



**PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-  
GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**



**(PIPGCF) UFSCar/UNESP**

**Investigação do tratamento com N-acetilcisteína  
nos comportamentos relacionados à ansiedade durante  
a síndrome de abstinência do etanol e na resposta  
cardiovascular induzida pelo estresse em ratos.**

**Lígia Cury Casula**

**São Carlos/SP  
2019**



**PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**



**(PIPGCF) UFSCar/UNESP**

**Investigação do tratamento com N-acetilcisteína nos comportamentos relacionados à ansiedade durante a síndrome de abstinência do etanol e na resposta cardiovascular induzida pelo estresse em ratos.**

**Lígia Cury Casula**

Tese apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (PIPGCF) UFSCar/UNESP, como pré-requisito para obtenção do Título de Doutora em Ciências Fisiológicas, sob a orientação do Prof. Dr. Marcelo Tadeu Marin e Co-orientação do Prof. Dr. Carlos Cesar Crestani.

**São Carlos/SP**

**2019**



---

**Folha de Aprovação**

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Lúcia Cury Casula, realizada em 08/02/2019:




---

Prof. Dr. Marcelo Tadeu Marin  
UNESP



---

Prof. Dr. Tarciso Tadeu Miguel  
UFU



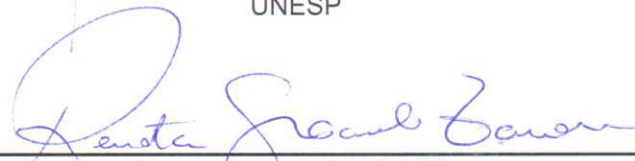
---

Profa. Dra. Debora Simões de Almeida Colombari  
UNESP



---

Profa. Dra. Cleopatra da Silva Planeta  
UNESP



---

Profa. Dra. Renata Graciele Zanon  
UFU

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais e irmão,

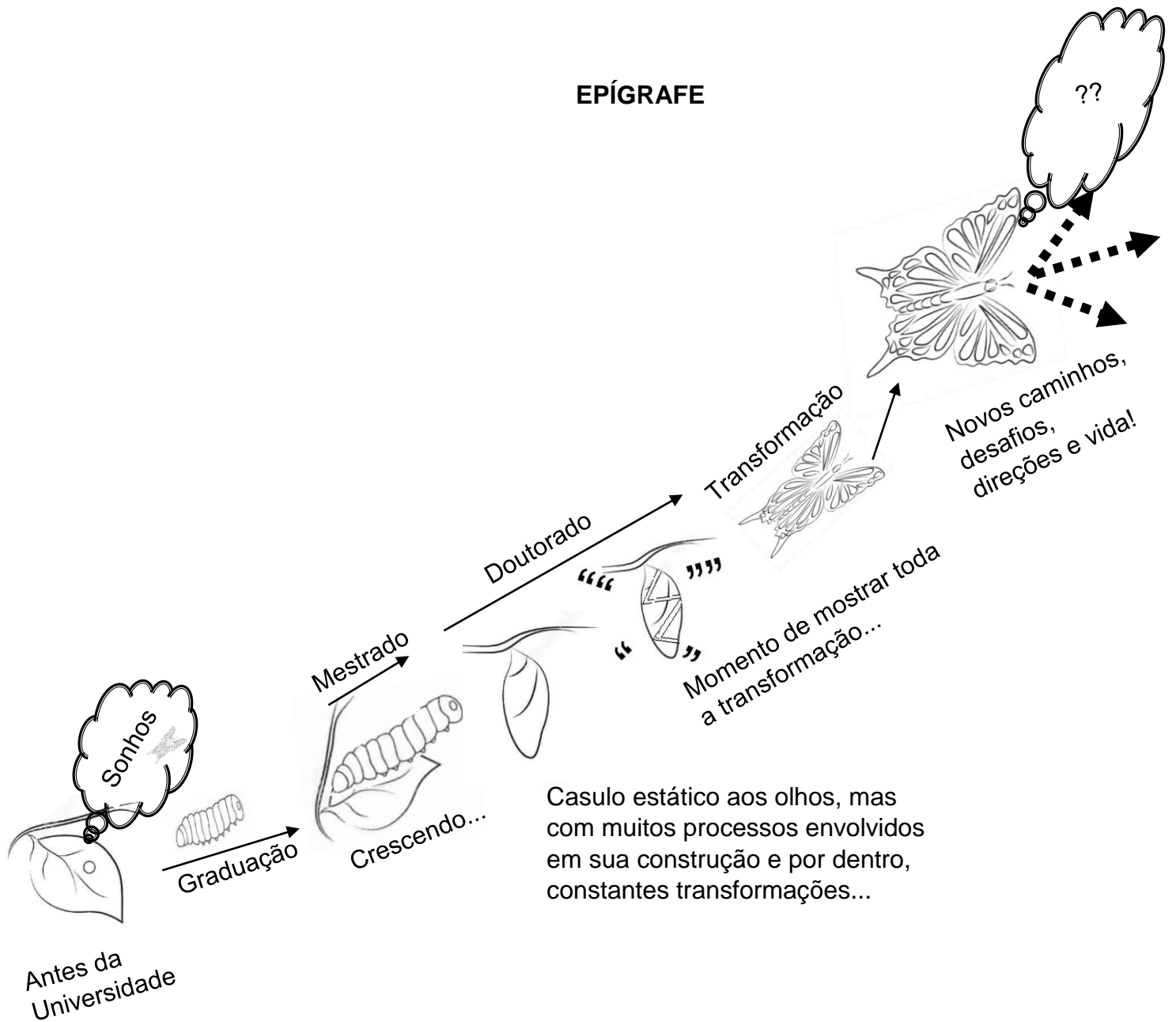
Maria Christina, Nelson e Henrique.

Por nunca medirem esforços em me ajudar a transformar sonhos em realidade, não tenho palavras para expressar todo o meu amor e gratidão. Simplesmente obrigada por caminharem sempre ao meu lado e por tanto que fizeram e fazem por mim, mesmo estando longe fisicamente.

E aos meus avós,

Aos que se encontram em forma de luz e aos que estão aqui na terra. Obrigada por todas as orações, carinho, palavras e sorrisos que nas maiores dificuldades a força deles sempre me fizeram refletir sobre a vida.

## EPÍGRAFE



Casulo estático aos olhos, mas com muitos processos envolvidos em sua construção e por dentro, constantes transformações...

Representação das fases da vida da borboleta em analogia com as transformações durante a vida acadêmica.  
Fonte: própria autora. Imagens do ciclo da borboleta adaptadas de @Carlanichiata.

*“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”*

José de Alencar

*“O sentir-se realizado vai além, ultrapassa o significado do sentir-se feliz. Na realização até a dor faz sentido. Passamos por ela acalentados pela certeza de que estamos no caminho que nos levará ao melhor de nós mesmos. E a gratidão é a via que nos devolve à relação de amor com a vida. Munidos de espírito grato, seremos sempre capazes de compreender: a vida foi como podia ser. E então só nos resta agradecer.”*

*Adaptado de Pe Fábio de Melo*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus etodas boas energias em forma de Luz, por me darem a oportunidade de ter saúde e força para que eu continuasse a minha caminhada e conseguisse chegar até o fim do que eu me propus a fazer.

A todos que passaram por minha vida até hoje, com certeza deixaram um pouco de aprendizado e contribuíram para a transformação da minha melhor versão até o momento.

Dentre tantos nomes a agradecer, alguns foram importantes para a finalização deste projeto.

Ao Prof. Dr. Marcelo Tadeu Marin pelo aceite em ser meu orientador para que eu conseguisse continuar a minha trajetória acadêmica e a todo o seu grupo de pesquisa pelo auxílio nos momentos que se fizeram necessários durante o desenvolvimento deste projeto.

Ao Prof. Dr. Carlos Cesar Crestani por ser sempre solícito e pelo acolhimento em seu grupo de pesquisa. Aos seus alunos de pós-graduação por todo apoio e compartilhamento de conhecimento, em especial ao Leandro Oliveira e ao Ricardo Benini por terem abraçado o meu desejo em desenvolver os testes de Cardio e terem me ajudado fazer as coisas acontecerem em tão pouco tempo. Obrigada meninos, por todo auxílio nas dúvidas, a amizade e parceria no laboratório.

A banca examinadora da qualificação, Prof. Dr. Ricardo L. Nunes de Souza, Prof. Dr. Laurival Antonio de Luca Jr e Prof. Dr. Paulo E. Carneiro-de-Oliveira, por todas as sugestões oferecidas que contribuíram para o aperfeiçoamento deste trabalho.

A banca examinadora de tese: Profa. Dra. Cleopatra da Silva Planeta; Prof. Dr. Tarciso Miguel Tadeu; Profa. Dra. Débora Simões de Almeida Colombari; Profa. Dra. Renata Graciele Zanon; pelo tempo dedicado a essa tese.

A Rosicler Palmira Trevisan Nocente por toda solícitude e tempo dispensado na correção do português desta tese.

A Rosana F. P. Silva, Elisabete Z. P. Lepera e Tirene Pavanelli por todo auxílio e ajuda oferecida em todos estes anos em que estive no laboratório, não tenho palavras para agradecer por tanto que fizeram por mim. E aos professores do laboratório de farmacologia pela convivência, amizade, aprendizado e disposição em me auxiliar nas dificuldades.

Aos técnicos Valéria e Vinicius pelo auxílio quando necessitei no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Laboratório de Toxicologia pelo espaço fornecido e auxílio quando precisei para o experimento de coleta de sangue dos animais, em especial ao Jhohann Benzi por compartilhar o seu conhecimento comigo.

Ao Prof. Dr. Fábio C. Cruz por ter sido sempre muito solícito e ter disponibilizado o seu laboratório para alguns experimentos que realizei durante um período do doutorado e ao seu grupo de pesquisa daquele período por toda ajuda dispensada e amizade.

Aos colegas do laboratório de farmacologia; todos serão lembrados de maneira recíproca e especial por terem passado momentos importantes ao meu lado. Em especial gostaria de agradecer ao Diego Mascarenhas por toda a companhia e grande amizade, sempre esteve ao meu lado fornecendo apoio e sugestões valiosas. A Maria Adriele Vicente por toda amizade e troca de experiências que, de alguma maneira, contribuíram para o meu aperfeiçoamento durante o doutorado. Ao Lucas Souza, Willian Costa, Lucas Barretto pelo auxílio nas dúvidas que surgiam sobre cardio.

A todos da minha família que sempre torceram por mim. Aos que estão neste plano físico e aos que já partiram sem conseguirem a verdadeira finalização desta etapa importante da minha vida. Obrigada por todos os bons momentos, conselhos, memórias e boas energias.

Ao Luiz Ricardo Galhardo por todo carinho, companheirismo, bons momentos e troca de experiências. Obrigada por tanto que faz por mim e por todo acolhimento carinhoso de sua família.

A todos os amigos. Em especial aos que sempre estão presentes no dia-a-dia por toda força e amizade: Leticia B. Marega, Mariana Rozzato, Mariane Baiocato, Priscila Pratinha, Daniela Hartmann, Franciele Baveloni, Tati Sorregotti, Thassia Lima, Roberta Souza, Juliana Ioste Natália Pedroso.

A Faculdade de Ciências Farmacêuticas e ao laboratório de Farmacologia da UNESP por terem cedido espaço para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

A todos os colaboradores da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara/SP e do Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas UFSCar/UNESP.

Aos órgãos de fomento Capes pelo apoio financeiro, FAPESP e CNPq por terem contribuído com os custos deste projeto.



## RESUMO

Há décadas a N-acetilcisteína (NAC) tem apresentado efeitos benéficos para o tratamento de algumas enfermidades. Esse pró-fármaco apresenta diversos mecanismos de ação e suas consequências no organismo ainda não são totalmente compreendidas. Recentemente, seus efeitos sobre a neurotransmissão glutamatérgica central, transtornos psiquiátricos e a resposta ao estresse tem sido explorados. A dependência ao etanol e alterações cardiovasculares e autônomas induzida ao estresse são considerados problemas de saúde pública e responsáveis por grande quantidade de mortes do mundo. Ambos os problemas possuem relação com disfunções na neurotransmissão glutamatérgica central.

Assim, nosso primeiro objetivo foi investigar se a NAC era capaz de reverter um dos estados emocionais negativos da síndrome de abstinência ao etanol, a ansiedade. Para isto, ratos Wistar foram induzidos a comportamentos relacionados com a ansiedade no Labirinto em Cruz Elevado (LCE) após retirado o tratamento de etanol ofertado em seus bebedouros e de injeções intraperitoneais de etanol (2 g/kg) por 11 dias. Durante a exposição ao etanol os animais também receberam por 10 dias injeções intraperitoneais de NAC nas doses de 30; 60 e 120 mg/kg e no 11º dia, dia do teste do LCE, os animais não receberam NAC ou somente receberam uma única injeção de NAC 2 horas antes do teste no LCE. As concentrações de etanol no sangue também foram verificadas para analisar mudanças farmacocinéticas do etanol e o melhor momento para investigar a síndrome de abstinência. O segundo objetivo do estudo investigou os efeitos da NAC na possível reversão de parâmetros cardiovasculares alterados pela exposição do estresse de restrição repetido ou agudo. Os resultados obtidos mostraram que a NAC não foi capaz de reverter os comportamentos relacionados com a ansiedade após a retirada do tratamento com etanol. A NAC também não reverteu as alterações cardiovasculares induzidas ao estresse de restrição como pressão arterial, frequência cardíaca e temperatura da cauda. Porém, na resposta dos barorreflexos, a NAC apresentou um efeito potencial em alteração a sensibilidade dos mesmos. De maneira aguda, 2 horas antes da análise das funções dos barorreflexos, a NAC reduziu a taquicárdia. Após 24 horas de sua administração aguda e após a sua administração crônica, a NAC apresentou aumento bradicárdico e redução da frequência cardíaca intrínseca em animais normotensos, e, quando associado à exposição ao estresse, reduziu o tônus simpático, aumentou a frequência cardíaca intrínseca e reduziu a função bradicárdica. Portanto, o seu uso requer cautela, devido alterações na frequência cardíaca e alterações na sensibilidade do barorreflexo.

**Palavras-chave:** N-acetilcisteína; etanol; estresse; ansiedade; barorreflexo.

## ABSTRACT

N-acetylcysteine (NAC) for decades, has been shown to have beneficial effects for the treatment of some diseases. Recently, based on central glutamatergic neurotransmission, psychiatric disorders and the stress response have been explored. Ethanol addiction and cardiovascular and autonomic changes in the exposure of stress are considered public health problems and responsible for a large number of deaths in the world. Both problems are related to dysfunctions in central glutamatergic neurotransmission. Thus, our first objective was to investigate whether NAC was able to reverse one of the negative emotional states of the ethanol withdrawal syndrome, anxiety. For this, Wistar rats were induced to anxiety-related behaviors in the Elevated Plus Maze (EPM) after withdrawing the treatment of ethanol offered in their drinking fountains and intraperitoneal injections of ethanol (2 g / kg) for 11 days. During ethanol exposure, the animals also received 10-day intraperitoneal injections of NAC at doses of 30; 60 and 120 mg / kg and on day 11, on the day of the EPM test, the animals did not draw NAC or only received a single injection of NAC 2 hours before the EPM test. Ethanol concentrations in blood were also checked to analyze ethanol pharmacokinetic changes and the best time to investigate withdrawal symptoms. The second objective of the study investigated the effects of NAC on the possible reversal of cardiovascular parameters altered by exposure of the stress of repeated or acute restriction. The results showed that NAC was not able to revert anxiety-related behaviors after treatment withdrawal with ethanol. The NAC also did not reverse the cardiovascular changes induced by restriction stress such as blood pressure, heart rate and tail temperature. However, in the response of the baroreflex, the NAC presented a potential effect in altering their sensitivity. Acutely 2 hours before analysis of baroreflex functions, NAC reduced tachycardia. After 24 hours of its acute administration and after its chronic administration, NAC presented bradycardic increase and reduction of intrinsic heart rate in normotensive animals. When associated with stress exposure reduced sympathetic tone, increased intrinsic heart rate and reduced bradycardic function. Therefore, its use requires caution, due to changes in the cardiac frequency and changes in baroreflex sensitivity.

**Keywords:** N-acetylcysteine; ethanol; stress; anxiety; baroreflex

## LISTA DE SIGLAS DE ABREVIATURAS

(s) – segundos

Ac - Núcleo Acumbens

CeA - amígdala Central

CPF - Córtex Pré-Frontal

CRF - Fator Liberador de Corticotropina

EPM – erro padrão da média

ER – estresse por restrição

FC – frequência cardíaca

FCI – frequência cardíaca intrínseca

FENIL – fenilefrina

Freq – frequência

GABA - Ácido Gama-Amino-Butírico

GAT-3 - transportador do neurotransmissor GABA

GLT-1 – transportador glutamatérgico glial do tipo 1

mGluRs - receptores metabotrópicos glutamatérgicos

GSH – glutationa

GSSG –dissulfito glutationa

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - peróxido de hidrogênio

HIV – Vírus da imunodeficiência humana

HPA - Hipotálamo-Pituitária-Adrenal

i.p. – injeção intraperitoneal

ICR – International Cancer Research

Kappa B – fator de transcrição nuclear

KCl – cloreto de potássio

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – fosfato monopotássico

LCE - Labirinto em Cruz Elevado

L-cisteína – Cisteína livre

METIL – metilatropina

MVRL - Medula Ventrolateral Rostral

Na<sup>+</sup> - Sódio

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - Fosfato dissódico ou hidrogenofosfato dissódico

NAC – N-acetilcisteína

NaCl – cloreto de sódio  
NMDA - N-Metil-D-Aspartato  
NO – óxido nítrico  
NPS – nitroprussiato de sódio  
NTS – Núcleo do Trato Solitário  
PA – pressão arterial  
PAD - pressão arterial diastólica  
PAM - pressão arterial média  
PAP – pressão arterial pulsátil  
PAS - pressão arterial sistólica  
PBS - tampão fosfato salino  
PROP – propranolol  
ROS – espécies reativas de oxigênio  
RVLM - núcleo rostral da medula ventrolateral  
SH – Sulfidril  
SHR – ratos espontâneo hipertensivo (em inglês: spontaneously hypertensive rat)  
s.c.- subcutânea  
SNC – Sistema Nervoso Central  
TEMP – temperatura  
TOC - transtorno obsessivo-compulsivo  
xCT - trocador cistina/glutamato  
4°v - quarto ventrículo  
WKY – ratos Wistar Kyoto  
 $\Delta$ PAM - Variação da pressão arterial média  
 $\Delta$ FC - Variação da frequência cardíaca  
 $\Delta$ TEMP - variação da temperatura da cauda

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Efeito da NAC na neurotransmissão glutamatérgica.....	5
<b>Figura 2.</b> Comportamento relacionados à ansiedade induzidos pela exposição repetida do etanol.....	35
<b>Figura 3.</b> Ausência de efeitos do tratamento crônico com N-acetilcisteína (NAC) nas doses 30, 60 e 120 mg/kg nos comportamentos relacionados à ansiedade induzidos pela abstinência ao etanol.....	38
<b>Figura 4.</b> Ausência de efeitos do tratamento com N-acetilcisteína (NAC) agudo nas doses 30, 60 e 120 mg/kg nos comportamentos relacionados a ansiedade induzidos pela síndrome de abstinência ao etanol.....	41
<b>Figura 5.</b> Concentração de etanol no sangue dos ratos após exposição ao tratamento agudo ou repetido de etanol e/ou N-acetilcisteína (NAC, 60 mg/kg, i.p.).....	42
<b>Figura 6.</b> Resumo do protocolo experimental do experimento 1.....	43
<b>Figura 7.</b> Resumo do protocolo experimental do experimento 2.....	44
<b>Figura 8.</b> Resumo do protocolo experimental do experimento 3.....	46
<b>Figura 9.</b> Resumo do protocolo experimental do experimento 4.....	47
<b>Figura 10.</b> Resumo do protocolo experimental do experimento 5.....	48
<b>Figura 11.</b> Resumo do protocolo experimental do experimento 6.....	50
<b>Figura12.</b> Parâmetros cardiovasculares basais dos animais submetidos a uma injeção intraperitoneal de veículo, NAC 60 ou 120 mg/kg.....	52

<b>Figura 13.</b> Balanço autônomo dos animais após 2 horas de serem submetidos a uma injeção intraperitoneal de veículo, NAC 60 ou 120 mg/kg.....	52
<b>Figura 14.</b> Regressão linear do barorreflexo e análise do ganho da regressão linear após 2 horas dos animais serem submetidos a uma injeção intraperitoneal de veículo, NAC 60 ou 120 mg/kg.....	53
<b>Figura 15.</b> Parâmetros cardiovasculares basais dos animais 24 horas após a injeção intraperitoneal aguda de veículo, NAC 60 ou 120 mg/kg.....	54
<b>Figura 16.</b> Balanço autônomo dos animais 24 horas após a injeção intraperitoneal aguda de veículo, NAC 60 ou 120 mg/kg.....	54
<b>Figura 17.</b> Regressão linear do barorreflexo e análise do ganho da regressão linear dos animais 24 horas após a injeção intraperitoneal aguda de veículo, NAC 60 ou 120 mg/kg.....	55
<b>Figura 18.</b> Parâmetros cardiovasculares basais dos animais dos animais que receberam o tratamento crônico de veículo, NAC 60 ou 120 mg/kg, i.p. por 10 dias.....	56
<b>Figura 19.</b> Balanço autônomo dos animais dos animais que receberam o tratamento crônico de veículo, NAC 60 ou 120 mg/kg, i.p. por 10 dias.....	57
<b>Figura 20.</b> Regressão linear do barorreflexo e análise do ganho da regressão linear dos animais que receberam o tratamento crônico de veículo, NAC 60 ou 120 mg/kg, i.p. por 10 dias.....	58
<b>Figura 21.</b> Estudo dos efeitos do tratamento crônico de N-acetilcisteína sobre o barorreflexo e balanço autônomo desencadeadas por estresse de restrição repetido.....	60

**Figura 22.** Balanço autônomo dos animais que receberam injeção intraperitoneal por dia de veículo, NAC 60 ou 120 mg/kg 1h antes da exposição do estresse de restrição repetido com duração de 1h sendo 1 sessão por dia durante 10 dias.....61

**Figura 23.** Regressão linear do barorreflexo e análise do ganho da regressão linear dos animais que receberam injeção intraperitoneal por dia de veículo, NAC 60 ou 120 mg/kg 1h antes da exposição do estresse de restrição repetido com duração de 1h sendo 1 sessão por dia durante 10 dias.....62

**Figura 24.** Parâmetros cardiovasculares basais dos animais expostos ao estresse de restrição agudo após 1 hora da injeção intraperitoneal de N-Acetilcisteína.....63

**Figura 25.** Variação da pressão arterial média ( $\Delta$ PAM) dos animais expostos ao estresse de restrição agudo após 1 hora da injeção intraperitoneal de N-Acetilcisteína.....64

**Figura 26.** Variação da frequência cardíaca ( $\Delta$ FC) dos animais expostos ao estresse de restrição agudo após 1 hora da injeção intraperitoneal de N-Acetilcisteína.....64

**Figura 27.** Variação da temperatura da cauda ( $\Delta$ TEMP) dos animais expostos ao estresse de restrição agudo após 1 hora da injeção intraperitoneal de N-Acetilcisteína.....65

**Figura 28.** Parâmetros cardiovasculares basais dos animais expostos ao estresse de restrição repetido por 1h por dia após 1 hora da injeção intraperitoneal de veículo, NAC 60 ou 120 mg/kg por 10 dias.....67

**Figura 29.** Variação da pressão arterial média ( $\Delta$ PAM) ao longo da exposição ao estresse de restrição agudo e durante a recuperação a este estímulo após a injeção intraperitoneal de N-acetilcisteína aguda.....68

**Figura 30.** Variação da frequência cardíaca ( $\Delta FC$ ) ao longo da exposição ao estresse de restrição agudo e durante a recuperação a este estímulo após a injeção intraperitoneal de N-acetilcisteína aguda.....69

**Figura 31.** Representação da variação da temperatura da cauda ( $\Delta TEMP$ ) (gráfico superior) e a média da variação da temperatura da cauda em °C (gráfico inferior) ao longo da exposição ao estresse de restrição agudo e durante a recuperação a este estímulo após a injeção intraperitoneal de N-acetilcisteína aguda.....69



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Medidas complementares para a ansiedade durante a abstinência ao etanol (Experimento1).....	36
<b>Tabela 2.</b> Medidas complementares para a ansiedade e falta de efeitos do tratamento crônico da N-acetilcisteína (NAC) durante a abstinência ao etanol (Experimento 2).....	39
<b>Tabela 3.</b> Medidas complementares para a ansiedade e falta de efeitos do tratamento agudo de N-acetilcisteína (NAC) durante a abstinência ao etanol (Experimento 3).....	42
<b>Tabela 4.</b> Resumo dos resultados obtidos nos experimentos de barorreflexo.....	70

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1. Introito da N-Acetilcisteína (NAC).....	1
1.2. Apresentação farmacêutica, farmacocinética e farmacodinâmica da NAC com ênfase no Sistema Nervoso Central (SNC).....	3
1.3. Farmacodinâmica da NAC com ênfase no Sistema Periférico.....	7
1.4. Aspectos da dependência ao etanol e sistema cardiovascular com estresse.....	8
1.5. Evidências atuais na pesquisa clínica da NAC.....	18
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>22</b>
2.1. <i>1º trabalho: NAC nos comportamentos relacionados a ansiedade na retirada ao etanol.....</i>	<i>22</i>
2.2. <i>2º trabalho: NAC e alterações cardiovasculares induzidas por estresse.....</i>	<i>22</i>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>23</b>
3.1. Animais.....	23
3.2. Substâncias utilizadas.....	23
3.3. Procedimentos experimentais.....	26
3.3.1. Indução da síndrome de abstinência ao etanol.....	26
3.3.2. Análise dos comportamentos relacionados a ansiedade no Labirinto em Cruz Elevado (LCE).....	26
3.3.3. Dosagem dos níveis de etanol no sangue.....	28
3.3.4. Estresse por Restrição (ER).....	28
3.3.5. Cirurgia para canulação da artéria e veia femoral.....	28
3.3.6. Registros da pressão arterial e frequência cardíaca.....	29
3.3.7. Registro da temperatura cutânea.....	29
3.3.8. Avaliação da atividade barorreflexa.....	29
3.3.9. Avaliações da atividade simpática e parassimpática cardíaca.....	30
<b>4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DO <u>1º TRABALHO</u>: NAC NOS COMPORTAMENTOS RELACIONADOS A ANSIEDADE NA RETIRADA AO ETANOL.....</b>	<b>31</b>
4.1. <i>Experimento 1: Avaliação dos comportamentos relacionados à ansiedade durante a abstinência após a retirada do tratamento repetido com etanol.....</i>	<i>31</i>

4.2. Experimento 2: Avaliação do efeito do tratamento crônico com NAC durante o tratamento com etanol sobre comportamentos relacionados à ansiedade na abstinência.....	31
4.3. Experimento 3: Avaliação do efeito agudo da NAC sobre comportamentos relacionados a ansiedade na abstinência de etanol.....	32
4.4. Experimento 4: Avaliação da concentração plasmática de etanol após o tratamento agudo e crônico com etanol e também NAC.....	32
<b>5. ANÁLISE DOS DADOS DO 1º TRABALHO: NAC NOS COMPORTAMENTOS RELACIONADOS A ANSIEDADE NA RETIRADA AO ETANOL.....</b>	<b>33</b>
<b>6. RESULTADOS DO 1º TRABALHO: NAC NOS COMPORTAMENTOS RELACIONADOS A ANSIEDADE NA RETIRADA AO ETANOL.....</b>	<b>34</b>
6.1. Experimento 1: Avaliação dos comportamentos relacionados à ansiedade durante a abstinência após a retirada do tratamento repetido com etanol.....	34
6.2. Experimento 2: Avaliação do efeito do tratamento crônico com NAC durante o tratamento com o etanol sobre comportamentos relacionados à ansiedade na abstinência.....	36
6.3. Experimento 3: Avaliação do efeito agudo da NAC sobre comportamentos relacionados a ansiedade na abstinência de etanol.....	39
6.4. Experimento 4: Avaliação da concentração plasmática do etanol após o tratamento agudo e crônico com etanol e também NAC.....	42
<b>7. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DO 2º TRABALHO: NAC E ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES INDUZIDAS POR ESTRESSE.....</b>	<b>43</b>
7.1. Experimento 1: Estudo da ação aguda após 2 horas de NAC na função cardiovascular.....	43
7.2. Experimento 2: Estudo da ação aguda após 24 horas de NAC na função cardiovascular.....	44
7.3. Experimento 3: Estudo dos efeitos do tratamento crônico com NAC sobre o barorreflexo e balanço autônomo.....	45
7.4. Experimento 4: Estudo dos efeitos do tratamento crônico com NAC sobre o barorreflexo e balanço autônomo desencadeadas por estresse de restrição repetido.....	46
7.5. Experimento 5: Efeitos da ação aguda após 2 horas do tratamento com NAC sobre as alterações cardiovasculares desencadeadas por estresse de restrição agudo.....	48

7.6. <i>Experimento 6: Efeitos da ação do tratamento crônico com NAC sobre as alterações cardiovasculares desencadeadas por estresse de restrição repetido</i> .....	49
<b>8. ANÁLISE DOS DADOS DO <u>2º TRABALHO</u>: NAC E ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES INDUZIDAS POR ESTRESSE</b> .....	<b>50</b>
<b>9. RESULTADOS DO <u>2º TRABALHO</u>: NAC E ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES INDUZIDAS POR ESTRESSE</b> .....	<b>51</b>
9.1. <i>Experimento 1: Estudo da ação aguda após 2 horas de NAC na função cardiovascular</i> .....	51
9.2. <i>Experimento 2: Estudo da ação aguda após 24 horas de NAC na função cardiovascular</i> .....	53
9.3. <i>Experimento 3: Estudo dos efeitos do tratamento crônico com NAC sobre o barorreflexo e o balanço autônomo</i> .....	55
9.4. <i>Experimento 4: Estudo dos efeitos do tratamento crônico com NAC sobre o barorreflexo e balanço autônomo desencadeadas por estresse de restrição repetido</i> .....	58
9.5. <i>Experimento 5: Investigar os efeitos agudos de N-acetilcisteína sobre as alterações cardiovasculares desencadeadas por estresse agudo de restrição</i> .....	62
9.6. <i>Experimento 6: Estudo dos efeitos do tratamento crônico de N-acetilcisteína sobre as alterações cardiovasculares desencadeadas pela exposição a um protocolo por estresse de restrição repetido</i> .....	65
<b>10. DISCUSSÃO</b> .....	<b>71</b>
<b>11. CONCLUSÃO FINAL</b> .....	<b>81</b>
<b>12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>82</b>
<b>13. APROVAÇÃO DOS COMITÊS DE ÉTICA (CEUA)</b> .....	<b>102</b>
13.1. CEUA – Trabalho 1.....	102
20.2. CEUA – Trabalho 2.....	103

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1. Introito da N-acetilcisteína (NAC)**

A N-acetilcisteína (NAC,  $C_5H_9NO_3S$ ) é um pró-fármaco proveniente da cisteína livre (L-Cisteína,  $C_3H_7NO_2S$ ), ou seja, é um fármaco em sua forma inativa que após passar por biotransformação, fica em sua forma ativa que é a acetilcisteína, e após isto, se desacetila em L-cisteína.

A NAC é amplamente utilizada na prática clínica como agente mucolítico (HURST et al., 1967; RUSHWORTH; MEGSON; 2014) em patologias pulmonares por hidrolisar o muco (MILLAR et al., 1985) e favorecer a oxigenação sistêmica (SUTER et al, 1994; AUGUSTÍ, 1997).

Foi introduzida como um agente farmacológico promissor para o tratamento da fibrose cística em 1960 (RUSHWORTH; MEGSON, 2014). Uma década depois, ela apresentou excelentes resultados para o tratamento de overdose por acetaminofeno (paracetamol) (RUSHWORTH; MEGSON, 2014), restaurando a glutatona (GSH) hepática destes pacientes intoxicados com o anti-inflamatório (HEARD, 2008).

A partir do acompanhamento de pacientes com lesão hepática foram identificados efeitos da NAC no sistema cardiovascular (HARRISON et al., 1991) e melhora significativa na oxigenação sem a ventilação mecânica em alguns pacientes, demonstrando um efeito sistêmico benéfico por ela (SUTER et al., 1994). Também foi observado melhora na proteção da função renal (HOLT et al., 1999; HUANG et al., 2018) e melhora na função renal em pacientes com nefrotoxicidade induzida pelo contraste radiográfico (TEPEL et al., 2000). Embora o mecanismo de ação da NAC não seja totalmente compreendido, estes efeitos benéficos foram atribuídos ao poderoso efeito antioxidante e protetor celular da GSH que tem sua síntese aumentada pela administração de NAC por consequente aumento na biodisponibilidade de L-cisteína, um dos precursores da GSH (CHAKRABORTI et al., 2007; CAO et al., 2012; JOHNSON et al., 2012; RUSHWORTH; MEGSON; 2014).

Devido a estes achados clínicos, há algumas décadas a NAC vêm sendo utilizada na prática clínica para a minimização do impacto da lesão de reperfusão no tratamento do infarto do miocárdio, devido ao seu efeito nos radicais livres de oxigênio, proteção dos grupos sulfidril (-SH) e proteção da membrana celular

sobre a função endotelial e em compartimentos extravasculares (HARRISON et al., 1991). Além disto, esse pró-fármaco pode ser empregado como terapia complementar em pacientes com HIV por promover a melhora na capacidade dos linfócitos T (BREITKREUTZ et al., 2000).

Recentemente, foi observado excelente efeito protetor cerebral da NAC em humanos (HOFFER et al., 2013) e roedores (BAKI et al., 2010; GOU et al., 2015; DU et al., 2016) que sofreram lesões traumáticas medular e cerebral. Alguns estudos também tem relacionado o envolvimento indireto da NAC na restauração do balanço da neurotransmissão sináptica glutamatérgica no sistema nervoso central (SNC) (BAKER et al., 2003; SCHMAAL et al., 2011).

Apesar da NAC ser controversa na literatura, em atravessar (McELTAN et al., 1995; SAMUNI et al., 2013) ou não a barreira hematoencefálica íntegra (DU et al., 2016), vários estudos vêm sendo desenvolvidos para tentar investigar o seu mecanismo de ação no SNC, e com isto, a NAC têm se mostrado promissora no tratamento de transtornos neuropsiquiátricos, como: transtorno obsessivo-compulsivo (TOC), tricotilomania, esquizofrenia e doença bipolar (DEAN et al., 2011), bem como na dependência de maconha, nicotina e cocaína (BERK et al., 2013). Porém, pouco se sabe dos seus efeitos relacionados com a substância etanol e mecanismos cardiovasculares em relação ao estresse que são duas vertentes distintas de problemas que acometem a população mundial e são responsáveis pelo maior número de mortes no mundo em que a dependência ao etanol está entre um dos maiores fatores de risco de morbidade e mortalidade responsável por 5,9% da mortalidade mundial (WHO, 2013) e as doenças cardiovasculares responsáveis por 31% das mortes do mundo (WHO, 2016).

Apesar das causas destes dois problemas de saúde pública não estarem diretamente relacionadas entre si e possuírem centros clássicos de ativação encefálica distintos em resposta aos efeitos da dependência ao etanol ou a patologias do sistema cardiovascular relacionadas à exposição ao estresse, ambos os problemas possuem alterações no funcionamento e equilíbrio dos sistemas de neurotransmissão Gabaérgico e Glutamatérgico e promovem a ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA)(KOOB, 2009; HERMANN et al., 2011; MARTISOVA et al., 2012; SANTINI et al., 2013; GORKA et al., 2015;

GILPIN et al., 2015; HOUTEPEN et al., 2017; FERREIRA-JUNIOR et al., 2018) e por isto são o foco deste trabalho.

## **1.2. Apresentação farmacêutica; farmacocinética e farmacodinâmica da NAC com ênfase no Sistema Nervoso Central (SNC)**

As vias de administração da NAC mais utilizadas são a via intravenosa, a via oral ou a administração por via inalatória (SAMUNI et al., 2013). Quando comparado o uso da NAC oral com intravenoso ambos apresentam efetividade parecidas em sua utilização (KANTER, 2006). O pró-fármaco NAC é mais seguro e apresenta maior biodisponibilidade e é mais aceito quando comparado ao tratamento com outras formas farmacêuticas de dispensação que podem ser pela administração por via parenteral do aminoácido não essencial cisteína (ATKURI et al., 2007) e por administração por via intravenosa da forma farmacêutica ativa, a acetilcisteína (HEARD, 2008).

A NAC, por ser mais solúvel em água, torna-se melhor fonte de cisteína do que a própria cisteína utilizada por via parenteral. A presença da porção acetil (-CO-CH<sub>3</sub>) na molécula de NAC reduz a reatividade do grupo sulfidril (-SH, que é um tiol) em comparação com a cisteína sendo menos tóxica e menos susceptível a oxidação e dimerização (ATKURI et al., 2007), atingindo a funcionalidade de um pró-fármaco.

Em relação à acetilcisteína, devido as suas propriedades organolépticas desagradáveis, a preferência pelos pacientes pela administração por via intravenosa deste fármaco pode causar efeitos adversos com erro da dosagem, como: edema cerebral e hiponatremia (HEARD, 2008), que é a alteração metabólica caracterizada pela baixa concentração de sódio no sangue em relação ao volume de água no organismo. Já o pró-fármaco NAC possui propriedades que mascaram os efeitos desagradáveis do fármaco quando administrado por via oral e quando administrado por via intravenosa não atravessa a barreira hematoencefálica íntegra devido ao seu carregamento negativo (RAFTOS et al., 2007; DU et al., 2016), sendo mais seguro que a acetilcisteína.

A NAC quando administrada por via oral passa por extenso metabolismo de 1ª passagem no fígado (ATKURI et al., 2007; SAMUNI et al., 2013). Neste processo de metabolização a NAC é desacetilada no interior das células em duas moléculas de cisteína e as moléculas de cisteína são liberadas aumentando as

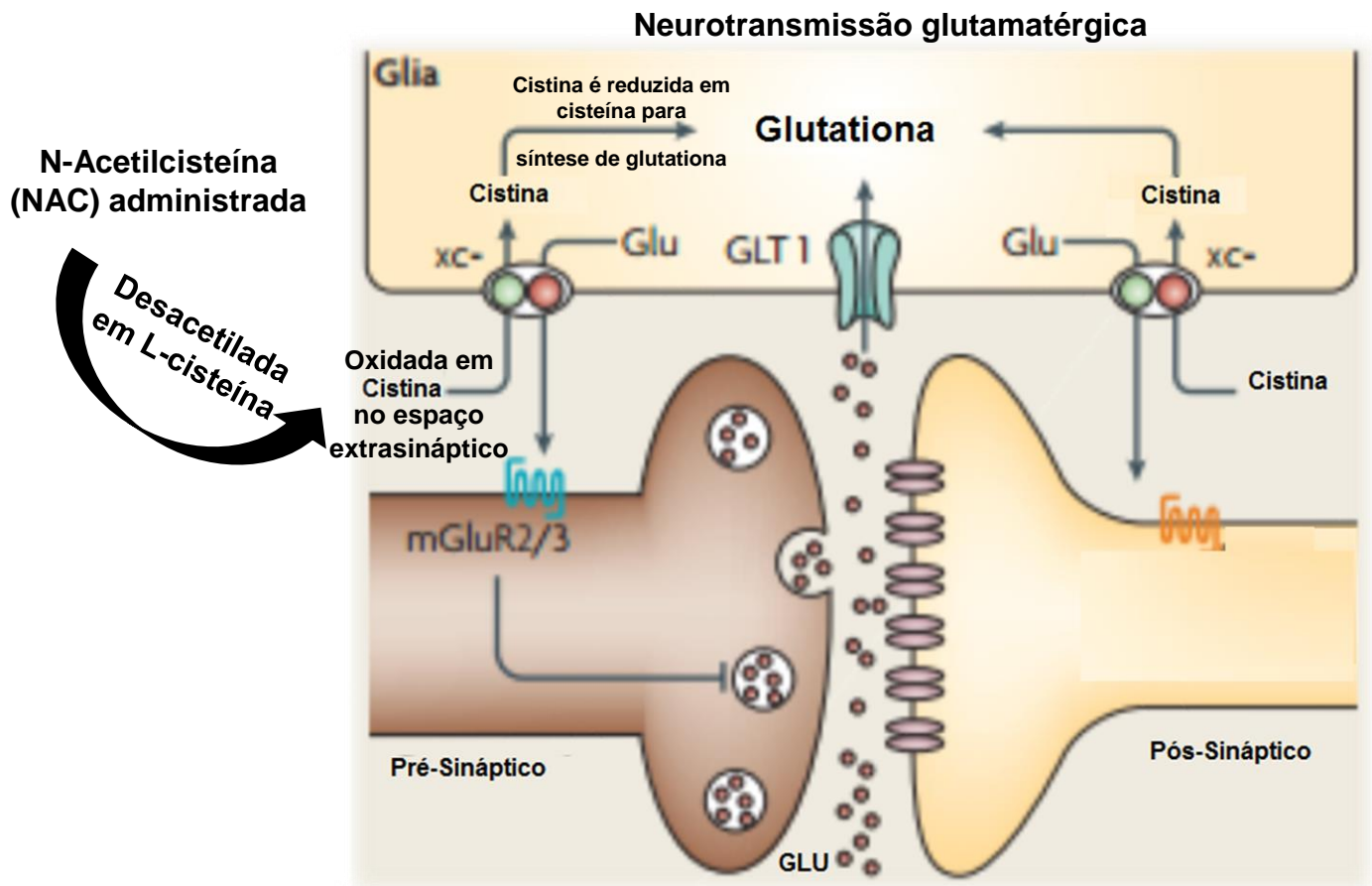
concentrações de L-cisteína existentes no plasma que em condições normais são baixas (ATKURI et al., 2007; RAFTOS et al., 2007).

Após a NAC ser desacetilada, a L-cisteína consegue atravessar a barreira hematoencefálica por intermédio do sistema L (WADE; BRADE, 1981). O sistema L é composto por transportadores com o mecanismo predominante de transporte de um aminoácido do sangue para o encéfalo (WADE; BRADE, 1981). Este sistema também está presente na barreira hematoencefálica (HOSOYA et al., 2002) e é parte da família SCL7 dos transportadores de aminoácidos independentes de Na<sup>+</sup> (JOHNSON et al., 2012).

Assim, alguns estudos vêm relacionando o envolvimento indireto da NAC na restauração do balanço da neurotransmissão sináptica glutamatérgica no SNC através do envolvimento do trocador cistina/glutamato (xCT) (BAKER et al., 2003; SCHMAAL et al., 2011).

Portanto, no espaço extrassináptico a L-cisteína sofre oxidação sendo convertida em cistina (HOSOYA et al., 2002) que é constituída por duas moléculas de cisteína ligadas por pontes de dissulfureto (RAFTOS et al., 2007). O aumento de cistina no espaço extrassináptico aumenta a atividade do trocador XCT presente nas células dos astrócitos (HOSOYA et al., 2002; KALIVAS, 2009), que é um sistema de transporte independente de Na<sup>+</sup> e sensível à redução de glutamato (JOHNSON et al., 2012). A cistina dentro dos astrócitos é rapidamente reduzida para formar a cisteína que serve como substrato para síntese do tripeptídeo extremamente reativo a GSH (JOHNSON et al., 2012), como ilustrado na figura 1. A GSH é um importante antioxidante e protetor celular (ATKURI et al., 2007; JOHNSON et al., 2012) encontrado em todas as células do corpo, incluindo o tecido cerebral (WADE; BRADE, 1981; ATKURI et al., 2007; JOHNSON et al., 2012; ZHOU et al., 2015). Portanto, os astrócitos possuem concentrações mais elevadas de GSH e capacidade de secretar para o espaço extracelular e fornecer GSH para células neuronais que possuem quantidades menores de GSH (JOHNSON et al., 2012).





**Figura 1: Efeito da NAC na neurotransmissão glutamatérgica.** NAC: N-acetilcisteína; XC: Trocador cistina/glutamato; GLUT-1: – transportador glutamatérgico glial do tipo 1; LTD: depressão longo-termo; mGluR2/3: receptor glutamatérgico do tipo 2/3; mGluR5: receptor glutamatérgico do tipo 5. Imagem adaptada de KALIVAS, *Nature Reviews Neuroscience*, 10 (2009).

A GSH é uma molécula antioxidante endógena de eliminação de radicais livres (DRINGER et al., 2000). Ela é formada a partir da união de cisteína, glicina e ácido glutâmico que a caracteriza como um tripeptídeo. A união destes aminoácidos é catalisada pelas enzimas  $\gamma$ -glutamato-cisteína-ligase (GCL) e a GSH sintetase que ocorre no citosol das células (GIUSTARINI et al., 2012; ZHOU et al., 2015). O aumento da síntese de GSH aumenta as taxas redox nos tecidos que é formada pela razão redox da forma reduzida da GSH por sua forma oxidada de dissulfeto glutatona (GSSG) (DRINGER et al., 2000; JOHNSON et al., 2012) que são inversamente proporcionais. O aumento da taxa redox após a administração intravenosa ocorre em 60 minutos pelo aumento de GSH e redução de GSSH(ZHOU et al., 2015).

Neste sentido, distúrbios na homeostase de GSH em que ocorre o desequilíbrio na razão redox de GSH/GSSH para o aumento das quantidades de GSSH é considerado como um aumento para a suscetibilidade ao estresse oxidativo, que é caracterizado como um aumento descoordenado do metabolismo celular produzindo espécies reativas de oxigênio (ROS) através da respiração celular e esgotamento da produção de moléculas endógenas que possuem a função de remover as ROS, sendo uma condição biológica em que ocorre o desequilíbrio nos sistemas redox das células e favorece o envelhecimento celular (LUSHCHAK, 2014; BREITENBACH; ECKL, 2015).

O estresse é uma condição de resposta altamente individualizada de um organismo a fatores do meio ambiente ou estímulo externo em que coloca em risco o seu bem-estar (BUTLER, 1993; GUEDRI et al., 2017) e a homeostase do seu organismo (HUERTA-FRANCO et al., 2013). A resposta primária do organismo para restabelecer a homeostase é neuroendócrina por hiperatividade do sistema hormonal do eixo HPA que resulta em níveis aumentados de glicocorticóides circulantes com o propósito de preparar o organismo para o estímulo estressor e promover uma redistribuição de energia em uma ampla gama de sistema e órgãos (BUTLER, 1993; URSIN; ERIKSEN, 2004; BREITENBACH; ECKL, 2015; HERMAN et al., 2016). Quando a resposta do indivíduo em relação aos fatores do meio ambiente é mal-adaptada, devido a exposição repetida do estímulo estressor, ocorre alterações permanentes no funcionamento do organismo do indivíduo que são fisiológicas, cognitivas, comportamentais e emocionais (BUTLER, 1993; TOFOLI et al., 2011; HERMAN et al., 2016) e o indivíduo deixa de responder adequadamente a ameaças emocionais ou físicas (STEPTOE, 1991; TOFOLI et al., 2011) e com isto, ocorre esgotamento dos recursos adaptativos naturais do organismo (STEPTOE, 1991; SCANDALIOS, 2005) como por exemplo, o gasto das reservas de GSH resultando em patologias no indivíduo como demonstrado pelos autores Chakraborti et al., (2008) que após ratos Wistar serem submetidos ao estresse de restrição, apresentaram redução das concentrações de GSH no tecido cerebral e aumento dos comportamentos relacionados a ansiedade e os animais que foram submetidos ao estresse de restrição e receberam tratamento com a NAC apresentaram as concentrações de GSH similares aos dos que não foram

submetidos a nenhuma das exposições (grupo controle) e apresentaram ausência de comportamentos relacionados a ansiedade.

### **1.3. Farmacodinâmica da NAC com ênfase no Sistema periférico**

Apesar de alguns de seus efeitos estarem relacionados com o aumento de cisteína necessária para a síntese da GSH (JOHNSON et al., 2012; CAO et al., 2012) a NAC também possui efeitos similares a de um antioxidante, favorecendo também a produção da enzima GSH-peroxidase que possui uma maior eficiência em neutralizar os radicais livres devido ao fato de reagir lentamente com espécies de oxigênio ( $H_2O_2$ ) seguida pela perda de sulfidril (-SH, tiol) (AROUMA et al., 1989). Como demonstrado pelos autores Ozaras et al., (2003) que ratos Wistar submetidos ao tratamento com etanol apresentaram redução das concentrações de GSH-peroxidase da hemoglobina e quando eram tratados com NAC apresentavam as concentrações de GSH-peroxidase similares ao grupo controle.

A velocidade destas reações possui constantes de velocidade com ordens inferiores em relação a outros antioxidantes (sequestradores de radicais livres). Portanto, existem diferenças em relação aos outros antioxidantes (LEE et al., 2010; JOHNSON et al., 2012) devido a molécula de cisteína também ser capaz de se ligar a muitas substâncias formando complexos devido ao grupo sulfidril que compõe esta molécula (ATKURI et al., 2007). A cisteína pode formar complexos que são eliminados (KOH et al., 2002) se ligando a radicais livres (ATKURI et al., 2007) ou quelando metais pesados (KOH et al., 2002) e também reage com grupos eletrolíticos de espécies reativas de oxigênio livre que são geradas continuamente durante o metabolismo oxidativo (DRINGER et al., 2000). As ROS incluem moléculas inorgânicas como o radical superóxido aniônico, peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radicais hidroxila, bem como moléculas orgânicas que em excesso causam doenças cardiovasculares (FERNÁNDEZ et al., 2013) e desordens neuronais, incluindo doenças neurodegenerativas (DRINGER et al., 2000; ZHOU et al., 2015), porém estes mecanismos ainda são pouco conhecidos.

Além destes efeitos a NAC tem apresentado um mecanismo de ação de complexidade maior e ainda pouco compreendido como um importante regulador no sistema periférico nos canais de fluxo de cálcio (WALSH et al., 2007) e nos canais  $I_{to}$  de potássio (ROZANSKI; XU, 2002).

Quando ocorre estresse oxidativo, a consequência é o esvaziamento de reservas intracelulares de regulação fisiológica da célula (WALSH et al., 2007), levando o influxo de cálcio extracelular e estes aumentos são mediados pela oxidação de grupos sulfidrílo (tiol), presentes no citosol das células (DRINGER et al., 2000), que são provavelmente alvo de outros oxidantes gerados endogenamente, por exemplo, óxido nítrico (WALSH et al., 2007). Isto promove alterações no metabolismo e glicose celular fazendo com que ocorra, no caso das células do tecido cardíaco, um remodelamento dos canais de potássio (ROZANSKI; XU, 2002). Esta alteração no estado redox celular é controlado pelas concentrações relativas de GSH e GSSG (ROZANSKI; XU, 2002). No entanto, mais estudos são necessários para determinação das funções desempenhadas pela sinalização de cálcio na resposta celular aos oxidantes tiol produzidos durante a lesão aguda do tecido (WALSH et al., 2007). Além disto, a remodelação negativa do canal de potássio a longo prazo pode elevar a concentração de cálcio intracelular e acelerar processos de insuficiência cardíaca (ROZANSKI; XU, 2002).

Após administrado, o pró-fármaco NAC é eliminado totalmente do sangue em 280 minutos (ZHOU et al., 2015), sendo 30% eliminado por excreção renal (ATKURI et al., 2007; SAMUNI et al., 2013). Apesar disto, os efeitos benéficos da NAC são prolongados, mesmo após a sua total eliminação do sangue, devido a sua propriedade de sustentar a síntese e preservar as concentrações intracelulares do antioxidante GSH (JOHNSON et al., 2012; DU et al., 2016).

#### **1.4. Aspectos da dependência ao etanol e sistema cardiovascular com estresse**

Segundo o levantamento realizado pela Organização Mundial da Saúde dos problemas mundiais que são responsáveis pelo maior número de mortes no mundo, a dependência ao etanol está entre um dos maiores fatores de risco de morbidade e mortalidade, sendo responsável por 5,9% da mortalidade mundial (WHO, 2013) e as doenças cardiovasculares responsáveis por 31% das mortes do mundo (WHO, 2016).

Estes problemas de saúde pública são decorrentes do estilo de vida, variáveis genéticas, físicas (CEDERBAUM, 2013) e facilidades do cotidiano para obtenção de substâncias de uso abusivo, alimentos gordurosos ricos em

açúcares e sal (VASDEV et al., 2009) sob a influência de fatores externos como o estresse (KAGIAS et al., 2012; RUSSELL et al., 2017).

Em relação aos problemas relacionados com o uso abusivo de bebidas alcólicas, segundo o último levantamento feito pela secretaria nacional anti-drogas em 2007, 12,3% da população brasileira são classificadas como dependentes e a nível mundial a ingestão abusiva de álcool vem sendo cada vez mais frequente na população de pessoas acima de 15 anos de idade, sendo o consumo médio por pessoa de 6,4 litros de álcool puro (WHO, 2017). Este alto consumo está relacionado com 4 a 5% dos anos de vida ajustados por incapacidade (Disability-Adjusted Life Years) (SUDHINARASET et al., 2016), que são frequentemente associados a desidratação, esteatose hepática, pancreatite, doenças cardíacas, instabilidade muscular, neuropatia periférica, atrofia do cerebelo. Além de distúrbios de coordenação, delírios, alterações de humor e demência (EZZATI et al., 2002; HECKMANN; SILVEIRA, 2009) que podem desencadear violência e outros problemas como acidentes de trânsito (SUDHINARASET et al., 2016), pois quanto maior a concentração de etanol no sangue mais rapidamente alcançará o SNC (CEDERBAUM, 2013) causando uma série de modificações nas neurotransmissões que envolvem vários sistemas neurais abrangendo um mecanismo de ação complexo (LEWYS; JUNE, 1990; SCHUCKIT, 2012; KOOB; Le MOAL, 2008; EŞEL; DINÇ, 2017) e processos celulares, incluindo a oxidação neural (ZIMATKIN et al., 2006; WANG et al., 2013).

A dependência é uma desordem crônica e recorrente na qual a substância de uso abusivo se torna prioridade na vida do indivíduo (KOOB; LeMOAL, 2008) e é caracterizada pela perda de controle sobre o consumo da bebida alcóolica (KOOB et al., 2009; KOOB; VOLKOW, 2010), ou seja, o indivíduo deixa de sentir prazer pelo consumo da bebida alcóolica e passa a sentir “fissura”, que é um desejo incontrolável pela substância de uso abusivo, e do uso ocasional, o indivíduo passa a consumir de maneira abusiva e constante a bebida alcóolica devido a perda do controle para limitar o consumo (KOOB; Le MOAL, 2008).

As neuroadaptações e mecanismos neurais envolvidos no desenvolvimento da dependência não são totalmente conhecidos (KOOB, LeMOAL, 2001) e o mecanismo de ação do etanol é complexo e envolve os sistemas GABAérgico (principal sistema inibitório) e o sistema Glutamatérgico

(principal sistema excitatório) (EŞEL; DINÇ, 2017) e a resposta comportamental e cognitiva ao etanol é dose-dependente (SCHUCKIT, 2012).

Na fase inicial da dependência ocorrem dois processos distintos no SNC que levam a um desequilíbrio devido a mudanças persistentes na plasticidade sináptica das projeções dopaminérgicas da região VTA para as regiões do Ac e CPF (via mesocorticolímbica) (EDWARDS; KOOB, 2010), promovendo a perda da função neste sistema de recompensa e ao mesmo tempo ocorrem outras mudanças persistentes que promovem uma sensibilização na plasticidade sináptica potencializando as neurotransmissões da via antirrecompensa, que é uma via composta pelo tronco encefálico e amídala, sendo mediadas pelo Fator Liberador de Corticotropina (CRF) e outros neurotransmissores como a noradrenalina e dinorfina (EDWARDS; KOOB, 2010) que estão relacionados com a ativação do eixo HPA (SILBERMAN et al., 2015; KOOB; Le MOAL, 2008) tornando o indivíduo mais sensível ao estresse e a ansiedade (SILBERMAN et al., 2015; KOOB; Le MOAL, 2008).

Quando a dependência está instalada, a via antirrecompensa se sobrepõem a via mesocorticolímbica e o indivíduo deixa de sentir prazer e passa a querer consumir cada vez mais o etanol a fim de evitar os sinais e sintomas negativos ocasionados pela via antirrecompensa que fica superativada com o consumo limitado ou a ausência do etanol, caracterizando os sinais negativos da síndrome de abstinência (KOOB; LeMOAL, 2001; 2008; EDWARDS; KOOB, 2010), sendo que a maneira como esta se desenvolve é dependente da quantidade da última dose ingerida e limitados no tempo de exposição, com o aparecimento dos primeiros sinais a partir de 6 horas da diminuição ou interrupção do etanol (LARANJEIRA et al., 2000).

Algumas evidências sugerem que o desequilíbrio nas projeções e neurotransmissões do sistema Glutamatérgico e GABAérgico na amídala central (CeA), estão relacionadas com características no desenvolvimento da dependência (KOOB; LeMOAL, 2008; SWIFT; LEWIS,2009; EŞEL; DINÇ, 2017).

Há indícios que o sistema Glutamatérgico está relacionado com a carga genética para a predisposição da dependência ao etanol (EŞEL, 2006; SWIFT; LEWIS,2009) e acredita-se que este sistema apresenta características cruciais no desenvolvimento da dependência (SWIFT; LEWIS, 2009; EŞEL; DINÇ, 2017) e na síndrome de abstinência (KOOB; LeMOAL, 2001) que é uma situação

emergencial sendo consequência da interrupção abrupta e absoluta da bebida alcóolica em indivíduos dependentes caracterizada por uma série de alterações físicas e psicológicas, como: alterações cardíacas, anedônia, alterações na atividade locomotora, instabilidade muscular, neuropatia periférica, atrofia do cerebelo, delírios, demência (EZZATI et al., 2002; HECKMANN; SILVEIRA, 2009), disforia, irritabilidade (KOOB; LeMOAL, 2008), ansiedade (NUSS et al., 2015), e em casos mais graves *dellirium tremens* que é um estado confusional breve que acompanha perturbações somáticas com sintomas prodrômicos típicos como insônia, tremores, medo e posterior é caracterizada por agitação severa, confusão mental, alucinações visuais, febre, suor intenso, aumento dos batimentos cardíacos, náusea, diarreia e convulsões podendo levar a óbito (LARANJEIRA et al., 2000). A intensidade da síndrome de abstinência é dependente da quantidade da última dose ingerida e tempo de exposição à bebida alcóolica (LARANJEIRA et al., 2000; EZZATI et al., 2002; HECKMANN; SILVEIRA, 2009). Estes sinais e sintomas da abstinência ao etanol levam o indivíduo a recair e o impedem de se abster do consumo das bebidas alcóolicas na tentativa de aliviar estes efeitos aversivos (LÄCK et al., 2007; KOOB; LeMOAL, 2008; EDWARDS; KOOB, 2010; KOOB, 2013).

Dentre o conjunto de fatores que caracterizam a síndrome de abstinência, a ansiedade é um contribuinte significativo para induzir o indivíduo a continuar o consumo do etanol (LACK et al., 2007; NUSS, 2015). O número de episódios em que o indivíduo tenta abster-se da substância de abuso é proporcional ao aumento das funções glutamatérgicas (DAHCHOUR; De WITTE, 2003), resultando no aumento das concentrações do neurotransmissor do glutamato nos aferentes talâmicos para núcleos da amígdala ou para a região periaquedutal dorsal durante a síndrome de abstinência (NUSS, 2015) que são regiões relacionadas aos comportamentos de ansiedade e defensivos (LAWTHER et al., 2015; SORREGOTTI et al., 2018).

A ansiedade é um frequente estado emocional negativo complexo e adaptativo, controlado por uma rede neural interconectadas abrangendo uma grande extensão encefálica (KORT; BOER, 2003; LAWTHER et al., 2015) caracterizada pelo sentimento de preocupação, apreensão, e é acompanhado por manifestações específicas somáticas, cognitivas e comportamentais (NUSS et al., 2015), sendo um estímulo estressor em que situações ansiogênicas

promovem a resposta ao estresse no organismo com o objetivo de melhorar o desempenho do organismo a possíveis situações adversas, porém em excesso, acaba prejudicando o desempenho na realização de tarefas (ARENT; LANDERS, 2003; VITASARI et al., 2011; CAMPOS et al., 2013).

Quando o etanol é retirado ocorre alterações na sinalização glutamatérgica dentro da amígdala que são fundamentais durante a síndrome de abstinência, pois a disfunção no sistema GABAérgico (NUSS, 2015) e a hiperativação do sistema glutamatérgico (HERMANN et al., 2011) promovem a estimulação excessiva da amígdala que é crucial para o desenvolvimento de comportamentos como a ansiedade (NUSS, 2015; MORALES et al., 2018) e aumento do limiar de recompensa (LEWYS; JUNE, 1990; CHESTER et al., 2006; SCHULTEIS; LIU, 2006). Como demonstrado pelos autores Augier et al., (2018) que a redução nas quantidades de GAT-3 (transportador do neurotransmissor GABA) na amígdala central (CeA) aumenta a preferência por etanol. E os autores Silberman et al., (2015) observaram que a síndrome de abstinência é responsável pelo aumento da transmissão glutamatérgica nesta mesma região, a CeA. A amígdala está relacionada com a via antirrecompensa (KOOB, 2009) e possui projeções para diferentes regiões do encéfalo (KOOB; VOLKOW, 2010; GILPIN et al., 2015), sugerindo que a abstinência ao etanol compreende um processo de alterações neurais que desencadeiam o estado neural hiperexcitado pelo sistema glutamatérgico em diferentes regiões encefálicas quando o indivíduo tenta se abster das substâncias alcóolicas.

Em animais, a ansiedade é um estado emocional desagradável gerado por uma situação de avaliação de risco sem um componente bem definido de ameaça a integridade do indivíduo, sendo caracterizada pela incerteza no ambiente desconhecido e conflito exploratório, tendo sua raiz etológica nas reações de defesa do animal (BLANCHAARD, 1988). Portanto, o tempo para a resposta comportamental é a expressão mais importante na distinção entre medo e ansiedade, pois ao contrário da ansiedade, o medo é uma resposta imediata a um perigo detectado (BLANCHARD, 1988).

Um aparato muito utilizado devido a facilidade para investigar os comportamentos relacionados com a ansiedade em roedores é o Labirinto em Cruz Elevado (LCE) que consiste em dois braços abertos e dois fechados à 50cm acima do solo(HOGG, 1996). A principal medida comportamental que sugere



ansiedade avaliada no LCE é para o tempo de evitar os braços abertos e latência de outros comportamentos (PELLOW et al., 1985; PELLOW; FILE, 1986) como demonstrados pelos autores Doremus-Fitzwater; Spear (2007) que após a interrupção do tratamento com etanol os animais apresentaram redução na permanência de tempo nos braços abertos, caracterizando a ansiedade na abstinência ao etanol. Além disto, a interpretação dos resultados é facilitada quando analisadas em conjunto com as outras medidas espaço temporais e também com as medidas de avaliação de risco, mesmo após o roedor deixar uma área desprotegida, pois são medidas sensíveis a substâncias moduladoras da ansiedade que facilitam a interpretação dos resultados por avaliarem sedação ou comprometimento locomotor (PELLOW; FILE, 1986; HOGG, 1996; RODGERS; DALVI, 1997).

A atividade locomotora também é um comportamento observado durante a síndrome de abstinência ao etanol em roedores e humanos (GILPIN; KOOB, 2008) que pode facilitar a interpretação dos resultados, pois suas bases biológicas comportamentais são diferentes da ansiedade (ACEVEDO et al., 2014). No aparato LCE, a atividade locomotora é observada com o intuito de evitar confusão na interpretação dos resultados para a ansiedade através da medida espaço-temporal de frequência de entrada nos braços fechados e comportamentos de avaliação de risco, como por exemplo, número de levantadas (HOGG, 1996; RODGERS; DALVI, 1997).

Em outros estudos utilizando aparatos como caixa de atividade locomotora ou campo aberto (KLITHERMES, 2005), a atividade locomotora também é um comportamento avaliado durante a síndrome de abstinência ao etanol e sua intensidade é variável com o tempo de exposição e última dose ingerida antes da abstinência ao etanol (RASMUSSEN et al., 2001; KAMEDA et al., 2007; ACEVEDO et al., 2014; WSCIEKLICA et al., 2016), porém, estes resultados são controversos na literatura em que alguns autores observam hipoatividade (DOREMUS-FITZWATER; SPEAR, 2007) e outros hiperatividade em um período de 2 a 6 horas (UZBAY et al., 1998) após a última exposição ao etanol, necessitando da inclusão de outras análises para avaliar a abstinência ao etanol.

O consumo crônico e abusivo ao etanol promove inúmeros prejuízos à saúde, sendo exacerbados durante a síndrome de abstinência ao etanol que é

uma condição em que, até o momento, não se têm um tratamento totalmente efetivo sendo necessária a inclusão de terapias adjuvantes como medicamentos para o sistema cardiovascular para reduzir a pressão arterial (PA) elevada durante a síndrome de abstinência ao etanol e evitar as sensações desagradáveis, que em conjunto com os outros sinais e sintomas da abstinência ao etanol, impedem que o indivíduo permaneça abstêmio da bebida alcóolica (MAYO-SMITH, 1987). Acredita-se que o sistema glutamatérgico apresenta características cruciais no desenvolvimento da dependência e nos estados emocionais e físicos negativos que caracterizam a síndrome de abstinência, pois há indícios relacionando receptores glutamatérgicos com a carga genética que carrega a predisposição a dependência ao etanol (SWIFT; LEWIS, 2009; ESEL; DINÇ, 2017). No entanto, pouco se sabe sobre tratamentos que envolvam os transportadores do sistema glutamatérgico durante a síndrome de abstinência ao etanol e recentemente foi demonstrado que os transportadores do sistema glutamatérgicos estão envolvidos com perturbações ocasionadas pela síndrome de abstinência ao etanol em alguns modelos (ABULSEOU et al., 2014; ALSHEHRI et al., 2017) sendo necessário mais estudos para a investigar esta relação envolvendo possíveis tratamentos que possam reduzir os efeitos aversivos da abstinência ao etanol.

Em relação ao outro problema de saúde pública mundial, a exposição ao estresse vem sendo associada com a incidência de patologias cardiovasculares nas últimas décadas sendo um dos problemas que mais causa mortes no mundo (WHO, 2016). Dentre diversos fatores psicossociais, o estresse psicológico tem sido reconhecido como um fator de risco para diversas disfunções cardiovasculares (STEPTOE; KIVIMAKI, 2013) e caracterizado como um fator independente daqueles comumente conhecidos (ex., idade, sexo, tabagismo, diabetes mellitus e obesidade) (STEPTOE; KIVIMAKI, 2013; CRESTANI, 2016), pois interfere em dois circuitos de neurotransmissão importantes do encéfalo que modulam a atividade do eixo HPA (MARTISOVA et al., 2012; HOUTEPEN et al., 2017), como a redução da atividade do sistema GABAérgico (MARTISOVA et al., 2012) e aumento da atividade do sistema glutamatérgico (YUEN et al., 2009; MARTISOVA et al., 2012).

Com a exposição ao estresse a ativação do eixo HPA libera cortisol em humanos e isto promove mudanças fisiológicas como alterações no metabolismo

para glicose e lipídios (LAKKA et al., 2002; LAGRAAUW et al., 2015; GUEDRI et al., 2017) que em associação ao estilo de vida sedentário do indivíduo e com facilidades ao acesso a alimentos ricos em açúcares e gorduras (LAKKA et al., 2002; TORRES et al., 2007) favorecem a incidência de patologias cardiovasculares que incluem doenças como hipertensão, isquemia e acidentes vasculares devido ao aumento da PA (LAKKA et al., 2002; LAGRAAUW et al., 2015; GUEDRI et al., 2017).

Esta incidência de patologias cardiovasculares em associação ao estresse foi demonstrada pelo levantamento feito pelo INTERHEART que relacionou sexo e idade de 52 países apresentando mais de 11000 pacientes com infarto do miocárdio, sendo que mais da metade destes casos estavam associados com fatores psicossociais crônicos, como estresse permanente no trabalho ou relataram estar expostos a dois ou mais eventos estressantes agudos como, por exemplo: perda de um ente querido, divórcio, perda de emprego ou fracasso comercial (LAGRAAUW et al., 2015). Portanto, o fator estresse é uma condição importante de ser investigada e muitos estudos vêm sendo desenvolvidos (CRESTANI, 2016; DUARTE et al., 2017; ADAMI et al., 2017) para investigar os mecanismos neurais relacionados a exposição ao estresse com influência no sistema cardiovascular com o propósito de contribuir para a literatura e fornecer subsídios para se encontrar alternativas que minimizem o impacto das exposições ao estresse no sistema cardiovascular.

Da mesma forma que ocorre em humanos, em modelos de roedores ocorre alterações fisiológicas e comportamentais em resposta ao estresse psicológico em condições experimentais (MAWDSLEY; RAMPTON, 2005; GUEDRI et al., 2017) e a atividade do sistema glutamatérgico tem sido relacionado com o funcionamento do sistema cardiovascular (SANTINI et al., 2013; MORAES – NETO et al., 2014; FABRI et al., 2014; GORKA et al., 2015; FERREIRA-JUNIOR et al., 2018).

Dentro dos procedimentos experimentais de exposição ao estresse, a restrição do animal é um estressor amplamente utilizado nos estudos por ser um tipo severo de estresse psicológico, caracterizado como uma condição incontrolável e inescapável para o mesmo (BUYNITSKY; MOSTOFSKY, 2009; SÁNTHA et al., 2016) por restringir os seus movimentos dentro de um tubo cilíndrico que contém somente perfurações para que ele continue a respirar

(BUYNITSKY; MOSTOFKY, 2009; SÁNTHA et al., 2016). Este tipo de exposição é considerado como estresse psicológico (MORAES-NETO et al., 2014) por causar alterações emocionais e comportamentais no animal após a sua exposição (TORRES et al., 2007), que são plausíveis de serem observadas em aparatos de avaliação comportamental como o LCE através de comportamentos relacionados com a ansiedade (CHOTIWAT; HARRIS, 2006; JOSHI et al., 2015; GOUVEIA et al., 2016) e em experimentos envolvendo alterações nas modulações cardiovasculares (CÔCO et al., 2016; DUARTE et al., 2017; ADAMI et al., 2017).

Inicialmente ou agudamente, o estresse de restrição provoca mudanças controladas ao organismo sendo essenciais para a sobrevivência (SÁNTHA et al., 2016), pois a exposição ao estresse promove muitas alterações fisiológicas importantes para a manutenção da homeostase como o aumento dos mineralocorticoides e glicocorticoides por ativação do eixo HPA (REIS et al., 2011) e liberação de catecolaminas (noradrenalina e adrenalina) (TORRES et al., 2007) que causam diferentes respostas emocionais, comportamentais e respostas mediadas pelo sistema autônomo (TORRES et al., 2007; DAMPNEY et al., 2008; McEWEN; MORRISON, 2013; SÁNTHA et al., 2016) que incluem aumento da PA, frequência cardíaca (FC) (DAMPNEY et al., 2008; McEWEN; MORRISON, 2013) e redefinição do barorreflexo para valores mais altos de PA (CRESTANI, 2016). Estas alterações também são acompanhadas pela redistribuição do fluxo sanguíneo em que ocorre aumento do mesmo para o músculo esquelético e redução do fluxo sanguíneo cutâneo devido a vasoconstrição (DAMPNEY et al., 2008; REIS et al., 2011; McEWEN; MORRISON, 2013; FABRI et al., 2014) que leva a uma queda na temperatura durante a exposição ao estresse agudo, sendo um indicador fisiológico putativo deste tipo de estresse (GJENDAL et al., 2018; BUSNARDO et al., 2013) que é mediada pelo aumento do tônus vasomotor simpático mediado pelo receptor de glutamato não- NMDA local (ADAMI et al., 2017), sendo possível de ser observado por um método simples e não invasivo por uma câmera que através da emissão de radiação infravermelha mede processos fisiológicos normais e traduz isso em um termograma (GJENDAL et al., 2018).

Em situações crônicas de estresse ocorre a hiperativação do eixo HPA (TORRES et al., 2007) e consequente esgotamento das reservas energéticas do

organismo, aumentando a suscetibilidade para o estresse oxidativo e prejudicando as plasticidades neurais (RADLEY; MORRISON, 2005; CHAKRABORTI et al., 2008). Estas alterações fisiológicas, devido a mal-adaptação do organismo em relação ao estímulo estressor, são permanentes no organismo e podem trazer prejuízos ao indivíduo como o desenvolvimento de transtornos psiquiátricos e prejuízos para o sistema cardiovascular como ausência de modulação dos barorreflexos (CRESTANI, 2016).

O barorreflexo é considerado um sistema de controle da PA que a mantém dentro dos limites normais em períodos de segundos a minutos em situações que fazem a PA oscilar durante o dia, ou seja, controlam a PA momento-a-momento em um curto prazo (CAMPAGNOLE-SANTO, 2001). A eficiência deste sistema é obtida através de um mecanismo de retro-alimentação pelo sistema autônomo (simpático e parassimpático) (IRIGOYEN; KRIEGER, 1998), portanto quando a PA está alta os barorreceptores arteriais sofrem alterações morfológicas pela distensão da artéria cujos aferentes envolvidos com estes mecanorreceptores enviam o sinal para regiões centrais que compõem o tronco encefálico que são: Medula Ventrolateral Rostral (MVRL), Núcleo do Trato Solitário (NTS) e hipotálamo. O sinal nestas regiões é processado e através do mecanismo de retro-alimentação negativo ocorre a inibição dos eferentes cardíacos por redução da atividade dos mecanismos simpáticos barosensitivos, renais e vasomotores restabelecendo a PA para os limites normais (SHEFFERS et al., 2010; GUYENET, 2006).

Alguns fatores como o estresse requerem a redefinição do barorreflexo para níveis mais altos de PA e isto envolve a estimulação de três mecanismos: 1) A estimulação da MRVL por neurônios barosensitivos glutamatérgicos, via entrada de estruturas mais rostrais; 2) por redução do feedback negativo do barorreflexo devido a uma polarização da transmissão entre aferentes barorreceptores e neurônios de segunda ordem no NTS em que o mecanismo se baseia pela inibição pré e pós-sináptica mediada pelo GABA e outras substâncias como a vasopressina; 3) o barorreflexo está sob controle humoral, como angiotensina II que reduz a transmissão entre os aferentes do barorreflexo e neurônios de segunda ordem envolvendo a produção de óxido nítrico pelo endotélio capilar (GUYENET, 2006). Portanto, todas respostas para a exposição ao estresse em um indivíduo normal, são controladas através de sistemas que

possui importante função para o funcionamento cardiovascular que são essenciais para a sobrevivência (SÁNTHA et al., 2016). Quando ocorre deficiência em algum destes mecanismos e ausência de modulação dos barorreflexo (CRESTANI, 2016) ocorre a redução da sensibilidade do mesmo (CASADEI; PATERSON, 1969) e a ausência de alterações cardiovasculares para o aumento da PA causa prejuízos para o organismo do indivíduo aumentando o risco de patologias cardiovasculares como hipertensão, derrames, infartos (VALENTINI et al., 2009; SCHEFFERS et al., 2010; SÁNTHA et al., 2016) e também, morte súbita (KOUGIAS et al., 2010; LIU et al., 2012).

Portanto, é importante investigar alternativas farmacológicas com intuito de amenizar a resposta do indivíduo aos efeitos nocivos no organismo ocasionados pelo estímulo estressor (LAKKA et al., 2002; STEPTOE; KIVIMAKI, 2012; 2013; LAGRAAUW et al., 2015). Por isto na pesquisa existe constante investigação para complicações no sistema cardiovascular relacionadas ao estresse (VALENTINI et al., 2009; SCHEFFERS et al., 2010; SÁNTHA et al., 2016; CRESTANI, 2016; CÔCO et al., 2016).

### **1.5. Evidências atuais da pesquisa e clínica da NAC**

A NAC é amplamente utilizada na prática clínica para disfunções pulmonares e outras patologias (MILLAR et al., 1985, HARRISON et al., 1991; HEARD, 2008) fornecendo melhores condições de vida para os indivíduos e frequentemente utilizada em humanos como agente mucolítico na dose de 200 mg sendo administrada de duas à três vezes por dia (ANVISA, medicamento genérico lei nº9787, 1999). Apesar de seus resultados serem controversos na literatura (McLELLAN et al., 1995; BAKI et al., 2010; SAMUNI et al., 2013; HOFFER et al., 2013), seus efeitos benéficos se sobrepõem aos resultados negativos e muitos estudos vêm sendo desenvolvidos para investigar os efeitos deste pró-fármaco empregado na clínica (CHAKRABORTI et al., 2007; DEAN et al., 2011; JOHNSON et al., 2012; BERK et al., 2013; RUSHWHOORTH; MEGSON, 2014).

Com base na literatura consultada, observamos que a NAC consegue reverter quadros patológicos (AUGUSTÍ, 1997; HURST et al., 1967; RAUCHOVA et al., 2005; ADAMY et al., 2007; RUSHWHORTH; MEGSON; 2014; HUANG et al., 2018) por reduzir alterações fisiológicas causadas por estímulos externos

aversivos (CHEN et al., 2014; SANTOS et al., 2017) e redução de marcadores de estresse oxidativo (CHAKRABORTI et al., 2007; CHAKRABORTI et al., 2008). A NAC também tem demonstrado ser um poderoso ansiolítico nos modelos de ratos e peixes (MOCELIN et al., 2015; SANTOS et al., 2017) e a ansiedade induzida pelo estresse também é diminuída pela administração prévia da NAC em ratos (CHAKRABORTI et al., 2007; CHAKRABORTI et al., 2008). Existem evidências de que a NAC consegue reduzir comportamentos relacionados a ansiedade através das projeções glutamatérgicas do tálamo – amígdala, que são regiões dependentes da ativação do receptor mGLU (CHEN et al., 2014) e estão relacionadas com regiões encefálicas responsivas a exposição ao estresse que ativam estruturas referentes ao sistema cardiovascular (FURLONG et al., 2014; CHEN; HERBERT, 1995) e desencadeiam efeitos distintos e nocivos no sistema cardiovascular (MATSUOKA et al., 1998). Portanto, a NAC tem apresentado efeitos promissores como agente terapêutico.

Além disso, a NAC tem se mostrado promissora em reverter comportamentos relacionados com a dependência para o consumo, busca e recaída tanto a cocaína (BAKER et al., 2003) quanto para a nicotina (KNACKSTEDT et al., 2009), maconha (DEAN et al., 2011) e, recentemente, foi demonstrado para o etanol (LEBOURGEOIS et al., 2017). No entanto, nenhum deles estão relacionados diretamente com o estado emocional negativo da retirada do etanol de um dependente, a ansiedade. Só encontramos um estudo dos autores Schneider Jr et al. (2015) demonstrando que o tratamento com NAC nas doses de 60 e 90 mg/kg inibiu a diminuição locomotora ocasionada pela abstinência ao etanol no campo aberto, analisando portanto, o comportamento de locomoção durante a síndrome de abstinência ao etanol. No entanto, este comportamento não está relacionado propriamente com a ansiedade desencadeada pela abstinência ao etanol (ACEVEDO et al., 2014).

O uso de NAC em estudos utilizando animais demonstraram que ela também foi eficaz em regular a PA e reduzir o estresse oxidativo, melhorando a capacidade antioxidante do organismo (MARTINA et al., 2008; RAUCHOVA et al., 2005); como observado pelos autores Giam et al., (2016), a NAC reduziu o estresse oxidativo e o remodelamento na fibrose relacionada com o quadro de insuficiência cardíaca. Com base nestes estudos, a deficiência de GSH celular é responsável por várias doenças crônicas e inflamatórias em humanos incluindo

insuficiências cardíacas e a restauração de GSH no tecido cardíaco pela NAC, melhora nas funções cardiovasculares como a função contrátil em roedores e humanos que apresentam GSH reduzida no endotélio cardiovascular por terem sofrido infarto do miocárdio (ADAMY et al., 2007) além de melhorar propriedades do tecido aórtico protegendo-o de disfunções endoteliais em espécies normotensas e hipertensas de ratos (CABASSI et al., 2001) por modular os níveis de óxido nítrico e outras moléculas vasoativas (PECHANOVA et al., 2006; VASDEV et al., 2009, MARTINA et al., 2008) que favorecem a estabilidade da estrutura de proteínas e isto contribui para a manutenção da integridade das estruturas vasculares (VASDEV et al., 2009) entre outros benefícios periféricos.

A NAC também tem mostrado ser promissora em reverter quadros patológicos de ratos hipertensos melhorando a resposta dos barorreflexos sem alterar os parâmetros cardiovasculares dos normotensos (GIROUARD et al., 2004; PERCHÁNÓVÁ et al., 2006). Porém, os poucos trabalhos encontrados na literatura são controversos por diferirem da via de exposição deste pró-fármaco, como demonstrado pelos autores Valenti e colaboradores (2011) que a NAC administrada centralmente no 4º ventrículo, não melhorou as funções dos barorreflexos em ratos jovens hipertensos.

Realizando uma ampla busca na literatura, até o momento não existem evidências sobre os efeitos da NAC relacionado com o efeito da retirada do etanol nos comportamentos relacionados com a ansiedade no LCE e existem poucos trabalhos relacionando a NAC como promissor agente cardioprotetor na regulação do sistema barorreflexo (VASDEV et al., 2009; VALENTI et al., 2011; GIROUARD et al., 2004; PECHÁNÓVÁ et al., 2006) e nenhum trabalho que relacionava o efeito desse pró-fármaco com os danos ao sistema cardiovascular induzidos pelo estresse que está relacionado com a maioria das doenças cardiovasculares (RAUCHOVA et al., 2005). Portanto, considerando um possível uso da NAC no tratamento da dependência, decidimos investigar o potencial da NAC na ansiedade da síndrome de abstinência ao etanol no LCE e em conjunto, consideramos importante dosar as quantidades plasmáticas de etanol durante o período que sugerimos de abstinência para nos certificarmos de que a NAC não interferia no metabolismo do etanol. Além disto, decidimos investigar se a NAC possui propriedades em alterar os parâmetros cardiovasculares e autônomos em ratos normotensos e se nestes parâmetros expostos ao estresse de restrição ela



possui a propriedade em reverter as alterações causadas por este estímulo aversivo. Por isto, este trabalho foi inédito na literatura e culmina com informações para pesquisas futuras.

## 2. OBJETIVOS

Investigamos os efeitos do tratamento com o pró-fármaco NAC nos comportamentos relacionados com a ansiedade durante a retirada do etanol no Labirinto em cruz elevado e investigamos se o tratamento (agudo ou crônico) com a NAC modifica as alterações cardiovasculares induzidas por estresse.

*Para tanto, avaliamos em dois distintos trabalhos, que dividimos em:*

*2.1.1° trabalho: NAC nos comportamentos relacionados com a ansiedade na retirada ao etanol*

- Os comportamentos relacionados com a ansiedade na retirada da exposição crônica ao etanol;
- Os efeitos do tratamento crônico com NAC nos comportamentos relacionados com a ansiedade na retirada da exposição crônica ao etanol;
- Os efeitos do tratamento agudo com NAC nos comportamentos relacionados com a ansiedade na retirada da exposição crônica ao etanol;
- Os níveis de etanol no sangue seguidos do tratamento agudo ou crônico com etanol ou com NAC.

*2.2.2° trabalho: NAC e alterações cardiovasculares induzidas por estresse*

- Os efeitos agudos 2 horas e 24 horas após o tratamento com NAC sobre o barorreflexo e o balanço autônomo cardíaco;
- Os efeitos agudos 2 horas após o tratamento com NAC sobre as alterações cardiovasculares desencadeadas por estresse de restrição agudo;
- Os efeitos do tratamento crônico com NAC sobre o barorreflexo e balanço autônomo;
- Os efeitos do tratamento crônico com NAC sobre o barorreflexo e balanço autônomo desencadeadas por estresse repetido de restrição;
- Os efeitos do tratamento crônico com NAC sobre as alterações cardiovasculares desencadeadas por estresse repetido de restrição.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar, adultos, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista – UNESP (Botucatu, SP). Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ), com livre acesso a ração e água, exceto durante breves períodos de avaliações comportamental e cardiovascular nos experimentos. No 1º trabalho referente a: *NAC nos comportamentos relacionados com a ansiedade na retirada ao etanol*, os animais pesavam inicialmente 200g e foram transferidos para o biotério do laboratório de Farmacologia no mínimo 7 dias antes do início dos experimentos para se habituarem ao ciclo invertido de luz (12/12h, luz acesa às 19h nos experimentos 1 e 2 e 22h para parte dos experimentos 2, 3 e 4); todos os experimentos foram executados na fase escura do ciclo. O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - UNESP (CEUA/FCF/CAR: 04/2017). Diferentemente, no 2º trabalho referente a: *NAC e alterações cardiovasculares induzidas por estresse*, os animais pesavam inicialmente 250g e foram transferidos para o biotério do laboratório de Farmacologia do departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCFAR/UNESP) no mínimo 3 dias antes do início dos experimentos para se habituarem ao ambiente com ciclo claro-escuro de 12 horas (luzes acesas das 7:00 h às 19:00 h); todos os experimentos foram executados na fase clara do ciclo. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - UNESP (CEUA/FCF/CAR: 03/2018).

#### 3.2. Substâncias utilizadas

No 1º trabalho: *NAC nos comportamentos relacionados com a ansiedade na retirada ao etanol*. As substâncias utilizadas nestes experimentos foram N-acetilcisteína (NAC) (Sigma-Aldrich®) nas doses de 30, 60 e 120 mg/kg dos animais, dissolvidas na solução tampão de fosfato de sódio salino (PBS) com pH 7,0 que foi utilizado como solução veículo para seus respectivos grupos.

A solução PBS foi feita em água deionizada para um volume de 1000 ml. Para este fim, foi utilizado 8g de NaCl; 0,2g de KCl; 1,44g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  e 0,24g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Álcool Etilico absoluto – A.C.S (Labsynth produtos para laboratório

LTDA) foi utilizado para a produção do Etanol 20% (v/v) dissolvido em solução de salina (NaCl 0,9%) e administrado na dose de 2g de etanol/kg do animal de maneira intraperitoneal (i.p.) e 4% (v/v) foi dissolvido em água potável e oferecido em garrafas à vontade para os animais em suas caixas moradias. Os grupos controles não tiveram contato com etanol e tiveram oferta de água pura nas garrafas por todo experimento.

As doses de etanol e tempo de retirada para análise dos comportamentos foram baseadas em estudos pilotos do laboratório que foram baseados nos autores Kotlinska e Bochenski (2008). A concentração de 20% (v/v) de etanol e o volume total da injeção foram baseadas em outros autores para atingir a dose desejada sem alterar a concentração e evitar desconforto durante a injeção intraperitoneal (MORSE et al., 2000; SCHULTEIS; LIU, 2006). Já a escolha da via intraperitoneal, apesar de ser considerada uma metodologia invasiva e causar estresse por manipulação no animal (PATTEN et al., 2014) quando comparada com a via gástrica, ambas as vias de administração de etanol apresentaram concentrações sanguíneas de etanol, padrão de resposta para as lesões e efeitos nocivos do etanol no organismo semelhantes, sendo atribuídos a própria substância etanol e não a via administrada (CHEN et al., 2013) e o uso de modelos ratos quando comparado a outro modelo de roedor para a via intraperitoneal, apresenta perfil de concentração da substância no sangue e metabolização (LIVY et al., 2003) mais desejável para este estudo.

Para as doses de NAC nos baseamos em um apanhado bibliográfico em que ela apresenta efeito nos comportamentos relacionados com a síndrome de abstinência de substâncias de uso abusivo (BAKER et al., 2003; SCHENEIDER Jr et al., 2015; BOWERS et al., 2016; LEBOURGEOIS et al., 2017). Além disto, para a escolha da dose da administração de um fármaco ou substância é necessário analisar o metabolismo do modelo, pois este segue uma razão inversamente proporcional ao tamanho, sendo variável com cada espécie (MARTIGNONI et al., 2006; SHIN et al., 2010; NAIR; JACOB, 2016) e a escolha por administrar intraperitonealmente foi devido a velocidade de alcance a níveis sanguíneos máximos em um curto período de tempo, a fim de obtermos alterações comportamentais (LEWYS; JUNE, 1990). As garrafas de etanol foram pesadas diariamente e foi feita uma média da estimativa de consumo de etanol de todos os animais por dia, pois os ratos foram alojados em grupos, dificultando

uma análise de consumo mais precisa, e apesar de ser uma medida importante, o consumo por garrafas não era o objetivo do trabalho.

Diferentemente no 2º trabalho: *NAC e alterações cardiovasculares induzidas por estresse*; a NAC (Sigma-Aldrich<sup>R</sup>) foi administrada somente nas doses de 60 e 120 mg/kg, pois foram consideradas doses com perfil comportamental mais parecidas. A solução tampão de PBS foi a mesma descrita e utilizada no 1º trabalho. Também foram utilizados cloridrato de fenilefrina (70µg/ml) (Sigma-Aldrich, EUA), nitroprussiato de sódio di-hidratado (100 µg/ml) (Sigma-Aldrich, EUA), propranolol [5mg/ml] com dose de 0,1ml/100g do animal (Sigma-Aldrich, EUA) e metilatropina [4mg/ml] com dose 0,1ml/100g do animal (Sigma-Aldrich, EUA); os quais foram dissolvidos em solução salina (0,9% NaCl). Os fármacos: Tribroetanol 250 mg/kg injeção intraperitoneal sendo 1ml/100g do animal (Sigma-Aldrich, EUA); Fluxina meglumina 2,5 mg/kg, sendo 0,3ml como dose fixa subcutânea (Banamine®, Schering-Plough, Cotia-SP) e a preparação de poli-antibiótico 0,2 mL como dose única intramuscular (Pentabiotico®, Fort Dodge, Campinas-SP), foram utilizados como fornecidos pelo fabricante.

### **3.3. .Procedimentos experimentais**

No 1º trabalho: *NAC nos comportamentos relacionados com a ansiedade na retirada ao etanol*, foram realizados os procedimentos descritos abaixo.

#### *3.3.1. Indução da Síndrome de abstinência ao etanol*

Os animais foram submetidos ao tratamento com etanol a 20% i.p., por 11 dias consecutivos recebendo uma injeção intraperitoneal por dia, que chamamos de tratamento crônico neste trabalho. Durante este período, as garrafas de água pura foram removidas para o grupo que iria receber etanol por via intraperitoneal e foram ofertadas garrafas com solução de etanol diluído a 4% como descrito previamente por Kotlinska e Bochenski (2008). Esse procedimento permite a administração de uma grande dose diária de etanol no animal acrescido de pequenas doses ao longo do dia. No 11º dia, após a última injeção intraperitoneal de etanol, as garrafas com etanol 4% foram removidas e foram oferecidas garrafas com água pura para que os animais entrassem em abstinência ao etanol por 6 horas antes do início dos testes. A dose de etanol foi escolhida baseada em estudos da literatura, pois produz incoordenação motora e não é uma dose considerada tóxica e nociva aos animais (POHORECKY, 1997; WALKER; EHLERS, 2010; KARLSSON; ROMAN, 2016) e a maneira e quantidade de exposição e tempo de retirada do etanol foram baseados em prévios experimentos pilotos realizados em nosso laboratório (dados não mostrados). O grupo controle teve, a todo momento, oferta de água pura em suas caixas moradias e receberam injeções intraperitoneal somente com solução de salina no mesmo período que o outro grupo que recebeu etanol.

#### *3.3.2. Análise dos comportamentos relacionados com a ansiedade no Labirinto em Cruz Elevado (LCE)*

O aparato labirinto em cruz elevado (LCE) foi utilizado para avaliar os comportamentos relacionados com a ansiedade dos animais devido a estímulos aversivos que representam vulnerabilidade ao animal a possíveis predadores (LISTER, 1990; CORNÉLIO; NUNES-DE-SOUZA, 2009), como altura e os braços abertos. Este aparato compreende 4 braços de dimensões iguais (50 x 12 cm) elevados a 50 cm do solo, dois dos quais são fechados por paredes de 40 cm. Por este aparato é possível avaliar medidas convencionais espaço

temporais, como: número de entradas nos braços fechados, que representam a atividade locomotora do animal, e porcentagem de tempo e frequência de entradas nos braços abertos do labirinto, em que representam comportamentos relacionados com a ansiedade (RODGERS; JOHNSON, 1995). Os ratos foram colocados individualmente no centro do labirinto com a face voltada para o braço aberto e tiveram seu comportamento filmado por 5 minutos para posterior análise das filmagens com a utilização do programa ANY-maze Video Tracking Software® e para também análise das medidas como o tempo no quadrante central e medidas complementares de avaliação de risco que consistiram na frequência de: mergulhos (em inglês head dipping) em que é representado pelo comportamento de inclinação da cabeça do animal para fora da borda do labirinto em direção ao chão; esticada (em inglês stretched-attend postures, SAP), que é representado pelo comportamento do animal em alongar seu corpo, mantendo o trem posterior fixo; levantada (em inglês rearing), que é representado pelo comportamento do animal em elevar os membros posteriores tocando ou não a superfície da parede nos braços abertos. Todas estas medidas complementares de avaliação de risco são medidas dependentes que antecipam a previsão do comportamento (PELLOW et al., 1985; WALF; FRYE, 2017) e se o animal realmente apresenta comportamentos relacionados com a ansiedade sem ter a interferência da redução da atividade locomotora (KLITHERMAS, 2005), sendo que os conjuntos da análise contribuem para a interpretação dos resultados. Portanto, todas estas medidas foram analisadas no momento em que os animais estavam em áreas do aparato consideradas desprotegidas (braços abertos) e também protegidas (braços fechados) (RODGERS; JOHNSON, 1995) e apesar da simplicidade, o teste fornece subsídios importantes nos comportamentos relacionados com a ansiedade (RODGERS; DALVI, 1997). Todos os testes foram conduzidos durante a fase escura com iluminação fraca (5 lux) proporcionada por uma lâmpada vermelha no teto da sala. Entre um animal e outro, o aparato foi limpo com etanol a 20% (v/v) e secos com papel. O tempo de análise comportamental por 5 minutos foi baseado nos primeiros estudos em que o comportamento de evitação dos estímulos aversivos era observado de maneira mais robusta neste tempo inicial (WALF; FRYE, 2017).

### 3.3.3. *Dosagem dos níveis de etanol no sangue*

Foram coletadas amostras de sangue (em torno de 100 µL) em tubos heparinizados após um pequeno corte na cauda do animal. Somente no momento de cada coleta de sangue os animais foram rapidamente colocados em tubos de restrição para suas caudas serem aquecidas em um aparato que permite o aquecimento controlado à temperatura de 40°C evitando a vasoconstrição cutânea e permitindo a coleta de sangue em um mesmo animal em tempos distintos. Este aparato foi cedido pelo Laboratório de Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP. A cada coleta de sangue os animais foram devolvidos para suas caixas moradias com água e ração a vontade. Depois da coleta de sangue, os animais foram devidamente sacrificados e os tubos com as amostras sanguíneas foram centrifugadas por 15 minutos em 4°C a 22.000g. As amostras de sangue foram analisadas por meio de um Sistema enzimático [AM1 Analyzer (Analox Instruments, London, UK)] baseado nas medidas de consumo de oxigênio na reação de álcool – acetaldéido.

No 2º trabalho: *NAC e alterações cardiovasculares induzidas por estresse*, foram utilizados somente os procedimentos descritos abaixo.

### 3.3.4. *Estresse por Restrição (ER)*

O estresse por restrição consistiu na introdução dos animais em tubos cilíndricos para contenção dos movimentos. O tubo possuiu dimensões apropriadas ao tamanho de cada animal a fim de evitar asfixia. Para o protocolo de estresse repetido, cada animal foi submetido a uma única sessão por dia com duração de uma hora por 10 dias consecutivos. Todas as sessões de estresse foram realizadas em uma sala separada do biotério. Os animais dos grupos controle foram mantidos no biotério, sem estresse, por todo o momento.

### 3.3.5. *Cirurgia para canulação da artéria e veia femoral*

Vinte e quatro horas antes do início do registro cardiovascular, os animais foram anestesiados com tribromoetanol (250 mg/Kg, i.p.) para uma cirurgia de implantação de dois cateteres. Um cateter foi implantado na artéria femoral, para registro dos parâmetros cardiovasculares; e o outro foi implantado na veia femoral para infusão de fármacos. Após esta implantação, os cateteres foram



exteriorizados na região dorsal do animal e fixados à pele por sutura cirúrgica. Após a cirurgia, como medida profilática, os animais receberam 80.000 UI de Pentabiótico Veterinário (Fontoura- 27 Wyeth, Brasil) aplicados em 0,2 mL (i.m.) e o anti-inflamatório não-esteroidal 2,5 mg/kg flunexina meglumina aplicados em (0,3ml) (s.c.) (Banamine®, Schering Plough, Brazil) para analgesia pós-operatória. Após a cirurgia, os animais foram mantidos em câmara aquecida dentro de caixas individuais para prevenir hipotermia e assim que voltavam da cirurgia eram transferidos e mantidos em suas caixas individuais na sala dos testes experimentais, onde ficavam instalados até o fim dos experimentos. Nesta sala, a temperatura era controlada em (24°C).

### *3.3.6. Registros da pressão arterial e frequência cardíaca*

O cateter implantado na artéria femoral foi conectado a um transdutor de pressão (DPT100, Utah Medical Products Inc., EUA) através de um segmento de polietileno PE-50. A pressão arterial pulsátil (PAP) foi registrada utilizando um amplificador (Bridge ML221, ADInstruments, Austrália), conectado a um sistema de aquisição de dados computadorizado (PowerLab 4/30, ML 866, ADInstruments, Austrália). Os valores de pressão arterial média (PAM), pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD) e frequência cardíaca (FC) foram obtidos a partir do sinal de PAP.

### *3.3.7. Registro da temperatura cutânea*

A temperatura cutânea da cauda foi registrada utilizando uma câmera térmica (IRI 4010, Infravermelho Integrated Systems Ltd., Northampton, Reino Unido). A análise foi realizada através de um software para análise termográfica, e a temperatura foi representada por variações de intensidade de cor. Para análise das imagens, a temperatura foi medida em cinco pontos de cauda do animal e o valor médio foi calculado para cada registro.

### *3.3.8. Avaliação da atividade barorreflexa*

O barorreflexo foi analisado através de alterações na pressão arterial induzidas pela infusão intravenosa de fenilefrina (50µg/mL/kg a 0.32 mL/min), (agonista seletivo dos adrenocetores  $\alpha_1$ ) ou de NPS (70µg/mL/kg a 0.8 mL/min) (doador de óxido nítrico). A fenilefrina e nitroprussiato de sódio (NPS) causam aumento e redução na pressão arterial, respectivamente. A atividade do barorreflexo foi avaliada relacionando a variação de PAM (10, 20, 30 e 40 mmHg) com a variação reflexa correspondente da FC. Nesse sentido, foram traçadas

curvas de regressão linear para análise individual da atividade barorreflexa durante o efeito pressor e depressor na pressão arterial (CRESTANI et al., 2006, 2010).

### *3.3.9. Avaliações da atividade simpática e parassimpática cardíaca*

A atividade parassimpática e simpática cardíaca, bem como a frequência cardíaca intrínseca, foram avaliadas através da análise do efeito sobre a frequência cardíaca da administração intravenosa de metilatropina (antagonista de receptores colinérgicos muscarínicos) (3 mg/ml/kg) e propranolol (antagonista de adrenoceptores  $\beta$ ) (4 mg/ml/kg) (SOUZA et al., 2001). O protocolo foi realizado em dois dias, conforme descrito previamente (GRIPPO et al., 2012). No dia 1, metade dos animais em cada grupo experimental receberam propranolol e 10 minutos após, metilatropina. A outra metade dos animais receberam o mesmo tratamento em ordem invertida (metilatropina depois propranolol). Vinte e quatro horas após (dia 2), os animais receberam novamente o tratamento combinado com os bloqueadores autonômicos cardíacos, mas na ordem oposta ao tratamento recebido no dia 1. A atividade simpática cardíaca foi determinada através da análise da diferença entre os valores de frequência cardíaca antes e após o tratamento com propranolol. A atividade parassimpática cardíaca foi determinada através da análise da diferença dos valores de frequência cardíaca antes e após o tratamento com metilatropina. A frequência cardíaca intrínseca foi mensurada nos dois dias do protocolo após o tratamento combinado com propranolol e metilatropina, e a média das duas medidas foram calculadas para cada animal.

*Com o intuito de facilitar a compreensão, separamos os delineamentos experimentais e resultados por partes em 1º e 2º trabalho.*

#### **4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DO 1º TRABALHO: NAC NOS COMPORTAMENTOS RELACIONADO COM A ANSIEDADE NA RETIRADA AO ETANOL**

*4.1.Experimento 1: Avaliação dos comportamentos relacionados com a ansiedade durante a abstinência após a retirada do tratamento repetido com etanol*

Após a padronização da dose de etanol e tempo de retirada do etanol, este experimento foi realizado para verificarmos se conseguiríamos observar os comportamentos relacionados com a ansiedade com uma exposição baseada aos autores Kotlinska e Bochenski (2008). A indução da síndrome de abstinência ao etanol está descrita no item 4.3.1. Os animais foram alojados em grupos 3-4 por caixa, com a oferta de etanol nas garrafas em suas caixas moradias pelos 11 dias consecutivos que receberam injeções diárias de etanol. Denominamos neste trabalho esta exposição repetida de etanol de tratamento crônico. Enquanto que animais controles tiveram oferta de água por todo experimento e receberam uma única injeção de Salina i.p. por dia, pelo mesmo período que os animais que receberam etanol. No 11º dia, seis horas após a última injeção de etanol e retirada das garrafas com etanol, os animais foram colocados no LCE para serem gravados comportamentos relacionados com a ansiedade para posterior análise (descritos no item 4.3.2). Assim, os grupos foram denominados de acordo com o tipo de tratamento: grupo Salina e grupo Etanol (n = 9 a 10 por grupo).

*4.2.Experimento 2: Avaliação do efeito do tratamento crônico com NAC durante o tratamento com etanol sobre comportamentos relacionados com a ansiedade na abstinência.*

Investigamos se a administração de NAC durante a exposição ao etanol previne os comportamentos relacionados com a ansiedade após a retirada do etanol. Para isto, os animais foram submetidos ao procedimento de tratamento ao etanol por 11 dias (como descrito previamente). Duas horas antes de cada injeção de etanol, por 10 dias os animais receberam uma injeção i.p. de veículo, NAC30; 60 ou 120 mg/kg. No 11º dia os animais receberam uma única injeção de etanol (2g/kg, i.p.) sem receber NAC e tiveram as garrafas com etanol substituídas por água pura 6 horas antes da exposição ao LCE para serem

avaliados os comportamentos relacionados com a ansiedade. Os grupos controles receberam veículo ou NAC com oferta de água para consumo oral a todo o momento. Assim, os grupos foram: Veículo-Salina; Veículo-Etanol; NAC30-Salina; NAC30-Etanol; NAC60-Salina; NAC60-Etanol; NAC120-Salina; NAC120-Etanol (n = 13 a 20 por grupo).

#### *4.3. Experimento 3: Avaliação do efeito agudo da NAC sobre comportamentos relacionados com a ansiedade na abstinência de etanol*

Investigamos se uma única dose de NAC 2 horas antes da exposição ao LCE era suficiente para reduzir os comportamentos relacionados com a ansiedade durante a retirada do etanol. Para isto, os animais foram submetidos ao procedimento de tratamento ao etanol por 11 dias (previamente descrito). No 11º dia, após quatro horas da última injeção intraperitoneal de salina ou etanol e substituição das garrafas de etanol por água, os animais receberam uma única dose via intraperitoneal de veículo NAC30; 60 ou 120 mg/kg, duas horas antes de serem expostos ao LCE para serem avaliados os comportamentos relacionados com a ansiedade. Assim, os grupos foram: Salina-Veículo; Etanol-Veículo; Salina-NAC30; Etanol-NAC30; Salina-NAC60; Etanol-NAC60; Salina-NAC120; Etanol-NAC120 (n = 9 a 13 por grupo).

#### *4.4. Experimento 4: Avaliação da concentração plasmática de etanol após o tratamento agudo e crônico com etanol e também NAC*

Este procedimento foi realizado para observar se seis horas de abstinência total de etanol era o suficiente para que a concentração de etanol no plasma, depois do tratamento agudo e crônico de etanol em ratos, era aproxima de zero. Além disto, grupos tratados com NAC foram avaliados para mensurar se a NAC poderia interferir na metabolização do etanol. Para este procedimento, utilizamos um aparato gentilmente cedido pelo Laboratório de Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP. Este equipamento contém um suporte para ser encaixado na cauda do animal com sistema de aquecimento controlado à temperatura de 40°C. A utilização deste aparato no momento da coleta de sangue é importante para evitar a vasoconstrição na cauda do animal ocasionada pelo estresse de manipulação. Os animais foram imobilizados e um pequeno corte na cauda dos mesmos foi feito para a coleta de sangue. No momento da coleta de sangue foi utilizado vaselina para massagear a cauda para a retirada do sangue com o intuito de minimizar lesões no tecido da cauda

do animal e reduzir a lise das hemácias. Todos os grupos tiveram amostras sanguíneas coletadas nos intervalos que chamamos de tempo “zero” (antes da injeção intraperitoneal de etanol no dia do teste) e depois da última injeção de etanol nos tempos 0,5; 1; 2; 4 e 6 horas que foram considerados os tempos durante a abstinência de etanol. Quatro grupos foram testados: i) animais que não receberam tratamento prévio, somente uma única dose de etanol no dia da coleta de sangue (Grupo Controle); ii) animais que foram submetidos ao tratamento com etanol por 11 dias como descrito no procedimento para abstinência ao etanol (Grupo Etanol Crônico), sendo a última dose de etanol recebida após a primeira coleta de sangue no tempo chamado de “zero”; iii) animais que foram submetidos ao tratamento idêntico ao grupo anterior, mas que quatro horas após o início da coleta de sangue (dia 11) receberam uma única injeção de NAC (Grupo: Etanol Crônico+NAC aguda) e iv) animais que foram submetidos ao tratamento de 11 dias ao etanol, sendo que duas horas antes de cada injeção de etanol por 10 dias os animais receberam uma injeção de NAC na dose de 60 mg/kg. No 11º dia houve somente administração de etanol após o tempo chamado de “zero” para a coleta de sangue (Grupo: NAC Crônica+ Etanol Crônico) (n = 5 a 6 por grupo).

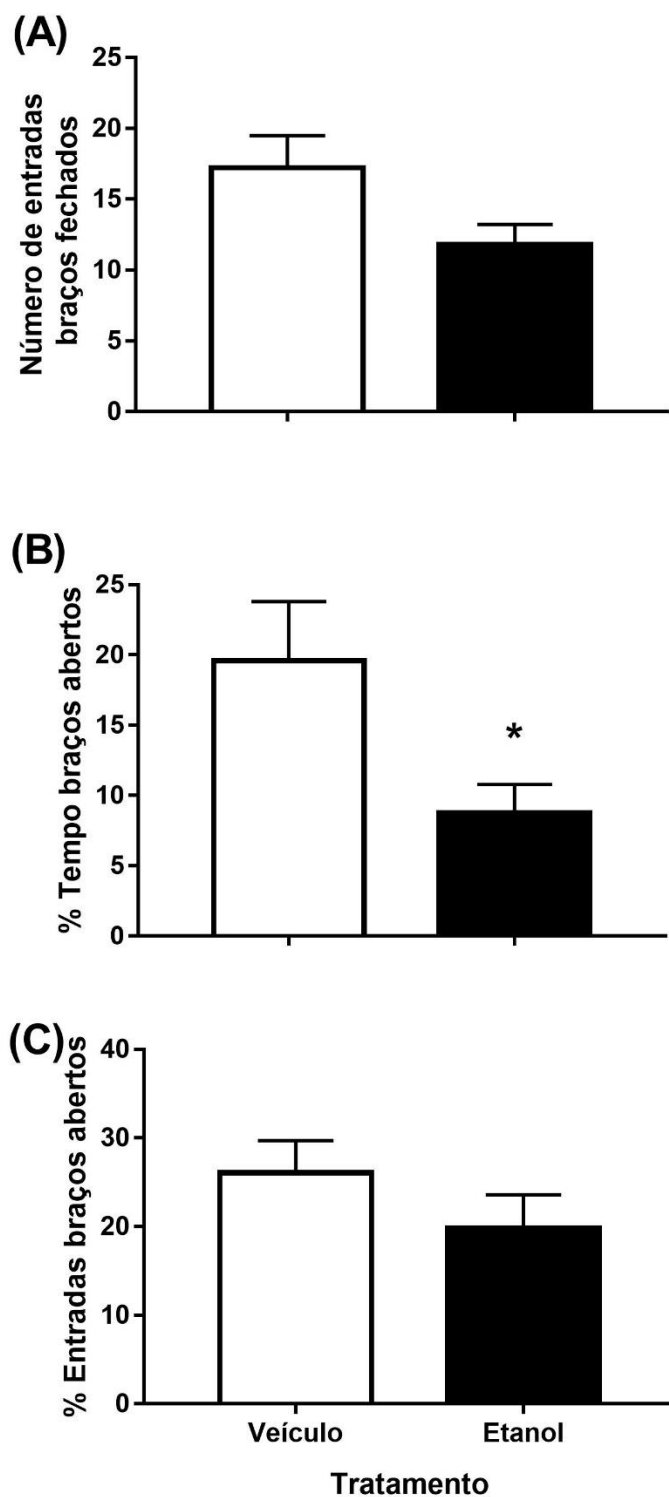
## **5. ANÁLISE DOS DADOS DO 1º TRABALHO: NAC NOS COMPORTAMENTOS RELACIONADOS COM A ANSIEDADE NA RETIRADA AO ETANOL**

Todos os dados estão mostrados com a média e o erro padrão da média. A análise estatística dos dados comportamentais coletados no LCE foi avaliada de acordo com cada experimento. Dados do Experimento 1 foram submetidos ao Student's test entre os grupos Salina vs Etanol e a covariância foi analisada por ANOVA/MANOVA. Dados do Experimento 2 e 3 foram analisados por ANOVA bifatorial considerando os fatores tratamento etanol (etanol vs salina) e NAC (NAC 30, NAC 60, NAC 120 ou veículo) seguindo pelo post-hoc de alcance múltiplo Duncan's test. Dados do Experimento 4 foram analisados por ANOVA de medidas repetidas considerando os fatores grupo (4 grupos tratados com etanol ou NAC) e tempo (5 pontos).

## **6.RESULTADOS DO 1° TRABALHO: NAC NOS COMPORTAMENTOS RELACIONADOS COM A ANSIEDADE NA RETIRADA AO ETANOL**

### *6.1.Experimento 1: Avaliação dos comportamentos relacionados com a ansiedade durante a abstinência após a retirada do tratamento repetido com etanol*

A oferta de etanol nas garrafas não foi para dosar a quantidade de consumo de cada animal, pois eles foram mantidos em grupos de 3 a 4 animais nas caixas moradias. No entanto, fizemos uma média estimada do consumo dos animais por etanol em relação a todos os dias, que foi de 30,18 g/ kg. O teste t-Student mostrou que houve diferença na porcentagem do tempo nos braços abertos induzida pelo tratamento com etanol ( $t_{1;17}=2,39$ ;  $p<0,05$ ), mas não houve para a porcentagem de entrada nos braços abertos ( $t_{1;17}=1,19$ ;  $p=0,25$ ). Houve tendência para tratamento com etanol alterar a frequência de entradas nos braços fechados ( $t_{1;17}=2,07$ ;  $p=0,054$ ), que é considerado um marcador de alteração locomotora (Figure 1). Devido a esta tendência de influência da atividade locomotora foi realizada a análise de covariância para o parâmetro número de entrada nos braços fechados com a porcentagem de entrada nos braços abertos ( $F_{1;16}=4,76$ ;  $p<0,05$ ) e porcentagem de tempo nos braços abertos ( $F_{1;16}=6,21$ ;  $p<0,05$ ). Estes resultados mostram que não houve interferência da locomoção nos resultados obtidos pelo t-student nestas medidas. Em continuidade, a análise estatística mostrou que houve uma diminuição no número de mergulhos desprotegidos ( $t_{1;17}=3,05$ ;  $p<0,05$ ) para o grupo tratado com etanol. Não houve diferença significativa entre os grupos para os outros parâmetros (todos os valores  $t \leq 2,07$ ;  $p > 0,05$ ), como mostrado na tabela 1.



**Figura 2: Comportamento relacionados à ansiedade induzidos pela exposição repetida do etanol.** Número de entradas nos braços fechados  $t_{1;17}=2,07$ ;  $p=0,054$  (A), porcentagem do tempo nos braços abertos (B) e porcentagem das entradas nos braços abertos (C) no Labirinto em Cruz Elevado,  $n=9-10$  por grupo. \* $p<0,05$  quando comparado com o grupo Salina (Teste t-Student).

**Tabela 1:** Medidas complementares para a ansiedade durante a abstinência ao etanol (Experimento 1). Os dados estão mostrados como frequência dos comportamentos (média±E.P.M) nas áreas desprotegidas e protegidas do Labirinto em Cruz Elevado.

Tratamento	Levantadas						Quadrante
	Mergulhos (Freq)		(Freq)		Esticadas (Freq)		Central
	Desp	Prot	Desp	Prot	Desp	Prot	Tempo (s)
Salina	8,9±1,5	0,44±0,2	0,9±0,4	17,33±2,2	0,2±0,2	1,78±0,6	108,1±7,6
Etanol	3,7±0,9 *	0,3±0,3	0,2±0,1	15,8±1,3	0,0±0,0	1,3±0,3	94,3±7,7

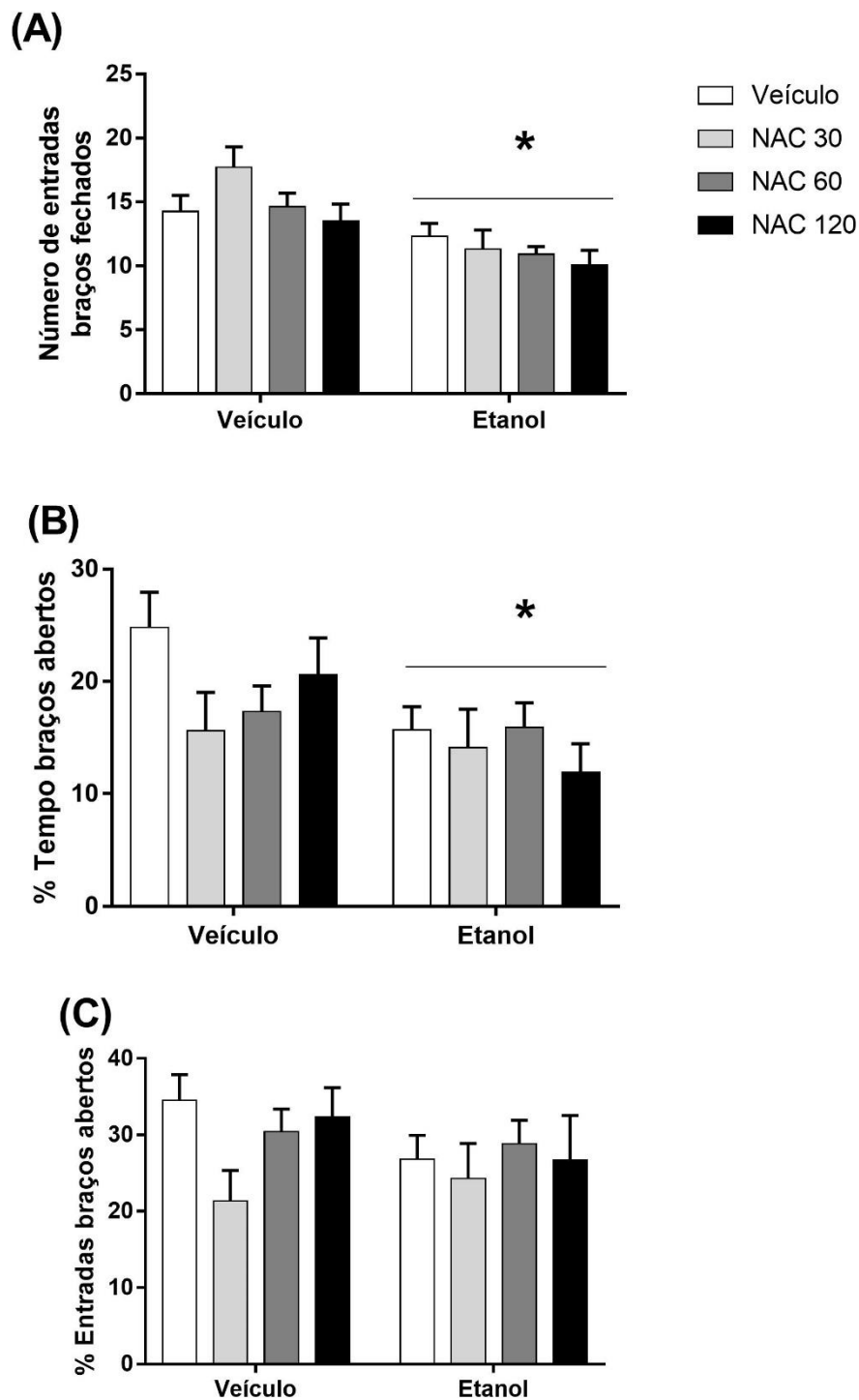
Freq: Frequência, Desp: Comportamentos nos espaços desprotegidos, Prot: Comportamentos nos espaços protegidos (s): Segundos. \*  $p < 0,05$  quando comparados com o grupo Salina (Teste t-Student). Valores em média±EPM, n=9-10 por grupo.

### 6.2. Experimento 2: Avaliação do efeito do tratamento crônico com NAC durante o tratamento com etanol sobre comportamentos relacionados com a ansiedade na abstinência

ANOVA bifatorial mostrou diferenças significativas relacionadas ao fator etanol nas medidas espaço temporais, como: número de entrada nos braços fechados ( $F_{1;116}=21,53$ ;  $p < 0,01$ ) e porcentagem de tempo nos braços abertos ( $F_{1;116}=6,80$ ;  $p < 0,05$ ), mas não revelou para porcentagem de entrada nos braços abertos ( $F_{1;116}=1,20$ ;  $p=0,28$ ). Para o fator NAC não houve alteração nestas medidas: número de entrada nos braços fechados ( $F_{3;116}=1,68$ ;  $p=0,17$ ), porcentagem de tempo nos braços abertos ( $F_{3;116}=1,31$ ;  $p=0,27$ ) e porcentagem de entrada nos braços abertos ( $F_{3;116}=1,57$ ;  $p=0,20$ ) e não houve interação entre estes 2 fatores (todos valores de  $F \leq 0,70$ ;  $p > 0,05$ ). Mostrando que a NAC não reverteu os comportamentos relacionados com a ansiedade no LCE ocasionados pela abstinência ao etanol. O teste de covariância foi realizado para verificarmos que não houve influência da atividade locomotora com os outros fatores, prejudicando os resultados obtidos. Realizando MANOVA para análise de covariância do número de entradas nos braços fechados, pudemos observar alteração significativa para porcentagem do tempo nos braços abertos ( $F_{1;115}=11,57$ ;  $p < 0,01$ ) e porcentagem de entrada nos braços abertos ( $F_{1;115}=12,35$ ;  $p < 0,01$ ). Estes resultados mostram que para o fator etanol, não houve interferência na locomoção dos animais em relação aos comportamentos relacionados com a ansiedade para os parâmetros analisados. Para o fator NAC, a análise de covariância pelo número de entradas nos braços fechados não apresentou diferenças para a porcentagem de entrada nos braços abertos ( $F_{3;115}=1,04$ ;  $p=0,38$ ) e porcentagem de tempo nos braços abertos ( $F_{3;115}=1,37$ ;



$p=0,25$ ). Em adição, análise estatística mostrou que houve diminuição no número de mergulhos desprotegidos para o fator etanol ( $F_{1;116}=9,61$ ;  $p<0,01$ ), mas não houve para a porcentagem de mergulhos desprotegidos ( $F_{1;116}=0,15$ ;  $p=0,70$ ) e para o fator NAC no número de mergulhos desprotegidos também não houve diferença significativa ( $F_{3;116}=1,11$ ;  $p=0,35$ ) e tão pouco no número de mergulhos protegidos ( $F_{3;116}=0,75$ ;  $p=0,52$ ) e interação entre estes fatores para o número de mergulhos ( $F_{3;116}=2,37$ ;  $p=0,07$ ) e protegidos ( $F_{3;116}=0,09$ ;  $p=0,97$ ). Em relação ao tempo no quadrante central houve redução significativa para os fatores etanol ( $F_{1;116}=26,06$ ;  $p<0,01$ ) e NAC ( $F_{3;116}=4,02$ ;  $p<0,01$ ), mas não houve interação entre estes fatores ( $F_{3;116}=0,14$ ;  $p=0,94$ ). ANOVA não revelou diferença significativa para nenhuma outra medida complementar ou interação (todos valores de  $F \leq 1,83$ ;  $p > 0,05$ ). Os resultados mostrados na Figura 2 e tabela 2.



**Figura 3: Ausência de efeitos do tratamento crônico com N-acetilcisteína (NAC) nas doses 30, 60 e 120 mg/kg nos comportamentos relacionados à ansiedade induzidos pela abstinência ao etanol. \*  $p < 0,05$  quando comparados com o grupo Veículo (Teste ANOVA), barras representam média  $\pm$  EPM,  $n = 13-20$  por grupo.**

**Tabela 2:** Medidas complementares para a ansiedade e falta de efeitos do tratamento crônico da N-acetilcisteína (NAC) durante a abstinência ao etanol (Experimento 2). Os dados estão mostrados como frequência dos comportamentos (média±E.P.M) nas áreas desprotegidas e protegidas do Labirinto em Cruz Elevado.

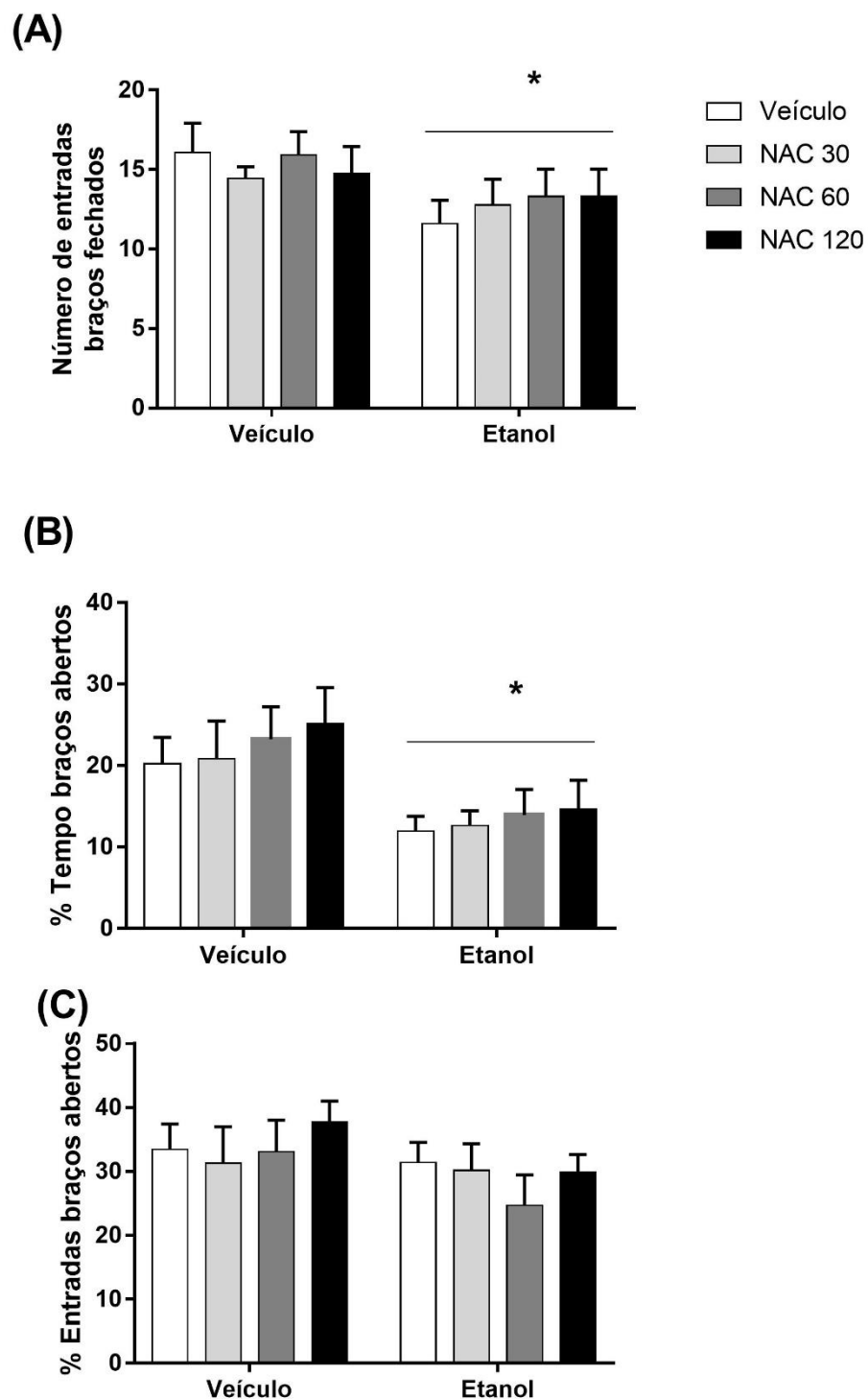
Agente Terapêutico	Tratamento	Mergulhos (Freq)		Levantadas (Freq)		Esticadas (Freq)		Quadrante Central Tempo(s)
		Desp	Prot	Desp	Prot	Desp	Prot	
Veículo	Salina	12,5±1,9	0,1±0,1,6	0,9±0,4	13,1±1,3	25,0±0,5	1,5±0,6	112,7±6,4
	Etanol	6,5±1,0	0,4±0,2	0,4±0,2	15,5±0,8	2,6±0,7	1,3±0,3	91,0±7,0
NAC30	Salina	6,7±1,4	0,2±0,2	0,3±0,2	16,7±1,3	1,5±0,5	2,2±0,6	101,8±4,9
	Etanol	7,9±2,0	0,1±0,1	0,4±0,2	17,2±1,6	0,9±0,2	1,0±0,4	81,7±6,6
NAC60	Salina	9,2±1,5	0,2±0,1	0,6±0,2	17,6±1,0	1,9±0,5	1,1±0,3	107,3±5,0
	Etanol	6,8±1,0	0,1±0,1	0,4±0,2	15,2±1,3	2,2±0,5	0,9±0,3	84,0±6,2
NAC120	Salina	9,9±1,6	0,0±0,0	0,7±0,2	15,3±1,3	2,3±0,5	1,4±0,3	94,3±6,4
	Etanol	4,5±1,1	0,1±0,1	0,4±0,4	14,2±1,7	1,3±0,5	1,1±0,4	66,1±7,8

Freq: Frequência; Dep: comportamentos nos espaços desprotegidos; Prot: comportamentos nos espaços protegidos; (s): Segundos. Valores em média±EPM, n=13-20 por grupo.

### 6.3. Experimento 3: Avaliação do efeito agudo da NAC sobre comportamentos relacionados com a ansiedade na abstinência de etanol

ANOVA de dois fatores mostrou diferença significativa para o fator etanol nas medidas espaço temporal, como: número de entrada nos braços fechados ( $F_{1;85}=5,18$ ;  $p<0,05$ ); porcentagem de tempo nos braços abertos ( $F_{1;85}=13,20$ ;  $p<0,01$ ), mas não revelou para porcentagem de entrada nos braços abertos ( $F_{1;85}=2,66$ ;  $p=0,11$ ). No entanto, nenhuma diferença estatística foi encontrada para o fator NAC no número de entrada nos braços fechados ( $F_{3;85}=0,15$ ;  $p=0,93$ ), porcentagem de tempo nos braços abertos ( $F_{3;85}=0,51$ ;  $p=0,68$ ) e porcentagem de entrada nos braços abertos ( $F_{3;85}=0,56$ ;  $p=0,65$ ). ANOVA não mostrou interação entre estes 2 fatores (todos valores de  $F\leq 0,74$ ;  $p>0,05$ ). O teste de covariância para etanol apresentou diferença estatística para o fator tratamento etanol para a porcentagem de tempo nos braços abertos ( $F_{1;84}=18,50$ ;  $p<0,01$ ) e entre porcentagem de entrada nos braços abertos ( $F_{1;84}=8,94$ ;  $p<0,01$ ) quando comparados ao número de entrada nos braços fechados, mostrando que não houve interação entre estes parâmetros. Assim como a análise estatística, o teste de covariância para o fator NAC não apresentou interação quando comparado os parâmetros porcentagem de tempo nos braços abertos ( $F_{3;84}=0,65$ ;  $p=0,59$ ) e porcentagem de entrada nos braços abertos ( $F_{3;84}=0,55$ ;  $p=0,65$ ) quando comparados com o número de entrada nos braços fechados. Também não houve covariância para interação de porcentagem de tempo nos braços abertos ( $F_{3;84}=0,32$ ;  $p=0,99$ ) e porcentagem de entrada nos braços abertos ( $F_{3;84}=0,43$ ;  $p=0,73$ ) quando comparados ao número de entrada nos

braços fechados. Em continuidade, a análise estatística mostrou que houve alteração nas medidas complementares para o fator etanol, como: número de mergulhos desprotegidos ( $F_{1;85}=14,84$ ;  $p<0,01$ ), número de levantadas desprotegidas ( $F_{1;85}=11,16$ ;  $p<0,01$ ), número de levantadas protegidas ( $F_{1;85}=10,19$ ;  $p<0,01$ ), número de esticadas desprotegidas ( $F_{1;85}=11,14$ ;  $p<0,01$ ), número de esticadas protegidas ( $F_{1;85}=4,73$ ;  $p=0,03$ ) e tempo no quadrante central ( $F_{1;85}=4,19$ ;  $p=0,04$ ), porém houve diferença para fator etanol no número de mergulhos protegidos ( $F_{1;85}=0,14$ ;  $p=0,71$ ). Além disto, ANOVA não revelou diferença significativa para o fator NAC para ambos frequência e porcentagem das medidas complementares (todos valores de  $F \leq 0,98$ ;  $p > 0,05$ ). Nenhuma interação foi observada (todos valores de  $F \leq 1,09$ ;  $p > 0,05$ ). Os resultados estão mostrados na Figura 3 e tabela 3.



**Figura 4: Ausência de efeitos do tratamento com N-acetilcisteína (NAC) agudo nas doses 30, 60 e 120 mg/kg nos comportamentos relacionados a ansiedade induzidos pela síndrome de abstinência ao etanol. \*  $p < 0,05$  quando comparados com o grupo Veículo (Teste ANOVA), barras representam média  $\pm$  EPM,  $n = 9-13$  por grupo.**

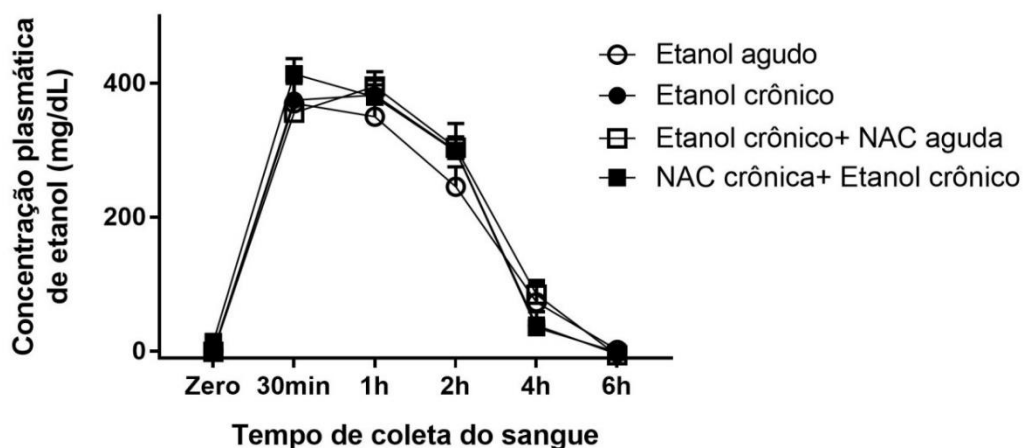
**Tabela 3:** Medidas complementares para a ansiedade e falta de efeitos do tratamento agudo de N-acetilcisteína (NAC) durante a abstinência ao etanol (Experimento 3). Os dados estão mostrados como frequência (número) dos comportamentos (média±E.P.M) nas áreas desprotegidas e protegidas do Labirinto em Cruz Elevado.

Agente Terapêutico	Tratamento	Mergulhos (Freq)		Levantadas (Freq)		Esticadas (Freq)		Quadrante Central Time (s)
		Desp	Prot	Desp	Prot	Desp	Prot	
Veículo	Salina	12,8±2,5	0,0±0,0	1,3±0,4	17,4±7,5	6,8±1,3	7,5±1,3	83,3±9,2
	Etanol	7,2±1,3	0,0±0,0	0,3±0,2	17,1±1,6	5,5±1,0	6,5±1,1	63,2±8,0
NAC30	Salina	13,4±3,4	0,0±0,0	0,8±0,3	20,2±2,5	12,9±3,0	11,6±1,8	88,0±5,9
	Etanol	7,1±1,8	0,0±0,0	0,4±0,3	14,9±1,2	5,4±0,6	7,9±1,6	90,8±9,5
NAC60	Salina	14,3±2,8	0,1±0,1	1,5±0,7	19,4±1,3	9,2±2,2	7,0±1,7	88,5±6,0
	Etanol	7,6±1,8	0,0±0,0	0,2±0,1	18,8±1,9	6,3±1,6	8,8±0,8	77,8±8,4
NAC120	Salina	15,7±2,8	0,0±0,0	1,8±0,6	16,9±1,8	11,7±2,5	6,9±1,3	82,9±7,3
	Etanol	8,3±2,2	0,0±0,0	0,3±0,1	15,7±1,8	5,7±1,6	6,8±1,6	64,2±8,4

Freq: Frequência; Dep: comportamentos nos espaços desprotegidos; Prot: comportamentos nos espaços protegidos; (s): Segundos. Valores em média±EPM, n=9-13 por grupo.

#### 6.4. Experimento 4: Avaliação da concentração plasmática de etanol após o tratamento agudo e crônico com etanol e também NAC

ANOVA para medidas repetidas não mostrou diferença estatística para o fator grupo ( $F_{3;18}=0,36$ ,  $p=0,79$ ) e mostrou diferença estatística para o fator tempo ( $F_{5;90}=300,32$ ,  $p<0,01$ ). Importaneamente ANOVA não mostrou interação entre os dois fatores ( $F_{15;90}=0,90$ ,  $p=0,57$ ). Estes achados mostram que ambos tratamentos com etanol e NAC, independentemente se agudo ou crônico, não alteraram a farmacocinética do etanol e as seis horas de retirada total de etanol foram o suficiente para que os animais tivessem etanolemia próxima a zero, como mostrado na Figura 4.



**Figura 5:** Concentração de etanol no sangue dos ratos após exposição ao tratamento agudo ou repetido de etanol e/ou N-acetilcisteína (NAC, 60 mg/kg, i.p.). Os pontos representam média±EPM, n=5-6 por grupo.

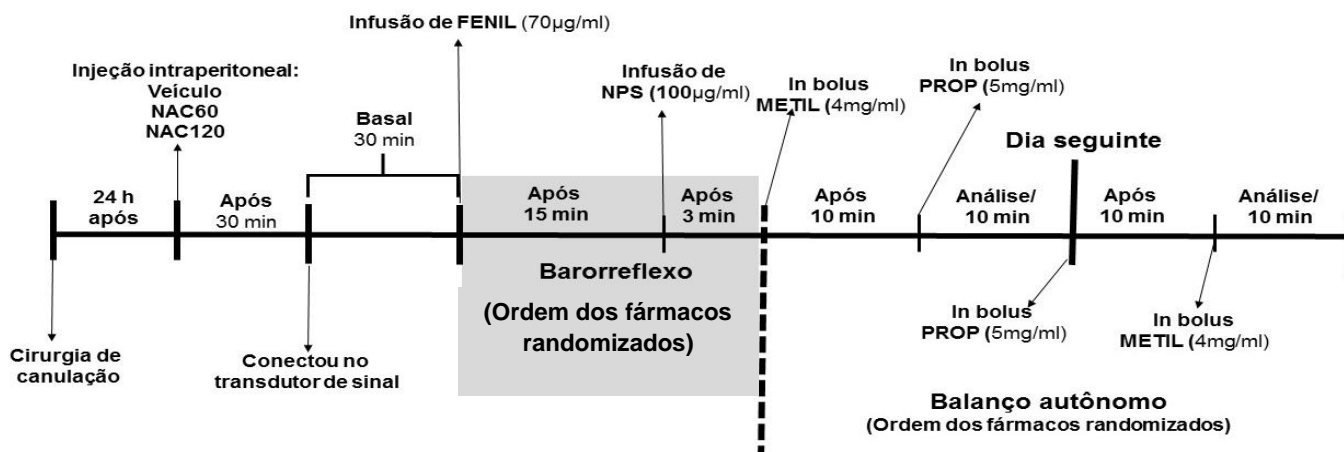
## 7. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DO 2º TRABALHO: NAC E ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES INDUZIDAS POR ESTRESSE

### 7.1. Experimento 1. Estudo da ação aguda após 2 horas de NAC na função cardiovascular.

Os animais foram submetidos à cirurgia de canulação da artéria e veia femoral. Após 24 horas da cirurgia, os animais receberam uma injeção intraperitoneal de NAC nas doses de 60 ou 120 mg/kg ou solução PBS (grupo veículo). Após 30 minutos, os animais foram conectados ao sistema de registro cardiovascular para mensurar parâmetros basais por 30min. Em seguida, para avaliar a resposta barorreflexa, foi realizado infusões dos fármacos fenilefrina e nitroprussiato de sódio. Em continuidade, foram realizadas infusões in bolus de propranolol e metilatropina. Vinte e quatro horas após estes registros, os animais receberam novamente uma injeção intraperitoneal de NAC em suas respectivas doses ou veículo. E depois de uma hora e meia foi realizado o registro do bloqueio autônomo pelos fármacos metilatropina e propranolol na ordem inversa em relação ao dia anterior.

Deste modo, os grupos foram caracterizados, como:

Veículo (n=7); NAC60 (n=7); NAC120 (n=8).



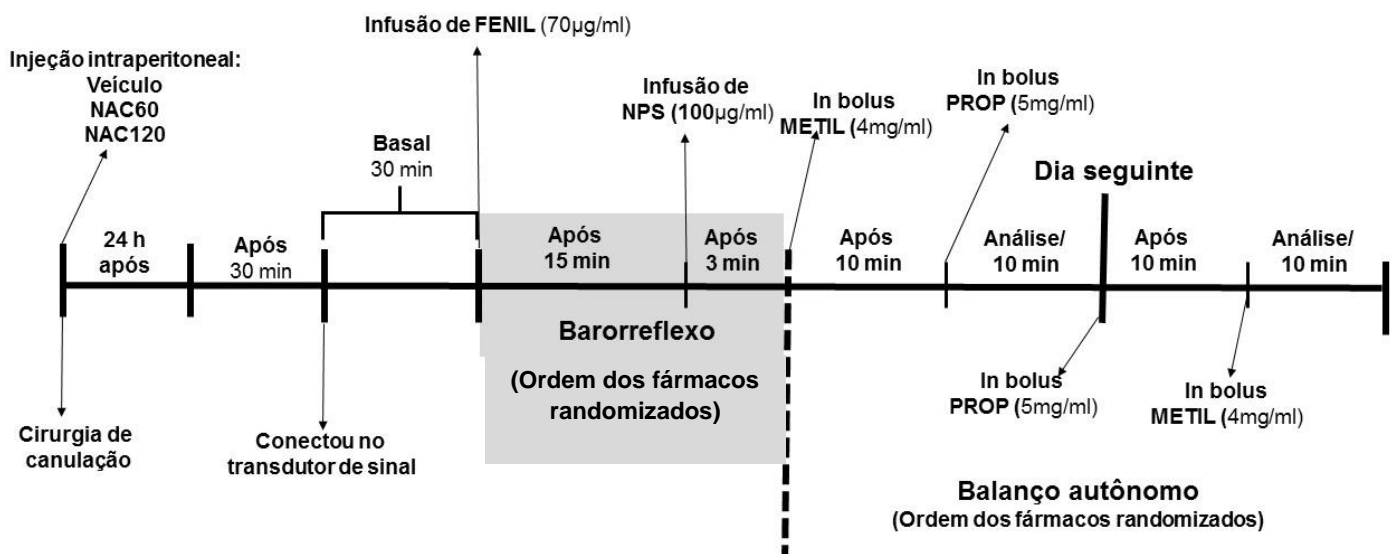
**Figura 6. Resumo do protocolo experimental do experimento 1.** Após 2 horas do tratamento agudo com uma injeção intraperitoneal de veículo, NAC 60 ou 120 mg/kg seguido do protocolo para os testes dos barorreflexos e balanço autônomo.

7.2. *Experimento 2. Estudo da ação aguda após 24 horas de NAC na função cardiovascular.*

Os animais foram submetidos à cirurgia de canulação da artéria e veia femoral, e foram tratados durante o procedimento cirúrgico com uma injeção intraperitoneal de N-acetilcisteína (NAC) nas doses de 60 ou 120 mg/kg ou solução PBS (grupo veículo). Após 24 horas, os animais foram conectados ao sistema de registro cardiovascular para mensurar parâmetros basais por 30min. Em seguida, para avaliar a resposta barorreflexa, foi realizado infusões dos fármacos fenilefrina e nitroprussiato de sódio. Em seguida, foram realizadas infusões *in bolus* de propranolol e metilatropia. Vinte e quatro horas após estes registros foram realizados o bloqueio autônomo pelos fármacos metilatropina e propranolol em ordem inversa em relação ao dia anterior para os animais.

Assim, os grupos foram caracterizados, como:

Veículo (n=10); NAC60 (n=7); NAC120 (n=7).



**Figura 7. Resumo do protocolo experimental do experimento 2.** Após 24 horas do tratamento agudo com uma injeção intraperitoneal de veículo, NAC 60 ou 120 mg/kg seguido do protocolo para o teste dos barorreflexos e balanço autônomo.

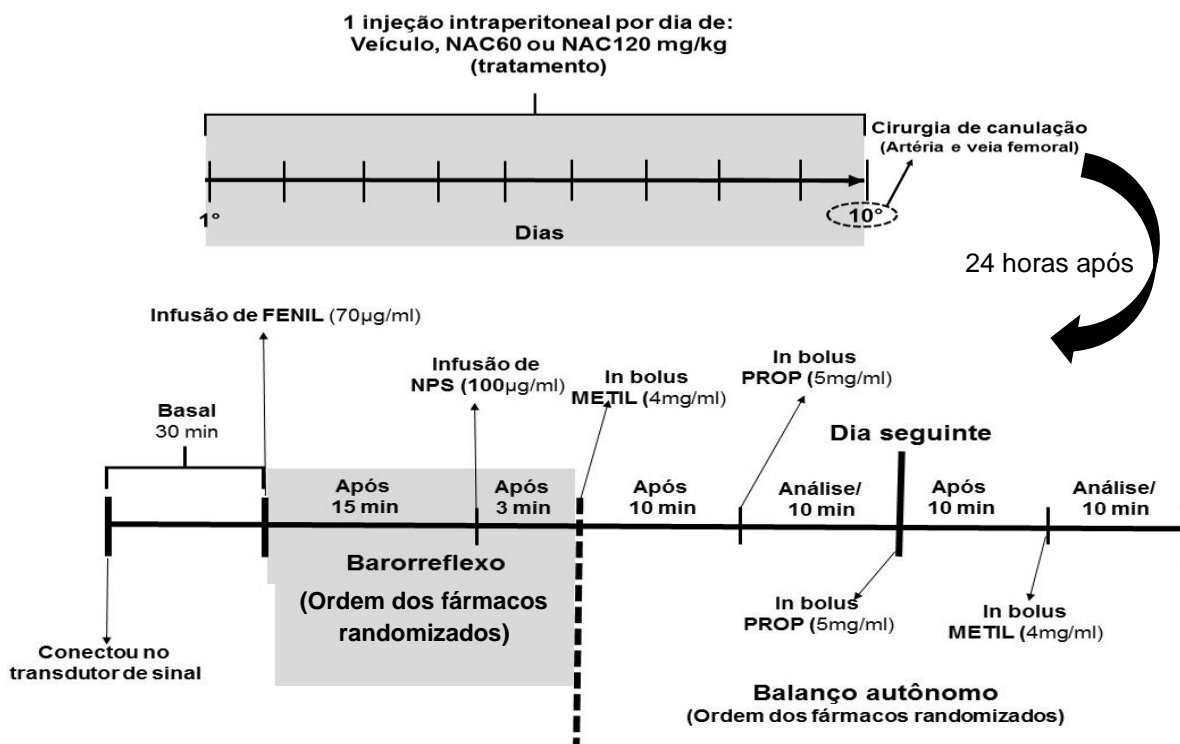


7.3. *Experimento 3. Estudo dos efeitos do tratamento crônico com NAC sobre o barorreflexo e balanço autônomo.*

Os animais foram submetidos ao tratamento de 10 dias com N-acetilcisteína nas doses de 60 ou 120 mg/kg ou solução PBS (grupo veículo). No 10º dia foi realizada a cirurgia de canulação da artéria e veia femoral, e 24 horas após a cirurgia, os animais foram conectados ao sistema de registro cardiovascular para mensurar parâmetros basais por 30min. Em seguida foram realizadas infusões dos fármacos fenilefrina e nitroprussiato de sódio para avaliar a resposta barorreflexa em um intervalo de 15 minutos entre os fármacos. Após isto, os animais receberam propranolol e metilatropina com um intervalo de 10 minutos para cada infusão para avaliar a atividade autônoma cardíaca. Vinte e quatro horas após estes registros, os animais receberam novamente uma injeção intraperitoneal de N-acetilcisteína ou veículo e depois de uma hora e meia foi realizado o registro do bloqueio autônomo pelos fármacos metilatropina e propranolol em ordem inversa em relação ao dia anterior.

Assim, os grupos foram caracterizados, como:

Veículo (n=8); NAC60 (n=8); NAC120 (n=7).



**Figura 8. Resumo do protocolo experimental do experimento 3.** Tratamento com injeção intraperitoneal por 10 dias de veículo, NAC 60 ou 120 mg/kg 24 horas após a cirurgia de canulação, seguido do protocolo para os testes dos barorreflexores e balanço autônomo.

7.4. *Experimento 4. Estudo dos efeitos do tratamento crônico com NAC sobre o barorreflexo e o balanço autônomo desencadeadas por estresse de restrição repetido.*

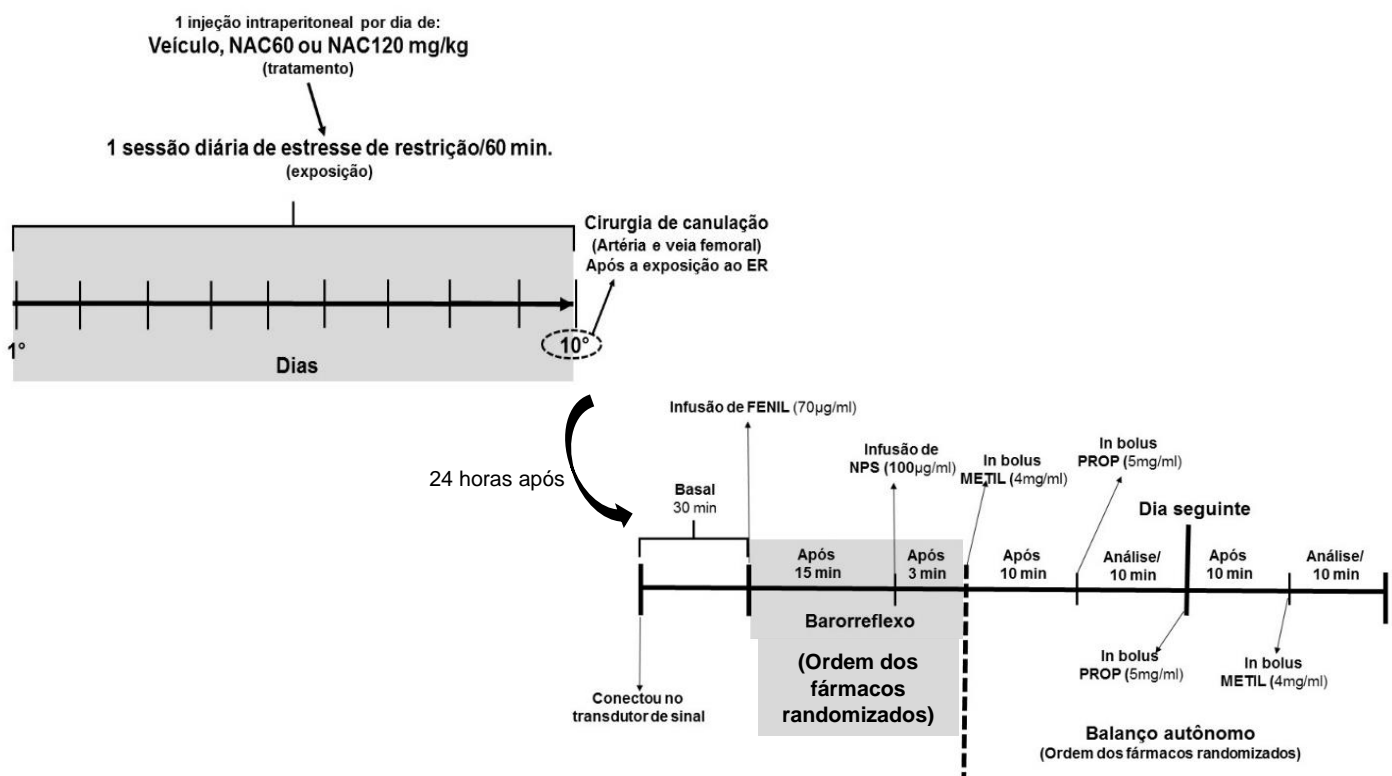
Os animais foram submetidos ao tratamento com N- acetilcisteína (NAC) e a exposição ao estresse de restrição por 10 dias consecutivos. Os grupos foram divididos e caracterizados de acordo com o tratamento e exposição. Deste modo, eles foram separados de acordo com o tratamento que receberam de NAC nas doses de 60 ou 120 mg/kg e um grupo recebeu veículo (PBS) sem a exposição ao estresse. No 10º dia, após o tratamento e exposição ao estresse, foram realizadas as cirurgias de canulação da artéria e veia femoral. Vinte e quatro horas após a cirurgia, os animais foram conectados ao sistema de registro cardiovascular, para mensurar parâmetros basais por 30min. Em seguida, foram realizadas infusões dos fármacos fenilefrina e nitroprussiato de sódio para avaliar a resposta barorreflexa em um intervalo de 15 minutos entre os fármacos.

Após isto, os animais receberam propranolol e metilatropina com um intervalo de 10 minutos para cada infusão para avaliar a atividade autônoma cardíaca. Vinte e quatro horas após estes registros, foi realizado novamente o registro do bloqueio autônomo pelos fármacos metilatropina e propranolol em ordem inversa em relação ao dia anterior.

Deste modo, os grupos foram caracterizados, como:

Controle-Veículo (n=12); Controle-NAC60 (n=12); Controle-NAC120 (n=11); sendo os animais que receberam somente tratamento ao longo dos 10 dias.

Estresse-Veículo (n=8); Estresse-NAC60 (n=7); Estresse-NAC120 (n=6), sendo os animais que receberam estresse de restrição (1h/dia) após 1h do tratamento por 10 dias.



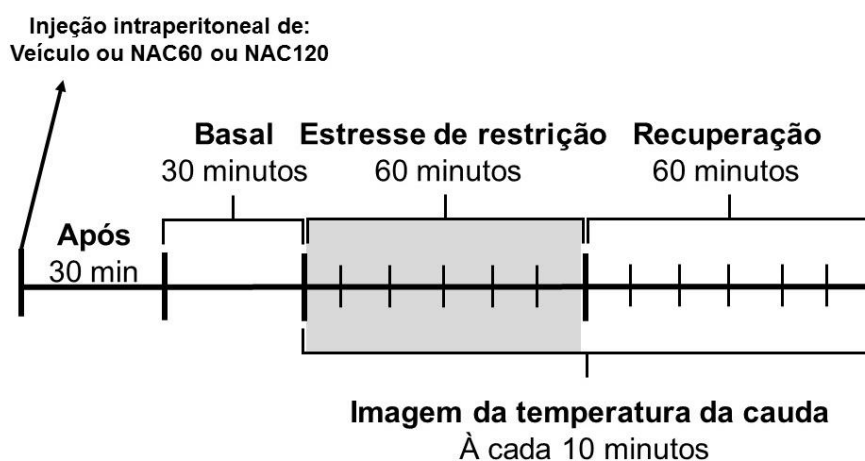
**Figura 9. Resumo do protocolo experimental do experimento 4.** Tratamento com uma injeção intraperitoneal por dia de veículo, NAC 60 ou 120 mg/kg 1h antes da exposição do estresse de restrição repetido com duração de 1 hora sendo 1 sessão por dia durante 10 dias e cirurgia de canulação da artéria e veia femoral logo após a última sessão de estresse de restrição. Após 24 horas da cirurgia foi seguido do protocolo para os testes dos barorreflexores e balanço autônomo.

7.5. *Experimento 5. Efeitos da ação aguda após 2 horas do tratamento com NAC sobre as alterações cardiovasculares desencadeadas por estresse de restrição agudo.*

Os animais foram submetidos à cirurgia de canulação da artéria femoral. Após 24 horas da cirurgia, os animais receberam uma injeção intraperitoneal de N-acetilcisteína (NAC) nas doses de 60 ou 120 mg/kg do animal e um grupo recebeu veículo (PBS). Após trinta minutos da injeção, os animais foram conectados ao sistema de registro cardiovascular para mensurar parâmetros basais por 30min. Ainda conectados ao transdutor do sistema de registro, os animais foram submetidos a uma sessão de estresse de restrição por 60 minutos. Após isto, ainda conectados ao transdutor de registro cardiovascular, os animais foram retirados do tubo de restrição para serem avaliados os parâmetros cardiovasculares de recuperação durante 60 minutos após uma situação de estresse. Durante todo o tempo com uma câmera termográfica, registro de imagem da cauda do animal foi feito a cada 10 minutos para avaliarmos a temperatura cutânea em °C do animal.

Deste modo, os grupos foram caracterizados, como:

Veículo (n=8); NAC60 (n=8); NAC120 (n=7), sendo que todos foram submetidos ao estresse de restrição agudo no dia do teste.



**Figura 10. Resumo do protocolo experimental do experimento 5.** Tratamento agudo de veículo, NAC 60 ou 120 mg/kg, injeção intraperitoneal com exposição aguda do estresse de restrição para análise dos parâmetros cardiovasculares e de temperatura da cauda no momento da exposição ao estresse e durante a recuperação deste estímulo aversivo.

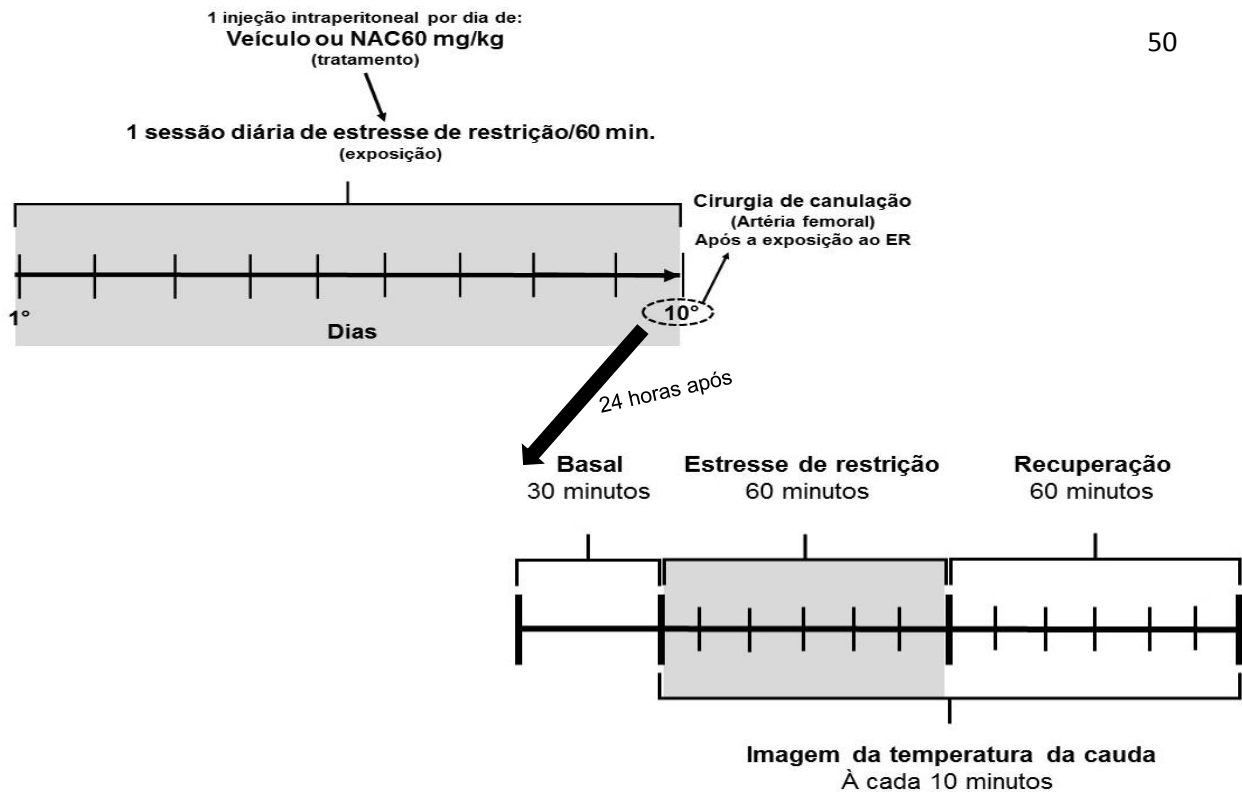
7.6. Experimento 6. *Efeitos da ação do tratamento crônico com NAC sobre as alterações cardiovasculares desencadeadas por estresse de restrição repetido.*

Os animais foram submetidos ao estresse de restrição repetido e tratamento por 10 dias com N- acetilcisteína (NAC) na dose de 60 mg/kg e um grupo recebeu veículo (PBS). As sessões de estresse de restrição foram de 60 min., sendo uma vez por dia, e ocorreram sessenta minutos após cada injeção intraperitoneal de NAC ou veículo. No 10º dia, após a última sessão de estresse, foi realizada a cirurgia de canulação da artéria femoral. Vinte e quatro horas após a cirurgia, os animais foram conectados ao sistema de registro cardiovascular para mensurar parâmetros basais por 30min e permanecendo conectados, foram submetidos a mais uma sessão de estresse de restrição por 60 minutos. Em seguida, ainda conectados ao transdutor de registro cardiovascular, foram retirados do tubo de restrição para serem avaliados os parâmetros cardiovasculares de recuperação durante 60 minutos após uma situação de exposição ao estresse crônico. Um grupo recebeu somente veículo e outro somente NAC 60 mg/kg sem estresse por 10 dias consecutivos.

Deste modo, os grupos foram caracterizados, como:

Controle-Veículo (n=11); Controle-NAC60 (n=13); sendo animais que receberam somente tratamento ao longo dos 10 dias e uma única sessão de estresse de restrição no dia do teste

Estresse-Veículo (n=8); Estresse-NAC60 (n=9), sendo animais que receberam uma sessão de estresse de restrição por 10 dias após 1h do tratamento e no dia do teste somente foram expostos ao estresse de restrição, sem tratamento.



**Figura 11. Resumo do protocolo experimental do experimento 6.** Tratamento com uma injeção intraperitoneal por dia de veículo ou NAC 60 mg/kg 1h antes da exposição do estresse de restrição repetido com duração de 1 hora por dia durante 10 dias. Análise dos parâmetros cardiovasculares e de temperatura da cauda no momento do estresse de restrição agudo e durante a recuperação deste estímulo aversivo.

## 8. ANÁLISE DOS DADOS DO 2º TRABALHO: NAC E ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES INDUZIDAS POR ESTRESSE

Os dados foram expressos com média  $\pm$  EPM. Os parâmetros cardiovasculares dos experimentos 1, 2, 3 foram analisados usando one-way ANOVA, considerando o fator tratamento (Veículo e NAC nas doses descritas). No experimento 4, os parâmetros cardiovasculares foram analisados usando two-way ANOVA considerando os fatores tratamento (Veículo e NAC nas doses descritas) e estresse (Controle vs estresse de restrição). Para os experimentos 5 e 6 foram analisados usando ANOVA considerando os fatores tratamento, exposição (estresse vs recuperação) e tempo. Para todas as análises, foi utilizado o teste post-hoc de Bonferroni para identificação das diferenças entre os grupos experimentais. Os resultados do teste estatístico foram considerados significativos com  $P \leq 0,05$ .

## **9.RESULTADOS DO 2º TRABALHO: NAC E ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES INDUZIDAS POR ESTRESSE**

Para facilitar a visualização dos parâmetros cardiovasculares, fizemos uma lista de abreviaturas antes de expormos os resultados, sendo: pressão arterial (PA), frequência cardíaca (FC), frequência cardíaca intrínseca (FCI), pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD), pressão arterial média (PAM), temperatura (TEMP), metilatropina (METIL), propranolol (PROP), fenilefrina (FENIL), nitroprusiato de sódio (NPS).

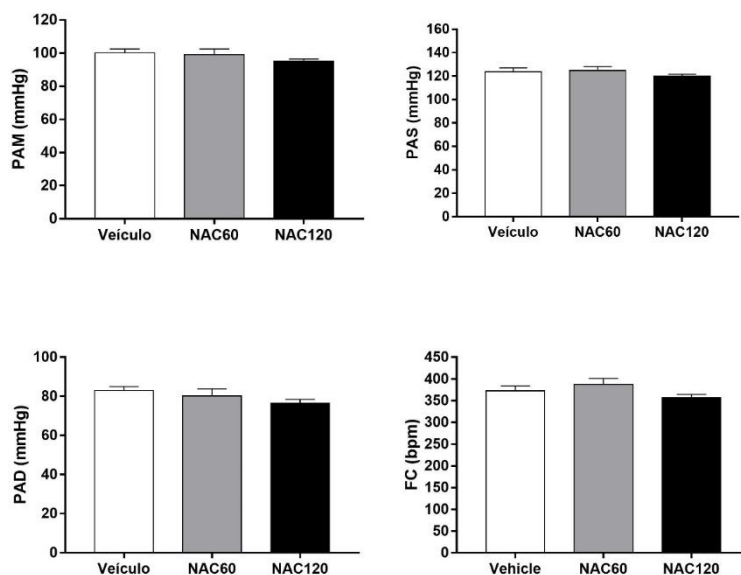
### *9. 1. Experimento 1. Estudo da ação aguda após 2 horas de NAC na função cardiovascular.*

Este experimento foi feito para avaliarmos se a administração aguda de NAC teria efeito na atividade do barorreflexo e na atividade autônoma cardíaca. A análise estatística one-way ANOVA mostrou que não houve alteração nos parâmetros cardiovasculares basais, para: PAM ( $F_{2,18}=1,241$ ;  $p=0,313$ ), PAS ( $F_{2,18}=0,791$ ;  $p=0,469$ ), PAD ( $F_{2,18}=1,448$ ;  $p=0,261$ ) e FC ( $F_{2,18}=2,114$ ;  $p=0,150$ ).

One-way ANOVA também não mostrou alterações na resposta da FC à METIL ( $F_{2,18}=0,775$ ;  $p=0,476$ ) e PROP ( $F_{2,18}=0,219$ ;  $p=0,806$ ), e da FCI ( $F_{2,18}=0,413$ ;  $p=0,668$ ).

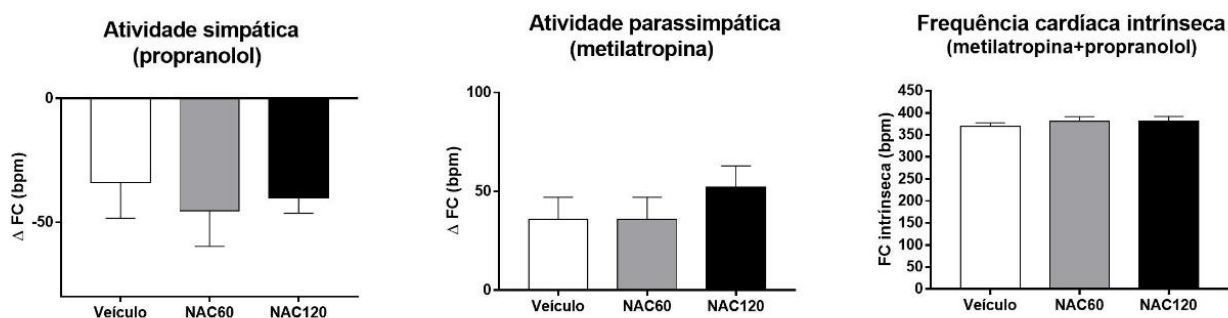
One-way ANOVA também não demonstrou diferenças no ganho da regressão linear da resposta bradicárdia do barorreflexo. ( $F_{2,19}=1,341$ ;  $p=0,285$ ), porém demonstrou efeito da NAC no ganho da regressão linear da resposta taquicárdica ( $F_{2,19}=14,110$ ;  $p<0,001$ ). O pós-teste de Bonferroni revelou que o grupo veículo é diferente do grupo NAC 60 ( $p<0,001$ ) e NAC 120 ( $p=0,01$ ), e que os grupos NAC 60 e NAC 120 não são diferentes entre si ( $p=0,277$ ).

### Parâmetros cardiovasculares basais



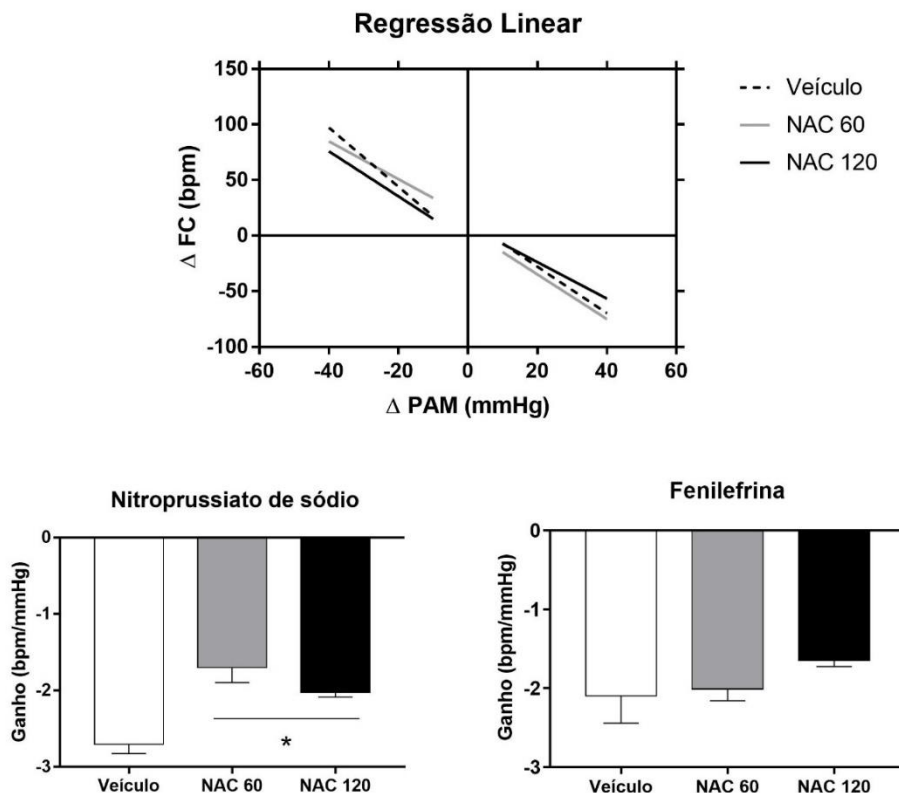
**Figura 12.** Parâmetros cardiovasculares basais dos animais submetidos a uma injeção intraperitoneal de veículo, NAC 60 ou 120 mg/kg. Pressão arterial média (PAM), pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD) e frequência cardíaca (FC). As barras apresentam os valores em média±EPM (n=7-8 animais por grupo).

### Balanco autônomo



**Figura 13.** Balanço autônomo dos animais após 2 horas de serem submetidos a uma injeção intraperitoneal de veículo, NAC 60 ou 120 mg/kg. Os gráficos representam a variação da frequência cardíaca ( $\Delta$ FC) induzida pela administração intravenosa de propranolol (antagonista de adrenoreceptores  $\beta$ ) ou metilatropina (antagonista de receptores colinérgicos muscarínicos) e frequência cardíaca intrínseca (FCI) observada após a administração combinada de metilatropina e propranolol. As barras apresentam os valores em média±EPM (n=7-8 animais por grupo).





**Figura 14.** Regressão linear do barorreflexo e análise do ganho da regressão linear após 2 horas dos animais serem submetidos a uma injeção intraperitoneal de veículo, NAC 60 ou 120 mg/kg. O gráfico superior correlaciona a variação da pressão arterial média ( $\Delta PAM$ ) com a resposta reflexa da variação da frequência cardíaca ( $\Delta FC$ ). Análise do ganho da regressão linear frente ao desafio de nitroprussiato de sódio (NPS) e fenilefrina (FENIL). \* $p < 0,05$  quando comparados ao grupo veículo (Bonferroni teste post-hoc). As barras apresentam os valores em média  $\pm$  EPM (n=7-8 animais por grupo).

## 9.2. Experimento 2. Estudo da ação aguda após 24h de N- acetilcisteína na função cardiovascular.

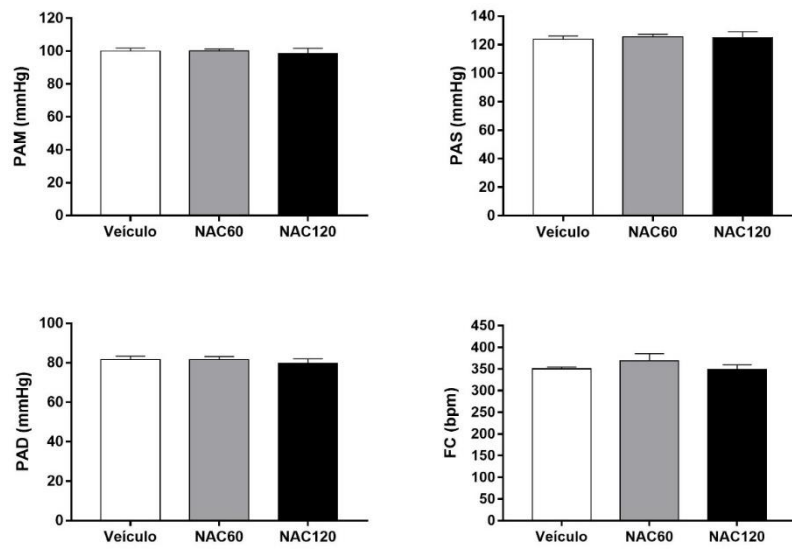
Este experimento foi feito para avaliarmos a persistência dos efeitos identificados no Experimento 1 24 horas da administração aguda de NAC. A análise one-way ANOVA mostrou que não houve alteração nos parâmetros cardiovasculares basais, para: PAM ( $F_{2,21}=0,126$ ;  $p=0,882$ ), PAS ( $F_{2,21}=0,111$ ;  $p=0,896$ ), PAD ( $F_{2,21}=0,361$ ;  $p=0,701$ ) e FC ( $F_{2,21}=1,076$ ;  $p=0,359$ ).

One-way ANOVA também não mostrou alterações nas respostas da FC à METIL ( $F_{2,19}=0,271$ ;  $p=0,765$ ) e PROP ( $F_{2,21}=0,06$ ;  $p=0,942$ ) e da FCI ( $F_{2,21}=0,524$ ;  $p=0,600$ ).

One-way ANOVA demonstrou diferenças na regressão linear da resposta bradicárdica do barorreflexo ( $F_{2,21}=5,306$ ;  $p=0,014$ ). O pós-teste de Bonferroni

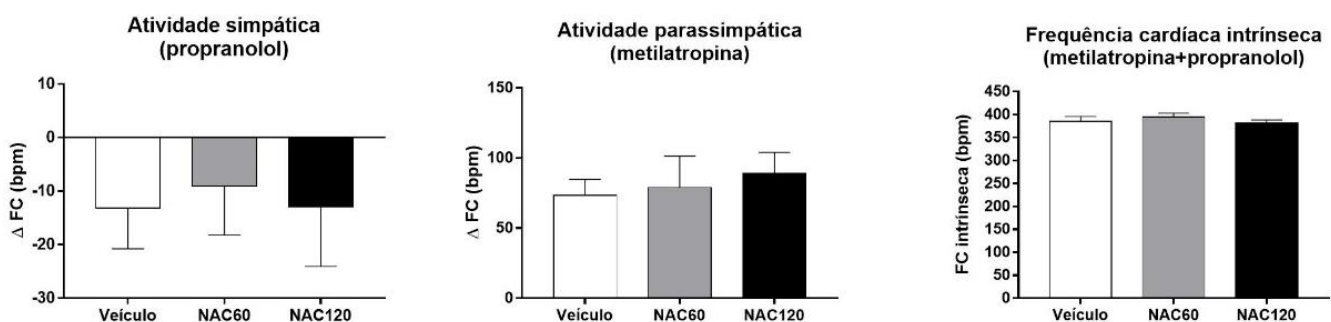
revelou diferenças do grupo veículo com o grupo NAC 60 ( $p=0,029$ ), mas não mostrou diferença do grupo veículo com o grupo NAC 120 ( $p>0,9999$ ); além de indicar que os grupos NAC 60 e NAC 120 são diferentes entre si ( $p=0,028$ ). No entanto, one-way ANOVA não demonstrou diferenças na regressão linear da resposta taquicárdica do barorreflexo ( $F_{2,21}=0,211$ ;  $p=0,812$ ).

### Parâmetros cardiovasculares basais

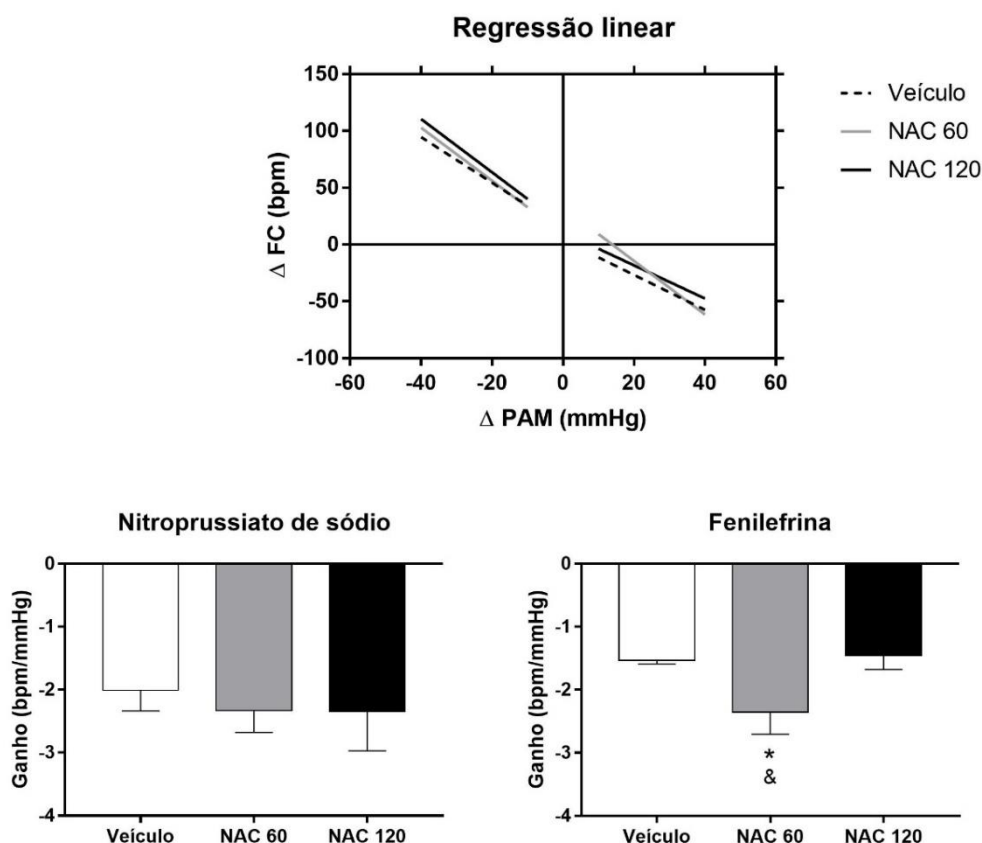


**Figura 15.** Parâmetros cardiovasculares basais dos animais 24 horas após a injeção intraperitoneal aguda de veículo, NAC 60 ou 120 mg/kg. Pressão arterial média (PAM), pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD) e frequência cardíaca (FC). As barras apresentam os valores apresentados em média±EPM ( $n=7-10$  animais por grupo).

### Balanço autônomo



**Figura 16.** Balanço autônomo dos animais 24 horas após a injeção intraperitoneal aguda de veículo, NAC 60 ou 120 mg/kg. Os gráficos representam a variação da frequência cardíaca ( $\Delta FC$ ) induzida pela administração intravenosa de propranolol (antagonista de adrenoreceptores  $\beta$ ) ou metilotropina (antagonista de receptores colinérgicos muscarínicos) e frequência cardíaca intrínseca (FCI) observada após a administração combinada de metilotropina e propranolol. As barras apresentam os valores apresentados em média±EPM ( $n=7-10$  animais por grupo).



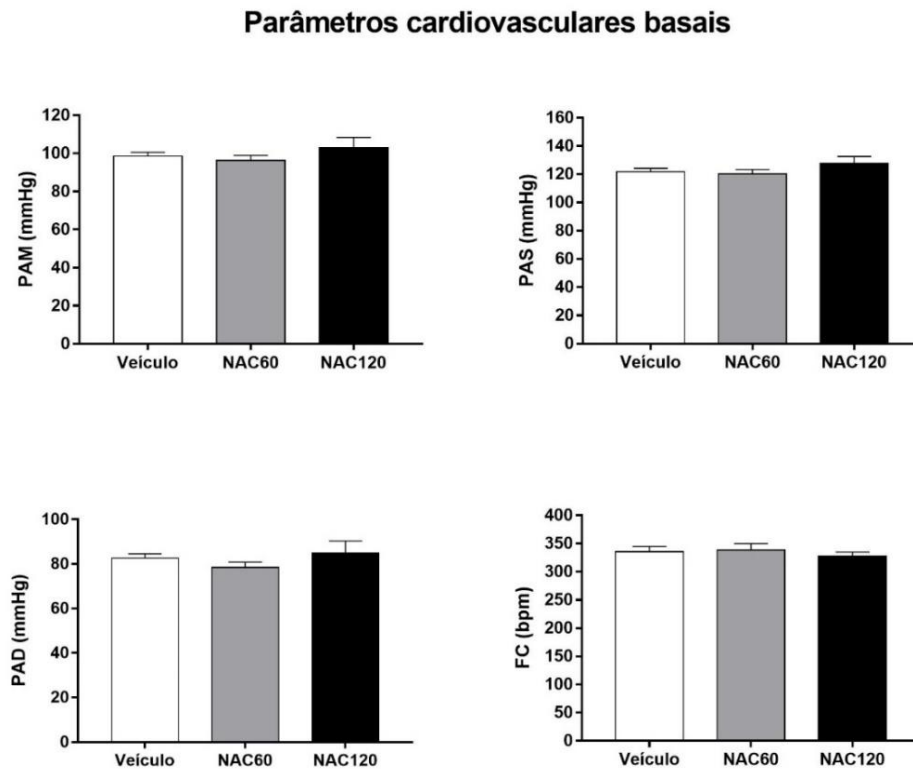
**Figura 17.** Regressão linear do barorreflexo e análise do ganho da regressão linear dos animais 24 horas após a injeção intraperitoneal aguda de veículo, NAC 60 ou 120 mg/kg. O gráfico superior correlaciona a variação da pressão arterial média ( $\Delta$ PAM) com a resposta reflexa da variação da frequência cardíaca ( $\Delta$ FC). Análise do ganho da regressão linear frente ao desafio de nitroprussiato de sódio (NPS) e fenilefrina (FENIL). \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo veículo; & $p < 0,05$  quando comparado ao grupo NAC120 (Bonferroni teste post-hoc) ( $n = 7-10$  animais por grupo).

### 9.3. Experimento 3. Estudo dos efeitos do tratamento crônico de N-acetilcisteína sobre o barorreflexo e o balanço autônomo.

Este experimento foi feito para avaliarmos se após 24h da exposição crônica à NAC ocorria alteração na atividade barorreflexa e na atividade autônoma cardíaca. A análise estatística one-way ANOVA mostrou que não houve alteração nos parâmetros cardiovasculares basais, para: PAM ( $F_{2,20} = 0,891$ ;  $p = 0,426$ ), PAS ( $F_{2,20} = 1,216$ ;  $p = 0,317$ ), PAD ( $F_{2,20} = 0,919$ ;  $p = 0,415$ ) e FC ( $F_{2,20} = 0,346$ ;  $p = 0,712$ ).

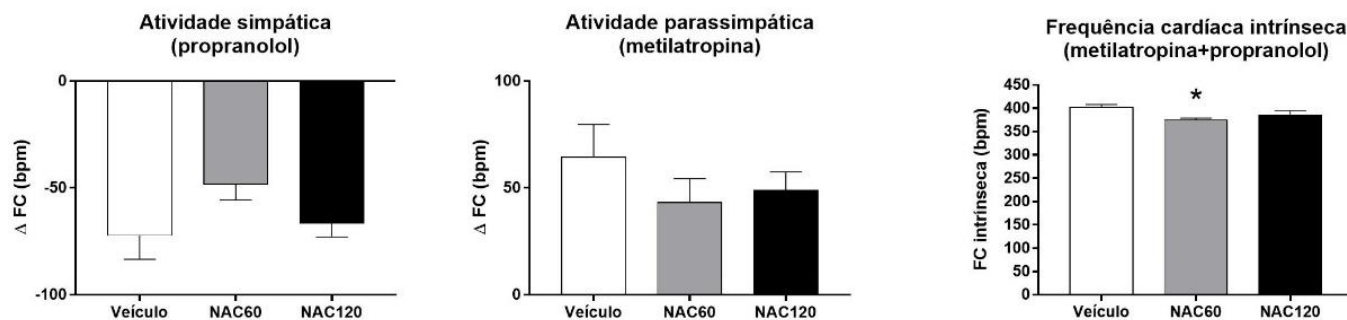
One-way ANOVA também não mostrou alterações nas respostas de FC à METIL ( $F_{2,17} = 0,822$ ;  $p = 0,456$ ) e PROP ( $F_{2,18} = 2,106$ ;  $p = 0,151$ ). No entanto, a análise indicou diferenças para a FCI ( $F_{2,19} = 3,892$ ;  $p = 0,038$ ) entre os grupos veículo e NAC 60 ( $p = 0,036$ , Bonferroni teste post-hoc).

One-way ANOVA demonstrou diferenças para o fator tratamento na regressão linear da resposta bradicárdica do barorreflexo ( $F_{2,20}=49$ ;  $p<0,001$ ). O pós-teste de Bonferroni revelou diferença entre os grupos: veículo e NAC 60 ( $p<0,001$ ), veículo e NAC 120 ( $p<0,001$ ) e grupos NAC 60 e NAC 120 ( $p<0,001$ ). No entanto, one-way ANOVA não demonstrou diferenças na regressão linear da resposta taquicárdica do barorreflexo ( $F_{2,20}=0,392$ ;  $p=0,681$ ).

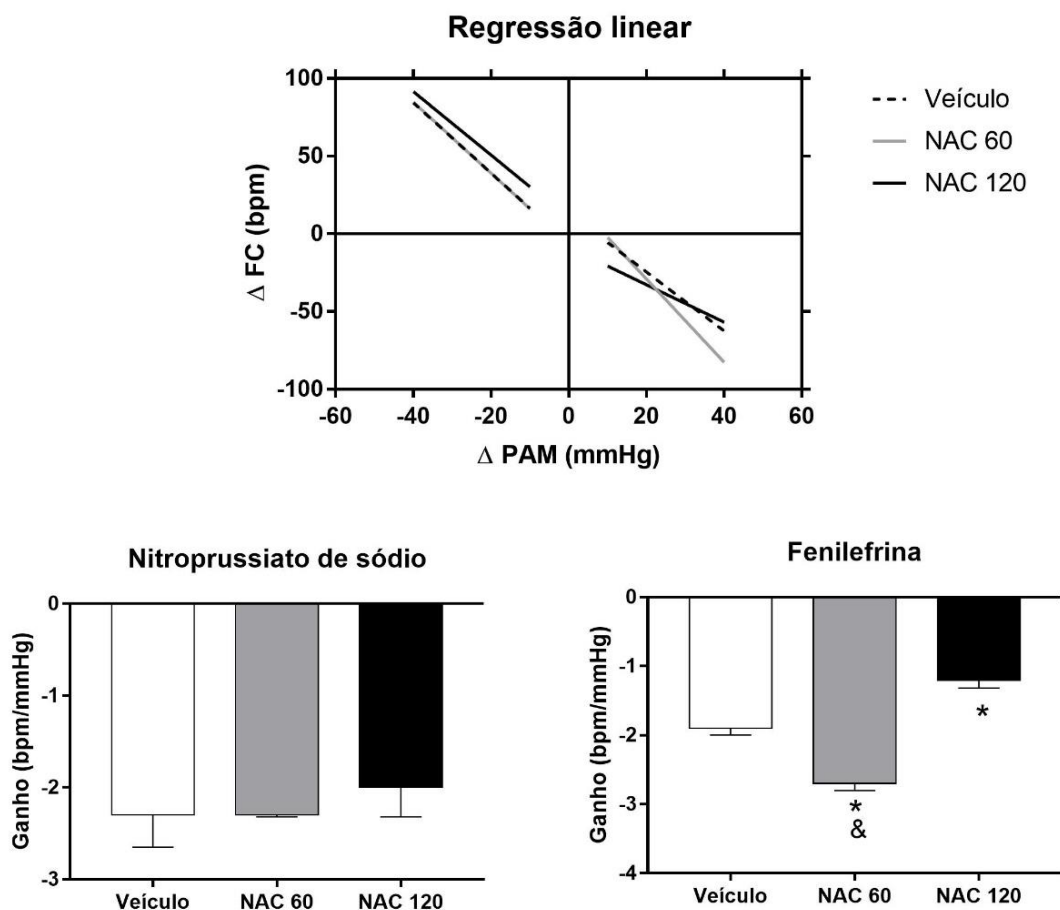


**Figura 18.** Parâmetros cardiovasculares basais dos animais dos animais que receberam o tratamento crônico de veículo, NAC 60 ou 120 mg/kg, i.p. por 10 dias. Pressão arterial média (PAM), pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD) e frequência cardíaca (FC). As barras apresentam os valores apresentados em média±EPM (n=7-8 animais por grupo).

## Balço autônomo



**Figura 19.** Balço autônomo dos animais dos animais que receberam o tratamento crônico de veículo, NAC 60 ou 120 mg/kg, i.p. por 10 dias. Os gráficos representam a variação da frequência cardíaca ( $\Delta FC$ ) induzida pela administração intravenosa de propranolol (antagonista de adrenoreceptores  $\beta$ ) ou metiltropina (antagonista de receptores colinérgicos muscarínicos) e frequência cardíaca intrínseca (FCI) observada após a administração combinada de metiltropina e propranolol. \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo veículo (Bonferroni post-hoc teste). As barras representam os valores apresentados em média  $\pm$  EPM ( $n = 7-8$  animais por grupo).



**Figura 20.** Regressão linear do barorreflexo e análise do ganho da regressão linear dos animais que receberam o tratamento crônico de veículo, NAC 60 ou 120 mg/kg, i.p. por 10 dias. O gráfico superior correlaciona à variação da pressão arterial média ( $\Delta$ PAM) com a resposta reflexa da variação da frequência cardíaca ( $\Delta$ FC). Análise do ganho da regressão linear frente ao desafio de nitroprussiato de sódio (NPS) e fenilefrina (FENIL). \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo veículo; & $p < 0,05$  quando comparado ao grupo NAC120 (Bonferroni post-hoc teste) ( $n = 7$ -8 animais por grupo).

9.4. *Experimento 4. Estudo dos efeitos do tratamento crônico de N-acetilcisteína sobre o barorreflexo e balanço autônomo desencadeadas por estresse de restrição repetido.*

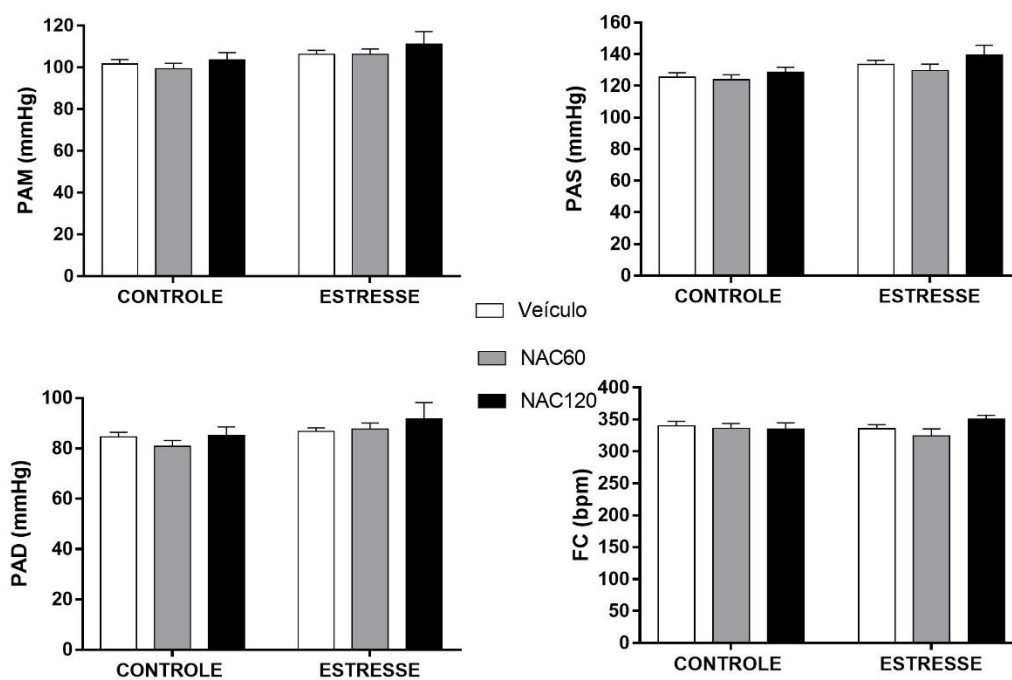
Este experimento foi feito para avaliarmos se a exposição crônica à NAC proporcionava proteção em relação às alterações na atividade barorreflexa e atividade autônoma cardíaca induzidas pela exposição ao estresse de restrição repetido. A análise estatística two-way ANOVA mostrou que não houve alteração nos parâmetros cardiovasculares basais para o fator tratamento, para: PAM ( $F_{2,50} = 1,084$ ;  $p = 0,346$ ), PAS ( $F_{2,50} = 1,940$ ;  $p = 0,154$ ), PAD ( $F_{2,50} = 0,896$ ;  $p = 0,415$ ) e FC ( $F_{2,50} = 0,891$ ;  $p = 0,417$ ). Two-Way ANOVA mostrou que houve alteração nos parâmetros cardiovasculares basais para o fator estresse para a PAM ( $F_{1,50} = 6,07$ ;  $p = 0,017$ ) e PAD ( $F_{1,50} = 4,26$ ;  $p = 0,044$ ), mas não alterou PAS

( $F_{1,50}=7,717$ ;  $p=0,008$ ) e FC basal ( $F_{1,50}=0,000$ ;  $p=0,985$ ). Para todos os parâmetros cardiovasculares basais avaliados não houve interação entre os fatores (todos  $F \leq 1,149$ ;  $p > 0,05$ ).

Two-way ANOVA também não mostrou efeito do fator tratamento nas respostas de FC à METIL ( $F_{2,49}=1,369$ ;  $p=0,264$ ) e PROP ( $F_{2,45}=2,190$ ;  $p=0,124$ ) e da FCI ( $F_{2,49}=2,194$ ;  $p=0,122$ ). Two-Way ANOVA mostrou efeito do fator estresse nas respostas de FC à METIL ( $F_{1,49}=7,208$ ;  $p=0,010$ ) e PROP ( $F_{1,45}=9,266$ ;  $p=0,004$ ). O pós-teste demonstrou diferença para o bloqueio de PROP entre os grupos veículo e estresse-NAC60 ( $p=0,039$ ). Além disso, ANOVA apresentou uma tendência para a FCI ( $F_{1,49}=3,719$ ;  $p=0,059$ ). O pós-teste de Bonferroni mostrou diferença entre os grupos controle-NAC60 e estresse-NAC60 ( $p=0,006$ ). Para todos os parâmetros cardiovasculares avaliados não houve interação entre os fatores (todos  $F \leq 5,259,149$ ;  $p > 0,05$ ).

Two-way ANOVA não demonstrou efeito do fator tratamento ( $F_{2,50}=0,443$ ;  $p=0,645$ ) e do fator estresse ( $F_{1,50}=0,295$ ;  $p=0,590$ ) na regressão linear da resposta bradicárdica do barorreflexo, mas demonstrou interação entre os fatores ( $F_{2,50}=20,760$ ;  $p < 0,01$ ). O pós-teste de Bonferroni demonstrou que o grupo Controle-NAC60 é diferente dos grupos: Estresse-NAC60 ( $p < 0,001$ ), Controle-NAC120 ( $p < 0,01$ ) e do Estresse-Veículo ( $p=0,013$ ). Além disso, o grupo Controle-NAC120 é diferente do grupo Estresse-NAC120 ( $p=0,001$ ) e o grupo Estresse-NAC60 é diferente do grupo Estresse-NAC120 ( $p=0,005$ ). Two-way ANOVA não demonstrou efeito do fator tratamento ( $F_{2,50}=0,052$ ;  $p=0,949$ ), fator estresse ( $F_{1,50}=0,345$ ;  $p=0,560$ ) e interação ( $F_{2,50}=0,755$ ;  $p=0,475$ ) na regressão linear da resposta taquicárdica ao barorreflexo.

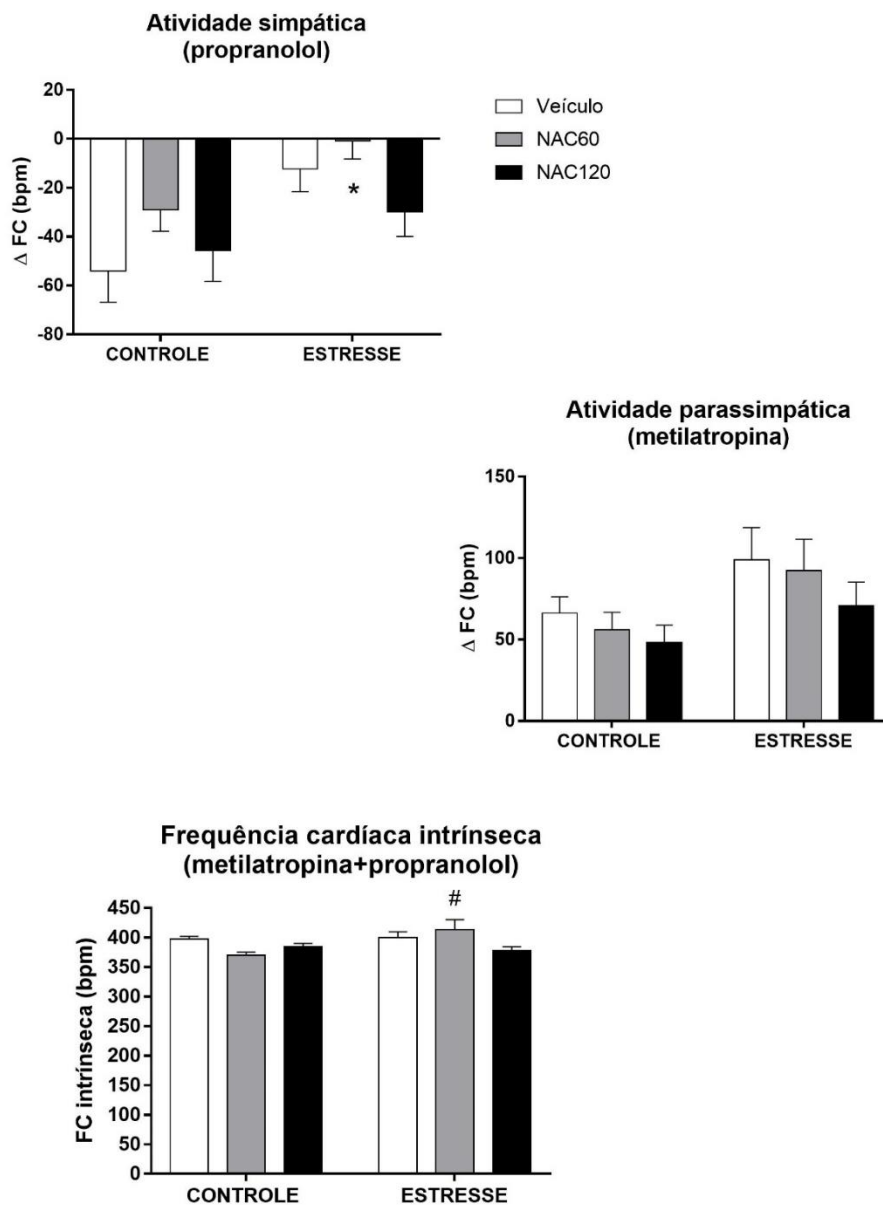
### Parâmetros cardiovasculares basais



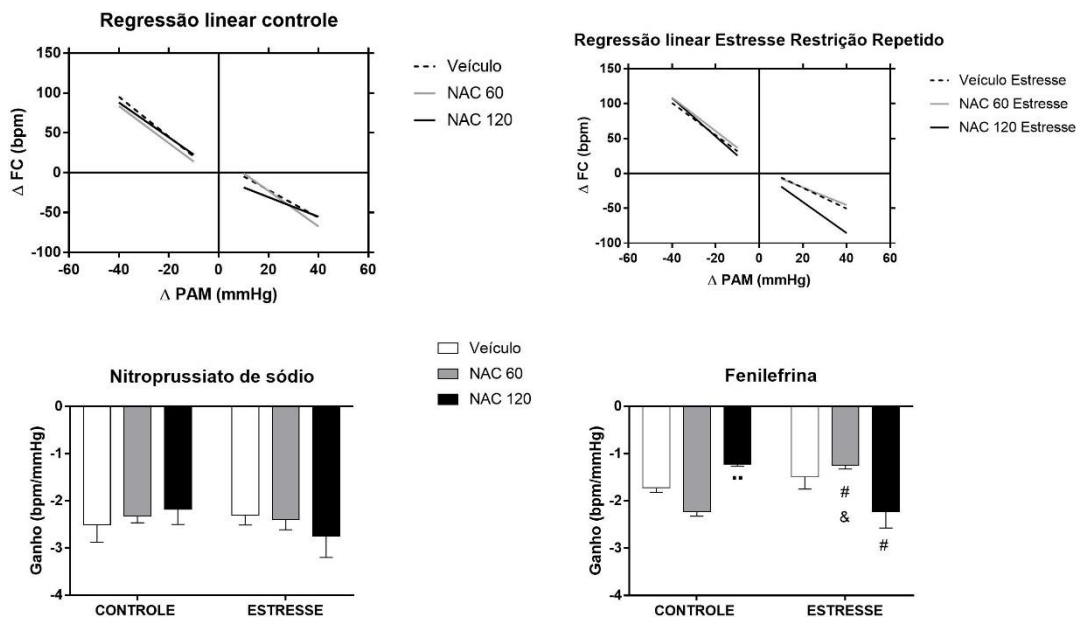
**Figura 21.** Parâmetros cardiovasculares basais dos animais que receberam o tratamento crônico de veículo, NAC 60 ou 120 mg/kg, i.p. 1h antes da exposição do estresse de restrição repetido com duração de 1h sendo 1 sessão por dia durante 10 dias. Pressão arterial média (PAM), pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD) e frequência cardíaca (FC). As barras representam os valores apresentados em média±EPM (n=6-12 animais por grupo).



## Balço autônomo



**Figura 22.** Balço autônomo dos animais que receberam injeção intraperitoneal por dia de veículo, NAC 60 ou 120 mg/kg 1h antes da exposição do estresse de restrição repetido com duração de 1h sendo 1 sessão por dia durante 10 dias. Os gráficos representam a variação da frequência cardíaca ( $\Delta FC$ ) induzida pela administração intravenosa de propranolol (antagonista de adrenoreceptores  $\beta$ ) ou metilatropina (antagonista de receptores colinérgicos muscarínicos) e frequência cardíaca intrínseca (FCI) observada após a administração combinada de metilatropina e propranolol. \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo veículo; # $p < 0,05$  quando comparado ao seu controle (Bonferroni post-hoc teste). As barras representam os valores apresentados em média  $\pm$  EPM ( $n = 6-12$  animais por grupo).



**Figura 23.** Regressão linear do barorreflexo e análise do ganho da regressão linear dos animais que receberam injeção intraperitoneal por dia de veículo, NAC 60 ou 120 mg/kg 1h antes da exposição do estresse de restrição repetido com duração de 1h sendo 1 sessão por dia durante 10 dias. Os gráficos superiores correlacionam a variação da pressão arterial média ( $\Delta$ PAM) com a resposta reflexa da variação da frequência cardíaca ( $\Delta$ FC) em regressão linear. Análise do ganho da regressão linear frente ao desafio de nitroprussiato de sódio (NPS) e fenilefrina (FENIL). # $p < 0,05$  quando comparado ao seu grupo controle; & $p < 0,05$  quando comparado ao grupo NAC120- estresse;  $\ddagger p < 0,05$  quando comparado ao grupo NAC60- controle (Bonferroni pos-hoc teste)( $n=6-12$  animais por grupo).

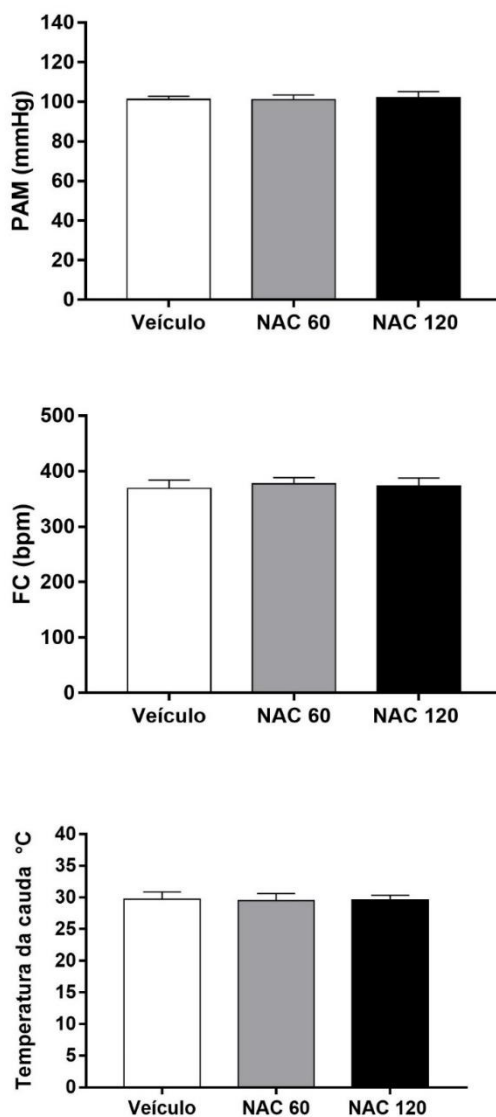
### 9.5. Experimento 5. Investigar os efeitos agudos de N-acetilcisteína sobre as alterações cardiovasculares desencadeadas por estresse agudo de restrição.

Este experimento foi feito para avaliarmos os efeitos agudos da NAC sobre alterações cardiovasculares desencadeadas no momento do desafio pelo estresse de restrição agudo. A análise estatística one-way ANOVA mostrou que não houve alteração nos parâmetros cardiovasculares basais, para: PA ( $F_{2,20}=0,046$ ;  $p=0,955$ ), FC ( $F_{2,20}=0,092$ ;  $p=0,913$ ), TEMP ( $F_{2,20}=0,016$ ;  $p=0,984$ ).

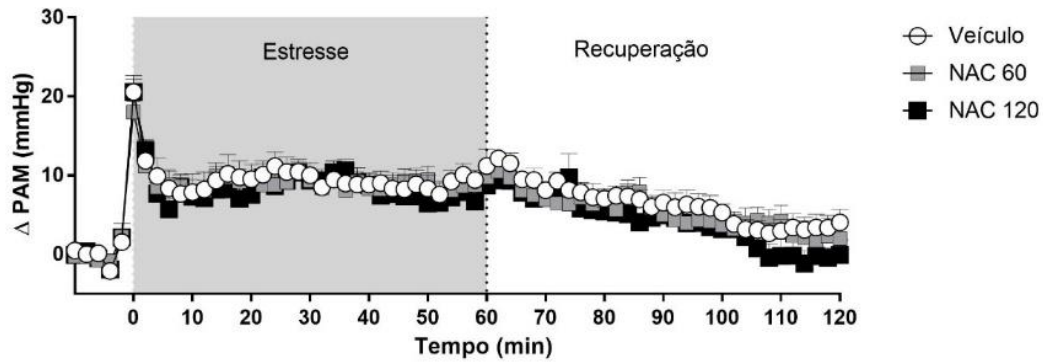
Two-way ANOVA também não mostrou alteração nos parâmetros cardiovasculares para o fator tratamento, para:  $\Delta$ PAM ( $F_{2,20}=0,600$ ;  $p=0,560$ ) e PAM ( $F_{2,20}=0,604$ ;  $p=0,556$ ),  $\Delta$ FC ( $F_{2,20}=0,415$ ;  $p=0,670$ ) e FC média ( $F_{2,20}=0,428$ ;  $p=0,660$ ),  $\Delta$ TEMP da cauda °C ( $F_{2,20}=0,015$ ;  $p=0,985$ ) e TEMP média da cauda °C ( $F_{2,20}=0,015$ ;  $p=0,985$ ). Two-way ANOVA mostrou alteração nos parâmetros cardiovasculares para o fator tempo, para:  $\Delta$ PAM ( $F_{65,1300}=24,25$ ;  $p < 0,001$ ) e PAM ( $F_{1,20}=23,080$ ;  $p < 0,001$ ),  $\Delta$ FC ( $F_{65,1300}=22,130$ ;

$p < 0,001$ ) e FC média ( $F_{1,20}=39,830$ ;  $p < 0,001$ ),  $\Delta$ TEMP da cauda  $^{\circ}\text{C}$  ( $F_{14,280}=9,315$ ;  $p < 0,001$ ), mas não apresentou para a TEMP média da cauda  $^{\circ}\text{C}$  ( $F_{1,20}=1,148$ ;  $p=0,297$ ). Nenhum dos parâmetros apresentou interação entre os fatores (todos  $F \leq 0,696$ ;  $p > 0,580$ ).

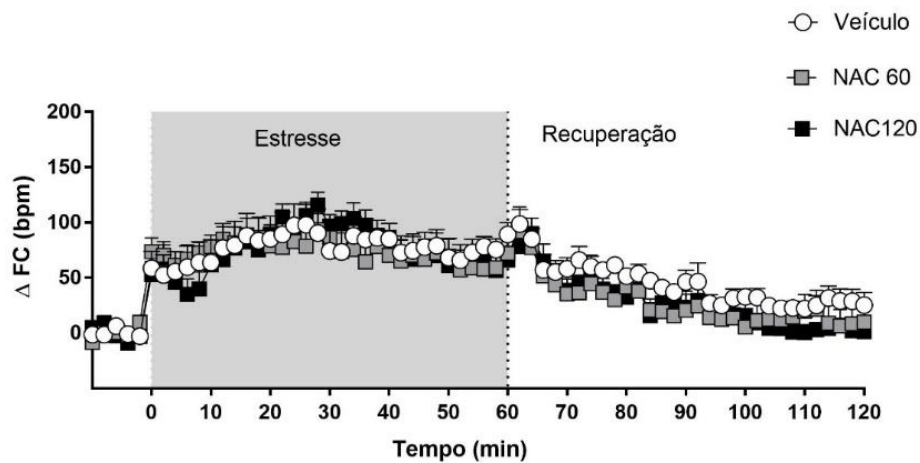
#### Parâmetros cardiovasculares basais



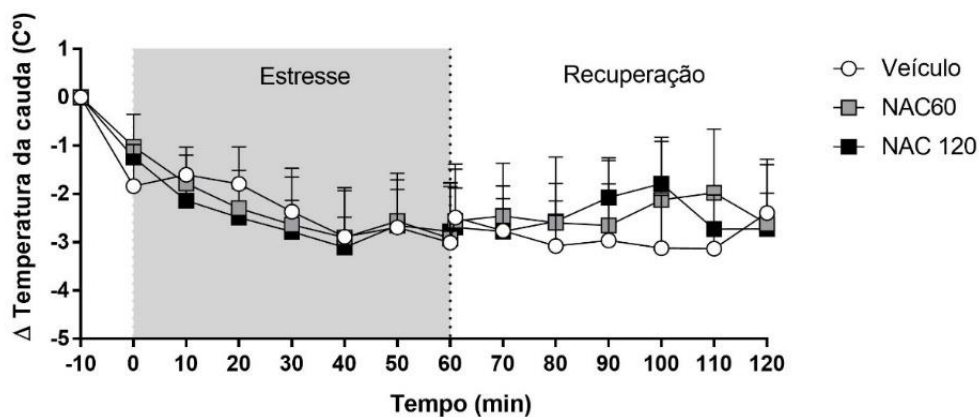
**Figura 24.** Parâmetros cardiovasculares basais dos animais expostos ao estresse de restrição agudo após 1 hora da injeção intraperitoneal de N-Acetilcisteína. Pressão arterial média (PAM), pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD) e frequência cardíaca (FC). ANOVA não demonstrou alterações. As barras apresentam os valores em média $\pm$ EPM (n=7-8 animais por grupo).



**Figura 25.** Variação da pressão arterial média ( $\Delta$ PAM) dos animais expostos ao estresse de restrição agudo após 1 hora da injeção intraperitoneal de N-Acetilcisteína. Os pontos e as barras apresentam os valores em média $\pm$ EPM (n=7-8 animais por grupo).



**Figura 26.** Variação da frequência cardíaca ( $\Delta$ FC) dos animais expostos ao estresse de restrição agudo após 1 hora da injeção intraperitoneal de N-Acetilcisteína. Os pontos e as barras apresentam os valores em média $\pm$ EPM (n=7-8 animais por grupo).



**Figura 27.** Variação da temperatura da cauda ( $\Delta$ TEMP) dos animais expostos ao estresse de restrição agudo após 1 hora da injeção intraperitoneal de N-Acetilcisteína. Os pontos e as barras apresentam os valores em média $\pm$ EPM (n=7-8 animais por grupo).

9.6. *Experimento 6. Estudo dos efeitos do tratamento crônico de N-acetilcisteína sobre as alterações cardiovasculares desencadeadas pela exposição a um protocolo por estresse de restrição repetido.*

Este experimento foi feito para avaliarmos os efeitos do tratamento crônico da NAC sobre alterações cardiovasculares desencadeadas pela exposição do estresse de restrição repetido. A análise estatística two-way ANOVA mostrou que não houve alteração nos parâmetros cardiovasculares basais para o fator tratamento, para: PA ( $F_{1,37}=0,428$ ;  $p=0,517$ ), FC ( $F_{1,37}=0,203$ ;  $p=0,655$ ), TEMP ( $F_{1,36}=0,202$ ;  $p=0,656$ ). Também não demonstrou para os parâmetros basais para o fator exposição: PA ( $F_{1,37}=0,766$ ;  $p=0,387$ ), FC ( $F_{1,37}=0,061$ ;  $p=0,806$ ), TEMP ( $F_{1,36}=0,039$ ;  $p=0,844$ ). Todos os parâmetros não apresentaram interação entre os fatores (todos  $F \leq 1,570$ ;  $p > 0,218$ ).

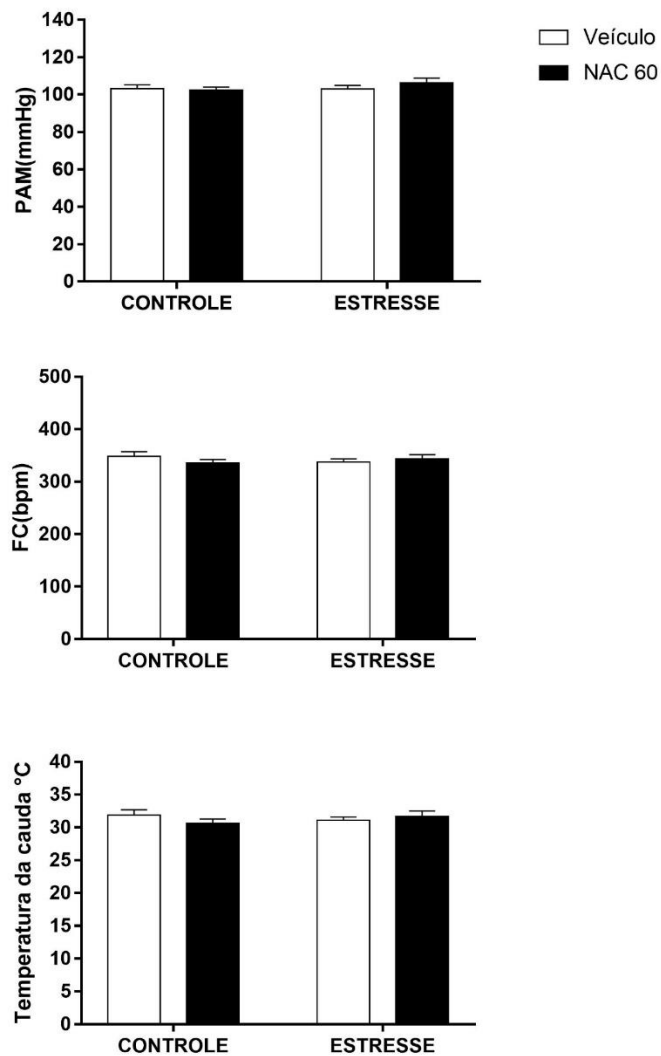
ANOVA de medidas repetidas não mostrou alteração nos parâmetros cardiovasculares para o fator tratamento da  $\Delta$ PAM ( $F_{1,37}=0,116$ ;  $p=0,740$ ) e PAM ( $F_{1,37}=0,116$ ;  $p=0,735$ ). Também não houve para o fator exposição da  $\Delta$ PAM ( $F_{1,37}=0,934$ ;  $p=0,340$ ) e PAM ( $F_{1,37}=0,955$ ;  $p=0,335$ ) e nenhuma interação entre estes fatores foi encontrada (todos  $F=0,001$ ;  $p=0,972$ ). Para o fator tempo houve diferença para o  $\Delta$ PAM ( $F_{65,2405}=32,399$ ;  $p < 0,01$ ) e PAM ( $F_{1,37}=24,024$ ;  $p < 0,001$ ) sem interação entre os fatores (tempo vs tratamento) (todos  $F \leq 0,622$ ;  $p > 0,906$ ). No entanto, houve interação entre os fatores (tempo vs exposição) para o  $\Delta$ PAM ( $F_{65,2405}=2,417$ ;  $p < 0,01$ ) e PAM ( $F_{1,37}=5,247$ ;  $p=0,028$ ). O pós-teste de Bonferroni mostrou que o grupo controle-veículo ( $p=0,022$ ) e o grupo controle-

NAC60 ( $p=0,004$ ) apresentaram diferenças quando comparados ao período de exposição (estresse ou recuperação).

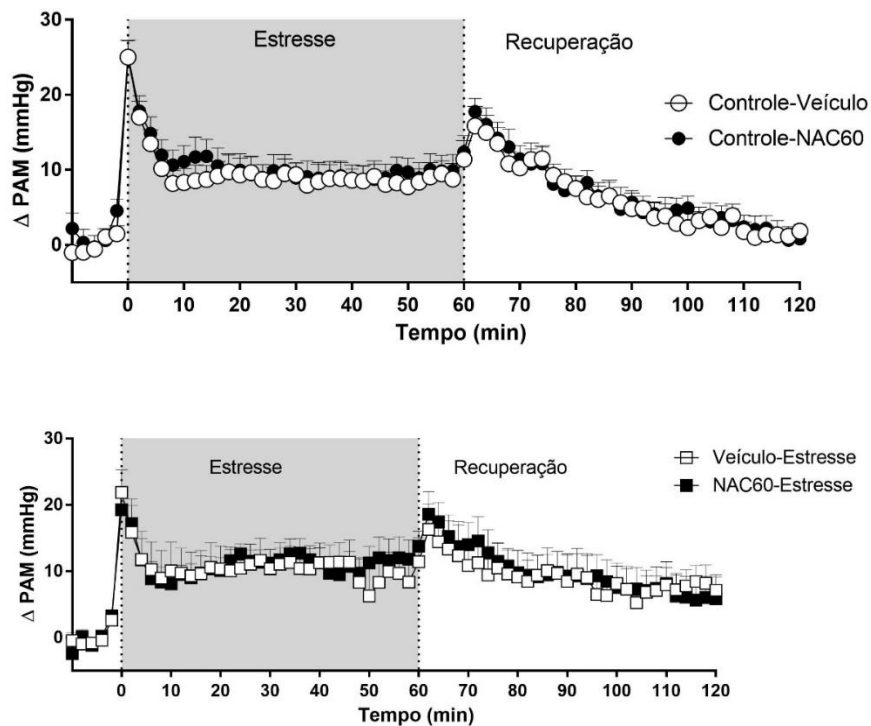
ANOVA de medidas repetidas não demonstrou diferença no fator tratamento para o  $\Delta FC$  ( $F_{1,37}=0,235$ ;  $p=0,631$ ) e FC média ( $F_{1,37}=0,227$ ;  $p=0,637$ ). Também não houve diferença para o fator exposição o  $\Delta FC$  ( $F_{1,37}=0,580$ ;  $p=0,451$ ) e FC média ( $F_{1,37}=0,607$ ;  $p=0,441$ ) e nenhuma interação entre estes fatores foi encontrada (todos  $F \leq 0,092$ ;  $p > 0,763$ ). Também não houve alteração para o fator tempo da FC média ( $F_{1,37}=3,286$ ;  $p=0,078$ ), mas apresentou para o  $\Delta FC$  ( $F_{65,2405}=20,702$ ;  $p < 0,01$ ) sem interação entre os fatores (tempo vs tratamento) (todos  $F \leq 0,523$ ;  $p > 0,846$ ) e com interação entre os fatores (tempo vs tratamento vs exposição) para o  $\Delta FC$  ( $F_{65,2405}=0,767$ ;  $p < 0,002$ ) e tendência para a FC média ( $F_{1,37}=3,970$ ;  $p=0,054$ ).

ANOVA de medidas repetidas não demonstrou alteração para o fator tratamento do  $\Delta TEMP$  da cauda °C ( $F_{1,35}=0,073$ ;  $p=0,788$ ) e TEMP média da cauda °C ( $F_{1,36}=0,066$ ;  $p=0,799$ ), e também não apresentou alterações para o fator exposição do  $\Delta TEMP$  da cauda °C ( $F_{1,35}=0,079$ ;  $p=0,780$ ) e TEMP média da cauda °C ( $F_{1,36}=0,072$ ;  $p=0,790$ ) e nenhuma interação entre estes fatores foi encontrada (todos  $F \leq 2,050$ ;  $p > 0,161$ ). Para o fator tempo ANOVA de medidas repetidas apresentou alteração para o  $\Delta TEMP$  da cauda °C ( $F_{13,455}=19,296$ ;  $p < 0,01$ ) e TEMP média da cauda °C ( $F_{1,36}=23,316$ ;  $p < 0,01$ ), mas não demonstrou interação entre os fatores (tempo vs tratamento) (todos  $F \leq 0,613$ ;  $p > 0,631$ ) e entre os fatores (tempo vs tratamento vs exposição) (todos  $F \leq 0,570$ ;  $p > 0,870$ ).

## Parâmetros cardiovasculares e temperatura basais

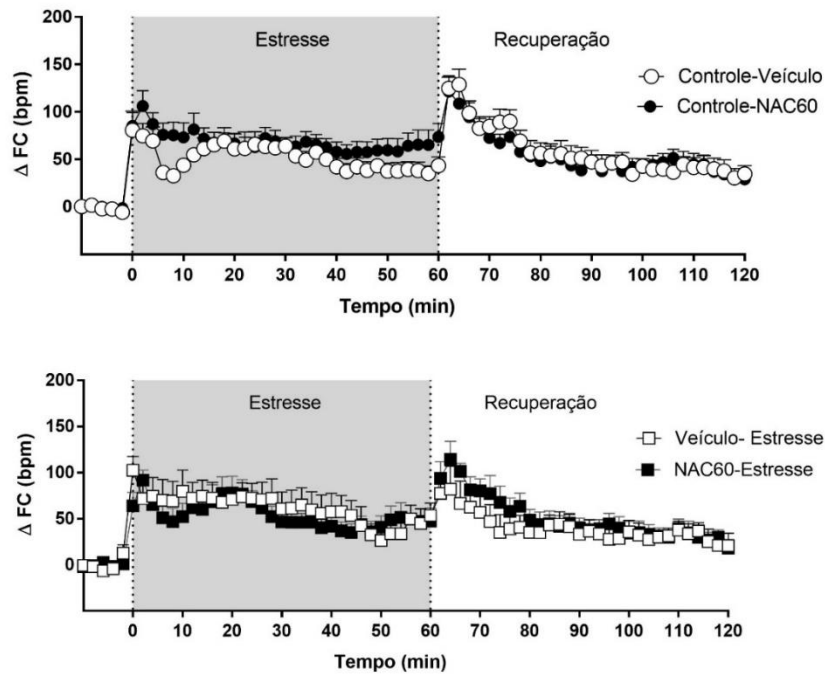


**Figura 28.** Parâmetros cardiovasculares basais dos animais expostos ao estresse de restrição repetido por 1h por dia após 1 hora da injeção intraperitoneal de veículo, NAC 60 ou 120 mg/kg por 10 dias. Pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e temperatura da Cauda °C. As barras apresentam os valores em média±EPM (n=8-13 animais por grupo).

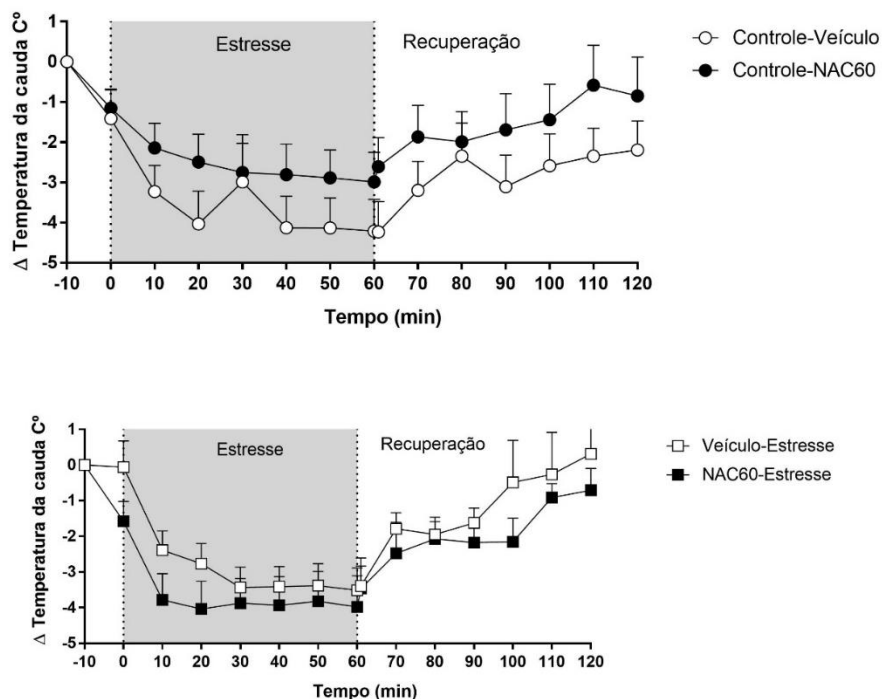


**Figura 29.** Variação da pressão arterial média ( $\Delta$ PAM) ao longo da exposição ao estresse de restrição agudo e durante a recuperação a este estímulo após a injeção intraperitoneal de N-acetilcisteína aguda. Os pontos e as barras apresentam os valores em média $\pm$ EPM (n=8-13 animais por grupo).





**Figura 30.** Variação da frequência cardíaca ( $\Delta FC$ ) ao longo da exposição ao estresse de restrição agudo e durante a recuperação a este estímulo após a injeção intraperitoneal de N-acetilcisteína aguda. Os pontos e as barras apresentam os valores em média $\pm$ EPM (n=8-13 animais por grupo).



**Figura 31.** Representação da variação da temperatura da cauda ( $\Delta TEMP$ ) (gráfico superior) e a média da variação da temperatura da cauda em  $^{\circ}C$  (gráfico inferior) ao longo da exposição ao estresse de restrição agudo e durante a recuperação a este estímulo após a injeção intraperitoneal de N-acetilcisteína aguda. Os pontos e as barras apresentam valores em média $\pm$ EPM (n=8-13 animais por grupo).

**Tabela 4.** Resumo dos resultados obtidos nos experimentos de barorreflexo

Parâmetros	NAC aguda		NAC aguda		NAC crônica		NAC crônica+Estresse Restrição Repetido			
	Efeito 2 horas após i.p		Efeito 24 horas após i.p		Efeito 28 horas após i.p		Efeito 28 horas após i.p			
	NAC60	NAC120	NAC60	NAC120	NAC60	NAC120	NAC60	NAC60+ERR	NAC120	NAC120+ERR
PAM basal	-	-	-	-	-	-	-	↑	-	↑
PAS basal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PAD basal	-	-	-	-	-	-	-	↑	-	↑
Tônus Simpático	-	-	-	-	-	-	-	↓	-	-
Tônus Parassimpático	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FCI	-	-	-	-	↓	-	-	↑	-	-
Baro bradicardia	-	-	↑	-	↑	↓	-	↓	-	↑
Baro taquicardia	↓	↓	-	-	-	-	-	-	-	-

Baro: Barorreflexa; FCI: Frequência cardíaca intrínseca; PAM: Pressão arterial média; PAS: Pressão arterial sistólica; PAD: Pressão arterial diastólica; NAC: N-acetilcisteína; 60: 60 mg/kg e 120: 120mg/kg; i.p.: injeção intraperitoneal.

## 10. Discussão

### 1º trabalho: NAC nos comportamentos relacionados com a ansiedade na retirada ao etanol

Até o momento, este foi o primeiro trabalho que investigou os efeitos da NAC no LCE em animais previamente expostos ao etanol e a superação da síndrome de abstinência, principalmente os estados emocionais negativos, como a ansiedade; é um passo importante na tentativa de impedir a recaída e o consumo de etanol (KOOB et al., 2009).

Primeiro, testamos se a retirada após o protocolo de exposição ao etanol era suficiente para os comportamentos relacionados com a ansiedade serem evidenciados no LCE. O tempo de exposição e a via de administração ao etanol foram baseados nos autores Kotlinska e Bochenski (2008). Em nosso laboratório foi realizada uma padronização (dados não mostrados) em relação à dose de etanol e tempo de tratamento para verificar se o período de abstinência proposto de 6 horas era o suficiente para induzir comportamentos relacionados com a ansiedade no LCE. A melhor dose diária que mostrou comportamentos relacionados com a síndrome de abstinência ao etanol em 6 horas no LCE foi de 2g/kg para um tratamento crônico de 11 dias, como mostrados nos resultados do experimento 1. Submetemos nossos resultados de comportamentos relacionados com a ansiedade no LCE ao teste de covariância com o número de entradas nos braços fechados. O efeito do etanol no tempo de entradas nos braços abertos foi estatisticamente significativa quando covariados com entradas nos braços fechados no primeiro e nos experimentos seguintes, portanto essas análises mostraram que a diminuição locomotora não interferiu nas medidas relacionadas com a ansiedade (tempo e frequência de entradas nos braços abertos do LCE). Os dados obtidos neste experimento estão de acordo com outros autores (KOTLINSKA; BOCHENSKI, 2008; SCHULTEIS; LIU, 2006) e com os autores Zhang et al. (2007) que observaram que a administração repetida de etanol na dose de 2g/kg por três dias, foi o suficiente para ratos Wistar apresentarem comportamentos relacionados com a ansiedade no LCE por um período de abstinência de 6 a 9 e 12 horas. Da mesma forma que nos nossos resultados, esses autores também evidenciaram hipoatividade locomotora como um comportamento observado no LCE, sendo relacionada com a exposição repetida ao etanol.

No experimento 2, o tratamento concomitante de NAC com etanol não preveniu os comportamentos relacionados com a ansiedade durante a síndrome de abstinência ao etanol após 28 horas da última exposição de NAC. No experimento 3, após o tratamento crônico com etanol, a administração aguda de NAC 2 horas antes da exposição dos animais ao teste do LCE durante o período de abstinência também não inibiu os comportamentos relacionados à retirada do etanol. As doses de NAC injetadas (30, 60 ou 120 mg / kg, i.p.) e período de tempo antes do desafio (2 horas) foram baseadas em estudos mostrando que a NAC reduzia a reinstalação de psicoestimulantes na auto-administração operante e alterações neural na neurotransmissão de glutamato (BAKER et al., 2003; KAU et al., 2008). Alguns autores revelaram que o tratamento repetido de NAC diminuiu as mudanças comportamentais relacionadas à busca de cocaína ou etanol na auto-administração operante para as doses 60 ou 100 mg/kg (REICHEL et al., 2011; JASTRZEBSKA et al., 2016; LEBOURGEOIS et al., 2017). Esses achados também sugerem que aNAC pode apresentar efeitos em alguns comportamentos induzidos por substâncias de uso abusivo, mas não em outros. Indo de acordo com os nossos resultados de que a NAC não foi efetiva em reverter os comportamentos relacionados com a ansiedade no LCE. Os autores Bowers et al., (2016) não observaram os efeitos do NAC nas alterações comportamentais semelhantes à ansiedade no LCE para a retirada da nicotina em camundongos endogâmicos ICR, apesar da NAC reduzir de maneira dose-dependente (5, 15, 30, 60 mg/kg) a preferência condicionada por lugar induzida pela nicotina. Recentemente os autores Santos et al. (2017) mostraram que a NAC nas doses de 60 e 150 mg/kg preveniu efeitos relacionados com a ansiedade, similares ao diazepam, em camundongos no campo aberto e caixa claro-escuro, mas não no teste do labirinto em T elevado. Talvez porque os estímulos proporcionados por estes aparatos sejam tão aversivos ou que ativem outras regiões encefálicas que possam sobrepor-se a qualquer efeito benéfico deste pró-fármaco durante a síndrome de abstinência.

Encontramos apenas um estudo que investigou os efeitos do NAC na retirada do etanol (SCHNEIDER Jr et al., 2015). Esses autores observaram em ratos Wistar que a NAC reverteu a diminuição locomotora causada pela retirada do etanol no campo aberto. Isso é interessante, mas a diminuição locomotora possui outras vias neurais de ativação que são diferentes das que estão

relacionadas com os comportamentos que caracterizam a ansiedade no LCE (FILE, 1994; KLITHERMES, 2005; ZHANG et al., 2007; KOTLINSKA; BOCHENSKI, 2008); portanto, não é um comportamento essencialmente relacionada com a ansiedade, que é um sintoma comportamental muito significativo da abstinência de etanol em humanos. Além disso, Schneider Jr e colaboradores investigaram a abstinência a longo prazo (5 dias de suspensão do tratamento com etanol) e descobriram que 4 dias de administração de NAC (60 ou 90 mg / kg, ip) após o término das administrações de etanol impediram a redução induzida pelo etanol na atividade exploratória durante o teste de campo aberto (SCHNEIDER Jr et al., 2015). Comparando com os nossos, uma diferença importante é que eles administraram NAC apenas durante a abstinência de etanol (sem etanol no sangue) e nós demos NAC na presença de etanol. Essas diferenças procedimentais podem induzir interações inesperadas entre os estímulos etanol e NAC no corpo.

Um possível local de interação entre etanol e NAC é o eixo HPA. A administração aguda ou crônica do etanol ativa o eixo HPA em humanos e ratos (CLARKE et al., 2007). A NAC e alguns outros antioxidantes também alteram o eixo HPA. Prevatto e colaboradores (2017) mostraram que a NAC (150 mg / kg) administrada por gavagem durante 18 dias causou hipertrofia adrenal, aumentou os níveis plasmáticos de corticosterona e reduziu o feedback negativo do eixo HPA em ratos Wistar. Estes efeitos da NAC, e também de outros antioxidantes, deixam o eixo HPA hiperativo a possíveis situações de estresse fornecendo eficiência em manter o equilíbrio do organismo frente a um estímulo aversivo, porém estes autores não consideraram esta ativação do eixo HPA benéfica a longo prazo. Além disso, Schneider Jr e colaboradores (2015) observaram que a NAC por si só aumentou os níveis de corticosterona em ratos normais e reduziu os níveis alterados deste hormônio em ratos que receberam etanol e que estavam com estes níveis elevados no sangue durante a síndrome de abstinência ao etanol. Estes resultados sugerem que a NAC neutraliza os efeitos do etanol sobre os níveis plasmáticos de corticosteroides (em ratos) após a retirada, mas não durante as administrações de etanol.

O experimento 4 foi realizado para verificar se 6 horas de retirada de etanol eram suficientes para a metabolização desta substância no sangue e possíveis efeitos da NAC nos níveis plasmáticos de etanol, pois as

concentrações de etanol no sangue são determinadas pela quantidade de consumo de etanol e variáveis genéticas, fisiológicas e ciclo circadiano devido a temperatura corporal (CEDERBAUM, 2013) que oscila de acordo com o período do dia e a taxa máxima de eliminação do etanol do sangue ocorre quando a temperatura corporal máxima é atingida (CEDERBAUM, 2013) sendo em roedores no final do período escuro e em humanos no final do período claro (CAMBRAS et al., 2006). Com este experimento, nós verificamos que os animais chegaram a uma taxa máxima de 378,8 mg de etanol/dL de plasma em 30 minutos e em 4 horas os níveis de etanol encontrados já eram inferiores a 100mg/dL, sendo que 6 horas foi o suficiente para total eliminação do etanol do sangue. Portanto, os dados obtidos mostraram que, independentemente do tipo de exposição (aguda vs crônica) ou tratamento (Etanol com NAC vs Etanol sem NAC), todos apresentaram um padrão similar de metabolização de etanol. Então, nenhuma interferência dos níveis plasmáticos de etanol está relacionada aos resultados comportamentais. O mesmo foi observado por outros autores como Schulteis e Liu, (2006), que após 6 horas do tratamento por i.p. de etanol na dose 2g/kg em ratos Wistar não detectaram mais etanol no sangue dos animais e pelos autores Morse et al., (2000) que consideraram a velocidade de metabolização aproximada de 45 mg/dl/h dose de etanol de 2g/kg, injeção intraperitoneal (i.p.), com completa metabolização em 6 horas de retirada da exposição ao etanol. Portanto, nossos dados de etanol no sangue estão compatíveis com a literatura para tempo de metabolização e alterações comportamentos em relação a retirada desta substância, sendo que a partir de  $80 \pm 14$  mg % de etanolemia várias regiões encefálicas já ficam ativadas e é o suficiente para os animais apresentarem alterações comportamentais (PASCUAL et al., 2009; BONASSOLI et al., 2011).

A maioria dos estudos não se concentra na síndrome de abstinência, mas na busca e consumo de substâncias de uso abusivo. Resultados de Baker et al. (2003) mostraram que a NAC teve um efeito neural protetor dose-dependente e isso influenciou os comportamentos relacionados à reinstalação da auto-administração de cocaína. Schmaal et al. (2011) observaram que a NAC reduziu os efeitos recompensadores do primeiro cigarro após o período de abstinência em humanos. Apesar dos achados na literatura para os resultados neurobiológicos (DUCRET et al., 2015) e melhora na neurotransmissão

glutamatergica (BAKER et al., 2003; MURRAY et al., 2011) pelo pró-fármaco NAC, seu mecanismo de ação ainda não é totalmente compreendido. Sabe-se que a NAC previne as alterações bioquímicas causadas pelo etanol e produz melhor eficácia na redução dos processos fisiopatológicos associados à administração repetida de fármacos (OZARAS et al., 2003; CARO et al., 2014; SHAHRIPOUR et al., 2014; HURLEY et al., 2016; SANTOS et al., 2017). Portanto, a NAC mostrou-se eficaz para evitar a reinstalação e que a proteção da NAC para a reinstalação para a cocaína parece persistir por 2 semanas após o tratamento ter sido descontinuado, mesmo com estímulos associativos por dicas ambientais com o local em que o animal recebia o tratamento (REICHEL et al., 2011). Além disto, alguns autores mostraram que este pró-fármaco também é eficaz na redução de comportamentos semelhantes à sensibilização para outras substâncias de uso abusivo, como também para o etanol (KALIVAS, 2009; MORAIS-SILVA et al., 2016; MURRAY et al., 2011). Observado recentemente em nosso laboratório pelos autores Morais-Silva et al. (2016) que a NAC na dose 120 mg/kg em camundongos, reduziu a sensibilização comportamental induzida pelo etanol. Estes autores não encontraram alterações no tratamento com exposição curta ao etanol no trocador cistina/glutamato xCT no córtex pré-frontal. Sugerindo que este pró-fármaco pode ter efeitos em outras regiões encefálicas que previnem estes comportamentos. Portanto, os efeitos protetores da NAC para este tipo de comportamentos incluem regiões neurais dependentes da ativação de mGLU (CHEN et al., 2014) e relacionadas com aspectos de aprendizagem envolvendo modulações dos receptores mGluR5 (LEBOURGEOUS et al., 2017). Os receptores mGluR5 estão relacionados com a modulação excitatória do neurônio pós-sináptico e plasticidade de longo termo no Ac (COZZOLI et al., 2015) podendo ter uma ação diferente das regiões e modulações envolvidas nos comportamentos relacionados com a ansiedade avaliados no LCE (KNACKSTEDT et al., 2009).

*Em relação ao 2º trabalho: NAC e alterações cardiovasculares induzidas por estresse*

Até o momento, este foi o primeiro trabalho que investigou os efeitos da NAC nas alterações cardiovasculares induzidas por estresse.

Nos nossos experimentos envolvendo os efeitos da NAC no teste farmacológico dos barorreflexos pudemos observar no experimento 1 que após

2 horas da administração intraperitoneal aguda de NAC nas doses 60 e 120 mg/kg nenhum outro parâmetro foi alterado a não ser a redução do ganho para a resposta taquicárdica que sugere redução da sensibilidade do barorreflexo, sendo prejudicial no funcionamento do sistema barorreflexo. No entanto, no experimento 2, quando testamos os efeitos da NAC aguda 24 horas após as doses de 60 e 120 mg/kg, observamos aumento no ganho para a resposta bradicárdica para a dose de 60 mg/kg, que sugere melhora na sensibilidade do barorreflexo de maneira tardia, sendo um efeito benéfico. O barorreflexo é o principal mecanismo de controle efetivo da PA (CAMPAGNOLE-SANTOS; HAIBARA, 2001). Este sistema inclui mecanorreceptores localizados no seio da artéria carótida e aorta que são ativados quando ocorre estiramento das paredes da artéria e os reflexos originados pela deformação destes mecanorreceptores enviam sinais pelo nervo aferente até o SNC para o NTS localizado na região do tronco encefálico que processa o sinal e promove uma resposta no sistema periférico através do nervo eferente (CAMPAGNOLE-SANTOS; HAIBARA, 2001; KOUGIAS et al., 2010). Portanto, o aumento da PA promove inibição do sistema simpático e aumento da resposta vagal e redução da PA promove aumento da resposta simpática e redução do sistema vagal, a eficiência nestes sistemas é obtida através do sistema de retro-alimentação pelo sistema autônomo (IRIGOYEN; KRIEGER, 1998; SCHEFFERS et al., 2010; KOUGIAS et al., 2010). Quando ocorre redução da sensibilidade do barorreflexo, o sistema de retro-alimentação negativa para a resposta simpática não funciona adequadamente e a PA; FC e força de contração permanecem acima dos limites normais causando prejuízos para o sistema cardiovascular (SÁNTHA et al., 2016) como hipertensão, lesão nas paredes dos vasos, derrame e morte súbita que se segue ao infarto agudo do miocárdio (CASADEI; PATERSON, 1969; KOUGIAS et al., 2010). No mesmo sentido, quando o sistema de retro-alimentação negativa para a resposta parassimpática não funciona adequadamente e a PA; FC e força de contração permanecem abaixo dos limites normais, também ocorre prejuízos para o sistema cardiovascular, como redução da irrigação coronária e morte súbita (LIU et al., 2012). Por outro lado, o aumento da sensibilidade do barorreflexo é considerado de alto ganho para o organismo, pois aumenta a sensibilidade dos barorreceptores a manter a PA dentro de limites normais em



períodos de segundos (IRIGOYEN; KRIEGER, 1998; KOUGIAS et al., 2010; MARTELLI, 2013), sendo muito benéfico para o organismo.

Nos experimentos envolvendo os efeitos do tratamento da NAC crônica no teste farmacológico aos barorreflexos pudemos observar no experimento 3, que após 28 horas da administração intraperitoneal de NAC nas doses 60 e 120 mg/kg, houve redução da FC intrínseca e aumento do ganho para a resposta bradicárdica (aumentando a sensibilidade do barorreflexo) dos animais tratados com NAC na dose de 60 mg/kg, sendo um efeito benéfico. Porém na dose de 120 mg/kg de NAC houve redução no ganho para a resposta bradicárdica sem alterar nenhum outro parâmetro. Em relação ao experimento 4 envolvendo os efeitos do tratamento da NAC crônica com exposição ao estresse de restrição repetido pelo mesmo período de exposição com NAC no teste farmacológico aos barorreflexos no experimento 4, houve efeito diferente do que esperávamos e da maioria dos dados observados na literatura em que a NAC melhora situações aversivas (CHAKRABORTI et al., 2007;2008; MOCELIN et al., 2015; CHEN et al., 2014; SANTOS et al., 2017), pois a NAC administrada junto com a exposição ao estresse de restrição repetido causou alterações nos parâmetros basais da PA média e aumento da PA diastólica, aumentou a FC intrínseca e reduziu o tônus simpático e a bradicardia observada com o desafio por FENIL para a dose 60mg/kg em associação ao estresse. Para a NAC na dose 120 mg/kg em associação com o estresse de restrição repetido, houve aumento das pressões arteriais média e diastólica com aumento da bradicardia, sem alterar os outros parâmetros. Portanto, esta variabilidade da FC ocasionada pela NAC requer cuidado em relação ao seu uso.

Está bem relatado na literatura que o aumento da FC aumenta o consumo de oxigênio e redução da suplementação de oxigênio no miocárdio, aumentando a rigidez da aorta e desgaste dos vasos, reduzindo assim a expectativa de vida (BOUDOULAS et al., 2015) e entre os mamíferos, há um inverso da relação entre FC e expectativa de vida (LIU et al., 2012; BOUDOULAS et al., 2015). Portanto, quanto maior a FC de um indivíduo, menor é a sua expectativa de vida (BOUDOULAS et al., 2015) devido ao aumento do risco para doenças cardiovasculares como: doenças coronárias, fibrilação atrial, infarto e morte súbita (AUNE et al., 2017) e a variabilidade da FC está relacionada com a atividade parassimpática (SAKAMOTO et al., 2017), porém em nossos testes

não observamos alterações na atividade parassimpática. A FCI sinusal (sem qualquer entrada autonômica) sendo limitado pelo tônus vagal extrínseco que aumenta a atividade reflexa vagal, também podem contribuir para a bradicardia sinusal (LIU et al., 2012) e esta variabilidade na FC desencadeada pelo pró-fármaco NAC requer atenção e pode ser um alerta em indivíduos com problemas cardiovasculares, pois em indivíduos jovens e saudáveis, ocorre naturalmente uma leve bradicardia associada à melhoria da saúde e aumento da expectativa de vida. No entanto quando acentuada, ocorre risco de morte por reduzir a pressão de perfusão coronária principalmente em indivíduos com problemas cardiovasculares (LIU et al., 2012). Além disso, a bradicardia acompanha sintomas como síncope, fadiga, tontura ou dispneia (LIU et al., 2012).

Está bem relatado na literatura que o estresse de restrição promove alterações no eixo HPA (SÁNTHA et al., 2016) e também afeta os barorreflexos facilitando a resposta taquicárdica e reduzindo a resposta bradicárdica, sendo que os efeitos taquicárdicos deste tipo de estresse dependente da atividade simpática cardíaca (CRESTANI et al., 2010). Além da resposta evocada pelo estresse de restrição ser mediada pelo sistema nervoso autônomo sem o envolvimento de fatores humorais (REIS et al., 2011) e a NAC de alguma maneira interferiu nisto.

Os poucos trabalhos encontrados na literatura que relacionam a NAC com os barorreflexos, demonstram que a NAC possui um efeito relativo dependendo do indivíduo exposto e a condição em que ele se encontra. Valenti et al., (2011) avaliaram as funções barorreflexas em ratos WKY e SHR nos tempos de 5, 15, 30 e 60 minutos após a injeção de NAC no 4º ventrículo. A NAC central apresentou elevação discreta, porém significativa da FC basal aos 15 minutos e reduziu significativamente o aumento de PAM nos tempos de 30 e 60 minutos em ratos WKY. Em relação aos ratos SHR, a NAC diminuiu a FC nos tempos de 15 e 30. Além disto, o tratamento crônico com a NAC é demonstrado como um efetivo redutor do estresse oxidativo no SNC e periférico apresentando efeito benéfico dependendo da intensidade da patologia. Por outro lado, os autores Girouard et al., (2004) observaram que a NAC reduziu significativamente a PAM e FC em ratos SHR e melhorou as respostas reflexas bradicárdicas e taquicárdicas, apresentando melhora na enzima GSH-peroxidase. Entretanto, as

alterações secundárias (como remodelação estrutural pronunciada na resistência dos vasos) podem reduzir o efeito terapêutico da NAC.

Além disto, o tratamento crônico com a NAC é demonstrado como efetivo redutor do estresse oxidativo no sistema central e periférico (HARRISON et al, 1991) por produção da GSH (CAO et al., 2012; JOHNSON et al., 2012; RUSHWHORTH; MEGSON; 2014) e da enzima GSH-peroxidase (GIROUARD et al, 2004), apresentando efeito benéfico dependendo da intensidade da patologia (PECHÁNÓVÁ et al., 2007). Portanto, a relação da NAC e sistema cardiovascular é bem complexa e requer mais estudos, pois recentemente foi demonstrado pelos autores Schneider Jr et al., (2015) que a NAC na dose de 60 mg/kg aumentou os níveis de corticosterona no sangue de roedores, e no mesmo sentido, os autores Prevatto et al., (2017) demonstraram que a NAC na dose 150 mg/kg também aumentou os níveis de corticosterona em roedores, apresentando efeito significativo no eixo HPA, apesar deste mecanismo ainda não ser conhecido. Portanto, em indivíduos com problemas cardiovasculares, o efeito observado da NAC na FC requer cuidado.

Nos experimentos 5 e 6 envolvendo a NAC nos quais foram avaliados os efeitos agudos e crônicos no momento do estresse, ela não apresentou efeito de proteger e nem de acelerar a recuperação nos parâmetros cardiovasculares observados como: as alterações na PA, FC e temperatura da cauda. Portanto, neste estudo não observamos efeitos protetores cardiovasculares da NAC frente ao estresse, sendo ao contrário do que esperávamos devido às propriedades benéficas deste pró-fármaco em reduzir os efeitos do estresse (MULLER et al., 2002).

A nossa hipótese, é que o ER pode ter sido intenso ao ponto da NAC não possuir propriedades suficientes para reverter o ER. Além disto, acreditamos que somente a NAC por si só não é o suficiente para alterar respostas em relação ao ER nos parâmetros cardiovasculares (PA; FC, Temperatura da cauda). Portanto, neste estudo não observamos efeitos protetores cardiovasculares da NAC em relação à exposição ao estresse.

Alguns estudos têm demonstrado que a NAC possui efeitos periféricos antioxidantes e na expressão do NO, apresentando efeito no endotélio dos vasos (HOROWITZ, 1991; SOCHMAN, 1990). A NAC também tem sido relacionada com efeito de melhorar a vasodilatação dependente do endotélio tanto nas

artérias periféricas quanto nas artérias coronárias (ANDREWS, 2001), devido a sua propriedade em eliminar os radicais hidroxila e aumentar o fluxo coronariano dependente do sistema nítrico-oxidase. Através da sua ação nas moléculas de adesão vascular-1 e na ação da adesividade mediada pelo endotélio via fator nuclear – Kappa B, a NAC pode reduzir o impacto de estresse oxidativo (SOCHMAN, 1990) e o aumento dos efeitos de NO pelos tiols, refletem a importância do estado redox no controle das funções vasculares e pode ser um terapêutico benéfico para outras patologias do Sistema cardiovascular, como a aterosclerose (ANDREWS, 2001) e redução de infarto (HOROWITZ, 1991). Portanto, segundo os achados na literatura, a NAC possui efeitos benéficos, favorecendo algumas funções em determinadas situações. No entanto, a regulação cardiovascular possui muitos mecanismos envolvidos, sendo necessários mais estudos para avaliar o efeito da NAC neste sistema.

O sistema glutamatérgico está sendo apresentado com uma importante função para o equilíbrio e funcionamento cardiovascular (SANTINI et al., 2013; MORAES – NETO et al., 2014; FABRI et al., 2014; GORKA et al., 2015; FERREIRA-JUNIOR et al., 2018), estando relacionado com muitas regiões encefálicas, entre elas o NTS (DIAS et al., 2005) e outras regiões (SANTINI et al., 2013; ADAMI et al., 2017) que compõem o tronco encefálico (PUNG et al., 2006) e promovem respostas cardiovasculares quando o sistema de neurotransmissão glutamatérgico está ativado (DIAS et al., 2005; CAMARGO et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2018). Apesar de existirem muitas evidências na literatura que relacionam o desequilíbrio na atividade deste sistema em respostas mal-adaptadas no sistema cardiovascular em relação ao estresse, (MARTISOVA et al., 2012; HOUTEPEN et al., 2017) nós não testamos farmacologicamente o sistema glutamatérgico para analisar o envolvimento dele nos efeitos da NAC em relação ao funcionamento dos barorreflexos e nem em relação aos parâmetros cardiovasculares como PA, FC e temperatura da cauda. Com base em nossos achados dos testes do barorreflexo, nós acreditamos que a NAC pode ter efeitos no SNC ou no nervo aferente que liga os barorreceptores ao SNC, porém são necessários outros estudos para testarmos esta nossa hipótese.

## **11.CONCLUSÃO FINAL**

Pela primeira vez a NAC foi testada em estados emocionais negativos durante a síndrome de abstinência ao etanol de ratos expostos ao LCE para avaliar os comportamentos relacionados com a ansiedade e nos barorreflexos e modulações cardiovasculares induzidos ao estresse de restrição. No entanto, apesar de nossa hipótese dos efeitos protetores da NAC com base neste estudo, demonstramos que o tratamento com a NAC não preveniu comportamentos relacionados com a ansiedade no LCE durante a síndrome de abstinência ao etanol. Além disso, a NAC não foi eficiente em reverter a resposta ao estresse de restrição nos parâmetros cardiovasculares e autônomos e o seu uso requer cautela devido a alteração na FC por possíveis alterações na sensibilidade do barorreflexo.

## 12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AUNE, D. et al. Resting heart rate and the risk of cardiovascular disease, total cancer, and all-cause mortality – A systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases**. v. 27, p. 504-517, 2017.

ABULSEOU, O.A. et al. Attenuation of ethanol withdrawal by ceftriaxone-induced upregulation of glutamate transporter EAAT2. **Neuropsychopharmacology**. v.39, p. 1674-1684, 2014.

ACEVEDO, M.B. et al. Relationship between ethanol-induced activity and anxiolysis in the open field, elevated plus maze, light-dark box, and ethanol intake in adolescent rats. **Behavioural Brain Research**. v.265, p. 203-215, 2014.

ADAMI, M. B. et al. Both N-methyl-D-aspartate and non-N-methylD-aspartate glutamate receptors in the bed nucleus of the stria terminalis modulate the cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. **J. Psychopharmacol**. V.31, n. 6, p.674-681, 2017.

ADAMY, C. et al. Neutral sphingomyelinase inhibition participates to the benefits of N-acetylcysteine treatment in post-myocardial infarction failing heart rats. **J Molecular and Cellular Cardiology**. v.43, p. 344-353, 2007.

ALSHEHRI, F.S.; ATHOBAITI, Y.S.; SARI, Y. Effects of administered ethanol and methamphetamine on glial glutamate transporters in rat striatum and hippocampus. **J Molecular Neuroscience**. v. 61, n. 3, p. 343-350, 2017.

ANDREWS, N.P.; PRASAD, A.; QUYYUMI, A.A. N-acetylcysteine improves coronary and peripheral vascular function. **J American College Cardiology**. v. 37, n.1, p. 117-23, 2001.

AROUMA, O. I et al. The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. **Free Radical Biology Med**. V.6, p. 593-597, 1989.

ARENT, S. M.; LANDERS, D. M. Arousal, anxiety, and performance: A reexamination of the inverted – U hypothesis. **Research Quarterly for exercise and sport**. V.74, n.4, p.436-444, 2013.

ATKURI, K.R. et al. N-acetylcysteine-a safe antidote for cysteineglutathione deficiency. **Current Opinion Pharmacology**. v. 7, p. 355-359, 2007.

AUGIER, E. et al. A molecular mechanism for choosing alcohol over an alternative reward. **Science**. v.360, p. 1321-1326, 2018.

AUGUSTÍ, A.G. et al. Effects of N-acetylcysteine on tissue oxygenation in patients with multiple organ failure and evidence of tissue hypoxia. **Europe Respiratory J**. v.10, n.9, p.1962-6, 1997.

ANVISA (1999). Acetilcisteína. Lei nº9787, medicamento genérico. Disponível em:<[http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila\\_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=13241972016&pIdAnexo=3141329](http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=13241972016&pIdAnexo=3141329)>.

BAKER, D. et al. Neuroadaptation in cysteine-glutamate exchange underlie cocaine relapse. **Nature Neuroscisce**. v.6, n.7, p.743-749, 2003.

BAKI, S.G.A. et al. Minocycline Synergizes with N-Acetylcysteine and Improves Cognition and Memory Following Traumatic Brain Injury in Rats. **Plos One**. V.5, n.8, p. e12490, 2010.

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

BONASSOLI, V. T.; MILANI, H.; OLIVEIRA, R. M. W. Ethanol withdrawal activates nitric oxide -producing neurons in anxiety-related brain areas. **Alcohol**. V. 45, n.7, p. 641-52, 2011.

BOUDOULAS, K. D.; BORER, J. S.; BOUDOULAS, H. Heart rate, life expectancy and the cardiovascular system: therapeutic considerations. **Cardiology**. v. 199, p. 199-212, 2015.

BOWERS, M.S. et al. N-acetylcysteine decreased nicotine reward-like properties and withdrawal in mice. **Psychopharmacology**. V.233, n.6, p. 995–1003, 2016.

BREITKREUTZ, R. et al. Improvement of immune functions in HIV infection by sulfur supplementation: two randomized trials. **J Mol Med**. V. 78, p. 55-62, 2000.

BUTLER, G. Definitions of stress. **Occas Pap R Coll Gen Pract**. v.61, p.1-5, 1993.

BUSNARDO, C. et al. Paraventricular nucleus of the hypothalamus glutamate neurotransmission modulates autonomic, neuroendocrine and behavioral responses to acute restraint stress in rats. **Eur. Neuropsychopharmacol.** V.23, p. 1611-1622, 2013.

BUYNITSKY, T.; MOSTOFISKY, D. I. Restraint stress in biobehavioral research: recent developments. **Neuroscience Biobehavioral Reviews.** v.33, p.1089-1098, 2009.

BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, R. J. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. **Am. Rev. Psychol.** V.39, p. 43-68, 1988.

BREITENBACH, M.; ECKL, P. Introduction to oxidative stress in biomedical and biological research. **Biomolecules.** V.5, p.1169-1177, 2015.

CABASSI, A. et al. Effects of chronic N-acetylcysteine treatment on the actions of peroxynitrite on aortic vascular reactivity in hypertensive rats. **J Hypertension.** V.19, n.7, p.1233-1244, 2001.

CAMARGO, L.H.A. et al. Involvement of N-methyl-d-aspartate glutamate receptor and nitric oxide in cardiovascular responses to dynamic exercise in rats. **Cardiovascular pharmacology.** v.713, p. 16-24, 2013.

CAMBRAS, T. et al. Circadian desynchronization of core body temperature and sleep stages in the rat. **PNAS.** V.104, n.18, p. 7634-7639, 2007.

CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; HAIBARA, A. S. Reflexos cardiovasculares e hipertensão arterial. **Rer Bras Hipertens.** v.8, p. 30-40, 2001.

CAMPOS, A. C. et al. Animal models of anxiety disorders and stress. **Rev. Bras. Psiquiatria.** V.35, p.101-S111, 2013.

CAO, L.; LI, L.; ZOU, Z. N-Acetylcysteine reverses existing cognitive impairment and increase oxidative stress in glutamate transporter type 3 in deficient mice. **Neuroscience.** v.220, p. 85-89, 2012.

CARO, A.A.; BELL, M.; EJIOFO, S.; ZURCHER, G.; PETERSEN, D.R.; RONIS, M.J.J. N-acetylcysteine inhibits the upregulation of mitochondrial biogenesis genes in livers from rats fed ethanol chronically. **Alcohol Clin Exp Res.** v.38, n.12, p. 2896–2906, 2014.



CASADEI, B.; PATERSON, D.J. Should we still use nitrovasodilators to test baroreflex sensitivity? [editorial]. **J Hipertens**.v.18, p. 3-6, 1969.

CHOTIWAT, C.; HARRIS, R. B. S. Increased anxiety-like behavior during the post-stress period in mice exposed to repeated restraint stress. **Hormones and Behavior**. V.50, p. 489-495, 2006.

CÔCO, H. et al. Chronic restraint stress increases angiotensin II potency in the rat carotid: role of cyclooxygenases and reactive oxygen species. **J. Pharmacy and Pharmacology**. V.69, p.52-65, 2017.

KAMEDA, S.R.; FRUSSA-FILHO, R.; CARVALHO, R.C. Dissociation of the effects of ethanol on memory, anxiety, and motor behavior in mice tested in the plus-maze discriminative avoidance task. **Psychopharmacol**. v.192, n.1, p.39-48, 2007.

CASADEI, B.; PATERSON, D.J. Should we still use nitrovasodilators to test baroreflex sensitivity? [editorial]. **J Hipertens**.v.18, p. 3-6, 1969.

CEDERBAUM, A.L. Alcohol metabolism. **Clin Liver Dis**. v.16, n. 4, p.667-685, 2013.

CHAKRABORTI, A. et al. Possible involvement of free radicals in the differential neurobehavioral responses to stress in male and female rats. **Behavioural Brain Research**. v.179, p. 321-325, 2007.

CHAKRABORTI, A.; GULATI, K.; RAY, A. Age related differences in stress-induced neurobehavioral responses in rats: modulation by antioxidants and nitrenergic agents. **Behavioural Brain Research**. v. 194, p. 86-91, 2008.

CHEN, M. M. et al. Intoxication by Intraperitoneal Injection or Oral Gavage Equally Potentiates Postburn Organ Damage and Inflammation. **Hindawi**. ID 971481, p. 1-10, 2013.

CHEN, Y. W. et al. Activation of mGluR2/3 underlies the effects of N-acetylcystein on amygdala-associated autism-like phenotypes in a valproate-induced rat model of autism. **Frontiers Behavioral Neuroscience**. v.8, p. 1-9, 2014.

CHEN, X.; HERBERT, J. Regional changes in c-fos expression in the basal forebrain and brainstem during adaptation to repeated stress: correlations with

cardiovascular, hypothermic and endocrine responses. **Neuroscience**. v. 64, n. 3, p. 675-685, 1995.

CHESTER, J. A. et al. Decreased reward during acute alcohol withdrawal in rats selectively bred for low alcohol drinking. **Alcohol**. v.38, p. 165-172, 2006.

CLARKE, T.K. et al. HPA-axis activity in alcoholism: examples for a gene-environment interaction. **Addiction Biology**. v.13, p. 1-14, 2007.

CORNÉLIO, A. M.; NUNES-DE-SOUZA, R. L. Open elevated plus maze-induced antinociception in rats: A non-opioid type of pain inhibition?. **Physiol. Behav.** v. 96, n. 3, p. 440–7, 2009.

CRESTANI, C.C. et al. The bed nucleus of the stria terminalis modulates baroreflex in rats. **Neuroreport**. v.17, n.14, p.1531-5, 2006.

CRESTANI, C.C. et al. N-methyl-D-aspartate glutamate receptors in the hypothalamic paraventricular nucleus modulate cardiac component of the baroreflex in unanesthetized rats. **Neuroscience Research**. v.67, p. 317-326, 2010.

CRESTANI, C.C. Emotional stress and cardiovascular complications in animal models: a review of the influence of stress type. **Frontiers in Physiology**. V.7, n.251, p.1-20, 2016.

DAHCHOUR, A.; De WITTE, P. Excitatory and inhibitory amino acid changes during repeated episodes of ethanol withdrawal: an in vivo microdialysis study. **European J Pharmacology**. v. 459, p. 171-178, 2003.

DAMPNEY, R.A.L.; HORIUCHI, J.; McDOWALL, L.M. Hypothalamic mechanisms coordinating cardiorespiratory function during exercise and defensive behavior. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**. V.142, p. 3-10, 2008.

DEAN, O. et al. N-acetylcysteine in psychiatry: current therapeutic evidence and potential mechanisms of action. **J Psychiatry Neurosci**. V.36, n.2, p.78-86, 2011.

DIAS, A. C. R. Et al. Nitric oxide modulation of glutamatergic, baroreflex, and cardiopulmonary transmission in the nucleus of the solitary tract. **Am. J. Physiol. Circ. Physiol.** V. 288, p. H256-H262, 2005.

DOREMUS-FITZWATER, T.L.; SPEAR, L. P. Developmental differences in acute ethanol withdrawal in adolescent and adult rats. **Alcohol Clin Exp Res.** v. 31, n.9, p. 1516-1527, 2007.

DUARTE, J. O. et al. Role of the lateral preoptic area in cardiovascular and neuroendocrine responses to acute restraint stress in rats. **Physiology&Behavior.** V.175, p. 16-21, 2017.

REIS, D. R. et al. Behavioral and autonomic responses to acute restraint stress are segregated within the lateral septal area of rats. **Plos One.** v.6, n.8, p.1-7, 2011.

DRINGER, R.; GUTTERER, J. M.; HIRRLINGER, J. Glutathione metabolism in brain. **Eur J Biochem.** v.267, p. 4912-4916, 2000.

DUCRET, E. et al. N-Acetylcysteine Facilitates Self-Imposed Abstinence After Escalation of Cocaine Intake. **Biol Psychiatry.** v.80, p.226-234, 2015.

EDWARDS, S.; KOOB, G. F. Neurobiology of dysregulated motivational systems in drug addiction. **Future Neurol.** v. 5, n. 3, p. 393–401, 2010.

EŞEL, E. Neurobiology of alcohol withdrawal inhibitory and excitatory neurotransmitters. **Turk Psikiyatri Derg.**v.17, n. 2, p. 129-37, 2006.

EŞEL, E.; DINÇ, K. Neurobiology of alcohol dependence and implications on treatment. **Turkish J Psychiatry.** v. 28, n. 1, p. 51-60, 2017.

EZZATI, M.; et al. The comparative risk assessment collaborating group. Selected major risk factors and global and regional burden of disease. **Lancet.** v.360, p.1347- 1360, 2002.

FABRI, D. R. S. et al. The expression of contextual fear conditioning involves activation of a NMDA receptor-nitric oxide-cGMP pathway in the dorsal hippocampus of rats. **Europ Neuropsychopharmacology.** v.24, p.1676-1686, 2014.

FERNÁNDEZ, V. F. et al. Reestablishment of ischemia-reperfusion liver injury by N-acetylcysteine administration prior to a preconditioning iron protocol. **Scientific World J.** ID 607285, p.1-9, 2013.

FERREIRA-JUNIOR, N. C.; LAGATTA, D. C.; RESSTEL, L. B. M. Glutamatergic, GABAergic, and endocannabinoid neurotransmissions within the dorsal hippocampus modulate the cardiac baroreflex function in rats. **Eur J Physiol**. V. 470, p. 395-411, 2018.

FILE, S. E. Chronic exposure to noise modifies the anxiogenic response, but not the hypoactivity, detected on withdrawal from chronic ethanol treatment. **Psychopharmacology**. V.116, p.369-372, 1994.

FURLONG, T.M. et al. The effect of air puff stress on c-Fos expression in rat hypothalamus and brainstem: central circuitry mediating sympathoexcitation and baroreflex resetting. **Eur J Neuroscience**. v.39, p.1429-1438, 2014.

GIAM, B. et al. N-acetylcysteine attenuates the development of cardiac fibrosis and remodeling in a mouse model of heart failure. **Physiological Reports**. v. 4, n. 7, p. 1-13, 2016.

GILPIN, N. W.; koob, G. F. Neurobiology of alcohol dependence: Focus on motivational mechanisms. **Alcohol. Clin. Exp. Res**. v. 31, n.3, p. 185–195, 2008.

GILPIN, N. W.; HERMAN, M. A.; ROBERTO, M. The central amygdala as an integrative hub for anxiety and alcohol use disorders. **Biol Psychiatry**. v. 77, n.10, p. 859-869, 2015.

PATTEN, A. R.; FOUNTAINE, C. J.; CHRISTIE, B. R. A comparison of the different animal models of fetal alcohol spectrum disorders and their use in studying complex behaviors. **Frontiers pediatrics**. v.2, n. 93, p. 1-19, 2014

GIROUARD, H. et al. Treatment by N-acetylcysteine and melatonin increases cardiac baroreflex and improves antioxidant reserve. **AJH**. V.17, p. 947-954, 2004.

GIUSTARINI, D. et al. N-acetylcysteine ethyl ester (NACET): a novel lipophilic cell-permeable cysteine derivative with an unusual pharmacokinetic feature and remarkable antioxidant potential. **Biochemical Pharmacology**. v.84, p. 1522-1533, 2012.

GJENDAL, K. et al. Eye, body or tail? Thermography as a measure of stress in mice. **Physiology&Behavior**. V.196, p.135-143, 2018.

GORKA, A. X.; KNODT, A. R.; HARIRI, A. R. Basal forebrain moderates the magnitude of task-dependent amygdala functional connectivity. **SCAN**. V.10, p. 501-507, 2015.

GOU, J. et al. N-acetylcysteine treatment following spinal cord trauma reduces neural tissue damage and improves locomotor function in mice. **Mol Med Reports**. v.12, p.37-44, 2015.

GOUVEIA, M. K. et al. Dissociation in control of physiological and behavioral responses to emotional stress by cholinergic neurotransmission in the bed nucleus of the stria terminalis in rats. **Neuropharmacol**. V. 101, p. 379-388, 2016.

GRIPPO, A. J. et al. Peripheral oxytocin administration buffers autonomic but not behavioral responses to environmental stressors in isolated prairie voles. **Stress**. V.15, n.2, p.149-161, 2012.

GUEDRI, K. et al. Chronic restraint stress induced neurobehavioral alterations and histological changes in rat. **Toxicol Environ Health**. V.9, n.2, p. 123-129, 2017.

GUYENET, P. G. The sympathetic control of blood pressure. **Nature reviews Neuroscience**. V.7, p.335-346, 2006.

HARRISON, P. M. et al. Improvement by acetylcysteine of hemodynamics and oxygen transport in fulminant hepatic failure. **New Engl J Med**. P. 1852-1857, 1991.

HEARD K.J. Acetylcysteine for Acetaminophen Poisoning. **N Engl J Med**. V.359, n.3, p.285-292, 2008.

HECKMANN, Wolfgang; SILVEIRA, Camila Magalhães. **Dependência do álcool, aspectos clínicos e diagnósticos**. In: ANDRADE. Arthur Guerra de; ANTHONY, James C. Álcool e suas consequências: uma abordagem multiconceitual. 1ª ed. São Paulo: Minha Editora, 2009. Cap.3, p.67-87.

HERMAN, J. P. et al. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical stress response. **Compr Physiol**. V.6, n. 2, p. 603-621, 2016.

HERMANN, D. et al. Translational magnetic resonance spectroscopy reveals excessive central glutamate levels during alcohol withdrawal in humans and rats. **Biol Psychiatry**. v. 71, p. 1015-1021, 2011.

HOFFER, M. E. et al. Amelioration of acute sequelae of blast induced mild traumatic brain injury by N-acetyl cysteine: a double-blind, placebo controlled study. **Plos one**. v.8, n.1, p.1-10, 2013

HOGG, S. A review of the validity and variability of the elevated Plus- Maze as an animal model of anxiety. **Pharmacol. Biochem. Behavior**. V. 54, n. 1, p. 21-30, 1996.

HOLT, S. et al. Improvement in renal function in hepatorenal syndrome with N-acetylcysteine. **Lancet**. V.353, p. 294-295, 1999

HOROWITZ, J. D. Thiol- containing agents in the management of unstable angina pectoris and acute myocardial infarction. **American J Med**. V.91, suppl 3C, p. 1135-1175, 1991.

HOSOYA, K. I. et al. Enhancement of L-cysteine transport activity and its relation to xCT gene induction at the blood-brain barrier by diethyl maleate treatment. **J Pharmacol Experimental Therapeutics**. V.302, n.1, p. 225-231, 2002.

HOUTEPEN, L. C. et al. Acute stress effects on GABA and glutamate levels in the prefrontal cortex: A7T<sup>1</sup>H magnetic resonance spectroscopy study. **Neuroimage: Clinical**. V.14, p.195-200, 2017.

HUANG, J.W. et al. The effect of N-acetylcysteine on creatinine measurement: Protocol for a systematic review. **Canadian J Kid Health Diseases**. V.5, p. 1-6, 2018.

HUERTA-FRANCO, M.R. et al. Effects of occupational stress on the gastrointestinal tract. **World J. Gastrointest. Pathophysiol**. V.4, n.4, p. 108-118, 2013.

HURLEY, M.M. et al. N-acetylcysteine (NAC) decreases binge eating in a rodent model. **Int J Obes**. V.40, n.7, p. 1183–1186, 2016.

HURST, G.A.; SHAW, P.B.; LEMAISTRE, C.A. Laboratory and clinical evaluation of the mucolytic properties of acetylcysteine. **Am Rev Respir Dis**. v.96, n.5, p.962-70, 1967.

IRIGOYEN, M.C.C.; KRIEGER, E. M. Baroreflex control of sympathetic activity in experimental hypertension. **J Med Biol Research**. V. 31, p. 1213-1220, 1998.

JASTRZEBSKA, J. et al. N-acetylcysteine amide (AD4) reduces cocaine-induced reinstatement. **Psychopharmacol**. V.233, p.3437–3448, 2016.

JOHNSON, W. M.; WILSON-DELFOSE, A. L.; MIEYAL, J. J. Dysregulation of glutathione homeostasis in neurodegenerative diseases. **Nutrients**. V.4, p. 1399-1440, 2012.

JOSHI, J. C. et al. Effects of morphine on stress induced anxiety in rats: Role of nitric oxide and Hsp 70. **Physiology&Behavior**. V. 139, p. 393-396, 2015.

KAGIAS, K. et al. Neuronal responses to physiological stress. **Frontiers in genetics**. V. 3, n. 222, p. 1-17, 2012.

KALIVAS, P. W. The glutamate homeostasis hypothesis of addiction. **Nature Review Neuroscience**. V. 10, p. 561-572, 2009.

KANTER, M. Z. Comparison of oral and i.v. acetylcysteine in the treatment of acetaminophen poisoning. **Am J Health-Syst Pharm**. V.63, p. 1821-1827, 2006.

KARLSSON, O.; ROMAN, E. Dose-dependent effects of alcohol administration on behavioral profiles in the MCSF test. **Alcohol**. v.50, p.51-56, 2016.

KAU, K. S. et al. Blunted cystine –glutamate antiporter function in the nucleus accumbens promotes cocaine-induced drug seeking. **Neuroscience**. V.155, p.530-537, 2008.

KLIETHERMES, C.L. Anxiety-like behaviors following chronic ethanol exposure. **Neurosc Biobehav Rev**. 28:837–850, 2005.

KNACKSTEDT, L.A. et al. The Role of Cystine-Glutamate Exchange in Nicotine Dependence in Rats and Humans. **Biol Psychiatry**. v.65, n.10, p.841–845, 2009.

KOH, A. S. et al. Identification of a mechanism by which the methylmercury antidotes N-acetylcysteine and dimercaptopropanesulfonate enhance urinary metal excretion: transport by the renal organic anion transporter-1. **Mol Pharmacol**. V.62, p.921-926, 2002.

KOOB G.F.; LLOYD, K.G.; MASON, B.J. Development of pharmacotherapies for drug addiction: a Rosetta stone approach. **Nat Rev Drug Discov.** V.8,n.6,p.500-15, 2009.

KOOB, G.F. Negative reinforcement in drug addiction: the darkness within. **Curr Opin Neurobiol.** V.23,n.4,p.559-63, 2013.

KOOB, G. F.; LE MOAL, M. Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis. **Neuropsychop.** v. 24, n. 2, p. 97-129, 2001.

KOOB, G.F.; LE MOAL, M. Addiction and the brain antireward system. **Annu. Rev. Psychol.** v.59, p.29-53, 2008.

KOOB, G.F. Dynamics of Neuronal Circuits in Addiction: Reward, Antireward, and Emotional Memory. **Pharmacopsyc.** v.42, n. Suppl 1, p. S32–S41, 2009.

KOOB, G. F.; VOLKOW, N. D. Neurocircuitry of addiction. **Neuropsychopharmacol.** V.35, p.217-238, 2010.

COZZOLI, D. K. et al. The effect of mGluR5 antagonism during binge drinking on subsequent ethanol intake in C57BL/6J mice: sex- and age-induced differences. **Alcohol Clin Res.** V.38, n. 3, p.730-738, 2015.

KORT, A. M.; BOER, S. F. A robust animal model of state anxiety: fear-potentiated behavior in the elevated plus-maze. **Eur J Pharmacol.** V.463, p. 163-175, 2003.

KLOTINSKA J.; BOCHENSKI, M. The influence of various glutamate receptors antagonists on anxiety-like effect of ethanol withdrawal in plus-maze test in rats. **Europ J Pharmac.** V.598, p.57-63, 2008.

KOUGIAS, P. et al. Arterial baroreceptors in the management of systemic hypertension. **Med Sci Monit.** V.16, n. 1, p. 1-15, 2010.

LÄCK, A.K. et al. Chronic ethanol and withdrawal differentially modulate pre- and postsynaptic function at glutamatergic synapses in rat basolateral amygdala. **J Neurophysiol.** V. 98, n.6, p. 3185–3196, 2007.



LAGRAAUW, H.M.; KUIPER J.; BOT, I. Acute and chronic psychological stress as factors for cardiovascular disease: insights gained from epidemiological, clinical and experimental. **Brain, Behavior and Immunity**. V. 50, p.18-30, 2015.

LAKKA, H. M. et al. The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men. **American Med Association**. V.288, n.21, p.2709-2716, 2002.

LARANJEIRA, R. et al. Consenso sobre a síndrome de abstinência do álcool (SAA) e o seu tratamento. **Rev. Bras. Psiquiatr.** v.22, n.2, p. 62-71, 2000.

LAWTHER, A. J. et al. Anxiogenic drug administration and elevated plus-maze exposure in rats activate populations of relaxin-3 neurons in the dorsal raphe nucleus. **Neuroscience**. V.303, p. 270-284, 2015.

LEBOURGEOIS, S. et al. Effect of N-acetylcysteine on motivation, seeking and relapse to ethanol self-administration. **Addict Biol**. doi:10.1111/adb.12521, 2017.

LEE, T.M.; LAI, P.Y.; CHANG, N. C. Effect of N-acetylcysteine on sympathetic hyperinnervation in post-infarcted rat hearts. **Cardiovascular Research**. V.85, p.137-146, 2010.

LEWYS, M. J.; JUNE, H. L. Neurobehavioral studies of ethanol reward and activation. **Alcohol**. V.7, p.213-219, 1990.

LUSHCHAK, V. I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. **Chemico-Biological interaction**. V.224, p. 164-175, 2014.

DU, L. et al. Probenecid and N-acetylcysteine prevent loss of intracellular glutathione and inhibit neuronal death after mechanical stretch injury *in vitro*. **J Neurotrauma**. V.33, n.20, p. 1913-1917, 2016.

LISTER, R. G. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. **Pharmac. Ther.** v. 46, p. 321-340, 1990.

LIU, E. F. et al. Sinus bradycardia: normal phenomenon or risk factor? Evaluation based on recent evidence. **J Insur Med**. V.43, p. 102-111, 2012

LIVY, D. J.; PARNELL, S. E.; WEST, J. R. Blood ethanol concentration profiles: a comparison between rats and mice. **Alcohol**. V.29, p.165-171, 2003.

MARTISOVA, E. et al. Long lasting effects of early-life stress on glutamatergic/GABAergic circuitry in the rat hippocampus. **Neuropharmacology**. V.62, p.1944-1953, 2012.

MARTELLI, A. Baroreflexes and blood pressure homeostasis. **Rev HCPA**. V.33, n.3/4, p.230-237, 2013.

MARTIGNONI, M.; GROOTHUIS, G.; KANTER, R. Comparison of mouse and rat cytochrome P450-mediated metabolism in liver and intestine. **Drug Metabolism Disposit**. V. 34, n.6, p.1047-1054, 2006.

MARTINA, V. et al. Long-term N-acetylcysteine and L-arginine administration reduces endothelial activation and systolic blood pressure in hypertensive patients with type 2 diabetes. **Diabetes Care**. V.31, p.940-944, 2008.

MATSUOKA, N. et al. Characterization of stress-induced sudden death in cardiomyopathic Hamsters. **J Pharmacol Experimental Therapeutics**. V.284, p.125-135, 1998.

MAYO-SMITH, M. F. Pharmacological management of alcohol withdrawal. **JAMA**. V. 278, n. 2, p.144-151, 1987.

MAWDSLEY, J. E.; RAMPTON, D. S. Psychological stress in IBD: New insights into pathogenic and therapeutic implications. **Gut**. V.54, p. 1481-1491, 2005.

MILLAR, A. B. et al. Effect of oral N-acetylcysteine on mucus clearance. **Br. J. Dis. Chest**. V.79, n. 3, p.262-266, 1985.

Mc EWEN, B. S.; MORRISON, J. H. Brain on stress: vulnerability and plasticity of the prefrontal cortex over the life course. **Neuron**. V. 79, n. 1, p.16-29, 2013.

McLELLAN, L. I. et al. Uptake and distribution of N-acetylcysteine in mice: tissue-specific effects on glutathione concentrations. **Carcinogenesis**. V.16, n. 9, p.2099-106, 1995.

MOCELIN, R. et al. N-acetylcysteine prevents stress-induced anxiety behavior in zebrafish. **Pharmacol Biochem Behav.** V.139, n.Pt B, p.121-6, 2015.

MORAES-NETO, T.B. et al. Involvement of dorsal hippocampus glutamatergic and nitrenergic neurotransmission in autonomic responses evoked acute restraint stress in rats. **Neuroscience.** V.258, p.364-373, 2014.

MORAIS-SILVA, G.; ALVES, G.C.; MARIN, M.T. N-Acetylcysteine treatment blocks the development of ethanol-induced behavioural sensitization and related  $\Delta$ FosB alterations. **Neuropharmacol.** V.110, p.135-142, 2016.

MORALES, M. M. et al. Chronic intermittent ethanol exposure modulation of glutamatergic neurotransmission in rat Lateral/Basolateral amygdala is duration-, input-, and sex-dependent. **Neuroscience.** V.371, p. 277-28, 2018.

MORSE, A. C. et al. Conditioned place aversion to the “hangover” phase of acute ethanol administration in the rat. **Alcohol.** V.22, p.19-24, 2000.

MULLER, B. et al. Nitric oxide transport and storage in the cardiovascular system. **Ann N.Y. Acad. Sci.** v.962, p. 131-139, 2002.

MURRAY, J.E.; EVERITT, B.J.; BELIN, D. N-Acetylcysteine reduces early- and late-stage cocaine seeking without affecting cocaine taking in rats. **Addict Biol.** V.17, p.437–440, 2011.

NAIR, A. B.; JOCOB, S. A simple practice guide for dose conversion between animals and human. **J Basic Clin Pharmac.** V.7, n.2, p.27-31, 2016.

NUSS, P, Anxiety disorders and GABA neurotransmission: a disturbance of modulation. **Neuropsychiatr. Dis and Treat.** V.11, p.165–175, 2015.

OLIVEIRA, L. A. et al. Controlo f cardiovascular responses to stress by CRF in the bed nucleus of stria terminalis is mediated by local NMDA/nNOS/sGC/PKG signaling. **Psychoneuroendocrinology.** V.89, p. 168-176, 2018.

OZARAS, R. et al. N-acetylcysteine attenuates alcohol-induced oxidative stress in the rat. **World J Gastroenterol.** V.9, n.1, p.125-128, 2003.

PASCUAL, M. et al. Repeated alcohol administration during adolescence causes changes in the mesolimbic dopaminergic and glutamatergic systems and

promotes alcohol intake in the adult rat. **J Neurochemistry**. V.108, p.920-931, 2009.

PECHÁNÓVÁ, O. et al. Effect of chronic N-acetylcysteine treatment on the development of spontaneous hypertension. **Clin Science**. V.110, p.235-242, 2006.

PECHÁNÓVÁ, O. et al. The effect of N-acetylcysteine and melatonin in adult spontaneously hypertensive rats with established hypertension. **Eur J Pharmacol**. V.561, p.129-136, 2007.

PELLOW, S. et al. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **J Neurosci Methods**. V.14, p. 149-167, 1985.

PELLOW, S.; FILE, S. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. **Pharmacol. Biochemistry & Behavior**. V.24, p. 525-529, 1986.

POHORECKY, L. A. Biphasic action of ethanol. **Biobehavioral Review**. V.1, p.231-240, 1997.

PREVATTO, J.P. et al. Antioxidant Treatment Induces Hyperactivation of the HPA Axis by Upregulating ACTH Receptor in the Adrenal and Downregulating Glucocorticoid Receptors in the Pituitary. **Oxid Med Cell Longev**. doi.org/10.1155/2017/4156361, 2017.

PUNG, T. et al. Examination of concurrent exposure to repeated stress and chlorpyrifos on cholinergic, glutamatergic, and monoamine neurotransmitter systems in rat forebrain regions. **J Toxicol**. V.25, p.65-80, 2006.

RADLEY, J. J.; MORRISON, J. H. Repeated stress and structural plasticity in the brain. **Ageing Research Reviews**. V. 4, p. 271-287, 2005.

RAFTOS, J. E. et al. Kinetics of uptake and deacetylation of N-acetylcysteine by human erythrocytes. **J Biochem Cell Biol**. V.39, p.1698-1706, 2007.

RASMUSSEN, D.D. et al. Chronic Daily Ethanol and Withdrawal: 2. Behavioral Changes During Prolonged Abstinence. **Alcohol Clin Exp Res**. V.25, n.7, p.999-1005, 2001.

RAUCHOVA, H. et al. Chronic N-acetylcysteine administration prevents development of hypertension in N-nitro-L-arginine methyl ester-treated rats: the role of reactive oxygen species. **Hypertens Res.** V.28, n.5, p.475-482, 2005.

REICHEL, C.M. et al. Chronic N-Acetylcysteine during Abstinence or Extinction after Cocaine Self-Administration Produces Enduring Reductions in Drug Seeking. **J Pharmacol Exp Ther.** V.337, n.2 ,p.487-493, 2011.

REIS, D. G. et al. Behavioral and autonomic responses to acute restraint stress are segregated within the Lateral Septal Area of rats. **Plos One.** v. 6, n. 8, p.1-7, 2011.

REIS, R. et al. Energy drink induced lipid peroxidation and oxidative damage in rat liver and brain when used alone or combined with alcohol. **J Food Science.** V.82, n.4, p. 1037-1043, 2015.

RODGERS, R. J.; DALVI, A. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. **Neuroscience Biobehavioral.** V.21, n.6, p. 801-810, 1997.

RODGERS, R.J.; JOHSON, J.T. Factor Analysis of Spatiotemporal and Ethological Measures in the Murine Elevated Plus-Maze test of anxiety. **Pharmacol Biochem, Behav.** V.52, n.2, p.297-303, 1995.

ROZANSKI, G. J.; XU, Z. Glutathione and K<sup>+</sup> channel remodeling in postinfarction rat heart. **Ann J Physiol Heart Circ Physical.** V. 282, p. H2346-H2355, 2002.

RUSSELL, M. A. Stressor-related drinking and future alcohol problems among university students. **Psychol Addict. Behav.** V.31, n.6, p. 676-687, 2017.

RUSHWORTH, G.F.; MEGSON, I.L. Existing and potential therapeutics uses for N-Acetylcysteine : The need for conversion to intracellular glutathione for antioxidant benefits. **Pharmacol Ther.** V.141, p.150-159, 2014.

SAKAMOTO, J. T. et al. Heart rate variability analysis in patients who have bradycardia presenting to the emergency department with chest pain. **J Emergency Med.** V. 54, n.3, p.273-280, 2017.

SAMUNI, Y. et al. The chemistry and biological activities of N-acetylcysteine. **Biochimica Biophysica Acta.** V. 1830, p. 4117-4129, 2013.

SÁNTHA, P. et al. Restraint stress-induced morphological changes at the blood-brain barrier in adult rats. **Frontiers Molecul Neuroscienc.** V.8, n.88,p. 1-15, 2016.

SANTINI, G. O. et al. The ventral hippocampus NMDA receptor/nitric oxide/guanylate cyclase pathway modulates cardiovascular responses in rats. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical.** V.177, p.244-252, 2013.

SANTOS, P. et al. Anxiolytic proprieties of N-Acetylcysteine in mice. **Behav Brain Res.** V.317, p.461-469, 2017.

SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian J. Medical Biol. Research.** V.38, p.995-1014, 2005.

SCHEFFERS, I. J. M.; KROON, A. A.; LEEUW, P. W. Carotid baroreflex activation: Past, present, and future. **Curr Hypertens Rep.** v.12, p. 61-66, 2010.

SCHNEIDER Jr, R, et al. N-Acetylcysteine prevents behavioral and biochemical changes induced by alcohol cessation in rats. **Alcohol.** v.49, p. 259-263, 2015.

SCHMAAL; L. et al. Efficacy of N-acetylcysteine in the treatment of nicotine dependence: a double-blind placebo-controlled pilot study. **Eur Addict Res.** V.17, n.4, p.211-6, 2011.

SCHUCKIT, Marc A. **Etanol e metanol.** In: Brunton, Laurence L.; Knollman, Björn C., Chabner, Bruce A. Alcohol. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. 12a Ed. New York :McGraw-Hill Professional, 2012. p.629-644

SCHULTEIS, G.; LIU, J. 2006. Brain reward deficits accompany withdrawal (hangover) from acute ethanol in rats. **Alcohol.** V.39, n.1, p. 21-28, 2006.

SECRETARIA NACIONAL ANTIDROGAS. **I Levantamento nacional sobre os padrões de consumo de álcool na população brasileira.** Brasília, DF 2007. Disponível em: . Acesso em: 01 de Junho de 2013.

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

SHIN, J. W.; SEOL, I. C.; SON, C. G. Interpretation of animal dose and human equivalent dose for drug development. **J Korean Med.** V.31, n.3, p.1-7, 2010.

SILBERMAN, Y. et al. Ethanol produces corticotropin releasing factor receptor-dependent enhancement of spontaneous glutamatergic transmission in the mouse central amygdala. **Alcohol Clin Exp Res.** V.39, n. 11, p.2154-2162, 2015.

SOCHMAN, J. Cardioprotective effects of N-acetylcysteine: the reduction in the extent of infarction and occurrence of reperfusion arrhythmias in the dog. **J Cardiology.** V.28, p.191-196, 2002.

SORREGOTTI, T. et al. Amygdaloid involvement in the defensive behavior of mice exposed to the open elevated plus-maze. **Behavioural Brain Research.** V.338, p.159-165, 2018.

SOUZA, H.C. et al. Cardiac sympathetic overactivity and decreased baroreflex sensitivity in L-NAME hypertensive rats. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** v. 280, H844-H850, 2001.

STEPTOE, A. The links between stress and illness. **J. Psychosomatic Research.** V.35, n.6, p. 633-644, 1991.

STEPTOE, A.; KIVIMAKI, M. Stress and cardiovascular disease: an update on current knowledge. **Annu Rev Public Health.** V.34, p. 337-54, 2013.

SUDHINARASET, M. et al. Social and cultural contexts of alcohol use. **Alcohol Research.**v.38, n.1, p.35-45, 2016.

SUTER, P.M. et al. N-acetylcysteine enhances recovery from acute lung injury in man. A randomized, a double – blind, placebo-controlled clinical study. **Chest.**1v.05, n.1, p.190-4,1994.

SWIFT, R. M.; LEWIS, D. C. **Farmacologia da dependência e abuso de drogas.** In: Golan, David E.; Tashjian Jr., Armen H.; Armstrong, Ehrin J.; Armstrong, April W. Princípio de farmacologia: A base fisiopatológica da farmacoterapia. 2a Ed. Guanabara Koogan, 2009. P. 263-270.

TEPEL, M. et al. Prevention of radiographic-contrast-agent-induced reductions in renal function by acetylcysteine. **The new England J. Medicine.** V. 343, n. 3, p. 180-184, 2000.

TOFOLI, S. M. C. et al. Early life stress, HPA axis, and depression. *Psychology&Neuroscience*. V. 4, n. 2, p. 229-234, 2011.

TORRES, S. J. et al. Relationship between stress, eating behavior, and obesity. *Nutrition*. V. 23, p. 887-894, 2007.

URSIN, H.; ERIKSEN, H. R. The cognitive activation theory of stress. *Psychoneuroendocrinology*. V. 29, p. 567-592, 2004.

UZBAY, I.T. et al. Dopaminergic and serotonergic alterations in the rat brain during ethanol withdrawal: association with behavioral signs. *Drug Alcohol Depend*. V.53, p.39-47, 1998.

VALENTI, V. E. et al. Central N-acetylcysteine effects on baroreflex in juvenile spontaneously hypertensive rats. *J Integrative Neuroscience*. V.10, n.2, p.161-176, 2011.

VALENTINI, V. E. et al. Avaliação da função barorreflexa em ratos jovens espontaneamente hipertensos. *Arq Bras Cardiol*. V.92, n.3, p.216-221, 2009.

VASDEV, S.; SINGAL, P.; GILL, V. The antihypertensive effect of cysteine. *J Angiol*. v.18, n.1, p. 7-21, 2009.

VITASARI, P. et al. Assessing of physiological arousal and cognitive anxiety toward academic performance: The application of catastrophe model. *Procedia – Social and behavioral science*. V.30, p. 615-619, 2011.

WADE, L. A.; BRADE, H. M. Cysteine and Cystine transport at the blood-brain barrier. *J Neurochemistry*. V.37, n.3, p.730-734, 1981.

WALF, A. A.; FRYE, C. A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc*. V.2, n.2, p.322-328, 2017.

WALKER, B. M.; EHLERS, C. L. Age-related differences in the blood alcohol levels of Wistar Rats. *Pharmacol Biochem Behav*. V.91, n.4, p. 560-565, 2010.

WALSH, B. M. et al. Thiol-oxidant monochloramine mobilizes intracellular Ca<sup>2+</sup> in parietal cells of rabbit gastric glands. *Am J Physiol Cell Physiol*. V.293, p.C1687-C1697, 2007.



WANG, J. et al. Oxidation of ethanol in the rat brain and effects associated with chronic ethanol exposure. **PNAS**. V.110, n.35, p.144444-14449, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. The ICD-10 **Classification of Mental and Behavioural Disorders: Clinical descriptions and diagnostic guidelines**. Disponível em: < [http://www.who.int/substance\\_abuse/terminology/icd\\_10/en/](http://www.who.int/substance_abuse/terminology/icd_10/en/)>. Acesso: 12 de outubro de 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. New initiative launched to tackle cardiovascular disease, the world's number one killer. Disponível no dia 22 de setembro de 2016 em: < [https://www.who.int/cardiovascular\\_diseases/en/](https://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/)>. Acesso em 29 de novembro de 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2017) Noncommunicable diseases and mental health. **World health statistics**, p. 31. Disponível em Estatísticas mundiais da saúde 2017 no site: < <http://www.cisa.org.br/artigo/8300/estatisticas-mundiais-saude-2017.php>>.

WSCIEKLICA, T. et al. Alcohol consumption increases locomotion in an open field and induces Fos-immunoreactivity in reward and approach/ withdrawal-related neurocircuitries. **Alcohol**. V. 50,p.73-82, 2016.

ZHANG, Z. et al. Dose- and time-dependent expression of anxiety-like behavior in the elevated plus-maze during withdrawal from acute and repeated intermittent ethanol intoxication in rats. **Alcohol Clin Exp Res**. V.31, n.11 ,p.1811–1819, 2007.

ZHOU, J. et al. Intravenous administration of stable-labeled N-acetylcysteine demonstrates an indirect mechanism for boosting glutathione and improving redox status. **J Pharmaceutical Science**. V.104, p.2619-2626, 2015.

ZIMATKIN, S. M. et al. Enzymatic mechanisms of ethanol oxidation in the brain. **Alcoholism: Clin Exp Research**. v.30, n.9, p.1500-1505, 2006.

YUEN, E. Y. et al. Acute stress enhances glutamatergic transmission in prefrontal cortex and facilitates working memory. **PNAS**. V.106, n. 33, p.14075-14079, 2009.

### 13. APROVAÇÃO DOS COMITÊS DE ÉTICA (CEUA)

#### 13.1. CAPITULO1- APROVAÇÃO DO COMITÊS DE ÉTICA



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Câmpus de Araraquara



#### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeitos do tratamento com N-Acetilcisteína na síndrome de abstinência, reinstalação da autoadministração induzida pelo estresse e neuroadaptações associadas em ratos", registrada com o Protocolo CEUA/FCF/CAR: 04/2017, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Marcelo Tadel Marin - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado ad-referendum pelo Coordenador da COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP em 08 de maio de 2017.

Finalidade	( ) Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	maio de 2019
Espécie/linhagem/raça	Rato Wistar/Long Evans
Nº de animais	535
Peso/Idade	200/250g – 9/11 semanas
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central da UNESP/Botucatu

Araraquara, 08 de maio de 2017.

Profa. Dra. Carla Raquel Fontana Mendonça  
Coordenadora da CEUA

## 13.2. CAPITULO2- APROVAÇÃO DO COMITÊS DE ÉTICA



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Câmpus de Araraquara



### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeitos da N-acetilcisteína sobre o sistema cardiovascular de ratos expostos ao estresse", registrada com o Protocolo CEUA/FCF/CAR: 03/2018, sob a responsabilidade do Professor Doutor Marcelo Tadeu Marin, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP em reunião de 18 de abril de 2018.

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Abril de 2018
Espécie/linhagem/raça	Rato Heterogênico / Wistar- 200 g 168 M
Nº de animais	168
Peso/Idade	200 gramas/ 09 semanas
Sexo	Masculino
Origem	Biotério Central Unesp/ Botucatu

Araraquara, 18 de abril de 2018.

Profa. Dra. CARLA RAQUEL FONTANA  
Coordenadora da CEUA