

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**EFEITOS DA N-ACETILCISTEÍNA NAS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS
INDUZIDAS PELA ALTERAÇÃO DO FOTOPERÍODO AMBIENTAL**

Daiany Barbosa da Silva

Monografia apresentada à Coordenação
do Curso de Ciências Biológicas, da
Universidade Federal de Uberlândia, para
a obtenção do grau de Bacharel em
Ciências Biológicas

Uberlândia - MG

Dezembro – 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE BIOLOGIA

CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**EFEITOS DA N-ACETILCISTEÍNA NAS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS
INDUZIDAS PELA ALTERAÇÃO DO FOTOPERÍODO AMBIENTAL.**

Daiany Barbosa da Silva

Orientador(a): Profa. Dra. Erika Renata Barbosa Neiro

Projeto de Pesquisa apresentado como
requisito para a aprovação na disciplina
Iniciação à Pesquisa do Curso de Ciências
Biológicas - Bacharelado da Universidade
Federal de Uberlândia.

Uberlândia - MG

Dezembro – 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**EFEITOS DA N-ACETILCISTEÍNA NAS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS
INDUZIDAS PELA ALTERAÇÃO DO FOTOPERÍODO AMBIENTAL.**

Daiany Barbosa da Silva

Orientador(a): Profa. Dra. Erika Renata Barbosa Neiro

ICBIM

Homologado pela coordenação do Curso
de Ciências Biológicas em __/__/__

Prof. Dr. Oswaldo Marçal Júnior

Uberlândia - MG

Dezembro – 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**EFEITOS DA N-ACETILCISTEÍNA NAS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS
INDUZIDAS PELA ALTERAÇÃO DO FOTOPERÍODO AMBIENTAL.**

Daiany Barbosa da Silva

Aprovado pela Banca Examinadora em: 09 / 12 / 2016 Nota: 93

Erika Renata Barbosa Neiro

Uberlândia, 09 de dezembro de 2016

AGRADECIMENTOS

Agradeço todos os envolvidos, direta ou indiretamente, na realização deste trabalho. À minha orientadora, Erika Neiro, e a todos os meus colegas em nosso grupo de pesquisas. Aos meus familiares, pelo apoio incondicional em todos os momentos. Em especial aos meus pais por serem os meus exemplos na vida. À minha amiga e companheira de curso, Priscilla, que esteve presente nos melhores e piores momentos dentro e fora da UFU. Aos membros da minha banca, Vanessa Spini e Alexandre Vieira, pelas contribuições ao longo do trabalho e que foram fundamentais para a conclusão do mesmo. Ao meu melhor amigo e noivo, Ludwig, por ter me ajudado durante todo o projeto, e ter sido essencial para realização do mesmo. À UFU por ter me dado uma oportunidade de grande crescimento dentro dos anos que aqui estudei. Ao CNPq pela Iniciação Científica por meio do Programa Institucional Voluntário de Iniciação Científica - PIVIC. Agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para o término desta importante etapa da minha vida.

RESUMO

A Desordem Afetiva Sazonal é caracterizada por episódios de depressão durante o inverno com remissão no verão. No presente trabalho foi proposto o estudo dos efeitos da N-Acetilcisteína (N-Ac) na reversão de alterações comportamentais frente a mudanças no fotoperíodo, uma vez que a substância tem mostrado um potencial efeito antidepressivo. Sendo assim, ratos Wistar foram expostos a um regime diário de 5 horas de luz e 19 de escuro (grupo 5C/19E) ou mantidos em ciclo de iluminação de 12 horas de luz e 12 de escuro (grupo 12C/12E) por 6 semanas e posteriormente passaram a receber injeções intraperitoneais diárias de N-Ac ou de tampão PBS por 3 semanas. Após as injeções, os animais tiveram testados os comportamentos relacionados à ansiedade e à depressão. A alteração no ciclo mostrou resultados significativos quanto a alteração de parâmetros comportamentais, porém, o tratamento com N-Ac não foi capaz de reverter esses comportamentos. Pode-se afirmar que o modelo experimental usado será importante para validar pesquisas futuras quanto a alteração de ciclos e nas investigações do papel da N-Ac para doenças neuropsiquiátricas.

Palavras-chave: Desordem Afetiva Sazonal, N-acetilcisteína, Testes comportamentais.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	1
2. OBJETIVOS	7
2.1 Gerais	7
2.2 Especificos	7
3. METODOLOGIA	8
3.1. Animais	8
3.2 Delineamento experimental	8
3.3 Farmáco	9
3.4 Controle da luminosidade ambiental	10
3.5 Injeções intraperitoneais diárias	10
3.6 Testes comportamentais	10
3.6.1 Teste de Nado Forçado	11
3.6.2 Teste de Campo Aberto	11
3.6.3 Teste de Consumo de Sacarose	12
3.7 Destino dos animais	12
3.8 Análise dos dados e estatística	13
4. RESULTADOS	14
4.1 Teste de Nado Forçado	14
4.2 Teste de Campo Aberto	15
4.3 Teste de Consumo de Sacarose	17
5. DISCUSSÃO	22
6. CONCLUSÃO	27
7. REFERÊNCIAS	28
ANEXO	41

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Os organismos em geral possuem mecanismos de sincronização fisiológicas (ciclos biológicos), que modulam ritmicamente o funcionamento de células, tecidos e órgãos. Na natureza pode-se observar ciclos biológicos com durações diversas, mas os mais evidentes entre eles são os ciclos com duração de aproximadamente 24 horas, conhecidos como ritmos circadianos (MENAKER, 1969). Os ritmos biológicos possuem um caráter endógeno que é geneticamente determinado, e as estruturas geradoras destes ritmos são denominadas de relógios biológicos ou osciladores circadianos (PITTENDRIGH, 1981). Em uma situação em que os ciclos ambientais são eliminados ou reduzidos, o ritmo biológico se mantém, evidenciando que fatores exógenos não são necessários para a geração da ritmicidade (BUNNING, 1967). Para que ocorra a regulação entre os ritmos externos ambientais e os ritmos biológicos deve ocorrer uma sincronização, e a luz é tida como um dos maiores sincronizadores (*zeitgebers*) para a harmonização interna com o ciclo claro-escuro externo (DUFFY et al., 1996; DANILENKO et al., 2000; HONMA, 1995).

A glândula pineal, também denominada de órgão pineal, participa da organização temporal de ritmos biológicos, atuando como mediadora entre o ciclo de claro-escuro ambiental e processos regulatórios fisiológicos, incluindo regulação da reprodução, do sistema cardiovascular e do sistema imunológico, entre outros (CIPOLLA-NETO & AFECHE, 1992). A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) é um hormônio elaborado pela glândula pineal e é o principal produto de seu sistema metabólico. Este hormônio responde à falta de luz produzindo uma maior quantidade de melatonina, que induz o sono em indivíduos da espécie humana (MILLER, 2005). A quantidade de melatonina liberada pela glândula pineal varia com o ciclo de iluminação ambiental (MOORE et al., 1974). Estudos recentes indicam que a síntese de melatonina na glândula pineal é regulada pela atividade de uma enzima, a serotonina N-acetil-transferase, que converte serotonina em N-acetilserotonina, que

também possui um perfil de atividade rítmico sendo influenciado pelo padrão da luz ambiental. A atividade da serotonina N-acetiltransferase é baixa durante o período de luz e aumenta durante o período de escuro chegando a níveis trinta vezes maiores á noite (MOORE et al., 1974).

Como a luz é o principal fator ambiental para regulação dos ritmos biológicos, perturbações do fotoperíodo podem levar a sintomas temporários e efeitos de longo prazo nos organismos levando até a desordens psiquiátricas. Muitos pacientes atingidos por desordens de humor também enfrentaram mudanças nos ritmos endógenos e mudanças no ciclo de sono-vigília (WIRZ- JUSTICE, 2007).

Entre as doenças associadas a mudanças no fotoperíodo está a Desordem Afetiva Sazonal (SAD) uma desordem depressiva recorrente, na qual episódios de depressão ocorrem no outono e inverno seguido por grandes remissões na primavera e verão (ROSENTHAL et al., 1984). SAD é um subtipo recorrente de Depressão Maior (DM) com um padrão sazonal. Entre os diferentes subtipos de DM, a SAD é a desordem que possui a maior frequência de recorrência, sendo que 40% dos casos progredem para episódios de Depressão Maior Não Sazonal (FAEDDA et al., 1993; ROSENTHAL et al., 1984; SCHWARTZ et al., 1996). A prevalência anual da SAD é normalmente de 1 a 6% em países mais distantes da Linha do Equador, sendo que as maiores percentagens ocorrem em latitudes extremas (MAGNUSSON et al., 2000).

SAD é uma desordem que possui diagnósticos variados, e o critério utilizado para identificá-la inclui ter sintomas depressivos que se iniciam e terminam durante estações específicas todos os anos, com duração de pelo menos dois anos e ter mais períodos com depressão do que períodos sem ao longo da vida (MANUAL DE DESORDENS MENTAIS – DSM-5, 2013). Os indivíduos com essa desordem possuem dificuldades na regulação da serotonina, um neurotransmissor que acredita-se ser responsável por estados de humor

(McMAHON et al., 2014). Estudos mostram que pessoas com esse transtorno possuem mais proteínas que auxiliam o transporte de serotonina (SERT) nos meses de inverno do que nos meses de verão (McMAHON et al., 2014). O SERT transporta a serotonina até o neurônio pré-sináptico, portanto níveis altos desse transportador levam a níveis baixos da atividade da serotonina, podendo levar a doenças neuropsiquiátricas. Ao longo do verão a maior incidência de luz solar mantém os níveis de SERT naturalmente baixos, com a redução da incidência no outono ocorre a diminuição na atividade da serotonina, pelo aumento dos níveis de SERT (McMAHON et al., 2014).

A Terapia Luminosa é tida como um dos tratamentos mais efetivos para SAD, reforçando assim o suporte à associação entre humor e luz (ROSENTHAL, et al., 1984; TERMAN et al., 2005; HINTON, 1962; VOGEL et al., 1973; VON ZERSSEEN et al., 1985).

Considerando a importância dos mecanismos circadianos em distúrbios de humor e ansiedade, estudos recentes sugerem que roedores de hábitos diurnos podem ser modelos animais eficientes para o estudo dessas doenças (SMALL et al., 2005; EINAT et al., 2006; ASHKENAZY et al., 2008; FLAISHER-GRINBERG et al., 2008; CUESTA et al., 2009). Trabalhos utilizando o rato da areia diurno *Psammomys obesus* como modelo animal para a exploração das mudanças afetivas relacionadas ao fotoperíodo mostraram que roedores previamente expostos por três semanas ou mais a um regime de luz com cinco horas de claro e dezenove horas de escuro apresentavam comportamentos do tipo ansiosos e depressivos (EINAT et al., 2006; ASHKENAZY et al., 2008).

Baseados em dados da literatura, acredita-se que uma das substâncias que poderiam possuir a capacidade de reverter essas distúrbios de humor seria a N-Acetilcisteína (N-Ac). A N-acetilcisteína, (R)-2acetamida-3-ácido mercaptoetanóico é derivada do aminoácido L-cisteína e vem sendo utilizada por mais de 30 anos como um antídoto no tratamento da overdose de paracetamol, como um agente mucolítico para Doença Pulmonar Obstrutiva

Crônica (DPOC) e como agente terapêutico no gerenciamento do HIV (DODD et al., 2008). Por se tratar de um agente mucolítico, que atua reduzindo a viscosidade de secreção do muco, está presente no comércio nas mais diversas formas como xaropes e outros (CAPO, 2012).

Evidências recentes sugerem que a N-Ac pode ter efeitos terapêuticos no tratamento de múltiplas desordens neuropsiquiátricas, incluindo depressão, autismo, esquizofrenia, desordem bipolar, Alzheimer e Parkinson (DEAN et al., 2011).

Um dos prováveis mecanismos de atuação da N-Ac, seria por meio de seu poder antioxidante. Esse efeito pode ser visto em diversos experimentos com modelos de infecção e câncer *in vitro* e *in vivo* (AMINI et al., 2014; TRAN et al., 2010; LIMA AIRES, et al., 2012; MOON et al., 2016). Nessas configurações a N-Ac atua como um pró-fármaco para a L-cisteína, que é o precursor do antioxidante biológico glutationa (GSH). Portanto a suplementação com a N-acetilcisteína mostra resultados na preservação dos níveis intracelulares de GSH (MILLEA, 2009). Este tripeptídeo é encontrado intracelularmente em altas concentrações, essencialmente em todos os organismos aeróbicos (JOSEPH et al., 1997). A glutationa é extremamente importante na desintoxicação do organismo a uma grande variedade de substâncias tóxicas, incluindo a biotransformação e eliminação de xenobióticos (produtos químicos estranhos aos sistemas biológicos), compostos de peróxido, e outras moléculas que geram radicais livres. Dessa forma exerce um efeito protetor profundo sobre células, incluindo neurônios (MILLEA, 2009; FERREIRA et al., 2008; LINCK et al., 2012.) Além disso, o GSH possui um papel central na defesa das células contra o estresse oxidativo

Terapias com antioxidantes podem ser eficientes no tratamento de doenças neurodegenerativas, já que estudos tem mostrado que o estresse oxidativo desempenha papéis importantes em diversas doenças e pode ser um mecanismo em comum a várias desordens psiquiátricas. A produção excessiva de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) gera uma

resposta inflamatória e aumenta a liberação de citocinas pró-inflamatórias e o encéfalo é mais vulnerável aos efeitos prejudiciais das EROs devido à sua elevada taxa metabólica e baixos níveis de antioxidantes, o que poderia explicar o motivo do estresse oxidativo ser uma característica central na maioria das doenças neurodegenerativas (AL-SAMHARI et al., 2015).

Assim como os antidepressivos tricíclicos, os antipsicóticos e o lítio têm elucidado o papel das monoaminas na depressão, da dopamina na esquizofrenia e sistemas de segundos mensageiros nas desordens bipolares, a N-Ac surge como uma oportunidade de nova terapia para o tratamento de doenças que afetam os comportamentos, possivelmente por meio da modulação dos sistemas de neurotransmissores como glutamato e dopamina (OLIVE et al., 2012).

A N-Ac impacta múltiplas vias implicadas em uma variedade de desordens neurodegenerativas. Na doença de Parkinson, por exemplo, são reportadas alterações dos eventos oxidativos do metabolismo da dopamina, disfunção mitocondrial e fosforilação alterada, mecanismos potencialmente alvos da ação da N-Ac (MARTINEZ-BANACLOCHA, 1999).

A dopamina é historicamente relacionada com a expressão de doenças como Parkinson e Esquizofrenia e a habilidade da N-Ac em modular sua liberação é notável (BAKER et al., 2002). Evidências pré-clínicas em relação a modelos da Doença de Parkinson e da Doença de Alzheimer (DA), sugerem os potenciais efeitos benéficos da N-Ac. Algumas investigações clínicas demonstram que pacientes com DA tratados com 50mg/Kg/dia de N-Ac por 6 meses mostraram melhora significativa no Teste de Fluência Verbal (“Letter Fluency Task”) e no teste de Escala de Memória Wechsler (“Wechsler Memory Scale Immediate Number Recall”) (ADAIR et al., 2001). Em indivíduos tratados durante 1 ano com uma formulação vitamino/nutracêutica (N-Ac, ácido fólico, vitamina B6, α -tocoferol, S-

adenosil metionina e acetil-L-carnitina), apresentaram melhora quando submetidos à aplicação da Escala de Avaliação Clínica de Demência (“Dementia Rating Scale”) e melhora cognitiva (CHAN et al., 2008).

Administrações de N-Ac tem mostrado potencial efeito em promover neurogênese diretamente, aumentando as proteínas neuroprotetoras como o Fator Neurotrópico Derivado do Cérebro (BDNF), mas também indiretamente reduzindo apoptose celular através de um aumento do número de proteínas anti-apoptose. Além disso, deprime as respostas inflamatórias por diminuir a produção de citocinas assim como do fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e de interleucina-6 (IL-6) (BERK et al., 2013).

Tendo em vista que Desordens comportamentais afetam mais de 30 milhões de pessoas pelo mundo e vem tornando-se um grande problema de saúde pública, sendo os mecanismos neurobiológicos dessas desordens ainda pouco elucidados (ZHOU et al., 2013), e que a N-Ac mostra resultados terapêuticos no tratamento de diversas desordens neuropsiquiátricas, sua utilização na reversão de transtornos comportamentais ligados a ansiedade e depressão torna-se um importante alvo de investigações.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAIS

- Avaliar os efeitos da N-acetilcisteína na expressão de comportamentos ligados á ansiedade e depressão em animais expostos a um regime de fotoperíodo alterado.

2.2 ESPECÍFICOS

- Investigar as alterações da atividade locomotora e ansiedade no teste de Campo Aberto em animais submetidos a alteração do ciclo claro/escuro e tratados com N-Ac.
- Avaliar os comportamentos relacionados à depressão nos Testes de Nado Forçado e Consumo de Sacarose em animais submetidos a alteração do ciclo de luz e tratados com N-Ac.

3. METODOLOGIA

3.1 ANIMAIS

Ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), adultos, pesando em média 250 gramas foram mantidos no localatário de animais da área de Ciências Fisiológicas do Instituto de Ciências Biomédicas da UFU e submetidos a um regime especial de iluminação suporte para a condução dos experimentos propostos. As gaiolas com os animais foram mantidas em gabinetes (Insight Ltda, Ribeirão Preto-SP) com ciclo de iluminação controlado e fluxo de ar constante. Esses gabinetes foram alocados em salas refrigeradas (22 ± 2 ° C). Com objetivo de minimizar o uso de animais, o tamanho amostral (N) foi estimado entre 8-10 animais por grupo experimental.

3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Após atingirem uma média de peso de 250g, os animais foram divididos em dois grandes grupos: animais que foram mantidos em iluminação de 12 horas de luz e 12 horas de escuro e animais mantidos no ciclo de iluminação com 5 horas de claro e 19 horas de escuro. Cada grande grupo foi dividido em animais que receberam injeções intraperitoneais diárias de N-Ac e animais que receberam injeções intraperitoneais de veículo PBS, formando assim quatro grupos: 5C/19E (Grupo de animais em ciclo de 5 horas de claro e 19 horas de escuro que recebeu injeções intraperitoneais de N-Ac), N-Ac 12C/12E (Grupo de animais em ciclo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro que recebeu injeções intraperitoneais de N-Ac), PBS 5C/19E (Grupo de animais em ciclo de 5 horas de claro e 19 horas de escuro que recebeu injeções intraperitoneais de PBS) e PBS 12C/12E (Grupo de animais em ciclo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro que recebeu injeções intraperitoneais de PBS).

Tabela 1. Grupo de animais

N-Ac 5C/19E	Grupo de animais em ciclo de 5 horas de claro e 19 horas de escuro que recebeu injeções intraperitoneais de N-Ac.
N-Ac 12C/12E	Grupo de animais em ciclo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro que recebeu injeções intraperitoneais de N-Ac.
PBS 5C/19E	Grupo de animais em ciclo de 5 horas de claro e 19 horas de escuro que recebeu injeções intraperitoneais de PBS.
PBS 12C/12E	Grupo de animais em ciclo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro que recebeu injeções intraperitoneais de PBS.

3.3 FÁRMACO

N-acetilcisteína é um derivado de cisteína com um grupo acetilo ligado ao seu átomo de nitrogênio e pode ser oxidado por uma grande variedade de radicais e serve também como um nucleófilo (par de elétron doador). De fato, é um antídoto seguro para a deficiência de glutatona em uma ampla gama de distúrbios metabólicos, doenças pulmonares, neurotoxicidade, hepatotoxicidade, neurotoxicidade, entre outros (DHOUIB et al., 2016).

Para o preparo da solução a N-Ac foi dissolvido em PBS com concentração de 60 mg de N-Ac para cada 1ml de PBS. A Solução foi injetada por meio de injeção intraperitoneal com concentração de 1mL de solução para cada kg do animal. A concentração final é de 60 mg/kg. É de grande importância que o pH seja ajustado para 7,4 com NaOH e em quantidade suficiente para no máximo 7 dias. Para que a concentração esteja sempre atualizada de acordo com o aumento de massa, os animais foram pesados durante todo o processo a cada dois dias. A solução foi mantida em geladeira entre os usos.

O PBS foi aplicado nos animais do grupo controle por meio de injeção intraperitoneal. O PBS 1X preparado foi mantido em geladeira entre os usos. Todas as soluções foram retiradas previamente da geladeira para que estivessem em temperatura ambiente durante as aplicações.

3.4 CONTROLE DA LUMINOSIDADE AMBIENTAL

Após três semanas de aclimatização às condições básicas do biotério, os animais foram divididos em um grupo com o fotoperíodo normal (12 h claro/12 h escuro, luzes ligadas às 7h e apagadas 19h da noite) e fotoperíodo alterado (5 h claro/19 h escuro, luzes ligadas às 13:00 da tarde e apagadas 18:00 da noite), permanecendo nesse regime de iluminação durante 6 semanas. Esse protocolo foi criado baseado nos experimentos realizados por ASHKENAZY et al. (2009). Os animais foram mantidos nessas condições durante todo o tempo de experimentação.

3.5 INJEÇÕES INTRAPERITONEAIS DIARIAS

Esse procedimento consiste em duas aplicações intraperitoneais diárias de N-Ac ou PBS, com intervalo de 4 horas entre elas. O intervalo é necessário para que a concentração de N-Ac esteja sempre alta nos animais. As aplicações tiveram duração de três semanas.

3.6 TESTES COMPORTAMENTAIS

Para avaliar os efeitos das aplicações diárias de N-Ac na reversão de comportamentos do tipo depressivos e ansiosos, três testes variados foram utilizados, sendo estes o Teste de Nado Forçado, Teste de Campo Aberto e o Teste de Consumo de Sacarose. Todos os testes comportamentais foram realizados durante o período de claro de ambos os grupos. Os experimentos se iniciaram pelo menos 1 hora depois das luzes se acenderem e terminaram pelo menos 1 hora antes das luzes se apagarem para o grupo 5C/19E. Todos os testes foram gravados com a utilização de câmera de vídeo.

3.6.1 TESTE DE NADO FORÇADO

O Teste de Nado Forçado (TNF) é um dos testes mais frequentemente usados como modelo para demonstrar efeitos depressogênicos e antidepressivos de manipulações e tratamentos (MARTIJENA et al., 1996; CRYAN et al., 2005).

O TNF envolve duas fases, um pré-teste e um teste. Ambos devem ser realizados em um recipiente cilíndrico de 33 cm de diâmetro com coluna de água de 40 cm. A temperatura da água deve estar entre 25 e 27 °C e limpa antes de cada animal.

Para o pré-teste, cada animal foi colocado no recipiente com água por 15 minutos. Em 24 horas depois, os animais foram colocados na água novamente e filmados durante 5 minutos. Nesse teste foram observados os comportamentos de imobilidade, nado e escalada. Imobilidade foi considerada como quando o animal boia sem movimentos, além apenas dos necessários para conseguir manter a cabeça fora da água. O comportamento de Natação foi considerado como quando o animal executa movimentos horizontais além dos que são apenas necessários para boiar. Escalada foi definido como quando o animal toca as paredes do recipiente com as patas dianteiras tentando escala-las (PORSOLT et al., 1978).

3.6.2 TESTE DE CAMPO ABERTO

O Teste de Campo Aberto (TCA) é muito utilizado para se avaliar comportamentos relacionados à ansiedade. Para essa avaliação é utilizado um aparato de madeira circular com base de 90 cm de diâmetro circundado por uma parede de 60 cm de altura cuja área é dividida em quadrantes periféricos (adjacentes à parede) e centrais. Os animais foram colocados no centro do aparato, e foi avaliado a atividade locomotora (número de quadrantes percorridos), o número de comportamentos de levantar (elevação das patas dianteiras com exploração do ambiente) e o tempo gasto tanto no centro quanto na periferia do aparelho. O aparato foi

limpo com uma solução de álcool 20% a cada animal testado. Os testes foram gravados e avaliados por 5 minutos.

3.6.3 TESTE CONSUMO DE SACAROSE

O Teste de Consumo de Sacarose (TCS) teve duração de quatro dias, sendo que no primeiro dia os animais foram individualizados em gaiolas pequenas (30X19X13 cm) com tampas altas e receberam no bebedouro solução de sacarose 2% (em água filtrada) durante 24 horas, sem oferta de água pura simultaneamente. No segundo dia a solução de sacarose foi retirada e o animal permaneceu isolado ingerindo somente água pura. No terceiro dia foram feitas as análises do consumo de sacarose 2% pela exposição a dois bebedouros simultaneamente para o animal, um com sacarose e outro com água pura, durante 90 minutos, posteriormente os bebedouros foram trocados de lugar e tiveram o consumo avaliado por mais 90 minutos. Os bebedouros foram mantidos nas gaiolas por mais 21 horas. No quarto dia, quando se completar 24 horas da primeira apresentação de sacarose 2% (90min+90min+21horas), os bebedouros foram retirados e pesados. Os animais tiveram ração disponível em suas gaiolas. A quantificação do consumo das soluções foi realizada pesando-se os bebedouros antes e após cada exposição aos animais.

3.7 DESTINO DOS ANIMAIS

Após os testes comportamentais os animais foram direcionados para verificação de parâmetros cardiovasculares sob a responsabilidade de outro grupo de pesquisa colaborador do trabalho, sendo que ao final dos experimentos ocorreu a indução da morte dos animais por aprofundamento da anestesia utilizando-se tiopental sódico (50 mg/kg, i.p.). Após verificação da ausência de reflexos (movimentos dos membros após pressão na pata ou cauda) foi realizado o deslocamento cervical para certificar o não retorno da anestesia pelo animal.

3.8 ANÁLISE DOS DADOS E ESTATÍSTICA

Todos os testes comportamentais foram analisados e submetidos a testes estatísticos através do programa STATISTICA 7. Os dados serão expressos como a média \pm EPM e analisados por ANOVA Bifatorial, seguida do teste de Duncan para comparações múltiplas. O nível de significância assumido será de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Teste de Nado forçado

A análise da figura 1 mostra que a alteração do fotoperíodo foi eficiente para provocar um maior tempo de imobilidade dos animais sob o ciclo 5C/19E comparados aos animais sob o ciclo 12C/12E. Em relação as aplicações diárias de N-Ac não houve diferenças significativas quanto a redução da imobilidade esperada para os animais submetidos ao tratamento, sendo que os animais que receberam N-Ac quando comparados aos animais tratados com PBS apresentaram resultados próximos de imobilidade, portanto a N-Ac não reverteu os comportamentos do tipo depressivos no Teste de Nado Forçado. O estudo da interação ciclo-tratamento $F_{(1,43)}=1,12$, $p=0,30$ mostrou que as injeções de N-Ac não alteraram os efeitos da mudança de ciclo quanto a imobilidade.

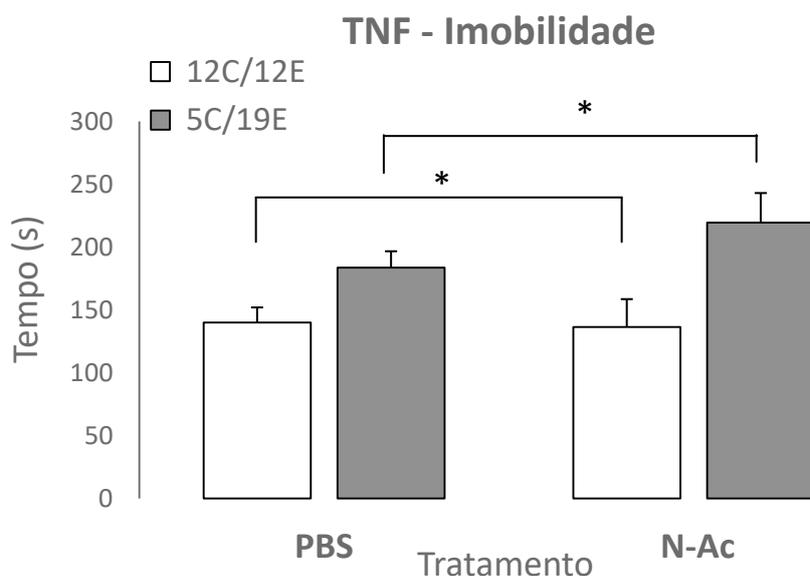


Figura 1: Tempo de imobilidade (segundos) no Teste de Nado Forçado em relação aos grupos estudados. As colunas representam as Médias \pm EPM. N = 8-10 animais por grupo; $p < 0,05$. *Diferença significativa entre animais do ciclo 5C/19E e animais 12C/12E. A ANOVA bifatorial seguida de comparações múltiplas de Duncan mostrou que o **Fator ciclo claro/escuro**: $F_{(1,43)}=11,55$, $p < 0,01$; **Fator tratamento**: $F_{(1,43)}=0,74$, $p=0,39$; **Interação ciclo e tratamento**: $F_{(1,43)}=1,12$, $p=0,30$.

A figura 2 representa o tempo gasto pelos animais em comportamentos como Natação e Escalada. Quanto ao parâmetro Natação houve diferença significativa quanto o fato ciclo claro/escuro entre os animais dos grupos 5C/19E e os controles 12C/12E, não havendo alterações com o aumento da Natação pelos animais tratados com N-Ac. Em relação a Escalada não houve diferenças significativas entre os grupos.

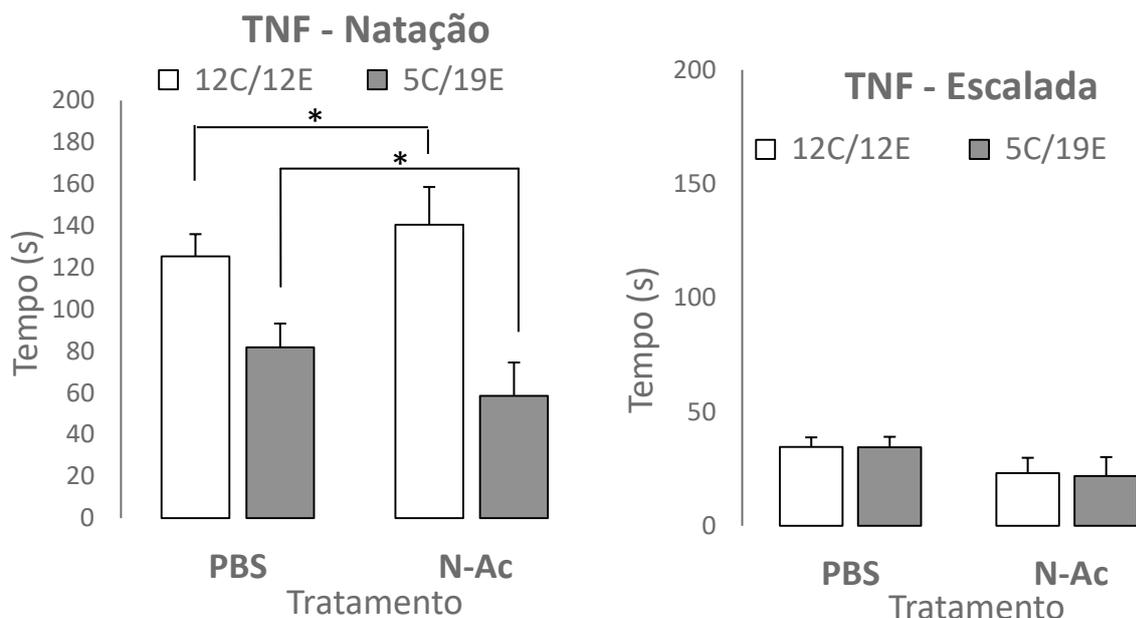


Figura 2: Tempo de Natação e Tempo de Escalada (em segundos) no Teste de Nado Forçado em relação aos grupos estudados. As colunas representam as Médias \pm EPM. N = 8-10 animais por grupo; $p < 0,05$. *Diferença significativa entre animais do ciclo 5C/19E e animais 12C/12E. A ANOVA bifatorial seguida de comparações múltiplas de Duncan em relação a Natação mostrou que o **Fator ciclo claro/escuro**: $F_{(1,43)}=18,97$, $p < 0,001$; **Fator tratamento**: $F_{(1,43)}=0,08$, $p=0,78$; **Interação ciclo e tratamento**: $F_{(1,43)} = 1,77$, $p=0,19$. Quanto a Escalada o **Fator ciclo claro/escuro**: $F_{(1,43)}=3,74$, $p=0,06$; **Fator tratamento**: $F_{(1,43)}=0,08$, $p=0,78$; **Interação ciclo e tratamento**: $F_{(1,43)} = 0,01$, $p=0,93$.

4.1 Campo aberto

A Figuras 3 mostra os resultados comportamentais nos animais no Teste de Campo Aberto em relação a locomoção. A análise estatística demonstra que existe diferença significativa entre os grupos 5C/19E e 12C/12E quanto a Locomoção Central, Locomoção

Periférica e Locomoção Total, sendo que os animais sob o regime de iluminação 5C/19E apresentam menor locomoção nos quadrantes estudados e também menor expressão do Comportamento de Levantar. Quanto ao tratamento com N-Ac este não foi capaz de reverter os parâmetros comportamentais no Campo Aberto, uma vez a análise da interação ciclo/tratamento dos diferentes parâmetros de locomoção e do comportamento de levantar não tiveram $p > 0,05$.

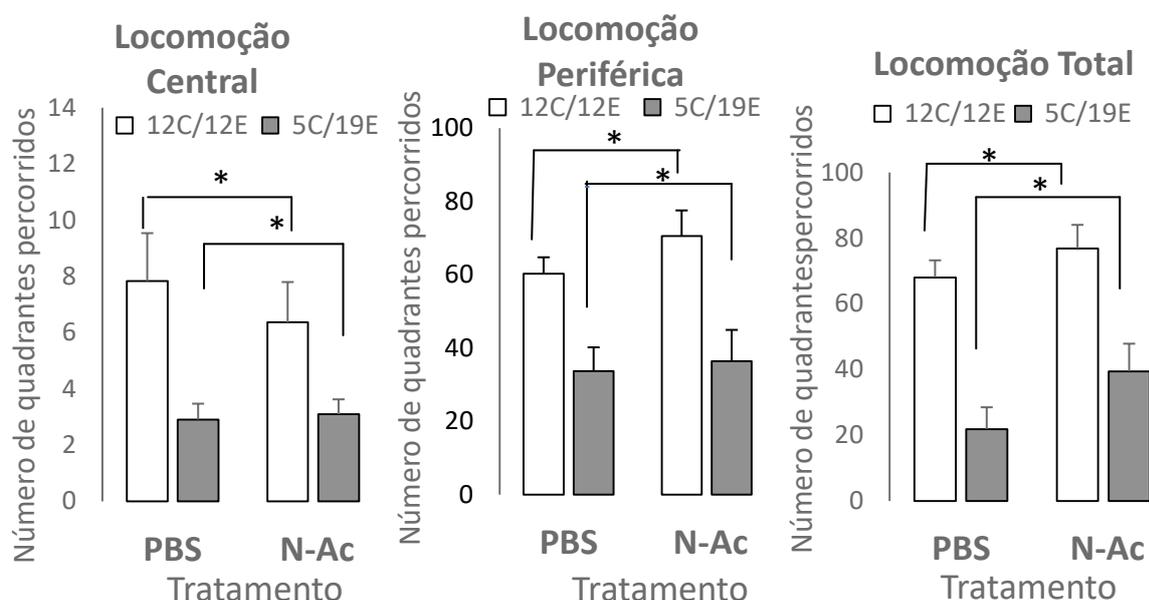


Figura 3: Número de quadrantes percorridos no centro (Locomoção Central), Número de quadrantes percorridos na periferia (Locomoção Periférica) e Soma do número de quadrantes percorridos no centro e periferia (Locomoção Total) no Teste de Campo Aberto em relação aos grupos estudados. As colunas representam as Médias \pm EPM. N = 8-10 animais por grupo; $p < 0,05$. *Diferença significativa entre animais do ciclo 5C/19E e animais 12C/12E. A ANOVA bifatorial seguida de comparações múltiplas de Duncan em relação a Locomoção Central mostrou que o **Fator ciclo claro/escuro**: $F(1,40)=10,96$, $p < 0,01$; **Fator tratamento**: $F(1,40)=0,96$, $p=0,33$; **Interação ciclo e tratamento**: $F(1,40)=0,46$, $p=0,51$. Quanto a Locomoção Periférica o **Fator ciclo claro/escuro**: $F(1,40)=20,98$, $p < 0,001$; **Fator tratamento**: $F(1,40)=0,96$, $p=0,33$; **Interação ciclo e tratamento**: $F(1,40)=0,33$, $p=0,57$. Em relação a Locomoção total o **Fator ciclo claro/escuro**: $F(1,40)=18,97$, $p < 0,001$; **Fator tratamento**: $F(1,40)=0,08$, $p=0,78$; **Interação ciclo e tratamento**: $F(1,40)=1,77$, $p=0,19$.

A Figura 4 mostra a frequência em que os animais realizam o Comportamento de Levantar, parâmetro comportamental que pode ser considerado como uma medida complementar ao Teste de Campo Aberto, já que auxilia a refletir o estado emocional do animal frente ao novo ambiente. Houve diferença significativa entre os animais dos grupos 5C/19E e seus controles 12C/12E novamente, porém não houve alteração quanto ao uso da N-Ac.

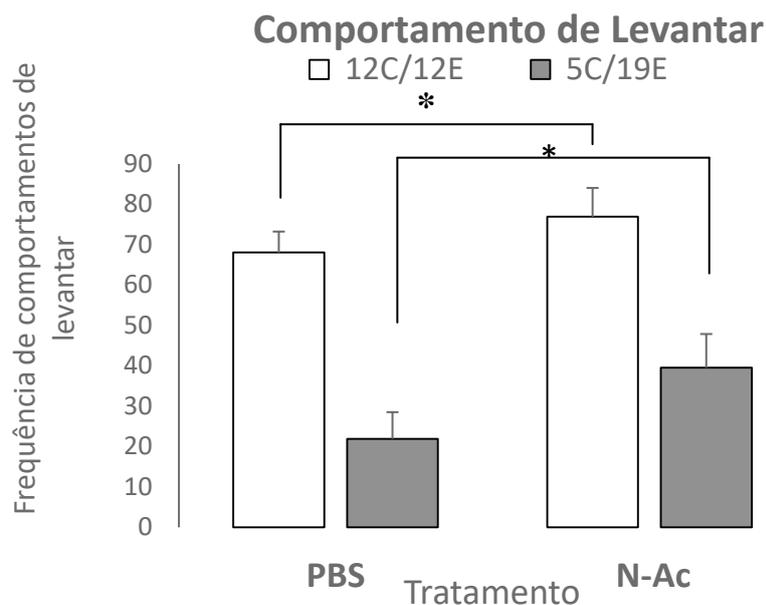


Figura 4: Frequência de Comportamentos de Levantar no Teste de Campo Aberto em relação aos grupos estudados. As colunas representam as Médias \pm EPM. N = 8-10 animais por grupo; $p < 0,05$. *Diferença significativa entre animais do ciclo 5C/19E e animais 12C/12E. A ANOVA bifatorial seguida de comparações múltiplas de Duncan mostrou que o **Fator ciclo claro/escuro**: $F_{(1,40)}=17,77$, $p < 0,001$; **Fator tratamento**: $F_{(1,40)} = 1,26$, $p = 0,27$; **Interação ciclo e tratamento**: $F_{(1,40)}=0,01$, $p = 0,91$.

4.2 Teste de Consumo de Sacarose

As análises estatísticas utilizando ANOVA para medidas repetidas revelou que na figura 5 a alteração do ciclo de luz para o ciclo 5C/19E foi eficaz para diminuir o consumo de sacarose no período de 0-90 e 91-180 minutos, induzindo comportamento do tipo depressivo. Também indicou diferença significativa no Fator Tempo $F_{(1,44)}=48,41$, $p < 0,001$, indicando maior consumo de sacarose no período de 0-90 minutos quando comparado com o período de

91-180 minutos. Porém não indicou diferença significativa no tratamento com a N-Ac quando comparada com o controle ($F_{(1,44)}=0,03$, $p=0,86$).

A análise da figura 5 mostra que a alteração do fotoperíodo foi eficiente para provocar um menor consumo de solução de sacarose(g)/massa do animal (Kg) sob o ciclo 5C/19E comparados aos animais sob o ciclo 12C/12E. Em relação as aplicações diárias de N-Ac não houve diferenças significativas quanto a aumento do consumo esperado para os animais submetidos ao tratamento, portanto a N-Ac não reverteu os comportamentos do tipo depressivos no Teste de Consumo de Sacarose.

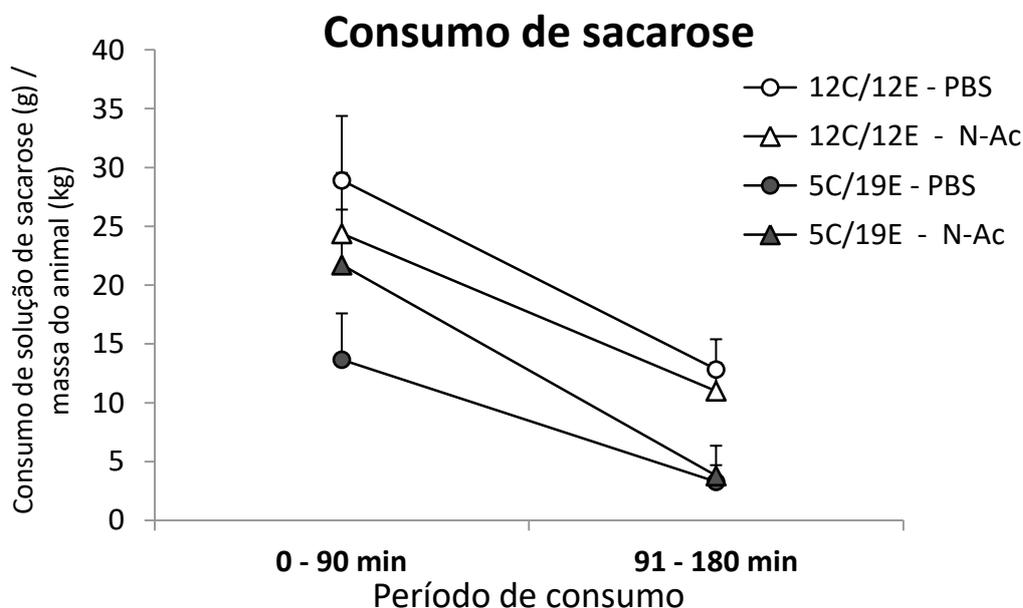


Figura 5: Consumo de solução de sacarose sobre a massa do animal no Teste de Consumo de Sacarose no período de 0-90 e 91-180 minutos, em relação aos grupos estudados. As linhas representam as Médias \pm EPM. N = 8-10 animais por grupo; $p < 0,05$. Houve diferença significativa entre animais do ciclo 5C/19E e animais 12C/12E e entre os períodos de consumo. A ANOVA para medidas repetidas mostrou que o **Fator ciclo claro/escuro**: $F_{(1,44)}=88,25$, $p<0,01$; **Fator tratamento**: $F_{(1,44)}=0,03$, $p=0,86$; **Fator tempo**: $F_{(1,44)}=48,41$, $p<0,001$; **Interação ciclo e tratamento**: $F_{(1,44)}=1,37$, $p=0,28$; **Interação ciclo e tempo** $F_{(1,44)}=0,02$, $p=0,89$; **Interação tratamento e tempo**: $F_{(1,44)}=0,34$, $p=0,56$; **Interação ciclo, tratamento e tempo**: $F_{(1,44)}=1,52$, $p=0,22$.

Na figura 6, em relação ao Consumo de Água nos períodos de 0-90 minutos e 91-180 minutos no Teste de Consumo de Sacarose, a análise estatística não indicou resultados significativos em nenhum dos fatores, indicando que a alteração do fotoperíodo e/ou o tratamento com N-Ac não alteraram o consumo.

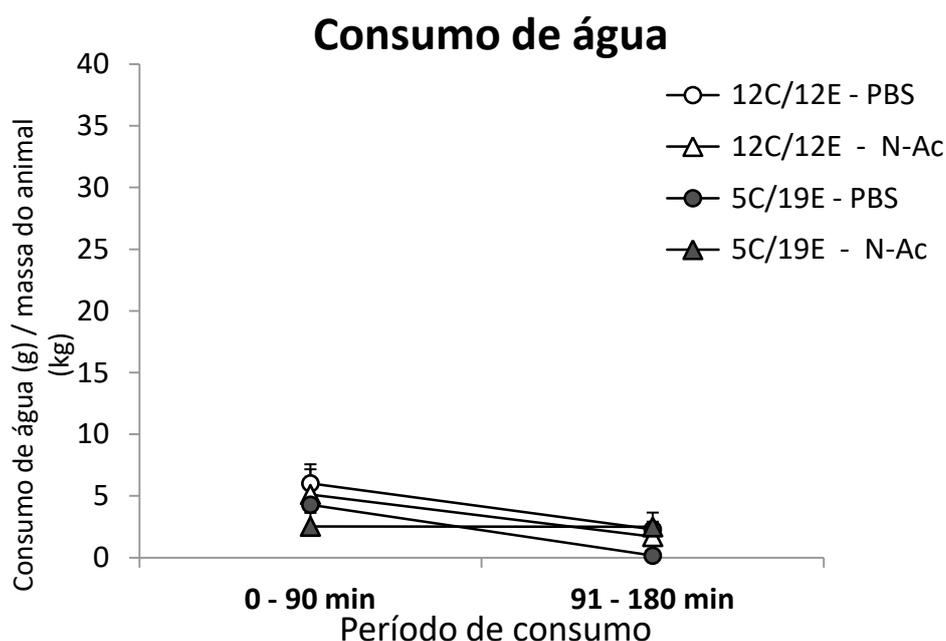


Figura 6: Consumo de solução de água sobre a massa do animal no Teste de Consumo de Sacarose no período de 0-90 e 91-180 minutos, em relação aos grupos estudados. As linhas representam as Médias \pm EPM. N = 8-10 animais por grupo; $p < 0,05$. A ANOVA para medidas repetidas mostrou que o **Fator ciclo claro/escuro**: $F(1,44)=2,53$, $p=0,12$; **Fator tratamento**: $F(1,44)=0,06$, $p=0,80$; **Fator tempo**: $F(1,44)=9,78$, $p<0,01$; **Interação ciclo e tratamento**: $F(1,44)=0,34$, $p=0,56$; **Interação ciclo e tempo**: $F(1,44)=0,68$, $p=0,42$; **Interação tratamento e tempo**: $F(1,44) = 1,48$, $p=0,23$; **Interação ciclo, tratamento e tempo**: $F(1,44) = 1,08$, $p=0,30$.

A Figura 7 mostra os resultados de Consumo de Sacarose e Consumo de Água nos animais após 24 horas no Teste de Consumo de Sacarose. A análise estatística demonstra que existe diferença significativa entre os grupos 5C/19E e 12C/12E apenas quanto ao Consumo de Sacarose, sendo que os animais sob o regime de iluminação 5C/19E apresentam maior

consumo de solução de sacarose se comparados aos animais 12C/12E. Quanto ao tratamento com N-Ac este não foi capaz de reverter os parâmetros comportamentais no teste, já que a análise da interação ciclo/tratamento dos diferentes fatores não tiveram $p > 0,05$.

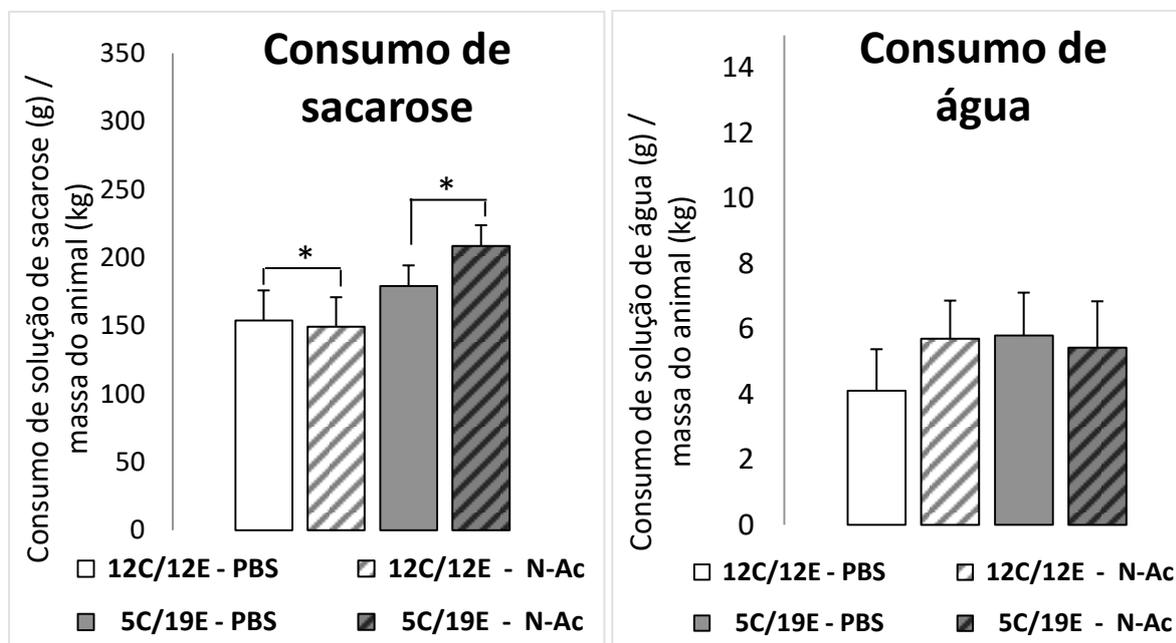


Figura 7: Consumo de sacarose e Consumo de água no Teste de Consumo de Sacarose após 24 horas, em relação aos grupos estudados. As barras representam as Médias \pm EPM. N = 8-10 animais por grupo; $p < 0,05$. *Diferença significativa entre animais do ciclo 5C/19E e animais 12C/12E. A análise de ANOVA/MANOVA mostrou que em relação ao Consumo de sacarose o **Fator ciclo claro/escuro**: $F(1,42)=4,86$, $p < 0,05$; **Fator tratamento**: $F(1,42) = 0,41$, $p=0,52$; **Interação ciclo e tratamento**: $F(1,42) = 0,77$, $p=0,38$. E as análises estatísticas em relação ao Consumo de água mostraram que o **Fator ciclo claro/escuro**: $F(1,42) = 0,30$, $p=0,59$; **Fator tratamento**: $F(1,42) = 0,22$, $p=0,64$; **Interação ciclo e tratamento**: $F(1,42) = 0,57$, $p=0,45$.

A Figura 8 representa a Preferência Pela Sacarose dos animais nos diferentes grupos. As análises estatísticas mostram que não houve resultados significativos quanto ao Fator Ciclo (claro-escuro), Fator Tratamento e Interação Ciclo e Tratamento. Portanto a N-Ac não elevou a Preferência pela Sacarose no grupo 5C/19E como o esperado.

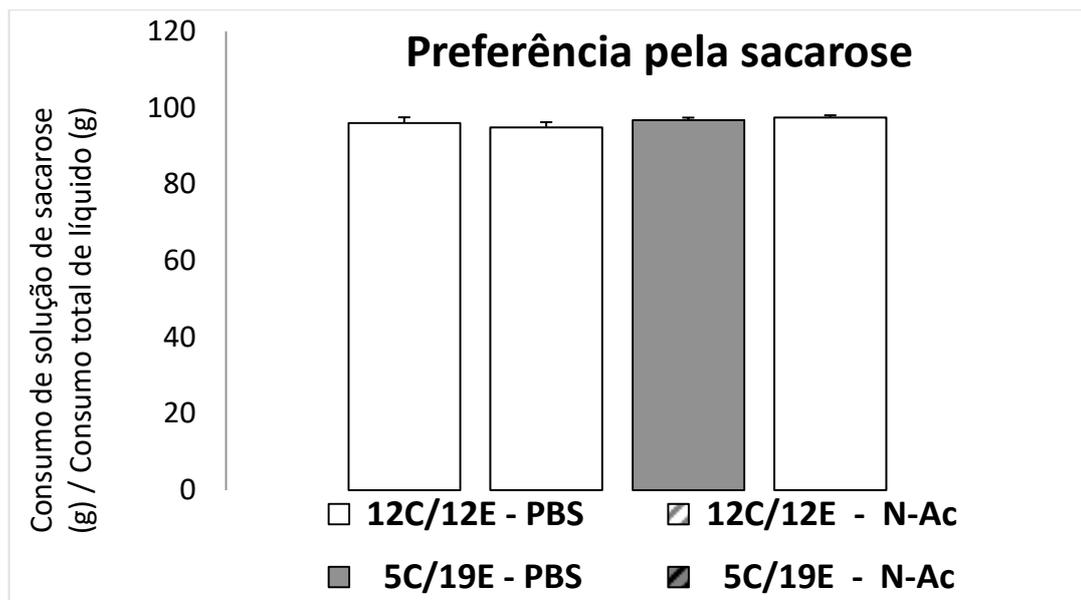


Figura 8: Consumo de sacarose sobre o consumo total de líquido (Preferência pela Sacarose), após 24 horas do início do teste em relação aos grupos estudados. As barras representam as Médias \pm EPM. N = 8-10 animais por grupo; $p < 0,05$. A ANOVA/MANOVA mostrou que o **Fator ciclo claro/escuro**: $F_{(1,42)} = 2,10$, $p=0,15$; **Fator tratamento**: $F_{(1,42)} = 0,03$, $p=0,86$; **Interação ciclo e tratamento**: $F_{(1,42)} = 0,61$, $p=0,44$.

5. DISCUSSÃO

Perturbações dos ritmos circadianos tem sido há décadas associadas a alterações das funções cerebrais. Observações clínicas mostram que muitos pacientes com doenças neuropsiquiátricas sofrem de alterações nos ritmos circadianos, como por exemplo no ritmo sono-vigília (WULFF et al., 2010; ROSENBERG et al., 2011). Sabe-se que a luz possui um papel muito importante nos ritmos biológicos dos mamíferos, sendo o principal fator ambiental usado pelo relógio circadiano endógeno para sincronizar com o ciclo dia/noite externo (DUMONT et al., 2007). Em modelos animais, a manipulação do ciclo claro/escuro altera os fenótipos afetivos, locomotores e comportamentais dos animais, demonstrando uma conexão direta entre o relógio circadiano e as funções cerebrais relevantes para doenças neuropsiquiátricas (LANDGRAF et al., 2014).

Experimentos realizados usando-se ratos de areia diurnos demonstram que a alteração do ciclo claro/escuro para 5 horas de claro e 19 horas de escuro levam a mudanças comportamentais nos animais, induzindo comportamentos do tipo depressivos e ansiosos (EINAT et al., 2006; ASHKENAZY et al., 2008). O presente trabalho utilizando protocolo adaptado de EINAT et al. (2006) e ASHKENAZY et al. (2008), porém com ratos Wistar (roedores noturnos), demonstrou resultados significativos relacionados à alteração de parâmetros comportamentais quando os animais eram submetidos a alterações do fotoperíodo ambiental, dando suporte a ideia de que a diminuição do tempo de exposição a luz ambiental causaria comportamentos do tipo depressivos e ansiosos também em roedores noturnos.

Os dados obtidos no presente estudo sugerem que roedores noturnos submetidos a um ciclo de luz com 5 horas de claro e 19 horas de escuro (grupo 5C/19E) apresentam comportamentos do tipo ansiosos e depressivos quando comparados aos animais submetidos a um ciclo com 12 horas de claro e 12 horas de escuro (grupo 12C/12E). Além disso, sugerem

que as aplicações diárias de N-Ac a uma concentração de 60mg/Kg não foram efetivas para reverter tais efeitos comportamentais provocados pela alteração do ciclo de luz.

Entre os testes comportamentais utilizados está o Teste do Nado Forçado (TNF) que é baseado no modelo de “desespero comportamental”. O TNF é um teste comportamental usualmente empregado na avaliação de fármacos com potencial atividade antidepressiva (PORSOLT et al., 1977). Neste teste, roedores são expostos a uma situação aversiva chamada de nado forçado, que consiste em nadar em um tanque cilíndrico com uma quantidade de água que impeça o apoio das patas ou cauda no fundo do cilindro e a fuga pela borda superior. No início do teste os animais nadam e fazem movimentos de escalada as paredes internas do cilindro e com o passar do tempo adotam uma postura de imobilidade (POSSAMAI, 2013).

A imobilidade é diminuída pelo tratamento com antidepressivos de diferentes classes farmacológicas (PORSOLT et al., 1977; SUGIMOTO et al., 2011) e isto confere validade preditiva ao teste. A imobilidade que se segue ao período de luta, é a principal característica à analogia neste teste, uma vez que, é diminuída pelo tratamento com fármacos antidepressivos (PORSOLT et al., 1977). De acordo com os resultados obtidos em nosso trabalho, as injeções diárias de N-Ac não foram capazes de reduzir a imobilidade dos animais no TNF como esperado se comparados aos animais do grupo controle, o que contradiz o possível efeito antioxidante e antidepressivo da N-Ac.

No Teste de Campo Aberto (TCA) desenvolvido por HALL (1934) a quantidade de atividade motora do animal é usada como indicadora de seu estado emocional, já que a baixa atividade locomotora pode ser um dos parâmetros indicativos de ansiedade. Pode-se também utilizar a atividade locomotora do animal no centro do Campo Aberto como uma medida mais seletiva de ansiedade. Esse modelo tem sido amplamente utilizado para demonstrar efeito de drogas ansiolíticas em modelos animais. Em relação ao presente estudo, o efeito esperado para o tratamento com a N-Ac seria o de uma maior Locomoção Total do animal no aparato,

com um aumento significativo da Locomoção Central e também na periferia onde a sensação de segurança do animal é maior por causa das paredes. Os resultados obtidos demonstram que o Fator Ciclo alterou os parâmetros Locomoção Central, Locomoção Periférica, Locomoção Total, com os animais do grupo 5C/19E se locomovendo menos que os animais 12C/12E, portanto aparentemente mais “ansiosos”. O tratamento com a N-Ac não foi capaz de reverter ou igualar os resultados entre os grupos. Dados de FERREIRA et.al. (2008) corroboram tais resultados quanto aos comportamentos no TCA, uma vez que os autores demonstram que a aplicação de N-Ac em diferentes concentrações não afeta parâmetros de locomoção dos animais no teste. O TCA tem sido utilizado como indicativo da atividade motora do animal e também pode ser utilizado em conjunto com o TNF para verificar se o tempo de imobilidade no nado forçado é decorrente de alterações na locomoção do animal causadas pela dose dos tratamentos aplicados quando os experimentos envolvem uso de fármacos. (MONLEON, et al.,1995).

O Teste de Consumo de Sacarose (TCS) baseia-se em testar o comportamento anedônico dos animais, que consiste na diminuição de um efeito reforçador positivo, neste caso, a perda pela preferência no consumo de sacarose. A reversão deste comportamento em animais é possível com os mesmos tratamentos farmacológicos utilizados em humanos, portanto pode-se considerar que tal modelo possui também validade preditiva (SIBA, 2013). A anedonia é um dos comportamentos marcantes da depressão e pode ser mensurada pelo TCS em modelos animais (McARTHUR et al., 2006). O animal que apresenta comportamentos do tipo depressivos não demonstra preferência pela solução de sacarose e nem aumento do consumo de sacarose em relação ao consumo de água, já que perde o interesse em atividades que antes lhe eram prazerosas. Essa ligação entre a preferência por soluções doces e o estado hedônico foi baseada na evidência de que a informação visceral possui alto impacto nos processos cognitivos e comportamentais (BERNTSON, et al., 2003). Nossos resultados demonstram que

em relação ao período de consumo da solução de sacarose/massa corpórea do animal (Kg) nos primeiros 180 minutos, o grupo 5C/19E consumiu menos solução de sacarose que os animais controle e que esse fato ocorreu tanto nos primeiros noventa minutos de exposição quanto nos minutos seguintes, mostrando claramente uma perda do caráter hedônico do consumo da solução doce, indicando que a alteração do ciclo de luz ambiental levou esses animais a um “estado depressivo” que não foi significativamente alterado pela administração de N-Ac.

Após 24 horas de exposição à sacarose nossos resultados mostraram uma inversão no Consumo de Sacarose quando comparados aos 180 minutos iniciais, já que os animais 5C/19E consumiram mais solução doce do que os animais 12C/12E. Um comportamento inesperado, já que o ciclo alterado havia mostrado resultados significativos em induzir nos animais do grupo com ciclo alterado um possível comportamento anedônico. Trabalhos anteriores realizados por KLEIN et al. (1972 Apud GARCIA, 2014) descreveram que ratos quando mantidos em condições de mudança no ritmo de iluminação ambiental desenvolvem alterações metabólicas, que caracterizam a síndrome metabólica. Segundo MULDER et al. (2009) e PESCHKE et al. (2000), conforme citado por GARCIA (2014) as mudanças no ciclo claro/escuro podem alterar a síntese de melatonina pela glândula pineal em ratos. Sabendo-se que a melatonina tem um papel importante na regulação do metabolismo da glicose, podendo interferir na regulação da síntese e ações da insulina, uma síndrome metabólica poderia explicar o aumento no Consumo de Sacarose pelos animais expostos a alteração de ciclo após 24 horas de exposição. O Fator ciclo e Fator tratamento não mostraram resultados significativos.

O fato de a N-Ac não ter alterado os comportamentos do tipo depressivos e ansiosos expressos pelos animais que tiveram o ciclo de iluminação alterado e que receberam doses diárias desse fármaco pode ser explicado levando-se em conta dois fatores principais: a dose de N-Ac utilizada e/ou o protocolo de administração da mesma.

No estudo de FERREIRA et al. (2008) foram testadas diferentes concentrações de N-Ac (5mg/Kg, 15mg/Kg, 50 mg/Kg e 150 mg/Kg e 250mg/Kg) no tratamento de animais submetidos ao TNF, sendo que os autores evidenciaram que somente as concentrações de 15mg/Kg, 50mg/Kg e 150 mg/Kg foram efetivas na redução da imobilidade dos animais, sendo que a de 50mg/Kg foi a que mais provocou imobilidade, uma dosagem muito próxima a utilizada em nossos experimentos que foi de 60mg/Kg, concentração esta baseada nos trabalhos de LaROWE et. al. (2010) e de BERK et al. (2013). Portanto, a dosagem utilizada no presente trabalho não parece ter sido o fator limitante para a falta de efeito da N-Ac na redução de comportamentos do tipo ansiosos e depressivos.

Quanto ao protocolo de administração de N-Ac utilizado em nosso estudo, as aplicações foram diárias, sendo duas aplicações/dia separadas por um intervalo de 4 horas entre cada uma, durante 3 semanas. A escolha por um uso crônico de N-Ac baseou-se em trabalhos como os de BERK et al., (2013) e LaROWE et al., (2010). Porém, existem autores que utilizam aplicações agudas da substância (FERREIRA et al., 2008; SMAGA et al., 2012) e que obtiveram resultados significativos quanto a seus efeitos nas desordens psiquiátricas. Talvez mudando a metodologia de administração da N-Ac quanto ao tempo de tratamento, possamos obter os resultados previstos.

Sendo assim, dada a importância dos estudos que envolvem desordens neuropsiquiátricas e seus possíveis tratamentos, estudos adicionais a esse são necessários para elucidarmos os efeitos dessa estratégia de terapia.

6. CONCLUSÃO

O presente estudo sugere que roedores noturnos submetidos a um ciclo de iluminação alterado, com menor exposição a luz ambiental, apresentam comportamentos do tipo ansiosos e depressivos. Além disso, as aplicações crônicas e diárias de N-Ac na dosagem de 60mg/kg não foram efetivas para reverter tais efeitos comportamentais provocados pela alteração do ciclo claro-escuro.

7. REFERÊNCIAS

ADAIR, J.C.; KNOEFEL, J. E.; MORGAN, N. **Controlled trial of N-acetylcysteine for patients with probable Alzheimer's disease.** *Neurology*, 2001. 57, 1515–1517.

AL-SAMHARI, M. M.; AL-RASHEED, N. M.; AL-RASHEED, N. M.; HASAN, I. H.; MAHMOUD, A. M.; DZIMIRI, N. **Possible involvement of the JAK/STAT signaling pathway in N-acetylcysteine-mediated antidepressant-like effects.** *Exp Biol Med* (Maywood). 2016 Mar;241(5):509-18. doi: 10.1177/1535370215619707. Epub 2015 Dec 6.

AMINI, A.; MASOUMI-MOGHADDAM, S.; EHTEDA, A.; MORRIS, D. L.; **Bromelain and N-acetylcysteine inhibit proliferation and survival of gastrointestinal cancer cells in vitro: significance of combination therapy.** *J Exp Clin Cancer Res.* 2014;33:92. .

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, **DIGNOSTIC AND STATISTICAL MANUAL OF MENTAL DESORDERS**, fifth edition. (DSM-5), American Psychiatric Association, Arlington, Va, USA, 2013.

ASHKENAZY, T.; EINAT, H.; KRONFELD-SCHOR, N. **We are in the dark here: induction of depression- and anxiety-like behaviours in the diurnal fat sand rat, by short daylight or melatonin injections.** Int J Neuropsychopharmacol, 2008. 17:1–11.

BAKER, D.A.; XI, Z. X.; SHEN, H.; SWANSON, C. J.; KALIVAS, P. W. **The origin and neuronal function of in vivo nonsynaptic glutamate.** J. Neurosci, 2002. 22, 9134–9141.

BERK, M.; MALHI, G. G.; GRAY, L. J.; DEAN, O. M. **The promise of N-acetylcysteine in Neuropsychiatry.** Trends Pharmacol Sci, 2013 Mar;34(3):167-77. doi: 10.1016/j.tips.2013.01.001. Epub 2013 Jan 29.

BERNTSON, G. G.; SARTER, M.; CACIOPPO, J. T. **Ascending visceral regulation of cortical affective information processing.** Eur J Neurosci. v. 18, n. 8, p. 2103-2109. 2003.

BUNNING, E. **The Physiological Clock.** Academic Press. Inc. New York. 1964.

CAPO, G. S. **Desenvolvimento de métodos condutimétrico e potenciométrico aplicados á determinação de N-acetil cisteína em medicamento granulado.** Cnpq. 2012. Disponível em: <http://www3.fsa.br/proppex/piic2010/48965.pdf>. Acesso em: 20 de maio de 2016.

CHAN, A.; PASKAVITZ, J.; REMINGTON, R.; RASMUSSEN, S.; SHEA, T. B. **Efficacy of a vitamin/nutriceutical formulation for early-stage Alzheimer's disease: a 1-year, open-label pilot study with an 16-month caregiver extension.** *Am. J. Alzheimers Dis. Other Demen*, 2008. 23, 571–585.

CUESTA, M.; CLESSE, D.; PEVET, P.; CHALLET, E. **From daily behavior to hormonal and neurotransmitters rhythms: comparison between diurnal and nocturnal rat species.** *Horm Behav*, 2009. 55(2):338–47.

CRYAN, J. F.; VALENTINO, R. J.; LUCKI, I. **Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test.** *Neurosci Biobehav Rev*, 2005. 29(4–5):547–69.

DANILENKO, K. V.; WIRZ-JUSTICE, A.; KRAUCHI, K.; WEBER, J. M.; TERMAN, M. **The human circadian pacemaker can see by the dawn's early light.** Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences, Novosibirsk. *J Biol Rhythms*. 2000;15(5):437-46.

DEAN, O. GIORLANDO, F.; BERK, M. **N-Acetylcysteine in psychiatry: current therapeutic evidence and potential mechanisms of action.** *J. Psychiatry Neurosci.*, 2011. 36, 78–86

DODD, S. DEAN, O.; COPOLOV, D. L.; MALHI, G. S.; BERK, M. **N-Acetylcysteine for antioxidant therapy: pharmacology and clinical utility**. *Expert Opin. Biol. Ther*, 2008. 8, 1955–1962

DHOUIB, I.E.; ANNA, A.; JALLOUILI, M.; ELFAZAA, S.; LASRAM, M.M. **A minireview on N-Acetylcysteine: An Old Drug with New Approaches**. *Life Sciences*, 2016. doi: 10.1016/j.lfs.2016.03.003;

DUFFY, J. F.; KRONAUER, R.E.; CZEILER, C. A. **Phase-shiftind human circadian rhythms: influence of sleep timing, social contact and light exposure**. *Journal of Physiology*. 1996. 495.1, pp.289-297.

DUMONT, M.; BEAULIEU, C. **Light exposure in the natural environment: relevance to mood and sleep disorders**. *Sleep Med*. 2007 Sep;8(6):557-65. Epub 2007 Mar 23.

EINAT, H.; KRONFELD-SCHOR, N.; EILAM, D. **Sand rats see the light: short photoperiod induces a depression-like response in a diurnal rodent**. *Behav Brain Res*, 2006. 173(1):153–7 [Epub 2006 July 10].

FAEDDA, G. L.; TONDO, L.; TEICHER, M. H.; BALDESSARINI, R. J.; GELBARD, H. A.; FLORIS, G. F. **Seasonal mood disorders. Patterns of seasonal recurrence in mania and depression.** Arch Gen Psychiatry, 1993. 50: 17-23.

FERREIRA, F.R.; BIOJONE, C.; JOCA, S. R.; GUIMARÃES, F. S. **Antidepressant-like effects of N-acetyl-L-cysteine in rats.** Behav Pharmacol 2008;19:747–50

FLAISHER-GRINBERG, S.; OVERGAARD, S.; EINAT, H. **Attenuation of high sweet solution preference by mood stabilizers: a possible mouse model for the increased reward-seeking domain of mania.** J Neurosci Methods, 2008. 177(1):44–50 [Epub 2008 September 27].

GARCIA, J. B. **Perfil noturno da síntese de melatonina na glândula pineal de ratos com obesidade hipotalâmica induzida pelo glutamato monossódico.** Dissertação (Mestrado em Fisiologia Humana) – Instituto de ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2014:94f.

HALL, C. S. **Emotional behavior in the rat: I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality.** J Comp Psychol. 1934;18:385-403.

HINTON, J. M. **Sleep and motility in depressive illness.** Proc R Soc Med 1962;55:907–10.
Insel TR. From animal models to model animals. Biol Psychiatry, 1962. 62(12):1337–9.

HONMA, K.; HONMA, S.; NAKAMURA, K.; SASAKI, M.; ENDO, T.; TAKAHASHI, T.
Differential effects of bright light and social cues on reentrainment of human circadian rhythms. Am J Physiol, 1995. Feb;268(2 Pt 2):R528-35.

JOSEPH, P. D.; MANNERVIK, B.; ORTIZ de MONTELLANO, P.; **Molecular Toxicology**,
1st ed., Oxford University Press: New York, 1997, p.152-186.

LANDGRAF, D.; McCARTHY, M. J.; WELSH, D. K. **The role of the circadian clock in animal models of mood disorders.** Behav Neurosci, 2014. Jun;128(3):344-59. doi: 10.1037/a0036029. Epub 2014 Mar 24.

LaROWE, S. D.; KALIVAS, P. W.; **The role of N-acetylcysteine in inhibiting responding during extinction in rats trained to self-administer cocaine.** Open addict J. 2010; 3:88-91.

LINCK, V. M.; COSTA-CAMPOS, L.; PILZ, L. K.; GARCIA, C. R. L.; ELISABETSKY, E.
AMPA glutamate receptors mediate the antidepressant-like effects of N-acetylcysteine in the mouse tail suspension test. Behav Pharmacol 2012;23:171–7.

LIMA AIRES, de A.; AZEVEDO ALBUQUERQUE, de M. C.; SILVA, R. A.; SCHIRATO, G. V.; PONTES FILHO, de N. T.; ARAUJO, de S. B.; SOUZA, V. M. COSTA, V. M. MALAGUENO, E. **Immunohistopathological changes in murine Schistosomiasis mansoni under the influence of N-acetyl-L-cysteine.** Parasitol Res. 2012;111(4):1569–78.

McMAHON, S. ANDERSEN, S. B.; MADSEN, M. K.; HJORDT, L. V.; HAGEMAN, I.; DAM, H.; SVARER, C. DA CUNHA-BANG, S.; BAARÉ, W.; MADSEN, J.; HASHOLT, L. HOLSHOLT, L.; HOLST, K.; FROKJAER, V. G.; KNUDSEN, G. M. **Seasonal difference in brain serotonin transporter binding predicts symptom severity in patients with seasonal affective disorder.** European Neuropsychopharmacology, 2014. vol. 24, supplement 2, p. S319.

MAGNUSSON, A. **An overview of epidemiological studies on seasonal affective disorder.** Acta Psychiatr Scand, 2000. 101: 176-184.

MARTIJENA, I. D.; TAPIA, M.; MOLINA, V. A. **Altered behavioral and neurochemical response to stress in benzodiazepine-withdrawn rats.** Brain Res ,1996. 712(2):239–44.

MARTINEZ-BANACLOCHA, M.; MARTINEZ, N. **N-acetylcysteine elicited increase in cytochrome c oxidase activity in mice synaptic mitochondria.** Brain Res, 1999. Sep 18;842(1):249-51

McARTHUR, R.; BORSINI, F. **Animal models of depression in drug discovery**. Pharmacol Biochemistry and Behav. v. 84, p. 436-452. 2006.

MENAKER, M. **Biological clocks**. Lea & Febiger. University of Texas, Austin. 1969:10.

MILLEA, P. J. **N-acetylcysteine: multiple clinical applications**. Am Fam Physician 80, 265, 2009.

MILLER, A. L. **Epidemiology, etiology, and natural treatment of seasonal affective disorder**, Alternative Medicine Review, 2005. vol. 10, no. 1, pp. 5–13.

MONLEON, S.; D'AQUILA, P.; PARRA, A.; SIMON, V. M.; BRAIN, P. F.; WILLNER, P. **Attenuation of sucrose consumption in mice by chronic mild stress and its restoration by imipramine**. Psychopharmacology (Berl).1995 Feb;117(4):453-7.

MOON, J.H.; CHOI, Y.S.; LEE, H. W.; HEO, J. S.; CHANG, S. W.; LEE, J. Y. **Antibacterial effects of N-acetylcysteine against endodontic pathogens**. J Microbiol. 2016;54(4):322–9.

MOORE, R. Y.; DAVID, C. K. **Visual pathways and central neural control of a circadian rhythm in pineal serotonin N-acetyltransferase activity.** Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam. Brain Research, 1974. 71, 17-33.

OLIVE, M.F.; CLEVA, R.M.; KALIVAS, P.W.; MALCOLM, R.J. **Glutamatergic medications for the treatment of drug and behavioral addictions.** Pharmacology, Biochemistry, and Behavior. 2012;100(4):801-810. doi:10.1016/j.pbb.2011.04.015.

PAPP, M.; WILLNER, P.; MUSCAT, R. **An animal model of anhedonia: attenuation of sucrose consumption and place preference conditioning by chronic unpredictable mild stress.** Psychopharmacology (Berl). 1991. 104: 255–259.

PITTENDRIGH, C. S. **Circadian Systems: General Perspective.** Hopkins Marine Station, Stanford University, Pacific Grove, California. 1981. 57-77

PORSOLT, R. D.; ANTON, G.; BLAVET, N.; JALFRE, M. **Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments.** Eur J Pharmacol, 1978. 47: 379–391.

POSSAMAI, F. Teste do Nado Forçado repetido: **Avaliação dos efeitos da imipramina sobre o comportamento e a neurogênese hipocampal dos ratos alojados em ambiente enriquecido**. Florianópolis, 2013.

ROSENBERG, R.; DOGHRAMJI. P. P.; **Is shift work making your patient sick? Emerging theories and therapies for treating shift work disorder**. Postgrad Med. 2011;123(5):106–15. doi:10.3810/pgm. 2011.09.2465.

ROSENTHAL, N. E.; SACK, D. A.; GILLIN, J. C.; LEWY, A. J.; GOODWIN, F. K.; DAVENPORT, Y.; MUELLER, P.S.; NEWSOMW, D. A.; WEHR, T. A. **Seasonal affective disorder: a description of the syndrome and preliminary findings with light therapy**. Arch Gen Psychiatry, 1984. 41: 72-80.

SADOCK, J.; KAPLAN, H. **Synopsis of psychiatry**. Philadelphia, PA: Lippincott &Williams, 2002.

SIBA, P. I. **Avaliação pré-clínica do potencial efeito antidepressivo da miricitrina em modelos animais**. Curitiba, 2013.

SCHWARTZ, P. J.; BROWN, C.; WEHR, T. A.; ROSENTHAL, N. E. **Winter seasonal affective disorder: a followup study of the first 59 patients of the National Institute of Mental Health Seasonal Studies Program.** Am J Psychiatry, 1996. 153: 1028-1036.

SMAGA, I.; POMIERNY, B. KRZYZ-ANOWSKA, W.; POMIERNY-CHAMIOLO, L. et al. **N-acetylcysteine possesses antidepressant-like activity through reduction of oxidative stress: behavioral and biochemical analyses in rats.** Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 2012;39:280–7.

SMALE, L.; HEIDEMAN, P. D.; FRENCH, J.A. **Behavioral neuroendocrinology in nontraditional species of mammals: things the ‘knockout’ mouse CAN’T tell us.** Horm Behav, 2005. 48(4):474–83 [Epub 2005 June 28].

SUGIMOTO, Y.; YAMAMOTO, M.; TAGAWA, N.; KOBAYASHI, Y.; MITSUI-SAITOH, K.; HOTTA, Y.; YAMADA, J. **Differences between mice strain in response to paroxetine in the forced swimming test: Involvement of serotonergic or noradrenergic system.** European Journal of Pharmacology, v. 672, p. 121-5, 2011

TERMAN, M.; TERMAN, J. S. **Light therapy for seasonal and nonseasonal depression: efficacy, protocol, safety, and side effects.** CNS Spectr, 2005. 10: 647–663.

TRAN, C. D.; KRITAS, S.; CAMPBELL, M. A.; HUYNH, H. Q.; LEE, S. S.; BUTLER, R. N. **Novel combination therapy for the eradication of *Helicobacter pylori* infection in a mouse model.** Scand J Gastroenterol. 2010;45(12):1424–30.

VOGEL, G. W.; THOMPSON, F. C.; THURMOND, A.; RIVERS, B. **The effect of REM deprivation on depression.** Psychosomatics, 1973. 14(2):104–7.

VON ZERSSEN, D.; DIRLICH, G.; DOERR, P.; EMIRICH, H.M.; LUND, R.; PLOOG, D. **Are biological rhythms disturbed in depression?** Acta Psychiatr Belg, 1985. 85(5):624–35.

WIRZ-JUSTICE, A. **Chronobiology and psychiatry.** Sleep Med Rev 2007;11:423–7.

WULFF, K.; GATTI, S.; WETTSTEIN, J. G.; FOSTER, R. G. **Sleep and circadian rhythm disruption in psychiatric and neurodegenerative disease.** Nat Rev Neurosci, 2010. 11(8):589–99. doi:10.1038/nrn2868.

ZHOU, L.I.; MIRANDA-SAKSENA, M.; SAKSENA, N.K. **Viruses and neurodegeneration.** Virol. J., 2013. 10: 172.

ANEXOS



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)
Rua Ceará, S/N - Bloco 2T, sala 113 – CEP 38405-315
Campus Umuarama – Uberlândia/MG – Ramal (VoIP) 3423;
e-mail: ceua@propp.ufu.br; www.comissoes.propp.ufu.br

ANÁLISE FINAL Nº 146/16 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 039/16

Projeto Pesquisa: "Efeitos da N-Acetilcisteína nas alterações comportamentais e fisiológicas induzidas pela redução do período de luz diário".

Pesquisador Responsável: Erika Renata Barbosa Neiro.

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas. Ao final da pesquisa deverá encaminhar para a CEUA um relatório final.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 05 de agosto de 2016.

Prof. Dr. César Augusto Garcia
Coordenador da CEUA/UFU