

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

GUSTAVO BEILKE^{1,3}, ANNA PAULA MONTEIRO DE SOUZA^{2,3}, RICIERI MOCELIN^{3,4}

1 Introdução

Os transtornos mentais como ansiedade e depressão são altamente deletérios, gerando altos custos pessoais e globais. É bem aceita a ideia de que o estresse é um importante fator etiológico no desenvolvimento de transtornos de ansiedade e depressão, induzindo alteração da neuroplasticidade, dano oxidativo e neuroinflamação. Apesar dos avanços científicos, o entendimento sobre a neurobiologia dos transtornos de ansiedade e depressão ainda é superficial. Recentemente foi mostrado uma relação entre o sistema glutamatérgico, por exemplo, a cetamina, um antagonista de receptores de glutamato do tipo NMDA, foi capaz de reverter os sintomas depressivos. Em novembro de 2020, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) aprovou a esketamina (SPRAVATOTM, Jonhson & Jonhson) para o tratamento de pacientes com depressão maior não-responsivos a antidepressivos, aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) em março de 2019. O SPRAVATOTM é um enantiômero S da cetamina sob formulação farmacêutica de spray nasal, capaz de reverter sintomas depressivos em poucas horas, entretanto, está disponível a um alto custo. Apesar dos benefícios, o uso pode induzir tolerância, dependência e ansiedade. Além disso, a cetamina pode ser utilizada potencialmente como droga de abuso.

A N-acetilcisteína (NAC) é amplamente utilizado na clínica como mucolítico, antídoto específico para overdose por paracetamol, na prevenção de doença pulmonar obstrutiva crônica, dentre outras aplicações. Seu mecanismo de ação multifacetado vem sendo recentemente evidenciado, demonstrando potencial como adjuvante terapêutico no tratamento de diferentes

¹Graduando do 6º nível de Medicina, Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Passo Fundo, contato: gustavo.beilke@estudante.uffs.edu.br.

²Graduando do 8º nível de Medicina, Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Passo Fundo, contato: anna.souza@estudante.uffs.edu.br.

³Grupo de Pesquisa: Neurociência Translacional, Clínica e Epidemiológica. Laboratório de Neuropsicobiologia Translacional (LaNT), Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Passo Fundo, Bloco A, Sala 102.

⁴ Professor Doutor da Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Passo Fundo, contato: ricieri.mocelin@uffs.edu.br. (**Orientador**).

transtornos mentais como ansiedade, depressão, esquizofrenia, dentre outros, além de eficácia na redução do abuso de substâncias como o álcool. A NAC apresenta propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, bem como, neuromodulador de diferentes sistemas neurotransmissores, principalmente o sistema glutamatérgico. A modulação sobre esse sistema demonstra similaridade com o mecanismo de ação da cetamina que, aliado ao potencial sinaptogênico e neurotrófico, promove prevenção do dano oxidativo, excitotoxicidade e morte neuronal.

Considerando o papel neuromodulador da NAC em diversas vias relevantes aos transtornos mentais relacionados ao estresse, o projeto contribuirá na investigação dos efeitos de ação rápida e sustentada da NAC sobre parâmetros comportamentais em peixes-zebra submetidos ao protocolo de estresse crônico.

2 Objetivos

O objetivo desse projeto foi investigar o efeito rápido e sustentado da N-acetilcisteína (NAC) sobre parâmetros comportamentais no teste de tanque novo em peixes-zebra.

3 Metodologia

Foram usados 96 peixes-zebra (*Danio rerio*) adultos com aproximadamente 4 meses de idade (proporção 50:50 machos: fêmeas) do tipo selvagem (*wild-type*, fenótipo *short fin*) para melhor representar a heterogeneidade e variabilidade genética da população.

Os peixes foram adquiridos em loja especializada (Delphis, Porto Alegre/RS), aclimatados em quarentena por 30 dias com densidade máxima de 2 peixes por litro. Após período de habituação, os animais foram transferidos para tanques de aclimação de forma randomizada totalizando 12 animais (6 machos e 6 fêmeas), mantidos durante 5 dias sobre condições ideais para a espécie, alimentados três vezes ao dia com ração comercial (Poytara, tropicais dia a dia, Araraquara/SP). Após 5 dias de aclimação, os peixes foram gentilmente transferidos em grupos de 6 animais para os respectivos tanques de exposição, expostos às 8:00 durante 20 minutos e retornando aos seus tanques moradia. A análise comportamental no teste de tanque novo foi realizada 24 horas após exposição. Os animais foram filmados individualmente durante 6 minutos e quantificados no software ToxTrac®.

A N-acetilcisteína (NAC) foi adquirida da Sigma-Aldrich (St Louis, Missouri, EUA), a fluoxetina (FLU, Daforin®, EMS) e a cetamina (CET, Cetamin 10%, Syntec) foram adquiridos de lojas especializadas. As concentrações foram baseadas em estudos anteriores. As soluções de NAC, fluoxetina e cetamina foram preparadas no dia da exposição.

A normalidade dos dados foi analisada pelo teste de *D'Agostino-Person* e a

homogeneidade das variâncias pelo teste de *Levene*. ANOVA de uma via seguida do teste *post hoc* de *Tukey*, foi utilizada para identificar os efeitos da exposição aos compostos. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média (S.E.M). O nível de significância adotado foi $p < 0,05$.

4 Resultados e Discussão

A figura 1 mostra os efeitos da cetamina, NAC e fluoxetina no teste de tanque novo. Fluoxetina diminuiu significativamente a distância percorrida ($F_{3,92}=16,24, p < 0,0001$, Fig. 1A) e aumentou significativamente o tempo de permanência na área superior do aparato ($F_{3,92}=14,19, p < 0,0001$, Fig. 1D). Não foram observados efeitos dos tratamentos sobre o número de cruzamentos entre as diferentes áreas (Fig. 1B) e número de entradas na área superior do aparato (Fig. 1C).

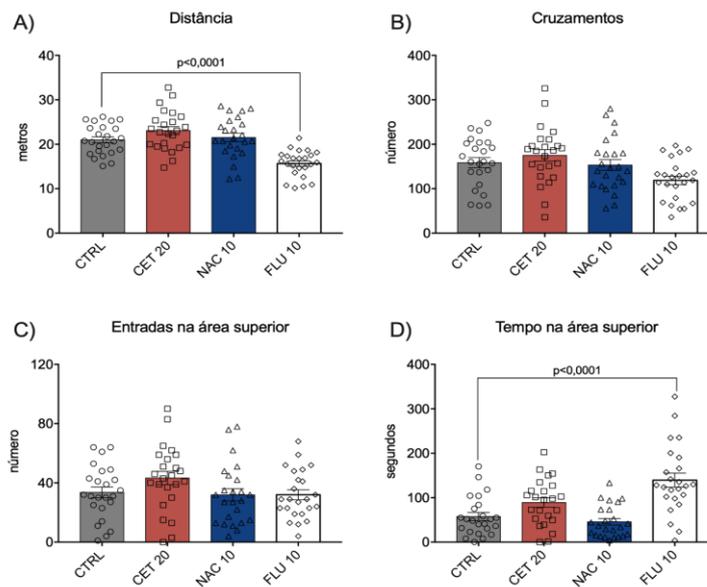


Figura 1. Efeitos da cetamina (CET, 20 mg/L), NAC (10 mg/L) e fluoxetina (FLU, 10 mg/L) sobre parâmetros comportamentais no teste de tanque novo em peixes-zebra. Distância percorrida (A), número de cruzamentos (B), entradas (C) e tempo (D) na área superior (D). Os dados são apresentados como a média \pm S.E.M. $n=24$

Os resultados aqui apresentados não demonstram comportamento tipo-ansiolítico da cetamina como em estudos com roedores, entretanto, consideramos necessário experimentos a fim de demonstrar ou refutar nossa hipótese, bem como a ampliação de testes comportamentais e intervenções ansiogênicas que avaliem outros contextos neurobiológicos.

5 Conclusão

NAC e KET não apresentaram comportamento do tipo ansiolítico após exposição aguda. Dados os efeitos da FLU no comportamento do tipo-ansiolítico após a exposição aguda,

nenhuma intervenção ansiogênica foi realizada para avaliar os potenciais efeitos reversores do NAC. Nesse sentido, estudos adicionais são necessários para melhor avaliar a eficácia da NAC em transtornos mentais.

Referências Bibliográficas

- ABDALLAH, C. G. et al. Ketamine's Mechanism of Action: A Path to Rapid-Acting Antidepressants. *Depression and Anxiety*, v. 33, n. 8, p. 689–697, 2016.
- ABDALLAH, C. G. et al. The neurobiology of depression, ketamine and rapid-acting antidepressants: Is it glutamate inhibition or activation? *Pharmacology & Therapeutics*, v. 190, p. 148–158, out. 2018.
- ANDRADE, C. Ketamine for Depression, 1: Clinical Summary of Issues Related to Efficacy, Adverse Effects, and Mechanism of Action. *The Journal of Clinical Psychiatry*, v. 78, n. 4, p. e415–e419, abr. 2017.
- AUST, S. et al. Anxiety during ketamine infusions is associated with negative treatment responses in major depressive disorder. *European Neuropsychopharmacology: The Journal of the European College of Neuropsychopharmacology*, 13 fev. 2019.
- BERK, M. et al. The promise of N-acetylcysteine in neuropsychiatry. *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 34, n. 3, p. 167–177, mar. 2013.
- CADDY, C. et al. Ketamine as the prototype glutamatergic antidepressant: pharmacodynamic actions, and a systematic review and meta-analysis of efficacy. *Therapeutic Advances in Psychopharmacology*, v. 4, n. 2, p. 75–99, abr. 2014.
- DEAN, O.; GIORLANDO, F.; BERK, M. N-acetylcysteine in psychiatry: current therapeutic evidence and potential mechanisms of action. *Journal of Psychiatry & Neuroscience: JPN*, v. 36, n. 2, p. 78–86, mar. 2011.
- JIANG, Y. et al. Short- and long-term antidepressant effects of ketamine in a rat chronic unpredictable stress model. *Brain and Behavior*, v. 7, n. 8, p. e00749, 2017.
- KOHR, R.; DURIEUX, M. E. Ketamine: teaching an old drug new tricks. *Anesthesia and Analgesia*, v. 87, n. 5, p. 1186–1193, nov. 1998.
- KOIKE, H.; CHAKI, S. Requirement of AMPA receptor stimulation for the sustained antidepressant activity of ketamine and LY341495 during the forced swim test in rats. *Behavioural Brain Research*, v. 271, p. 111–115, 1 set. 2014.
- KRYSTAL, J. H.; SANACORA, G.; DUMAN, R. S. Rapid-acting glutamatergic antidepressants: the path to ketamine and beyond. *Biological Psychiatry*, v. 73, n. 12, p. 1133–1141, 15 jun. 2013.
- LI, N. et al. mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists. *Science (New York, N.Y.)*, v. 329, n. 5994, p. 959–964, 20 ago. 2010.
- LI, N. et al. Glutamate N-methyl-D-aspartate Receptor Antagonists Rapidly Reverse Behavioral and Synaptic Deficits Caused by Chronic Stress Exposure. *Biological Psychiatry, Serotonin and Depression - Revisited*. v. 69, n. 8, p. 754–761, 15 abr. 2011.
- LINCK, V. M. et al. AMPA glutamate receptors mediate the antidepressant-like effects of N-acetylcysteine in the mouse tail suspension test. *Behavioural Pharmacology*, v. 23, n. 2, p. 171–177, abr. 2012.

MCEWEN, B. S. et al. Mechanisms of stress in the brain. *Nature Neuroscience*, v. 18, n. 10, p. 1353–1363, out. 2015.

MOCELIN, R. et al. N-acetylcysteine prevents stress-induced anxiety behavior in zebrafish. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 7 ago. 2015.

MOCELIN, R. et al. Behavioral and Biochemical Effects of N-Acetylcysteine in Zebrafish Acutely Exposed to Ethanol. *Neurochemical Research*, v. 43, n. 2, p. 458–464, fev. 2018a.

MOCELIN, R. et al. N-Acetylcysteine Reverses Anxiety and Oxidative Damage Induced by Unpredictable Chronic Stress in Zebrafish. *Molecular Neurobiology*, 6 jun. 2018b.

MURROUGH, J. W.; ABDALLAH, C. G.; MATHEW, S. J. Targeting glutamate signalling in depression: progress and prospects. *Nature Reviews. Drug Discovery*, v. 16, n. 7, p. 472–486, jul. 2017.

PAL, H. R. et al. Ketamine dependence. *Anaesthesia and Intensive Care*, v. 30, n. 3, p. 382–384, jun. 2002.

POPOLI, M. et al. The stressed synapse: the impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission. *Nature Reviews. Neuroscience*, v. 13, n. 1, p. 22–37, 30 nov. 2011.

SMITH, K. M.; LARIVE, L. L.; ROMANELLI, F. Club drugs: methylenedioxymethamphetamine, flunitrazepam, ketamine hydrochloride, and gamma-hydroxybutyrate. *American journal of health-system pharmacy: AJHP: official journal of the American Society of Health-System Pharmacists*, v. 59, n. 11, p. 1067–1076, 1 jun. 2002.

SWANSON, C. J. et al. Metabotropic glutamate receptors as novel targets for anxiety and stress disorders. *Nature Reviews. Drug Discovery*, v. 4, n. 2, p. 131–144, fev. 2005.

TAYLOR, J. H. et al. Ketamine for Social Anxiety Disorder: A Randomized, Placebo-Controlled Crossover Trial. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, v. 43, n. 2, p. 325–333, jan. 2018.

TROFIMIUK, E. et al. Stress and Ketamine, Bimodal Influence on Cognitive Functions. *Behavioural Brain Research*, v. 360, p. 354–364, 15 2019.

VIDAL, S. et al. Efficacy and Safety of a Rapid Intravenous Injection of Ketamine 0.5 mg/kg in Treatment-Resistant Major Depression: An Open 4-Week Longitudinal Study. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, v. 38, n. 6, p. 590–597, dez. 2018.

ZANOS, P. et al. NMDAR inhibition-independent antidepressant actions of ketamine metabolites. *Nature*, v. 533, n. 7604, p. 481–486, 26 2016.

ZANOS, P. et al. Convergent Mechanisms Underlying Rapid Antidepressant Action. *CNS drugs*, v. 32, n. 3, p. 197–227, 2018.

ZARATE, C. A. et al. Relationship of ketamine's plasma metabolites with response, diagnosis, and side effects in major depression. *Biological Psychiatry*, v. 72, n. 4, p. 331–338, 15 ago. 2012.

ZARATE, C. A., Jr et al. A randomized trial of an N-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant major depression. *Archives of general psychiatry*, v. 63, n. 8, p. 856–864, ago. 2006.

Palavras-chave: peixe-zebra; transtorno mental; comportamento; n-acetilcisteína; cetamina.

Nº de Registro no sistema Prisma: PES 2022-0328

Financiamento: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS). Bolsa de IC (Edital 89/GR/UFS/2022).