

INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS DA N-ACETILCISTEÍNA (NAC) SOBRE PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS NO MODELO DE ESTRESSE CRÔNICO EM PEIXES-ZEBRA

BRUNO ZILLI PERONI^{1,3}, ANNA PAULA MONTEIRO DE SOUZA^{1,3}, RICIERI
NAUE MOCELIN^{2,3}

1 Introdução

A vida moderna apresenta uma estreita relação com o desenvolvimento de transtornos mentais como ansiedade e depressão, as quais geram incapacidade, danos sociais e altos custos econômicos. Apesar dos avanços científicos, a neurobiologia dos transtornos mentais ainda é pouco esclarecida (Grogans *et al.*, 2023; Patel *et al.*, 2018).

O dano neuronal induzido pela hiperatividade glutamatérgica e o estresse oxidativo estão associados ao desenvolvimento de transtornos mentais, resultando em neuroinflamação, disfunção mitocondrial e excitotoxicidade (Berk *et al.*, 2013; Bradlow *et al.*, 2022; Raghu *et al.*, 2021). É bem aceita a ideia de que o estresse é um fator desencadeante de transtornos mentais, principalmente por promover dano oxidativo, alterações em neurotransmissores e epigenéticas, bem como hiperatividade glutamatérgica, causadora de excitotoxicidade (Bradlow *et al.*, 2022; Dean, Giorlando e Berk, 2011; Tardiolo, Bramanti e Mazzon, 2018).

A N-acetilcisteína (NAC) apresenta importantes propriedades neuroprotetoras e antioxidantes, possuindo mecanismo de ação multialvo, atuando sobretudo no sistema glutamatérgico, sendo estudada em transtornos mentais - inclusive naqueles relacionados ao estresse - e neurodegenerativos (Bradlow *et al.*, 2022; Dean, Giorlando e Berk, 2011; Mocelin *et al.*, 2019; Tardiolo, Bramanti e Mazzon, 2018).

Recentemente a ANVISA incluiu para o tratamento de depressão maior a Escetamina (Spravato®), um spray nasal que atua sobre o sistema glutamatérgico e é aplicado 1 vez por semana, garantindo uma reversão dos sintomas depressivos em poucas horas, diferentemente dos tratamentos convencionais, que necessitam de 3 semanas para iniciar o efeito (Cipriani *et*

¹ Acadêmico de Medicina, Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus Passo Fundo*, contato: bruno.peroni@hotmail.com

² Professor do Curso de Medicina, Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus Passo Fundo*, contato: ricieri.mocelin@uffs.edu.br

³ Laboratório de Neuropsicobiologia Translacional (LaNT)

al., 2018). Apesar disso, efeitos dissociativos têm sido relatados na literatura (Ballard e Zarate Jr., 2020; Moussiopoulou *et al.*, 2023).

Dada a alta incidência de transtornos mentais e as limitações dos tratamentos atuais, há uma necessidade de buscar compostos com menos efeitos adversos e maior eficácia clínica. Nesse sentido, o objetivo deste estudo foi investigar o efeito rápido da NAC sobre parâmetros comportamentais no modelo de Estresse Crônico Imprevisível (ECI) em peixes-zebra.

2 Objetivos

Investigar o efeito rápido da NAC sobre parâmetros comportamentais em peixes-zebra submetidos a um protocolo de ECI.

3 Metodologia

Trata-se de um estudo quantitativo, experimental, controlado, randomizado, cego, de cunho analítico a partir de análise comportamental em modelo animal. Inicialmente, 80 peixes-zebra adultos (4-6 meses de idade; 50:50 machos fêmeas) foram habituados e aclimatados 30 dias, sob parâmetros físico-químicos ideais, de acordo com o descrito na literatura (Mocelin *et al.*, 2018; Mocelin *et al.*, 2019). Após aclimação, os animais foram alocados em aquários de modo aleatório, em 8 grupos experimentais com 10 animais cada, sendo 4 submetidos ao ECI (+) e 4, não submetidos (-). Cada um destes 4 grupos foi exposto à N-acetilcisteína (NAC, 10 mg/L, 20 min), Fluoxetina (FLU, 10 mg/L, 20 min), Ketamina (KET, 20 mg/L, 20 min) ou veículo (CTRL, água, 20 min).

Durante os primeiros 7 dias os animais foram expostos ao protocolo de ECI, sendo submetido a distintos agentes estressores em diferentes horários: perseguição por rede, aquecimento de água, resfriamento de água, aglomeração, troca de tanque e exposição do dorso (Gallas-Lopes *et al.*, 2023; Mocelin *et al.*, 2019). No 7º dia, os animais receberam o tratamento farmacológico correspondente (CTRL, NAC, FLU ou KET). Após 24 horas da exposição ao tratamento (dia 8), os animais foram submetidos ao teste de tanque novo (NTT) para análise comportamental dos seguintes parâmetros: distância percorrida (m), número de cruzamentos e tempo de permanência (s) na área superior e inferior do aquário. Os animais foram transferidos cuidadosamente e individualmente ao aparato, filmados durante 6 minutos e posteriormente analisados utilizando o software ANY-Maze®.

Para análise estatística foram criados gráficos de frequência e verificou-se a normalidade dos dados utilizando o teste de Shapiro-Wilk. Foi utilizado o teste de ANOVA de

duas-vias, seguido do teste *post hoc* de Tukey, através do software GraphPad Prism (versão 9.2.0) para análise das intervenções. O sexo dos animais foi considerado como um possível fator, no entanto, nenhuma significância estatística foi encontrada. Em todas as comparações, o nível de significância adotado foi $p < 0,05$. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), sob o protocolo nº 6.839.180.221.

4 Resultados e Discussão

Foram avaliados os efeitos do tratamento com NAC, FLU e KET nos parâmetros comportamentais em peixes-zebra submetidos ao ECI. O ECI reduziu o número de cruzamentos e o tempo de permanência na área superior e aumentou o tempo de permanência na área inferior no NTT. O teste de ANOVA revelou um efeito principal do tratamento ($F_{3,69} = 14,12$, $p < 0,0001$), estresse ($F_{3,69} = 45,52$, $p < 0,0001$) e interação ($F_{3,69} = 13,27$, $p < 0,0001$) para o tempo na área superior, bem como efeitos do tratamento ($F_{3,69} = 12,27$, $p < 0,0001$), estresse ($F_{3,69} = 49,80$, $p < 0,0001$) e interação ($F_{3,69} = 9,53$, $p < 0,0001$) para o tempo na área inferior. Além disso, a FLU apresentou comportamento tipo-ansiolítico em animais não submetidos ao ECI.

Conforme esperado, o ECI induziu comportamento tipo-ansioso nos animais sem produzir dano locomotor, reduzindo o tempo de permanência na área superior e aumentando o tempo de permanência da área inferior (Mocelin *et al.*, 2019). A KET já apresenta efeito rápido e sustentado descrito na literatura em roedores e humanos (Ma *et al.*, 2023; Rawat *et al.*, 2024), porém, aqui mostramos o efeito rápido em peixes-zebra. Pela primeira vez, demonstramos que a exposição de 10 mg/L de NAC durante 20 minutos reverteu o comportamento tipo-ansiosogênico induzido pelo ECI, mostrando seu potencial efeito rápido em transtornos mentais relacionados ao estresse. No que tange ao efeito tipo-ansiolítico *per se* da FLU, tal resultado é demonstrado na literatura após exposição aguda (Mocelin *et al.*, 2015).

Considerando o potencial efeito rápido da NAC em reverter o comportamento tipo-ansioso induzido por ECI nesse estudo, reforça-se que este medicamento pode ser um agente promissor no tratamento de transtornos mentais relacionados ao estresse. Entretanto, mais estudos são necessários para investigar o provável mecanismo de ação de efeito rápido da NAC.

5 Conclusão

Demonstramos pela primeira vez que a N-acetilcisteína (NAC) apresenta efeito

rápido ao reverter o comportamento tipo-ansiosígeno induzido pelo protocolo de Estresse Crônico Imprevisível (ECI) em peixes-zebra. Os resultados sugerem a aplicabilidade deste medicamento no tratamento de transtornos mentais relacionados ao estresse, dado o seu ótimo perfil de tolerabilidade e segurança em seres-humanos.

Referências Bibliográficas

- BALLARD, E. D.; ZARATE JR., C. A. The role of dissociation in ketamine's antidepressant effects. **Nature Communications**, v. 11, n. 6431, 2020. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41467-020-20190-4>>. Acesso em: 22 ago. 2024.
- BERK, Michael *et al.* The promise of N-acetylcysteine in neuropsychiatry. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 34, n. 3, p. 167-177, mar. 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23369637/>>. Acesso em: 22 dez. 2023.
- BRADLOW, Richard C. J. *et al.* The Potencial of N-Acetyl-L-Cysteine (NAC) in the Treatment of Psychiatric Disorders. **Central Nervous System Drugs**, v. 36, n. 5, p. 451-482, maio 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35316513/>>. Acesso em: 19 dez. 2023.
- CIPRIANI, Andrea *et al.* Comparative efficacy and acceptability of 21 antidepressant drugs for the acute treatment of adults with major depressive disorder: a systematic review and network meta-analysis. **The Lancet**, v. 391, n. 10128, p. 1357-1366, 2018. Disponível em: <[https://www.thelancet.com/article/S0140-6736\(17\)32802-7/fulltext](https://www.thelancet.com/article/S0140-6736(17)32802-7/fulltext)>. Acesso em: 22 ago. 2024.
- DEAN, O; GIORLANDO, F.; BERK, M. N-acetylcysteine in psychiatry: current therapeutic evidence and potential mechanism of action. **Journal of Psychiatry and Neuroscience**, v. 36, n. 2, p 78-86., mar. 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21118657/>>. Acesso em: 21 dez. 2023.
- GALLAS-LOPES, Matheus *et al.* Systematic review and meta-analysis of 10 years of unpredictable chronic stress in zebrafish. **Laboratory Animals (New York)**, v. 52, n. 10, p. 229-246, out. 2023. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37709998/>>. Acesso em: 12 abr. 2024.
- GROGANS, Shannon E. *et al.* The nature and neurobiology of fear and anxiety: State of the science and opportunities for accelerating discovery. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 151, p. 1-90, 2023 Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37209932/>>. Acesso em: 22 ago. 2024.
- MA, Shuangshuang *et al.* Sustained antidepressant effect of ketamine through NMDAR trapping in the LHb. **Nature**, v. 662, p. 802-809, 2023. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41586-023-06624-1>>. Acesso em: 22 ago. 2024.
- MOCÉLIN, Ricieri *et al.* Behavioral and Biochemical Effects of N-acetylsysteine in Zebrafish Acutely Exposed to Ethanol. **Molecular Neurobiology**, v. 43, p. 458-464, dez. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29196951/>>. Acesso em: 12 abr. 2024.
- MOCÉLIN, Ricieri *et al.* N-acetylcysteine prevents stress-induced anxiety behavior in zebrafish. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 139, p. 121-126, 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26261019/>>. Acesso em: 22 ago. 2024.
- MOCÉLIN, Ricieri *et al.* N-Acetylcysteine Reverses Anxiety and Oxidative Damage Induced by Unpredictable Chronic Stress in Zebrafish. **Molecular Neurobiology**, v. 56, n. 2, p. 1188-1195, fev. 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29876880/>>. Acesso em: 18 dez. 2023.

- MOUSSIPOUNOULOU, Joanna *et al.* Dissociative side effects of repeated intranasal esketamine in a patient with preexisting dissociative symptoms. **Psychiatry Research Case Reports**, v. 2, n. 1, 2013. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2773021223000081>>. Acesso em: 22 ago. 2024.
- PATEL, V. *et al.* The Lancet Commission on global mental health and sustainable development. **Lancet**, v. 392, n. 10.157, p. 1553–1598, out. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30314863/>>. Acesso em: 12 abr. 2024.
- RAGHU, Ganesh *et al.* The Multifaceted Therapeutic Role of N-acetylcysteine (NAC) in Disorders Characterized by Oxidative Stress. **Current Neuropharmacology**, v. 19, n. 8, p. 1202-1224, ago. 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33380301/>>. Acesso em: 18 dez. 2023.
- RAWAT, Radhika *et al.* Ketamine's rapid and sustained antidepressant effects are driven by distinct mechanism. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 81, n. 1, p. 1-19, 2024. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10899278/>>. Acesso em: 22 ago. 2024.
- TARDIOLO, G.; BRAMANTI, P.; MAZZON, E. Overview of the Effects of N-Acetylcysteine in Neurodegenerative Diseases. **Molecules**, v. 23, n. 12, p. 1-20, dez. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30551603/>>. Acesso em: 21 dez. 2023.

Palavras-chave: Ansiedade; Estresse Crônico Imprevisível; N-acetilcisteína; Peixe-zebra; Transtornos Neuropsiquiátricos.

Nº de Registro no sistema Prisma: PES 2023-0098

Financiamento: EDITAL Nº 73/GR/UFGS/2023 (EDITAL Nº 517/GR/UFGS/2023) - FAPERGS.