



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**ADRIANA MARY NUNES COSTA**

**ESTUDO DO EFEITO NEUROPROTETOR DA N-ACETILCISTEINA EM  
RATAS PERIADOLESCENTES SUBMETIDAS A CONVULSÃO PELO  
ABRASAMENTO INDUZIDO POR NICOTINA.**

**FORTALEZA**  
**2014**

**ADRIANA MARY NUNES COSTA**

**ESTUDO DO EFEITO NEUROPROTETOR DA N-ACETILCISTEINA EM  
RATAS PERIADOLESCENTES SUBMETIDAS A CONVULSÃO PELO  
ABRASAMENTO INDUZIDO POR NICOTINA.**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Danielle Macêdo Gaspar

**FORTALEZA  
2014**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca de Ciências da Saúde

---

- C837e Costa, Adriana Mary Nunes  
Estudo do efeito neuroprotetor da N-Acetilcisteína em ratas periadolescentes submetidas a convulsão pelo abrasamento induzido por nicotina / Adriana Mary Nunes. – 2014.  
77f. : enc. ; 30 cm.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2014.  
Orientação: Profa. Dra. Danielle Macêdo Gaspar
- 1.Epilepsia. 2. Estresse Oxidativo. I. Título.

CDD: 616.853

---

**ADRIANA MARY NUNES DA COSTA**

**ESTUDO DO EFEITO NEUROPROTETOR DA N-ACETILCISTEÍNA EM  
RATAS PERIADOLESCENTES SUBMETIDAS AO ABRASAMENTO NO  
MODELO DE EPILEPSIA INDUZIDO POR NICOTINA**

Dissertação de Mestrado em  
Farmacologia submetida à  
Coordenação do Programa de Pós-  
Graduação em Farmacologia da  
Universidade Federal do Ceará  
como requisito parcial para obtenção  
do Grau de Mestre em  
Farmacologia.

Aprovada em: 27 de junho de 2014

*Danielle Macêdo Gaspar*

---

Prof. Dra. Danielle Macêdo Gaspar  
Universidade Federal do Ceará – UFC  
(Orientadora)

*Cícero Francisco Bezerra Felipe*

---

Prof. Dr. Cícero Francisco Bezerra Felipe  
Universidade Federal da Paraíba – UFPB

*Pedro Braga Neto*

---

Prof. Dr. Pedro Braga Neto  
Universidade Estadual do Ceará – UECE

À minha família e ao meu noivo  
por todo amor e apoio fundamentais.

## **AGRADECIMENTOS**

Sobretudo a Deus e a Nossa Senhora que tem colocado em minha vida oportunidades através de pessoas que acreditam em mim, por estarem sempre ao meu lado guiando meus pensamentos através de orações para que as melhores decisões sejam tomadas.

A minha orientadora, Danielle, que me deu apoio durante todo o programa de mestrado, acreditou na minha capacidade e trabalho.

Aos meus pais que sempre acreditaram em mim e lutaram de todas as formas para proporcionar oportunidade de crescimento intelectual e pessoal para mim e meus irmãos.

Ao meu noivo, Alexandre, pelo companheirismo, compreensão e paciência diante das minhas dúvidas e inquietações.

A Patrícia, por ter me estendido à oportunidade de dar continuidade ao seu trabalho e ter me ajudado a iniciar meu mestrado.

A Gersilene e a Fernanda, pelo apoio imensurável nos experimentos, por terem me ensinado de forma solidária tudo o que sabem.

Ao Victor, Cassio e Isabel pela ajuda, apoio e disponibilidade.

A Júlia pela amizade, pela disponibilidade e por me tranquilizar em momentos conturbados.

As técnicas Lena e Vilani pela atenção e apoio.

A todos meus colegas do Laboratório de Neurofarmacologia- UFC que fizeram parte de forma direta e indireta desses dois marcantes anos de mestrado.

A CAPES pelo apoio financeiro através da bolsa de mestrado, essencial à minha dedicação à pesquisa.

*“Não há vitórias sem lutas, muito menos conquistas sem batalhas. A vida é feita de oportunidades, e o mais importante talvez não seja saber somente aproveitá-las, mas também criá-las.”*

*Leonardo Luís Gomes*

## RESUMO

A nicotina (NIC) é o principal componente da fumaça do tabaco e considerada uma das substâncias com maior poder de abuso. Um importante efeito farmacológico da NIC é a indução de convulsões. Neste contexto, foi proposto que a administração repetida de NIC é capaz de causar abrasamento, uma forma de sensibilização à manifestação de alterações comportamentais, dentre elas a convulsão, sendo usado como ferramenta para o estudo dos mecanismos de progressão para uma ampla gama de transtornos neuropsiquiátricos. Recentemente nosso grupo de pesquisa evidenciou que ratas na periadolescência são mais susceptíveis aos efeitos do abrasamento por NIC mostrando a participação de mecanismos pró-oxidantes neste processo. Baseado nestas evidências, o presente trabalho objetivou estudar os possíveis benefícios da administração de N-acetilcisteína (NAC), uma droga antioxidante, na prevenção do abrasamento induzido por NIC. Para isto foram utilizadas ratas *Wistar* periadolescentes (60-80 g). Os animais receberam NIC (2mg/Kg/dia, v.o.); NAC (90, 180 ou 270 mg/Kg/dia, i.p.) sozinha ou associada a NIC (NAC+NIC) ou água destilada durante 19 dias (cinco dias consecutivos e dois de intervalo). O comportamento dos animais foi avaliado nos 1º, 8º 15º e 19º dias, através da Escala de Racine. Ao final do tratamento (19º dia) os animais tiveram o córtex pré-frontal (CPF), hipocampo (HP) e corpo estriado (CE) dissecados para a avaliação de parâmetros oxidativos como atividade da SOD, níveis de GSH, nitrito e peroxidação lipídica (TBARS). Os resultados mostraram que os animais tratados com NAC apresentaram diminuição dos graus de convulsão na Escala de Racine. A administração de NAC+NIC reduziu a atividade da SOD, enquanto os níveis de GSH foram significativamente aumentados nos grupos NAC e NAC+NIC. NAC+NIC reduziram a peroxidação lipídica não alterando os níveis de nitrito nos grupos estudados. Em conclusão nosso estudo mostrou que a NAC apresenta efeito protetor em animais expostos ao abrasamento induzido por nicotina.

Palavras-chave: N-acetilcisteína. abrasamento induzido por nicotina. Convulsão. estresse oxidativo.



## ABSTRACT

Nicotine (NIC) is the major component of tobacco smoking being one of the most abused substances worldwide. One important pharmacological effect of NIC is the induction of seizures. In this context it was previously proposed that NIC repeated administration is capable of inducing kindling, a form of sensitization related to the induction of behavioral alterations, among then seizures. Kindling is being used as a tool for the study of progression in a wide range of neuropsychiatric disorders. Recently our research group evidenced that periadolescent female rats were more susceptible to NIC-induced kindling demonstrating a participation of prooxidant mechanisms in this response. Based on these evidences, the present study had the goal to study the benefits of the administration of N-acetylcysteine (NAC), an antioxidant drug, in the prevention of NIC-induced seizures. To do this, female Wistar periadolescent rats (60-80 g) were used. The animals were administered NIC (2mg/Kg/day, i.p.); NAC (90, 180 or 270 mg/Kg/day, i.p.) alone or combined with NIC (NAC+NIC) or distilled water during 19 days. The animal's behavior was evaluated at 1<sup>st</sup>, 8<sup>th</sup>, 15<sup>th</sup> and 19<sup>th</sup> days, using Racine Scale (seizure grades 1 to 5). At the end of treatment (19<sup>th</sup> day), animals were killed and their prefrontal cortex, hippocampus and striatum dissected. Homogenates were used to evaluate SOD activity, GSH levels, nitrite levels (as an indirect nitric oxide measurement), and lipid peroxide generation by measuring the substances that react with thiobarbituric acid. Animals treated with NAC presented a decrement in seizure activity. The SOD activity levels were decreased in group that received NAC+NIC. On the other hand, GSH levels had a significant increment in both groups treated with NAC and NAC+NIC. The lipid peroxidation level was reduced in the group that received NAC+NIC, and there was no change in nitrite levels in any group. The conclusion was that NAC presented a neuroprotective effect when diminished the lipid peroxidation level in a exposed to nicotine-induced kindling.

Keywords: N-acetylcysteine. Nicotine-induced kindling. Seizure. Oxidative stress.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1-** Diagrama resumo da Revisão terminológica para organização de crises e epilepsias da ILAE de 2010.

**Figura 2** - Imagem digitalizada da secção transversal de um encéfalo de rato enfoque para corno de Amon

**Figura 2-** Integração de defesa do sistema enzimático com conversão de  $O_2$  em  $H_2O$  e suas etapas intermediárias

**Figura 3-** Mecanismos envolvidos na indução da peroxidação lipídica. Reação em cadeia com formação de radicais lipídicos nas fases de iniciação, propagação e terminação. Formação de MDA a partir do radical peroxila

**Figura 4-** Estrutura molecular da cisteína a esquerda e da molécula L-isômera, N-acetilcisteína a direita.

**Figura 5-** Representação da atividade antiinflamatória e antioxidante da NAC

**Figura 6-** Delineamento experimental - protocolo de prevenção NAC no abrasamento induzido por nicotina.

**Figura 7-** Estágios de convulsão baseados na escala de Racine submetidos ao abrasamento com nicotina e tratados com N-acetilcisteína.

**Figura 8-** Análise do desenvolvimento de convulsões estágio 5 na esc Racine em animais submetidos ao tratamento com nicotina e N-acetilciste

**Figura 9-** Concentrações de GSH no córtex pré-frontal dos animais submetidos ao abrasamento induzido por nicotina e tratados com N-acetilcisteína.

**Figura 10-** Concentrações de GSH no hipocampo dos animais submetido ao abrasamento induzido por nicotina e tratados com N-acetilcisteína.

**Figura 11-** Concentrações de GSH no corpo estriado dos animais submetidos ao abrasamento induzido por nicotina e tratados com N-acetilcisteína.

**Figura 12-** Atividade da SOD no córtex pré-frontal dos animais submetidos ao abrasamento induzido por nicotina e tratados com N-acetilcisteína.

**Figura 13-** Atividade da SOD no hipocampo dos animais submetidos ao abrasamento induzido por nicotina e tratados com N-acetilcisteína.

**Figura 14-** Atividade da SOD no corpo estriado dos animais submetidos ao abrasamento induzido por nicotina e tratados com N-acetilcisteína.

**Figura 15-** Concentrações de MDA no córtex pré-frontal dos animais submetidos ao abrasamento por nicotina e tratados com N-acetilcisteína.

**Figura 16-** Concentrações de MDA no hipocampo dos animais submetidos ao abrasamento por nicotina e tratados com N-acetilcisteína.

**Figura 17-** Concentrações de MDA no corpo estriado dos animais submetidos ao abrasamento por nicotina e tratados com N-acetilcisteína.

**Figura 18-** Concentrações de Nitrito no córtex pré-frontal dos animais submetidos ao abrasamento por nicotina e tratados com N-acetilcisteína.

**Figura 19-** Concentrações de Nitrito no hipocampo dos animais submetidos ao abrasamento por nicotina e tratados com N-acetilcisteína.

**Figura 20-** Concentrações de Nitrito no corpo estriado dos animais submetidos ao abrasamento por nicotina e tratados com N-acetilcisteína.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1-** Taxas de Prevalência de transtornos psiquiátricos em pacientes com epilepsia e a população em geral

**Tabela 2-** Distribuição de animais em números e realização de testes experimentais por grupos controle e teste.

**Tabela 3-** Escala de comportamento para convulsão, segundo Racine 1972

## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

**μL** Microlitro

**μM** Micromolar

**ABC** *Autism behavior checklist*

**ATV** Área tegmentar ventral

**CA** Corno de Ammon

**Ca<sup>2+</sup>** Íon cálcio

**CAT** Catalase

**CEPA** Comitê de ética em pesquisa animais

**CPF** Córtex pré-frontal

**Cu<sup>2+</sup>** Íon cobre

**DNA** Ácido desoxirribonucleico

**DSM-III-R** Manual de diagnóstico e estatístico de transtornos mentais, terceira edição revisada.

**EDTA** Ácido etilenodiamino tetra-acético

**EO** Estresse oxidativo

**EROS** Espécies reativas de oxigênio

**GABA** Ácido gama amino butírico

**GMPC** Monofostato cíclico de guanosina

**GR** Glutaciona redutase

**GSH** Glutaciona reduzida

**GSH-Px** Glutaciona peroxidase

**GSSG** Glutaciona oxidada

**H<sub>2</sub>O** Água

**HO<sub>2</sub><sup>-</sup>** Hidroperoxila

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** Peróxido de hidrogênio

**IBE** *International Bureau for epilepsy*

**IL** Interleucina

**IL 8** Interleucina 8

**ILAE** International League against epilepsy

**iNOS** Óxido nítrico sintase induzida

**i.p** Intraperitoneal

**Kg** Quilograma

**L·** Radical lipídico

**LO·** Radical alcoxila

**LOO·** Radical peroxila

**MCQ** Questionário de craving da maconha

**MDA** Malonildialdeído

**ME** Manifestações epilépticas

**Mg** Miligrama

**Min** Minuto

**mL** Mililitro

**n** Número de animais

**NAC** N-Acetilcisteína

**nACh** Acetilcolina neuronal

**NADPH** Nicotinamina adenina de dinucleotídeo fosfato reduzida

**NBT** Nitrotetrazolio

**NIC** Nicotina

**NMDA** N-metil-D-aspartato

**NO** Óxido nítrico

**NOS** Óxido nítrico sintase

**O<sub>2</sub>** Oxigênio

**O<sub>2</sub><sup>·-</sup>** Radical superóxido

**OH<sup>·</sup>** Hidroxila

**p** Índice de significância

**PG-YBOCS** Escala de Yale Brown Obsessivo compulsivo modificada para jogos patológicos

**pH** Potencial hidrogeniônico

**PTZ** Pentilenotetrazol

**SNC** Sistema nervoso central

**SOD** Superóxido dismutase

**TAB** Transtorno bipolar

**TBARS** Substância reativa ao ácido Tiobarbitúrico

**TDAAH** Transtorno e déficit de atenção e hiperatividade

**UFC** Universidade Federal de Ceará

## SUMÁRIO

<b>1 Introdução</b> .....	<b>17</b>
1.1 Epilepsia.....	17
1.1.1 Incidência de transtornos mentais associados a epilepsia.....	20
1.2 Fisiopatologia da epilepsia.....	21
1.2.1 Epilepsia e estresse oxidativo.....	23
1.3 Modelos de convulsão em animais.....	28
1.3.1 Abrasamento induzido por nicotina.....	28
1.3.2 Influência do gênero e idade no abrasamento induzido por nicotina.....	30
1.4 N-acetilcisteína.....	31
1.4.1 N-Acetilcisteína e psiquiatria.....	32
1.4.2 Uso da N-Acetilcisteína na neuropsiquiatria.....	34
1.5 Justificativa e relevância.....	35
<b>2 Objetivos</b> .....	<b>37</b>
2.1 Objetivo geral.....	37
2.2 Objetivos específicos.....	37
<b>3 Material e métodos</b> .....	<b>38</b>
3.1 Animais.....	38
3.2 Estratégia experimental.....	38
3.3 Tratamento dos animais e esquema de indução do abrasamento.....	41
3.4 Determinação dos níveis de estresse oxidativo.....	42
3.4.1 Dosagem dos níveis de nitrito/nitrato.....	42
3.4.2 Dosagem dos níveis de superóxido dismutase.....	42
3.4.3 Determinação da concentração de glutathiona redutase.....	43
3.4.4 Avaliação de peroxidação lipídica.....	43
3.5 Análise estatística.....	44
<b>4 Resultados</b> .....	<b>45</b>
4.1 Análise do comportamento de convulsão segundo Racine.....	45
4.2 Determinação da atividade de GSH.....	48
4.3 Determinação da atividade da SOD.....	52
4.4 Determinação dos níveis de TBARS.....	56
4.5 Determinação dos níveis de NO.....	60
<b>5 Discussão</b> .....	<b>64</b>
<b>6 Conclusão</b> .....	<b>70</b>
Referências.....	71



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Epilepsia

O relato mais antigo que se tem da epilepsia está registrado no capítulo de um livro-texto babilônico de medicina que resume 40 manuscritos, datados de 2.000 anos antes de Cristo. O livro detalha as diversas manifestações epilépticas e as relaciona a invocações espirituais malignas (Gastaut, 1973).

Por muitos anos a epilepsia seguiu sendo vista como invocação de espíritos malignos, e só por volta de 175 anos depois de Cristo, Galeno conseguiu identificar a epilepsia como sendo uma doença relacionada ao cérebro, e a classificou como sendo de causa desconhecida ou decorrente de outra doença, porém a ideia de sobrenatural ainda era vinculada a doença e por esse motivo, os indivíduos acometidos foram constantemente perseguidos durante a Idade Média (Dreiffus, 1996).

Com o aumento do interesse por parte dos pesquisadores pelas doenças neurológicas, no século XIX, a epilepsia passou a ser vista como insanidade e ao passo que a doença desvinculava-se da espiritualidade, ganhava o perfil de loucura que também, era renegada socialmente (Trimble, M.R., 1991).

Durante toda história a epilepsia foi perseguida pelas leis eugênicas. Até 1970, nos Estados Unidos, foi proibido o casamento entre pessoas que tinham a doença e até 1956, em dezoito estados, era imputada a lei de esterilização a essas pessoas (Kale, 1997).

A OMS em parceria com *International League Against Epilepsy* (ILAE) e com o *International Bureau for Epilepsy* (IBE), lançou em 1997, uma campanha global intitulada “retirar a epilepsia das sombras” com intuito de diminuir a marginalização da doença (Out of the Shadows, 2001).

Atualmente a epilepsia é caracterizada como uma desordem cerebral relacionada a manifestações epilépticas (ME) crônicas e repetidas,

cl clinicamente diversificadas e resultantes de atividade neuronal excessiva, anormal e hipersincrônica. (Fuchs et al., 2004; Engel JR,2001).

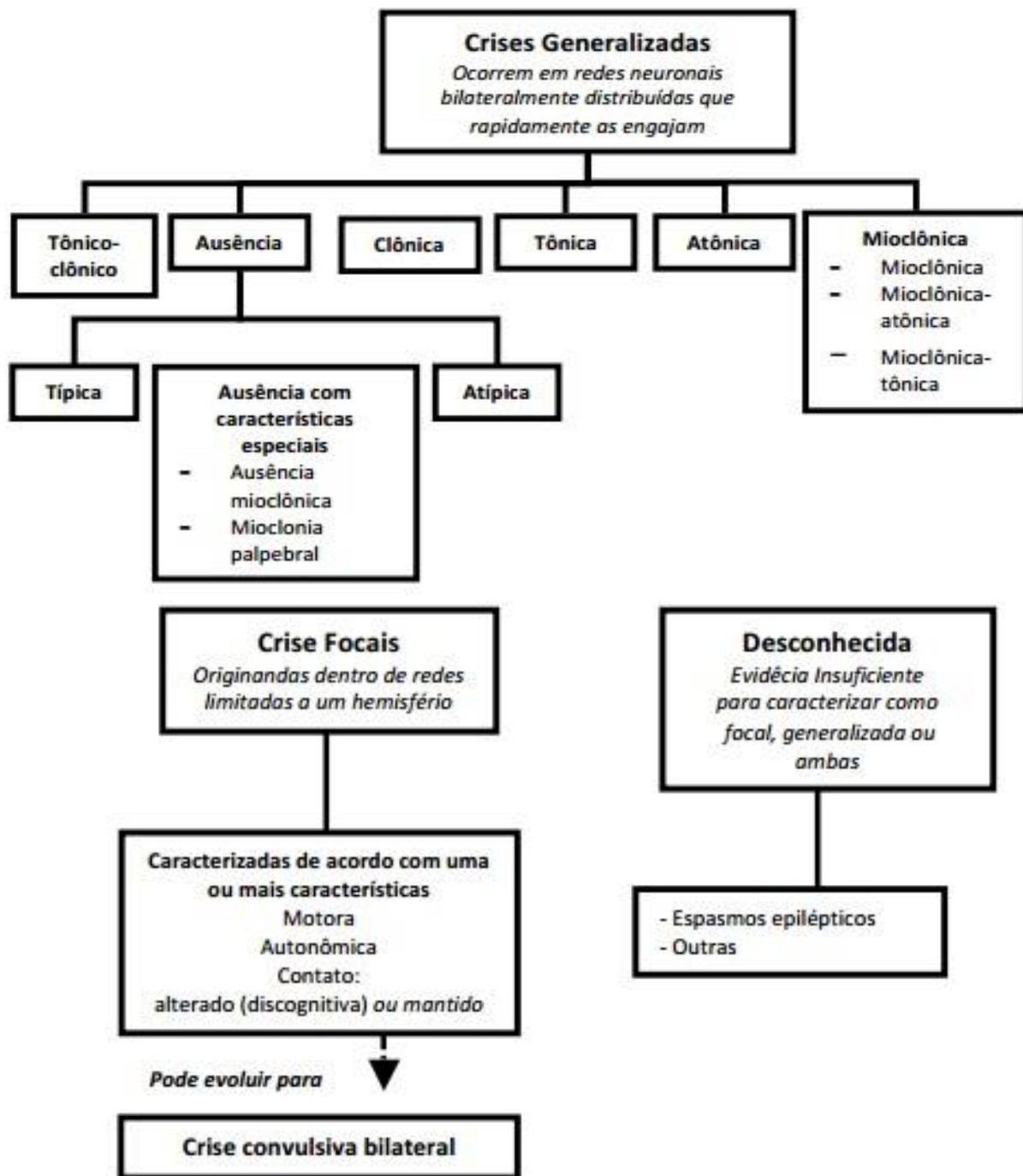
É um dos distúrbios neurológicos mais comuns e tem uma prevalência mundial de 10 a 15/1.000 pessoas, podendo chegar à frequência de até 50 casos novos/ 100.000 pessoas em países de desenvolvimento não equilibrado (Sander, 2003; De Lorenzo et al, 2001).

As ME podem ocorrer em qualquer faixa etária, porém têm maior prevalência entre nos primeiros anos de vida (Sindenvall et al, 1993; Guerreiro et al, 2000). Na infância e adolescência a incidência tem flutuante predominância de gênero determinada por tipos de manifestações epiléticas e pela exposição ambiental (Cowan, 2002).

A Liga Internacional de epilepsia (ILAE, 2011), se baseia em dados encefalográficos e características clínicas que permitem a classificação das epilepsias em três grandes grupos: focal, generalizada e desconhecida (ILAE, 2011) (Figura 1).

A epilepsia focal origina-se dentro de uma rede que afeta apenas um hemisfério cerebral. Tal classificação é baseada em característica motora e/ou autonômica, podendo ainda, evoluir para uma epilepsia bilateral; A classificação de epilepsia generalizada é caracterizada por ocorrência de crises em redes neuronais bilateralmente distribuídas que rapidamente se engajam, podem ser sub-divididas em tônico, tônico-clônica, clônica, atônita, mioclônica (mioclônica, mioclônica-tônica ou mioclônica- atônita) ou de ausência que podem ser sub-classificadas em típica, atípica ou ausência com características especiais. Uma epilepsia é classificada como desconhecida, quando suas características clínicas não se enquadram em nenhuma das descritas anteriormente ( ILAE, 2011).

Figura 1- Diagrama resumo da Revisão terminológica para organização de crises e epilepsias.



### 1.1.1 Incidência de transtornos mentais associados à epilepsia

Estima-se que exista relação de presença de transtornos mentais associados à epilepsia em 30 a 70% dos casos e de comorbidades psiquiátricas e transtornos comportamentais englobam cerca de 40 a 50% das crianças que são acometidas pela epilepsia. (Nowack, 2006; Maia et al, 2006).

Estudos epidemiológicos em hospitais psiquiátricos, clínicas de epilepsia e comunidades mostram que existe uma prevalência de transtornos mentais em grupo de pessoas com epilepsia quando comparados à população não epiléptica (Pond & Bidwell, 1959; Gudmundsson, 1966; Rutter *et al*, 1970; Edeh, 1984).

Dos acometidos com crises parciais complexas 70% podem ter um ou mais diagnósticos presente no Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais, Terceira Edição Revisada (DSM-III-R). A depressão é o transtorno associado mais frequente e pode estar presente em 58% dos casos, além disto, 32% poderão desenvolver transtornos de ansiedade e 13% psicoses (Algreeshah, 2007) (Tabela 1) .

Algumas comorbidades são comuns a adultos e crianças, como a depressão e ansiedade, porém, outras são características dos primeiros anos de vida como o transtorno e déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) e autismo (Maia, 2006).

Tabela 1- Taxas de Prevalência de transtornos psiquiátricos em pacientes com epilepsia e a população em geral

<b>Transtorno Psiquiátrico</b>	<b>Controles (%)</b>	<b>Pacientes com epilepsia (%)</b>
<b>Transtorno depressivo maior</b>	10,7	17,4
<b>Transtorno de ansiedade</b>	11,2	22,8
<b>Transtorno de humor/ansiedade</b>	19,6	34,2
<b>Ideação suicida</b>	13,3	25
<b>Outros</b>	20,7	35

Algreeshah, 2007.

A população pediátrica tem um índice de 3 a 7% de acometidos pelo TDAH, porém em pacientes epiléticos o índice sobe para 20 a 40 %. Já o autismo em crianças com epilepsia pode variar de 8 a 42% dos casos. (Hermann et al, 2007; Canitano et al, 2005).

## 1.2 Fisiopatologia da epilepsia

Sabe-se que as ME estão ligadas à neurotransmissão do sistema nervoso central (SNC), através do aumento da excitabilidade neuronal e diminuição da inibição de tal excitabilidade ( Meldrum, 1984).

A lesão neuropatológica mais comumente encontrada nas ME é a esclerose hipocampal, ( Leite e Cavalheiro, 1998)

Fisiologicamente, a região hipocampal é constituída por quatro sub-regiões distintas: Giro denteado (fáscia dentada), o subiculum, o córtex entorrinal e o hipocampo (corno Amon) que por sua vez é dividido em quatro áreas: CA1, CA2, CA3 e CA4. A abreviação CA deriva do latim “*cornu ammonis*” que significa corno de carneiro que por semelhança, foi comparada à região do hipocampo. (Andersen et al.,2007) (figura 1)

Figura 1: Imagem digitalizada da secção transversal de um encéfalo de rato corado com Nissl. Ao centro – Desenho esquemático da imagem mostrando a localização das diferentes áreas do corno de Ammon.

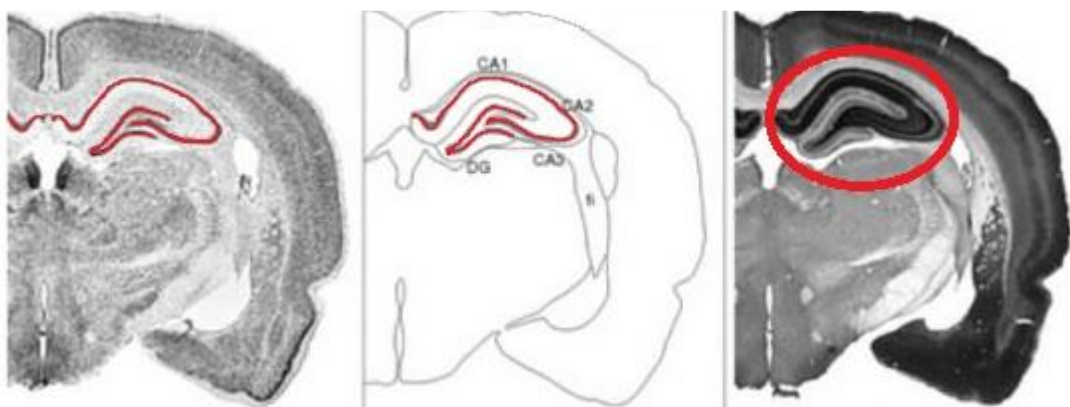


Figura adaptada de Andersen et al. (2007)

Células piramidais do hipocampo emitem prolongamentos dos axônios para fora do hipocampo, e colaterais de Schaffer para área de CA1, estas fazem sinapses com outras células piramidais, as quais têm os axônios projetados para fora do hipocampo (Lent, 2001).

A região do giro denteado tem importante liberação de glutamato e ácido gama-amino-butírico (GABA) pelos axônios das células granulares, as fibras musgosas, que por sua vez, fazem sinapses com os neurônios piramidais das áreas CA3 e CA4 do hipocampo, interneurônios e células musgosas do hilo (Gutierrez, 2003).

Quadros de epilepsia podem levar à lesão e até morte celular nessas áreas. As mais susceptíveis são as CA1 e CA3, por outro lado as células da área CA2 são as menos afetadas. Isso se deve ao fato das áreas CA1 e CA3 possuírem grande quantidade de receptores para o glutamato, e possuírem respectivamente, receptores sensíveis ao N-metil-D-aspartato (NMDA) e receptores cainato. Quando ativados, tais receptores podem permitir influxo intracelular de cálcio ( $Ca^{2+}$ ) a níveis nocivos para a célula. (Sloviter, 1987; Dumam e Vaidya, 1998; Margerison e Corsellis, 1966).

Sommer 1880, foi o primeiro a descrever a esclerose do corno de Armon ou esclerose hipocampal que é caracterizada por perda neuronal em CA1, CA3 e hilo do giro denteado com preservação de CA2 e aspecto esclerótico do hipocampo decorrente de epilepsia do lobo temporal mesial.

Apesar da evolução dos estudos relacionados à epilepsia, os mecanismos envolvidos na fisiopatologia seguem sem claros delineamentos e desta forma a epilepsia permanece sem cura. Diante disto os pesquisadores empenham-se em alcançar meios de diminuir as frequências e propagação das ME's. Muitas drogas já foram descobertas com tal finalidade, mas 30% dos pacientes não apresentam boas respostas ou apresentam efeitos adversos severos às drogas disponíveis ( Loscher & Schmidt 2002; Wahab 2010).

### 1.2.1 Epilepsia e Estresse oxidativo

O estresse oxidativo (EO) é resultado de um desequilíbrio entre as defesas antioxidantes e a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) no organismo. Este desequilíbrio tem sido relacionado com a fisiopatologia de uma série de doenças, incluindo transtornos neuropsiquiátricos (Hamai et al., 2006; Jung et al., 2007; Berck et al., 2011; Liu et al., 2012).

O aumento da excitabilidade neuronal e diminuição da inibição de tal excitabilidade, característicos da convulsão, podem levar a injúria e morte celular, resultado da formação excessiva de radicais livres (Meldrum, 1984; Floyd, 1990).

As EROS são encontradas em todos os sistemas biológicos. Fisiologicamente o oxigênio ( $O_2$ ) sofre redução tetravalente com aceitação de quatro elétrons o que resulta na formação de água ( $H_2O$ ). Durante esse processo, metabólitos intermediários, como os radicais superperóxido ( $O_2^\bullet$ ), hidroperoxila ( $HO_2^-$ ), hidroxila ( $OH^\bullet$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) são produzidos. A redução completa do  $O_2$  deve acontecer dentro da mitocôndria, o que neutraliza as EROS (Cohen, 1989).

Em face das reações univalentes da oxidação do  $O_2$  na cadeia transportadora de elétrons, a mitocôndria é considerada a maior formadora de radicais livres (Green *et al*, 2004).

Em condições fisiológicas o corpo dispõe de mecanismos antioxidantes que conseguem neutralizar as EROS, porém em desequilíbrio por uma produção excessiva de EROS, por uma ineficiência do sistema antioxidante ou ainda pela combinação dos dois fatores, caracterizado o EO, um processo fisiopatológico que pode levar a toxicidade celular e até mesmo um dano ou morte da mesma. Esse sistema fisiológico antioxidante é constituído por agentes de ação não enzimática e enzimática (Halliwell, 2007; Barreiros et al, 2006).

O sistema de defesa não enzimático é composto por reagentes exógenos e são, normalmente, obtidos na alimentação. As vitaminas, sais minerais e compostos fenólicos são os mais evidentes, porém dentre os maiores destaques antioxidantes exógenos estão: vitamina C, betacaroteno, precursor da vitamina A e  $\alpha$ -tocoferol, precursor da E. Dentre os sais minerais, ferro, magnésio, cobre e selênio são exemplos de sais minerais ativos no combate as EROs ( Prasad et al, 2007).

O sistema de defesa enzimático inclui as enzimas Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione Peroxidase (GSH-Px). Estas enzimas estão presentes tanto no citoplasma celular como na mitocôndria, local onde há maior produção de EROs. A SOD sofre dismutação e catalisa a formação de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) a partir do radical superóxido ( $O_2^\bullet$ ). As enzimas CAT e glutathione peroxidase (GPS-Px) impedem o acúmulo de  $H_2O_2$  que, apesar de não possuir pares de elétrons livres que caracterizam os radicais livres, tem alta capacidade de provocar danos nas células. (Ferreira, 1997; LAMBETH et al., 2008; Rover et al, 2001).

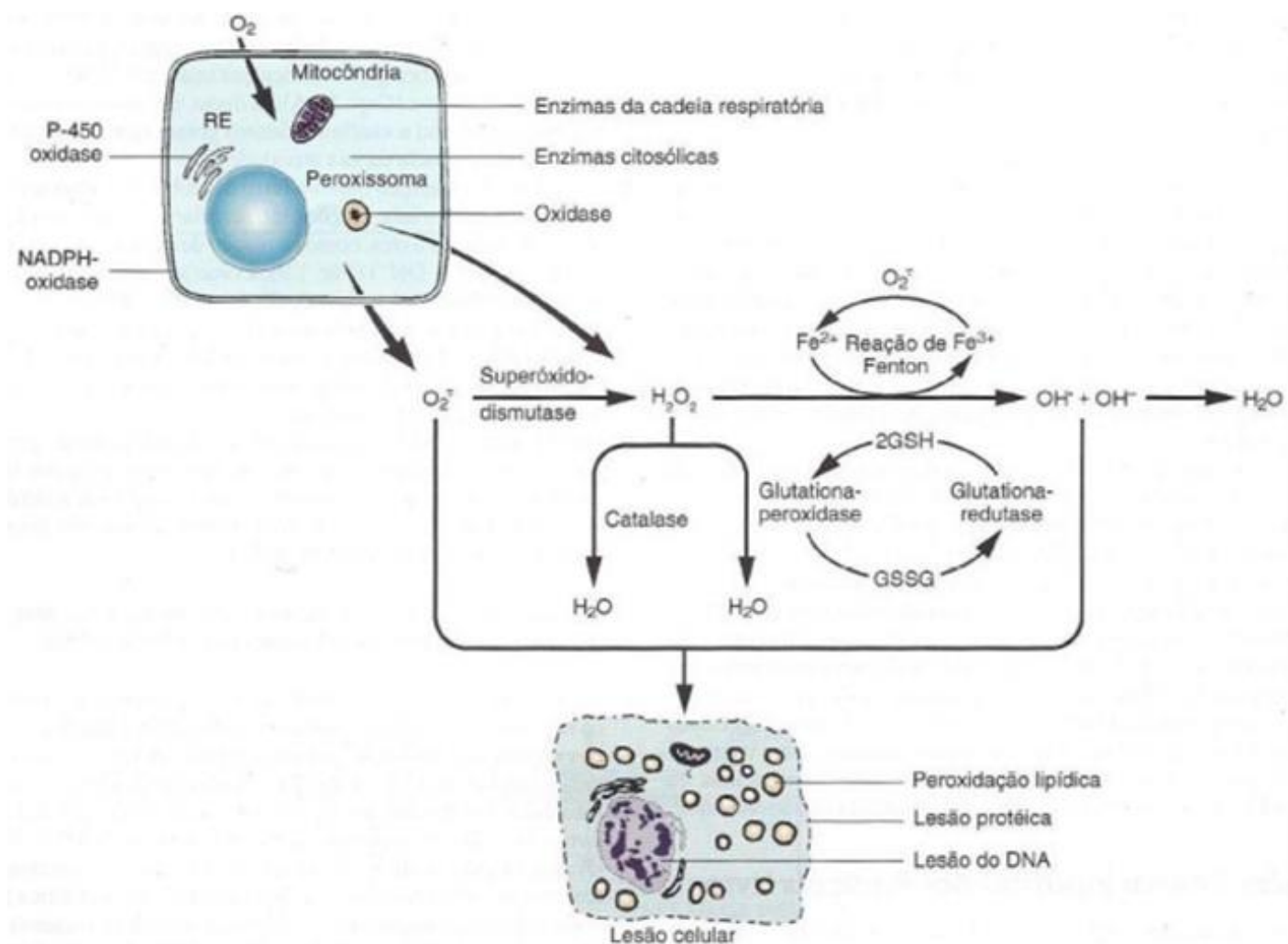
O acúmulo do ( $H_2O_2$ ) por meio das reações de Fentone Haber-Weiss, forma o radical hidroxila ( $OH^\bullet$ ), contra o qual não existe defesa enzimática. A GPS-Px reduz o  $H_2O_2$  à água, mas para isso precisa da conversão da glutathione reduzida (GSH) em oxidada (GSSG), essa última promove ação oxidante em função da ligação dissulfeto existente em sua estrutura. Para completar o ciclo, a enzima Glutathione Redutase (GR) reduz a molécula de GSSG à sua forma reduzida em uma reação de oxidação da molécula de nicotinamida adenina de dinucleótido fosfato (NADPH) (Kulak et al., 2013) (Figura 2)

Assim, fica clara a importância da glutathione redutase (GR), pois ela é responsável pela recuperação da glutathione reduzida (GSH), o que possibilita a manutenção do ciclo redox da glutathione de forma íntegra e, permite assim o equilíbrio entre os sistemas de defesa enzimáticos (Rover et al, 2001).



A GSH está envolvida também na manutenção do estado redox de tiol, o qual modula processos redox-sensíveis, sendo desta maneira indispensável para a regulação do ciclo celular e diferenciação celular, a ativação de receptores, transdução de sinal e a ligação de fatores de transcrição para o DNA (Kulak et al., 2013).

Figura 2- Integração de defesa do sistema enzimático com conversão de  $O_2$  em  $H_2O$  e suas etapas intermediárias.



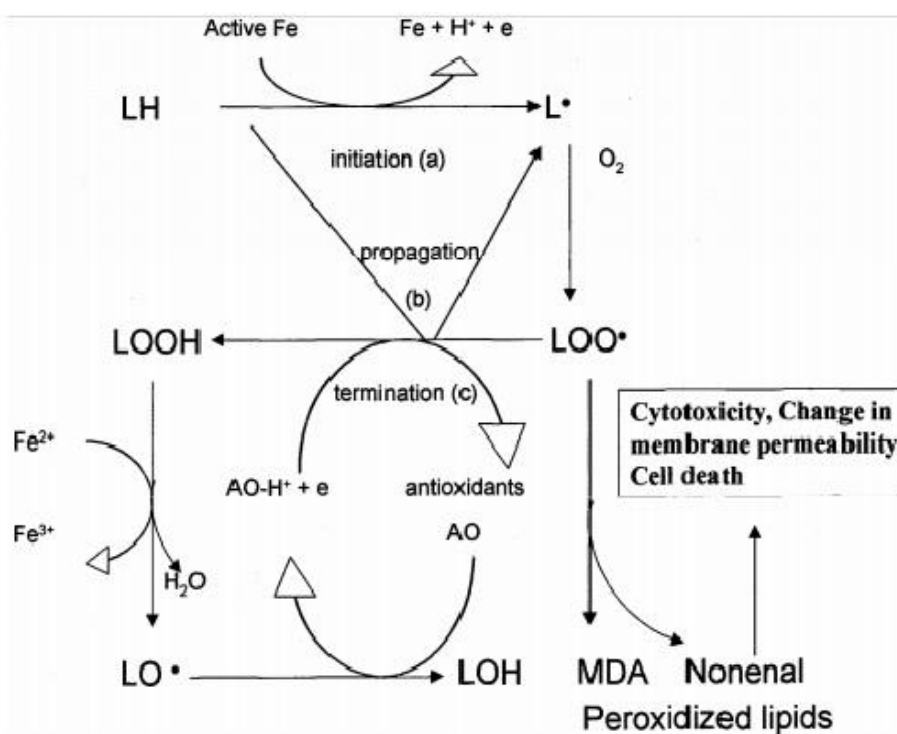
Robbins & Cotran – Bases Patológicas das Doenças, 2010.

Um dos danos causados diretamente pelas EROs é a peroxidação lipídica. Esse processo ocorre quando as EROs reagem com ácidos graxos

polinsaturados presentes nas membranas celulares e lipoproteínas, o que resulta na formação de radicais lipídico ( $L\cdot$ ), alcoxila ( $LO\cdot$ ) e peroxila ( $LOO\cdot$ ), que por sua vez degradam a estrutura lipídica da membrana celular. Em função disto, há perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como enzimas hidrolíticas dos lisossomos, e formação de produtos citotóxicos, podendo resultar em morte celular (Hershko, 1989; Lima & Abdala, 2001) (Figura 3).

A partir da peroxidação lipídica são formados produtos secundários como alcanos, aldeídos e isoprostanos. Estes produtos são usados como marcadores biológicos, desempenhando desta maneira, a função de indicadores de EO e dano celular. O Malonildialdeído (MDA) é um dos marcadores biológicos mais utilizados. Sua sensibilidade ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) permite sua identificação através da formação de coloração rosa (DEVASAGAYAM et al, 2003).

Figura 3- Mecanismos envolvidos na indução da peroxidação lipídica. Formação de MDA a partir do radical peroxila.



Devasagayam et al., 2003

Todos os tecidos corporais estão suscetíveis aos danos causados pelas EROs, porém o sistema nervoso central (SNC), devido ao seu grande consumo de  $O_2$  e ainda sua baixa propriedade antioxidante, apresenta maior vulnerabilidade em desenvolver o EO (Olmez & ozyurt, 2012; Khairova et al., 2012).

O cérebro é um órgão abundante em ácidos graxos polinsaturados, que agem como substrato para a formação de peróxidos lipídicos. Ele contém grande quantidade de ferro livre que é formador do radical OH e, além disso, é formado basicamente por células estáveis onde a maturidade é estabilizada por volta de 30 anos de idade. Estas características tornam este órgão extremamente vulnerável ao desenvolvimento de injúrias, principalmente as relacionadas ao EO (Halliwell e Gutteridge, 1989).

Um número considerável de estudos relaciona o desenvolvimento do EO e possíveis danos celulares cerebrais a crises convulsivas recorrentes (Eracovik, 2001; Liang et al, 2000; Kaneko et al 2002). Em modelos de convulsão em animais, mostrou-se que o EO foi participativo no processo de degradação e morte neuronal e glial (Arnaiz et al, 1998).

Em estudo com modelo de convulsão quimicamente induzida por pentilenotetrazol (PTZ) foi relacionado o aumento dos níveis de peroxidação lipídica, através de marcação TBARS, com os efeitos convulsivantes e neurotóxicos induzidos pelo químico ( Bashkatova et al, 2003).

Em estudo recente, Gomes et al mostrou que convulsões quimicamente induzidas por nicotina, afetam com maior intensidade fêmeas periadolescentes. Nestes animais ficou comprovada a diminuição dos níveis de GSH e SOD o que remete ao desequilíbrio fisiológico e caracteriza o EO.

### **1.3 Modelo para o Estudo do desenvolvimento de convulsões e transtornos neuropsiquiátricos: abrasamento**

O abrasamento ou kindling trata-se de repetidos estímulos excitatórios elétricos de baixa intensidade que são aplicados em estruturas cerebrais, resultando em alterações comportamentais que podem ser detectadas eletrograficamente ( MCINTYGRE et al, 2001; MORINATO et al, 2004).

A progressão comportamental do abrasamento mostra que inicialmente o processo de sensibilização afeta apenas alguns circuitos elétricos e posteriormente circuitos adicionais são somados, correlacionando-se com comportamentos progressivos de crises epiléticas (BERTRAN, 2007).

O mecanismo deste fenômeno tem sido relacionado a mudanças de vias de sinalização, funções de neurotransmissores, expressões de canais de íons e morfologia neuronal. Tem sido evidenciado também aumento de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) no hipocampo, hipotálamo, neocórtex e corpo estriado o que tem causado hiperexcitabilidade em cortes hipocampais (SATO et al, 1996), além disso o processo de sensibilização tem mostrado aumento progressivo da densidade de receptor GABA<sub>A</sub> e *upregulation* do receptor nas áreas de CA1 e CA3, seguida de *downregulation* aguda ( LIU et al, 2009).

#### **1.3.1 Abrasamento induzido por nicotina**

A nicotina atuando em receptores nicotínicos neuronais da acetilcolina (nACh) é o principal componente da fumaça do tabaco relacionada à adição (Dani, 2001; Itier & Bertrand, 2001; De Biasi, 2002).

A proporção de pessoas que já fumaram cigarro na vida no Brasil é de 41,1 %, sendo que as classes de nível socioeconômico mais baixo fumam mais. Cerca de 90% dos fumantes ficam dependentes da nicotina entre os 5 e os 19 anos de idade (atualmente temos aproximadamente 2,8 milhões de

fumantes nessa faixa etária), mas a grande concentração de fumantes está na faixa etária, entre 20 a 49 anos de idade (Carlini et al., 2002).

Em baixas doses a nicotina afeta a atenção, o aprendizado, a memória, a ansiedade, as respostas cardiovasculares, a termorregulação e a nocicepção. Em altas doses produz comportamentos mais drásticos, incluindo eventualmente a indução de convulsões tônico-clônicas em roedores (Benowitz, 1999; Salas et al., 2003). Estudos mostram que a nicotina como droga de abuso causa ativação da área tegmental ventral (ATV), uma região mesencefálica envolvida na mediação de ações de recompensa de muitas drogas de abuso. Estudos com microdiálise mostram que a administração sistêmica ou local de nicotina produz aumentos dose-dependentes nos níveis de dopamina no núcleo accumbens (NAC) de animais (Sidhpura et al., 2007) e no corpo estriado de humanos fumantes (Montgomery et al., 2007).

A administração da nicotina *in vivo* e em culturas celulares desencadeia o aumento da expressão de numerosos genes relacionados com a neurosecreção incluindo as enzimas biossintetizadoras de catecolaminas. Também foi recentemente evidenciada uma modulação pela nicotina do sistema de transporte de elétrons mitocondrial em várias regiões cerebrais deixando claro, que mitocôndrias estão envolvidas com a adaptação neuronal à exposição crônica de nicotina (Wang et al., 2009).

A mitocôndria é de particular interesse porque é responsável pela geração da maior parte da energia usada pelo organismo e é o principal local de produção de espécies reativas do oxigênio (EROS) na célula. Além disso, a mitocôndria tem um importante papel em muitos processos fisiológicos tais como apoptose e proliferação, sendo estas alterações mitocondriais associadas a doenças neurodegenerativas como Parkinson. Trabalhos mostram que os efeitos benéficos da nicotina no Parkinson seriam baseados na preservação da função mitocondrial no SNC com redução da síntese do radical superóxido, por exemplo (Cormier et al., 2003).

Foi sugerido que a modulação sináptica mediada por receptores nicotínicos no SNC poderia envolver a ativação da enzima sintetizadora de óxido nítrico (NOS), e que a estimulação nicotínica poderia disparar a síntese

de NO em hipocampo de ratos (NO E GMPC), visto que o NO apresenta um papel importante na neurobiologia da adição.

### **1.3.2 Influência do gênero e idade no abasamento induzido por nicotina**

O estudo de animais adolescentes tem como base que grande parte dos usuários de drogas são adolescentes (Samhsa, 2003), e de fato, a exposição cada vez mais cedo às drogas de abuso pode ser um forte preditor do uso prolongado e dependência (Johanson & Fischman, 1989; Kandel & Davies, 1992).

Como a adolescência em primatas humanos e não-humanos se estende por vários anos, modelos deste estágio desenvolvimental em roedores, chamada periadolescência se limita a 2 semanas entre aproximadamente 35 e 50 dias após o nascimento (Spear & Brake, 1983; Spear, 2000). Várias características são comuns entre roedores e primatas periadolescentes. Exemplos incluem uma grande quantidade de tempo gasto com interações sociais (Brown, 1990; Panskepp, 1981), alto nível de riscos, sensação de procura pelo novo (Adriani et al, 1998, 2004; Zuckerman, 1992) e hiperatividade e hiperexploração de ambientes novos (Bronstein, 1972, 1979; Caza & Spear, 1980).

Apesar da alta prevalência do uso de tabaco entre adolescentes, a neurobiologia da adição por nicotina tem sido estudada principalmente em animais adultos. Embora poucos estudos tenham sido feitos para evidenciar os efeitos da nicotina em modelos animais na adolescência, existem evidências de que animais adolescentes e adultos respondem de maneira diferente à nicotina. Por exemplo, ratos adolescentes, quando comparados a adultos foram mais suscetíveis às ações da nicotina na atividade locomotora (Faraday et al., 2001; Collins & Izenwasser 2004; Cruz et al., 2005).

Em estudo recente, Gomes e colaboradores demonstraram que animais submetidos ao uso crônico de nicotina apresentaram níveis de SOD e GSH diminuídos e NO e MDA aumentados no córtex pré-frontal, quando comparados aos animais controle. No hipocampo dos animais submetidos ao

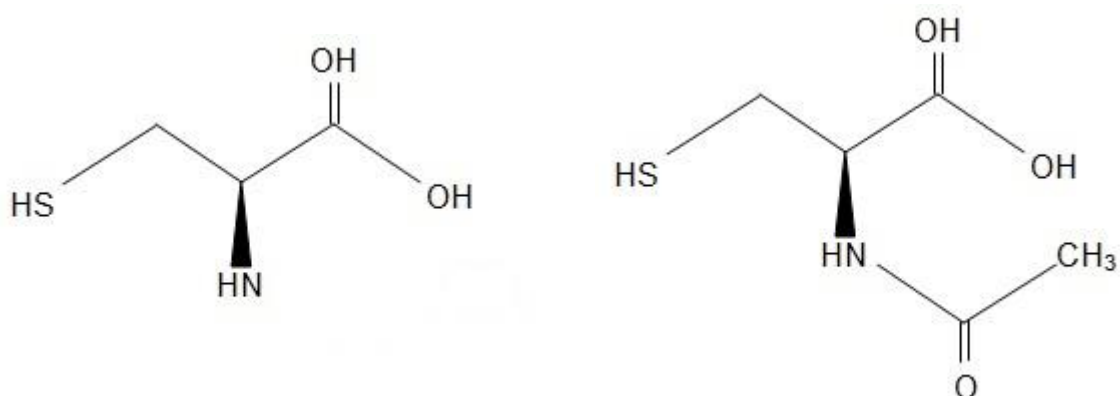
uso crônico da nicotina os níveis de NO e GSH apresentaram-se diminuídos, por sua vez os níveis de MDA encontraram-se aumentados, quando comparados aos de animais controle. O estudo mostrou ainda, que fêmeas periadolescentes são mais vulneráveis ao EO, pois apresentaram uma queda mais significativa nos níveis de SOD e GSH e aumento nos níveis de NO e peroxidação lipídica quando comparados aos grupos de animais machos periadolescentes e adultos e ainda fêmeas e adultas.

#### 1.4N- acetilcisteína

N-Acetilcisteína (NAC) é um fármaco utilizado como agente mucolítico, principalmente no tratamento de doenças broncopulmonares crônicas e como antídoto para superdosagem de paracetamol.

A NAC é forma acetilada da L-cisteína, um aminoácido não essencial antioxidante presente em animais. Possui um grupamento tiol livre derivado da cisteína, que é o responsável por romper as ligações dissulfeto das mucoproteínas, o que confere a NAC expressiva atuação mucolítica (Sheffner, 1963; Zimet, 1988; P.R Vade mécum, 2005) ( Figura 4).

Figura 4- Estrutura molecular da cisteína a esquerda e da molécula L-isômera, N-acetilcisteína a direita



Lehinger, 2005.

Quimicamente, NAC e cisteína são similares, porém em meio acetil a reatividade do grupamento tiol da NAC é mais reduzida que o da cisteína, o que torna essa molécula menos tóxica, menos suscetível a dimerização e oxidação e apresenta melhor solubilidade em água. Além disso, diferente da NAC, a cisteína tem um fator limitante na produção de glutathiona (Burbunder et al, 1989; Holdines, 1991; Bonanomi e Gazzaniga, 1980; Dean et al, 2004). Esse conjunto de características faz da NAC uma excelente fonte de cisteína, ainda mais eficaz do que a própria cisteína por administração parenteral (Bonanomi e Gazzaniga, 1980).

#### **1.4.1 N- Acetilcisteína e o estresse oxidativo**

A NAC é uma pequena molécula que dispõe de fácil acesso a diversos compartimentos celulares, inclusive no cérebro (De Vries N e De Flora S, 1993). No interior da célula, a molécula é facilmente desacetilada e origina a cisteína, precursora na síntese de GSH que por sua vez, é um tripeptídeo presente em todos os tecidos corporais e de grande importância no sistema de defesa celular contra radicais livres. O GSH, desta maneira responde, em parte, pela integridade morfológica celular e manutenção da capacidade funcional (Lehninger *et al.*, 1995).

O combate aos radicais livres se dá por meio do grupo sulfidril proveniente da NAC com os radicais hidroxila e peróxido de hidrogênio das EROS (Aruoma et al, 1989).

As propriedades antioxidantes e antiinflamatórias da NAC são atribuídas ao aumento das sulfidrilas com conseqüente vasodilatação de reposição pelo NO, redução de produção de interleucinas (IL) pró-inflamatórias (particularmente a IL-8), fator de necrose tumoral e reparação dos estoques diminuídos de GSH que são característicos do EO (Paterson et al, 2003) .

Além da sua atuação como antioxidante agindo principalmente na regulação dos níveis de GSH, a NAC tem mostrado efeitos antiinflamatórios e ainda, efeitos diretos sobre o sistema de transmissão glutamatérgica e dopaminérgica. Essas propriedades são atrativas para o desenvolvimento de

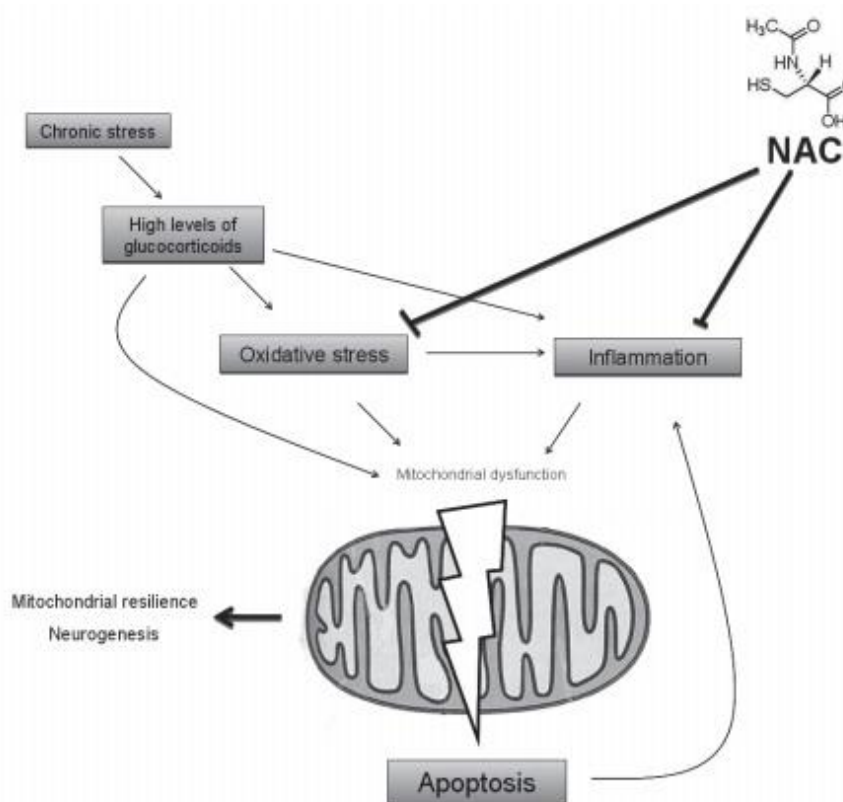


estudos que envolvem transtornos e doenças psiquiátricas (Dean et al, 2009; Kapczinski et al, 2011) (Figura 5).

Em estudo que investigou o efeito protetor da NAC em transplante renal, foi mostrado que a NAC foi capaz de reduzir os níveis de estresse oxidativo no pós-operatório em até sete dias após transplante quando comparado ao grupo controle (Danilovic, 2009).

Em um estudo que visou investigar o efeito antioxidante da NAC em ratos com cirrose, foi demonstrado que a droga foi capaz de reduzir os níveis de peroxidação lipídica, expressão de óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e regenerar os níveis de glutathiona (Pereira Filho et al, 2008).

**Figura 5-** Representação da atividade antiinflamatória e antioxidante da NAC. Na figura NAC aumenta a resiliência mitocondrial e neurogênese e minimiza os danos causados pelo estresse oxidativo que podem levar a apoptose e disfunção mitocondrial



Fries & Kapczinski, 2011.

#### 1.4.2 Usos da N-acetilcisteína na neuropsiquiatria

Devido à sua capacidade de reestabelecer os níveis de GSH no cérebro e com isso sua notória propriedade antioxidante e facilidade de alcançar os mais diversos tecidos corporais, a NAC tem sido amplamente estudada em distúrbios e patologias neurológicas (Dean, 2009).

Em um ensaio clínico randomizado comparando NAC adjuvante com placebo para episódios depressivos no transtorno bipolar (TAB) durante 24 semanas, mostrou-se que a NAC foi eficaz no quadro de depressão em oito de dez participantes. Os dados pré-clínicos também sugerem efeitos antimaníacos e antidepressivos de compostos antioxidantes (Magalhães et al, 2011; MACÊDO et al., 2012; MANOSSO et al., 2013).

Hardan e colaboradores mostraram em um estudo randomizado duplo cego que um grupo de crianças autistas submetidas ao uso da NAC por quatro semanas apresentaram melhora no questionário *Autism Behavior Checklist* (ABC) ao final do tratamento quando comparados ao grupo placebo. A explicação para a melhora da irritabilidade das crianças inclina-se para as propriedades antioxidantes e ainda, para a capacidade que a NAC tem de regular os níveis de glutamato.

Estudos relacionando a NAC com a dependência química à cocaína tem tornado o fármaco cada vez mais promissor. Em estudo duplo cego controlado por placebo, foi mostrado que treze indivíduos desinteressados por tratamento para a dependência, tiveram uma diminuição do craving e dos sintomas de abstinência (LaRowe et al., 2006).

Em um estudo piloto, 23 indivíduos que buscavam tratamento para a dependência foram expostos a três diferentes doses de NAC (1200, 2400 e 3600 mg/d). Todos tiveram bons resultados, com consequente diminuição do consumo de cocaína e ainda, maiores números de adesões ao tratamento nas doses mais altas, sem nenhuma tolerância às doses de NAC administradas (Mardikian et al., 2007).

Gray e colaboradores investigaram a relação entre a dependência causada pelo uso da maconha e a possível minimização dos mesmos através do tratamento com a NAC. Em estudo aberto, 24 indivíduos dependentes da maconha, durante quatro semanas fizeram tratamento com duas doses de NAC (1200mg) diárias. Ao fim das quatro semanas, houve significativa diminuição do comportamento de fissura, constatada através da diminuição dos escores do Questionário de “craving” da maconha (MCQ).

Usuários de cocaína apresentam uma diminuição de glutamato no núcleo acumbens o que gera o comportamento de busca pela droga. A NAC tem a capacidade de equilibrar os níveis de glutamato nos meios intra e extracelular diminuindo assim o comportamento pela procura. Foi o que mostrou o tratamento com a NAC em animais de modelo de busca. O fármaco conseguiu reduzir a auto-administração feita pelos ratos (Baker et al, 2003).

Com a mesma lógica da relação de equilíbrio dos níveis de glutamato proporcionados pela NAC, foi realizado um estudo piloto, clínico duplo-cego, com vinte e sete indivíduos com distúrbio de comportamento denominado jogos patológicos. No estudo foi usada a Escala de Yale Brown Obsessivo Compulsivo modificado para Jogo Patológico (PG-YBOCS), que mensurou quadro de melhora geral, sintomatologia depressiva e qualidade de vida. O resultado mostrou que indivíduos que fizeram tratamento com a NAC tiveram uma diminuição dos escores da escala, mostrando uma melhora comportamental do quadro patológico (Grant et al, 2007).

### **1.5 Justificativa e Relevância**

A nicotina é uma droga amplamente utilizada pela sociedade e tem sido usada para indução de modelos de abasamento, onde uma das principais sintomatologias é a convulsão. Estudos anteriores, feitos por nosso grupo de pesquisa, mostraram que as fêmeas em faixa etária periadolescente que correspondem a adolescência no humano, tem maior sensibilidade aos efeitos nocivos desse processo (Gomes et al, 2010).

Em humanos as mulheres também se mostram mais suscetíveis aos efeitos de drogas de abuso e conseqüentemente, são mais dependência química que os homens.

A convulsão tem sido relacionada a várias patologias neurológicas e tem seu estopim relacionado a amplas possibilidades, o que faz sua prevalência ter números consideráveis. Mesmo com todas essas evidências a doença ainda carrega o peso histórico da negligência, preconceito e rejeição social.

Diante da carência de estudos direcionados a prevenção de convulsões, da incidência considerável da doença e ainda da carência de novos fármacos que suprimam a falta de eficácia em torno de 20 a 30% dos fármacos atualmente usuais, o desenvolvimento deste estudo foi de extrema relevância, uma vez que visou contribuir com novos caminhos terapêuticos para um transtorno corriqueiro e que trás ao paciente que o tem grandes limitações sociais.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Estudar o efeito possível protetor da N-acetilcisteína contra o abrasamento induzido por nicotina em ratas adolescentes.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Analisar em animais submetidos ao modelo de abrasamento induzido por nicotina e tratados com N-acetilcisteína os seguintes parâmetros:
  - Alterações comportamentais com base na escala de Racine;
  - Marcadores de estresse oxidativo nas áreas cerebrais do córtex pré-frontal, hipocampo e núcleos da base pela determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD) e da glutatona reduzida (GSH);
  - Verificar os marcadores de peroxidação lipídica nas áreas cerebrais córtex pré-frontal, hipocampo e núcleos da base;
  - Analisar as concentrações de nitrito nas áreas cerebrais do córtex pré-frontal, hipocampo e núcleos da base dos animais.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Animais**

Foram utilizados ratas Wistar fêmeas 35-50 dias após o nascimento período em que são classificados como periadolescentes (Spear,2000). Os animais foram provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (UFC), mantidos a um ciclo claro/escuro de 12 h e ambientados em grupos de 4 animais com livre acesso a comida e água. O peso dos animais foi monitorado diariamente, 60 min antes da administração das drogas para verificar sua saúde e responsividade às drogas. O projeto foi aprovação do Comitê de ética e pesquisa animal (CEPA) da UFC sob o número 86/13 e os experimentos foram conduzidos de acordo com o Guia de Cuidados e Usos de Animais de Laboratório do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos da América.

#### **3.2 Estratégia Experimental**

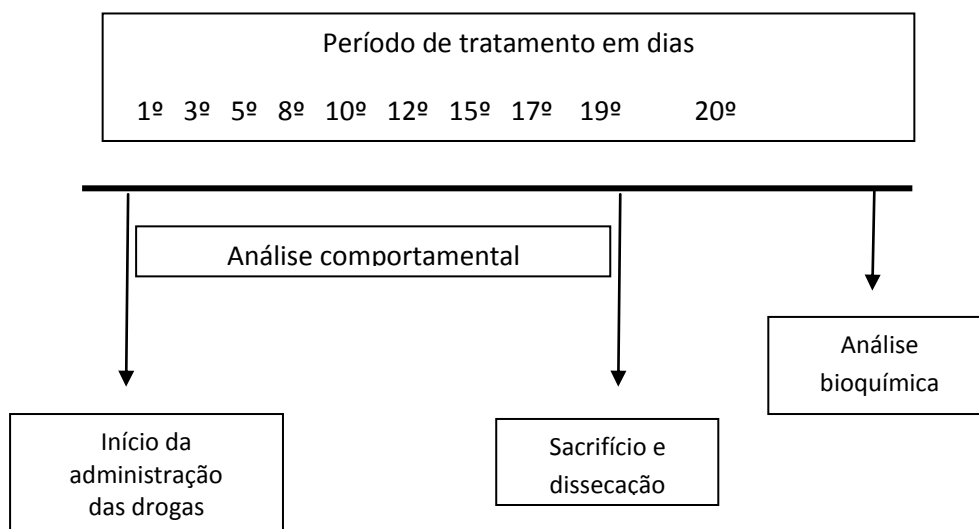
Através do desenvolvimento das metodologias descritas se visou elucidar a eficácia da droga aqui citada, através de análises comportamental e neuroquímicas. A primeira metodologia a ser empregada foi a indução do abasamento em animais adolescentes com concomitantemente uso das drogas a fim de concluir qual o efeito preventivo da mesma.

A aplicação das drogas foi realizada em um período de 19 dias, período justificado pelo estudo de Gomes et al, que mostrou ser um período necessário para que ocorra o abasamento completo pelo uso da nicotina em fêmeas adolescentes. Findado este período, os animais foram sacrificados e dissecados, para que fosse feita a análise bioquímica do córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado.

O abasamento foi induzido por nicotina em doses de 2.0mg/Kg, visto que foi a dose que apresentou melhores resultados para a indução do abasamento no estudo de Gomes et al. Para o protocolo de prevenção do abasamento foi utilizada a NAC como dose potencial em 270 mg/Kg, visto que tal dose no animal corresponde a doses de 2000 mg em humanos ( Pegar

referências). As demais doses foram utilizadas em escalas geométricas (30, 60, 90, 180 mg/Kg) para formulação de curva dose resposta e melhor interpretação de dados obtidos.

**Figura 6-** Delineamento experimental - protocolo de prevenção NAC no abrasamento induzido por nicotina.



Para as doses de 30 e 60mg/kg foram realizado apenas os testes comportamentais, pelo fato de não terem havido resultados significativos os estudos não foram continuados.

Para as doses de 90, 180 e 270mg/kg foram realizados os testes comportamentais e ao fim do período de tratamento os animais foram sacrificados e dissecados sendo as áreas do córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado foram analisadas ( Tabela 2).

Tabela 2- Distribuição de animais em números e realização de testes experimentais por grupos controle e teste.

<b>Drogas e doses administradas por grupos (controles)</b>	<b>Testes realizados e número de animais por grupos</b>
<b>Nac 30 mg/Kg ( dose isolada)</b>	Comportamento (8 animais)
<b>Nac 60 mg/Kg ( dose isolada)</b>	Comportamento (8 animais)
<b>Nac 90 mg/Kg ( dose isolada)</b>	Comportamento e bioquímicos (8 animais)
<b>Nac 180 mg/Kg ( dose isolada)</b>	Comportamento e bioquímicos (8 animais)
<b>Nac 270 mg/Kg ( dose isolada)</b>	Comportamento e bioquímicos (8 animais)
<b>Nicotina</b>	Comportamento e bioquímicos (8 animais)
<b>Água destilada</b>	Comportamento e bioquímicos (8 animais)

<b>Drogas e doses administradas por grupos (testes)</b>	<b>Testes realizados e número de animais por grupos</b>
<b>Nac 30 mg/Kg +NIC</b>	Comportamento (8 animais)
<b>Nac 60 mg/Kg +NIC</b>	Comportamento (8 animais)
<b>Nac 90 mg/Kg +NIC</b>	Comportamento e bioquímicos (8 animais)
<b>Nac 180 mg/Kg +NIC</b>	Comportamento e bioquímicos (8 animais)
<b>Nac 270 mg/Kg +NIC</b>	Comportamento e bioquímicos (8 animais)



### 3.3 Tratamento dos animais e esquema de indução do abasamento

A solução de nicotina foi preparada em cada dia de injeção e foi administrada intraperitonealmente (i.p.: 0,1ml/ 100 g de peso corporal). O abasamento foi induzido de acordo com método previamente descrito (Bastlund et al., 2005). Os animais receberam repetidas injeções de nicotina na forma de base livre ((-)-*Nicotine hemisulfate salt*, Sigma) 2,0 mg/kg, i.p., (dose subconvulsivante) a droga foi administrada todos os dias da semana (segunda-sexta) durante 3 semanas.

Para os animais do grupo teste foi administrada NAC nas concentrações de 90, 180 e 270 mg/kg 30 min antes da administração de nicotina 2mg/kg durante 3 semanas. Os animais do grupo controle positivo receberam injeção de NAC 90, 180 e 270 mg/kg isoladamente. Os do grupo controle negativo receberam apenas nicotina. Os animais controle receberam solução salina pelo mesmo intervalo de tempo

A quantificação das convulsões foi feita por observação visual por um período de 15 min após a administração da NIC. O tempo de observação foi limitado a 15 min, visto que estudos prévios mostraram que para a dose de nicotina usada este tempo é suficiente. A administração das drogas foi sempre feita no mesmo horário e local.

Para determinação da atividade convulsivante os animais foram avaliados pela escala de Racine 1972, modificada por Itzhak e Martin (2000)

**Tabela 3-** Escala de comportamento para convulsão

Estágio	Comportamento
1	Normal
2	Hiperatividade
3	Movimentos verticais repetidos, estereotipado
4	Clonia nas patas dianteiras
5	Ataque motor completo

Racine 1972.

O abasamento completo foi considerado quando o animal apresentava repetidos ataques estágio 5. Após o término do tratamento farmacológico os animais foram eutanasiados e áreas cerebrais (córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado) dissecadas e submetidas às análises descritas abaixo.

### **3.4 Determinação do estresse oxidativo**

#### **3.4.1 Dosagem dos níveis de nitrito (GREEN et al., 1981)**

Para a realização do ensaio foram usados 100 µL do reagente de Greiss e adicionados 100 µL da suspensão mitocondrial isolada das áreas cerebrais ou 100 µL dos padrões nas várias concentrações. Para o branco foram usados 100 µL do reagente de Greiss e adicionados 100 µL de salina. A leitura da absorbância será feita em 560 nm em leitor de placa. As leituras da absorbância dos padrões (y) foram plotadas contra as concentrações de cada padrão (x), para determinação da equação da reta, que foi usada para a determinação da concentração de cada amostra.

#### **3.4.2 Atividade da superóxido dismutase (SOD)**

A quantidade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi avaliada medindo-se sua capacidade de inibir a redução fotoquímica do azul de nitro-tetrazolio (NBT). Nesse método a riboflavina reduzida fotoquimicamente gera  $O_2^-$  o qual reduz o NBT produzindo formazam que absorve no comprimento de onda de 560nm. Na presença de SOD a redução do NBT é inibida. Os resultados foram expressos em unidades da enzima, que é a quantidade de SOD necessária para inibir a taxa de redução do NBT em 50%. A suspensão miocondrial numa câmara escura será misturada em 1mL do meio de reação (tampão fosfato 50mM, EDTA 100nM e L-metionina 13mM pH 7,8) 30 µL da amostra, 150µL do NBT 75µM e 300 µL riboflavina 2µM. Os tubos contendo a solução obtida foram expostos a lâmpadas fluorescentes (15W) por 15minutos. Ao término do tempo o material foi lido em espectrofotômetro 560nm.

### **3.4.3 Determinação dos níveis de Glutathiona Reduzida (GSH)**

Foram retirados 400µL das suspensões mitocondriais e adicionados a 320µL de água destilada e mais 80µL de ácido tricloroacético a 50%. O material foi agitado e centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos. Em seguida foi recolhido 400µL do sobrenadante e acrescidos 800µL de tampão Tris-HCl 0,4M, pH 8,9 e mais 20µl de DTNB 0,01M e após 1 minuto da reação foi feita a leitura da coloração em 412nm através de leitor de placas. A concentração de glutathiona reduzida foi expressa em nanogramas de GSH/g de tecido, tendo por base uma curva padrão.

### **3.4.4 Avaliação da peroxidação lipídica (dosagem de malonildialdeído) (HUANG et al., 1998)**

Após obtenção das suspensões mitocondriais 125 µL de cada foi adicionado a 225 µL de tampão fosfato de potássio monobásico 50 mM, pH 7,4 e a 125 µL de um sistema catalisador contendo sulfato ferroso e ácido ascórbico em um tubo de ensaio. Esta mistura foi incubada a 37 °C por 30 min. Esta reação foi interrompida pela adição de 250 µL de ácido tricloroacético 10 % e em seguida centrifugada a 3000 rpm por 15 min. Após centrifugação o sobrenadante foi separado e acrescido a este 250 µL de ácido tiobarbitúrico 0,8 %. Após agitação essa mistura foi mantida em Banho Maria com água fervente (100 °C) por 15 min e logo em seguida retirada do Banho Maria foi colocada em um banho de gelo para o retorno da reação à temperatura ambiente. A leitura foi feita em leitor de placas com comprimento de onda ajustado para 532 nm. Como padrão, foram utilizadas várias concentrações de MDA (0,627 a 16,77 µmol). Os resultados foram expressos como µmol/mg de proteína.

### 3.5 Análise estatística

A análise dos dados foi realizada através do software GraphPad Prism, versão 5.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média foram analisados através de two-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni para parametros comportamentais. As análises do número de convulsões estágio 5 foram realizadas através de análise de sobrevivência. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média foram analisados através de one-way ANOVA seguido do teste de Tukey para parametros bioquímicos. Os valores foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

### 4.1 A administração de N-acetilcisteína é capaz de atenuar o desenvolvimento de convulsões estágio 5 na Escala de Racine.

A administração diária de NIC durante 19 dias resultou em convulsões de grau cinco na escala de Racine nos animais administrados NIC, portanto em manifestação de abasamento completo. Os resultados estão mostrados nas figuras 7 e 8.

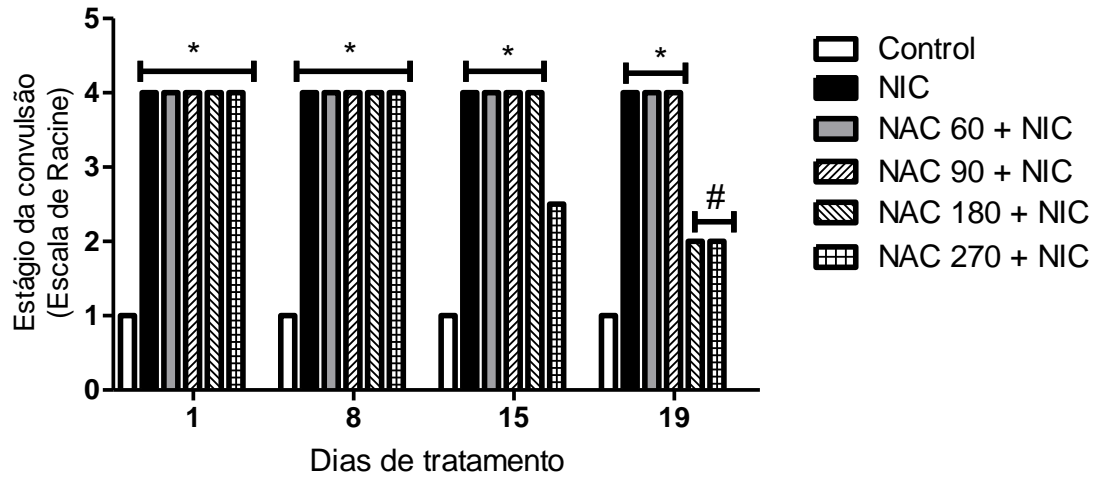
Durante todos os dias de tratamento a mediana para o grupo controle foi grau um na escala de Racine, visto que nenhum animal apresentou convulsão em nenhum dia de tratamento (Figura 7).

Para os grupos NIC, NAC60+NIC e NAC90+NIC; a mediana foi de estágio 4 no decorrer de todo o tratamento. Já os grupos NAC 180+NIC e NAC 270+NIC, apresentaram variações de estágios ao longo do tratamento. O grupo NAC180+NIC apresentou-se com mediana de 4 para o estágio de convulsão no 1º, 8º e 15º dias, porém no 19º dia e último de tratamento, mostrou-se uma queda para o estágio 2.

O grupo NAC 270+NIC, foi o que apresentou resultados mais relevantes, teve mediana de 4 para o estágio de convulsão no 1º e 8º dias, porém no 15º teve uma melhora nos estágios e apresentou uma mediana de 3 e por fim, no último dia de tratamento, 19º a mediana foi de 2 para escala de Racine.

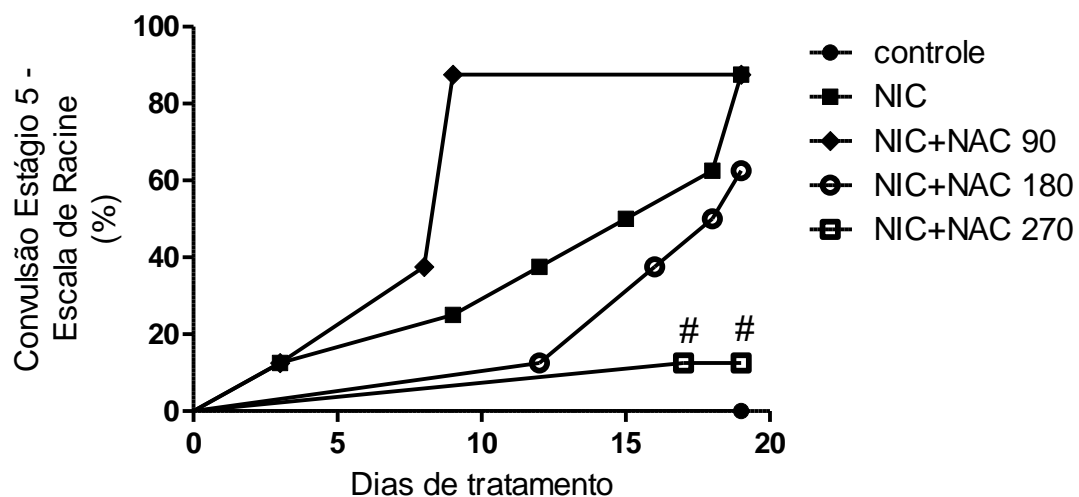
Levando-se em consideração somente o grau cinco na escala de Racine (Figura 8), ao final dos 19 dias de tratamento, dos 8 animais alocados nos grupos NIC e NAC60+NIC um total de cinco animais desenvolveu estágio cinco na Escala de Racine. Na administração de NAC90+NIC sete animais desenvolveram estágio cinco. Quando da administração de NAC180+NIC e NAC270+NIC um total de quatro e um animal, respectivamente, apresentaram estágio cinco (Figura 8).

**Figura 7- Estágios de convulsão baseados na escala de Racine submetidos ao abramamento com nicotina e tratados com N-acetilcisteína.**



As fêmeas periadolescentes foram tratadas com nicotina (NIC) 2 mg/kg, i.p. sozinha ou associada à N-acetilcisteína (NAC) em diferentes doses. O comportamento segundo a escala de Racine foi analisado ao longo de 19 dias. A análise dos resultados foi feita através de ANOVA de duas vias, seguido do teste de Bonferroni. \* $P < 0.05$  vs controle, # $P < 0.05$  vs NIC em relação a cada dia de tratamento, respectivamente.

**Figura 8- Análise do desenvolvimento de convulsões estágio 5 na escala de Racine em animais submetidos ao tratamento com nicotina e N-acetilcisteína**



As linhas indicam o percentual do número de animais que atingiram o estágio 5 de convulsão na escala de Racine (n=8). Os tratamentos foram realizados por 19 dias. A análise dos resultados foi feita através de análise de sobrevivência. Abreviaturas: NIC = nicotina (2,0 mg/kg i.p); NAC +NIC= N-acetilcisteína + nicotina. #P < 0.05 vs NIC.

#### **4.2 O tratamento com N-acetilcisteína é capaz de prevenir as alterações nos níveis de GSH induzidas pelo abasamento por nicotina**

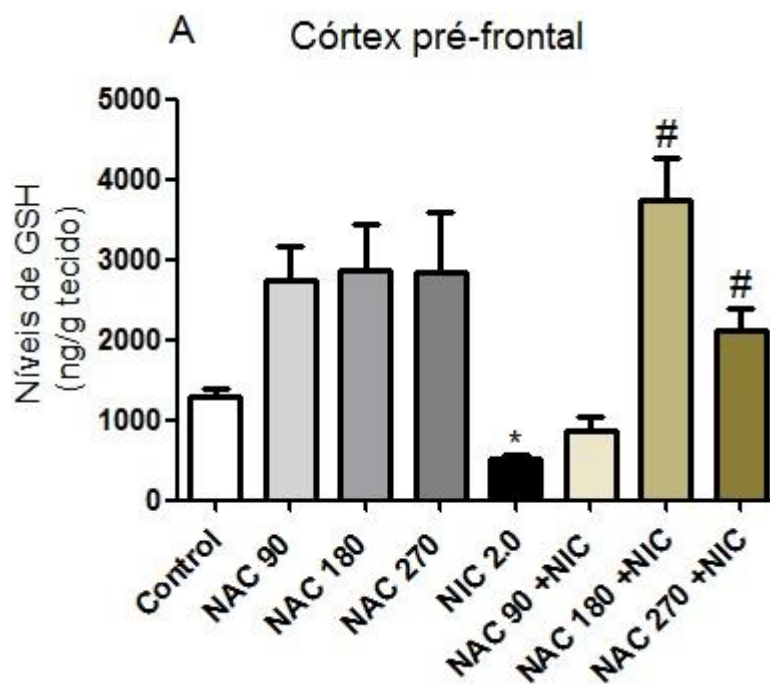
No córtex pré-frontal (figura 9), os níveis de GSH dos animais submetidos somente ao uso da NIC ( $506,8 \pm 53,03$  ng/g de tecido) por 19 dias reduziram significativamente ( $p < 0,0001$ ) quando comparado ao grupo controle ( $1283 \pm 107,9$  ng/g de tecido). A associação com NAC aumentou os níveis de GSH, NAC180+NIC ( $3743 \pm 518,4$  ng/g de tecido) e NAC270+NIC ( $2105 \pm 298,5$  ng/g de tecido), quando comparado aos grupos NIC. A administração de NAC 90+NIC ( $861,1 \pm 182,3$  ng/g de tecido) não preveniu as alterações induzidas por NIC. Os grupos tratados com NAC sozinha (NAC 90 -  $2750 \pm 408,4$ ; NAC 180 -  $2875 \pm 567,6$  e NAC 270 -  $2833 \pm 762,7$  ng/g de tecido) apresentaram aumento não significativo de GSH em relação ao controle.

Analisando o hipocampo (figura 10), pode-se observar uma elevação significativa ( $p < 0,0001$ ) nos níveis de GSH no grupo tratado com NAC 270 ( $2710 \pm 703,0$  ng/g de tecido) sozinha quando comparados o grupo controle ( $776,9 \pm 40,69$  ng/g de tecido). A administração de NIC ( $366,6 \pm 23,13$  ng/g de tecido) por 19 dias causou uma redução significativa dos níveis de GSH em relação ao controle. O tratamento combinado NAC+NIC nas doses de 180 e 270 aumentou significativamente os níveis de GSH quando comparado ao grupo administrado NIC (NAC 180+NIC -  $1745 \pm 283,5$  e NAC 270+NIC -  $1476 \pm 166,8$  ng/g de tecido). A administração de NAC 90 sozinha ( $734,0 \pm 52,19$  ng/g de tecido) e NAC 180 sozinha ( $1326 \pm 179,7$  ng/g de tecido) não causou diferenças significativas quando comparados ao controle.

No corpo estriado (figura 11) houve aumento significativo ( $p < 0,0001$ ) dos níveis de GSH nos grupos submetidos ao tratamento combinado NAC 180 + NIC ( $3470 \pm 268,4$  ng/g de tecido) e NAC 270+ NIC ( $1684 \pm 298,2$  ng/g de tecido) comparando-os ao grupo NIC ( $358,7 \pm 24,66$  ng/g de tecido). A NIC sozinha causou uma redução significativa nos níveis de GSH quando comparado ao controle ( $851,9 \pm 43,95$  ng/g de tecido). NAC 180 e 270 mg/kg sozinha, aumentou significativamente os níveis de GSH quando comparado ao controle (NAC 180 -  $3340 \pm 663,1$ , NAC 270 -  $2157 \pm 231,5$  ng/g de tecido).

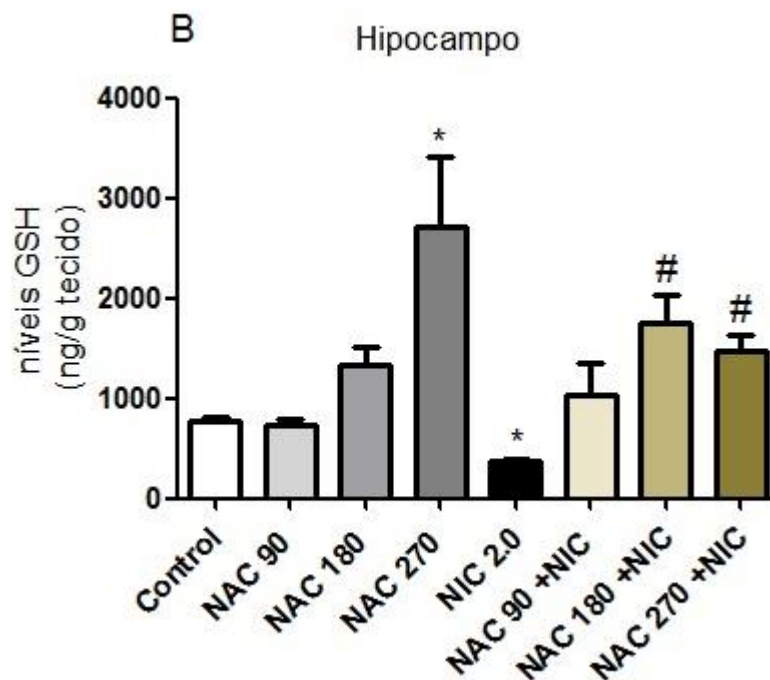


Figura 9- Níveis de GSH no córtex pré-frontal dos animais submetidos ao abasamento induzido por nicotina e tratados com N-acetilcisteína.



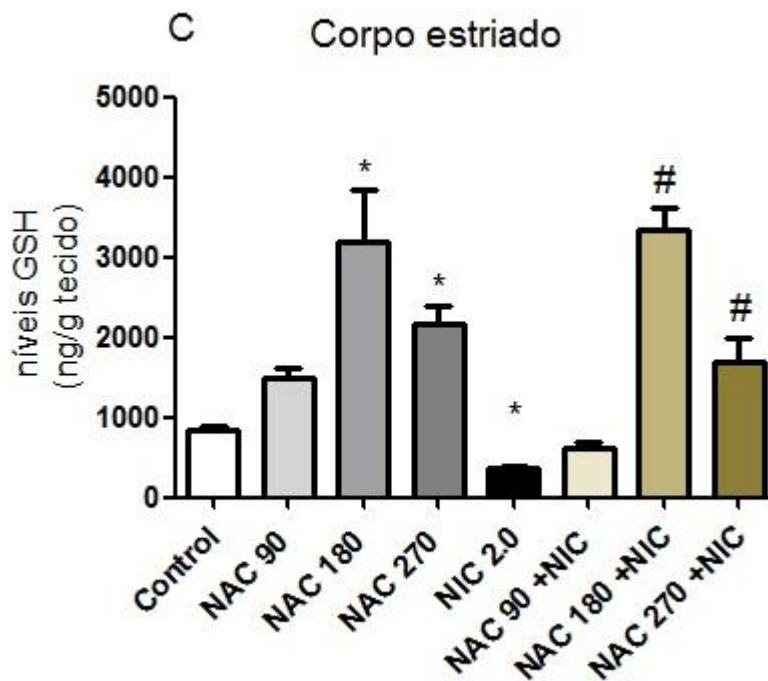
Os animais foram tratados por 19 dias com N-acetilcisteína (NAC) ou nicotina (NIC 2,0 mg/kg i.p) sozinhas ou associadas (NAC + NIC) em três diferentes doses. O grupo controle e recebeu apenas água destilada. As barras representam média  $\pm$  erro de 8 animais por grupo. A análise dos resultados foi feita através de ANOVA de uma via, seguido do teste de Turkey's. \* $p < 0.05$  vs controle, # $p < 0.05$  vs NIC.

**Figura 10- Níveis de GSH no hipocampo dos animais submetidos ao abasamento por nicotina e tratados com N-acetilcisteína.**



Os animais foram tratados por 19 dias com N-acetilcisteína (NAC) ou nicotina (NIC 2,0 mg/kg i.p) sozinhas ou associadas (NAC + NIC) em três diferentes doses. O grupo controle e recebeu apenas água destilada. As barras representam média  $\pm$  erro de 8 animais por grupo. A análise dos resultados foi feita através de ANOVA de uma via, seguido do teste de Turkey's. \* $p < 0.05$  vs controle, # $p < 0.05$  vs NIC.

Figura 11- Níveis de GSH no corpo estriado dos animais submetidos ao abasamento por nicotina e tratados com N-acetilcisteína.



Os animais foram tratados por 19 dias com N-acetilcisteína (NAC) ou nicotina (NIC 2,0 mg/kg i.p) sozinhas ou associadas (NAC + NIC) em três diferentes doses. O grupo controle e recebeu apenas água destilada. As barras representam média  $\pm$  erro de 8 animais por grupo. A análise dos resultados foi feita através de ANOVA de uma via, seguido do teste de Turkey's. \* $p < 0.05$  vs controle, # $p < 0.05$  vs NIC.

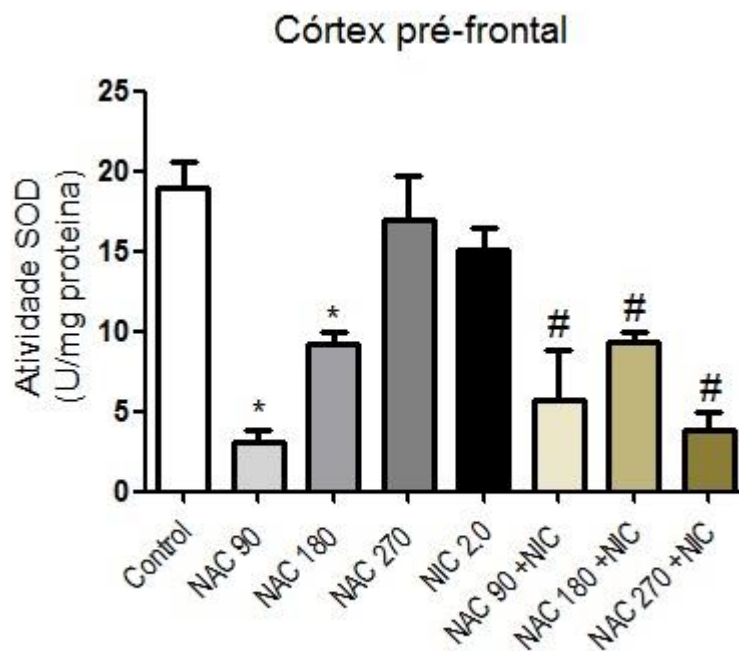
### 4.3 Determinação da atividade da Superóxido dismutase (SOD)

Observou-se que a atividade da SOD no CPF dos animais submetidos ao tratamento isolado com NAC teve uma diminuição significativa (NAC 90 -  $3,139 \pm 0,6698$ ; NAC 180 -  $9,205 \pm 0,6916$  U/mg de proteína) quando comparado ao grupo controle ( $18,90 \pm 1,716$  U/mg de proteína). O tratamento combinado NAC+NIC (NAC 90+NIC -  $5,706 \pm 3,131$ ; NAC 180+ NIC -  $9,271 \pm 0,7418$  e NAC 270+NIC -  $3,777 \pm 1,191$  U/mg de proteína) apresentou redução significativa quando comparados a NIC ( $15,09 \pm 1,375$  U/mg de proteína) (Figura 12 ).

No hipocampo (Figura 13) pode-se observar uma redução estatisticamente significativa ( $p < 0,0001$ ) na atividade da SOD no grupo administrado NAC 90 ( $5,026 \pm 0,5674$  U/mg de proteína), NAC 180 ( $12,61 \pm 1,013$  U/mg de proteína) e NAC 270 ( $15,95 \pm 3,518$  U/mg de proteína) quando comparados ao grupo controle ( $20,59 \pm 1,236$  U/mg de proteína). A associação NAC 90+NIC ( $3,802 \pm 0,7231$  U/mg de proteína), NAC180+NIC ( $3,814 \pm 0,5650$  U/mg de proteína) e NAC 270+NIC ( $8,637 \pm 0,5889$  U/mg de proteína) reduziu a atividade da SOD em relação ao grupo NIC ( $23,54 \pm 1,678$  U/mg de proteína).

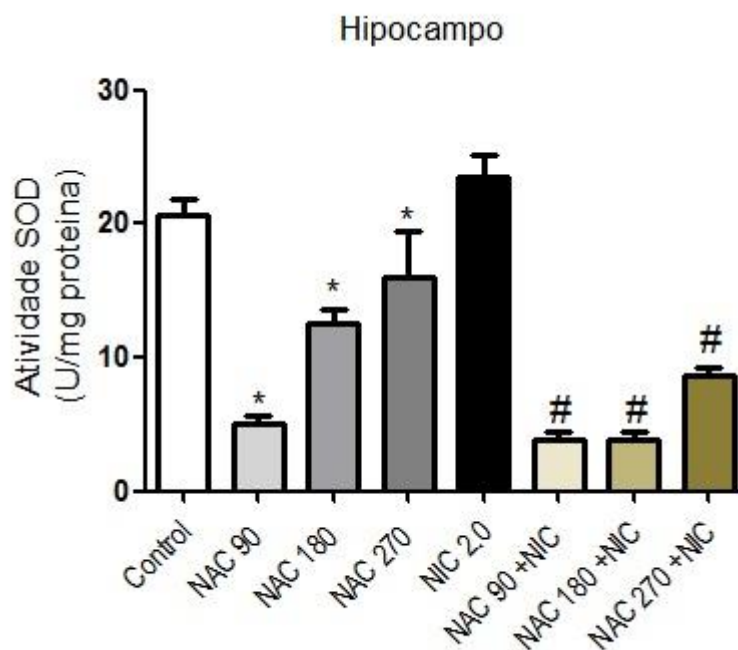
Em relação ao corpo estriado (Figura 14 ) ocorreu redução significativa ( $p < 0,0001$ ) na atividade da SOD nos grupos NAC 90 ( $3,841 \pm 0,3950$  U/mg de proteína), NAC 180 ( $13,98 \pm 1,989$  U/mg de proteína), NAC 270 ( $7,852 \pm 0,6626$  U/mg de proteína) e NIC ( $14,16 \pm 2,261$  U/mg de proteína) quando comparados ao grupo controle ( $23,88 \pm 0,8352$  U/mg de proteína). Houve também uma redução estatisticamente significativa na atividade da SOD nos grupos administrados NIC+NAC, NAC 90+NIC ( $3,678 \pm 0,9230$  U/mg de proteína), NAC180+NIC ( $5,372 \pm 0,6941$  U/mg de proteína) e NAC 270+ NIC ( $8,187 \pm 0,7313$  U/mg de proteína) quando comparados a NIC sozinha.

**Figura 12- Atividade da SOD no córtex pré-frontal de animais submetidos ao abasamento por nicotina e tratados com N-acetilcisteína.**



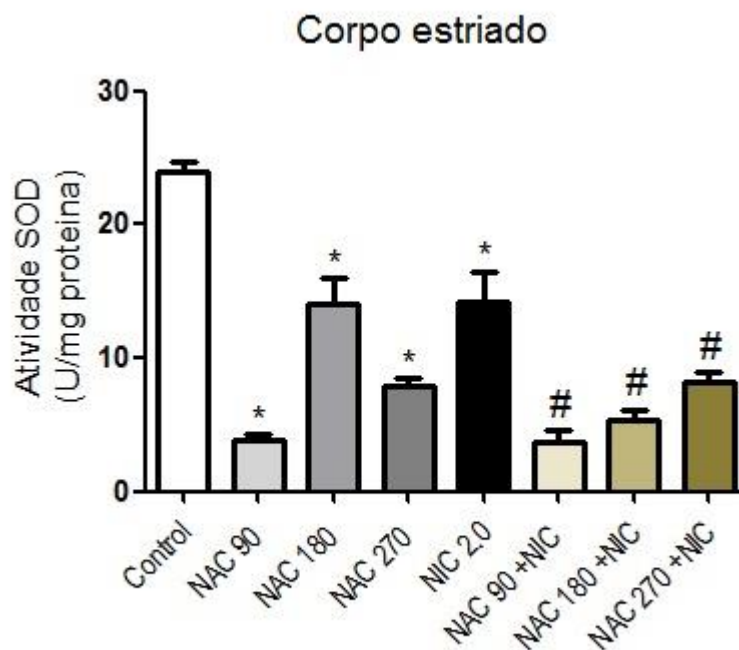
Os animais foram tratados por 19 dias com N-acetilcisteína (NAC) ou nicotina (NIC 2,0 mg/kg i.p) sozinhas ou associadas (NAC + NIC) em três diferentes doses. O grupo controle e recebeu apenas água destilada. As barras representam média  $\pm$  erro de 8 animais por grupo. A análise dos resultados foi feita através de ANOVA de uma via, seguido do teste de Turkey's. \* $p < 0.05$  vs controle, # $p < 0.05$  vs NIC.

**Figura 13- Atividade da SOD no hipocampo de animais submetidos ao abrasamento por nicotina e tratados com N-acetilcisteína.**



Os animais foram tratados por 19 dias com N-acetilcisteína (NAC) ou nicotina (NIC 2,0 mg/kg i.p) sozinhas ou associadas (NAC + NIC) em três diferentes doses. O grupo controle e recebeu apenas água destilada. As barras representam média  $\pm$  erro de 8 animais por grupo. A análise dos resultados foi feita através de ANOVA de uma via, seguido do teste de Turkey's. \* $p < 0.05$  vs controle, # $p < 0.05$  vs NIC.

**Figura 14- Atividade da SOD no corpo estriado de animais submetidos ao abasamento por nicotina e tratados com N-acetilcisteína.**



Os animais foram tratados por 19 dias com N-acetilcisteína (NAC) ou nicotina (NIC 2,0 mg/kg i.p) sozinhas ou associadas (NAC + NIC) em três diferentes doses. O grupo controle e recebeu apenas água destilada. As barras representam média  $\pm$  erro de 8 animais por grupo. A análise dos resultados foi feita através de ANOVA de uma via, seguido do teste de Turkey's. \* $p < 0.05$  vs controle, # $p < 0.05$  vs NIC.

#### **4.4 O abasamento induzido por nicotina aumenta os níveis de peroxidação lipídica que é prevenido pela administração de N-acetilcisteína.**

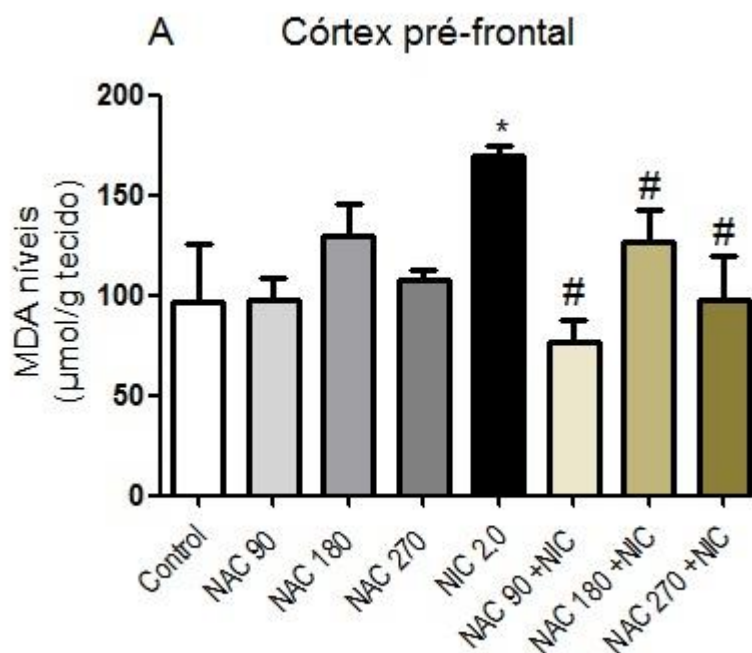
No córtex pré-frontal (Figura 15 ) dos animais submetidos ao tratamento por 19 dias com nicotina encontrou-se um aumento significativo ( $p < 0,0078$ ) nos níveis de peroxidação lipídica ( $169,9 \pm 4,916 \mu\text{mol/g}$  de tecido) quando comparado ao grupo controle ( $96,96 \pm 28,77 \mu\text{mol/g}$  de tecido). A administração de NAC 90+NIC ( $76,86 \pm 10,71 \mu\text{mol/g}$  de tecido); NAC 180+NIC ( $107,7 \pm 4,996 \mu\text{mol/g}$  de tecido) e NAC 270+NIC ( $97,70 \pm 21,80 \mu\text{mol/g}$  de tecido) reduziu a peroxidação lipídica quando comparado a NIC.

No hipocampo (Figura 16) a NIC sozinha aumentou significativamente a peroxidação lipídica (NIC- $138,0 \pm 6,722 \mu\text{mol/g}$  de tecido) quando comparado ao grupo controle ( $51,42 \pm 14,44 \mu\text{mol/g}$  de tecido). A administração de NAC 270+ NIC ( $67,06 \pm 11,07 \mu\text{mol/g}$  de tecido) reduziu significativamente a peroxidação quando comparado a NIC.

No corpo estriado (Figura 17) a NIC sozinha ( $134,9 \pm 17,19 \mu\text{mol/g}$  de tecido) também aumentou os níveis de MDA quando comparado ao controle ( $77,61 \pm 16,23 \mu\text{mol/g}$  de tecido). A administração de NAC 90+NIC ( $79,98 \pm 7,672 \mu\text{mol/g}$  de tecido) e NAC 270±NIC ( $73,45 \pm 4,766 \mu\text{mol/g}$  de tecido) reduziu significativamente os níveis de MDA quando comparado a NIC.

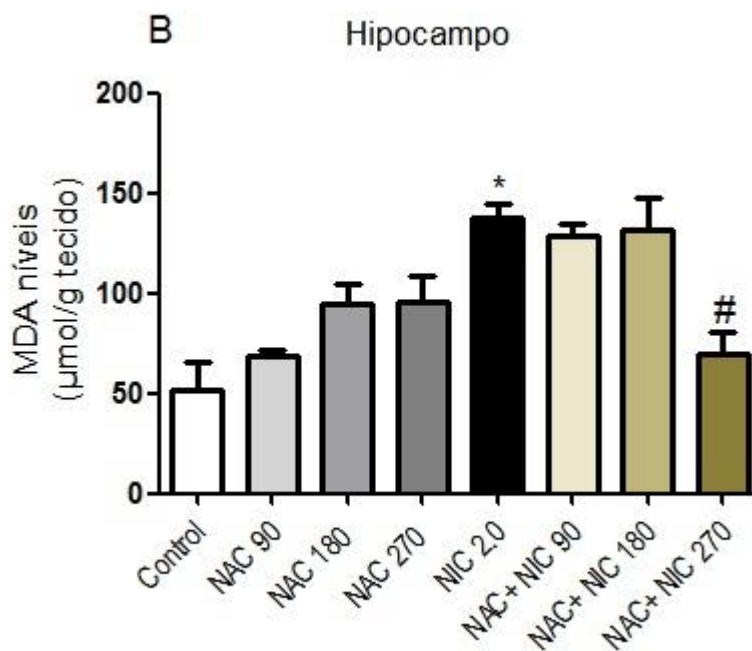


**Figura 15- Níveis de peroxidação lipídica no córtex pré-frontal dos animais submetidos ao abramamento por nicotina e tratados com N-acetilcisteína.**



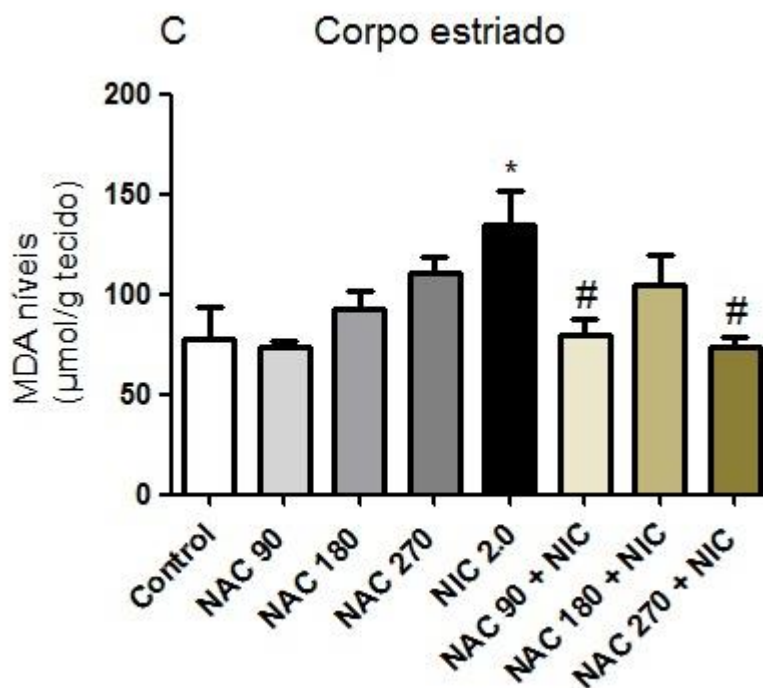
Os animais foram tratados por 19 dias com N-acetilcisteína (NAC) ou nicotina (NIC 2,0 mg/kg i.p) sozinhas ou associadas (NAC + NIC) em três diferentes doses. O grupo controle e recebeu apenas água destilada. As barras representam média  $\pm$  erro de 8 animais por grupo. A análise dos resultados foi feita através de ANOVA de uma via, seguido do teste de Turkey's. \* $p < 0.05$  vs controle, # $p < 0.05$  vs NIC.

**Figura 16- Níveis de peroxidação lipídica no hipocampo dos animais submetidos ao abrasamento por nicotina e tratados com N-acetilcisteína.**



Os animais foram tratados por 19 dias com N-acetilcisteína (NAC) ou nicotina (NIC 2,0 mg/kg i.p) sozinhas ou associadas (NAC + NIC) em três diferentes doses. O grupo controle e recebeu apenas água destilada. As barras representam média  $\pm$  erro de 8 animais por grupo. A análise dos resultados foi feita através de ANOVA de uma via, seguido do teste de Turkey's. \* $p < 0.05$  vs controle, # $p < 0.05$  vs NIC.

**Figura 17- Níveis de peroxidação lipídica no corpo estriado dos animais submetidos ao abrasamento por nicotina e tratados com N-acetilcisteína.**



Os animais foram tratados por 19 dias com N-acetilcisteína (NAC) ou nicotina (NIC 2,0 mg/kg i.p) sozinhas ou associadas (NAC + NIC) em três diferentes doses. O grupo controle e recebeu apenas água destilada. As barras representam média  $\pm$  erro de 8 animais por grupo. A análise dos resultados foi feita através de ANOVA de uma via, seguido do teste de Turkey's. \* $p < 0.05$  vs controle, # $p < 0.05$  vs NIC.

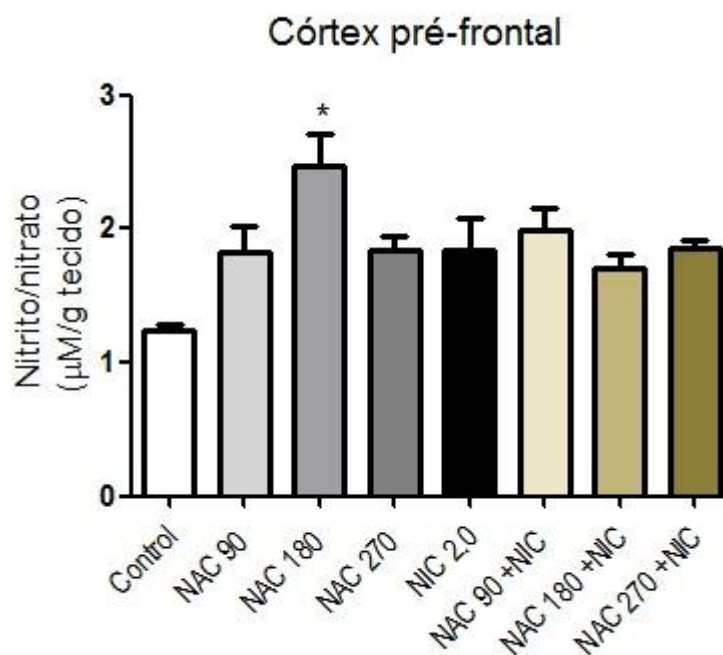
#### **4.5 O abrasamento induzido por nicotina não causa alterações significativas nos níveis de nitrito**

Os níveis de nitrito não apresentaram alterações nos animais submetidos ao abrasamento induzido por nicotina. Houve apenas uma diferença significativa ( $p < 0,0001$ ) entre os grupos controle ( $1,246 \pm 0,04083 \mu\text{M/g}$  de tecido) e a dose isolada NAC 180 ( $2,469 \pm 0,2468 \mu\text{M/g}$  de tecido). Os demais grupos de doses isoladas NAC 90 ( $1,823 \pm 0,2021 \mu\text{M/g}$  de tecido), NAC 270 ( $1,847 \pm 0,09449 \mu\text{M/g}$  de tecido), os grupos testes NAC 90+NIC ( $1,993 \pm 0,1613 \mu\text{M/g}$  de tecido); NAC 180+ NIC ( $1,711 \pm 0,09304 \mu\text{M/g}$  de tecido) e NAC 270+NIC ( $1,848 \pm 0,06798 \mu\text{M/g}$  de tecido) e ainda o grupo NIC ( $1,842 \pm 0,2319 \mu\text{M/g}$  de tecido) não apresentaram diferenças estatísticas significativas (Figura 18).

Na região do hipocampo (Figura 19), a maioria dos grupos de doses isoladas NAC 90 ( $1,652 \pm 0,07112 \mu\text{M/g}$  de tecido), NAC 270 ( $1,733 \pm 0,1125 \mu\text{M/g}$  de tecido), os grupos testes NAC 90+NIC ( $2,021 \pm 0,2020 \mu\text{M/g}$  de tecido); NAC 180+ NIC ( $1,814 \pm 0,1038 \mu\text{M/g}$  de tecido) e NAC 270+NIC ( $1,737 \pm 0,08892 \mu\text{M/g}$  de tecido) e ainda o grupo NIC ( $1,723 \pm 0,1125 \mu\text{M/g}$  de tecido) não apresentaram diferenças estatísticas significativas. Apenas, uma diferença significativa ( $p < 0,0037$ ) entre os grupos controle ( $1,323 \pm 0,1170 \mu\text{M/g}$  de tecido) e a dose isolada NAC 180 ( $2,080 \pm 0,07988 \mu\text{M/g}$  de tecido) foi observada.

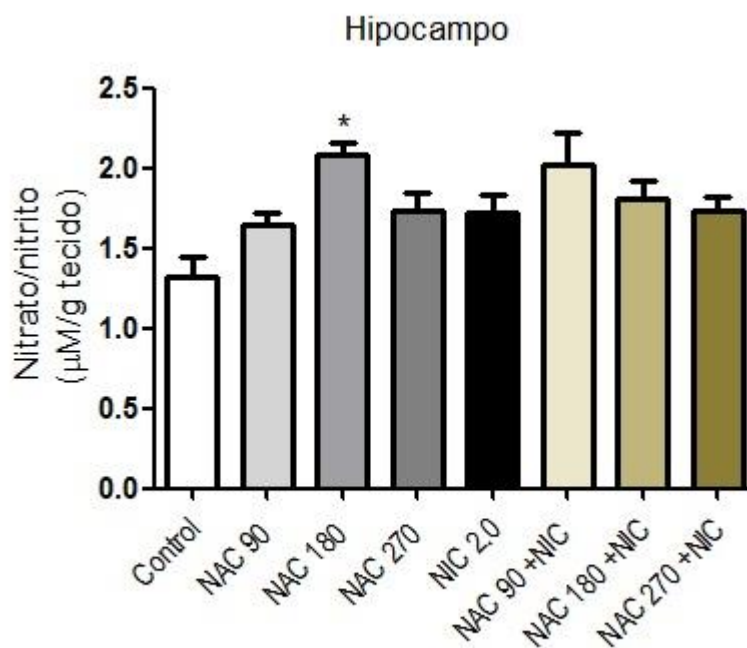
Os níveis de nitrito mostraram-se estatisticamente ( $p < 0,0001$ ) mais altos nos grupos NAC 180 ( $2,085 \pm 0,1158$ ) e NAC 270 ( $2,392 \pm 0,2491$ ), quando comparados ao grupo controle ( $1,358 \pm 0,1374$ ). Os demais grupos de doses isoladas NAC 90 ( $1,659 \pm 0,1024$ ), os grupos testes NAC 90+NIC ( $1,674 \pm 0,05201$ ); NAC 180+ NIC ( $1,752 \pm 0,1523$ ) e NAC 270+NIC ( $2,082 \pm 0,08151$ ) e ainda o grupo NIC ( $1,746 \pm 0,1590$ ) não apresentaram diferenças estatísticas significativas (Figura 20).

**Figura 18- Níveis de nitrito no córtex pré-frontal dos animais submetidos ao abasamento por nicotina e tratados com N-acetilcisteína**



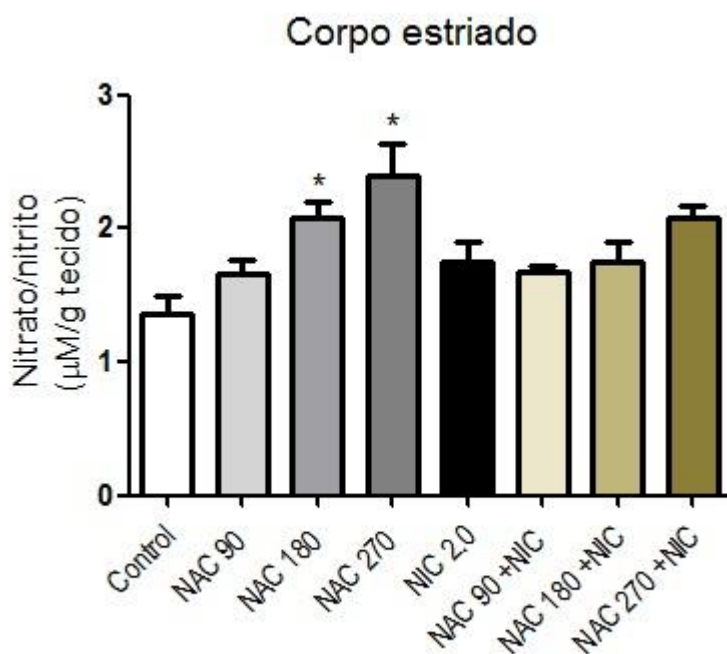
Os animais foram tratados por 19 dias com N-acetilcisteína (NAC) ou nicotina (NIC 2,0 mg/kg i.p) sozinhas ou associadas (NAC + NIC) em três diferentes doses. O grupo controle e recebeu apenas água destilada. As barras representam média  $\pm$  erro de 8 animais por grupo. A análise dos resultados foi feita através de ANOVA de uma via, seguido do teste de Turkey's.

**Figura 19- Níveis de nitrito no hipocampo dos animais submetidos ao abasamento por nicotina e tratados com N-acetilcisteína**



Os animais foram tratados por 19 dias com N-acetilcisteína (NAC) ou nicotina (NIC 2,0 mg/kg i.p) sozinhas ou associadas (NAC + NIC) em três diferentes doses. O grupo controle e recebeu apenas água destilada. As barras representam média  $\pm$  erro de 8 animais por grupo. A análise dos resultados foi feita através de ANOVA de uma via, seguido do teste de Turkey's.

**Figura 20- Níveis de nitrito no corpo estriado dos animais submetidos ao abasamento por nicotina e tratados com N-acetilcisteína.**



Os animais foram tratados por 19 dias com N-acetilcisteína (NAC) ou nicotina (NIC 2,0 mg/kg i.p) sozinhas ou associadas (NAC + NIC) em três diferentes doses. O grupo controle e recebeu apenas água destilada. As barras representam média  $\pm$  erro de 8 animais por grupo. A análise dos resultados foi feita através de ANOVA de uma via, seguido do teste de Turkey's.

## 5 DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo mostram que a NAC foi capaz de prevenir, as convulsões comuns no comportamento de animais submetidos ao abrasamento induzido por nicotina, minimizando ou anulando sua principal sintomatologia. Este efeito comportamental foi analisado através da escala de Racine que conforme descrito na metodologia mensura em estágios os graus da convulsão (Itzhak e Martin, 2000). O estudo comportamental e melhora dos níveis de convulsão foram acompanhados pelas alterações nos níveis de GSH, SOD, NO e TBARS, mostrando que o efeito antioxidante deste fármaco é responsável, em parte, pela diminuição dos níveis de convulsão desencadeados pelo abrasamento induzido pela nicotina.

A epilepsia é um dos mais comuns distúrbios neurológicos e afeta qualquer faixa etária, porém até os dias atuais carrega um forte estigma, o que restringe a qualidade de vida e interação social de quem a tem. Existem drogas antiepilépticas no mercado, porém 20% da população portadora de epilepsia é resistente aos fármacos existentes. As crises convulsivas limitam o indivíduo a frequentar ambientes de estudo e trabalho e imputam ao mesmo o estigma social (Kellet et al, 1997). Diante dessas evidências, esse trabalho apresenta dados que revelam o potencial da NAC para o tratamento da epilepsia, devido à sua ação sobre a atividade antioxidante no modelo animal de abrasamento induzido por nicotina.

Os anticonvulsivantes disponíveis hoje no mercado tem amplo espectro de ação e envolvem patologias diversas, como bulimia nervosa (Appolinario; Bacaltchuk, 2002) e transtorno bipolar (Moreno et al, 2004). Além dessas patologias, um número consideráveis de estudos tem envolvido o uso desses fármacos como o autismo (Soorya et al, 2008) e dependência química (Castro e Couzi, 2006).

Em decorrência do seu efeito antioxidante a NAC tem sido amplamente usada em pesquisas envolvendo a psiquiatria, principalmente em patologias semelhantes às quais os anticonvulsivantes têm sido investigados e tem apresentado bons resultados.



Assim como os anticonvulsivantes aceitos no mercado, a NAC tem apresentado bons resultados em estudos envolvendo a bulimia nervosa, TAB, autismo e dependência química. A similaridade entre os fins utilizados nas duas classes de fármacos em questão faz com que os resultados de diminuição níveis da escala de Racine em animais tratados com NAC tornem-se claramente compreensíveis.

Ficou claro, neste estudo, que animais submetidos ao tratamento de NAC com concentração de 270mg (NAC 270+NIC) expostos ao efeito do abasamento induzido por nicotina, foi o grupo que apresentou melhores resultados, tanto como diminuição dos padrões comportamentais encontrados em animais induzidos ao abasamento, quanto em níveis bioquímicos. Assim como em estudos clínicos de psiquiatria envolvendo TAB (500mg/dia), dependência de cocaína (3600mg/dia), maconha (2400mg/dia) e autismo (900mg/dia) o presente estudo obteve bons resultados com uma alta concentração da droga (Hardan et al, 2012; Mardikian et al, 2006; Magalhaes et al, 2011).

Apesar de altas concentrações serem frequentemente apresentadas em trabalhos clínicos a NAC tem se mostrado uma droga desprovida de toxicidade, sendo muito bem tolerada em humanos e animais, fato este, que corrobora a ausência de mortalidade de animais de grupos NAC isolado (NAC 90, NAC 180 e NAC 270) e ainda, nos grupos NAC associado à NIC (NAC 90+ NIC, NAC 180+ NIC e NAC 270+ NIC) (Longo & Dolti, 1965).

A NIC apresenta efeitos neuronais deletérios que se mostram mais graves em diferentes gêneros e faixas etárias. Animais fêmeas, periadolescentes tem apresentado maior suscetibilidade aos danos causados pelo abasamento induzido pela nicotina (Gomes et al, 2011). Tal degradação neuronal ficou explícita e comprovada no presente trabalho, quando o número de óbito dos animais somente expostos à ação degradante da NIC, sem prévia proteção da NAC, foi de 25% do total de animais deste grupo.

Além da ausência de óbitos nos grupos onde a NAC esteve presente, nosso estudo mostrou que a NAC foi capaz de reduzir os estágios de convulsão dos animais expostos ao abrasamento, além de aumentar o tempo de início das crises e diminuição da durabilidade das mesmas. Apesar de extremamente importante para conexões cerebrais, o glutamato pode apresentar-se em elevadas concentrações extra-celular e tornar-se uma importante neurotoxina causando uma consequente toxicidade neuronal, sendo, assim, associada à patologia neurológicas, inclusive a epilepsia (Obrenovitch et al,2000; Maragakis & Rothstein, 2001- avaliação comportamental e neuroquímica).

Como mencionado anteriormente, a NAC é capaz de equilibrar os níveis intra e extracelular de glutamato cerebral, diminuindo assim os níveis excessivos de excitabilidade neuronal. Fato que pode justificar a diminuição dos estágios de convulsão dos animais e ainda a menor incidência de frequência de estágio cinco de convulsão, pela escala de Racine nos animais tratados.

Diversos estudos têm relacionado patologias neurológicas com a ocorrência de EO e consequente dano cerebral. Acredita-se num importante dano tecidual cerebral após os episódios convulsivos, pois gera EROS que podem levar a morte neuronal e ainda uma importante participação do EO na neurogênese da convulsão. Agentes antioxidantes, como o ascorbato tem comprovada participação na defesa contra processos oxidativos, como lesões celulares induzidas por EROS (LIANG et al., 2000; ERAKOVIC et al., 2001; KANEKO et al., 2002 artigo 18 FREITAS; TOME, 2010).

O abrasamento induzido por nicotina ocasiona no animal, convulsões que podem chegar a estágio cinco da escala de Racine, provavelmente decorrentes do aumento dos níveis de estresse oxidativo que dentre outras alterações bioquímicas, destaca-se um aumento evidente dos níveis de MDA que são indicadores de dano da membrana lipídica celular (Gomes et al, 2011).

No presente estudo ficou clara a ação protetora fornecida pela NAC no abrasamento induzido por nicotina, uma vez que os animais apresentaram considerável diminuição dos níveis de MDA nos grupos em que a droga teste foi administrada. Nos grupos de doses isoladas de NAC, porém não se pôde observar o mesmo efeito, resultado este condizente e esperado, uma vez que tais animais não foram submetidos à degradação promovida pela NIC e tampouco poderiam mostrar degradação decorrente do EO e prevenção pela NAC. Esses resultados, associados aos achados de elevação nos níveis de MDA nas áreas cerebrais de animais expostos ao abrasamento, endossam a comprovação de estresse ocasionado pelo uso da NIC e reparo antioxidante pela NAC nas membranas celulares.

A glutathiona é um tripeptídeo que tem sua ativação mediada pela NAC que ao ser desacetilada, origina a cisteína que é o aminoácido responsável pela síntese de GSH. Idealizando a eficiência e eficácia do processo antioxidante, poderia pensar-se em administrações diretas de GSH, porém a molécula não é capaz de atravessar as membranas celulares e fica inviabilidade de atuar nos desequilíbrios oxidativos. Assim a cisteína poderia ser usada para equilibrar situações de EO, porém a sua baixa tolerância, toxicidade e ainda dificuldade de atravessar barreiras celulares, terminam impossibilitando a utilização da mesma (Moldeus et al,1989; Williamsom,1982).

Desta forma a NAC, tem sido a principal opção antioxidante já que é uma molécula de baixíssima toxicidade e de fácil acesso a compartimentos celulares, sendo capaz de ultrapassar a barreira hematoencefálica.

GSH é a principal defesa antioxidante da célula e está intimamente relacionada ao equilíbrio do ciclo celular redox, sendo desta forma, a manutenção dos seus níveis, primordial para um bom funcionamento da célula e combate ao estresse oxidativo.

Gomes et al, mostrou que o abrasamento induzido por nicotina diminui consideravelmente os níveis de GSH nas áreas cerebrais do córtex pré frontal, hipocampo e corpo estriado dos animais. Tais achados, ratificam nosso estudo,

pois nos animais expostos somente ao abrasamento por NIC, ocorreu uma redução significativa nos níveis de GSH das três áreas cerebrais estudadas.

O presente estudo evidenciou ainda, um aumento significativo dos níveis de GSH em animais submetidos à prevenção do abrasamento por NAC, isso mostra a capacidade que a droga tem de promover a neuroproteção e conseqüentemente diminuir os efeitos neurotóxicos decorrentes do EO proveniente do abrasamento induzido por nicotina.

Pereira et al 2008, mostrou que animais induzidos a desenvolver cirrose hepática apresentaram diminuição dos níveis de glutathiona peroxidase, em contra partida o grupo de animais tratados com NAC, após terem sido expostos a indução da cirrose, apresentaram elevação dos níveis de GSH e importante reparo tecidual.

Assim como a depleção dos níveis de GSH causada pela NIC, a elevação desses níveis proporcionada pela NAC ocorreu em todas as áreas cerebrais citadas. Firmando, desta maneira, o efeito da NAC sobre o processo oxidativo, o presente estudo mostrou que houve também um aumento dos níveis de GSH nas áreas cerebrais dos animais expostos a doses isoladas de NAC. O que comprova mais uma vez a eficácia precursora da NAC para formação de GSH no ciclo celular redox em nível de sistema nervoso.

Como mencionado anteriormente, as defesas antioxidantes fisiológicas são determinadas por componentes enzimáticos, dentre eles, SOD, CAT, GPx. Sendo que a cascata de conversão de radicais livres é iniciada pela ação da SOD que tem a capacidade de reduzir o superóxido a peróxido de hidrogênio. Tem-se assim a formação de um importante radical que poderá sofrer a ação das enzimas CAT ou da GPx. Desta maneira fica nítida a importância da GPx, uma vez que a enzima faz a conversão final de peróxido à água.

Apesar da ampla associação entre doenças e diminuição dos níveis de SOD, Sudha e colaboradores mostrou em estudo clínico, através de mensurações dos níveis da atividade de enzimas antioxidantes de eritrócitos,

que não existem diferenças significativas nos níveis da SOD quando comparados pacientes epiléticos e não epiléticos.

Nosso estudo revelou uma redução significativa dos níveis de SOD no grupo de animais tratados com NAC, porém o aumento dos níveis de atividade de GSH foi capaz de reduzir significativamente os níveis de peroxidação lipídica no grupo tratado e ainda, neste mesmo grupo, foi constatada uma melhora significativa no comportamento dos animais levando os mesmos a redução das escalas de convulsão.

Diante disto, nossos resultados corroboram com o estudo de Sudha, onde ambos sugerem que a SOD não está diretamente envolvida na fisiopatologia da convulsão. O nosso estudo mostra ainda, que apesar dessa diminuição da atividade da SOD, provavelmente induzida pela NAC, o efeito antioxidante da droga foi capaz de manter a integridade da membrana celular, evitando assim a degradação, dano celular e possível apoptose.

Quanto a investigação dos níveis de NO, o nosso estudo mostrou que a comparação entre todos os grupos não revelou nenhuma alteração significativa o que sugere a ausência de envolvimento desta via tanto na convulsão, como também da NAC na participação da produção de nitrito/ nitrato.

## 6 CONCLUSÃO

No nosso estudo a NAC teve a capacidade de atenuar o comportamento de convulsão dos animais expostos ao abrasamento induzido por nicotina.

O estudo mostrou ainda que os níveis de SOD nas áreas cerebrais diminuíram nos animais tratados com a droga teste o que sugeriu que o envolvimento da enzima em questão é irrelevante para a explicação da fisiopatologia da convulsão, uma vez que os níveis de degradação lipídica diminuíram nos animais tratados.

Pode-se concluir ainda no presente estudo que os níveis de GSH nas áreas cerebrais dos animais tratados com NAC aumentaram consideravelmente ao passo que diminuíram nos animais submetidos ao abrasamento induzido por nicotina. Tornando clara a relação da via com o comportamento convulsivante.

Ficou claro no estudo a diminuição dos níveis de peroxidação lipídica nas áreas cerebrais dos animais que foram submetidos ao protocolo de prevenção pela NAC, em contra partida, ficou claro o aumento dos mesmos níveis nos animais somente induzidos ao abrasamento.

Quanto aos níveis de nitrato/nitrito não houve variação significativa entre os grupos estudados, o que sugere ausência de envolvimento da via com o desenvolvimento do kindling induzido por nicotina, assim como também da NAC.

Conclui-se ainda de uma forma geral que há necessidade da ampliação do presente estudo para a determinação de mais mecanismos envolvidos com a ação anti-abrasamento deste fármaco.

## REFERÊNCIAS

- ALGREESHAN, F. S. Psychiatric disorders associated with epilepsy. 2007. Disponível em: <http://emedicine.medscape.com/article/1186336-overview>. Acessado em: 14 fev. 2014.
- ANDERSEN, P.; MORRIS, R.; AMARAL, D.; BLISS, T.; O'KEEFE, J. **The hippocampus book**. Oxford University. 2007.
- APPOLINARIO, J.C; BACALTCHUK, J. Tratamento farmacológico dos transtornos alimentares . **Rev. Bras. Psiquiatr**, v.24. p 54-9, 2002.
- ARNAIZ, S.L.; TRAVACIO, M.; LLESUY, S.; ARNAIZ, G. Regional vulnerability to oxidative stress in a model of experimental epilepsy. **Neurochem.Res.**, v. 23, p. 1477-1483, 1998.
- ARUOMA, O. I.; HALLIWELL, B.; HOEY, B.M.; BUTLER, J. The antioxidant action of Nacetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical superoxide, and hypochlorous acid. Free radical **Biol Med.**, v. 6, n.6, p. 593-7, 1989.
- BAKER, D. A., MCFARLAND, K.; LAKE, R.W.; SHEN, H.; TANG X-C, TODA, S. Neuroadaptation in cystine–glutamate exchange underlie cocaine relapse. **Nat Neurosci.**, v. 6, p.743–9, 2003.
- BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quim Nova.**, v.29, p.113-23, 2006.
- BASHKATOVA, V.; NARKEVICK, V.; VITSKOVA, G.; VANIN, A. The influence of anticonvulsivante drugs on nitric oxide levels lipid peroxidation in the rat brain during penthylenetetrazole-induced epileptiform model seizures. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol.Psychiatry**. v. 27, p. 487-492, 2003.
- BASTLUND, J. F.; BERRY, D.; WATSON, W. P. Pharmacological and histological characterisation of nicotine-kindled seizures in mice. **Neuropharmacology**, v. 48, n.7, p. 975-83, 2005.
- BERK, M.; KAPCZINSKI, F.; ANDREAZZA, A. C.; DEAN, O. M.; GIORLANDO, F.; MAES, M.; YÜCEL, M.; GAMA, C. S.; DODD, S.; DEAN, B.; MAGALHÃES, P. V.; AMMINGER, P.; MCGORRY, P.; MALHI, G. S. Pathways underlying neuroprogression in bipolar disorder: focus on inflammation, oxidative stress and neurotrophic factors. **Neurosci Biobehav Rev.**, v. 5, n. 3, p.804-817, 2011.
- BONONONI L, GAZZANIGA A. Toxicological, pharmacokinetic and metabolic studies on acetylcysteine. **Eur J Respir dis Suppl.**, v.111, p 45-54, 1980.
- BURGUNDER, J. M.; VARRIALEA; LAUTERBURGBH. Effect of N-acetylcysteine on plasma cysteine and glutathione following paracetamol administration. **Eur J Clin Pharmacol.**, v. 36, p.127–131, 1989.

CANITANO, R.; LUCHETTI, A.; ZAPPELLA, M. Epilepsy, electroencephalographic abnormalities, and regression in children with autism. **J Child Neurol.**, v. 20, n.1, p.27-31, 2005.

CASTRO L.A.; COUZI, C. Uso potencial dos anticonvulsivantes no tratamento ambulatorial da dependência de álcool. **J. bras. psiquiatr.**, v.55, n.3, 2006.

COHEN, M. V. Free radicals in ischemic and reperfusion myocardial injury: is this time for clinical trials? **Ann Intern Med.**, v.111, p.918-31, 1989.

COMMISSION ON CLASSIFICATION AND TERMINOLOGY OF THE INTERNATIONAL LEAGUE AGAINST EPILEPSY. Proposal for revised clinical and electroencephalographic classification of epileptic seizures. **Epilepsia.** v.22, p.489-501, 1981.

COWAN, L.D. The epidemiology of the epilepsies in children. Mental retardation and development al. **Desabilities research reviews.**,v. 8, p.171-181, 2002.

DANILOVIC, A. Efeito protetor da N-acetilcisteína em evolução precoce de receptores de transplante renal com doador falecido. 2009. **Tese (Doutorado em Urologia)-** Faculdade de medicina, Universidade de São Paulo, 2009.

DE LORENZO, R. J.; RAZA, M.; PAL, S.; RAQ, A. Long-term alteration of calciumhomeostatic mechanisms in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. **Brain Res.**, v. 903, p.1-12, 2001.

DE VRIES, N. DE FLORA S. N-acetyl-cysteine. **J Cell Biochem Suppl.**, v.17, p. 270-7, 1993.

DEAN, O. M.; VANDENBUUSE, M.; BUSH, A.I.; COPOLOV, D. L, N. G. F.; DODD, S.; BERK, M. A Role for Glutathione in the Pathophysiology of Bipolar Disorder and Schizophrenia? Animal Models and Relevance to Clinical Practice. **Curr Med Chem.**, v.16, n. 23, p. 2965-76, 2009.

DEAN,O.,VANDENBUUSE,M.,COPLOV,D.L., BERK,M., BUSH, A.I. N-acetylcysteine treatment inhibits depletion of brain glutathione levels in rats: implications for schizophrenia. **Int. J. Neuropsychopharmacol.**, v.7, p. 262, 2004.

DEVASAGAYAM, T. P.; BOLOOR, K. K.; RAMASARMA, T. Methods for estimating lipid peroxidation: an analysis of merits and demerits. **Indian J Biochem Biophys.**,v. 40, n. 5, p. 300-308, 2003.

DICHTER, M. A. The neurobiology of epilepsy. *In: Epilepsy: A comprehensive textbook*, eds. J Engel Jr, TA Pedley. p 233-235, Lippincott- Raven publishers, 1998.

ENGEL J. A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and



engel j. Report of the ILAE Classification Core Group. **Epilepsia.**, v.47, p.1558–1568, 2006.

ENGEL Jr. Avaliação comportamental e neuroquímica nos modelos de convulsão. **Epilepsia.**, v.42, p.796–803, 2001.

ERAKOVIC, V. Altered activities of rat brain metabolic enzymes by pentylentetrazol kindling and pentylentetrazol-induced seizures. **Epilepsy Res.**,v. 43, n. 2, p. 165-173, 2001.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **RAMB.**, v.43, n1, p.61-8, 1997.

FISHER,R.S. Overview of epilepsy, 2010. Disponível em:<  
<http://www.epilepsy.com/pdfs/Epilepsy-Handout.pdf>. Acesso em: 20 de Jan 2014.

FLOYD, R. A. Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. **FASEB J.**, v. 4, n. 9, p. 2587-2597, 1990.

GASTAUT, H. **Dictionary of epilepsy**. Genebra: World Health Organization, 1973.

GOMES, P.X.L. Estudo da influência do gênero e da idade nas alterações comportamentais e neuroquímicas induzidas pelo abrasamento por nicotina em ratos. Dissertação de mestrado, 2011.

GRANT, J. E.; KIM, S.; ODLAUG, B. L. N-Acetyl Cysteine, a Glutamate-Modulating Agent, in the Treatment of Pathological Gambling: A Pilot Study. **Biol psychiatry.**, v. 62, p. 652–657, 2007.

GRAY, K. M, WATSON, N. L.; CARPENTER, M. J., et al. N-cetylcysteine(NAC) in young marijuana users: an open-label pilot study. **Am JAddict.**, v.19, p. 187-9, 2010.

GREEN, K.; BRAND, M.D.; MURPHY, M. P. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. **Diabetes.**, v. 53, n. 1, p. 110-8, 2004.

GUERREIRO, C. A. M.; GUERREIRO, M. M.; CENDES, F.; LOPES-CENDES I. Considerações Gerais. In: **Epilepsia.**, 3. Edição. São Paulo : Lemos Editorial. 2000. p.1-10.

GUTERRIDGE, M. C.; HALLIWELL, B. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. **Biochem J.**, v.219, p.1-14, 1984.

GUTIERREZ, R. The GABAergic phenotype of the “glutamatergic” granule cells of the dentate gyrus. **Prog. Neurobiol.**, v.71, n.5, p. 337-358, 2003.

HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochem Soc Trans.**, v.35, p. 1147-50, 2007.

HAMAI, M.; IWAI, M.; IDE, A.; TOMOCHIKA, H.; TOMONO, Y.; MOGI, M.; HORIUCHI, M. Comparison of inhibitory action of candesartan and enalapril on brain ischemia through inhibition of oxidative stress. **Neuropharmacology**, v. 51, n. 4, p. 822-828, 2006.

HARDAN, A. Y.; FUNG, L. K.; LIBOVE, R. A.; OBUKHANYCH, T. V.; NAIR, S.; HERZENBERG, L. A.; FRAZIER, T. W.; TIROUVANZIAM, R. A randomized controlled pilot trial of oral N-acetylcysteine in children with autism. **Biol Psychiatry**, v. 71, n.11, p 956-961, 2012.

HERMANN, B., JONES, J.; DABBS, K.; ALLEN, C. A; SHETH, R.; FINE, J. The HERSHKO C. Mechanism of iron toxicity and its possible role in red cell membrane damage. **Semin Hematol.**, v.26, p. 277-85, 1989.

HOLDINESS, M. R. Clinical pharmokinetics of N-acetylcysteine. **Clin Pharmacokinet.**, v. 20, p.123–134, 1991.

ITZHAK, Y. MARTIN, J.L. Cocaine-induced kindling in associated with elevated NMDA receptor binding in discrete mouse brain regions. **Neuropharmacology**, v.39, p 32-9, 2000.

JUNG, K. H.; CHU, K.; LEE, S. T.; KIM, S. J.; SONG, E. C.; KIM, E. H.; PARK, D. K.; SINN, D. I.; KIM, J. M.; KIM, M.; ROH, J. K. Blockade of AT1 receptor reduces apoptosis, inflammation, and oxidative stress in normotensive rats with intracerebral hemorrhage. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 322, n. 3, p. 1051-1058, 2007.

KALE, R. - Bringing Epilepsy Out of the Shadows (editorial). **Br Med J.**, v.315, p.2-3, 1997.

KANEKO, K. Consequences of nitric oxide generation in epileptic-seizure rodent models as studied by in vivo EPR. *Magn, Redon. Med.*, v. 48, n. 6, p. 1051-1056, 2002.

KAPCZINSKI, F.; DAL-PIZZOL, F.; TEXEIRA, A. L.; MAGALHÃES, P.V.; KAUER; SANT' ANA M.; KLAMT, F. MOREIRA, J. C.; BITTENCOURT; PASQUALI, M. A.; FRIES, G.R.; QUEVEDO, J.; GAMA, C. S.; POST, R. Peripherd biomarkers and illness activity in bipolar disorder. **J Psychiatr Res.**, v.45, n. 2, p. 156-61, 2011.

KAPCZINSKI, F., FRIES, G. R. N-acetylcysteine as a mitochondrial enhancer: a new class of psychoactive drugs? **Rev Bras Psiquiatr.**, v. 33, p. 321-322, 2011.

KELLET, M. W.; SMITH, D. F.; BAKER, G. A; CHADWICK, D. W. Quality of life after epilepsy surgery. **J Neurol Neurosurg Psychiatry.**, v.63, p. 52-58, 1997.

KULAK, A.; STEULLET, P.; CABUNGAL, J. H.; WERGE, T.; INGASON, A.; CUENOD, M.; DO, K. Q. Redox dysregulation in the pathophysiology of schizophrenia and bipolar disorder: insights from animal models. **Antioxid Redox Signal.**, v. 18, n. 12, p. 1428-1443, 2013.

LAMBETH, J. D.; KRAUSE, K. H.; CLARK, R. A. NOX enzymes as novel targets for drug development. **Semin Immunopathol.**, v. 30, n. 3, p. 339-363, 2008.

LAROWE, S. D. Safety and tolerability of N-acetylcysteine in cocaine-dependent individuals. **Am J Addict.**, v. 15, n.1, p.105-110, 2006.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de bioquímica**. 2. ed. São Paulo: Sarvier. p. 839,1995.

LEITE, J.P, CAVALHEIRO, E. A. Neurobiologia da esclerose mesial temporal. In: Costa, J. C.; Palmini, A.; Yacubian, E. M. T.; Cavalheiro, E. A. **Fundamentos Neurobiológicos das Epilepsias** - aspectos clínicos e cirúrgicos. Cap 7. Vol. 1. São Paulo-SP: Editora Lemos, 1998, p.129-136.

LENT, R. **Cem bilhões de neurônios, conceitos fundamentais de neurociências**. São Paulo : Atheneu. V 2, p. 698, 2001,

LIANG, L. P.; HO, Y. S.; PANTEL, M. Mitochondrial superoxide production in kainate-induced hippocampal damage. **Neuroscience**, v. 101, n. 3, p. 563-570, 2000.

LIU, F.; HAVENS, J.; YU, Q.; WANG, G.; DAVISSON, R. L.; PICKEL, V. M.; IADECOLA, C. The link between angiotensin II-mediated anxiety and mood disorders with NADPH oxidase-induced oxidative stress. **Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol.**, v. 4, n. 1, p. 28-35, 2012.

LOSCHER W., SCHMIDT D. New horizons in the development of antiepileptic drugs. **Epilepsy Research**, v. 50, p 3-16, 2002.

MACÊDO, D. S.; MEDEIROS, C. D.; CORDEIRO, R. C.; SOUSA, F. C.; SANTOS, J. V.; MORAIS, T. A.; HYPHANTIS, T. N.; MCINTYRE, R. S.; QUEVEDO, J.; CARVALHO, A. F. Effects of alpha-lipoic acid in an animal model of mania induced by D-amphetamine. **Bipolar Disord.**, v. 14, n. 7, p. 707-718, 2012.

MAGALHÃES, P. V.; DEAN, O. M.; BUSH, A. I.; COPOLOV, D. L.; MALHI, G. S.; KOHLMANN, K.; JEAVONS, S.; SCHAPKAITZ, I.; ANDERSON-HUNT, M.; BERK, M. N-acetyl cysteine add-on treatment for bipolar II disorder: a subgroup analysis of a randomized placebo-controlled trial. **J. Affect. Disord.**, v. 129, n. 1–3, p. 317–320, 2011.

MANOSSO, L. M.; NEIS, V. B.; MORETTI, M.; DAUFENBACH, J. F.; FREITAS, A. E.; COLLA, A. R.; RODRIGUES, A. L. Antidepressant-like effect of  $\alpha$ -tocopherol in a mouse model of depressive-like behavior induced by TNF- $\alpha$ . **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 46, p. 48-57, 2013.

MARDIKIAN PN. An open-label trial of N-acetylcysteine for the treatment of cocaine dependence: a pilot study. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**. 2007., v.30, n.2, p.389-94, 2006.

MELDRUM, B. amino acids neurotransmitters in new approaches to anticonvulsant drug action. **Epilepsy**., v. 22, p. 140-149, 1984.

MORENO R.A, MORENO D.H, SOARES M.B.M, RATSKE R. Anticonvulsantes e antipsicóticos no tratamentos de transtorno bipolar. **Rev. Bra. Psiq.** v. 26. p.37-43, 2004.

N.J MARAGAKIS, J.D ROTHSTEIN. Glutamate transportes in neurologic disease. **Arch. Neurol.** v. 58, p. 365-370, 2001.

NOHL, H. Involvement of free radicals in ageing: a consequence or cause of senescence. **Br Med Bull.**, v.49, n.3, p. 653-67, 1993

NOWACK, W.J. Psychiatric disorders associated with epilepsy. 2006  
OUT OF THE SHADOWS. - **ILAE/IBE/WHO Global Campaign Against Epilepsy**. An Introduction to The Global Campaign and its Demonstration Projects. 2001.

P.R. Vade-mécum de medicamentos, 2004/2005, São Paulo, disponível em: [http://www.mapric.com.br/anexos/boletim610\\_14112007\\_081834.pdf](http://www.mapric.com.br/anexos/boletim610_14112007_081834.pdf).  
Acessado em: 14 de abril 2014.

PARISI, P.; MOAVERO, R.; VERROTTI, A.; CURATOLO, P. Attention deficit hyperactivity disorder in children with epilepsy. **Brain Dev**; in press. 2009.

PATERSON, R.L.; GALLEY, H.F.; WEBSTER, N.R. The effect of N-acetylcysteine on nuclear factor kappa-B activation, interleukin-8 and intercellular adhesion molecule-1 expression in patients with sepsis. **Crit Care Med.**, v.31, n.11, p. 2574-8, 2003.

PEREIRA-FILHO, G.; FERREIRA, C.; SCHWENGBER, A.; MARRONI, C.; ZETTLER, C; MARRONI, N. Role of N-acetylcysteine on fibrosis and oxidative stress in cirrhotic rats. **Experimental gastroenterology**. v. 45, n.2, p. 156-162, 2008.

PRASAD AS, BECK, F.W.J.; BAO, B.; FITZGERALD, J.T.; SNELL, D. C, STEINBERG, J.D. Zinc supplementation decreases incidence of infections in the elderly: effect of zinc on generation of cytokines and oxidative stress. **Am J Clin Nutr.**, v. 85, n. 3, p. 837-44, 2007.

- ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S. Resposta patológica ao estresse e a estímulos tóxicos: adaptação, lesão e morte. Cap.1, p. 3-42. *In: Bases Patológicas das Doenças*, 7. ed. Rio de Janeiro : Elsevier, 2010.
- ROVER JR L, HOEHR, N. F.; VELLASCO, A. P. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado à métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Quím Nova.**, v.24, n.1, p.112-9, 2001.
- SANDER, J. W. A. S. The epidemiology of epilepsy revisited. **Curr Opin Neurol** V.16, n. 2, p.165-170, 2003.
- SHEFFNER, A.L, The reduction "in vitro" in viscosity of mucoproteinsolution by a new mucolytic agent. N-Acetyl-L cysteine. *An. N.Y. Acad. Sci.*, v.106, p. 298-310, 1963.
- SOMMER, W. Erkrankung des ammonshorns als aetiologisches moment der epilepsie. **Arch Psychiatr Nervenkr.**, v. 10, p.631-675, 1880.
- SOORYA, L.; KIARASHI.; J HOLLANDER E. Intervenções psicofarmacológicas para Comportamentos Repetitivos nos Transtornos do Espectro Autista. **Child and Adolescent Psychiatric Clinics of North America**. v.17, p.185-210,2008.
- SPEAR, L. P. Modeling adolescent development and alcohol use in animals, **Alcohol and Health**. v. 24, p.115-23. 2000.
- T.P. OBRENOVITCH.; J. URENJACK. Altered glutamatergic transmission in neurological disorders: from high extracellular glutamate excessive synaptic efficacy. **Prog Neurobiol.**,v.5, p.39-87, 1997.
- TRIMBLE, M.R. The psychoses of epilepsy. New York : Raven Press, 1991.
- TURSKI, L.; CAVALHEIRO, E. A.; CZUCZUWAR, S. J.; JTURSKI, W. A; KLEINROK. Z. The seizuresinduced by pilocarpine. Behavioral, eletroencephalographic and neuropathological studies in rodents. **Pol. J Pharm.**, v 42, n.5, p. 545-555, 1987.
- VAN DER FELTZ-CORNELIS CM.; ALDENKAMP AP. Effectiveness and safety of methylphenidate in adult attention deficit hyperactivity disorder in patients with epilepsy: an open treatment trial. **Epilepsy Behav.**, v.8, p. 659-662, 2006.
- ZIMET, I. Acetylcysteine: A drug that is much more than a mucokinetic. **Biomed & Pharmacother.**, v. 130, n.12, p.3135-48, 2007.
- WAHAB, A. Difficulties in treatment and management of epilepsy and Challenges in new drug development. **Pharmaceuticals**, v.3, p. 2090-2110, 2010.