

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

Radharani Benvenuto

EFEITOS ANSIOLÍTICOS DE N-ACETILCISTEÍNA EM CAMUNDONGOS

Porto Alegre
2015

Radharani Benvenuto

EFEITOS ANSIOLÍTICO DE N-ACETILCISTEÍNA EM CAMUNDONGOS

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel(a) em Biomedicina.

Orientador: Profa. Dra. Elaine Elisabetsky
Coorientador: Me. Ana Paula Herrmann

Porto Alegre

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Jocerlei Elisa Benvenuti e Luiz Afonso Benvenuti, por terem sempre uma mente aberta e por me incentivarem nas minhas escolhas. À minha mãe, por atender aos meus pedidos e me levar inúmeras vezes para “passear” no hospital enquanto era enfermeira, isso sem dúvidas acendeu em mim o amor pela área da saúde. Ao meu pai, por me apresentar ao longo da vida à inúmeros filósofos, cientistas e artistas e me incentivar a desenvolver o pensamento crítico durante nossas intermináveis e maravilhosas conversas filosóficas.

À minha orientadora, Elaine Elisabetsky, por ser tão autêntica, atenciosa e inspiradora. Ela representa para mim a personificação da verdadeira ciência.

À Gabriela Melo e ao Bernardo Gabiatti, pela amizade verdadeira e por nunca desistirmos de fugir do senso comum, buscando incessantemente uma vida que seja original e idealista.

À minha co-orientadora, Ana Paula Herrmann, pela amizade e por me auxiliar ao longo de todo esse longo processo de formação acadêmica e científica; e também pelas grandes e divertidas discussões científico-alternativas.

Gratidão imensa aos amigos que fiz nesses últimos anos e os quais desejo levar ao longo da vida inteira. Em especial Bernardo, Gabriela, Matheus, Mauro, Giana, Luiza, Luana, Eduardo e Leonardo, obrigada por tornarem esses cinco anos tão fantásticos, divertidos e maravilhosos, apesar de todas as turbulências da academia.

Por fim, sou imensamente grata a todos os meus familiares, amigos e professores que de alguma forma especial contribuíram para esse maravilhoso processo de formação e transformação pessoal.

“Nada lhe posso dar que já não exista em você mesmo. Não posso abrir-lhe outro mundo de imagens, além daquele que há em sua própria alma. Nada lhe posso dar a não ser a oportunidade, o impulso, a chave. Eu o ajudarei a tornar visível o seu próprio mundo, e isso é tudo.”

O Lobo da Estepe – Hermann Hesse

ÍNDICE GERAL

RESUMO	6
1. INTRODUÇÃO	7
1.1. TRANSTORNOS DE ANSIEDADE	7
1.2. TRANSTORNO DE ANSIEDADE GENERALIZADA	8
1.3. TRANSTORNO DE PÂNICO	8
1.4. BASES BIOLÓGICAS DOS TRANSTORNOS DE ANSIEDADE	9
1.5. O SISTEMA GLUTAMATÉRGICO NOS TRANSTORNOS DE ANSIEDADE	11
1.6. TRATAMENTOS FARMACOLÓGICOS NOS T.A.	11
1.7. N-ACETILCISTEÍNA.	13
2. OBJETIVOS	15
3. ARTIGO CIENTÍFICO	16
4. ANEXOS	28
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	33
6. REFERÊNCIAS ADICIONAIS.....	34

RESUMO

Transtornos de ansiedade, como transtorno de pânico e ansiedade generalizada, são crônicos e podem ser bastante incapacitantes. Estima-se que cerca de 25 a 30% da população sofre de algum tipo de transtorno de ansiedade. Os fármacos disponíveis para tratamento desses transtornos são os ansiolíticos (benzodiazepínicos e não benzodiazepínicos) e antidepressivos (inibidores seletivos da recaptação de serotonina, inibidores da recaptação de serotonina e noradrenalina, antidepressivos tricíclicos). Esses fármacos estão associados com significativos efeitos colaterais, incluindo sedação, sonolência, diminuição da coordenação motora, no caso dos benzodiazepínicos, e disfunções sexuais, gastrointestinais e de sono, no caso dos antidepressivos. Relevante para este projeto, estima-se que 20-47% dos pacientes são refratários a esses tratamentos, justificando o grande interesse no desenvolvimento de novos fármacos. É provável que este objetivo só seja alcançado com o desenvolvimento de fármacos com mecanismo de ação inovador. O sistema glutamatérgico tem sido considerado como fonte de novos alvos farmacológicos em transtornos psiquiátricos. A N-acetilcisteína (NAC) é um modulador glutamatérgico que mostrou efeitos positivos tanto em modelos pré-clínicos como em testes clínicos em várias desordens psiquiátricas, incluindo depressão e esquizofrenia. No entanto, dados sobre seus efeitos em relação à ansiedade são ainda escassos, por essa razão, esse trabalho tem como objetivo elucidar o potencial ansiolítico de N-acetilcisteína. O objetivo desse trabalho foi explorar o potencial ansiolítico de N-acetilcisteína, usando os modelos T-maze elevado, supressão alimentar por novidade e hipertermia induzida por estresse em camundongos. Verificou-se que NAC foi capaz de prevenir o aumento da temperatura no teste de hipertermia induzida por estresse em camundongos Swiss e impediu a aquisição da esquila inibitória no teste t-maze elevado em camundongos BALB/C. Os resultados sugerem potencial efeito ansiolítico de NAC.

Palavras-chave: N-acetilcisteína, ansiedade, T-maze, supressão alimentar por novidade, hipertermia induzida por estresse.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Transtornos de Ansiedade

Transtornos de ansiedade (TA) são crônicos e podem ser incapacitantes, representando um alto custo para os indivíduos e para a sociedade (Kessler et al 2007). Esses transtornos são acompanhados de importante morbidade neuropsicológica, sendo a forma mais comum de transtorno psiquiátrico, afetando cerca de 25 a 30% da população e ocorrendo em pelo menos um episódio durante a vida (Kessler et al 2003). Indivíduos com ansiedade elevada são mais propícios do que aqueles que não tem ansiedade a ter uma grande variedade de condições médicas incluindo doenças cardiovasculares, auto-imunes e neurodegenerativas; além disso, estão em maior risco de mortalidade precoce (Carrol et al. 2009, Eaker et al. 2005, Li et al 2008, Spitzer et al. 2009).

De acordo com o Manual de Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-IV - 1994) existem pelo menos sete subtipos de transtornos de ansiedade reconhecidos: ansiedade generalizada (AG), transtorno de pânico (TP), fobia social (FS), estresse pós-traumático (TEPT) e transtorno obsessivo compulsivo (TOC). Ainda que o DSM-V (2013) tenha alterado algumas destas categorizações, particularmente colocando em um sub-grupo próprio os transtornos compulsivos, estes são transtornos reconhecidos na clínica com marcante presença de ansiedade.

Os TA são caracterizados por uma expressão inadequada ao medo, acarretando diversos sintomas físicos, afetivos e comportamentais, que tem expressão variada para cada subtipo de transtorno de ansiedade. É importante ressaltar que o medo é uma resposta adaptativa às situações de perigo, assim como a ansiedade (Bear et al 2008). O medo e a ansiedade têm uma considerável sobreposição, tanto em suas características comportamentais, como fisiológicas e neurológicas. No entanto, existem diferenças fundamentais entre os dois: o medo é definido por uma reação abrupta de luta-ou-fuga acompanhada de intensa excitação em resposta a uma ameaça intensa e identificável. Sendo assim, o medo nos permite evitar ameaças e perigos imediatos. Alternativamente, a ansiedade é caracterizada por um estado mais prolongado de tensão, preocupação e apreensão incertas, sobre eventos futuros potencialmente

negativos (Barlow et. al. 2000). Nos TA ocorre uma resposta de estresse inadequada, ocorrendo mesmo quando o estressor não está presente ou quando não há ameaça imediata (Bear et al 2007).

1.2. Transtorno de ansiedade generalizada

O transtorno de ansiedade generalizada (TAG) é caracterizado por preocupação excessiva e expectativa apreensiva, persistente e de difícil controle. De forma nenhuma é trivial, podendo acarretar grande dano psicológico e social ao indivíduo e apresentando apenas 20% de chance de recuperação (Stahl et al. 2000).

Entre os critérios diagnósticos, de acordo com o DSM-IV, estão:

a) Ansiedade e preocupação excessivas (expectativa com apreensão), ocorrendo mais dias do que não, durante pelo menos seis meses, a respeito de diversos eventos ou atividades.

b) Dificuldade de controlar a preocupação.

c) Ansiedade e preocupação associadas a três ou mais dos seguintes sintomas, presentes nos últimos seis meses: inquietação, cansaço fácil, dificuldade de concentração, irritabilidade, tensão muscular e distúrbios do sono.

d) A ansiedade, preocupação ou os sintomas físicos causam sofrimento clínico significativo ou prejuízo no funcionamento social ou ocupacional.

e) A perturbação não se deve aos efeitos fisiológicos diretos de substâncias (drogas de abuso ou medicamentos) ou de condição médica geral (p. ex., hipertireoidismo), nem ocorre exclusivamente durante transtornos de humor, transtorno psicótico ou transtorno do desenvolvimento.

1.3. Transtorno de pânico

O transtorno de pânico (TP) é uma doença psiquiátrica crônica que afeta 5 % da população ao longo da vida, atingindo 2 vezes mais mulheres que homens. É caracterizado pela presença de ataques súbitos e inesperados de ansiedade recorrentes acompanhados de sintomas físicos. Geralmente, esses ataques são seguidos de

preocupações persistentes acerca de ter um novo ataque e modificações do comportamento relacionadas a eles (Cordioli et al 2011).

Os sintomas associados ao TP incluem medo e ansiedade, assim como pensamento catastrófico com sensação de ameaça ou iminente perda de controle, morte ou insanidade (Stahl et al. 2000), que frequentemente levam a tentativas de fugir da situação. O ataque de pânico é acompanhado de diversos e variáveis sintomas físicos, que podem ser cardíacos, gastrointestinais, neurológicos e pulmonares, podendo simular diferentes doenças clínicas. Entre os comportamentos associados ao TP estão a tentativa de evitar situações que possam causar ansiedade ou situações que tenham sido associadas à ataques de pânico anteriores.

O ataque de pânico geralmente tem a duração de 5 a 30 minutos e, para ser classificado como ataque de pânico, deve conter no mínimo 4 dos seguintes sintomas:

- a) Palpitações ou taquicardia
- b) Sudorese
- c) Tremores
- d) Sensação de sufocação ou “respiração curta”
- e) Sensação de asfixia
- f) Dor ou desconforto torácico
- g) Náuseas ou cólicas abdominais
- h) Tonteira, desequilíbrio ou desmaio
- i) Desrealização (sensação de irrealidade) ou despersonalização (sensação de estar separado de si próprio)
- j) Temor de perder o controle ou “enlouquecer”
- k) Medo de morrer
- l) Parestesias
- m) Calafrios ou ondas de calor

1.4. Bases biológicas dos transtornos de ansiedade

Embora muito se tem estudado sobre transtornos de ansiedade, ainda são escassos na literatura dados sobre seus mecanismos neurais, existindo poucas evidências na caracterização de déficits cognitivos mais específicos para os vários tipos

de transtornos de ansiedade (Duval et al 2015). Apesar disso, muitos estudos e descobertas tem sido feitos através de modelos animais de ansiedade e estudos de imagem em humanos.

Uma série de regiões responsáveis por receber e processar informações sensoriais, como o córtex occipital, giro fusiforme, e tálamo, têm sido implicadas no neurocircuito do TA (Maren et. al. 2001; Lang et. al. 1998). Essas áreas têm um aumento na ativação em resposta à estímulos em pacientes ansiosos quando comparados com controles (Duval et. al. 2015).

Amplas evidências de estudos básicos e de imagem também sugerem a importância de regiões envolvidas no processamento e geração de emoções, como o estriado (Ferry et. al. 2014), a amígdala (Lee et. al. 2013; Herry et. al. 2010; Marek et. al. 2013), a ínsula (Maren et al. 2001; Stein et. al. 2007; Shankman et. al. 2014) e o Córtex dorsal cingular anterior (Whalen et. al. 1998). Estas áreas desempenham um grande papel na identificação de estímulos de medo e respostas de geração de medo. Estas regiões frequentemente têm anormalidades estruturais e são hiperativas na ansiedade em comparação aos controles. Extensas evidências sugerem hiperativação na amígdala em todos os transtornos de ansiedade (Shin et. al. 2010), que por essa razão possui um papel de extrema importância. O núcleo central da amígdala possui projeções colinérgicas para estruturas do prosencéfalo basal, as quais podem modular seletivamente processos sensoriais e de aprendizado através de projeções colinérgicas ascendentes para regiões corticais ativadas após situações que causem surpresa (Pessoa et al. 2010).

Regiões envolvidas na regulação da resposta à ameaça são particularmente importantes nos TA. Estudos básicos e estudos de imagem em humanos mostraram que o córtex pré-frontal medial, hipocampo, córtex pré-frontal dorsolateral e o córtex rostral cingulado anterior tem sido implicados na resposta ao medo (Duval et. al. 2015).

O hipotálamo possui um papel central importante, pois orquestra a resposta humoral, visceromotora e somáticomotora. A resposta humoral é mediada pelo eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA). O eixo HPA regula a secreção do cortisol pela glândula adrenal, sendo que o cortisol contribui para a resposta fisiológica do corpo ao estresse (Bear et al. 2007). A amígdala e o hipocampo regulam o eixo HPA. A ativação inadequada da amígdala e a diminuição de resposta do hipocampo têm sido relacionada

com TA, pois dessa forma, o eixo HPA estaria desregulado, assim como a liberação do cortisol (Bear et al. 2007).

Vários neurotransmissores estão implicados nos TA, entre os principais destaca-se a noradrenalina, a serotonina, o GABA e o glutamato (Braga et al. 2010).

1.5. O sistema glutamatérgico nos transtornos psiquiátricos

Nas últimas décadas o sistema glutamatérgico se tornou um importante alvo de estudo e vem ganhando crescente interesse na pesquisa relacionada a distúrbios psiquiátricos e comportamentais. Sendo o glutamato uma molécula presente em todo o sistema nervoso central, cuja transmissão está sujeita a uma fina regulação e que, ao mesmo tempo em que é modulado, também modula vários outros sistemas de neurotransmissores, vem se tornando um alvo farmacológico importante na área dos transtornos psiquiátricos (Hashimoto et al. 2011).

A evidência do papel do glutamato foi marcadamente destacada pela ação antidepressiva imediata do antagonista de receptores NMDA cetamina quando administrada em doses subanestésicas (Zarate et al., 2006). Em relação aos transtornos de ansiedade, também foi verificado a ação de fármacos que agem no sistema glutamatérgico. O acamprosato, que é um antagonista de receptores NMDA, reverteu o comportamento ansioso causado pela retirada da administração de anfetamina em camundongos (Koltunowska et al., 2013). Em outro estudo, um agonista de receptores mGlu 2/3 denominado LY354740 apresentou efeito ansiolítico no teste comportamental Plus-maze elevado. Todas essas evidências, apontam para o glutamato como sendo um alvo potencial para o desenvolvimento de fármacos com ação ansiolítica.

1.6. Tratamentos farmacológicos nos transtornos de ansiedade

A farmacoterapia é uma ferramenta importante no manejo e tratamento de transtornos de ansiedade. Em transtornos psiquiátricos em geral, há cada vez mais uma maior gama de evidências que apontam para a importância de tratamentos farmacológicos, principalmente quando concomitantes com psicoterapia. Entre os principais fármacos utilizados, estão:

Inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS): Os ISRS inibem a recaptura de serotonina, aumentando este neurotransmissor na fenda sináptica. Estes são os fármacos de primeira escolha para tratamento de TP, pois além de terem eficácia comprovada para este mal, combinam um espectro eficaz para condições comórbidas como depressão por exemplo, além de estarem associados com razoável segurança e tolerabilidade (Cordioli et al 2011). Também são muito úteis no tratamento de transtorno de ansiedade generalizada e outras subclasses de transtornos de ansiedade como fobias e transtorno de estresse pós-traumático. Entre os principais ISRS estão a fluoxetina, a sertralina e o citalopram.

Inibidores da recaptação de noradrenalina (IRNA): Essa classe de fármaco atua através da inibição da recaptura de noradrenalina, aumentando este neurotransmissor na fenda sináptica. O principal IRNA é a venlafaxina, também considerado tratamento de primeira linha para TP (Cordioli et al. 2011).

Antidepressivos tricíclicos (ADTs): Os ADTs também são eficazes no tratamento de TP, no entanto muitas vezes esses fármacos apresentam efeitos colaterais graves como ganho de peso e sonolência, além de apresentarem risco de superdosagem e menor tolerabilidade, relegando esses fármacos à segunda escolha.

Benzodiazepínicos (BZDs): Os BZDs atuam seletivamente nos receptores GABA_A que medeiam a transmissão sináptica inibitória em todo o sistema nervoso central, intensificando a resposta ao GABA. Nos últimos anos, o uso de BZDs vêm declinando e dando lugar aos antidepressivos, apesar disso, esses fármacos ainda são largamente utilizados para alívio de ansiedade intensa e incapacitante ou em estágios iniciais do tratamento com antidepressivos. Entre os principais BZDs se encontram o diazepam, o alprazolam e o clonazepam. Esses fármacos são muito úteis para tratar crises de ansiedade aguda e há muitos relatos de que em TP a combinação de um ISRS com um BZD pode ser melhor do que com um ISRS sozinho (Rang et al. 2012).

Os fármacos discutidos anteriormente possuem datados benefícios terapêuticos para tratamento de transtornos de ansiedade, no entanto, também apresentam na maioria dos casos efeitos adversos, que podem variar de leves a graves. Uma peculiaridade dos antidepressivos, é que estes podem levar dias ou mesmo semanas para fazer efeito, o que em muitos casos acaba sendo um grande empecilho quando se trata de casos mais severos da doença. Além disso, os antidepressivos podem causar

efeitos adversos como náuseas, insônia, disfunções metabólicas, sexuais e de sono. Já os benzodiazepínicos podem produzir paradoxalmente aumento da irritabilidade e agressividade em alguns indivíduos, além de apresentarem efeitos adversos como sonolência, sedação, efeitos tóxicos decorrentes de superdosagem e dependência física e emocional.

Apesar deste armamentarium terapêutico, chama atenção o fato de que em transtornos tão prevalentes, cerca de 20 – 47% (Pollack et al. 2007) dos pacientes são refratários aos tratamentos farmacológicos disponíveis. Esse quadro por si só evidencia a necessidade da busca de novas estratégias terapêuticas, de fármacos com mecanismos de ação inovadores.

1.7. N-acetilcisteína

N-acetilcisteína (NAC) tem sido utilizada nos últimos 30 anos principalmente como mucolítico em doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e como tratamento para overdose por paracetamol. Nos últimos anos, porém, tem surgido uma gama de evidências que sugerem que NAC pode ter diversos benefícios terapêuticos em múltiplos transtornos neuropsiquiátricos (Berk et al 2013).

NAC é o derivado N-acetyl do aminoácido L-cisteína e é rapidamente absorvido após uma dose por via oral (Arakawa et al 2007). L-cisteína é rapidamente oxidada no meio pró-oxidante do cérebro formando cistina. Cistina é o substrato do antiporter cistina-glutamato, o qual transporta o glutamato para fora da célula em troca de cistina, regulando dessa maneira os níveis de glutamato extracelular e facilitando, assim, a entrada de cisteína no interior da célula (Kau et al 2008). Dentro da célula, cistina pode ser reduzida à cisteína, que é o componente limitante da síntese da molécula endógena antioxidante glutathiona (Lushchak et al. (2012). A capacidade de NAC de regular tanto a atividade do antiporter cistina-glutamato e a biossíntese da glutathiona é a chave para sua eficácia terapêutica.

Há uma crescente gama de estudos na literatura demonstrando a ação de NAC em diversos transtornos psiquiátricos como esquizofrenia, transtorno bipolar, adição a drogas de abuso e depressão (Berk et al 2013). Isso se deve provavelmente ao mecanismo de ação multifacetado de NAC, pois este atua, diretamente ou

indiretamente, na neurotransmissão de glutamato e dopamina e, além disso, tem importante ação antioxidante e anti-inflamatória.

Existem também estudos de NAC relatados em transtornos de ansiedade como tricotilomania (Grant et al. 2009; Odlaug 2007) e Transtorno Obsessivo Compulsivo (Lafleur et al 2006) em humanos, sendo que em ambos foi observado considerável redução dos sintomas. Em modelos animais há um estudo de NAC no teste Marble-Burying em camundongos (Egashira, et al. 2012) demonstrando ação ansiolítica de NAC. Apesar da potencial ação terapêutica de NAC em transtornos de ansiedade, ainda há poucos dados em modelos animais que possam comprovar efeito ansiolítico e subsidiar desenhos de provas clínicas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito de N-acetilcisteína em modelos animais de ansiedade e pânico em camundongos.

2.2 Objetivos específicos

São objetivos específicos desse trabalho:

(i) avaliar os efeitos ansiolíticos e panicolíticos de NAC no teste de T-maze elevado em camundongos BALB/C com tratamento agudo;

(ii) avaliar os efeitos ansiolíticos de NAC no teste de hipertermia induzida por estresse em camundongos Swiss com tratamento agudo e subagudo;

(iii) avaliar os efeitos ansiolíticos de NAC no teste de supressão alimentar por novidade em camundongos Swiss e C57BL/6 com tratamento agudo e subagudo;

3. ARTIGO CIENTÍFICO

Artigo preparado segundo as normas da revista NEUROPHARMACOLOGY.

<http://www.elsevier.com/journals/neuropharmacology/0028-3908/guide-for-authors>

EFEITOS ANSIOLÍTICOS DE N-ACETILCISTEÍNA EM CAMUNDONGOS

Radharani Benvenuti ¹, Ana Paula Herrmann ¹, Patrícia Santos ¹, Yasmine Trojann¹, Roberta Andrejew ¹, Rafael Lima ¹, Elaine Elisabetsky ¹

1. Laboratório de Etnofarmacologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Sarmiento Leite 500/202, Porto Alegre, RS, 90050-170, Brasil.

Autor correspondente:

Tel: (51) 81245365; email: radavenvenuti@gmail.com (Radharani Benvenuti)

RESUMO

Introdução: Transtornos de ansiedade, como transtorno de pânico e ansiedade generalizada, são crônicos e podem ser bastante incapacitantes. Estima-se que cerca de 25 a 30% da população sofre de algum tipo de transtorno de ansiedade. Os fármacos disponíveis para tratamento desses transtornos apresentam diversos efeitos adversos, tem eficácia aquém do desejado e, significativamente, estima-se em 20 – 47% a fração de pacientes refratários aos tratamentos disponíveis. Torna-se, portanto, relevante desenvolver novos fármacos, preferencialmente com mecanismo de ação inovador. O sistema glutamatérgico, tem sido considerado como fonte de novos alvos farmacológicos em transtornos psiquiátricos. A N-acetilcisteína (NAC) é um modulador glutamatérgico que mostrou efeitos positivos tanto em modelos pré-clínicos como em testes clínicos em várias desordens psiquiátricas, incluindo depressão e esquizofrenia. No entanto, há poucos dados quanto a seu efeito em transtornos de ansiedade.

Objetivos: examinar os efeitos de NAC em diferentes testes comportamentais de ansiedade em camundongos. **Métodos:** Foi realizado o teste T-maze elevado, supressão alimentar por novidade e hipertermia induzida por estresse em camundongos BALB/C e Swiss com diferentes doses e tratamentos de NAC. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via seguida pelo teste post hoc de Student-Newman-Keuls (SNK) ou pelo modelo de equações de estimatórias generalizadas (GEE). **Resultados:** Verificou-se que NAC foi capaz de prevenir o aumento da temperatura no teste de hipertermia induzida por estresse em camundongos Swiss e impediu a aquisição da esquia inibitória no teste t-maze elevado em camundongos BALB/C. Apenas diazepam foi capaz de diminuir a latência para ingestão de alimento no teste de supressão alimentar por novidade. **Conclusão:** Foi observado efeito ansiolítico de NAC nos testes T-maze elevado e supressão alimentar por novidade em camundongos, o que sugere NAC como um possível tratamento para transtornos de ansiedade.

Palavras-chave: N-acetilcisteína, ansiedade, transtorno de pânico, T-maze, supressão alimentar por novidade, hipertermia induzida por estresse.

1. INTRODUÇÃO

Transtornos de ansiedade são prevalentes, crônicos, podem ser significativamente incapacitantes, representando um alto custo para os indivíduos e para a sociedade (Kessler et al 2007). Transtornos de ansiedades são a forma mais comum de transtorno psiquiátrico, afetando cerca de 25 a 30% da população e ocorrendo em pelo menos um episódio durante a vida (Kessler et al 2005).

O manejo terapêutico de transtornos de ansiedade é realizado com assistência psicológica e farmacoterapia; no entanto, estima-se que cerca de 40-50% dos pacientes são refratários a esses tratamentos (Wu et al., 2012). As drogas de primeira escolha são os antidepressivos (inibidores seletivos da recaptção de serotonina, os inibidores da recaptção de serotonina e noradrenalina e os antidepressivos tricíclicos) e os ansiolíticos (benzodiazepínicos e não benzodiazepínicos). No entanto, esses fármacos causam diversos efeitos colaterais, incluindo sonolência ou sedação e diminuição da coordenação motora, no caso dos benzodiazepínicos, e disfunções sexuais, gastrointestinais e de sono, no caso dos antidepressivos. Dessa forma, é de grande interesse a busca por novos fármacos com mecanismo de ação inovador, que sejam mais eficazes e/ou apresentem menos efeitos adversos do que os fármacos atualmente disponíveis.

Nas últimas décadas o sistema glutamatérgico passou a ser foco de atenção na neurobiologia em geral, e vem ganhando grande interesse na pesquisa relacionada a transtornos psiquiátricos e comportamentais. Sendo o glutamato uma molécula presente em todo o sistema nervoso central, cuja transmissão está sujeita a uma fina regulação e que ao mesmo tempo em que é modulado também modula vários outros sistemas de neurotransmissores, vem se tornando um alvo farmacológico importante na área de psiquiatria (Hashimoto, 2011). Evidência do potencial inovador de drogas cujo efeito se dá através da modulação glutamatérgica, é a ação antidepressiva imediata do antagonista de receptores NMDA cetamina quando administrada em doses subanestésicas (Zarate et al., 2006).

A N-acetilcisteína (NAC) é um precursor de cisteína que age no trocador cistina-glutamato presente em astrócitos, aumentando a quantidade de glutamato extrassináptico (Baker et al., 2008). Essa elevação promove uma maior ativação de receptores metabotrópicos mGlu2/3 localizados no espaço extra sináptico, resultando

em diminuição da liberação sináptica de glutamato e consequente redução na ativação de receptores glutamatérgicos pós sinápticos, especialmente do tipo NMDA (Dean et al., 2010). O potencial da utilidade de NAC em transtornos psiquiátricos tem sido documentado, tanto em modelos pré-clínicos (Linck et al., 2012) como em estudos clínicos (Berk et al., 2008; Berk, 2013). No entanto estudos sobre os efeitos ansiolíticos do NAC são escassos, resumindo-se a tricotilomania em humanos (Grant et al., 2009), no teste Marble-Burying em camundongos (Egashira, 2012) e dados não publicados de nosso laboratório (Noetzold, 2014). O objetivo deste trabalho é investigar os efeitos do NAC em modelos de ansiedade (supressão alimentar por novidade, hipertermia induzida por estresse e T-maze) em camundongos, úteis como subsídios ao desenho das necessárias provas clínicas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Animais

Foram utilizados camundongos machos adultos (45 dias) da linhagem Swiss, BALB/C e C57BL/6. Os animais foram adquiridos da Universidade Federal de Pelotas (UFPeL) e foram mantidos por pelo menos 15 dias de ambientação no biotério setorial do departamento de farmacologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) em ambiente controlado com temperatura entre 20 e 24 °C, ciclo claro/escuro de 12h/12h (luz acessa das 7h às 19h) e com alimentação padrão para a espécie e água ad libitum. Todos os experimentos foram aprovados pela comissão de ética no uso de animais (CEUA).

2.2. Drogas

N-acetilcisteína (NAC) foi adquirida da Sigma-Aldrich (St. Louis, Estados Unidos) e diazepam em ampola da Teuto Brasil (Goiás, Brasil). Todos os fármacos foram diluídos em solução salina e as soluções foram administradas por injeção intraperitoneal (i.p.) no volume de 0,1 mL/10 g de peso corporal.

2.3. Testes comportamentais

2.3.1. Teste de supressão alimentar por novidade: Foram utilizados camundongos da linhagem Swiss e C57BL/6. O aparato do teste consiste de uma arena de madeira quadrada (40 x 40 x 40 cm) com o chão coberto por uma fina camada de maravalha. Os animais permaneceram em jejum durante as 24 horas anteriores ao teste. No dia do teste, um único pellet de alimento (ração normal) foi colocado no centro da caixa sobre um papel filtro branco redondo e o animal foi posicionado em um dos cantos da caixa. Foi medido o tempo de latência para o animal começar a comer. O teto máximo do teste foi de 5 minutos (Santarelli et al., 2003). Em seguida, o animal foi transferido para a sua gaiola de origem e foi medida a quantidade de alimento consumido em 5 minutos.

Para este teste foi avaliado o efeito de tratamento agudo (salina, diazepam 1 mg/kg, NAC 30 e 60 mg/kg) onde as administrações por via i.p. ocorreram 30 minutos antes da realização do teste e tratamento subagudo (salina, diazepam 1 mg/kg, NAC 10 e 30 mg/kg) com administração durante 4 dias antes do teste.

2.3.2. Hipertermia induzida por estresse: Foram utilizados camundongos da linhagem Swiss. Os camundongos foram isolados em caixas-moradia 24 horas antes do teste. As administrações foram realizadas por via intraperitoneal 60 minutos antes do teste. As temperaturas retais foram medidas por meio de um termômetro enquanto o animal era mantido imóvel e seguro pela mão do pesquisador. A sonda foi mantida no local até que as leituras fossem feitas. A temperatura retal foi medida duas vezes em cada camundongo, sendo que a primeira medição (T1) induz a leve estresse, causando um aumento de temperatura; 10 minutos após foi feita a segunda medição (T2). A diferença entre as temperaturas (T2-T1) foi a medida de hipertermia induzida por estresse (Borsini et al. 1998). Os animais foram divididos nos seguintes grupos experimentais com n de 10 animais par cada grupo: tratamento agudo, onde as drogas (salina, diazepam 2 mg/Kg, NAC 60, NAC 100 e NAC 150 mg/Kg) foram administradas 60 min antes do teste e tratamento subagudo, onde as drogas (salina, diazepam 2 mg/kg, NAC 10, 30 ou 60 mg/kg) foram administradas durante 4 dias, sendo que a última administração foi realizada 60 min antes do teste.

2.3.3. T-Maze Elevado: Descrito por Graeff et al 1993 e 1998 e adaptado para camundongos por Pulga et al 2012. Foram utilizados camundongos das linhagens BALB/C. O aparato é em forma de T e consiste em três braços de iguais dimensões (30 x 5 cm), sendo que o braço vertical é fechado por paredes de acrílico escuro de 20 cm de altura; os dois braços horizontais são abertos, mas contêm uma borda de acrílico de 0,25 cm de altura em toda sua extensão. A sala foi iluminada apenas por luz vermelha. O experimento foi realizado entre 8:00 h e 15:00 h e consistiu de duas sessões: na sessão de treino o animal foi exposto a um dos braços abertos durante 30 min; 24 horas após foi realizada a sessão de teste, em que cada animal foi colocado na extremidade do braço fechado. Anotou-se a latência para que o animal saísse do braço fechado em três tentativas consecutivas separadas por um intervalo de 30 segundos. 30 segundos após a última tentativa, cada animal foi colocado na extremidade do mesmo braço aberto que foi utilizado na sessão de treino; anotou-se a latência de fuga para o braço fechado, em três tentativas consecutivas separadas por 30 segundos de intervalo. Foi utilizado um ponto de corte de 300 segundos para ambas as latências. Os experimentos foram filmados por uma câmera digital instalada acima do aparato, e posteriormente analisado através do software ANY-Maze (Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA).

2.4. Análise estatística

Os dados de supressão alimentar e T-maze foram analisados por ANOVA de uma via seguida pelo teste post hoc de Student-Newman-Keuls (SNK). Os dados do teste de hipertermia induzida por estresse foram analisados pelo modelo de equações de estimatórias generalizadas (GEE), pois este se mostrou mais adequado para este tipo de análise em comparação ao ANOVA (Guimarães et al. 2012). Foram considerados significativos valores de $p < 0,05$. Foi utilizado o programa Prism GraphPad 5.0 e SPSS 8.0 para Windows.

3. RESULTADOS

Os resultados de supressão alimentar são mostrados nas **Figuras 1 e 2**. Diazepam diminuiu significativamente ($F_{2,26} = 8.112$ e $p < 0.005$) a latência para ingestão de alimento em camundongos Swiss (Fig. 1A), mas não C57 ($F_{3,32} = 0.5474$ e $p > 0.05$) (Fig. 1B), quando administrado agudamente (Fig. 1). Não houve diferenças significativas

na quantidade de alimento ingerido entre os vários grupos e tratamentos (Swiss: $F_{2,28} = 8917$; C57: $F_{3,32} = 1.188$ e $p > 0.05$) (Fig. 1B), o que indica que nenhuma das drogas interfere no apetite. Na administração subaguda, não houve diferença significativa entre os grupos seja na latência ($F_{3,32} = 0.8061$ e $p > 0.05$) (Fig. 2A) ou no consumo ($F_{3,32} = 0.8284$ e $p > 0.05$) (Fig. 2B).

A **figura 3** apresenta os dados do teste de hipertermia induzida por estresse. Com administração aguda (Fig. 3A), NAC preveniu o aumento da temperatura nas doses de 60 mg/Kg (Wald chi-square₁=0.011 e $p > 0.05$) e 100 mg/Kg (Wald chi-square₁ =0.021 e $p > 0.05$), quando comparada com os animais controle. Diazepam não mostrou efeito (Wald chi-square₁ =4.556 e $p > 0.05$). Com administração subaguda, tanto NAC 10 mg/Kg (Wald chi-square₁=0.413 e $p > 0.05$) e NAC 60 mg/Kg (Wald chi-square₁ =2.459 e $p > 0.05$), quanto diazepam (Wald chi-square₁=1.092 e $p > 0.05$) foram efetivos em prevenir o aumento da temperatura (Fig. 3B). Não houve diferenças significativas na temperatura basal (T1 °C) entre todos os grupos ($F_{4,24}=2.111$ e $p > 0.05$) o que indica que nenhuma das drogas interfere na temperatura.

A **figura 4** apresenta os dados obtidos no teste T-maze elevado. Diazepam e NAC mostraram efeito ansiolítico, inibindo a aquisição da esQUIVA inibitória ($F_{2,24} = 4.825$ e $p > 0.001$).

4. DISCUSSÃO

Este estudo traz evidências adicionais quanto aos efeitos ansiolíticos de NAC, mostrando seu efeito nos testes de hipertermia induzida por estresse e esQUIVA inibitória no T-maze elevado. Como observado em outros modelos animais utilizando camundongos da linhagem CF1 (Noetzold, 2014), a administração subaguda parece diminuir a dose necessária para o efeito ansiolítico.

No teste de supressão alimentar por novidade, apenas diazepam se mostrou efetivo em reduzir a latência para ingestão de alimento em camundongos Swiss, mas não em C57BL/6. Na literatura o uso de camundongos da linhagem C57BL/6 é predominante (Wincott et al. 2014; Sahay et al. 2011; Bambico et al. 2010), mas também há dados em camundongos da linhagem Swiss (Gai et al. 2014). Não se observou atividade de NAC

agudo ou sub-agudo, em nenhum dos parâmetros analisados. A validação do teste nas linhagens e condições usadas neste estudo não parece robusta.

No teste de hipertermia induzida por estresse a primeira medição de temperatura (T1) é um agente estressor, que causa aumento da temperatura e drogas ansiolíticas são capazes de impedir esse aumento (Van der Heyden et al. 1997). NAC administrado agudamente foi capaz de impedir o aumento da temperatura nas doses de 60 e 100 mg/Kg; com administração subaguda, tanto diazepam, como NAC (10 e 60 mg/Kg) foram capazes de prevenir esse aumento. Os dados demonstram o efeito ansiolítico de NAC, num modelo validado com o controle positivo diazepam.

No T-maze elevado foi analisada a latência para o animal sair do braço fechado em três sessões consecutivas. Como os camundongos evitam lugares abertos, altos e claros, as latências para saída do braço fechado tendem a aumentar a cada uma das três sessões, já que há aprendizado e memória associados a experiência (esquiva inibitória). NAC 60 mg/Kg, assim como seu controle diazepam, foram capazes de prevenir a aquisição da esquiva inibitória, demonstrando seu efeito ansiolítico.

Os antidepressivos têm sido os fármacos de primeira escolha para tratamento de transtornos de ansiedade (Rang et al. 2012). Já foi demonstrado que NAC possui ação antidepressiva em testes comportamentais realizados em camundongos (Link et al. 2012). Foi sugerido que NAC pode diminuir a dose ativa de alguns antidepressivos, sugerindo emprego como adjuvante para aumentar a efetividade e aderência de antidepressivos (Costa-campos et al. 2013). Levando em consideração que muitas vezes os TA e depressão são comórbidos e se sobrepõem (Miller et al 2009), os dados deste trabalho apontam para uma nova vantagem do uso concomitante de NAC e antidepressivos usados para transtornos de ansiedade.

5. CONCLUSÃO

Este estudo foi capaz de demonstrar efeito ansiolítico positivo de NAC em testes comportamentais de ansiedade em camundongos. Por NAC possuir um mecanismo de ação diferente dos fármacos já utilizados na clínica médica e por não apresentar efeitos adversos importantes, sugere-se NAC como um forte candidato para tratamento de transtornos de ansiedade. Obviamente, mais estudos são necessários, tanto em

modelos animais e em análises bioquímicas, quanto em testes clínicos, para que se possa caracterizá-lo de forma mais completa.

Agradecimentos

Os autores são gratos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (A.P.H.) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (R.B. e E.E.).

6. Referências

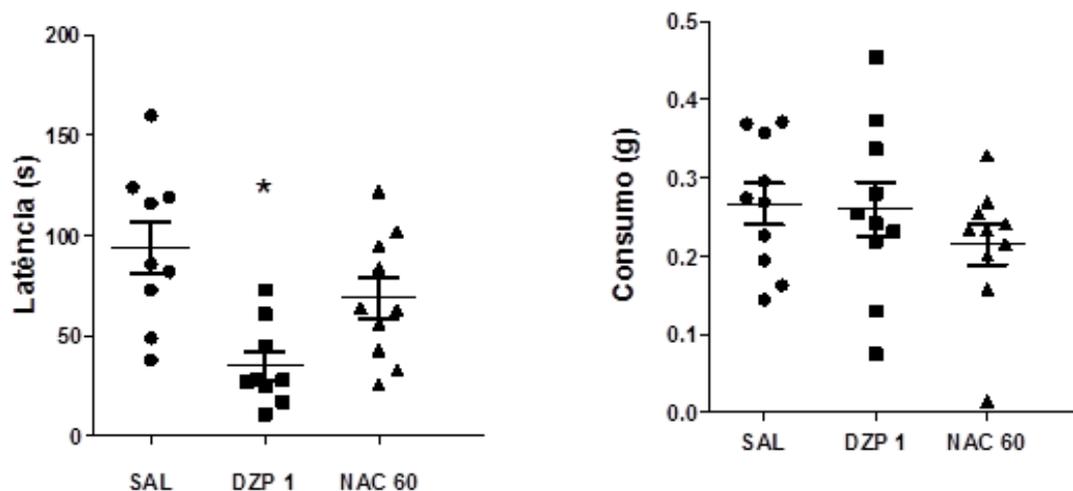
1. Baker DA, Madayag A, Kristiansen LV, Meador-Woodruff JH, Haroutunian V, Raju I. Contribution of cystine-glutamate antiporters to the psychotomimetic effects of phencyclidine. *Neuropsychopharmacology*; 33: (2008) 1760-1772.
2. Berk M, Copolov DL, Dean O, Lu K, Jeavons S, Schapkaitz I, Anderson-Hunt M, Bush AI. N-acetyl cysteine for depressive symptoms in bipolar disorder--a double-blind randomized placebo-controlled trial. *Biol Psychiatry*; 64: (2008) 468–475.
3. Berk M. The promise of N-acetylcysteine in neuropsychiatry. *Trends in Pharmacological Sciences*; 34(3): (2013) 167–177.
4. Borsini F, Lecci A, Volterra G, Meli A. A model to measure anticipatory anxiety in mice? *Psychopharmacology (Berl)*: (1989-98) 207–11
5. Costa-Campos L, Herrmann AP, Pilz LK, Michels M, Noetzold G, Elisabetsky E. Interactive effects of N-acetylcysteine and antidepressants. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*; 02.008 (44): (2013) 125–130
6. Dean O, Giorlando F, Berk M. N-acetylcysteine in psychiatry: current therapeutic evidence and potential mechanisms of action. *J Psychiatry Neurosci*; 36: (2011) 78-86.
7. Egashira N. N-Acetyl-L-Cysteine Inhibits Marble-Burying Behavior in Mice. *J Pharmacol Sci*; 119(1): (2012) 97-101.

8. Guimarães LS, Hirakata VN, Use of the Generalized Estimating Equation Model in longitudinal data analysis. *Revista HCPA*; 32(4): (2012) 503-511
9. Graeff FG, Viana MB, Tomaz C. The elevated T-maze, a new experimental model of anxiety and memory: effect of diazepam. *Braz. J. Med. Biol. Res.*; 26: (1993) 67–70.
10. Graeff FG, Netto CF, Zangrossi HJ. The elevated T-maze as an experimental model of anxiety. *Neurosci. Biobehav. Rev.*; 23: (1998) 237–246.
11. Grant JE. Addicted to hair pulling? How an alternate model of trichotillomania may improve treatment outcome. *Harv. Rev. Psychiatry*; 15: (2007) 80–85
12. Hashimoto K. The role of glutamate on the action of antidepressants. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*; 35: (2011) 1558-68.
13. Kessler RC, Demler O, Frank RG, Olsson M, Pincus HA, Walters EE, et al. Prevalence and Treatment of Mental Disorders, 1990 to 2003. *N. Engl. J. Med.* 352: (2005) 2515–2523.
14. Kessler RC. The global burden of anxiety and mood disorders: putting the European Study of the Epidemiology of Mental Disorders (ESEMeD) findings into perspective. *J. Clin. Psychiatry* 68 (Suppl. 2): (2007) 10–19.
15. Kessler RC, Ormel J, Petukhova M, McLaughlin KA, Green JG, Russo LJ. Development of lifetime comorbidity in the WHO World Mental Health (WMH) Surveys. *Arch Gen Psychiatry* Jan. 68: (2011) 90–100.
16. Linck VM, Costa-Campos L, Pilz LK, Garcia CR, Elisabetsky E. AMPA glutamate receptors mediate the antidepressant-like effects of N-acetylcysteine in the mouse tail suspension test. *Behav Pharmacol*; 23: (2012) 171–177.

17. Miller G, Chen E, Cole SW. Health psychology: developing biologically plausible models linking the social world and physical health. *Annu Rev Psychol* 60: (2009) 501–24
18. Noetzold G. Efeitos da N-acetilcisteína em modelos experimentais de ansiedade (TCC- UFRGS): (2014) 1-31
19. Pulga A., Ruzza C., Rizzi A., Guerrini R., Calo G., Anxiolytic- and panicolytic-like effects of Neuropeptide S in the mouse elevated T-maze. *European Journal of Neuroscience*, 36: (2012) 3531–3537
20. Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A, Battaglia F, Dulawa S, Weisstaub N, Lee J, Duman R, Arancio O, Belzung C, Hen R. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science*; 301: (2003) 805–809.
21. Van Der Heyden JAM., Zethof TJJ., Oliver B., Stress-induced hyperthermia in singly housed mice. *Physiology and Behavior*. 62 (3): (1996) 463-470
22. Wu K, Hanna GL, Rosenberg DR, Arnold PD. The role of glutamate signaling in the pathogenesis and treatment of obsessive-compulsive disorder. *Pharmacol Biochem Behav*; 100: (2012) 726-735.
23. Zarate CA, Singh JB, Carlson PJ, Brutsche NE, Ameli R, Luckenbaugh DA, Charney DS, Manji HK. A randomized trial of an N-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant major depression. *Arch Gen Psychiatry*; 63: (2006) 856-864

4. ANEXOS

A



B

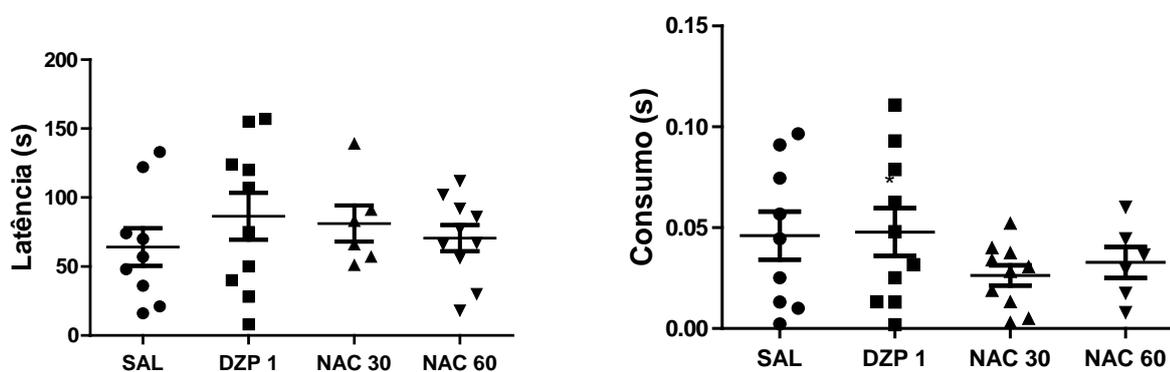
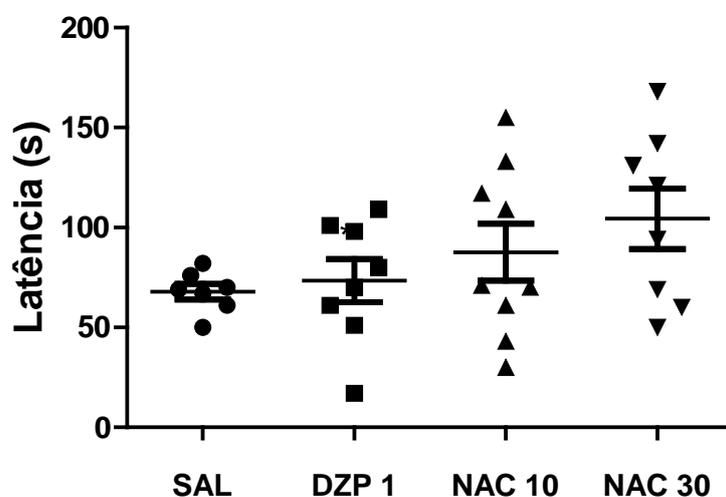


Figura 1 – Efeitos do tratamento agudo com N-acetilcisteína no teste de supressão alimentar induzida por novidade em camundongos Swiss (A) e C57BL/6 (B). Após 24 horas de privação de alimento os camundongos (n = 6-10 por grupo) foram submetidos ao teste de supressão alimentar por novidade. Salina (SAL), diazepam (DPZ) e N-acetilcisteína (NAC) 30 e 60 mg/Kg foram administradas 30 min antes do teste. Imediatamente após o teste os animais foram transferidos para sua caixa moradia e o consumo de comida foi avaliado por 5 min. Média ± erro padrão * p < 0,05 x salina.; One Way ANOVA – SNK.

A



B

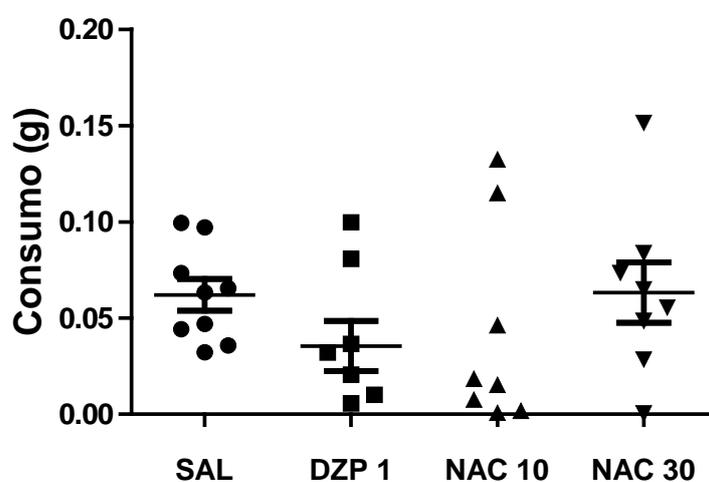


Figura 2 – Efeitos do tratamento sub-agudo com N-acetilcisteína no teste de supressão alimentar induzida por novidade em camundongos C57BL/6. (A) Latência para comer; (B) Consumo de alimento da caixa moradia. Após 24 horas de privação de alimento os camundongos (n = 6-10) foram submetidos ao teste. Salina (SAL), diazepam (DPZ) e N-acetilcisteína (NAC) 10 e 30 mg/kg foram administrados durante 4 dias, sendo a última administração 30 min antes do teste. Imediatamente após o teste o consumo de comida foi avaliado por 5 min na caixa moradia. Média ± erro padrão * p < 0,05 x salina.; One Way ANOVA – SNK.

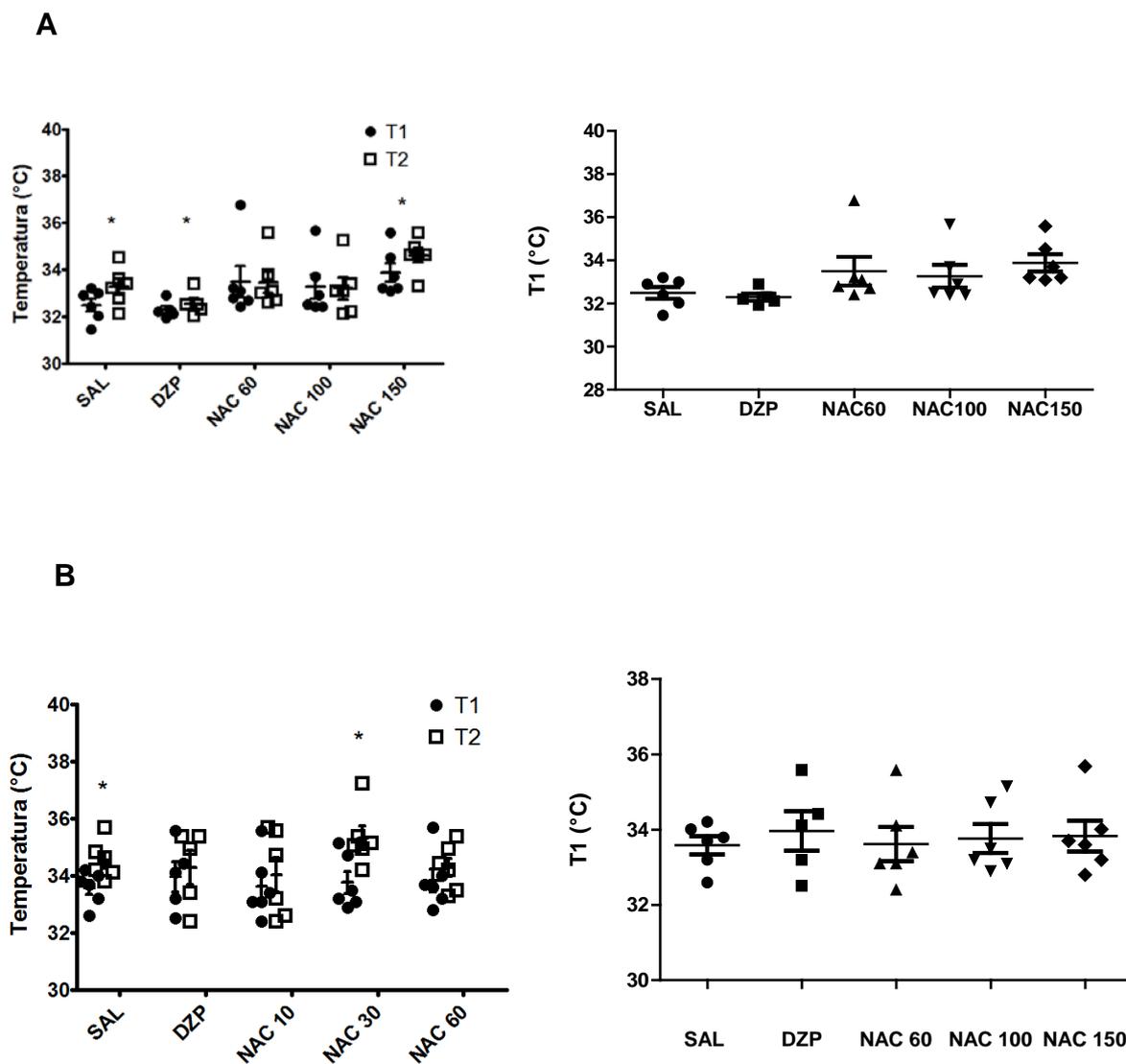


Figura 3 – Efeito de n-acetilcisteína no teste de hipertermia induzida por estresse em camundongos Swiss. SAL: salina, DZP: diazepam 2mg/Kg, NAC 10-150: N-acetilcisteína 10-150 mg/Kg. Tratamentos administrados 60 min antes do teste (agudo) (3A) ou durante 4 dias, sendo a última administração 60 min antes do teste (sub-agudo) (3B). T1 = temperatura basal; T2 = segunda medição de temperatura. Média \pm erro padrão * $p < 0,05$, Generalized estimating equation model (GEE) – Bonferroni e One Way ANOVA – SNK.

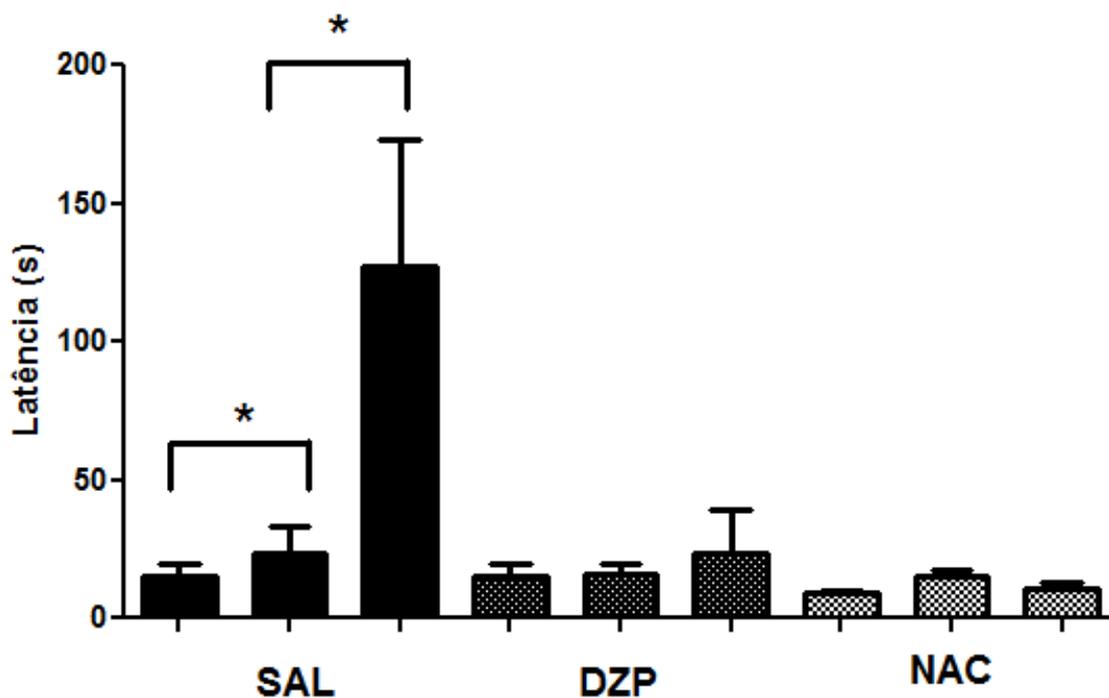


Figura 4 - Efeito de n-acetilcisteína na aquisição da esQUIVA INIBITÓRIA no teste T-maze elevado. Salina (SAL), diazepam 1 mg/Kg (DZP), n-acetilcisteína 60 mg/kg (NAC) foram administrados 30 min antes do teste. Latências para sair do braço fechado em três sessões consecutivas. Média \pm erro padrão. * $p < 0,05$, One Way ANOVA – SNK



CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 27553

Título: EFEITOS ANSIOLÍTICOS E PANICOLÍTICOS DE N-ACETILCISTEÍNA

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

ELAINE ELISABETSKY - coordenador desde 01/08/2014
ÂNGELO LUIS STAPASSOLI PIATO - pesquisador desde 01/08/2014
RADHARANI BENVENUTTI - Outra Função desde 01/08/2014
YASMINE TROJAN DOS SANTOS - Outra Função desde 01/08/2014
Ana Paula Herrmann - Aluno de Doutorado desde 01/08/2014

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo , em reunião realizada em 22/12/2014 - Sala I do Gabinete do Reitor - Prédio da Reitoria - Campus do Centro - Porto Alegre, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 680 Swiss, 680 Balb/c, 80 Ratos Wistar e 340 Peixe Zebras, de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa.

Porto Alegre, Quarta-Feira, 21 de Janeiro de 2015

CRISTIANE MATTE
Vice Coordenador da comissão de ética

Figura 5: Carta de aprovação da Comissão de Ética no uso de animais.

5. Conclusões e perspectivas

O presente estudo foi capaz de demonstrar efeito ansiolítico de NAC nos testes comportamentais de hipertermia induzida por estresse e T-maze.

Este trabalho tinha como um dos objetivos específicos avaliar o potencial panicolítico de NAC no teste de T-maze elevado. Foram realizados diversos pilotos com o intuito de validar o comportamento de escape de uma-via, ou seja, a fuga do braço aberto em três sessões consecutivas. Para que se possa avaliar esse comportamento de escape, é necessário que as três latências sejam semelhantes, não ocorrendo interferência por aprendizado. Drogas pânico-líticas seriam capazes de aumentar a latência para fuga do braço aberto nas três sessões (Graef et al 1993 e 1998). Foram realizadas inúmeras tentativas de adaptação do protocolo, incluindo mudanças de iluminação da sala de experimentação, tempo de ambientação dos animais tanto na sala como no aparato, utilização de diferentes linhagens de camundongos (Swiss e BALB/C). Apesar disso, não foi possível validar o teste. Tem sido discutido na literatura a dificuldade para validação do T-maze em camundongos e ratos (Carvalho-Netto et al. 2003), principalmente na sessão de escape e a validação desse teste tem se mostrado elusiva (Zangrossi et al 2014).

Ainda que esses dados sejam preliminares e que mais estudos devam ser realizados, o presente trabalho cumpriu seu objetivo de demonstrar o potencial ansiolítico de NAC.

Como perspectiva pretende-se realizar mais testes comportamentais em animais, visando uma melhor caracterização do efeito ansiolítico de NAC em diferentes doses e tratamentos (como tratamento sub-crônico de 15 dias e crônico de 21 dias com menores doses). Apesar das dificuldades de padronização e utilização de modelos de transtornos de pânico em animais, pretendemos avaliar os possíveis efeitos panicolíticos de NAC em diferentes doses e tratamentos. Testes bioquímicos também serão de grande importância para os estudos futuros.

Dessa forma, visa-se obter dados robustos que deem base para futuros testes clínicos, com potencial de validar e verificar o desenvolvimento de NAC como um futuro tratamento para transtornos de ansiedade.

6. Referências adicionais

1. Arakawa M. and Ito Y. N-Acetylcysteine and neurodegenerative diseases: basic and clinical pharmacology. *Cerebellum*; 6: (2007) 308–314
2. Associação Psiquiátrica Americana. DSM-IV-TR: Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2003.
3. Bambico FR, Cassano T, Dominguez-Lopez S, Katz N, Walker CD, Piomelli D and Gobbi G. Genetic Deletion of Fatty Acid Amide Hydrolase Alters Emotional Behavior and Serotonergic Transmission in the Dorsal Raphe, Prefrontal Cortex, and Hippocampus. *Neuropsychopharmacology*. 35: (2010) 2083–2100
4. Barlow DH. Unraveling the mysteries of anxiety and its disorders from the perspective of emotion theory. *Am Psychol*; 55(11): (2000) 1247–1263.
5. Bear M.F., Connors B.W, Paradiso M.A. 2007. Neurociências. Terceira edição, Artmed editora S.A. São Paulo, Brasil.
6. Berk, M. et al. The promise of N-acetylcysteine in neuropsychiatry. *Trends in Pharmacological Sciences*; 34(3): (2013) 167–177.
7. Braga JEF, Pordeus LC, Medeiros AT, Silva C, Pimenta FCF, Diniz MFFM, Almeida RN. Pathological Anxiety: Neural Bases and Advances in Psychopharmacological Approach. *Revista Brasileira de Ciências da Saúde*; 14 (2): (2010) 93-100
8. Carroll D, Phillips AC, Thomas GN, Gale CR, Deary I, Batty GD. Generalized anxiety disorder is associated with metabolic syndrome in the Vietnam experience study. *Biol Psychiatry*; (2009) 66:91–3.

9. Carvalho-Netto EF, Nunes-de-Souza RL, Use of the elevated T-maze to study anxiety in mice. *Behavioural brain research*. 148: (2004) 119-132
10. Cordioli A.V., 2011. *Psicofármacos*, quarta edição, artmed editora S.A., São Paulo, Brasil.
11. Duval ER, Javanbakht A, Liberzon A, Neural circuits in anxiety and stress disorders: a focused review. *Therapeutics and Clinical Risk Management*; 11: (2015) 115–126
12. Eaker ED, Sullivan LM, Kelly-Hayes M, D'Agostino Sr RB, Benjamin EJ. Tension and anxiety and the prediction of the 10-year incidence of coronary heart disease, atrial fibrillation, and total mortality: the Framingham Offspring Study. *Psychosom Med Oct*. 67: (2005) 692–6.
13. Egashira, N. et al. N-Acetyl-L-Cysteine Inhibits Marble-Burying Behavior in Mice. *J Pharmacol Sci*; 119(1): (2012) 97-101.
14. Ferry AT, Ongür D, An X, Price JL. Prefrontal cortical projections to the striatum in macaque monkeys: evidence for an organization related to prefrontal networks. *J Comp Neurol*; 425(3): (2000) 447–470.
15. Gai BM, Bortolatto CF, Heck SO, Stein AL, Duarte MMMF, Zeni G, Nogueira CW. An organoselenium compound improves behavioral, endocrinal and neurochemical changes induced by corticosterone in mice. *Psychopharmacology*; 231(10): (2014) 2119–2130.
16. Grant JE. Odlaug BL, Kim SW. N-acetylcysteine, a glutamate modulator, in the treatment of trichotillomania: a double-blind, placebo-controlled study. *Arch Gen Psychiatry*; 66: (2009) 756-763.
17. Hashimoto K. The role of glutamate on the action of antidepressants. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*; 35: (2011) 1558-68.

18. Herry C, Ferraguti F, Singewald N, Letzkus JJ, Ehrlich I, Lüthi A. Neuronal circuits of fear extinction. *Eur J Neurosci*. 31(4): (2010) 599–612.
19. Kau KS. Blunted cysteine–glutamate antiporter function in the nucleus accumbens promotes cocaine-induced drug seeking. *Neuroscience*; 155: (2008) 530–537
20. Kessler RC, Demler O, Frank RG, Olfson M, Pincus HA, Walters EE, et al. Prevalence and Treatment of Mental Disorders, 1990 to 2003. *N Engl J Med*; 352: (2005) 2515–2523.
21. Kessler RC. The global burden of anxiety and mood disorders: putting the European Study of the Epidemiology of Mental Disorders (ESEMeD) findings into perspective. *J. Clin. Psychiatry*; 68 (Suppl. 2): (2007) 10–19.
22. Koltunowska D, Gibula-Bruzda E, Kotlinska JH. The influence of ionotropic and metabotropic glutamate receptor ligands on anxiety-like effect of amphetamine withdrawal in rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*; 45C: (2013) 242-49.
23. Lafleur, D.L. et al. N-Acetylcysteine augmentation in serotonin reuptake inhibitor refractory obsessive–compulsive disorder. *Psychopharmacology*; 184: (2006) 254–256
24. Lang PJ, Bradley MM, Cuthbert BN. Emotion, motivation, and anxiety: brain mechanisms and psychophysiology. *Biol Psychiatry*; 44(12): (1998) 1248–1263.
25. Lee S, Kim S-J, Kwon O-B, Lee JH, Kim J-H. Inhibitory networks of the amygdala for emotional memory. *Front Neural Circuits*; 129 (7): (2013) 1-10.

26. Li C, Barker L, Ford ES, Zhang X, Strine TW, Mokdad AH. Diabetes and anxiety in US adults: findings from the 2006 Behavioral Risk Factor Surveillance System. *Diabet Med*; 25: (2008) 878–81.
27. Lushchak, V.I. Glutathione homeostasis and functions: potential targets for medical interventions. *J. Amino Acids*; 736837 (2012) 1-26
28. Marek R, Strobel C, Bredy TW, Sah P. The amygdala and medial prefrontal cortex: partners in the fear circuit. *J Physiol*; 591(Pt 10): (2013) 2381–2391.
29. Maren S. Neurobiology of Pavlovian fear conditioning. *Annu Rev Neurosci.*; 24(1): (2001) 897–931
30. Odlaug, B.L. and Grant, J.E. N-Acetyl cysteine in the treatment of grooming disorders. *J. Clin. Psychopharmacol.* 27; (2007) 227–229
31. Pessoa, L. Emotion and cognition and the amygdala: from "what is it?" to "what's to be done?". *Neuropsychologia*; 48(12): (2010) 3416-3429.
32. Pollack MH, Otto MW, Roy-Byrne PP, Coplan JD, Rothbaum BO, Simon MN, Gorman JM. Novel treatment approaches for refractory anxiety disorders. *Depress Anxiety.* 25(6): (2007) 467-76
33. Rang HP., Dale MM., Ritter J.M., Flower R.J., Henderson G., 2012. *Farmacologia*, sétima edição, Elsevier Editora, Rio de Janeiro, Brasil.
34. Sahay A., Kimberly NS. , Alexis SH, Colin MO, Mazen AK, Nisha SB, André AF, Dranovsky A, Henn R. Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to improve pattern separation. 472: (2011); 466–470

35. Shankman SA, Gorka SM, Nelson BD, Fitzgerald DA, Phan KL, O'Daly O. Anterior insula responds to temporally unpredictable aversiveness: an fMRI study. *Neuroreport.*; 25(8): (2014) 596–600.
36. Shin LM, Liberzon I. The neurocircuitry of fear, stress, and anxiety disorders. *Neuropsychopharmacology*; 35(1): (2010) 169–191
37. Spitzer C, Barnow S, Völzke H, John U, Freyberger HJ, Grabe HJ. Trauma, posttraumatic stress disorder, and physical illness: findings from the general population. *Psychosom Med Nov*; 71: (2009) 1012–7.
38. Stahl S.M. 2000. *Psicofarmacologia*. Segunda edição, Editora Médica e Científica Ltda., Rio de Janeiro, Brasil.
39. Stein MB, Simmons AN, Feinstein JS, Paulus MP. Increased amygdala and insula activation during emotion processing in anxiety-prone subjects. *Am J Psychiatry*; 164(2): (2007) 318–327.
40. Whalen PJ, Bush G, McNally RJ, et al. The emotional counting Stroop paradigm: a functional magnetic resonance imaging probe of the anterior cingulate affective division. *Biol Psychiatry.*; 44(12): (1998) 1219–1228
41. Wincott CM, Abera S, Vunck SA, Tirko N, Choi Y, Titcombe RF, Antoine SO, Tukey DS, DeVito LM, Hofmann F, Hoeffler CA, Ziff EB. cGMP-dependent protein kinase type II knockout mice exhibit working memory impairments, decreased repetitive behavior, and increased anxiety-like traits. *Neurobiology Of Learning And Memory*. 114:32-9: (2014) 32–39
42. Zangrossi HJ., Graeff FG., Serotonin in anxiety and panic: Contributions os the elevated T-maze. *Neuroscience and biobehavioral reviews*. (2014) 1-10

43. Zarate CA, Singh JB, Carlson PJ, Brutsche NE, Ameli R, Luckenbaugh DA, Charney DS, Manji HK. A randomized trial of an N-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant major depression. *Arch Gen Psychiatry*; 63: (2006) 856-864