

## ANÁLISE DOS EFEITOS NEUROQUÍMICOS DA N-ACETILCISTEÍNA (NAC) EM PEIXES-ZEBRA SUBMETIDOS AO ESTRESSE CRÔNICO IMPREVISÍVEL

MATHEUS RICARDO HOFFMANN DE SOUZA<sup>1,2\*</sup>, BRUNO ZILLI PERONI<sup>12</sup>

RICIERI MOCELIN<sup>2,3</sup>

### 1 Introdução

O desequilíbrio oxidativo e a peroxidação lipídica nas membranas neuronais desempenham papel central na fisiopatologia de transtornos mentais, como depressão e ansiedade (Walker *et al.*, 2015). Frente aos danos celulares por espécies reativas de oxigênio (ERO), a N-acetilcisteína (NAC) surge como alternativa terapêutica promissora (Berk *et al.*, 2013). Sua ação baseia-se na doação de L-cisteína para a síntese de glutathione (GSH), principal antioxidante endógeno, e na modulação glutamatérgica via sistema cistina/glutamato (Raghu *et al.*, 2021).

Para a investigação neuropsiquiátrica, o peixe-zebra (*Danio rerio*) consolida-se como modelo translacional devido à sua alta homologia genética com humanos. O protocolo de Estresse Crônico Imprevisível (ECI) nessa espécie simula com precisão as alterações neurobioquímicas e o estresse oxidativo observados em quadros clínicos de estresse persistente (Mocelin *et al.*, 2019).

### 2 Objetivos

Avaliar e comparar a capacidade neuroprotetora da N-acetilcisteína (NAC) contra a peroxidação lipídica cerebral induzida pelo protocolo de Estresse Crônico Imprevisível (ECI) em peixes-zebra, frente a psicotrópicos de uso clínico consagrado (fluoxetina e cetamina).

### 3 Metodologia

Utilizaram-se 128 peixes-zebra (*Danio rerio*) adultos da linhagem selvagem (4–6

---

1 Graduando em Medicina, Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Passo Fundo, bolsista de iniciação científica Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), matheus.hoffmann@estudante.uffs.edu.br

2 Grupo de Pesquisa: Laboratório de Neuropsicobiologia Translacional (LaNT).

3 Doutor em Neurociências, Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Passo Fundo, **Orientador**.

meses; 50% machos e 50% fêmeas; Recanto dos Peixes, Passo Fundo/RS). Os animais passaram por 30 dias de aclimatação em tanques de 40 L (fotoperíodo 14:10 h claro/escuro) com parâmetros de água (temperatura, pH, cloro, níveis de amônia, etc) monitorados.

A amostragem foi distribuída aleatoriamente em 8 grupos experimentais ( $n = 16/\text{grupo}$ ), divididos entre expostos ao estresse (ECI +) e não estressados (ECI -). O protocolo de ECI durou 7 dias com estressores diários aleatorizados: perseguição com rede (8 min), alteração térmica da água (33 °C ou 23 °C por 30 min), aglomeração em béquer de 250 mL (50 min), trocas consecutivas de aquário e exposição dorsal ao ar (2 min) (Mocelin *et al.*, 2019).

No 7º dia, a fim de avaliar os potenciais efeitos terapêuticos, realizou-se a intervenção farmacológica de 20 minutos, com posologia validada previamente por outros estudos, em aquários individuais de 2,7 L contendo: N-acetilcisteína (NAC, 10 mg/L), Fluoxetina (FLU, 10 mg/L), Cetamina (KET, 20 mg/L) ou Veículo (CTRL). Após 24 horas, os animais foram eutanasiados por resfriamento térmico rápido para coleta do tecido encefálico.

A peroxidação lipídica foi avaliada pelo ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em amostragem composta por *pools* de 4 encéfalos homogeneizados em tampão salina (PBS, pH 7,4). A quantificação proteica seguiu o método de Bradford, seguindo protocolos publicados. Os dados foram analisados quanto à normalidade (D'Agostino-Pearson) e homogeneidade (Levene), seguidos de ANOVA de duas vias com pós-teste de Bonferroni ( $p < 0,05$ ). O estudo foi aprovado pelo CEUA/UFS (nº 6.839.180.221) e conduzido de acordo com as normas do NIH, seguindo o guia ARRIVE para a redação do manuscrito.

#### **4 Resultados e Discussão**

A indução do ECI por 7 dias provocou dano oxidativo nas membranas neurais, evidenciado pelo aumento significativo nos níveis de TBARS no grupo estressado controle versus o não estressado ( $p < 0,001$ ). A ANOVA de duas vias confirmou efeito principal significativo do estresse na peroxidação lipídica ( $F_{1,12} = 58,66$ ;  $p < 0,0001$ ) (Mocelin *et al.*, 2019).

Entre os tratamentos, a intervenção aguda de 20 minutos com NAC (10 mg/L) foi a única capaz de reverter o dano lipídico provocado pelo ECI ( $p = 0,0258$ ), reestabelecendo a peroxidação a níveis equivalentes aos do grupo controle não estressado. A ANOVA de duas

vias demonstrou efeito significativo do tratamento com NAC ( $F_{1,12} = 8,14$ ;  $p = 0,0145$ ). Isso indica que a oferta suplementar de L-cisteína potencializa a regeneração de GSH, promovendo neutralização eficaz das ERO (Berk *et al.*, 2013; Raghu *et al.*, 2021).

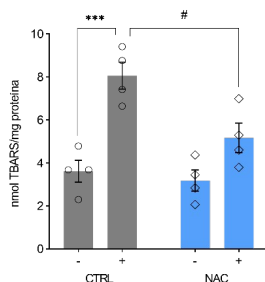


**Figura 1.** Efeitos do tratamento com N-acetilcisteína (NAC) 10 mg/L (20 minutos) sobre as alterações induzidas por estresse crônico imprevisível (ECI) nos níveis de peroxidação lipídica em encéfalos de peixes-zebra. Grupo não estressado (-); grupo estressado (+). Os dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.). Análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida do teste de *Bonferroni*.  $n = 4$ . \*\*\* $p < 0,001$ ; # $p < 0,05$  vs. estresse (+).

Por outro lado, os psicotrópicos tradicionais não combateram o estresse oxidativo tecidual. A cetamina (KET 20 mg/L;  $p = 0,021$ ) e a fluoxetina (FLU 10 mg/L;  $p = 0,0206$ ) não preveniram a elevação do TBARS nos animais estressados (Maximino *et al.*, 2013; Zanos *et al.*, 2016). Embora atuem no manejo da depressão e ansiedade por mecanismos monoaminérgicos e glutamatérgicos, esses fármacos parecem carecer de ação antioxidante direta imediata frente a agravos oxidativos agudos.

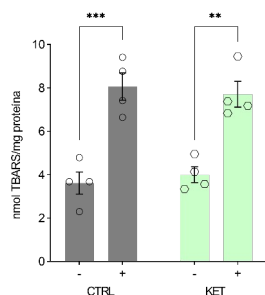


**Figura 2.** Efeitos do tratamento com cetamina (KET) 20 mg/L (20 minutos) sobre as alterações induzidas por estresse crônico imprevisível (ECI) nos níveis de peroxidação lipídica em encéfalos de peixes-zebra. Grupo não estressado (-); grupo estressado (+). Os dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.). Análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida do teste de *Bonferroni*.  $n = 4$ . \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  vs. estresse (+).

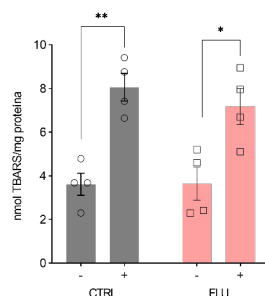


**Figura 3.** Efeitos do tratamento com fluoxetina (FLU) 10 mg/L (20 minutos) sobre as alterações induzidas por estresse crônico imprevisível (ECI) nos níveis de peroxidação lipídica em encéfalos de peixes-zebra. Grupo não estressado (-); grupo estressado (+). Os dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.). Análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida do teste de *Bonferroni*.  $n = 4$ . \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  vs. estresse (+).

## 5 Conclusão

A NAC demonstrou efetividade em reverter a peroxidação lipídica cerebral induzida pelo estresse crônico imprevisível em peixes-zebra, superando os efeitos da fluoxetina e da cetamina sob as mesmas condições. Embora a ação antioxidante direta da NAC evidencie seu potencial neuroprotetor contra os danos orgânicos do estresse oxidativo, restringe-se a dúvida se essa neutralização é capaz de mitigar os sintomas comportamentais da ansiedade e depressão ou se atua apenas como suporte fisiológico secundário. Estudos futuros associando marcadores oxidativos a desfechos comportamentais são necessários para determinar se a mitigação do estresse oxidativo possui papel causal na recuperação dos transtornos neuropsiquiátricos.

## Referências Bibliográficas

BERK, M. et al. The promise of N-acetylcysteine in neuropsychiatry. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 34, n. 3, p. 167-177, mar. 2013.

MAXIMINO, C. V. et al. Role of serotonin in zebrafish (*Danio rerio*) anxiety: Relationship with serotonin levels and effect of buspirone, WAY 100635, SB 224289, fluoxetine and para-chlorophenylalanine (pCPA) in two behavioral models. **Neuropharmacology**, v. 71, p. 170-181, ago. 2013.

MOCELIN, R. 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.

RAGHU, G. 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.

RIEHL, R. 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.

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.

ZANOS, P. et al. NMDAR inhibition-independent antidepressant actions of ketamine metabolites. **Nature**, v. 533, n. 7604, p. 481-486, maio 2016.

SHAHRIPOUR, R. B.; HARRIGAN, M. R.; ALEXANDROV, A. V. N-acetylcysteine (NAC) in neurological disorders: mechanisms of action and therapeutic opportunities. **Brain and Behavior**, v. 4, n. 2, p. 108-122, mar. 2014.

**Palavras-chave:** Peixe-zebra; N-acetilcisteína; Estresse Crônico Imprevisível; Estresse Oxidativo.

**Nº de Registro no sistema Prisma:** PES 2025-0311

#### **Financiamento**

