

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

Vanessa Pereira Saldanha

**ESTUDO DO EFEITO TIPO-ANTIDEPRESSIVO DE N-ACETILCISTEÍNA
NO AUMENTO DE IMOBILIDADE INDUZIDO POR INTERFERON-ALFA
NO TESTE DE SUSPENSÃO PELA CAUDA EM CAMUNDONGOS**

Porto Alegre
2011

Vanessa Pereira Saldanha

**ESTUDO DO EFEITO TIPO-ANTIDEPRESSIVO DE N-ACETILCISTEÍNA
NO AUMENTO DE IMOBILIDADE INDUZIDO POR INTERFERON-ALFA
NO TESTE DE SUSPENSÃO PELA CAUDA EM CAMUNDONGOS**

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

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Elaine Elisabetsky

Co-orientadora: Luciane Costa Campos

Porto Alegre
2011

ÍNDICE GERAL

1. INTRODUÇÃO	6
1.1 Glutamato e depressão	8
1.2 Inflamação crônica e depressão	9
1.3 Interferon- α	10
1.4 N-acetilcisteína	11
2. OBJETIVOS	14
3. ARTIGO CIENTÍFICO	15
3.1 ESTUDO DO EFEITO TIPO-ANTIDEPRESSIVO DE N-ACETILCISTEÍNA NO AUMENTO DE IMOBILIDADE INDUZIDO POR INTERFERON-ALFA NO TESTE DE SUSPENSÃO PELA CAUDA EM CAMUNDONGOS	
4. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	31
5. REFERÊNCIAS	32

RESUMO

Interferon α (IFN- α) tem sido usado em pacientes com alguns tipos de câncer ou doenças virais crônicas, como hepatite C. A terapia com essa citocina para hepatite C, apesar de eficaz, tem importantes efeitos adversos, sendo que depressão pode acometer mais da metade dos pacientes. O desenvolvimento da depressão em pacientes submetidos à imunoterapia parece estar relacionado com a ativação da enzima indolaminina 2,3-dioxigenase IDO pelo IFN- α , o que, em última análise, interfere nos sistemas serotoninérgico e glutamatérgico. A N-acetilcisteína (NAC) tem sido indicada como adjuvante na terapia com IFN- α por, aparentemente, melhorar a ação antiviral. NAC também age no SNC, e evidências sugerem possível atividade antidepressiva. **Objetivo:** Avaliar a atividade antidepressiva de NAC num modelo animal preditivo de atividade antidepressiva com alteração de comportamento induzida por IFN- α . **Material e Métodos:** Foi usado o modelo de suspensão pela cauda. Camundongos (BALBc) (N=8-13) foram tratados com IFN- α (2400U/kg), com ou sem administração prévia de NAC (25mg/kg) ou imipramina (20mg/kg). Tempo de imobilidade analisado por ANOVA. **Resultados:** O tratamento agudo com IFN- α aumentou significativamente ($p < 0,05$) o tempo de imobilidade, efeito prevenido pela administração aguda de NAC, mas não de imipramina. **Conclusão:** Corroborando as observações clínicas, IFN- α induziu em camundongos comportamento correlato de depressão no modelo de suspensão pela cauda. Neste modelo NAC mostrou ação tipo-antidepressiva. Um estudo mais abrangente, com várias doses e modelos experimentais, é necessário para validar estes dados preliminares. Considerando o efeito positivo de antioxidante na atividade antiviral e os efeitos adversos dos antidepressivos, justifica-se a continuidade deste estudo.

Palavras chave: Interferon- α , Hepatite C, Depressão , Glutamato, N-acetilcisteína

1.Introdução

A depressão maior é o mais comum dos distúrbios afetivos, definidos como distúrbios de humor, e pode variar de uma afecção muito leve beirando a normalidade à depressão grave (psicótica) acompanhada por alucinações e delírios (Rang & Dale, 2007). Esse distúrbio de humor vem crescendo no elenco das doenças mais prevalentes na população mundial, sendo preocupante não somente pelo risco significativo de morte prematura devido a suicídio, como também por interferir na produtividade dos indivíduos. A doença afeta a aptidão dos indivíduos para o trabalho, causando também dificuldade no relacionamento com outras pessoas e engajamento em atividades sociais (Kiyohar & Yoshimasu, 2009). Corroborando o aumento da incidência da depressão os antidepressivos estão entre os medicamentos mais vendidos no mundo, principalmente nos países mais desenvolvidos (Lopes & Murray, 1998).

A principal teoria bioquímica da depressão é a hipótese das monoaminas, baseada em dois conjuntos de evidências. O primeiro destes vem da constatação de níveis diminuídos de serotonina em suicidas, da ação moderadamente antidepressiva do triptofano (precursor de serotonina) e especialmente do fato que pacientes depressivos já em remissão recaem em depressão quando submetidos à dieta pobre em triptofano. O segundo corpo de evidências baseia-se na atenuação dos sintomas característicos da doença por fármacos que interferem de alguma forma na transmissão de noradrenalina (NOR) e serotonina (5-HT), em última análise aumentando a disponibilidade dos neurotransmissores na fenda sináptica (Rang e Dale, 2007). Contudo, uma real melhora dos sintomas característicos da depressão somente é experimentada de 3 a 4 semanas após o início da terapia. Essa evidência

sugere que a melhora dos sintomas não esta relacionada diretamente ao aumento dessas monoaminas, mas indiretamente por meio de mudanças adaptativas de longo prazo (Bear *et al*, 2008)

Ainda que sejam drogas amplamente prescritas e consumidas, uma parte considerável dos pacientes se mostra resistente aos tratamentos; mesmo para os pacientes responsivos os efeitos adversos experimentados são muito variados, desagradáveis e sérios a ponto da terapia ter que ser em muitos casos descontinuada. Alguns estudos também sugerem que os antidepressivos mais utilizados aumentam o risco de suicídio ou comportamento suicida (Cipriani *et al*, 2005; Licinio & Wong, 2005), o que apesar de contraditório tem dividido as opiniões no meio científico.

Devido aos problemas com a efetividade dos antidepressivos e a incerteza a respeito dos mecanismos neurobiológicos que levariam os indivíduos a manifestarem depressão, os quais em última instância poderiam levar ao desenvolvimento de novos fármacos mais eficazes, outras hipóteses sobre as bases neuroquímicas da depressão são atualmente levantadas. Duas dessas hipóteses permeiam hoje em dia os estudos relacionados à depressão e antidepressivos e estão diretamente relacionados com a proposta deste trabalho. A primeira é que o sistema glutamatérgico estaria diretamente envolvido na etiologia do distúrbio depressivo, consistente com a observação da atividade antidepressiva de substâncias que agem diretamente no sistema glutamatérgico (Machado-Vieira *et al*, 2010; Hashimoto, 2009; Tokita *et al*, 2011). A segunda é o envolvimento da ativação de vias do sistema imune no desenvolvimento da depressão, evidenciada pelo aumento de marcadores inflamatórios, como as citocinas, em indivíduos deprimidos (Capuron & Miller , 2011; Dean, 2010; Raison *et al* 2006).

1.1 Glutamato e depressão

Crescentes evidências sugerem o envolvimento do sistema glutamatérgico na neurobiologia e tratamento da depressão. Dentre essas estão o aumento dos níveis plasmáticos de glutamato e também no fluido cérebro-espinhal de pacientes com depressão, bem como o aumento de glutamato em amostras cerebrais *post-mortem* (Machado-Vieira *et al*, 2010; Hashimoto, 2009; Tokita *et al*, 2011). Também já foram constatadas alterações quantitativas em subunidades dos receptores ionotrópicos e metabotrópicos de glutamato em amostras de diferentes áreas encefálicas de pacientes com depressão em estudos *post-mortem* (Machado-Vieira *et al*, 2010; Hashimoto, 2009; Tokita *et al*, 2011)

Outros indícios da participação do glutamato na depressão são sugeridos pela atividade antidepressiva de substâncias antagonistas de receptores ácido *N*-metil-D-aspartato (NMDA, como a cetamina e a memantina), de moduladores positivos de receptores ácido- α -amino-3-hidroxi-5-metilsoxazol-4-propriânico (AMPA, como piracetam, aniracetam, ciclotiazide), assim como agentes que agem em receptores metabotrópicos como antagonistas dos grupo I mGlu e do grupo II mGlu e agonistas do grupo III mGlu (tais como JNJ16259685) (Hashimoto, 2009; Tokita *et al*, 2011). No todo, essas evidências apontam para a possibilidade de anormalidades no ciclo glial-neuronal glutamato/glutamina em pacientes com depressão (Hashimoto, 2009).

1.2 Inflamação crônica e depressão

Já está bastante estabelecido que a resposta inflamatória a uma infecção por agentes patogênicos leva a uma série de alterações humorais e celulares, envolvendo não somente a periferia como também o sistema nervoso central (SNC). As maiores responsáveis por esses eventos celulares que se seguem à lesão tecidual/inflamação são as citocinas, mediadores liberados por células do sistema imune e que tem ação em várias células e tecidos durante a cascata de eventos que envolvem o processo inflamatório. A ação das citocinas no SNC leva a alterações comportamentais, caracterizadas por sintomas que incluem humor deprimido, anedonia, fadiga, diminuição da atividade psicomotora e do apetite, alterações de sono e aumento da sensibilidade à dor (Dantzer, 2009).

Estudos recentes tem revelado a presença de níveis aumentados desses marcadores inflamatórios em pacientes com depressão (Capuron & Miller, 2011; Dean, 2010; Raison *et al* 2006). Esse fato é coerente com a possibilidade das citocinas interagirem com muitos dos domínios patofisiológicos associados à depressão, incluindo metabolismo de neurotransmissores, função neuroendócrina, plasticidade sináptica e comportamento (Capuron *et al*, 2009; Raison *et al*, 2006, Simon *et al*, 2008). Relacionado a esses achados está à constatação de que doenças que envolvem inflamação crônica muito frequentemente levam os indivíduos afetados a apresentarem co-morbidades psiquiátricas, dentre as quais a depressão (Evans *et al*, 2005). Também condizente com a associação de citocinas e depressão é a constatação de que a depressão pode ser induzida em humanos pela administração prolongada de citocinas pró-inflamatórias em suas formas recombinantes (Capuron & Miller, 2004; Raison, 2005-2006; Marieke & Maes, 2004).

1.3 Interferon α

As atividades antiviral e antiproliferativa de algumas citocinas pró-inflamatórias levaram à sua utilização no tratamento de pacientes com diversos tipos de câncer e doenças virais. Um dos tratamentos mais difundidos é com Interferon α (IFN- α), que tem se mostrado curativo para indivíduos com hepatite C crônica (especialmente se combinados com outras drogas antivirais), e paliativo para indivíduos acometidos por alguns tipos de câncer (Dantzer, 2009). Justamente, um dos importantes efeitos adversos da terapia de longo prazo com IFN- α é o risco de desenvolver depressão. Estima-se que mais de 50% dos pacientes com hepatite C tratados com IFN α podem apresentar distúrbio depressivo (Raison *et al*, 2005-2006).

Acredita-se que a indução de depressão por IFN- α está relacionada à via da cinurenina. O IFN- α parece estar envolvido na ativação da enzima indolamina 2,3 dioxigenase (IDO), limitante na via da cinurenina que converte L-triptofano (TRP) em N-formilcinurenina. A via da cinurenina pode estar envolvida na depressão de duas formas: uma delas relacionada à depleção do TRP, precursor para a síntese de 5-HT, o que levaria a uma diminuição dos níveis desse neurotransmissor (Capuron *et al*, 2003; Wichers & Maes, 2004); a outra possibilidade envolve os metabólitos neurotóxicos oriundos dessa via, incluindo 3-hidroxi-cinurenina (3-OH-KYN) e ácido quinolínico (QUIN). A neurotoxicidade de 3-OH-KYN relaciona-se à formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a do QUIN à sua propriedade de potente agonista de receptores NMDA glutamatérgicos. Entre as várias consequências da superprodução de ROS, acredita-se que neste caso os mecanismos de toxicidade seriam alterações de membrana celular como destruição de fosfolípidos e redução da viscosidade, ambas podendo influenciar na densidade e/ou

função de receptores serotoninérgicos ou de catecolaminas (Marieke & Maes, 2004). A ação de QUIN como agonista de receptores do tipo NMDA pode levar ao dano neuronal devido a um excesso de estimulação de receptores NMDA e o consequente aumento no influxo de cálcio, gerando uma situação de excitotoxicidade (Marieke & Maes, 2004).

1.4 N-acetilcisteína

A N-acetilcisteína (NAC) é um derivado acetilado do aminoácido L-cisteína. Historicamente NAC tem sido usado como agente mucolítico em doenças crônicas respiratórias, bem como no tratamento da intoxicação por paracetamol. Mais recentemente, estudos em animais e humanos mostraram que NAC pode ser um poderoso antioxidante com potencial papel terapêutico no tratamento de câncer, doenças cardíacas, infecção por HIV, intoxicação por metais pesados e outras doenças associadas com significativo dano oxidativo (Thorne Research, 2002). A ação antioxidante de NAC acontece tanto de forma direta, oriunda de sua própria ação antioxidante contra espécies reativas de oxigênio, como de forma indireta por ser precursora da glutathiona (γ -glutamilcisteinil-glicina; GSH) (Dean *et al*, 2010).

Provas clínicas têm sido realizadas para avaliar o potencial terapêutico de NAC em desordens psiquiátricas que envolvam dano oxidativo e anormalidades no sistema glutamatérgico, como transtorno obsessivo compulsivo, esquizofrenia e depressão, (Dean *et al*, 2010; Machado-Vieira *et al*, 2010; Hashimoto, 2009). A hipótese de benefício terapêutico para estas condições está baseada na constatação de que, aliada à importante atividade antioxidante de NAC como mencionado acima, este ter ação relevante no sistema glutamatérgico. Sabe-se que a glutathiona pode agir no sítio

sensível a REDOX do receptor NMDA modulando a atividade do receptor. A glutathiona também pode quelar o íon zinco, o qual exerce um bloqueio inibitório sobre o receptor NMDA (Hashimoto, 2009; Siegel, 2006; Tokita *et al*, 2011). A ação da NAC também pode dar-se pelo aumento de cisteína extracelular o que levaria a maior ativação do trocador cistina-glutamato presente nos astrócitos aumentando a liberação não-vesicular de glutamato. Esse aumento do glutamato não-vesicular pode ativar receptores metabotrópicos do grupos II (mGluR2/3) que inibem a liberação vesicular do glutamato, diminuindo portanto a ativação de receptores NMDA (Dean *et al*, 2010; Hashimoto, 2009; Olive *et al*, 2011; Tokita *et al*, 2011).

Graças às propriedades antioxidantes da NAC e da glutathiona, NAC tem sido indicada como adjuvante no tratamento de pacientes com hepatite C em tratamento com IFN- α . Doenças crônicas do fígado estão associadas à depleção da glutathiona, situação que supostamente seria melhorada pela utilização do NAC. Outra propriedade da NAC que poderia ser benéfica no caso de pacientes com hepatite C é modulação da expressão da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) nos hepatócitos, a qual é estimulada por citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral (TNF) e as interleucinas 1 e 6. O óxido nítrico (NO) tem consequências deletérias na presença de espécies reativas de oxigênio e participa na fisiopatologia de doenças virais e auto-imunes do fígado. Esse efeito ocorre pelo bloqueio da ativação do promotor da iNOS por NAC, bem como por sua ação na modulação da atividade do fator central de indução da iNOS (NF κ B) (Pereira-Filho *et al*, 2008; Moreno-Otero *et al*, 2010).

Considerando o uso de NAC como droga adjuvante no tratamento de hepatite C por IFN α , a incidência de depressão nestes pacientes durante o tratamento, e as

evidências de atividade antidepressiva do NAC, acreditamos ser de interesse avaliar a atividade antidepressiva do NAC no contexto de depressão induzida por INF α .

2.Objetivos

Esse trabalho teve por objetivos verificar se o interferon- α induz comportamento correlato de depressão em camundongos no modelo de suspensão pela cauda, e verificar se NAC tem ação antidepressiva neste modelo preditivo de atividade antidepressiva em humanos.

3.Artigo científico: – Estudo do efeito tipo-antidepressivo de N-acetilcisteína no aumento de imobilidade indizado por interferon-alfa no teste de suspensão pela cauda

Saldanha, VP; Costa-Campos, L; Elisabetsky, E;

ESTUDO DO EFEITO TIPO-ANTIDEPRESSIVO DE N-ACETILCISTEÍNA NO
AUMENTO DE IMOBILIDADE INDUZIDO POR INTERFERON-ALFA NO TESTE DE
SUSPENSÃO PELA CAUDA EM CAMUNDONGOS

Vanessa P. Saldanha^{1*}; Luciane Costa-Campos¹; Elaine Elisabetsky¹

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

* Autor correspondente:

Vanessa Pereira Saldanha

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, ICBS

Rua Sarmiento Leite, 500/202, 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil.

Fone/FAX: 55 51 33083121

vanessapsaldanha@gmail.com

Título resumido: NAC em comportamento tipo-depressivo induzido por IFN- α

Palavras chave: Interferon- α , Hepatite C, Depressão, Glutamato, N-acetilcisteína

Resumo

Interferon α (IFN- α) tem sido usado em pacientes com alguns tipos de câncer ou doenças virais crônicas, como hepatite C. A terapia com essa citocina para hepatite C, apesar de eficaz, tem importantes efeitos adversos, sendo que depressão pode acometer mais da metade dos pacientes. O desenvolvimento da depressão em pacientes submetidos à imunoterapia parece estar relacionado com a ativação da enzima indolaminina 2,3-dioxigenase IDO pelo IFN- α , o que, em última análise, interfere nos sistemas serotoninérgico e glutamatérgico. A N-acetilcisteína (NAC) tem sido indicada como adjuvante na terapia com IFN- α por, aparentemente, melhorar a ação antiviral. NAC também age no SNC, e evidências sugerem possível atividade antidepressiva. **Objetivo:** Avaliar a atividade antidepressiva de NAC num modelo animal preditivo de atividade antidepressiva com alteração de comportamento induzida por IFN- α . **Material e Métodos:** Foi usado o modelo de suspensão pela cauda. Camundongos (BALBc) (N=8-13) foram tratados com IFN- α (2400U/kg), com ou sem administração prévia de NAC (25mg/kg) ou imipramina (20mg/kg). Tempo de imobilidade analisado por ANOVA. **Resultados:** O tratamento agudo com IFN- α aumentou significativamente ($p < 0,05$) o tempo de imobilidade, efeito prevenido pela administração aguda de NAC, mas não de imipramina. **Conclusão:** Corroborando as observações clínicas, IFN- α induziu em camundongos comportamento correlato de depressão no modelo de suspensão pela cauda. Neste modelo NAC mostrou ação tipo-antidepressiva. Um estudo mais abrangente, com várias doses e modelos experimentais, é necessário para validar estes dados preliminares. Considerando o efeito positivo de antioxidante na atividade antiviral e os efeitos adversos dos antidepressivos, justifica-se a continuidade deste estudo.

1.Introdução

A depressão é um distúrbio afetivo socialmente incapacitante devido a seus sintomas que levam o indivíduo a um estado geral de tristeza, falta de esperança, culpa e ausência de perspectivas em relação ao futuro, podendo inclusive, resultar em morte prematura devido a suicídio (Purves, 2004). Apesar de o sistema monoaminérgico (serotonina, norepinefrina e dopamina) receber maior atenção na neurobiologia da depressão e ser alvo da maioria das drogas utilizadas como tratamento, crescentes evidências sugerem o que o sistema glutamatérgico desempenhe função importante na neurobiologia da depressão (Hashimoto, 2009; Tokita *et al*, 2011).

Outras constatações a respeito da fisiopatologia da depressão também vêm sendo exploradas em vários estudos, sendo uma delas o aumento de marcadores pró-inflamatórios em pacientes com depressão (Capuron & Miller 2011; Dean, 2010; Raison *et al* 2006; Simon *et al*, 2008). Também relacionando condições inflamatórias e estados depressivos é o fato de a depressão poder ser induzida por citocinas pró-inflamatórias utilizadas no tratamento de doenças virais crônicas e tumores (Capuron & Miller, 2004; Raison, 2005-2006, Marieke & Maes, 2004). O interferon α (IFN- α) é uma das citocinas mais utilizadas terapêuticamente por suas atividades antivirais e antiproliferativas (Dantzer, 2009). Entretanto, observa-se um elevado percentual de pacientes submetidos a essa terapia que desenvolvem um quadro de depressão (Dantzer, 2009; Dean, 2010; Raison *et al*, 2005-2006; Marieke & Maes, 2004). Evidências sugerem que essa indução seja proveniente da ativação da enzima indolamina 2,3-dioxigenase (IDO) por IFN- α . A IDO catalisa a reação que converte L-triptofano em N-formilcinurenina, diminuindo os níveis de triptofano disponíveis para a síntese de serotonina (5-HT). A formação de cinurenina também leva a sua metabolização em ácido quinolênico (QUIN) e 3-hidroxi-cinurenina (3-OH-KYN), o primeiro é um potente agonista do receptor

NMDA enquanto o segundo é responsável pela produção de grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio (ROS). Os metabólitos da cinurenina mostraram produzir neurodegeneração em animais e seus níveis estão aumentados em pacientes com doenças neurodegenerativas (Marieke & Maes, 2004).

N-acetilcisteína (NAC) tem sido indicada como adjuvante no tratamento com IFN- α de pacientes com hepatite C. Apesar dos resultados ainda controversos, a utilização de NAC é justificada por sua ação oxidante, assim como por ser precursora da glutathiona (GSH). Pacientes com doenças hepáticas crônicas apresentam diminuição nos níveis de GSH, o que dificulta a neutralização de ROS (Bernhard *et al*, 1998; Moreno-Otero *et al*, 2010; Pereira-Filho *et al*, 2008). Outra linha de pesquisa envolvendo NAC é a possibilidade de sua utilização no tratamento de distúrbios psiquiátricos, como transtorno obsessivo, esquizofrenia e depressão (Dean *et al*, 2010; Machado-Vieira *et al*, 2010; Hashimoto, 2009). O impulso para esses estudos é oriundo do dano oxidativo observado com o desenvolvimento dessas doenças e de anormalidades no sistema glutamatérgico (Dean *et al*, 2010).

Considerando o uso de NAC como droga adjuvante no tratamento de hepatite C por INF- α , a incidência de depressão nestes pacientes durante o tratamento, e as evidências de atividade antidepressiva de NAC, seria de interesse avaliar a atividade antidepressiva de NAC no contexto de depressão induzida por INF- α . Esse trabalho teve por objetivos verificar a indução de comportamento correlato de depressão induzida por INF- α no modelo da cauda suspensa em camundongos, bem como avaliar a ação antidepressiva de NAC nesse modelo.

2. Materiais e Métodos

Animais: Camundongos machos adultos das linhagens Balb/c e CF1 (pesando entre 25-30g para Balb/c e 35-45g para CF1) foram obtidos da Fundação Estadual de Produção e

Pesquisa em Saúde (FEPPS). Os animais foram mantidos no Camundongário Setorial do Depto de farmacologia em ambiente controlado com temperatura de 22°C, ciclo de 12 h luz/escuro e comida e água "*ad libitum*" por pelo menos duas semanas antes do início dos experimentos. Todos os procedimentos foram realizados após aprovação do projeto pelo Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL-UFRGS nº 19981)

Drogas: IFN- α 2a (3000000UI/0,5ml, Roferon A, Roche) foi adquirido da empresa ONCO PROD (Brasil, São Paulo); alíquotas foram diluídas em uma solução de albumina de camundongo 10% e salina 0,9%. Albumina, imipramina e NAC foram adquiridos da Sigma (St Louis, USA). Imipramina e NAC foram diluídos em água destilada. Os tratamentos foram administrados em um volume de 0,1 ml/10 g.

Teste de suspensão pela cauda (tail suspension test, TST): A metodologia no teste de suspensão pela cauda foi a relatada por Steru *et al.* (1985). Após os tratamentos descritos a seguir, os animais foram suspensos pela porção terminal de suas caudas a uma altura de 50 cm acima de uma superfície. A duração da imobilidade foi anotada durante 6 minutos, sendo que os animais foram considerados imóveis apenas quando se balançavam passivamente ou permaneceram com movimentação mínima. Após os experimentos, os animais retornaram à caixa moradia.

Indução do aumento do tempo de imobilidade no TST pelo IFN α -2a: Tratamento crônico: camundongos Balb/c receberam uma administração diária de IFN- α 2a 1600U/g (n=13), solução salina 0,9% mais albumina (n=12), ou somente solução salina 0,9% (n=13) via intraperitoneal (i.p.) durante cinco dias consecutivos. O grupo tratado com solução salina 0,9% foi utilizado para comparação com o grupo tratado com solução salina 0,9% mais

albumina. Após 6h da última administração, os animais foram submetidos ao teste de suspensão pela cauda (TST).

Tratamento agudo: camundongos Balb/c (n=15-16) e CF1 foram divididos em grupos (n=9-11) que receberam administração subcutânea (s.c.) de IFN- α 2a (2400U/g) ou solução salina 0,9% mais albumina. 30 min após os tratamentos foram submetidos ao TST.

Efeito do NAC sobre o aumento do tempo de imobilidade induzido pelo IFN α -2a:
Camundongos Balb/c foram divididos em três grupos (n=12-13) e receberam os seguintes tratamentos: imipramina na dose de 20mg/kg (i.p.), NAC na dose de 25mg/kg (i.p.) ou solução salina 0,9% (i.p.). 30 minutos depois destes tratamentos cada grupo foi subdividido em dois grupos que receberam IFN α -2a 2400U/g (s.c.) ou solução salina 0,9% mais albumina (s.c.). Após 30 minutos da última administração os animais foram submetidos ao TST.

Atividade locomotora: A locomoção foi medida em caixas de atividade (45 × 25 × 20 cm, Albarsch Electronic Equipment, Brasil, Porto Alegre, RS) equipadas com três fotocélulas paralelas que registram automaticamente o número de cruzamentos. Os animais foram divididos em dois grupos e receberam os seguintes tratamentos: solução salina 0,9% (i.p.) ou NAC na dose de 25mg/kg (i.p.). O grupo solução salina foi dividido em dois grupos que receberam após trinta minutos solução salina 0,9% mais albumina ou IFN- α 2a 2400U/g (n=10). O grupo NAC recebeu após trinta minutos a administração de IFN- α 2a 2400U/g (n=10). Os animais foram colocados individualmente nas caixas de atividade locomotora após 30 minutos da última administração por 8 minutos, sendo os primeiros dois minutos considerados como habituação.

Análise estatística: Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão. A comparação entre os grupos IFN α -2a e salina mais albumina foi feita utilizando teste T Student. Para comparação entre os grupos foi utilizada ANOVA de uma via seguido de *post-hoc* Duncan's, utilizando o programa SPSS 8.0.

3.Resultados

A Fig. 1 mostra que o tratamento crônico com IFN- α 2a 1600U/g não induziu diferenças significativas quanto ao tempo de imobilidade em TST em camundongos BALb/c [$F_{(2,35)}=1,432, p<0,252$]. Como não houve diferença entre os grupos tratados com solução salina 0,9% ou solução salina 0,9% mais albumina, o controle negativo nos experimentos subseqüentes foram realizados apenas com salina 0,9% mais albumina. Ainda com camundongos BALb/c, o tratamento agudo com IFN- α 2a 2400U/g (s.c.) induziu aumento significativo no tempo de imobilidade [$F_{(1,29)}=7,999, p<0,008$] (Figura 2A).

A Figura 2B mostra que em camundongos CF1 o tempo de imobilidade no TST não foi modificado pelo tratamento com IFN- α 2a 2400U/g (s.c.) [$F_{(1,19)}=1,468, p<0,8554$].

A figura 3 mostra que o NAC, mas não a imipramina, previniu o aumento no tempo de imobilidade no TST induzido por IFN- α 2a 2400U/g (s.c.) [$F_{(3,37)}=3,809, p<0,018$]. Em relação à atividade locomotora, não houve diferença significativa no número de cruzamentos entre os grupos tratados e o controle [$F_{(2,29)}=0,012, p<0,988$](Figura 4).

4.Discussão

Os resultados deste trabalho devem ser considerados como dados preliminares. Os dados mostram que para indução de comportamento tipo antidepressivo induzido por interferon no modelo de TST o melhor protocolo foi obtido com camundongos da linhagem

Balb/c e administração subcutânea aguda de IFN- α 2400U/kg. No modelo utilizado, a dose de 25mg/kg de NAC reduziu significativamente o tempo de imobilidade, sugerindo ação tipo-antidepressiva. Cabe notar que a administração subcutânea aguda de 2400U/kg ou NAC 25mg/kg não altera a atividade motora.

Indução do comportamento tipo-depressivo induzido por INF- α em roedores foi relatado em camundongos da linhagem ddY com administração aguda e crônica de IFN- α nos modelos de nado forçado e suspensão pela cauda (Makino *et al*, 1998, 1999; Yamano et al, 2000). Estudos anteriores com camundongos Balb/c tratados com INF- α mostram que a administração crônica de 1600U/kg de IFN- α (i.p.) altera o comportamento de desempenho de nado e atividade locomotora (hearing), o que prejudica a interpretação de resultados de testes como o de TST. (Crnic & Segall, 1992; Dunn & Crnic, 1993).

O modelo de suspensão pela cauda é consagrado por seu valor preditivo de atividade antidepressiva em humanos. Pode-se argumentar que neste caso, com o aumento de imobilidade induzido por IFN- α o modelo adquire ainda certo valor de construto, já que IFN- α induz depressão em pacientes. Contudo, uma das limitações deste trabalho está na indução de alteração de comportamento com administração aguda de IFN- α , uma vez que em pacientes submetidos à imunoterapia com IFN- α desenvolvem depressão ao longo do tratamento crônico. Uma limitação deste modelo é sua sensibilidade à administração aguda de antidepressivos, que em clínica se observam apenas depois de 2-4 semanas; existe assim um paralelo entre sensibilidade a antidepressivos e sensibilidade ao agente indutor de aumento de imobilidade.

Outra limitação do estudo é a dose única de NAC usada, e o efeito encontrado deve ser avaliado em outras doses. O efeito tipo-antidepressivo da imipramina na dose de 20mg/kg no

modelo de cauda suspensa é amplamente documentado (Piato *et al*, 2009). É, portanto, interessante que a imipramina nesta dose não tenha reduzido significativamente o tempo de imobilidade quando o aumento de imobilidade foi induzido por IFN- α , inda que não se possa descartar que com a diminuição da dispersão da amostra esta dose de imipramina não atingiria significância estatística. De qualquer forma este dado só pode ser melhor avaliado quando outras doses de imipramina e NAC forem testadas.

A utilização de NAC como adjuvante no tratamento de pacientes com hepatite C foi sugerida devido aos seus efeitos no estresse oxidativo provocado pela infecção no fígado. NAC parece melhorar a condição infecciosa geral por diminuir a lipoperoxidação, restaurando os níveis de glutathione e inibindo a expressão da oxido nítrico sintase induzida (iNOS) (Pereira-Filho *et al*, 2008; Moreno-Otero *et al*, 2010). O oxido nítrico (NO) tem consequências deletérias na presença de espécies reativas de oxigênio e participa assim na fisiopatologia de doenças virais e auto-imunes do fígado (Moreno-Otero *et al*, 2010). Weiss *et al* (1996) também sugerem que NAC tenha atividade antiviral agindo em nível transcricional.

A atividade antidepressiva de NAC parece estar relacionada à sua capacidade de agir diretamente no sistema glutamatérgico, aumentando a concentração de glutamato no meio extracelular por indução da atividade do trocador cistina-glutamato (Dean *et al*, 2010; Machado-Vieira *et al*, 2010; Hashimoto, 2009). A cistina é um dímero formado pela homodimerização da cisteína oriunda da desacetilação de NAC. O aumento do glutamato extracelular diminui a liberação de glutamato vesicular devido à ativação de receptores metabotrópicos glutamatérgicos perisinápticos do grupo II. O aumento da glutathione também pode estar relacionado a sua ação no sistema glutamatérgico, uma vez que o receptor NMDA tem um sítio sensível a GSH que potencializa sua ativação (Dean *et al*, 2010; Hashimoto, 2009). A elevação dos níveis de marcadores pró-inflamatórios em pacientes depressivos

também é um fator relevante, já que NAC parece diminuir a concentração de citocinas pró-inflamatórias (Dean *et al*, 2010). A ação de NAC na redução de expressão e indução de iNOS no fígado (Pereira-Filho *et al*, 2008; Moreno-Otero *et al*,2010) deve ser investigada, dada a importância do NO em vias de sinalização no SNC.

Esses dados, ainda que preliminares, sugerem a atividade antidepressiva de NAC em modelos animais com validade de predição para antidepressivos com alteração de comportamento relacionado à IFN- α . Sendo NAC uma droga disponível, com estudos de segurança mostrando grande janela terapêutica e de pouquíssimos efeitos adversos, além de ter um custo bastante reduzido, a relevância de sua atividade antidepressiva em pacientes em tratamento com IFN- α deve ser considerada.

5. Referências

- Bernhard M C, Junker E, Hettinger A, Lauterburg B H. Time course of total cysteine, glutathione and homocysteine in plasma of patients with chronic hepatitis C treated with interferon- α with and without supplementation with N-acetylcysteine. *J Hepatol* 1998; 28: 751–755
- Capuron L, Miller A H. Cytokines and Psychopathology: Lessons from Interferon- α . *Biol Psychiatry* 2004; 56:819–824
- Capuron L, Miller AH. Immune system to brain signaling: Neuropsychopharmacological implications. *J Pharmthera* 2011; 130:226-238.
- Crnic L S, Segall M A. Behavioral effects of mouse interferons- α and $-\gamma$ and human interferon- α in mice. *Brain Res* 1992; 590: 277-284.
- Dantzer R. Cytokine, sickness behavior, and depression. *Immunol Allergy Clin North Am* 2009; 29(2): 247-264.

- Dean O , Giorlando F, Berk M. N-acetylcysteine in psychiatry: current therapeutic evidence and potential mechanisms of action. *J Psychiatry Neurosci* 2010; 36(2):78-86
- Dunn A L., Crnic L S. Repeated injections of interferon- α in Balb/c mice: behavioral effects. *Brain Behav Immun* 1993; 7:104–111.
- Hashimoto K. Emerging role of glutamate in the pathophysiology of major depressive disorder. *Brain Res Rev* 2009; 61(2):105-23
- Machado-Vieira R, Salvadore G, Ibrahim L, Diaz-Granados N, Zarate C J. Targeting glutamatergic signaling for the development of novel therapeutics for mood disorders. *Curr Pharm Des* 2009; 15(14): 1595-611.
- Maes M, Wichers M C. The role of indolamine 2,3-dioxygenase (IDO) in the pathophysiology of interferon- α -induced depression. *J Psychiatry Neurosci* 2004; 29 (1): 11-7
- Makino M, Kitano Y, Hirohashi M, Takasuna K. Enhancement of immobility in mouse forced swimming test by treatment with human interferon. *Eur J Pharmacol* 1998; 356(1):1-7.
- Moreno-Otero R, Trapero-Marugán M. Hepatoprotective effects of antioxidants in chronic hepatitis C. *World J Gastroenterol* 2010; 16(15): 1937-1938.
- 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 *Arq Gastroenterol* 2008; 45(1):156-62
- Piato A L, Rizon LP, Martins B S, Nunes D S, Elisabetsky E. Antidepressant profile of *Ptychopetalum olacoides* benthana (Marapuama) in mice. *Phytother Res* 2009; 23: 519–524
- Purves D, Augustine G J, Fitzpatrick D, Hall W C, LaMantia A S, McNamara J O, Willians, M S. Neuroscience. 3ª edição. Massachusetts: Sinauer Associates; 2004

- Raison C L., Borisov A S, Broadwell S D, Capuron L, Woolwine B J; Jacobson I, et al.
Depression during pegylated Interferon-Alpha Plus Ribavirin Therapy: Prevalence and Prediction. *J Clin Psychiatry* 2005; 66(1): 41–48.
- Raison C L; Capuron L, Miller A H. Cytokines sing the blues: inflammation and the pathogenesis of depression. *Trends Immunol* 2006; 27(1):24-31
- Simon NM, McNamara K, Chow CW, Maser RS, Papakostas GI, MH Pollack, et al. A Detailed Examination of Cytokine Abnormalities in Major Depressive Disorder. *Eur Neuropsychopharmacol* 2008; 18 (3): 230-233.
- Steru L, Chermat R, Thierry B, Simon P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology* 1985;85(3): 367-70.
- Tokita K, Yamaji T, Hashimoto K. Roles of glutamate signaling in preclinical and/or mechanistic models of depression. *Pharmacol Kiochem Behav* 2011; (in press)
- Weiss L, Hildt E, Hofschneider P H. Anti-hepatitis B virus activity of N-acetyl-L-cysteine (NAC): new aspects of a well-established drug. *Antiviral Res* 1996; 32: 43- 53
- Yamano M, Yuki H, Yasuda S, Miyata K. Corticotropin-releasing hormone receptors mediate consensus interferon- α YM643- Induced depression-like behavior in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 292(1):181-7

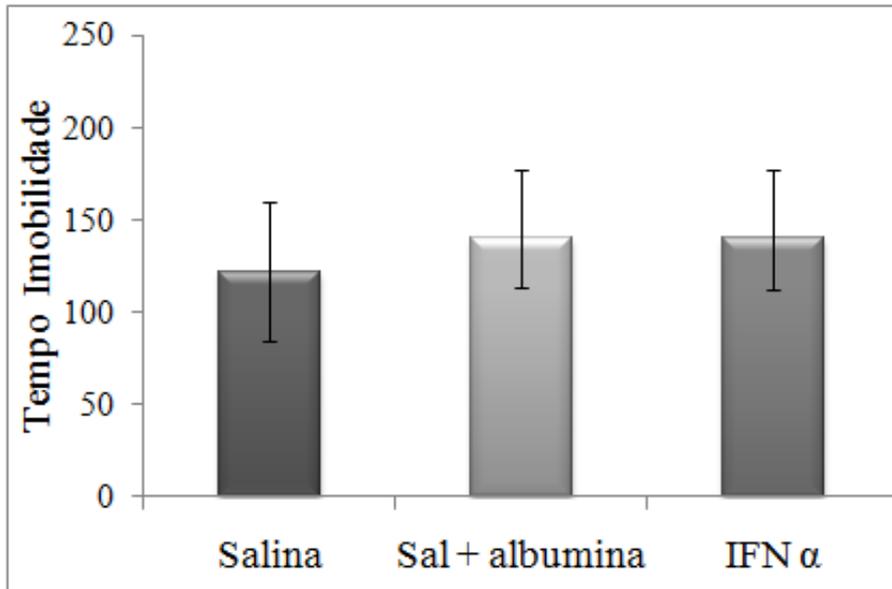


Figura 1- Efeito da administração crônica de IFN- α 1600U/g (i.p.) sobre o tempo de imobilidade no TST em camundongos Balb/c. Os dados estão expressos em média e desvio padrão (ANOVA).

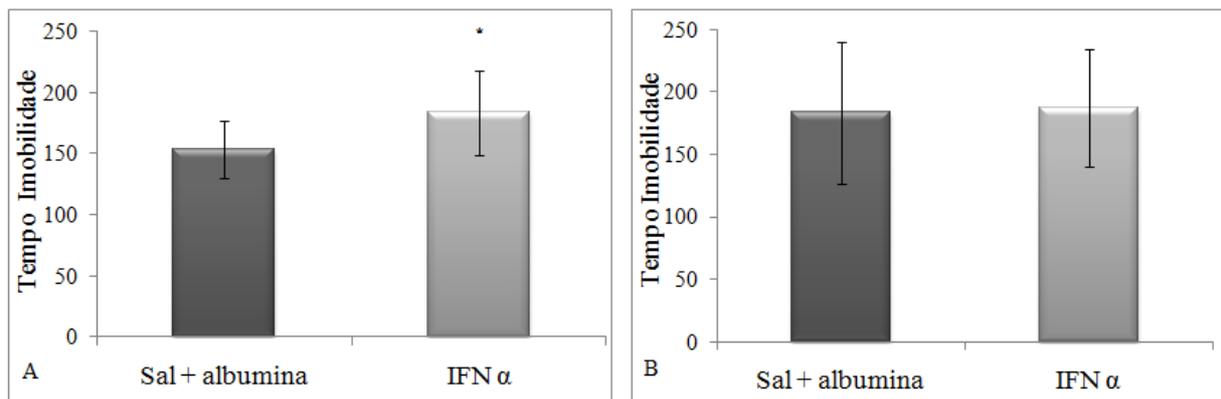


Figura 2: A- Efeito da administração aguda de IFN α 2400U/g (s.c.) sobre o tempo de imobilidade no TST em camundongos Balb/c. Os dados estão expressos em média e desvio padrão. $*=p < 0,05$, Teste t Student. B- Efeito da administração aguda de IFN- α 2a 2400U/g (s.c.) em camundongos da linhagem CF1. Os dados estão expressos em média e desvio padrão (Teste t Student).

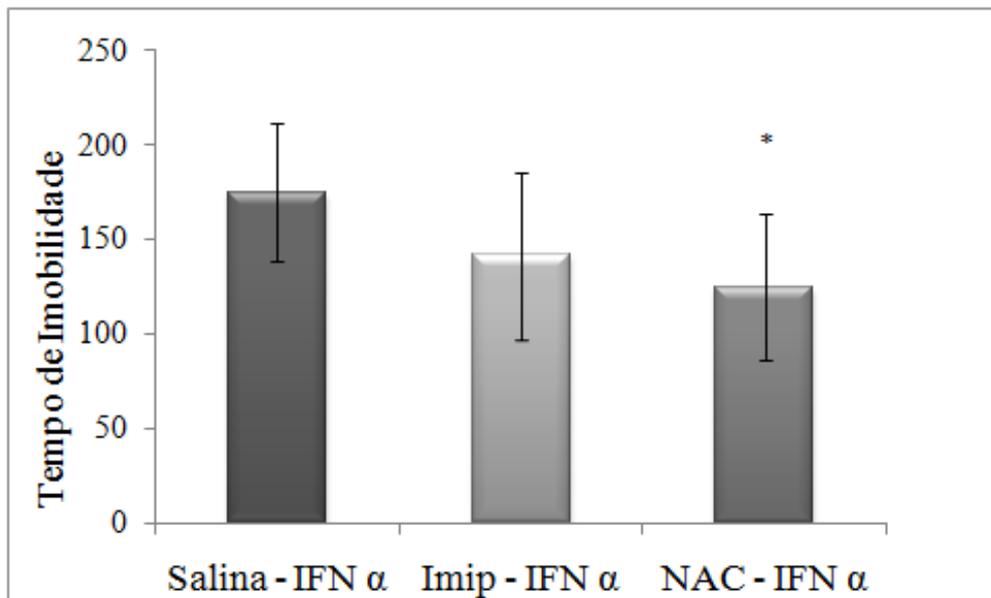


Figura 3: Efeito do NAC (25mg/kg, i.p.) e imipramina (i.p.) sobre o aumento no tempo de imobilidade induzido pelo IFN- α 2a 2400U/g (s.c.). Os dados estão expressos em média e desvio padrão. *= $p < 0,05$, ANOVA seguido de *post hoc* Duncan`s.

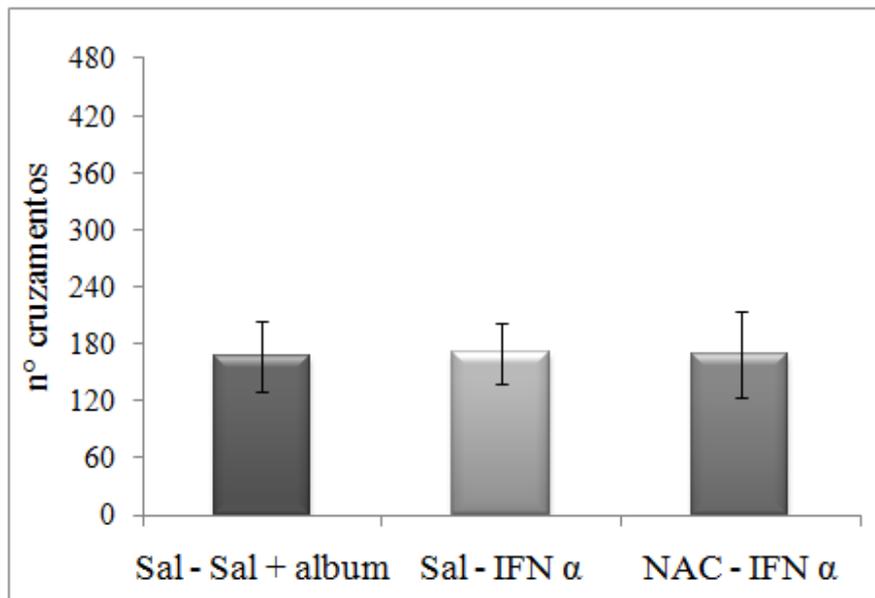


Figura 4: Efeito do NAC 25mg/Kg (ip) e IFN- α 2a 2400U/g (s.c.) sobre a atividade locomotora. Os dados estão expressos em média e desvio padrão (ANOVA).

4. Conclusões e perspectivas

A importância de contribuir para a validação de um modelo animal de comportamento tipo-depressivo no contexto de depressão induzida por IFN- α pode ter grande relevância no cenário da pesquisa científica neste tema. Também tem grande importância o fato de aumentarmos o número de estudos em relação ao potencial de NAC como antidepressivo, especialmente no contexto de depressão induzida por IFN- α , uma vez que NAC tem outras propriedades que contribuem para melhorar a efetividade da imunoterapia.

O conhecimento do mecanismo de ação pelo qual o IFN- α induz a depressão e pelo qual NAC age como antidepressivo se faz necessário tanto para o entendimento da etiologia da depressão, bem como para insights quanto a novos mecanismos de ação relevantes para drogas antidepressivas. Novos estudos pré-clínicos devem ser realizados considerando-se as limitações já apontadas deste trabalho preliminar. Em última análise, os dados obtidos com estudos com modelos animais podem subsidiar e estimular novos estudos clínicos necessários para corroborar a atividade antidepressiva do NAC em pacientes tratados com IFN- α .

Espera-se que os dados preliminares obtidos neste trabalho venham a estimular os estudos mais abrangentes e aprofundados necessários para concluir-se sobre os reais benefícios do NAC como droga adjuvante em pacientes com hepatite C que tem grande prevalência no RS.

5.Referências

Bear M F, Connors B W, Paradiso M A. Neurociências: Desvendando o sistema nervoso. 3º edição. Porto Alegre: Artmed; 2008.

Capuron L., Neurauter G., Musselman D. L., Lawson D. H., Nemeroff C. B., Fuchs D. Interferon-alpha-induced changes in tryptophan metabolism. relationship to depression and paroxetine treatment *Biol Psychiatry* 2003; 54: 906–914.

Capuron L, Miller A H. Cytokines and Psychopathology: Lessons from Interferon- α . *Biol Psychiatry* 2004; 56:819–824

Capuron L, Fornwalt F B, Knight B T, Harvey P D, Ninan P T, Miller A H. Does cytokine-induced depression differ from idiopathic major depression in medically healthy individuals?. *J Affect Disord* 2009; 19: 181–185

Capuron L, Miller AH. Immune system to brain signaling: Neuropsychopharmacological implications. *j.pharmthera* 2011; 130:226-238.

Cipriani A, Barbui C, Geddes J R. Suicide, depression, and antidepressants. *Br Med J* 2005; 330(7488): 373-374

Dantzer R. Cytokine, sickness behavior, and depression. *Immunol Allergy Clin North Am* 2009; 29(2): 247-264.

Dean O , Giorlando F, Berk M. N-acetylcysteine in psychiatry: current therapeutic evidence and potential mechanisms of action. *J Psychiatry Neurosci* 2010; 36(2):78-86

Evans D L, Charney D S, Lewis L, Golden R N, Gorman J M, Krishnan K R, et al. Mood disorders in the medically ill: scientific review and recommendations. *Biol Psychiatry* 2005; 58: 175–189.

Hashimoto K. Emerging role of glutamate in the pathophysiology of major depressive disorder. *Brain Res Rev* 2009; 61: 105-123

Kiyohara C, Yoshimasu K. Molecular epidemiology of major depressive disorder. *Environ Health Prev Med* 2009; 14: 71-87.

Licinio J, Wong M-L. Depression, antidepressants and suicidality: a critical appraisal. *Nat Rev Drug Discov* 2005; 4: 165-171

Lopez A, Murray C. The global burden of disease, 1990-2020. *Nat Med* 1998; 4(11): 1241-1243

Machado-Vieira R, Salvadore G, Ibrahim L, Diaz-Granados N, Zarate C J. Targeting glutamatergic signaling for the development of novel therapeutics for mood disorders. *Curr Pharm Des* 2009; 15(14): 1595-611.

Maes M, Wichers M C. The role of indolamine 2,3-dioxygenase (IDO) in the pathophysiology of interferon- α -induced depression. *J Psychiatry Neurosci* 2004; 29 (1): 11-7

Moreno-Otero R, Trapero-Marugán M. Hepatoprotective effects of antioxidants in chronic hepatitis C. *World J Gastroenterol* 2010; 16(15): 1937-1938.

Olive F M, Cleva R M, Kalivas P W, Malcolm R J. Glutamatergic medications for the treatment of drug and behavioral addictions. *Pharmacol biochem Behav* 2011; (in press)

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 *Arq Gastroenterol* 2008; 45(1):156-62

Raison C L., Borisov A S, Broadwell S D, Capuron L, Woolwine B J; Jacobson I, et al. Depression during pegylated Interferon-Alpha Plus Ribavirin Therapy: Prevalence and Prediction. *J Clin Psychiatry* 2005; 66(1): 41–48.

Raison C L; Capuron L, Miller A H. Cytokines sing the blues: inflammation and the pathogenesis of depression. *Trends Immunol* 2006; 27(1):24-31

Rang H P, Dale M M. Farmacologia. 6º edição. São Paulo: Elsevier; 2007

Siegel G, Albers W R, Brady S, Price D. Basic Neurochemistry. 7º edição. São Paulo: Elsevier; 2006

Simon NM, McNamara K, Chow CW, Maser RS, Papakostas GI, MH Pollack, et al. A Detailed Examination of Cytokine Abnormalities in Major Depressive Disorder. *Eur Neuropsychopharmacol* 2008; 18 (3): 230-233.

Thorne Research. N-acetylcysteine. *Alternative Medicine Review Monographs* 2002: 281- 286

Tokita K, Yamaji T, Hashimoto K. Roles of glutamate signaling in preclinical and/or mechanistic models of depression. *Pharmacol Kiochem Behav* 2011; (in press)

