

INVESTIGAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO DA N-ACETILCISTEÍNA EM UM MODELO DE ESTRESSE CRÔNICO IMPREVISÍVEL EM PEIXES-ZEBRA

BRUNO ZILLI PERONI^{1,2}, RICIERI NAUE MOCELIN²

1 Introdução

Os transtornos psiquiátricos apresentam alta prevalência na sociedade contemporânea, especialmente os transtornos de humor e de ansiedade (Alvi, Kumar e Tabak, 2022), os quais acarretam não apenas impactos deletérios ao indivíduo, mas também prejuízos significativos aos sistemas de saúde e à sociedade (Patel *et al.*, 2018; Walker, McGee e Druss, 2015). Apesar disso, as opções terapêuticas atualmente disponíveis apresentam eficácia limitada e efeitos adversos notáveis, o que leva a altas taxas de abandono do tratamento (Insel *et al.*, 2013).

Embora a fisiopatologia desses transtornos ainda seja dúbia, a literatura endossa um modelo baseado na interação entre estresse oxidativo e hiperatividade glutamatérgica, induzindo neuroinflamação, excitotoxicidade e disfunção mitocondrial, fatores com papel central na gênese dos transtornos mentais (Alvi, Kumar e Tabak, 2022). Além disso, evidências recentes destacam o papel do estresse como agente precipitante dessas doenças neurológicas, atuando justamente sobre as vias fisiopatológicas supracitadas (Bradlow *et al.*, 2022).

Diante desse cenário, torna-se relevante investigar o potencial terapêutico da N-acetilcisteína (NAC) no tratamento de transtornos neuropsiquiátricos, tendo em vista seu mecanismo de ação - atuando sobre vias glutamatérgicas e estresse oxidativo -, perfil de segurança favorável e crescentes evidências acerca de sua aplicabilidade na neurociência (Bradlow *et al.*, 2022; Tardiolo, Bramanti e Mazzon, 2018).

Estudos pré-clínicos são essenciais nas fases iniciais de estudos que visam avaliar compostos farmacológicos. Nesse contexto, o peixe-zebra destaca-se como organismo modelo na neurociência por apresentar significativa similaridade genômica, morfológica e fisiológica com os mamíferos. Seu sistema nervoso central compartilha circuitos neuronais com alta similaridade aos seres-humanos, como neurotransmissores dopamina, serotonina, glutamato e GABA, bem como hormônios como o cortisol (Kalueff, Stewart e Gerlai, 2014).

Assim, diante da alta incidência de transtornos mentais e das limitações dos tratamentos

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

² Laboratório de Neuropsicobiologia Translacional (LaNT), Universidade Federal da Fronteira Sul, *Campus* Passo Fundo

atuais, é urgente a busca por terapias com maior eficácia clínica, novos alvos terapêuticos e menores efeitos adversos.

2 Objetivos

Investigar o efeito sustentado da N-acetilcisteína (NAC) sobre parâmetros comportamentais no modelo de estresse crônico imprevisível (ECI) em peixes-zebra.

3 Metodologia

Inicialmente, 80 peixes-zebra (*Danio rerio*) adultos (4-6 meses de idade; 50:50 machos:fêmeas) adquiridos de loja especializada, foram habituados e aclimatados por 30 dias em tanques de 40 litros, alimentados duas vezes ao dia, com ciclo claro/escuro de 14:10 horas e mantidos sob parâmetros físico-químicos ideais para a espécie, de acordo com o descrito na literatura (Mocelin *et al*, 2018; Mocelin *et al*, 2019). Após aclimatação, os animais foram alocados em aquários de 16 litros de modo aleatório, em 8 grupos experimentais, com 10 animais cada.

Do dia 1 ao dia 7, 4 grupos foram expostos ao protocolo de ECI, sendo os animais submetido a distintos agentes estressores em diferentes horários, de acordo com o estabelecido pela literatura (Mocelin *et al*, 2018; Mocelin *et al*, 2019). No 7º dia, os peixes foram expostos à N-acetilcisteína (NAC, 10 mg/L, Sigma-Aldrich®), Fluoxetina (FLU, 10mg/L, Daforin®, Novaquímica), Ketamina (KET, 20 mg/L, Vetnil®) ou veículo (CTRL, água do sistema), durante 20 minutos em aquários de 2,7 litros, sendo posteriormente alocados em seus respectivos tanques. A concentração e o tempo de exposição às drogas foram baseados em estudos anteriores e replicados no laboratório (Mocelin *et al*, 2019; Riehl *et al*, 2011).

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 total percorrida (m), número de cruzamentos entre as áreas do aparato (superior, média e inferior) e tempo de permanência (s) na área superior e inferior. Os animais foram transferidos cuidadosamente e individualmente ao NTT, filmados durante 6 minutos e o comportamento analisado posteriormente com o software ANY-Maze®.

Para análise estatística, inicialmente realizou-se a análise de poder de efeito para detectar uma diferença no tempo gasto na área superior do tanque. Este cálculo foi realizado usando o software G*Power (versão 3.1), considerando um alfa = 0,05, poder = 0,9, tamanho

do efeito = 0,5 e desvio padrão = 0,4. A normalidade dos dados e a homogeneidade das variâncias foram analisadas usando os testes de *D'Agostino-Person* e *Levene*, respectivamente. Uma ANOVA de duas vias foi realizada para identificar os efeitos principais da exposição ao estresse e aos tratamentos, assim como a interação de ambos. Quando a ANOVA revelou interações significativas, foram conduzidas comparações *post hoc* utilizando o teste de Tukey. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.). O nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$. Foi utilizado o software *GraphPad Prism* (versão 9.2.0) para análise estatística e elaboração gráfica. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFFS) sob protocolo n° 6.839.180.221.

4 Resultados e Discussão

A Figura 1 demonstra os efeitos da exposição à NAC, FLU ou KET em peixes-zebra submetidos ao protocolo de ECI. O ECI induziu uma redução no tempo de permanência na área superior e no número de cruzamentos entre as áreas do aparato (Fig. 1C e Fig. 1B, respectivamente), bem como aumentou o tempo de permanência na área inferior (Fig. 1D). O teste de ANOVA revelou efeitos significativos do tratamento para o tempo gasto na área superior ($F_{3,69} = 14,12$, $p < 0,0001$, Fig. 1C), efeitos significativos do tratamento ($F_{3,69} = 12,27$, $p < 0,0001$), do estresse ($F_{3,69} = 49,80$, $p < 0,0001$) e da interação ($F_{3,69} = 9,53$, $p < 0,0001$) para o tempo gasto na área inferior (Fig. 1D), bem como interação no número de cruzamentos entre as áreas do aparato ($F_{3,69} = 2,77$, $p = 0,0481$, Fig. 1B). A FLU induziu aumento no tempo de permanência na área superior ($p < 0,0001$, Fig. 1C) e redução do tempo de permanência na área inferior ($p < 0,0001$, Fig. 1D) em animais não submetidos ao estresse.

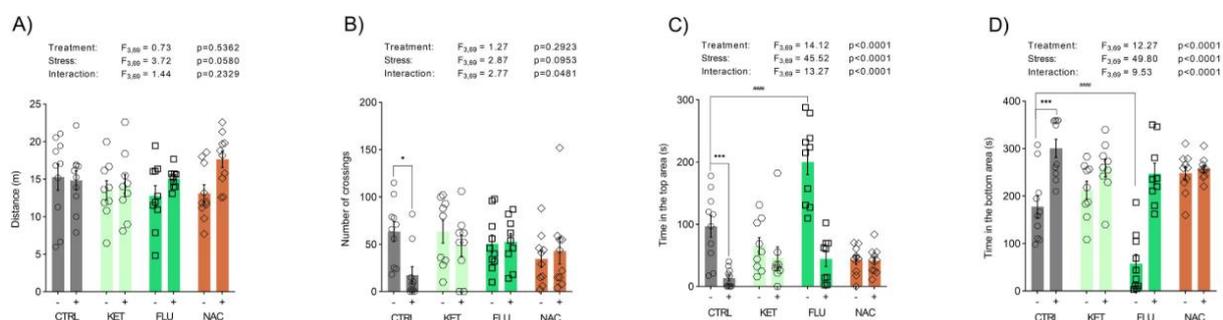


Figura 1. Efeitos da exposição à NAC, FLU ou KET em peixes-zebra submetidos ao protocolo de ECI. A) distância percorrida (m). B) número de cruzamentos entre as áreas do aparato. C) tempo na área superior (s). D) tempo na área inferior (s). CTRL: grupo controle; FLU: fluoxetina; KET: cetamina; NAC: N-acetilcisteína; +: grupo estressado; -: grupo não estressado. n = 9-10.

Demonstramos ineditamente que a NAC atenua de forma sustentada o comportamento

do tipo ansioso induzido pelo protocolo de ECI após única intervenção farmacológica.

Em peixes-zebra, o ECI induz alterações comportamentais, neuroquímicas e moleculares que replicam o fenótipo de pacientes com transtornos mentais (Song *et al.*, 2018). No NTT, a distância total percorrida (m) e o número de cruzamentos entre as áreas do aparato são usados como indicadores de atividade locomotora, enquanto o tempo de exploração reduzido de na área superior e aumentado na área inferior do aparato servem como indicadores de comportamento do tipo ansioso (Pittman e Piato, 2017), como demonstrado em nosso estudo, uma vez que o ECI induziu comportamento do tipo ansioso nos animais sem causar prejuízo locomotor, reduzindo o tempo de permanência na área superior e aumentando o tempo na área inferior, sem alterar a distância percorrida e o número de cruzamentos.

A NAC é capaz de atenuar o comportamento tipo-ansioso induzido pelo ECI em peixes-zebra após 7 dias de tratamento (Mocelin *et al.*, 2019) sem dano locomotor. Em consonância, demonstrou-se aqui que a exposição única à NAC também é capaz de atenuar o comportamento do tipo ansioso induzido pelo ECI, considerando assim um efeito sustentado da NAC nesse modelo. Dada a eficácia da NAC demonstrada em nosso estudo, destaca-se seu potencial como agente promissor para o tratamento de transtornos mentais relacionados ao estresse.

Além disso, os achados podem subsidiar o desenvolvimento de novos fármacos voltados para o controle do estresse oxidativo e hiperatividade glutamatérgica. Nesse sentido, os próximos estudos de nosso grupo visam investigar o papel dos receptores metabotrópicos de glutamato (mGLU) no mecanismo de ação da NAC, a fim de identificar potenciais novos alvos terapêuticos, bem como seu potencial uso adjuvante no tratamento dos transtornos mentais.

Apesar de demonstrarmos que a NAC é capaz de atenuar o comportamento tipo ansioso em um modelo pré-clínico após única exposição, o tamanho amostral reduzido devido ao tempo disponível e a análise comportamental isolada foram algumas das limitações do estudo, as quais serão resolvidas ao replicar o protocolo e investigar os efeitos sobre parâmetros bioquímicos.

5 Conclusão

Considerando o efeito sustentado da NAC na atenuação do comportamento do tipo ansioso induzido pelo estresse, seu bom perfil de segurança em humanos e evidências que apoiam seu uso como tratamento adjuvante em transtornos mentais, destaca-se seu potencial terapêutico em condições neuropsiquiátricas. Mais estudos pré-clínicos e ensaios clínicos randomizados de grande porte são necessários para embasar recomendações clínicas sólidas.

Referências Bibliográficas

ALVI, T.; KUMAR, D.; TABAK, B. Social anxiety and behavioral assessments of social cognition: A systematic review. **Journal of Affective Disorders**, v. 15, n. 311, p. 17-30, 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35490878/>>. Acesso em: 17 jul. 2025.

BRADLOW, Richard C. J. et al. The Potential of N-Acetyl-L-Cysteine (NAC) in the Treatment of Psychiatric Disorders. **Central Nervous System Drugs**, v. 36, n. 5, p. 451-482, 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35316513/>>. Acesso em 17 jul. 2025.

INSEL, T. R. et al. Innovative solutions to novel drug development in mental health. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 37, n. 10, p. 2438–2444, dez. 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23563062/>>. Acesso em: 17 jul. 2025.

KALUEFF, A. V.; STEWART, A. M.; GERLAI, R. Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 35, n. 2, p. 63-75, fev. 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24412421/>>. Acesso em: 17 jul. 2025.

MOCELIN, Ricieri et al. Behavioral and Biochemical Effects of N-acetylsysteine in Zebrafish Acutely Exposed to Ethanol. **Molecular Neurobiology**, v. 43, p. 458-464, 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29196951/>>. Acesso em: 17 jul. 2025.

MOCELIN, 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: 17 jul. 2025.

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: 17 jul. 2025.

PITTMAN, Julian; PIATO, Angelo. Developing Zebrafish Depression-Related Models. The rights and wrongs of zebrafish. **Behavioral phenotyping of zebrafish**, p. 33-43, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-3-319-33774-6_2>. Acesso em: 17 jul. 2025.

RIEHL, Russell et al. Behavioral and Physiological effects of acute ketamine exposure in zebrafish. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 33, n. 6, p. 658-667, nov./dez. 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21683787/>>. Acesso em: 17 jul. 2025.

SONG, C. et al. Modeling consequences of prolonged strong unpredictable stress in zebrafish: Complex effects on behavior and physiology. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 81, p. 384-394, fev. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2017.08.021>>. Acesso em: 17 jul. 2025.

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: 17 jul. 2025.

WALKER, E. R.; MCGEE, R. E.; DRUSS, B. G. Mortality in mental disorders and global disease burden implications: a systematic review and meta-analysis. **JAMA psychiatry**, v. 72, n. 4, p. 334–341, abr. 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25671328/>>. Acesso em: 17 jul. 2025.

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

Nº de Registro no sistema Prisma: PES 2024-0229

Financiamento: EDITAL Nº 153/GR/UFGS/2024 (EDITAL Nº 500/GR/UFGS/2024) - FAPERGS.