) ligação de hidrogênio (2,8 A) entre o oxigênio do aminoácido THR 58 da cadeia B e o grupo OH do peptídeo e (III) ligação de hidrogênio (3 A) entre o oxigênio do aminoácido LYS 102 da cadeia C e o grupo OH do peptídeo.

Fonte: Prof. Dr. Gustavo Henrique Goulart Trossini

Figura 13. Acoplamento molecular do peptídeo YLG com o receptor GABA A nas coordenadas $x=3.355$, $y=-1.120$ e $z=139.497$ (caixa de grade tamanho 13) utilizando o programa GOLD.

- YLG:



Possíveis interações foram encontradas: (I) ligação de hidrogênio (1,8 A) entre o oxigênio do aminoácido ASP 56 da cadeia C e o grupo NH do peptídeo; (II) ligação de hidrogênio (3,5 A) entre o nitrogênio do aminoácido LYS 103 da cadeia C e o grupo OH do peptídeo.

Fonte: Prof. Dr. Gustavo Henrique Goulart Trossini

Ovolina é um pentapeptídeo derivado da digestão trípica da ovoalbumina, abrangendo a sequência aminoacídica 280-284. Oda et al. (2012) estudaram seu

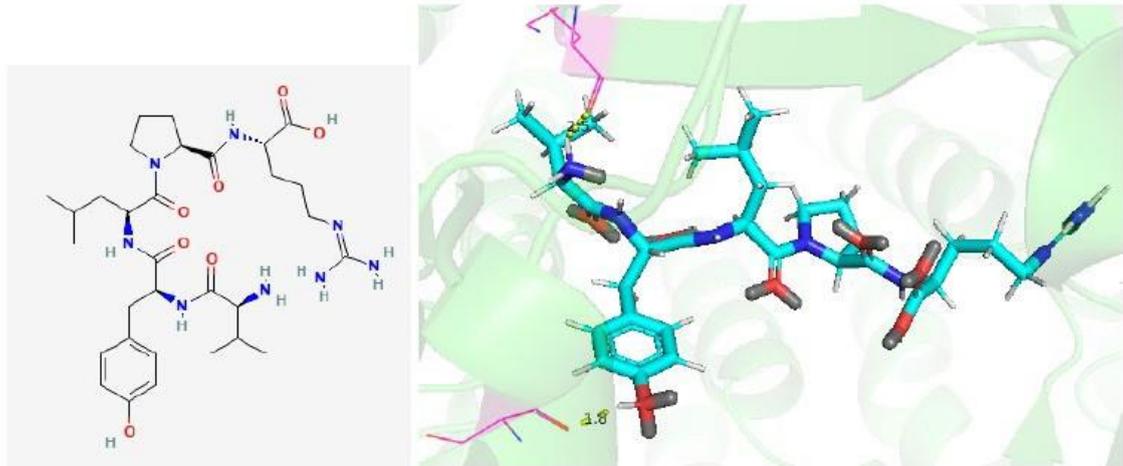
efeito ansiolítico e descobriram que este era inibido pela indometacina, um inibidor de cicloxigenase (COX), que está associada à produção de prostaglandinas. Além disso, o efeito ansiolítico da Ovolina também foi suprimido pelo BWA868C, um antagonista do receptor DP1 para prostaglandina PGD2, e por antagonistas de receptores de adenosina A2A e GABA A. No entanto, a Ovolina não mostrou afinidade direta por esses receptores, sugerindo que sua atividade ansiolítica é mediada indiretamente pelos sistemas de prostaglandinas PGD2, adenosina e GABA.

A hipótese proposta pelos autores é de um funcionamento acoplado desses sistemas: a Ovolina estimularia a COX, elevando a produção de PGD2, que por sua vez ativaria os receptores de prostaglandinas DP1. O sistema de adenosina, acoplado ao de prostaglandinas, reagiria ao aumento da atividade deste último, aumentando a produção de adenosina e ativando os receptores A2A. Por fim, o sistema gabaérgico, acoplado aos sistemas de adenosina e prostaglandinas, responderia ao aumento da atividade destes com um incremento na produção de GABA, ativando assim os receptores GABA A e promovendo a atividade ansiolítica.

Além disso, foi realizada uma análise de acoplamento molecular do peptídeo Ovolina com o receptor GABA A, utilizando as coordenadas $x=3.355$, $y=-1.120$ e $z=139.497$ (em uma caixa de grade de tamanho 13), através do programa GOLD (Genetic Optimisation for Ligand Docking). Os resultados dessa análise podem ser encontrados na Figura 5.

Figura 14. Acoplamento molecular do peptídeo Ovalina com o receptor GABA A nas coordenadas $x=3.355$, $y=-1.120$ e $z=139.497$ (caixa de grade tamanho 13) utilizando o programa GOLD.

- Ovolin Peptide



Possíveis interações foram encontradas: (I) ligação de hidrogênio (1,8 Å) entre o oxigênio do aminoácido SER 104 da cadeia A e o grupo OH do peptídeo; (II) ligação de hidrogênio (2,5 Å) entre o oxigênio do aminoácido LYS 102 da cadeia B e o grupo NH do peptídeo.

Fonte: Prof. Dr. Gustavo Henrique Goulart Trossini

Dois outros peptídeos estudados por sua capacidade de modular os sintomas de ansiedade são o Wheylin 1 e o Wheylin 2. Esses peptídeos são derivados da proteína láctea beta-lactoglobulina, correspondendo às sequências aminoacídicas 145-146 e 7-9, respectivamente. Eles foram obtidos por hidrólise com termolisina e subtilina, conforme descrito por Yamada et al. (2014).

No estudo de Yamada et al. (2014), os peptídeos bioativos foram administrados a roedores por injeções intraperitoneais, seguidas por testes comportamentais no Labirinto em Cruz Elevado. Os resultados indicaram que o Wheylin 1 exibe uma atividade ansiolítica significativamente mais potente que o Wheylin 2. Enquanto o Wheylin 1 alcançou o efeito ansiolítico com a administração de apenas 0,3 a 1 mg de PB por Kg de peso corporal dos roedores, o Wheylin 2 requereu 3 mg de PB por Kg para produzir um efeito similar.

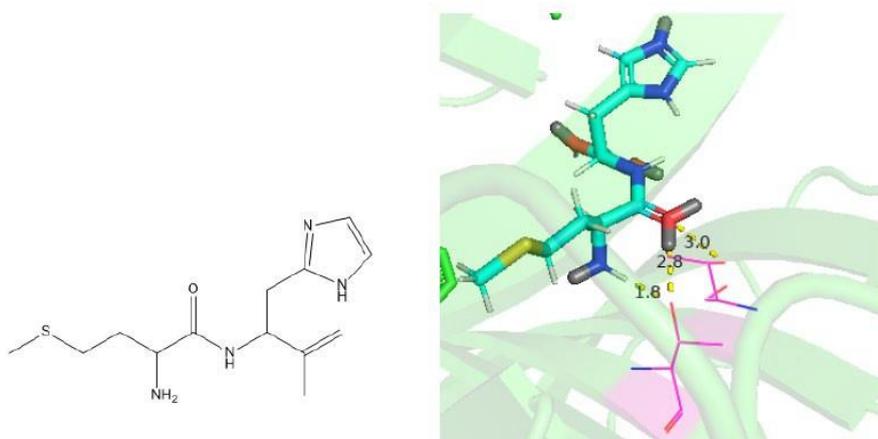
Dada a atividade ansiolítica mais promissora do Wheylin 1 no tratamento de Transtornos de Ansiedade, os autores investigaram sua relação com o sistema gabaérgico. A administração de bicuculina, um antagonista do receptor GABA A, inibiu a atividade ansiolítica do Wheylin 1, evidenciando a influência do sistema gabaérgico em seu mecanismo de ação. No entanto, não foi observada afinidade direta do PB pelos sítios de ligação gabaérgicos e benzodiazepínicos

nos receptores GABA A em ensaios específicos, sugerindo que o Wheylin 1 atua por meio de uma modulação indireta do sistema gabaérgico. Baseando-se nesses achados, os pesquisadores postularam que o Wheylin 1 promove o aumento da síntese do neurotransmissor GABA, que por sua vez ativa os receptores GABA A.

Além disso, foi realizada uma análise de acoplamento molecular dos peptídeos Wheylin 1 e Wheylin 2 com o receptor GABA A, usando as coordenadas $x=3.355$, $y=-1.120$ e $z=139.497$ (em uma caixa de grade de tamanho 13), por meio do programa GOLD (Genetic Optimisation for Ligand Docking). Os resultados desta análise podem ser encontrados na Figura 6 para o Wheylin 1 e na Figura 7 para o Wheylin 2.

Figura 15. Acoplamento molecular do peptídeo Wheylin 1 com o receptor GABA A nas coordenadas $x=3.355$, $y=-1.120$ e $z=139.497$ (caixa de grade tamanho 13) utilizando o programa GOLD.

- Wheylin 1 (MH)

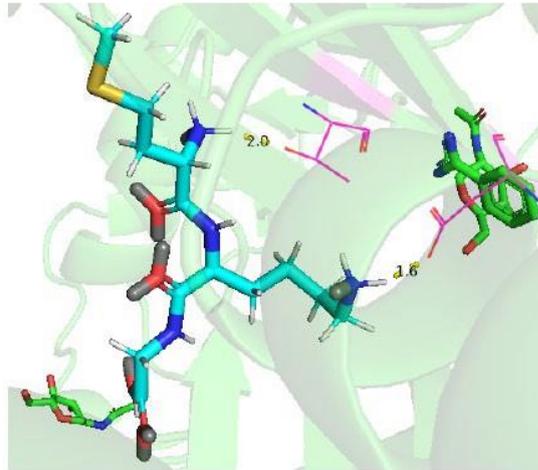
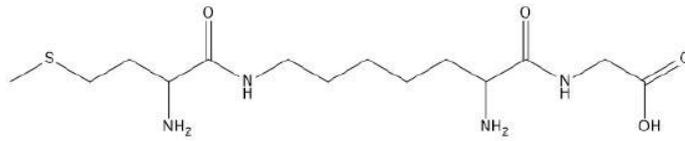


Possíveis interações foram encontradas: (I) ligação de hidrogênio (3 Å) entre o oxigênio do aminoácido THR 58 da cadeia B e o grupo OH do peptídeo; (II) ligação de hidrogênio (1,8 Å) entre o oxigênio do aminoácido THR 133 da cadeia B e o grupo NH do peptídeo e (III) ligação de hidrogênio (2,8 Å) entre o oxigênio do aminoácido THR 133 da cadeia B e o grupo OH do peptídeo.

Fonte: Prof. Dr. Gustavo Henrique Goulart Trossini

Figura 16. Acoplamento molecular do peptídeo Wheylin 2 com o receptor GABA A nas coordenadas $x=3.355$, $y=-1.120$ e $z=139.497$ (caixa de grade tamanho 13) utilizando o programa GOLD.

- Weylin 2 (MKG):



Possíveis interações foram encontradas: (I) ligação de hidrogênio (1,6 Å) entre o oxigênio do aminoácido ASP 56 da cadeia C e o grupo NH do peptídeo; (II) ligação de hidrogênio (2 Å) entre o oxigênio do aminoácido THR 133 da cadeia C e o grupo NH do peptídeo.

Fonte: Prof. Dr. Gustavo Henrique Goulart Trossini

Zhao et al. (2016) investigaram o efeito biológico de um peptídeo bioativo derivado do rubisco de espinafre, conhecido como Rubimetida. Utilizando o teste de Labirinto em Cruz Elevado, os autores observaram que o tratamento com Rubimetida resultou em um aumento de 40% no tempo de permanência dos roedores nos braços abertos do labirinto, uma área que representa maior risco de predação para os animais. Este resultado indicou um efeito ansiolítico significativo do peptídeo.

Para explorar mais a fundo o mecanismo de ação da Rubimetida, os pesquisadores administraram antagonistas dos receptores GABA A, assim como antagonistas dos receptores de prostaglandinas PG2 (receptores DP1) e de receptores de adenosina (receptores A2A). A reavaliação do teste comportamental após a administração desses antagonistas mostrou uma diminuição da atividade ansiolítica, o que era observado anteriormente sem a presença dos antagonistas. Com base nesses resultados, os autores sugeriram que o efeito ansiolítico da Rubimetida ocorre através de uma ativação indireta dos receptores DP1, A2A e GABA A. Eles também postularam que os sistemas

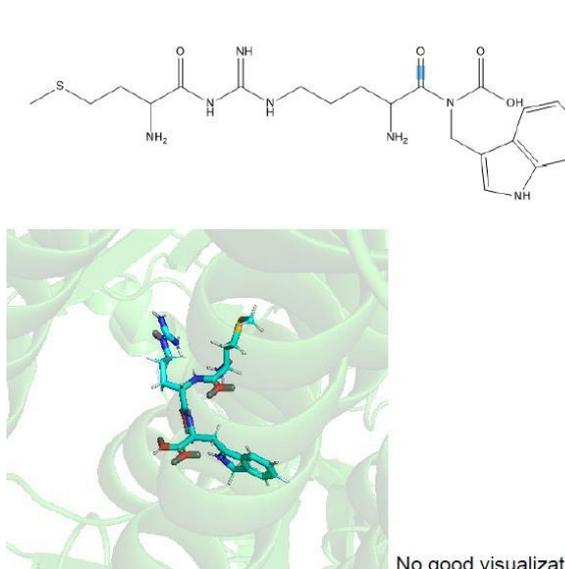
de prostaglandinas, adenosina e GABA operam de maneira acoplada no mecanismo de ação do peptídeo.

Além dos estudos comportamentais, a pesquisa de Zhao et al. (2016) incluiu também uma análise de acoplamento molecular do peptídeo Rubimetida com o receptor GABA A. Esta análise foi realizada utilizando o programa GOLD (Genetic Optimisation for Ligand Docking), com o peptídeo sendo posicionado nas coordenadas $x=3.355$, $y=-1.120$ e $z=139.497$, dentro de uma caixa de grade de tamanho 13. Os resultados deste acoplamento molecular estão detalhadamente apresentados na Figura 8.

Esta análise molecular fornece insights adicionais sobre a interação entre o peptídeo Rubimetida e o receptor GABA A, complementando os estudos comportamentais que indicaram um efeito ansiolítico mediado indiretamente por este receptor.

Figura 17. Acoplamento molecular do peptídeo Rubimetida com o receptor GABA A nas coordenadas $x=3.355$, $y=-1.120$ e $z=139.497$ (caixa de grade tamanho 13) utilizando o programa GOLD.

- Rubimetide (MRW)



Para a predição de interação entre a região estudada do receptor GABA A e o peptídeo Rubimetida não foram encontradas possíveis interações. Fonte: Prof. Dr. Gustavo Henrique Goulart Trossini

Análise comparativa do docking

Segundo a literatura científica, é sabido que a afinidade de ligação indicada pelo docking molecular considera através de um score de pontuação dado as configurações que se estabelecem entre componentes ligados e não ligados da molécula distintos termos de força, que podem ser: força eletrostática, hidrofobicidade, força de Van der waals, ligações de hidrogênio, etc. Os termos utilizados dependerão do software utilizado. De acordo com os termos considerados pelo Gold dispõe-se o score de pontuação a seguir:

Score	Peptide
59.07	Alpha Casozepine (YLGYLEQLLR)
55.57	Rubimetide (MRW)
58.26	Ovolin (VYLRP)
52.47	Selank (TKPRPGP)
48.12	weylin 1 (MH)
44.25	weylin 2 (MKG)
51.46	YL
52.89	YLG

É interessante notar que o peptídeo Rubimetida não apresentou nenhuma ligação de hidrogênio, todavia recebeu uma alta pontuação, o que indica significativa afinidade pelos receptores GABA, isto porque outras variáveis foram consideradas pela análise Gold. Isto vai ao encontro dos dados referentes ao efeito ansiolítico que a rubimetida apresentou em ensaios in vivo, em que foi indicado que ela modula o sistema gabaérgico de modo indireto, elevando no sistema a quantidade de neurotransmissor ácido gama amino-butírico que ativaria seus respectivos receptores GABA A. A ausência de ligações de hidrogênio pode ser um indicativo de baixa afinidade direta, todavia a alta pontuação obtida pela consideração de diferentes variáveis, endossa alguma afinidade pelos receptores GABA A, que pode vir a ser indireta.

Outro dado que merece ser destacado é o fato do peptídeo Wheilin 1 ter apresentado uma pontuação maior do que o Wheilin 2, pois nos ensaios in vivo, o Wheilin 1 também apresentou maior potencial ansiolítico.

Já a Alpha-casozepina que apresentou baixa afinidade direta pelos receptores GABA A em ensaios in vitro, porém apresentou-se 2,5 vezes mais ansiolítica do que os fármacos convencionais Diazepam e Olanzapina, recebeu

a maior pontuação do score, o que indica alta afinidade pelos receptores GABA A.

6- Discussão

Não podemos deixar de enfatizar a necessidade de problematizarmos, à luz de produções científicas recentes, conclusões pautadas em testes comportamentais com animais, pois segundo alguns estudos, estes ensaios apresentam significativas limitações (Miclo, et al., 2001).

Embora a ansiedade em ratos seja definida como alto nível de esquia a ambientes novos e pouco familiares, bem como reação de medo aumentada, a utilização de animais como ratos e camundongos para pesquisas relacionadas às causas e tratamentos de transtornos neuropsiquiátricos é tarefa desafiadora, pois sintomas atrelados a estas condições com frequência refletem motivações, emoções e processamentos cognitivos alheios ao repertório neurofisiológico destas espécies (Toth, 2003; Lezak et al., 2022).

Segundo, Rodgers e Dalvi (1997), Testes de respostas condicionadas ao estresse, como o ``Teste de labirinto em cruz elevado``, ``o Teste de campo aberto`` e o ``teste de enterramento defensivo`` são paradigmas reducionistas sobre os Transtornos de Ansiedade, pois esta categoria de transtornos neuropsiquiátricos é constituída por distintas e variadas respostas. Tais limitações acabam sendo consequência de estratégias de desenvolvimento de testes que, ao enfatizarem a validação farmacológica, produziram modelos preditivos de um tipo específico de atividade ansiolítica.

Conforme já exposto, evolutivamente a ansiedade caracteriza-se por um repertório de reações de defesa adaptadas para enfrentar diferentes formas de ameaças, todavia adaptações consideradas inadequadas ou exageradas gera padrões de respostas disfuncionais. Os ``modelos animais de ansiedade`` consideram determinadas respostas disfuncionais, logo, reflexos dos Transtornos de Ansiedade, quando podemos questionar se estas respostas consideradas inadequadas, são meramente adaptativas para a espécie específica, até porque, padrões comportamentais parecem variar entre e intra-espécie.

É sabido também que alguns parâmetros que influenciam o teste de enterramento de mármore, podem influenciar o teste de enterramento condicionado defensivo devido à semelhança entre estes testes, tais como: Iluminação. Luz de alta intensidade desencadeia estresse. Assim, a caixa clara e escura devem ser iluminadas com 60–150 lux. O manuseio e o modo de administração do medicamento podem variar o resultado. A temperatura deve ser de 23 a 25 °C, ou seja, à temperatura ambiente, pois a variação da temperatura também pode alterar o resultado. Os aparelhos devem ser limpos com etanol 10-70% e completamente secos. Alguns destes parâmetros não foram especificados pelos estudos que aplicaram testes comportamentais (Sarkar, et al., 2020).

Mediante à problematização acima exposta, destaca-se como atributo dos artigos sobre peptídeos bioativos ansiolíticos gabaérgicos que incluímos nesta revisão a cautela relacionada à utilização de termos mais apropriados para indicar ansiólise quando houve. Porém, destaca-se também como limitação o fato de apenas 1 dos estudos encontrado ter conduzido tanto ensaio *in vitro*, quanto *in vivo*.

Apesar das limitações apresentadas pelos modelos comportamentais animais, eles complementam com novas respostas as investigações *in vitro*, pois são capazes de conferir à pergunta de pesquisa um cenário mais complexo, mais próximo dos contextos patológicos reais. Não podemos esquecer que um evento biológico para ser melhor compreendido necessita ser contextualizado o mais próximo possível do modo como de fato ele ocorre. Ademais, determinados marcadores biológicos quando considerados isoladamente não são capazes de prever determinado efeito biológico, porém dentro de um contexto fisiológico geram o efeito esperado. Isto foi verificado com o peptídeo bioativo gabaérgico chamado Alpha-Casozepina. Nos ensaios *in vitro* ela não apresentou alta afinidade pelos receptores GABA A, porém nos ensaios comportamentais conduzidos, ele apresentou-se 2,5 vezes mais eficiente do que o benzodiazepínico convencional (Benoit, et al., 2016).

Devido ao fato de distintos ensaios terem cerceado os estudos encontrados, não é possível delinear um comparativo do potencial ansiolítico entre os 8 peptídeos localizados.

Referências.

Adwas, A. A., Jbireal, J. M., & Azab, A. E. Anxiety: Insights into signs, symptoms, etiology, pathophysiology, and treatment. *East African Scholars Journal of Medical Sciences*, 2(10), 580-591. *Alcohol Depend.* 2019, 200, 95–114. [CrossRef] [PubMed]; alternatives-reply. **JAMA Psychiatry** 2015, 72, 624. [CrossRef]

Ahmed I, Asgher M, Sher F, Hussain SM, Nazish N, Joshi N, Sharma A, Parra-Saldívar R, Bilal M, Iqbal HMN. Exploring Marine as a Rich Source of Bioactive Peptides: Challenges and Opportunities from Marine Pharmacology. **Mar Drugs**. 2022 Mar 13;20(3):208. doi: 10.3390/md20030208. PMID: 35323507; PMCID: PMC8948685.

American Psychiatric Association. **DSM-5: Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais**. 2014. Artmed Editora.

AMIN, Jahanshah; WEISS, David S. GABAA receptor needs two homologous domains of the β -subunit for activation by GABA but not by pentobarbital. **Nature**, v. 366, n. 6455, p. 565-569, 1993.

ANDERSSON, Inger; BACKLUND, Anders. Structure and function of Rubisco. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 46, n. 3, p. 275-291, 2008.

Argyropoulos, S. V., Sandford, J. J., & Nutt, D. J. The psychobiology of anxiolytic drugs: Part 2: pharmacological treatments of anxiety. **Pharmacology & therapeutics**, 88(3), 213-227, 2000.

Ashmarin IP, Samonina GE, Lyapina LA, Kamenskii AA, Levitskaya NG, Grivennikov IA, Dolotov OV, Andreeva LA, Myasoedov NF. Natural and hybrid ("chimeric") stable regulatory glyproline peptides. **Pathophysiology**. 2005; 11(4):179-185.

Ashmarin IP. Glyprolines in Regulatory Tripeptides. **Neurochemical Journal**. 2007; 1(3):173-175.

Bandelow, B. Current and novel psychopharmacological drugs for anxiety disorders. **Anxiety Disorders**, 347-365, 2020.

Bandelow, B.; Michaelis, S.; Wedekind, D. Treatment of anxiety disorders. **Dialogues Clin. Neurosci.** 19, 93–107, 2017.

BANDELOW, Borwin; MICHAELIS, Sophie. Epidemiology of anxiety disorders in the 21st century. **Dialogues in clinical neuroscience**, 2022.

Benoit, S., Chaumontet, C., Cakir-Kiefer, C., Tomé, D., & Miclo, L. Modulation of Cerebral Activity Induced by α -casozepine, a Benzodiazepine-like Peptide Derived from Bovine Casein. **The FASEB Journal**, 30, 125-4, 2016.

Bernet, F., Montel, V., Noël, B., & Dupouy, J. P. (2000). Diazepam-like effects of a fish protein hydrolysate (Gabolysat PC60) on stress responsiveness of the rat pituitary-adrenal system and sympathoadrenal activity. **Psychopharmacology**, 149(1), 34-40.

Bowery NG, Smart TG. GABA and glycine as neurotransmitters: a brief history. *Br J Pharmacol*. 2006 Jan;147 Suppl 1(Suppl 1):S109-19. doi: 10.1038/sj.bjp.0706443. PMID: 16402094; PMCID: PMC1760744.

Brandão, M. L., & Coimbra, N. C. Understanding the role of dopamine in conditioned and unconditioned fear. **Reviews in the Neurosciences**, 30(3), 325-337, 2019.

BROWNING, Michael D. et al. Protein kinase C and cAMP-dependent protein kinase phosphorylate the beta subunit of the purified gamma-aminobutyric acid A receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 87, n. 4, p. 1315-1318, 1990.

Brussaard AB, Herbison AE. Long-term plasticity of postsynaptic GABAA-receptor function in the adult brain: insights from the oxytocin neurone. **Trends Neurosci** 23:190–195, 2000.

Cabral, H. Peptides: Molecular and Biotechnological Aspects. **Biomolecules**, 11(1), 52, 2021.

Carhart-Harris RL, Nutt DJ. Serotonin and brain function: a tale of two receptors. **J Psychopharmacol**. 2017 Sep;31(9):1091-1120. doi: 10.1177/0269881117725915. Epub 2017 Aug 31. PMID: 28858536; PMCID: PMC5606297.

CASH, Derek J.; SUBBARAO, Katragadda. Channel opening of gamma-aminobutyric acid receptor from rat brain: molecular mechanisms of the receptor responses. **Biochemistry**, v. 26, n. 24, p. 7562-7570, 1987.

CHARNEY, Dennis S. et al. Serotonin function in anxiety: II. Effects of the serotonin agonist MCPP in panic disorder patients and healthy subjects. **Psychopharmacology**, v. 92, p. 14-24, 1987.

CHEBIB, Mary; JOHNSTON, Graham AR. GABA-activated ligand gated ion channels: medicinal chemistry and molecular biology. **Journal of medicinal chemistry**, v. 43, n. 8, p. 1427-1447, 2000.

DAVIS, Michael; WALKER, David L.; LEE, Younglim. Roles of the amygdala and bed nucleus of the stria terminalis in fear and anxiety measured with the acoustic startle reflex: possible relevance to PTSD a. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 821, n. 1, p. 305-331, 1997.

Deakin JB, Aitken MR, Dowson JH, Robbins TW, Sahakian BJ. Diazepam produces disinhibitory cognitive effects in male volunteers. **Psychopharmacology** (Berl). 2004 Apr;173(1-2):88-97. doi: 10.1007/s00213-003-1695-4. Epub 2003 Dec 19. PMID: 14689162.

DEN BOER, Johan A. et al. Behavioral biochemical and neuroendocrine concomitants of lactate-induced panic anxiety. **Biological psychiatry**, v. 26, n. 6, p. 612-622, 1989.

Dorman, T.B.L.; Glaze, P.; Hogan, J.; Skinner, R.; Nelson, D.; Bowker, L.; Head, D. The effectiveness of Garum armoricum (Stabilium) in reducing anxiety in college students. **J. Adv. Med.** 1995, 8, 193–200. [CrossRef]

EHLERS, Anke; CLARK, David M. A cognitive model of posttraumatic stress disorder. **Behaviour research and therapy**, v. 38, n. 4, p. 319-345, 2000.

Endres J, Graber MA, Dachs R. Benzodiazepines and Alzheimer disease. **Am Fam Physician.** 2015 Feb 1;91(3):191-2. PMID: 25822273.

Engel AK, Fries P, Singer W. Dynamic predictions: oscillations and synchrony in top-down processing. **Nat Rev Neurosci** 2:704– 716, 2001.

Fluyau, D., Revadigar, N., & Manobianco, B. E. Challenges of the pharmacological management of benzodiazepine withdrawal, dependence, and discontinuation. **Therapeutic advances in psychopharmacology**, 8(5), 147-168, 2018.

Freud, S. **The problem of anxiety**. W. W. Norton & Co., New York, 1936.

Freund TF, Buzsaki G. Interneurons of the hippocampus. **Hippocampus** 6:345–470, 1996.

GRAY, J. A. Behavioural and neural-system analyses of the actions of anxiolytic drugs. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 29, n. 4, p. 767-769, 1988.

Grillon, C. Models and mechanisms of anxiety: evidence from startle studies. **Psychopharmacology** 199, 421–437, 2008.

GYENES, Miklos et al. Phosphorylation factors control neurotransmitter and neuromodulator actions at the gamma-aminobutyric acid type A receptor. **Molecular Pharmacology**, v. 46, n. 3, p. 542-549, 1994.

HAFEEZ, Zeeshan et al. Food protein-derived anxiolytic peptides: Their potential role in anxiety management. **Food & Function**, v. 12, n. 4, p. 1415-1431, 2021.

HANSEN, Justine Y. et al. Correspondence between gene expression and neurotransmitter receptor and transporter density in the human brain. *Neuroimage*, v. 264, p. 119671, 2022. <http://vizhub.healthdata.org/gbd-compare>. implementation. **Rev Bras Psiquiatr.** 2009;31(4):375-86. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-44462009000400016>.

Harris KD, Henze DA, Hirase H, Leinekugel X, Dragoi G, Czurko A, Buzsaki G. Spike train dynamics predicts theta-related phase precession in hippocampal pyramidal cells. **Nature** 417:738–741, 2002.

HEDBLOM, Eva; KIRKNESS, Ewen F. A novel class of GABAA receptor subunit in tissues of the reproductive system. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 24, p. 15346-15350, 1997.

Hou, I. C., Suzuki, C., Kanegawa, N., Oda, A., Yamada, A., Yoshikawa, M., ... & Ohinata, K. (2011). β -Lactotensin derived from bovine β -lactoglobulin exhibits anxiolytic-like activity as an agonist for neurotensin NTS2 receptor via activation of dopamine D1 receptor in mice. **Journal of neurochemistry**, 119(4), 785-790.

<https://www.genome.jp/pathway/map04727>. Acesso em <04/07/23>

Hutcheon B, Morley P, Poulter MO. Developmental change in GABAA receptor desensitization kinetics and its role in synapse function in rat cortical neurons. **J Pysiol (Lond)** 522:3–17, 2000.

IMPERATORE, Roberta et al. Genetic deletion of monoacylglycerol lipase leads to impaired cannabinoid receptor CB 1R signaling and anxiety-like behavior. **Journal of neurochemistry**, v. 135, n. 4, p. 799-813, 2015.

Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME). GBD Compare Data Visualization. Seattle, WA: IHME, **University of Washington**; 2016 [cited 2017 Oct 11].

James, W. (1890). *The Principles of Psychology*. **New York**: Holt, Rinehart and Winston.

Jones 1 et al. Molecular recognition of receptor sites using a genetic algorithm with a description of desolvation. **Journal of Molecular Biology**, 2005.

Jüttner R, Meier J, Grantyn R. Slow IPSC kinetics, low levels of $\alpha 1$ subunit expression and paired-pulse depression are distinct properties of neonatal inhibitory GABAergic synaptic connections in the mouse superior colliculus. *Eur J Neurosci* 13:2088–2098, 2001.

Kanegawa N, Suzuki C, Ohinata K. Dipeptide Tyr-Leu (YL) exhibits anxiolytic-like activity after oral administration via activating serotonin 5-HT_{1A}, dopamine D₁ and GABA_A receptors in mice. **FEBS Lett.** 2010 Feb 5;584(3):599-604. doi: 0.1016/j.febslet.2009.12.008. Epub 2009 Dec 23. PMID: 20005875.

KEDO, Olga et al. Receptor-driven, multimodal mapping of the human amygdala. **Brain Structure and Function**, v. 223, n. 4, p. 1637-1666, 2018.

KIRKNESS, E. F. et al. Phosphorylation of γ -aminobutyrate (GABA)/benzodiazepine receptors by cyclic AMP-dependent protein kinase. **Biochemical Journal**, v. 259, n. 2, p. 613-616, 1989.

Klausberger T, Magill PJ, Marton LF, Roberts JDB, Cobden PM, Buzsaki G, Somogyi P. Brain state- and cell type-specific firing of hippocampal interneurons in vivo. **Nature** 421:844–848, 2003.

KOLOMIN, T.; MIKHALSKAIA, P.; SEDELNIKOVA, A. Changes in expression of chemokines, cytokines and their receptors under the action of selank and its fragments. **Journal of Clinical Physiology and Pathology (JCPP)**, v. 2, n. 2, p. 16-18, 2023.

KOROLEVA, S. V.; MJASOEDOV, N. F. Physiological effects of Selank and its fragments. **Biology Bulletin**, v. 46, n. 4, p. 407-414, 2019.

Kozlovskii II, Danchev ND. Optimizing action of synthetic peptide Selank on active avoidance conditioning test in rats. **Zh Vyssh Nerv Deiat** Im I P Pavlova. 2002; 52(5):579-84 (in Russian).

KUGLER, Peter. Enzymes involved in glutamatergic and GABAergic neurotransmission. **International review of cytology**, v. 147, p. 285-336, 1993.

Landsberg, G.M.; Mougeot, I.; Kelly, S.; Milgram, N.W. Assessment of noise-induced fear and anxiety in dogs: Modification by a novel fish hydrolysate supplemented diet. **J. Vet. Behav.** 2015, 10, 391–398. [CrossRef]

Lane, S. D., Tcheremissine, O. V., Lieving, L. M., Nouvion, S., & Cherek, D. R. Acute effects of alprazolam on risky decision making in humans. **Psychopharmacology**, 181(2), 364–373, 2005. <https://doi.org/10.1007/s00213-005-2265-8>

Lange, C. (1885). *The Emotions* (1967 Translation of 1885 Monograph). **New York**: Hafner.

LeDoux, J. (1998). Fear and the brain: where have we been and where are we going. *Biol Psychiatry* 44, 1229±1238.

LeDoux, J. E. (1992). Emotion and the amygdala. In J. P. Aggleton (Ed.), *The Amygdala: Neurobiological Aspects of Emotion, Memory and Mental Dysfunction* (pp. 339± 351). New York: Wiley-Liss.

LeDoux, J. E. (1996). *The Emotional Brain*. **New York**: Simon and Schuster.

LEE, Carmen M. et al. Anxiety, PTSD, and stressors in medical students during the initial peak of the COVID-19 pandemic. **PLoS One**, v. 16, n. 7, p. e0255013, 2021.

Lemes, A.C.; Sala, L.; Ores, J.C.; Braga, A.R.C.; Egea, M.B.; Fernandes, K.F. A review of the latest advances in encrypted bioactive peptides from protein-rich waste. **Int. J. Mol. Sci.** 2016, 17, 950. [CrossRef] [PubMed]

Levitan, E. S., Schofield, P. R., Burt, D. R., Rhee, L. M., Wisden, W., Köhler, M., ... & Seeburg, P. H. Structural and functional basis for GABAA receptor heterogeneity. **Nature**, 335(6185), 76-79, 1988.

LEZAK, Kimberly R.; MISSIG, Galen; CARLEZON JR, William A. Behavioral methods to study anxiety in rodents. **Dialogues in clinical neuroscience**, 2022.

LORENZ-GUERTIN, Joshua M.; JACOB, Tija C. GABA type a receptor trafficking and the architecture of synaptic inhibition. **Developmental neurobiology**, v. 78, n. 3, p. 238-270, 2018.

LYDIARD, R. Bruce. The role of GABA in anxiety disorders. **Journal of Clinical Psychiatry**, v. 64, p. 21-27, 2003.

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

MALHERBE, P. et al. Functional characteristics and sites of gene expression of the alpha 1, beta 1, gamma 2-isoform of the rat GABAA receptor. **Journal of Neuroscience**, v. 10, n. 7, p. 2330-2337, 1990.

MARGRAF, Jürgen; EHLERS, Anke; ROTH, Walton T. Panic attacks: Theoretical models and empirical evidence. In: Panic and phobias: Empirical evidence of theoretical models and longterm effects of behavioral treatments. **Berlin, Heidelberg**: Springer Berlin Heidelberg, 1986. p. 31-43.

Messaoudi, M.; Lalonde, R.; Schroeder, H.; Desor, D. Anxiolytic-like effects and safety profile of a tryptic hydrolysate from bovine alpha s1-casein in rats. **Fundam. Clin. Pharmacol.** 2009, 23, 323–330. [CrossRef]

Metha MR, Lee AK, Wilson MA. Role of experience and oscillations in transforming a rate code into a temporal code. **Nature** 417:741–746, 2000.

MICLO, Laurent et al. Characterization of α -casozepine, a tryptic peptide from bovine α s1-casein with benzodiazepine-like activity. **The FASEB Journal**, v. 15, n. 10, p. 1780-1782, 2001.

MINAKUCHI, Ryoji et al. Widespread Occurrence of Calcium-Activated, Phospholipid Dependent Protein Kinase in Mammalian Tissues. **The Journal of Biochemistry**, v. 89, n. 5, p. 1651-1654, 1981.

MINIER, Frédéric et al. Endogenous phosphorylation of the GABAA receptor protein is counteracted by a membrane-associated phosphatase. **Neurochemistry international**, v. 36, n. 6, p. 499-506, 2000.

Mizushige, T. (2021). Neuromodulatory peptides: Orally active anxiolytic-like and antidepressant-like peptides derived from dietary plant proteins. **Peptides**, 142, 170569.

MIZUSHIGE, Takafumi et al. Characterization of Tyr-Leu-Gly, a novel anxiolytic-like peptide released from bovine α S-casein. **The FASEB Journal**, v. 27, n. 7, p. 2911-2917, 2013.

MÖHLER, H. GABA A receptor diversity and pharmacology. **Cell and tissue research**, v. 326, p. 505-516, 2006.

Nutt, D. J. Altered alpha-2-adrenoceptor sensitivity in panic disorder. **Arch Gen Psychiatry** 46, 165± 169, 1989.

NUTT, D. J.; COWEN, P. J. Monoamine function in anxiety and depression: Information from neuroendocrine challenge tests. **Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental**, v. 2, n. 4, p. 211-220, 1987.

Nutt, D., & Lawson, C. Panic attacks: a neurochemical overview of models and mechanisms. **British Journal of Psychiatry** 160, 165±178, 1992.

O'Keefe J, Nadel L. The hippocampus as a cognitive map. Clarendon, **Oxford**, pp 477–543, 1978.

O'Keefe J, Recce ML Phase relationship between hippocampal place units and the EEG theta rhythm. **Hippocampus** 3:317–330, 1993.

Oda A, Kaneko K, Mizushige T, Lazarus M, Urade Y, Ohinata K. Characterization of ovolin, an orally active tryptic peptide released from ovalbumin with anxiolytic-like activity. **J Neurochem**. 2012 Jul;122(2):356-62. doi: 10.1111/j.1471-4159.2012.07777.x. Epub 2012 May 30. PMID: 22564055.

Olfson M, King M, Schoenbaum M. The popularity of benzodiazepines, their advantages, and inadequate pharmacological alternatives-reply. **JAMA Psychiatry**. 2015 Jun;72(6):624. doi: 10.1001/jamapsychiatry.2015.24. PMID: 25830609.

Paulsen O, Moser EI (1998). A model of hippocampal memory encoding and retrieval: GABAergic control of synaptic plasticity. **Trends Neurosci** 21:273–278.

Pawelzik H, Hughes DI, Thomson AM. Physiological and morphological diversity of immunocytochemically defined parvalbumin- and cholecystinin-positive interneurons in CA1 of the adult rat hippocampus. **J Comp Neurol** 443: 346–367, 2002.

RABOW, Lois E.; RUSSEK, Shelley J.; FARB, David H. From ion currents to genomic analysis: recent advances in GABAA receptor research. **Synapse**, v. 21, n. 3, p. 189-274, 1995.

REDMOND JR, D. E. The possible role of locus coeruleus noradrenergic activity in anxiety-panic. **Clinical neuropharmacology**, v. 9, p. 40-42, 1986.

Robbins, T. W. (1983). The neuropsychology of emotion. In M. Shepherd, & O. M. Zangwill (Eds.), **Handbook of Psychiatry**, Vol. 1 (pp. 123±145). Cambridge: Cambridge Univ. Press.

ROBERTS, Eugene; KURIYAMA, Kinya. Biochemical-physiology correlations in studies of the γ -aminobutyric acid system. **Brain Research**, v. 8, n. 1, p. 1-35, 1968.

Rodgers RJ, Dalvi A. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. **Neurosci Biobehav Rev.** 1997 Nov;21(6):801-10. doi: 10.1016/s0149-7634(96)00058-9. PMID: 9415905.

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

SARKAR, Deepa et al. A review of behavioral tests to evaluate different types of anxiety and anti-anxiety effects. **Clinical Psychopharmacology and Neuroscience**, v. 18, n. 3, p. 341, 2020.

SAUDEMONT, Gaëtan et al. The use of olanzapine as an antiemetic in palliative medicine: a systematic review of the literature. **BMC Palliative Care**, v. 19, n. 1, p. 1-11, 2020.

Saviola, F., Pappaianni, E., Monti, A., Grecucci, A., Jovicich, J., & De Pisapia, N. (2020). Trait and state anxiety are mapped differently in the human brain. **Scientific Reports**, 10(1), 1-11.

Schachter, S., & Singer, J. (1962). Cognitive social and physiological determinants of emotional state. **Psychol Rev** 69, 379± 397.

SIEGHART, Werner. Structure and pharmacology of γ -aminobutyric acid_A receptor subtypes. **Pharmacol rev**, v. 47, p. 181-234, 1995.

SIEGHART, Werner. Structure and pharmacology of γ -aminobutyric acid_A receptor subtypes. **Pharmacol rev**, v. 47, p. 181-234, 1995.

Skaggs WE, McNaughton BL, Wilson MA, Barnes CA. Theta phase precession in hippocampal neuronal populations and the compression of temporal sequences. **Hippocampus** 6:149–172, 1996.

Skibiski J, Abdijadid S. Barbiturates. In: StatPearls. **StatPearls Publishing**, Treasure Island (FL); 2022. PMID: 30969553.

SMART, Trevor G. Regulation of excitatory and inhibitory neurotransmitter-gated ion channels by protein phosphorylation. **Current opinion in neurobiology**, v. 7, n. 3, p. 358-367, 1997.

SMITH, Geoffrey B.; OLSEN, Richard W. Functional domains of GABAA receptors. **Trends in pharmacological sciences**, v. 16, n. 5, p. 162-168, 1995.

STEIN, Dan J. et al. Epidemiology of anxiety disorders: from surveys to nosology and back. **Dialogues in clinical neuroscience**, 2022.

STONE, Lindsey B.; MCCORMACK, Caitlyn C.; BYLSMA, Lauren M. Cross system autonomic balance and regulation: Associations with depression and anxiety symptoms. **Psychophysiology**, v. 57, n. 10, p. e13636, 2020.

TANAKA, Chikako; BOWERY, Norman G. (Ed.). GABA: receptors, transporters and metabolism. **Springer Science & Business Media**, 1996.

TODD, A. J. et al. Colocalization of GABA, glycine, and their receptors at synapses in the rat spinal cord. **Journal of Neuroscience**, v. 16, n. 3, p. 974-982, 1996

Toth M. 5-HT_{1A} receptor knockout mouse as a genetic model of anxiety. **Eur J Pharmacol**. 2003 Feb 28;463(1-3):177-84. doi: 10.1016/s0014-2999(03)01280-9. PMID: 12600709.

Traub RD, Draguhn A, Whittington MA, Baldeweg T, Bibbig A, Buhl EH, Schmitz D (2002). Axonal gap junctions between principal neurons: a novel source of network oscillations, and perhaps epileptogenesis. **Rev Neurosci** 13:1–30.

VAN NESS, Paul C. et al. γ -Aminobutyric acid receptors in normal human brain and Huntington disease. **Neurology**, v. 32, n. 1, p. 63-63, 1982.

VANNIER, Christian; TRILLER, Antoine. Biology of the postsynaptic glycine receptor. **International review of cytology**, v. 176, p. 201-244, 1997.

VIANA, Maria Carmen et al. Sao Paulo Megacity Mental Health Survey-a population-based epidemiological study of psychiatric morbidity in the Sao Paulo metropolitan area: aims, design and field implementation. **Brazilian Journal of Psychiatry**, v. 31, p. 375-386, 2009.

Vicini S, Ferguson C, Prybylowski K, Kralic J, Morrow AL, Homanics GE (2001). GABA_A receptor α 1 subunit deletion prevents developmental changes of inhibitory synaptic currents in cerebellar neurons. **J Neurosci** 21:3009–3016.

Violle, N.; Messaoudi, M.; Lefranc-Millot, C.; Desor, D.; Nejdi, A.; Demagny, B.; Schroeder, H. Ethological comparison of the effects of a bovine alpha s1-casein tryptic hydrolysate and diazepam on the behaviour of rats in two models of anxiety. **Pharmacol. Biochem. Behav.** 2006, 84, 517–523. [CrossRef] [PubMed]

Votaw, V.R.; Geyer, R.; Rieselbach, M.M.; McHugh, R.K. The epidemiology of benzodiazepine misuse: A systematic review. Drug volunteers. **Psychopharmacology** 2004, 173, 88–97. [CrossRef] [PubMed]

Vyunova TV, Andreeva L, Shevchenko K, Myasoedov N. Peptide-based Anxiolytics: The Molecular Aspects of Heptapeptide Selank Biological Activity. **Protein Pept Lett.** 2018;25(10):914-923. doi: 10.2174/0929866525666180925144642. PMID: 30255741.

Waldvogel, H.J., Baer, K., Faull, R.L.M. Distribution of GABAA Receptor Subunits in the Human Brain. In: Monti, J., Pandi-Perumal, S., Möhler, H. (eds) **GABA and Sleep**, 2010. Springer, Basel. https://doi.org/10.1007/978-3-0346-0226-6_3

WATANABE, Masahito et al. GABA and GABA receptors in the central nervous system and other organs. **International review of cytology**, v. 213, p. 1-47, 2002.

WATANABE, Masahito et al. GABA and GABA receptors in the central nervous system and other organs. **International review of cytology**, v. 213, p. 1-47, 2002.

Whiting PJ. GABA-A receptor subtypes in the brain: a paradigm for CNS drug discovery? **Drug Discov Today**. May 15;8(10):445-50, 2003. doi: 10.1016/s1359-6446(03)02703-x. PMID: 12801796.

WU, Mengwei et al. Electroacupuncture alleviates anxiety-like behaviors induced by chronic neuropathic pain via regulating different dopamine receptors of the basolateral amygdala. **Molecular neurobiology**, v. 59, n. 9, p. 5299-5311, 2022.

Yamada, Ayako, Mizushige, Takafumi , Kanamoto, Ryuhei, Ohinata, Kousaku 2014. Identification of novel β -lactoglobulin-derived peptides, wheylin-1 and -2, having anxiolytic-like activity in mice. **Mol. Nutr. Food, Res.**58, 353-358, 2014.

Yerkes, R. M. (1921). Psychological examining in the United States Army. **Memoirs Natl Acad Sci** 15, 1 ± 16.

Ying, F., Lin, S., Li, J., Zhang, X., & Chen, G. (2021). Identification of monoamine oxidases inhibitory peptides from soybean protein hydrolysate through ultrafiltration purification and in silico studies. **Food Bioscience**, 44, 101355.

Yoshikawa, M. (2015). Bioactive peptides derived from natural proteins with respect to diversity of their receptors and physiological effects. **Peptides**, 72, 208-225.

ZARRINDAST, Mohammad-Reza; KHAKPAI, Fatemeh. The modulatory role of dopamine in anxiety-like behavior. **Archives of Iranian medicine**, v. 18, n. 9, p. 0-0, 2015.

Zhao H, Sonada S, Yoshikawa A, Ohinata K, Yoshikawa M. Rubimetide, humanin, and MMK1 exert anxiolytic-like activities via the formyl peptide receptor 2 in mice followed by the successive activation of DP1, A2A, and GABAA receptors. **Peptides**. 2016 Sep;83:16-20. doi: 10.1016/j.peptides.2016.07.001. Epub 2016 Jul 27. PMID: 27475912.

Zozulia AA, Neznamov GG, Siuniakov TS, Kost NV, Gabaeva V, Sokolov Olu, Serebriakova EV, Siranchieva OA, Andriushenko AV, Telesheva ES, Siuniakov SA, Smulevich AB, Miasoedov NF, Seredenin SB. Efficacy and possible mechanisms of action of a new peptide anxiolytic selank in the therapy of generalized anxiety disorders and neurasthenia. **Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova**. 2008; 108(4):38- 48 (in Russian).