

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS – UNIFAL - MG

NATÁLIA GABRIELE HÖSCH

**EFEITO NEUROPROTETOR DA *N* – ACETILCISTEÍNA SOBRE A NEUROPATIA
ALCOÓLICA INDUZIDA EXPERIMENTALMENTE EM RATOS.**

**ALFENAS/MG
2015**

NATÁLIA GABRIELE HÖSCH

**EFEITO NEUROPROTETOR DA *N* – ACETILCISTEÍNA SOBRE A NEUROPATIA
ALCOÓLICA INDUZIDA EXPERIMENTALMENTE EM RATOS**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Fisiologia e Farmacologia da Dor.

Orientadora: Profa. Dra. Jalile Amin Naves Ventura.

ALFENAS/MG

2015

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Hösch, Natália Gabriele.

Efeito neuroprotetor da *N* - acetilcisteína sobre a neuropatia alcoólica induzida experimentalmente em ratos. / Natália Gabriele Hösch. -- Alfenas/MG, 2015.

93 f.

Orientadora: Jalile Amin Naves Ventura.

Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Federal de Alfenas, 2015.

Bibliografia.

1. Neuropatia alcoólica. 2. Etanol. 3. Acetilcisteína. I. Ventura, Jalile Amin Naves. II. Título.

CDD-615



NATÁLIA GABRIELE HÖSCH

**“EFEITO NEUROPROTETOR DA N – ACETILCISTEÍNA SOBRE A NEUROPATIA
ALCOÓLICA INDUZIDA EXPERIMENTALMENTE EM RATOS”**

A Banca Examinadora, abaixo assinada, aprova a
Dissertação apresentada como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre em Ciências
Fisiológicas pela Universidade Federal de Alfenas.
Área de concentração: Fisiologia e Farmacologia da
Dor.

Aprovado em: 27/02/2015

Profa. Dra. Jalile Amin Naves Ventura
Instituição: Universidade Federal de Alfenas – MG
– UNIFAL – MG

Assinatura: _____

Prof. Dr. Guilherme Rabelo de Souza
Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão
Preto – Universidade de São Paulo – FMRP – USP

Assinatura: _____

Profa. Dra. Maísa Ribeiro Pereira Lima Brigagão
Instituição: Universidade Federal de Alfenas – MG
– UNIFAL – MG

Assinatura: _____

Dedico este trabalho primeiramente à Deus e, depois, à minha mãe, que tanto amo.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Jalile Amin Naves Ventura, orientadora deste trabalho. Pelo seus ensinamentos, apoio e dedicação. Pela força e entusiasmo transmitidos. Exemplo não só de profissional, mas também de ser humano. Muito Obrigada.

À Profa. Dra. Sílvia Graciela Ruginsk Leitão, profissional a ser admirada e respeitada. Obrigada pelos seus ensinamentos, apoio e dedicação.

À Deus, por estar sempre iluminando meu caminho e me guiando em tudo que faço na vida. Só tenho a agradecer.

À Universidade Federal de Alfenas – MG e ao Departamento de Ciências Fisiológicas pela oportunidade de poder obter o título de mestre.

À CAPES, pelo apoio financeiro através da Bolsa de Estudos.

Aos animais, que prestimosamente colaboraram para a execução deste trabalho.

À minha mãe, Elena, pelas orações e palavras, que me confortaram e me fizeram continuar nesta jornada.

À minha avó, Lourdes, pelo apoio, orações e por acreditar no meu sonho.

Ao meu avô, Yukio, que mesmo não estando mais aqui entre nós, garantiu que esse sonho fosse realizado.

À colega de trabalho e amiga Rayssa, que compartilhou deste caminho comigo e que foi fundamental para o desenvolvimento deste trabalho. Obrigada por tornar a rotina laboratorial mais extrovertida.

Às colegas Mara e Tatiane, companheiras de laboratório, pelo convívio sadio e pelos bons momentos compartilhados.

Ao amigo Délcio, por partilhar deste momento comigo e pelas risadas compartilhadas nas horas mais difíceis.

Ao amigo Leandro, pela força, conhecimentos e apoio durante toda a trajetória.

Aos colegas e funcionários do Laboratório de Fisiologia, pela ajuda e momentos de descontração.

Ao Prof. Dr. Rômulo Novaes, pelos ensinamentos compartilhados.

Aos membros da banca examinadora, meu muito obrigado – ainda que antecipadamente – por suas sugestões e críticas que só tenderão a acrescentar qualidade a este trabalho.

Há muito mais a quem agradecer... A todos aqueles que, embora não nomeados, brindaram – me com seus estimáveis apoios em distintos momentos e por suas presenças afetivas, o meu reconhecido e carinhoso muito obrigado.

Todos vocês foram co – autores deste trabalho!

“Deus nos fez perfeitos e não escolhe os capacitados, capacita os escolhidos. Fazer ou não fazer algo só depende da nossa vontade e perseverança.”

(EINSTEIN, 1929)

RESUMO

A ingestão crônica de etanol é capaz de gerar lesões no sistema nervoso periférico que podem ocasionar uma neuropatia periférica dolorosa. A neuropatia alcoólica é caracterizada pela dor em queimação espontânea, hiperalgesia e alodinia. Evidências apoiam a ideia de que o estresse oxidativo pode ser o gatilho bioquímico para o desenvolvimento da neuropatia alcoólica, visto que, o etanol tem a capacidade de aumentar esse estresse através da formação de espécies reativas do oxigênio, danificar estruturas bioquímicas e de esgotar as reservas de antioxidantes endógenos. A *N*-acetilcisteína (NAC) é um antioxidante e exerce esta função por servir como substrato da biossíntese da glutatona e ao capturar espécies reativas do oxigênio. Portanto, o objetivo deste estudo foi investigar a ação protetora da NAC na neuropatia alcoólica induzida. Foram utilizados ratos Wistar divididos em 4 grupos experimentais (grupo Controle, grupo Etanol, grupo NAC + Etanol e grupo NAC) contendo uma média de 10 animais por grupo. Os grupos foram tratados por 10 semanas e os testes nociceptivos, Randall Selitto (hiperalgesia mecânica), Tail Flick (hiperalgesia térmica) e von Frey eletrônico (alodinia), foram realizados no dia 0 (antes do tratamento), quarta, sexta, oitava e décimas semanas. O teste Rota – rod também foi utilizado para avaliar o equilíbrio e coordenação motora dos animais, este teste foi realizado no dia 0 e na 10ª semana de tratamento. Além dos testes comportamentais, na 10ª semana de tratamento realizou-se imunofluorescência para investigar a expressão de *c*-Fos em áreas cerebrais que estão relacionadas com a nocicepção (Núcleo Paraventricular hipotalâmico (PVN), núcleo Dorsal da Rafe (NDR) e Substância Cinzenta Periaquedutal (PAG)). Os resultados mostraram que os animais tratados com etanol apresentaram uma diminuição significativa no limiar nociceptivo, como foi evidenciado a partir da diminuição do tempo de latência no teste Tail Flick e da diminuição do limiar de retirada de pata no teste Randall Selitto e von Frey eletrônico em relação à média basal (dia 0). O tratamento com NAC durante 10 semanas, por sua vez, foi capaz de manter elevado o limiar nociceptivo térmico no teste Tail Flick e manteve elevado também o limiar nociceptivo mecânico no teste Randall Selitto e von Frey eletrônico em relação ao grupo Etanol. Uma diminuição na latência de queda no teste Rota – rod foi observada no grupo Etanol após 10 semanas de tratamento em relação ao dia 0. No entanto, o tratamento com NAC foi capaz de manter elevado a latência de queda em relação ao grupo que só recebeu etanol. Para a imunofluorescência, os animais tratados com etanol e que não receberam NAC apresentaram um aumento significativo do número de neurônios imunorreativos a *c*-Fos no NDR, PVN e PAG em comparação aos animais controle.

Já o tratamento com NAC preveniu este aumento induzido pelo Etanol. Desta forma, esses resultados sugerem que a NAC exerce uma ação antinociceptiva e neuroprotetora na neuropatia alcoólica.

Palavras - chave: Neuropatia alcoólica. Etanol. Acetilcisteína.

ABSTRACT

Chronic alcohol consumption produces a painful peripheral neuropathy which is characterized by spontaneous burning pain, hyperalgesia and allodynia. Scientific evidences support oxidative stress as the biochemical trigger for the development of alcoholic neuropathy, since alcohol consumption increases the amounts of free radicals and damage biochemical structures, in addition to deplete endogenous antioxidant reserves. *N* - acetylcysteine (NAC) is an antioxidant agent that facilitates the biosynthesis of glutathione and capture reactive oxygen species. Therefore, the aim of this study was to investigate the protective effect of NAC on induced alcoholic neuropathy. Wistar rats were divided into 4 experimental groups (Control group, Ethanol group, NAC + Ethanol group and NAC group) containing an average of 10 animals each group. Nociceptive tests, Randall Selitto (mechanical hyperalgesia), Tail flick (thermal hyperalgesia) and electronic von Frey (allodynia) were performed at the day called 0 (before treatment) and at the fourth, sixth, eighth and tenth weeks. Rota-rod test was also performed to assess the balance and motor coordination of the animals, at day zero and at the tenth week. Immunofluorescence investigated the expression of c - Fos at brain areas associated with nociception (Paraventricular Nucleus of Hypothalamus (PVN), Dorsal Raphe Nuclei (DRN) and Periaqueductal Gray (PAG)). Results showed that Ethanol group showed a significant decrease in the nociceptive threshold, as evidenced from the reduced latency time in Tail flick test and decreased paw withdrawal threshold in Randall Sellito test and electronic von Frey compared to the mean baseline (day 0). NAC + Ethanol group at 10th week, in turn, maintained a high thermal nociceptive threshold at Tail flick test and also retained high mechanical nociceptive threshold at Randall Selitto and electronic von Frey relative to Ethanol group. A decrease in the falling latency at Rota-rod test was observed in the ethanol group after 10 weeks of treatment compared to day 0. However, NAC + Ethanol group kept the high values of falling latency compared to Ethanol group. Immunofluorescence tests showed, for Ethanol group, a significant increase in the number of immunoreactive neurons for c-Fos in DRN, PVN and PAG if compared to Control group. Once again, NAC prevented the increase induced by ethanol. Thus, these results suggest that NAC exerts a neuroprotective and an antinociceptive effect in alcoholic neuropathy.

Keywords: alcoholic neuropathy. Ethanol. Acetylcysteine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Diagrama ilustrando as diferentes vias envolvidas na fisiopatologia da neuropatia alcoólica.....	28
Figura 2	- Esquema representativo da formação da Glutathione a partir da <i>N</i> – acetilcisteína (NAC).....	30
Figura 3	- Estrutura molecular da <i>N</i> – acetilcisteína.....	31
Figura 4	- Esquema representativo do protocolo experimental para os testes nociceptivos que foram realizados.....	40
Figura 5	- von Frey eletrônico utilizado para verificar a alodinia mecânica nos ratos de cada grupo experimental.....	41
Figura 6	- Randall Selitto utilizado para verificar a hiperalgesia mecânica nos ratos de cada grupo experimental.....	42
Figura 7	- Tail Flick utilizado para verificar a hiperalgesia térmica nos ratos de cada grupo experimental.....	43
Figura 8A	- Esquema representativo do protocolo experimental para o teste de locomoção forçada em cilindro giratório (Rota – Rod).....	44
Figura 8B	- Rota – Rod utilizado para avaliar o equilíbrio e coordenação motora dos ratos de cada grupo experimental.....	45
Figura 9A	- Esquema representativo do protocolo experimental para a técnica de Imunofluorescência.....	46
Figura 9B	- Núcleo Dorsal da Rafe (NDR), em suas porções ventrolateral, dorsal e ventral. F: fascículo longitudinal medial.....	48

Figura 9C	- Núcleo Paraventricular do Hipotálamo (PVN), com suas porções parvocelulares (Dorsal cap, PaDC; medial, PaMP; e ventral, PaV) e magnocelular (lateral, PaLM).....	48
Figura 9D	- Substância Cinzenta Periaquedutal (PAG), com suas porções dorsomedial, dorsolateral e ventrolateral. A: aqueduto de Sylvius.....	48
Figura 10A	- Fotomicrografias representativas do Núcleo Dorsal da Rafe (NDR) de animais controles e tratados com Etanol que receberam ou não <i>N</i> – acetilcisteína (NAC), mostrando a marcação fluorescente para a proteína c – Fos (em vermelho). Escala: 50 µm. F: fascículo longitudinal medial.....	61
Figura 10B	- Fotomicrografias representativas do Núcleo Paraventricular do hipotálamo (PVN) de animais controles e tratados com Etanol que receberam ou não <i>N</i> -acetilcisteína (Nac), mostrando a marcação fluorescente para a proteína c-Fos (em vermelho). Escala: 50 µm. 3V: terceiro ventrículo.....	63
Figura 10C	- Fotomicrografias representativas da Substância Cinzenta Periaquedutal (PAG) de animais controles e tratados com Etanol que receberam ou não <i>N</i> -acetilcisteína (NAC), mostrando a marcação fluorescente para a proteína c-Fos (em vermelho). Escala: 50 µm. A: aqueduto de Sylvius.....	64
Figura 11	- Exame macroscópico do estômago dos animais de cada grupo após as 10 semanas de tratamento.....	68

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1A	- Efeito do tratamento crônico da <i>N</i> – acetilcisteína (NAC) na alodinia mecânica induzida por etanol, o teste nociceptivo foi realizado utilizando o von Frey eletrônico.....	51
Gráfico 1B	- Efeito do tratamento crônico com etanol na alodinia mecânica pelo teste von Frey eletrônico.....	52
Gráfico 2A	- Efeito do tratamento crônico da <i>N</i> – acetilcisteína (NAC) na hiperalgesia mecânica induzida por etanol, o teste nociceptivo foi realizado utilizando o teste Randall Selitto.....	54
Gráfico 2B	- Efeito do tratamento crônico com etanol na hiperalgesia mecânica pelo teste Randall Selitto.....	55
Gráfico 3	- Efeito do tratamento crônico da <i>N</i> – acetilcisteína (NAC) na hiperalgesia térmica induzida por etanol, o teste nociceptivo foi realizado utilizando o teste de retirada de cauda (Tail Flick).....	57
Gráfico 4	- Efeito do tratamento crônico da <i>N</i> – acetilcisteína (NAC) no equilíbrio e coordenação motora dos animais com neuropatia induzida por etanol através do teste de locomoção forçada em cilindro giratório (Rota – Rod).....	59
Gráfico 5A	- Número de neurônios imunorreativos a <i>c</i> – Fos no NDR.....	61
Gráfico 5B	- Número de neurônios imunorreativos a <i>c</i> – Fos nas porções parvocelulares do PVN.....	62
Gráfico 5C	- Número de neurônios imunorreativos a <i>c</i> – Fos na porção lateral magnocelular do PVN.....	62
Gráfico 5D	- Número de neurônios imunorreativos a <i>c</i> – Fos na PAG.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Tratamento dos grupos com suas respectivas drogas.....	39
Tabela 2	- Ganho de peso (g) dos animais de cada grupo ao longo das 10 semanas de tratamento.....	66
Tabela 3	- Atividade locomotora no campo aberto dos animais de cada grupo após 10 semanas de tratamento.....	67

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

AC	- Comissura anterior
ACTH	- Hormônio adrenocorticotrófico
AVP	- Vasopressina
CAT	- Catalase
CREB	- Proteína ligadora do elemento responsivo ao Monofosfato Cíclico de Adenosina
CRH	- Hormônio liberador de corticotrofina
DNA	- cido desoxirribonucleico
g	- Gramas
GABA	- cido aminobutírico
GPx	- Glutathiona Peroxidase
GSH	- Glutathiona
GST	- Glutathiona – S – transferase
H₂O₂	- Peróxido de hidrogênio
IGF - 1	- Fator de crescimento semelhante a insulina 1
IL – 1 – β	- Interleucina – 1 – β
Kg	- Quilograma
L - Cys	- L – cisteína
L - Glu	- cido – L – glutâmico
L - Gly	- L – glicina
MAP quinase	- Proteínas quinases ativadas por mitógenos
MDA	- Malondialdeído
mGlu1	- Receptor de glutamato metabotrópico 1

mGlu5	- Receptor de glutamato metabotrópico 5
mGlu5	- Receptores de glutamato metabotrópicos
mL	- Mililitros
NAC	- <i>N</i> – acetilcisteína
NaN₃	- Azida de sódio
NDR	- Núcleo dorsal da rafe
NF_κB	- Fator nuclear Kappa B
•NO	- Óxido nítrico
•OH	- Hidroxila
OMS	- Organização Mundial da Saúde
OT	- Ocitocina
PaDC	- Porções dorsomedial cap
PAG	- Substância cinzenta periaquedutal
PaLM	- Porção lateral magnocelular
PaMM	- Porção medial magnocelular
PaMP	- Porção medial parvocelular
PaV	- Porção parvocelular ventral
PBS	- Tampão fosfato – salina
PeM	- Porção periventricular
PKC	- Proteína quinase C
PVN	- Núcleo paraventricular do hipotálamo
ROS	- Espécies reativas do oxigênio
RPM	- Rotações por minuto
s	- Segundos
SODs	- Superóxido dismutases

SON	- Núcleo supraóptico
TBE	- Tribromoetanol
TGF – β – 1	- Fator de crescimento tumoral – β – 1
TNF – α	- Fator de necrose tumoral – α
v/v	- Volume para volume

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
1.1	ETILISMO	21
1.2	PATOLOGIAS RELACIONADAS AO ETILISMO	22
1.3	NEUROPATIA ALCOÓLICA PERIFÉRICA.....	25
1.4	<i>N</i> – ACETILCISTEÍNA	29
2	JUSTIFICATIVA	34
3	OBJETIVOS	35
3.1	OBJETIVO GERAL.....	35
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
4	MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1	ANIMAIS	36
4.2	DROGAS UTILIZADAS	36
4.3	PROCEDIMENTOS/PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS	37
4.3.1	Peso dos animais.....	37
4.3.2	Campo aberto.....	37
4.3.3	Análise macroscópica do estômago.....	38
4.3.4	Indução da neuropatia alcoólica	38
4.3.5	Tratamento com as drogas	39
4.3.6	Testes comportamentais	40
4.3.6.1	<i>Alodinia mecânica</i>	40
4.3.6.2	<i>Hiperalgesia mecânica</i>	41
4.3.6.3	<i>Hiperalgesia térmica</i>	42
4.3.7	Teste da locomoção forçada em cilindro giratório (Rota – Rod)	44

4.3.7.1	<i>Procedimento experimental para o teste da locomoção forçada em cilindro giratório (Rota – Rod)</i>	44
4.3.8	Expressão da proteína c – Fos em sítios específicos do sistema nervoso central...	46
4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	49
5	RESULTADOS	50
5.1	NAC PREVINE O DESENVOLVIMENTO DA ALODINIA MECÂNICA NA NEUROPATIA INDUZIDA POR ETANOL	50
5.2	NAC PREVINE O DESENVOLVIMENTO DA HIPERALGESIA MECÂNICA NA NEUROPATIA INDUZIDA POR ETANOL	53
5.3	NAC PREVINE O DESENVOLVIMENTO DA HIPERALGESIA TÉRMICA NA NEUROPATIA INDUZIDA POR ETANOL	56
5.4	NAC PREVINE ALTERAÇÕES NO EQUILÍBRIO E COORDENAÇÃO MOTORA NA NEUROPATIA INDUZIDA POR ETANOL	58
5.5	NAC PREVINE AUMENTO NO NÚMERO DE NEURÔNIOS IMUNORREATIVOS PARA C- FOS INDUZIDO PELO ETANOL.....	60
5.6	PESO DOS ANIMAIS	65
5.7	ETANOL E NAC NÃO AFETARAM A MOTIVAÇÃO DOS ANIMAIS EM EXPLORAR O AMBIENTE	67
5.8	ETANOL NÃO FOI CAPAZ DE INDUZIR ÚLCERA GÁSTRICA NOS ANIMAIS TRATADOS COM ETANOL COM OU SEM NAC	68
6	DISCUSSÃO	69
7	CONCLUSÃO	81
	REFERÊNCIAS	82

1 INTRODUÇÃO

O consumo crônico de etanol está associado a vários tipos de danos neurológicos, tais como a encefalopatia de Wernicke, demência e a polineuropatia periférica (HILLBOM; WENNEBERG, 1984; WINDEBANK, 1993).

O mecanismo preciso dos efeitos do etanol no sistema nervoso periférico ainda não é bem estabelecido, no entanto, deficiência nutricional, efeito tóxico direto do etanol nos axônios ou corpos celulares de neurônios, e formação de espécies reativas do oxigênio (ROS) são algumas explicações propostas para o efeito do etanol nos nervos periféricos. (TAN et al., 1984).

A ingestão crônica de etanol é capaz de produzir uma neuropatia periférica dolorosa, para a qual ainda não existe uma forma terapêutica eficaz, isto se deve, principalmente, à falta da compreensão da sua fisiopatologia (TIWARI et al., 2009).

A neuropatia alcoólica periférica é caracterizada por uma degeneração walleriana e uma redução na mielinização das fibras neurais (YERDELEN; KOC; UYSAL, 2008), e, atualmente, existem controvérsias que circundam o papel patogênico do etanol no desenvolvimento da neuropatia alcoólica. Narita et al. (2007) mostraram que o etanol possui um efeito neurotóxico direto sobre a medula espinhal e organelas neuronais, e que o acetaldeído seria um dos causadores diretos desse efeito.

Além do efeito neurotóxico, o etanol tem a capacidade de aumentar o estresse oxidativo através da formação de ROS¹, danificar estruturas bioquímicas (MONTOLIU et al., 1994), e de esgotar as reservas de antioxidantes endógenos. Mediante a isso, um grande número de evidências surgiram para apoiar a idéia de que o estresse oxidativo pode ser o gatilho bioquímico para o desenvolvimento deste tipo de neuropatia (BOSCH – MORELL et al., 1998).

Sabendo que não há um tratamento eficaz e que o estresse oxidativo pode ser o causador da fisiopatologia envolvida na neuropatia alcoólica, há a necessidade de desenvolver novos tratamentos que garantam a melhora dos nervos danificados e que também previnam o desenvolvimento desta patologia, e o uso de antioxidantes pode garantir esta melhora e prevenção.

A *N* – acetilcisteína (NAC), é um antioxidante pertencente ao grupo tiol e, historicamente, vem sendo utilizada como um agente mucolítico no tratamento de várias

¹ Espécies reativas do oxigênio

doenças pulmonares (GRASSI; MORANDINI, 1976), e é considerado o fármaco de eleição para o tratamento do envenenamento por paracetamol (LAUTERBURG et al., 1983).

A NAC² exerce sua função antioxidante ao facilitar a biossíntese da glutathiona (GSH) e pela captura de ROS³ formadas durante o estresse oxidativo (OCAL et al., 2004). Ela oferece proteção contra lesões no fígado induzidas por vários hepatotoxinas, tais como o etanol (RONIS et al., 2005) e metanol (RAZA et al., 2003). Além da sua ação hepatoprotetora, a NAC também é amplamente utilizada como antiangiogênico (ALBINI et al., 2001), antifibrótico (FILHO et al., 2008), neuroprotetor (ESKIOCAK et al., 2008), renoprotetor (HEYMAN et al., 2003) e como um agente quelante para o tratamento de intoxicação por metal pesado (MODI et al., 2006).

Assim, frente à capacidade antioxidante da NAC, o objetivo deste estudo foi, através de testes comportamentais e da expressão da proteína c - Fos, investigar a sua ação protetora na neuropatia alcoólica induzida.

1.1 ETILISMO

A dependência de etanol (etilismo) é uma doença crônica e multifatorial, ou seja, existem diversos fatores que contribuem para o seu desenvolvimento, entre os quais, a quantidade e frequência do consumo do etanol, a condição de saúde do indivíduo, além de fatores genéticos, psicossociais e ambientais. Entretanto, apesar da grande influência dos precedentes acima citados, não são eles que definem o diagnóstico de dependência (CISA, 2014). Este por sua vez, é estabelecido como um conjunto de eventos comportamentais, cognitivos e fisiológicos que se desenvolvem após o uso repetido do etanol, tipicamente associado aos seguintes sintomas: forte desejo de beber, dificuldade de controlar o consumo, uso continuado apesar das consequências negativas, maior prioridade dada ao uso da substância em detrimento de outras atividades e obrigações, necessidade de doses maiores de etanol para atingir o mesmo efeito obtido com doses anteriores inferiores e, finalmente, estado de abstinência física quando da falta do consumo do etanol (OMS, 2010).

O uso nocivo do etanol é um dos fatores de risco de maior impacto para a morbidade, mortalidade e incapacidades em todo o mundo e, pode estar relacionado a 3,3 milhões de mortes

² N - acetilcisteína

³ Espécies reativas do oxigênio

a cada ano. Desta forma, aproximadamente 6% das mortes no mundo são total ou parcialmente atribuídas ao etanol (CISA, 2014).

Atualmente, de acordo com a OMS⁴, o consumo de etanol é um dos mais graves problemas de saúde pública, ocupando a terceira posição entre os principais fatores de risco de saúde mundial. Estima-se que cerca de dois bilhões de pessoas em todo o mundo consumam bebidas alcoólicas e que 76,3 milhões fazem o uso abusivo do etanol. Assim, esta droga é considerada como uma das mais populares no mundo. No Brasil, a dependência ao etanol atinge 12% dos adultos, sendo, o uso do etanol, também responsável por 90% das mortes associadas ao uso concomitante com outras drogas, ou seja, o etanol mata mais do que as drogas ilícitas (PORTAL BRASIL, 2012), e ainda é apontado como um dos principais fatores responsáveis pela alta incidência dos acidentes de trânsito com vítimas, costuma-se considerar que o uso do etanol é causador da metade ou um quarto dos acidentes com vítimas fatais no trânsito (ABREU; LIMA; ALVES, 2006).

Além do que já foi exposto, nos últimos dez anos, o uso nocivo do etanol foi responsável por 3,8% do índice de mortalidade mundial, sendo considerado então como um dos principais fatores de riscos para transtornos neuropsiquiátricos e de doenças não transmissíveis, como a cirrose hepática, alguns tipos de câncer, como o de esôfago, e de doenças cardiovasculares (OMS, 2011).

Desta forma, o uso abusivo do etanol pode trazer consequências sérias para a saúde, já que o seu consumo exagerado pode danificar significativamente os órgãos, debilitar o sistema imune e contribuir para o desenvolvimento de várias patologias.

1.2 PATOLOGIAS RELACIONADAS AO ETILISMO

Como mencionado anteriormente, o uso prejudicial do etanol é um problema mundial, representando o terceiro maior fator de risco no mundo para doenças e incapacidades, sendo considerado assim, como elemento gerador de 60 tipos de patologias e lesões, e coadjuvante na causa de pelo menos outras 200 doenças (ROCCO et al., 2014).

Após a ingestão, o etanol é capaz de se distribuir por todo o corpo e rapidamente atravessar a barreira hematoencefálica, gerando danos em vários tipos de tecidos tais como o

⁴ Organização Mundial da Saúde

fígado, músculos cardíaco e esquelético, e o sistema nervoso central e periférico (CHOPRA; TIWARI, 2011). Na maioria dos países industrializados, cerca de 25% dos casos de cirrose hepática tem como causa principal o uso abusivo do etanol (MANN; SMART; GOVONI, 2003; SINGAL; ANAND, 2013). No entanto, geralmente os indivíduos expostos cronicamente ao etanol desenvolvem, principalmente, esteatose hepática, que é a primeira resposta do fígado ao consumo exagerado do etanol. Apenas a minoria desenvolve cirrose hepática (KAMPER – JORGENSEN et al., 2004; MANDAYAM; JAMAL; MORGAN, 2004).

Muitas hipóteses vêm sendo propostas para explicar o mecanismo patogênico das doenças hepáticas causadas pelo etanol. Primeiramente, o fígado é o principal órgão responsável por metabolizar o etanol. Assim, é possível que o etanol e seus metabólitos, como o acetaldeído, exerçam um efeito citotóxico direto, atuando como hepatotoxinas (SETH et al., 2011). No caso do acetaldeído, este tem a capacidade de danificar o fígado por desencadear inflamação, remodelação da matriz extracelular e fibrogênese (MELLO et al., 2008). Além disso, o abuso crônico do etanol garante a produção de espécies reativas do oxigênio (ROS) que são as principais responsáveis pelo perfil pró – inflamatório presente no fígado danificado por esse consumo crônico do etanol (PAROLA; ROBINO, 2001).

Além do fígado, o uso nocivo do etanol também pode afetar o sistema cardiovascular, sendo associado ao desenvolvimento de cardiomiopatia e arritmias, geralmente fibrilação atrial, o que poderia levar a um infarto do miocárdio e morte súbita (SIDORENKOV et al., 2011). O etilismo também parece ser um fator de risco para a hipertensão, através do aumento da secreção de catecolaminas, seguido por aumento da angiotensina II, e aumento da aterosclerose (DA SILVA et al., 2013; KLATSKY; FRIEDMAN; ARMSTRONG, 1986).

Os efeitos do etanol no músculo cardíaco são dose – dependentes. Em um estudo comparativo entre pacientes alcoólatras e pacientes saudáveis, os que faziam o uso abusivo do etanol, mostraram possuir uma menor fração de ejeção, diâmetro diastólico final maior, e uma massa ventricular esquerda maior (URBANO – MARQUEZ et al., 1989). Outros estudos ainda mostraram que a contração ventricular e a inibição de proteínas não – contráteis podem ser diretamente mediadas pelo etanol. Além disso, a oxidação do acetaldeído aumenta as ROS⁵, que são responsáveis pela oxidação de estruturas bioquímicas e por danificar as organelas através da oxidação de resíduos de aminoácidos. Possivelmente, a autofagia também seja induzida pelo acetaldeído, levando assim à injúria do miocárdio (GUO et al., 2012).

⁵ Espécies reativas do oxigênio

No caso das arritmias, tal como a fibrilação arterial, novamente, as ROS têm a maior participação na patogenia da fibrilação arterial em pacientes etilistas, isso devendo – se ao fato de uma maior formação de metabólitos reativos do oxigênio tais como glutathiona reduzida e cisteína (NEUMAN et al., 2007). O estudo de Lin et al. (2010) demonstrou que o estresse oxidativo induz um aumento na força de contração e uma diminuição no comprimento do potencial de ação do miocárdio, conduzindo desta forma ao aparecimento da fibrilação atrial.

O uso nocivo do etanol não causa danos apenas no músculo cardíaco, mas também nos músculos esqueléticos. Nestes o etanol é capaz de desencadear dois tipos de miopatia, a rbdomiólise aguda, que é a quebra rápida das fibras musculares esqueléticas, e a miopatia alcoólica crônica, sendo esta última definida como atrofia e fraqueza dos músculos proximais (PREEDY et al., 2001). A atrofia da fibra ocorre devido a um desequilíbrio entre a síntese e a quebra de proteínas, assim como a ocorrência de apoptose na fibra muscular, e o etanol parece ter um efeito direto na síntese dessas proteínas (FERNÁNDEZ – SOLÀ et al., 2003).

Adicionalmente, o etanol pode alterar a sinalização da insulina e do fator de crescimento semelhante a insulina (IGF) – 1, contribuindo assim para a atrofia muscular, já que essas sinalizações possuem papéis importantes no crescimento e metabolismo muscular. Alterações nesses fatores podem gerar dano oxidativo e disfunção mitocondrial, e o estresse oxidativo formado pode também inibir a acetilcolinesterase, podendo ser este, mais um fator envolvido na atrofia da fibra muscular (NGUYEN et al., 2012).

No sistema nervoso central, o consumo excessivo do etanol pode resultar em redução do peso cerebral e atrofia em suas regiões cortical e subcortical, podendo gerar, nos etilistas, certo tipo demência (HARPER, 2007; HARPER, 2009; NORDSTRÖM et al., 2013; ZHR; KAUFMAN; HARPER, 2011).

A produção de metabólitos tóxicos do etanol e o dano a proteínas celulares é um dos mecanismos propostos para a ocorrência do prejuízo neuronal (RINTALA et al., 2000; UPADHYA; RAVINDRANATH, 2002; ZHR; KAUFMAN; HARPER, 2011), ou seja, o etanol é capaz de aumentar o nível de morte neuronal e diminuir a neurogênese, porém, a intensidade da atrofia do cérebro está relacionada à quantidade de etanol consumido (GONZÁLEZ – REIMERS et al., 2014).

Ainda segundo Crews e Nixon (2009), a morte neuronal em etilistas está relacionada com o estado inflamatório desses pacientes. Dois fatores de transcrição são importantes para a manutenção neuronal: a proteína ligadora do elemento responsivo ao Monofosfato Cíclico de Adenosina (CREB), o qual promove a sobrevivência neuronal e protege os neurônios da excitotoxicidade, e o fator nuclear kappa B (NFκB), um complexo proteico pró – inflamatório

cuja ativação resulta em aumento da formação de citocinas pró – inflamatórias, tal como do fator de necrose tumoral (TNF) – α . O consumo exacerbado de etanol garante uma maior ativação do NF κ B⁶ e transcrição de genes alvo, e uma menor transcrição de genes oriundos do CREB⁷ (CREWS; NIXON, 2009), ou seja, o CREB, que regula no cérebro fatores neurotróficos, está reduzido nos cérebros de pacientes que fazem o uso abusivo do etanol, principalmente nas áreas onde ocorreu neurodegeneração (ZOU; CREWS, 2010). O etanol também inibe diretamente a neurogênese, já que afeta, principalmente, a proliferação das células tronco neuronais, fenômeno este, exacerbado pela presença do processo inflamatório (MONJE; TODA; PALMER, 2003; NIXON; CREWS, 2002).

Já no sistema nervoso periférico, o consumo excessivo do etanol pode desencadear uma neuropatia periférica, a qual é caracterizada por polineuropatia simétrica com maior envolvimento dos membros inferiores e, em menor grau, dos membros superiores (KOIKE et al., 2001a; KOIKE et al., 2003). Achados patológicos e eletrofisiológicos indicam que o etanol gera neuropatia axonal com diminuição na densidade das fibras nervosas, sendo que as fibras mais acometidas seriam as mielinizadas de pequeno calibre e as não mielinizadas, as fibras C (KOIKE et al., 2001b).

1.3 NEUROPATIA ALCOÓLICA PERIFÉRICA

A neuropatia alcoólica periférica é uma complicação ocasionada pelo consumo prolongado do etanol. É caracterizada por disfunção dos nervos sensoriais, motores e autônomos, ocorrendo primeiramente nas extremidades inferiores. A falta de compreensão da sua fisiopatologia dificulta o desenvolvimento de terapias confiáveis, tornado o tratamento desta patologia, um processo complexo. (KOIKE et al., 2003; KOIKE; SOUBE, 2006; MANJI, 2011; TIWARI et al., 2009).

A etiologia da neuropatia induzida pelo etanol vem sendo debatida por mais de um século e, atualmente, considera - se que ela esteja associada a vários fatores de risco, tais como predisposição genética, má nutrição, doenças sistêmicas, deficiência de tiamina, toxicidade dos metabólitos do etanol, como o acetaldeído que aumenta a concentração de espécies reativas do oxigênio, e histórico familiar de etilismo. Porém, ainda não está claro qual desses fatores possui

⁶ Fator nuclear kappa B

⁷ Proteína ligadora do elemento responsivo ao Monofosfato Cíclico de Adenosina

o papel fundamental na indução desta patologia (MELLION; GILCHRIST; DE LA MONTE, 2010). A neuropatia alcoólica severa causa dificuldade de caminhar, perda do equilíbrio e até paralisia. Suas características clínicas desenvolvem – se lentamente e estendem – se por vários meses (PETERS et al., 2006). Nas fases iniciais, as queixas apresentadas são dor em queimação nas extremidades, hiperalgesia (dor exagerada em resposta a um estímulo doloroso) e alodinia (dor evocada por estímulos normalmente inócuos) (TIWARI et al., 2009). Clinicamente, as características da neuropatia alcoólica são parecidas com as da doença beribéri (deficiência de tiamina – vitamina B₁), afetando principalmente os sistemas muscular, cardiovascular, gastrointestinal e nervoso (PETERS et al., 2006).

Os pacientes que apresentam a neuropatia alcoólica periférica, expressam degeneração axonal das fibras nervosas sensoriais e motoras, no entanto, com maior envolvimento dos nervos sensoriais presentes nos membros inferiores e, redução na mielinização dessas fibras neurais (AMMENDOLA et al., 2001).

A neuropatia alcoólica corresponde a um tipo de axonopatia distal, já que as mudanças axonais envolvem principalmente a parte distal das fibras mais longas dos membros inferiores (KOIKE et al., 2003; KOIKE et al., 2001) e, quando essa axonopatia está acentuada, há o envolvimento tanto de fibras mielinizadas quanto de não mielinizadas. O mecanismo que leva a essa degeneração ainda não é bem compreendido (KOIKE et al., 2004; NOVAK; VICTOR, 1974).

Inicialmente, foi considerado que a patogenia da neuropatia alcoólica estava relacionada com deficiências nutricionais, especialmente com a deficiência de tiamina. O etanol dificulta a absorção da tiamina no intestino, reduzindo o armazenamento desta no fígado e afetando assim a sua fosforilação, não permitindo que ela seja transformada na sua forma ativa (SINGLETON; MARTIN, 2001). Pacientes que fazem o uso abusivo de etanol também tendem a consumir pequenas quantidades de nutrientes essenciais e vitaminas, e/ou possuem a absorção gastrointestinal comprometida devido aos efeitos diretos do etanol (MEZEY, 1980; RYLE; THOMSON, 1984).

Entretanto, em 1979, Bosch et al. observaram que o etanol ou seus metabólitos possuem efeitos neurotóxicos que levam à degeneração axonal, desenvolvendo assim neuropatia alcoólica em ratos tratados com etanol, porém com os níveis de tiamina dentro da normalidade, mostrando então, que a deficiência de tiamina não era o gatilho bioquímico envolvido na sua patogenia.

Mediante isso e sabendo que o mecanismo exato que leva a neuropatia alcoólica ainda não é bem entendido, novos estudos foram realizados e novas explicações para tal mecanismo

foram propostas. Estas incluem ativação da micróglia presente na medula espinhal após a ingestão crônica de etanol (NARITA et al., 2006), ativação de receptores mGlu5⁸ na medula espinhal (MIYOSHI et al., 2007), estresse oxidativo formando espécies reativas do oxigênio que causam danos aos nervos, com a liberação de citocinas pró – inflamatórias (TNF – β^9 , TGF – $\beta 1^{10}$, IL - $1\beta^{11}$) seguida da ativação da proteína C quinase (PKC) (DINA et al., 2000), envolvimento de sinais extracelulares regulados por quinases ou o clássico MAP quinase (proteínas quinases ativadas por mitógenos) (DINA et al., 2007), envolvimento do sistema opioidérgico (NARITA et al., 2007) e do sistema hipotálamo-hipófise-adrenal (GIANOULAKIS et al., 2003).

Diante dessas novas proposições e apesar de ter sido visto que a deficiência nutricional, principalmente deficiência de tiamina, não é o gatilho bioquímico, chegou – se a conclusão de que a neuropatia alcoólica poderia ocorrer devido a uma combinação entre a deficiência nutricional e os efeitos tóxicos do etanol e dos seus metabólitos (FIGURA 1) (CHOPRA; TIWARI, 2011).

⁸ Receptor de glutamato metabotrópico 5

⁹ Fator de necrose tumoral β

¹⁰ Fator de crescimento tumoral $\beta 1$

¹¹ Interleucina – 1 - β

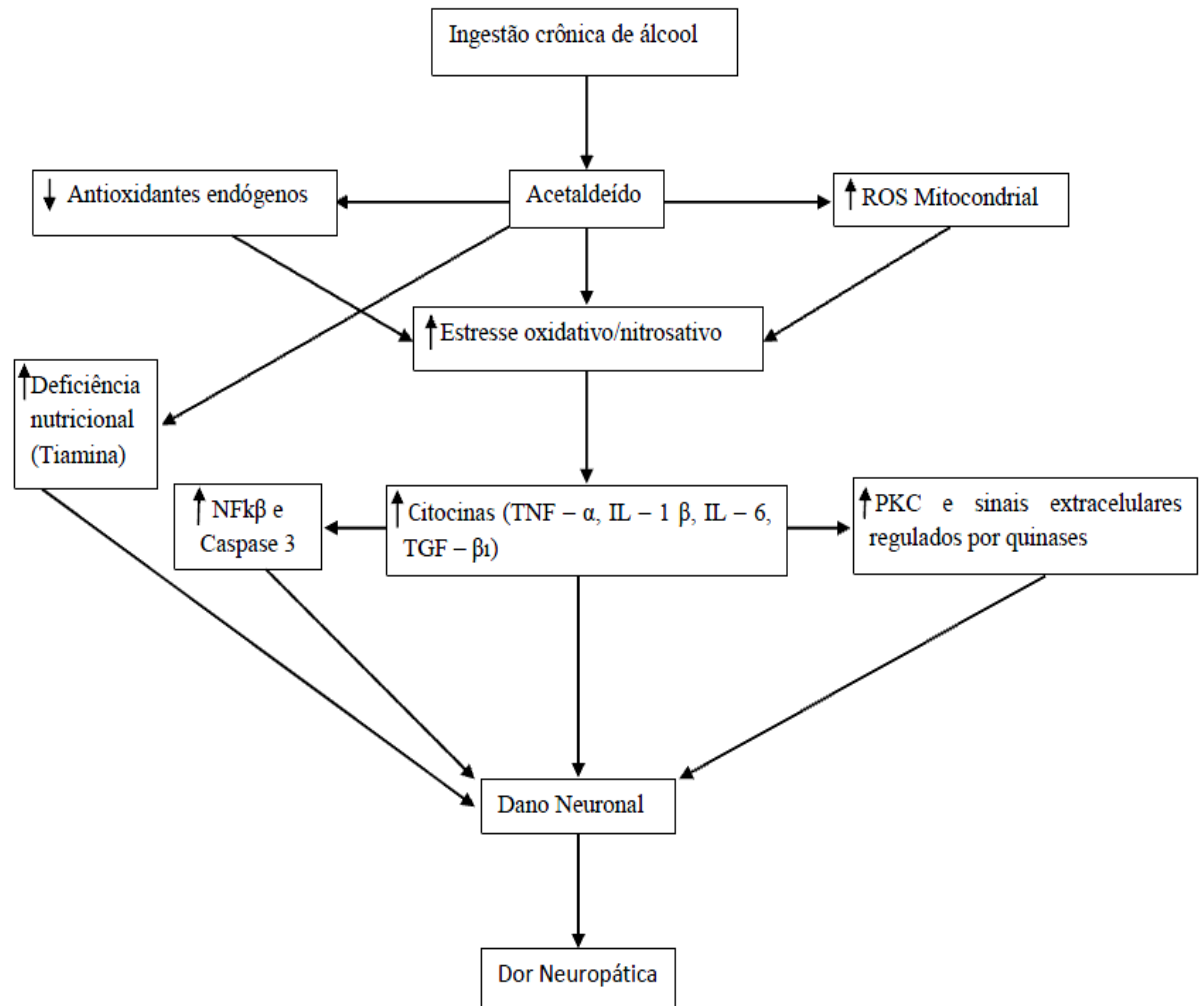


Figura 1 - Diagrama ilustrando as diferentes vias envolvidas na fisiopatologia da neuropatia alcoólica.
Fonte: modificado de CHOPRA; TIWARI, 2011.

Dina et al. (2007) em seu estudo indicaram que a ingestão de etanol pode diminuir o limiar nociceptivo e aumentar o estresse oxidativo/nitrosativo com posterior liberação de citocinas pró – inflamatórias (TNF – β^{12} , TGF – β^{13} , IL – $1\beta^{14}$) seguidas da ativação da PKC¹⁵.

Um decréscimo significativo na atividade de enzimas antioxidantes (superóxido dismutases (SODs) e catalase (CAT)) e um aumento na peroxidação lipídica foram observados no nervo ciático de ratos diabéticos com dor neuropática estabelecida (SHARMA; SAYYED, 2006). Devido a isso, o etanol é capaz de aumentar o estresse oxidativo através da formação de ROS¹⁶ e por danificar estruturas bioquímicas (MONTOLIU et al., 1994), e de diminuir as

¹² Fator de necrose tumoral β

¹³ Fator de crescimento tumoral $\beta 1$

¹⁴ Interleucina – 1 – β

¹⁵ Proteína quinase C

¹⁶ Espécies reativas do oxigênio

reservas de antioxidantes tais como o α – tocoferol, glutathiona (GSH), ácido ascórbico e vitamina E (MCDONOUGH, 2003).

Atualmente, as terapias para o tratamento da neuropatia alcoólica são direcionadas para o bloqueio dos danos adicionais que possam vir a ocorrer nos nervos periféricos e garantir assim, a volta do seu funcionamento normal. Entretanto, o tratamento somente alcança o sucesso através da abstinência ao etanol, associado a uma dieta equilibrada, complementada com todas as vitaminas do complexo B. Quando a ingestão de etanol é mantida, a degeneração das fibras nervosas continua a progredir e, apenas a suplementação vitamínica não garante a melhora do quadro dos pacientes. Quando isso acontece, a única opção possível é o tratamento com analgésicos para a dor aguda, não se tratando a patologia envolvida na neuropatia alcoólica (CHOPRA; TIWARI, 2011).

Sabendo que o consumo excessivo do etanol é capaz de diminuir as concentrações de antioxidantes endógenos e de aumentar o estresse oxidativo, tratamentos com antioxidantes tais como vitamina C, vitamina E e α – tocoferol vem sendo utilizados para gerar melhora na função dos nervos danificados pelo consumo crônico do etanol, já que estes possuem a capacidade de inibir a formação de ROS e também por alterarem o potencial redox intracelular. Por este motivo, há a necessidade de se identificar novos antioxidantes que possam vir a ter efeito benéfico maior ou mais complexo, quando comparados aos já existentes, sobre os danos neurais causados pela neuropatia alcoólica.

1.4 N – ACETILCISTEÍNA

A N – acetilcisteína (NAC) é o precursor acetilado dos aminoácidos sulfurados, L – cisteína (L - Cys), e possui efeitos antioxidantes por reagir diretamente com eletrofílicos e por facilitar a formação de um antioxidante intracelular, a GSH¹⁷, que é um tripeptídeo linear, composto por três aminoácidos, o ácido – L – glutâmico (L - Glu), L - Cys e a L - glicina (L - Gly) (FIGURA 2) (RUSHWORTH; MEGSON, 2014).

¹⁷ Glutathiona

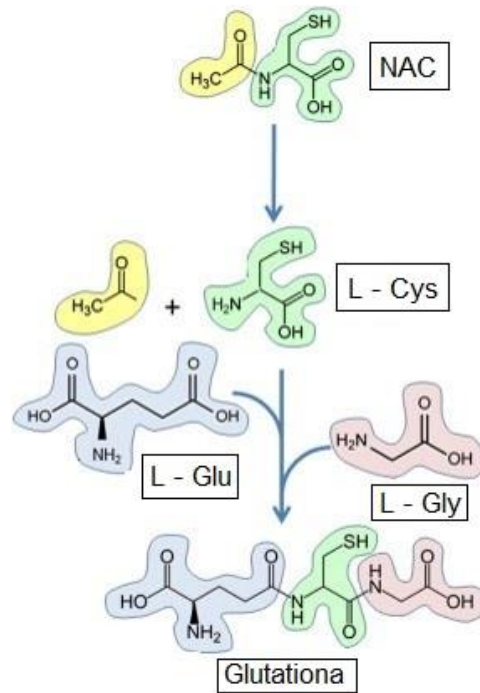


Figura 2 - Esquema representativo da formação da Glutathiona a partir da *N*-acetilcisteína (NAC). L - Cys (L - cisteína); L - Glu (ácido - L - glutâmico); L - Gly (L - glicina).
 Fonte: modificado de RUSHWORTH; MEGSON, 2014.

A NAC¹⁸ foi introduzida no mercado na década de sessenta e desde então, tem sido utilizada como agente mucolítico de doenças crônicas do trato respiratório e como um antídoto para a hepatotoxicidade ocasionada pela sobredosagem do acetaminofeno (paracetamol) (HARADA et al., 2001). Modelos experimentais em animais e humanos mostraram que a NAC é um poderoso antioxidante e um agente terapêutico potente no tratamento de câncer, doenças cardíacas, infecção por HIV, intoxicação por metais pesados, e outras doenças provocadas por ROS¹⁹ (SUAREZ, 2005).

A NAC²⁰ é um composto que contém um grupo sulfidrila e um grupo acetil (FIGURA 3), sendo o grupo acetil responsável pela sua rápida absorção em vários tecidos após a sua administração pela via oral. Ela é desacetilada e metabolizada no intestino e fígado, e depois incorporada em proteínas sulfídicas. A sua atividade antioxidante pode ser atribuída, como dito acima, ao fato dela servir como substrato para a síntese da GSH²¹ mas também pela presença do grupo sulfidrila, pois é através deste que a NAC reage diretamente com as ROS (BORGSTROM et al., 1986).

¹⁸ *N*-acetilcisteína

¹⁹ Espécies reativas do oxigênio

²⁰ *N*-acetilcisteína

²¹ Glutathiona

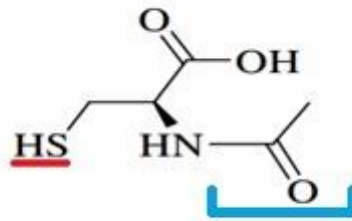


Figura 3 - Estrutura molecular da *N* – acetilcisteína. O grupo Sulfidrila encontra – se sublinhado em vermelho e o grupo Acetil encontra – se sublinhado em azul.

Fonte: Do autor.

A NAC possui a capacidade de reduzir extracelularmente o aminoácido cistina em cisteína e intracelularmente serve como fonte de grupos sulfidrila. Como fonte do grupo sulfidrila, a NAC além de estimular a síntese da GSH, aumenta à atividade da glutathione *S*-transferase (GST), que é importante para a desintoxicação celular causada por xenobióticos, promove a desintoxicação do fígado e é um poderoso antioxidante capaz de reduzir bastante as ROS presentes no organismo (DE VRIES; DE FLORA, 1993).

A GSH, quando na sua forma reduzida, está envolvida na eliminação de peróxidos e proteínas nitrosiladas presentes no citosol celular e nas mitocôndrias. Anormalidades no metabolismo dessa substância podem gerar um aumento na produção de TNF – α ²², que é um importante mediador envolvido na dor neuropática. (SAGARA et al., 1994). Diferente da L - Cys²³, a NAC é uma forma permeável à membrana celular, e desta forma, consegue atravessar passivamente a barreira hematoencefálica e assim, promover o aumento da GSH²⁴ neuronal (AOYAMA et al., 2006; DRINGEN, HAMPRECHT, 1999; FARR et al., 2003).

Como um potente antioxidante, a NAC²⁵ tem o poder de sequestrar peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e hidroxilas (•OH) (ARUOMA et al., 1989). Além disso, ela restringe as ROS²⁶, aumenta a viabilidade de células em cultura, incluindo entre estas, neurônios motores (ROTHSTEIN et al., 1994), oligodendrócitos (MAYER; NOBLE, 1994), neurônios corticais (RATAN et al., 1994) e células PC – 12 (células derivadas de uma linhagem clonal de feocromocitoma que exibem características de neurônios) (FERRARI et al., 1995). NAC também é capaz de diminuir ROS através do aumento da síntese de GSH (SONG et al., 2004).

²² Fator de necrose tumoral α

²³ L - cisteína

²⁴ Glutathione

²⁵ *N* – acetilcisteína

²⁶ Espécies reativas do oxigênio

O estudo de Verhasselt (1999) mostrou também que este precursor de L - Cys²⁷ inibe a síntese do óxido nítrico (•NO), diminui a expressão do fator de necrose tumoral (TNF) – α ²⁸ e da ativação de NF κ B²⁹ (envolvido na transcrição de enzimas apoptóticas).

Moosmann e Behl (2002) observaram que a NAC tem um poder antioxidativo efetivo contra a apoptose celular induzida pelo estresse oxidativo, que geralmente está envolvido na fisiopatologia de numerosas doenças.

Pascale et al. (1989) comprovaram que a NAC previne a inibição da Na⁺/K⁺ ATPase presente nas membranas plasmáticas dos hepatócitos de ratos tratados com etanol através da manutenção dos estoques da glutatona intracelular. Já no estudo de Aydin et al. (2002) conseguiu - se demonstrar que, a NAC diminui, em tecido cerebral de ratos que receberam etanol, a lipoperoxidação e a produção de •NO³⁰, e aumentou a concentração de enzimas e substâncias antioxidantes como a glutatona peroxidase (GPx), CAT³¹, SODs³² e GSH.

Kamboj et al. (2010) evidenciaram em seu estudo que após 7 semanas de tratamento com a NAC, os ratos com neuropatia diabética obtiveram melhora na hiperalgesia, coordenação motora e aumento da atividade da Na⁺/K⁺ ATPase presente no nervo ciático. Após a instalação da neuropatia diabética, estes ratos apresentaram aumento da peroxidação lipídica no nervo ciático e diminuição nos níveis de fosfolipídios. Porém, o tratamento com a N – acetilcisteína atenuou a peroxidação lipídica e aumentou os níveis de fosfolipídios, fato que parece estar ligado ao aumento subsequente da concentração da GSH³³ e proteínas do grupo tiol, o que levou à redução da atividade de enzimas antioxidantes como a SODs³⁴, CAT³⁵, glutatona redutase (GSR), GPx³⁶ e GST³⁷. O tratamento com a NAC³⁸, além de aumentar a defesa por antioxidantes, foi capaz ainda de prevenir a liberação do citocromo *c* e a ativação da caspase 3, mostrando uma diminuição na ativação das vias de apoptose que antes, nos ratos que apresentavam neuropatia diabética, se encontravam elevadas.

Desta forma, como a N – acetilcisteína revelou possuir propriedades protetoras contra o estresse oxidativo na neuropatia diabética e nos efeitos neurotóxicos do etanol, o estudo

²⁷ L - cisteína

²⁸ Fator de necrose tumoral α

²⁹ Fator nuclear Kappa B

³⁰ Óxido nítrico

³¹ Catalase

³² Superóxido dismutases

³³ Glutatona

³⁴ Superóxido dismutases

³⁵ Catalase

³⁶ Glutatona peroxidase

³⁷ Glutatona – S - transferase

³⁸ N – acetilcisteína

presente, através de testes nociceptivos e da expressão da proteína c – Fos em sítios específicos do cérebro, teve a finalidade de investigar se a *N* – acetilcisteína possui também propriedades antioxidantes sobre a neuropatia alcoólica induzida experimentalmente.

2 JUSTIFICATIVA

Além de ser considerado um dos mais graves problemas de saúde pública, o consumo crônico do etanol pode induzir neuropatia periférica dolorosa para a qual não existe ainda, uma terapia eficaz. Em virtude disso, a procura por novas substâncias que possam ser usadas na melhoria do funcionamento dos nervos danificados pela neuropatia alcoólica, se faz muito importante. Com isso, novas modalidades terapêuticas poderão ser desenvolvidas, diminuindo, assim, a morbidade gerada por esta neuropatia, com consequente aumento da qualidade de vida do doente.

3 OBJETIVOS

Diante das exposições apresentadas este estudo teve como objetivos:

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o potencial de neuroproteção da *N* – acetilcisteína na neuropatia alcoólica induzida experimentalmente.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para investigar o potencial neuroprotetor da *N* – acetilcisteína foi avaliado:

- a) A ação da *N* – acetilcisteína sobre o limiar nociceptivo dos animais com neuropatia alcoólica induzida através dos testes von Frey eletrônico (alodinia), Randall – Sellito (hiperalgesia mecânica) e retirada de cauda (hiperalgesia térmica).
- b) A ação da *N* – acetilcisteína sobre a coordenação motora dos animais com neuropatia alcoólica induzida por meio do Teste da locomoção forçada em cilindro giratório (Rota – Rod).
- c) O efeito da administração da *N* - acetilcisteína na expressão da proteína *c* – Fos, em sítios específicos no sistema nervoso central, relacionados à nocicepção, tais como, o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), núcleo dorsal da rafe (NDR) e substância cinzenta periaquedutal (PAG), em animais com neuropatia alcoólica induzida, após estímulo nocivo (hiperalgesia mecânica).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Fisiologia da Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL – MG.

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar divididos em quatro grupos experimentais contendo em média dez animais por grupo, com peso entre 150 a 200 gramas, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL - MG. Os animais foram alojados em caixas de polipropileno, em número máximo de seis por caixa, tratados com ração comercial e água “*ad libitum*”. Estas caixas foram mantidas em uma sala com temperatura controlada ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e ciclo claro/escuro de 12 horas, com luzes acesas às 7:00 am. Os animais foram ambientados as condições do laboratório antes da realização dos testes e todos os experimentos foram realizados entre 08:00 e 18:00 h. O uso dos animais foi aprovado pelo comitê de ética para o uso de animais (CEUA) da Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL - MG com o número de protocolo correspondente a 521/2013.

4.2 DROGAS UTILIZADAS

- **N – acetilcisteína** (Fagron, Brasil) – Precursor de aminoácidos sulfurados, L - cisteína, o qual apresenta efeitos antioxidantes. A N – acetilcisteína foi diluída em água destilada e sua concentração foi ajustada para se obter uma dose diária de 1,4 – 1,5 g/kg de peso corpóreo (média de $1,41 \pm 0,1$ g/kg/dia) por gavagem (KAMBOJ et al., 2010).

- **Etanol** (Dinâmica Química Contemporânea Ltda, Brasil) – Indutor da neuropatia alcoólica que foi administrado por via oral (gavagem) e diluído em água destilada. Inicialmente, utilizou – se Etanol 35% (v/v) para induzir a neuropatia alcoólica, no entanto, a administração de Etanol 35% (v/v) nos ratos do grupo Etanol, não conseguiu induzir os sinais característicos que evidenciam a presença da neuropatia alcoólica, hiperalgesia e alodinia. Desta forma,

decidiu – se por aumentar a porcentagem de Etanol até que tais sinais fossem evidenciados nos animais do grupo Etanol, logo, a porcentagem de Etanol que garantiu o desenvolvimento da neuropatia alcoólica foi a de 38% (v/v).

- **Água destilada** – Veículo utilizado para preparar o Etanol 38% (v/v) e a NAC

4.3 PROCEDIMENTOS/PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

Os protocolos experimentais, utilizados para estudar o efeito da NAC na neuropatia alcoólica, foram baseados e adaptados de TIWARI et al. (2009), TIWARI et al. (2010) e KAMBOJ et al. (2010).

Juntamente com a avaliação do efeito da NAC na neuropatia alcoólica, experimentos para verificar se a dose de Etanol administrada aos animais poderia estar influenciando no ganho de peso, na motivação em explorar o ambiente e se uma indução de úlcera gástrica estava ocorrendo, foram realizados.

4.3.1 Peso dos animais

A partir da primeira semana de tratamento e até o fim da 10^a semana, os animais foram pesados a cada 3 dias. A pesagem foi realizada antes do tratamento diário com as respectivas drogas e, em seguida, um ajuste na dose de cada droga foi realizada de acordo com o ganho de peso do animal. O controle do ganho de peso, além de ser importante para o ajuste da dose de Etanol, NAC e água destilada, foi importante também para verificar se a dose de 38% (v/v) de Etanol, que nunca antes na literatura havia sido administrada em ratos para induzir a neuropatia alcoólica, foi capaz de influenciar no ganho de peso dos animais.

4.3.2 Campo aberto

Para avaliar a motivação dos animais de cada grupo ($n = 10$) em explorar o ambiente foi implementado o teste do Campo aberto (Insight Ltda, Brasil). O teste do Campo aberto (WALSH, CUMMINS, 1976) promove a mensuração da locomoção, exploração e ansiedade. O número de quadros cruzados e a frequência de Rearing são usados como parâmetros para avaliar a atividade locomotora, mas também são parâmetros para avaliar a exploração e ansiedade. Uma alta frequência nesses comportamentos indica, respectivamente, aumento na locomoção e exploração e/ou diminuição no nível de ansiedade. Este teste foi realizado na 10ª semana de tratamento e, antes da sua realização, na noite anterior, os animais foram ambientados a sala de experimentação. No dia da realização do teste, um animal por vez de cada grupo foi colocado no centro do Campo aberto e filmado por 5 minutos. Ao terminar a filmagem, o animal foi retirado do Campo aberto e levado novamente ao biotério do Laboratório de Fisiologia da Universidade Federal de Alfenas – MG. Antes de realizar nova filmagem com outro animal, o Campo aberto foi devidamente higienizado com álcool etílico 10% (v/v) para eliminar qualquer odor do animal anterior.

4.3.3 Análise macroscópica do estômago

Úlceras gástricas são caracterizadas por longas bandas de lesões hemorrágicas na mucosa gástrica superficial (NORDIN et al., 2014). Antes da coleta dos estômagos, os animais permaneceram em jejum por 24 horas, para o esvaziamento gástrico. No dia da coleta, os animais foram anestesiados com tribromoetanol (TBE 2,5%, 1 mL/100g de peso corpóreo, intraperitoneal), eutanasiados por decapitação e, em seguida, o estômago de cada animal foi retirado e lavado com salina para posterior exame macroscópico.

4.3.4 Indução da neuropatia alcoólica

A neuropatia alcoólica foi induzida através da administração de etanol 38% v/v preparado em água destilada (10g/kg de peso corpóreo por via oral - gavagem) todos os dias por 10 semanas.

4.3.5 Tratamento com as drogas

Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais contendo de dezesseis a quatro animais por grupo. O grupo Controle foi o controle do grupo Etanol e, os animais receberam água destilada (10g/kg de peso corpóreo por via oral - gavagem) no lugar do etanol. No grupo Etanol foi administrado aos animais etanol 38% v/v (10g/kg de peso corpóreo por via oral - gavagem) por 10 semanas. O grupo NAC + Etanol recebeu Etanol 38% v/v (10g/kg de peso corpóreo por via oral - gavagem) e NAC (1,4 – 1,5 g/kg de peso corpóreo por via oral - gavagem). O grupo NAC recebeu apenas NAC (1,4 – 1,5 g/kg de peso corpóreo por via oral - gavagem) sem a administração do Etanol (TABELA 1).

A NAC foi preparada todos os dias antes da sua administração aos animais em água destilada e também foi administrada todos os dias por via oral (gavagem) por dez semanas a partir do dia 1.

Tabela 1 - Tratamento dos grupos com suas respectivas drogas.

Grupos	Drogas
Controle	Água destilada (10g/kg por via oral) por 10 semanas
Etanol	Etanol 38% v/v (10g/kg por via oral) por 10 semanas
NAC + Etanol	Etanol 38% v/v (10g/kg por via oral) + NAC (1,4 – 1,5 g/kg por via oral) por 10 semanas
NAC	NAC (1,4 – 1,5 g/kg por via oral) por 10 semanas

Fonte: Do autor.

4.3.6 Testes comportamentais

Todos os testes nociceptivos foram realizados no dia zero (antes do tratamento), em sequência, no primeiro dia, foi iniciado o tratamento dos animais e, na quarta, sexta, oitava e décima semanas novos testes nociceptivos foram realizados (FIGURA 4).

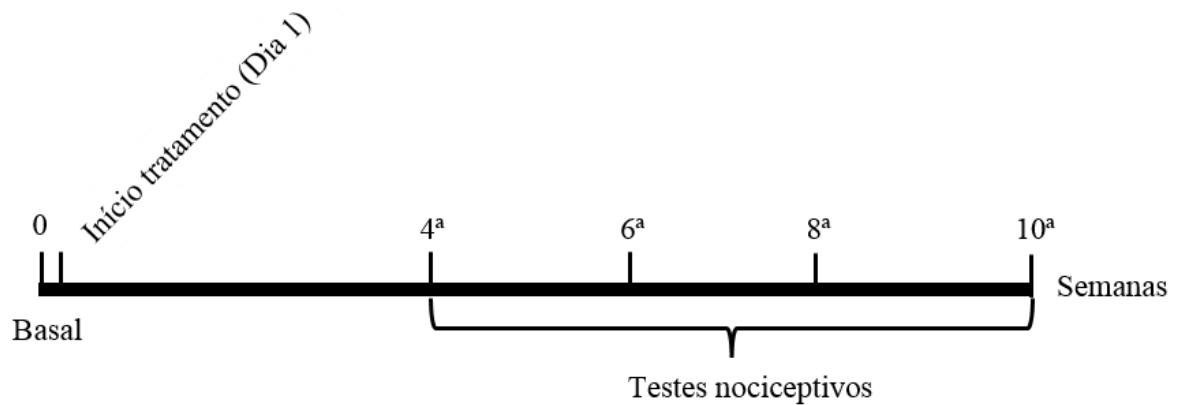


Figura 4 - Esquema representativo do protocolo experimental para os testes nociceptivos que foram realizados.

Fonte: do autor.

4.3.6.1 Alodinia mecânica

Os ratos de cada grupo ($n = 8$) foram alocados individualmente em câmaras acrílicas com o fundo composto por uma grade metálica e adaptados ao ambiente de teste por pelo menos 30 minutos. O von Frey Eletrônico (Insight Ltda, Brasil) foi utilizado para produzir estímulos mecânicos pontuais (em g) em várias intensidades. No método eletrônico, um transdutor de pressão acoplado a uma ponteira de calibre fixo possibilita o registro da força necessária para a resposta comportamental. A ponta do transdutor foi pressionada à planta da pata posterior até provocar uma ligeira deflexão contra a pata, e foi mantida por 1 segundo. Cada estímulo foi aplicado quatro vezes com um intervalo de 4 – 5 segundos. Um cuidado foi tomado para que locais aleatórios fossem estimulados na superfície plantar. Uma resposta positiva foi observada quando a pata estimulada foi retirada. O limiar de retirada da pata foi definido como a força

mínima necessária para provocar um reflexo de retirada da pata, pelo menos uma vez em quatro ensaios. Movimentos voluntários relacionados com a locomoção não foram considerados como uma resposta de retirada. A alodinia mecânica foi definida como uma diminuição nos limiares de retirada da pata (FIGURA 5).



Figura 5 - von Frey eletrônico utilizado para verificar a alodinia mecânica nos ratos de cada grupo experimental. Fonte: Do autor.

4.3.6.2 *Hiperalgisia mecânica*

A latência da resposta nociceptiva foi quantificada pelo teste de Randall – Selitto (Insight Ltda, Brasil). Neste teste, foi aplicada uma pressão mecânica aumentada linearmente no dorso da pata do rato (TAIWO et al., 1989). Os limiares nociceptivos, expresso em gramas (g), foram obtidos através do aumento da pressão no dorso da pata do animal até que ocorresse a retirada desta pata ou que uma vocalização fosse emitida. Como este teste envolve a manipulação do animal, o pesquisador habituou o rato da seguinte forma: 3 dias antes do experimento, os ratos foram manipulados pelo experimentador por 20 segundos, duas ou três vezes, dependendo da capacidade do animal em ficar quieto. No dia do experimento, os ratos foram novamente habituados 2 – 3 vezes por 20 segundos, para que os animais não demonstrassem reações aversivas durante o manuseio. Em seguida, a pata do rato foi colocada sob a ponta presente no aparelho e uma progressiva pressão foi aplicada até que o rato retirasse a pata ou vocalizasse. O limiar foi medido três vezes a fim de se obter dois valores consecutivos e que tivessem apenas 10% de diferença entre si. Um intervalo de pelo menos dez minutos foi feito entre as medições. A hiperalgisia mecânica foi definida como uma diminuição nos limiares de retirada da pata (FIGURA 6).

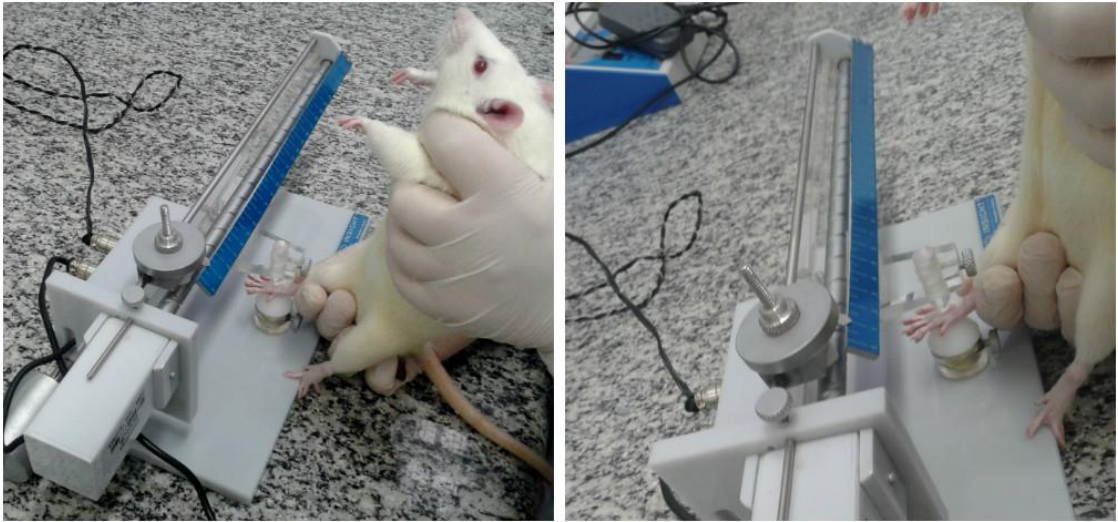


Figura 6 - Randall Sellito utilizado para verificar a hiperalgesia mecânica nos ratos de cada grupo experimental. Fonte: Do autor.

4.3.6.3 Hiperálgesia térmica

A hiperálgesia térmica foi obtida através do teste da latência para o reflexo de retirada da cauda, Tail flick (Insight Ltda, Brasil). Neste teste, um estímulo térmico foi aplicado à cauda dos ratos de cada grupo ($n = 8$) por meio de uma resistência elétrica capaz de promover um aquecimento com taxa de $6,0^{\circ}\text{C/s}$ até que ela fosse retirada. Como este teste envolveu a manipulação dos animais, um dia antes da realização do experimento, os ratos foram habituados ao ambiente do teste. No dia do experimento, os ratos foram novamente habituados, para que assim ficassem familiarizados com as condições que foram submetidos durante a realização do teste. Nenhum dos ratos deveria mostrar comportamento aversivo durante o manuseio. Após os ratos serem habituados, a cauda de cada rato foi colocada na resistência de aquecimento do analgesímetro. O teste foi repetido 3 vezes para se obter dois valores consecutivos. Quando houve um aumento do tempo ou da temperatura de retirada da cauda, este foi interpretado como uma ação analgésica, já uma retirada de cauda breve indicou hiperálgesia térmica (FIGURA 7).



Figura 7 - Tail Flick utilizado para verificar a hiperalgesia térmica nos ratos de cada grupo experimental.
Fonte: Do autor.

4.3.7 Teste da locomoção forçada em cilindro giratório (Rota – Rod)

O teste do Rota – Rod foi realizado no dia zero (antes do tratamento), no primeiro dia foi iniciado o tratamento dos animais e, na décima semana este teste foi realizado novamente (FIGURA 8A).



Figura 8A - Esquema representativo do protocolo experimental para o teste da locomoção forçada em cilindro giratório (Rota – rod) que foi realizado.

Fonte: Do autor

4.3.7.1 Procedimento experimental para o teste da locomoção forçada em cilindro giratório (Rota – Rod)

O teste do Rota – Rod (Insight Ltda, Brasil) foi realizado para avaliar o equilíbrio e a coordenação motora dos ratos de cada grupo ($n = 6$). O Rota – Rod é composto por 4 baias, de modo que quatro animais são avaliados por vez, e um cilindro rotatório, aonde os ratos devem caminhar continuamente sobre este para evitar a queda. Os animais foram mantidos na sala de experimentação e manipulados pelo experimentador por pelo menos duas horas antes do experimento. Os ratos foram inicialmente mantidos sobre os cilindros por cinco minutos, para habituação. Cinco minutos após o período de habituação, os animais foram novamente colocados sobre o Rota – Rod e a velocidade de rotação foi mantida de 5 a 35 RPM (rotações por minuto). A latência para queda dos animais foi medida automaticamente através de um sensor mecânico localizado na base do aparato (FIGURA 8B).



Figura 8B - Rota – Rod utilizado para avaliar o equilíbrio e coordenação motora dos ratos de cada grupo experimental.

Fonte: Do autor.

4.3.8 Expressão da proteína c – Fos em sítios específicos do sistema nervoso central

A perfusão dos animais para a realização da imunofluorescência foi realizada na 10^a semana de tratamento, e após 1 semana os cérebros foram cortados para a realização da técnica de imunofluorescência (FIGURA 9A).



Figura 9A - Esquema representativo do protocolo experimental para a técnica de Imunofluorescência que foi realizada.

Fonte: Do autor.

4.3.8.1 Procedimento experimental para a técnica de Imunofluorescência

Noventa minutos após a realização do teste Randall Selitto (Insight Ltda, Brasil), os animais foram anestesiados com tribromoetanol (TBE 2,5%, 1 mL/100g de peso corpóreo, intraperitoneal) e, a seguir, perfundidos por meio de punção intracardíaca com 300 mL de solução de tampão fosfato-salina (PBS, pH 7,4), seguido de 600 mL de solução de PBS contendo formaldeído a 4%. A seguir, os encéfalos foram removidos e mantidos imersos na solução fixadora por cerca de 14 horas em temperatura ambiente sob agitação. Em seguida, eles foram transferidos para solução de sacarose a 30%, na qual permaneceram durante aproximadamente 36 horas. A seguir, os encéfalos foram seccionados no plano coronal em cortes de 30 µm de espessura utilizando-se um criostato. Os cortes de encéfalo foram coletados em solução anti-congelante e armazenados a - 20°C até o momento do processamento imunistoquímico pela técnica de *free-floating*.

Os cortes de encéfalo foram incubados com soro normal de cavalo 10% em PBS (0,01M, contendo Triton 0,1% e NaN_3 0,04%) por, no mínimo, 2 horas. Após esse período, eles foram lavados (3x) com PBS 0,01M e incubados *overnight* com o anticorpo primário anti-c-Fos (rabbit, 1:5000, Oncogene). Após esse período, esses cortes foram novamente lavados em PBS 0,01M e incubados com o anticorpo secundário fluorescente Cy3 donkey α -rabbit (1:250, Jackson Immunoresearch) por um período de 2 horas. Os cortes de encéfalo foram, por sua vez, montados sobre lâminas gelatinizadas e cobertos com o meio de montagem.

A quantificação do sinal imunofluorescente foi realizada 1) no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), em sua porção lateral magnocelular e porções parvocelulares, 2) na substância cinzenta periaquedutal (PAG) e 3) no núcleo dorsal da rafe (NDR) (FIGURAS 9B, 9C e 9D). Secções representativas de 4 a 6 animais de cada condição experimental foram adquiridas no mesmo nível anatômico. A contagem visual foi realizada unilateralmente (no caso das estruturas encefálicas) em uma secção por animal e foi repetida ao menos por dois pesquisadores alheios às condições experimentais. A visualização microscópica do tecido avaliou o padrão espacial de imunomarcção por meio de um sistema de videomicroscopia. As imagens foram capturadas em alta resolução por uma câmera digital acoplada a um microscópio (Nikon), e transmitidas a um computador dotado de um programa digitalizador. Os resultados foram expressos em números de neurônios imunorreativos a c-Fos.

**DELIMITAÇÃO DOS NÚCLEOS PARA CONTAGEM DA IMUNORREATIVIDADE
A C-FOS (PAXINOS & WATSON, 2004)**

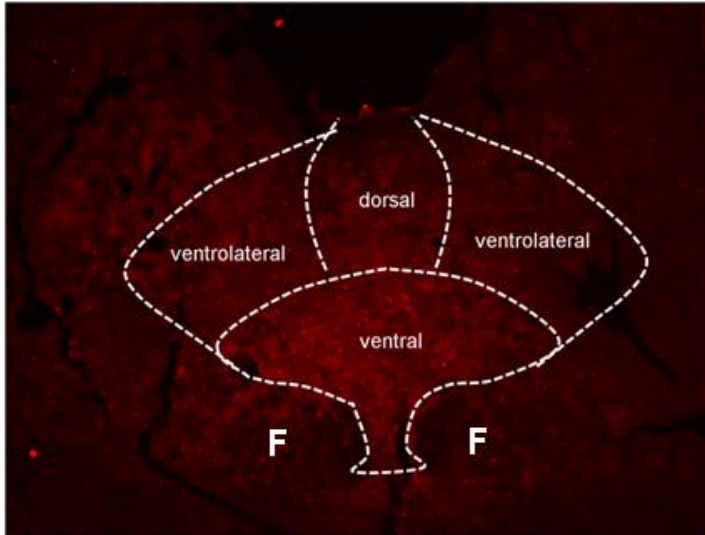


Figura 9B - Núcleo Dorsal da Rafe (NDR), em suas porções ventrolateral, dorsal e ventral. F: fascículo longitudinal medial.

Fonte: Do autor.

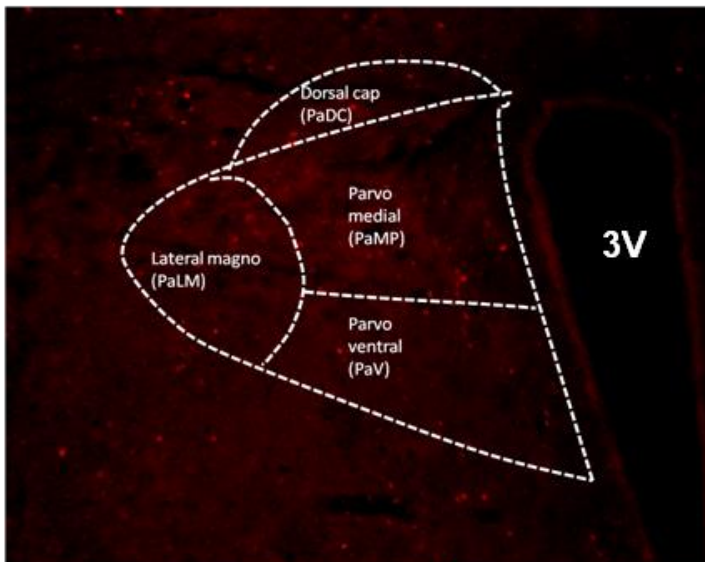


Figura 9C - Núcleo Paraventricular do Hipotálamo (PVN), com suas porções parvocelulares (Dorsal cap, PaDC; medial, PaMP; e ventral, PaV) e magnocelular (lateral, PaLM).

3V: terceiro ventrículo.

Fonte: Do autor.

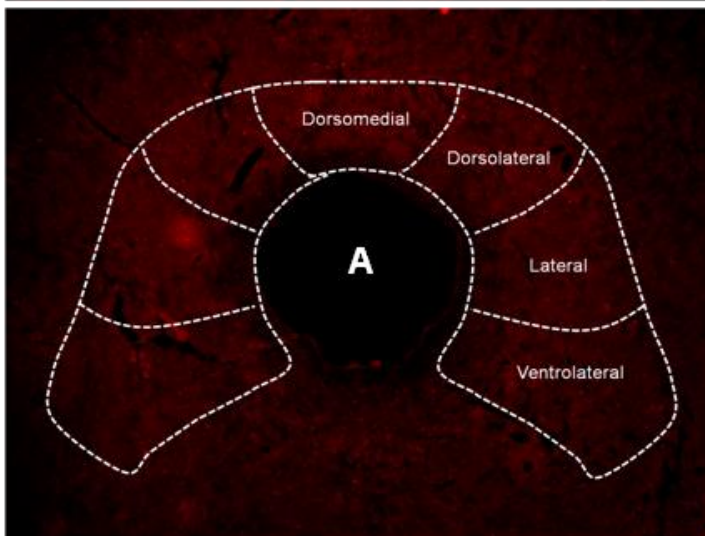


Figura 9D - Substância Cinzenta Periaquedutal (PAG), com suas porções dorsomedial, dorsolateral, lateral e ventrolateral.

A: aqueduto de Sylvius.

Fonte: Do autor.

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para realizar a análise estatística, o programa GraphPad Prism (GraphPad, Reino Unido) foi utilizado. Os resultados obtidos foram apresentados como média \pm erro padrão da média, e analisados considerando-se, dentro de cada protocolo, sempre a coerente relação entre os grupos experimentais e seus respectivos controles. Os dados dos testes von Frey eletrônico, Randall Sellito, Tail Flick, Rota – rod, peso dos animais e Campo aberto foram confrontados através do teste Two - Way ANOVA seguido do pós – teste de Bonferroni. Já para a imunofluorescência os dados foram confrontados através do teste Two – Way ANOVA seguido do pós – teste de Newman-Keuls. Foram considerados diferentes grupos analisados em que $P < 0,05$.

5 RESULTADOS

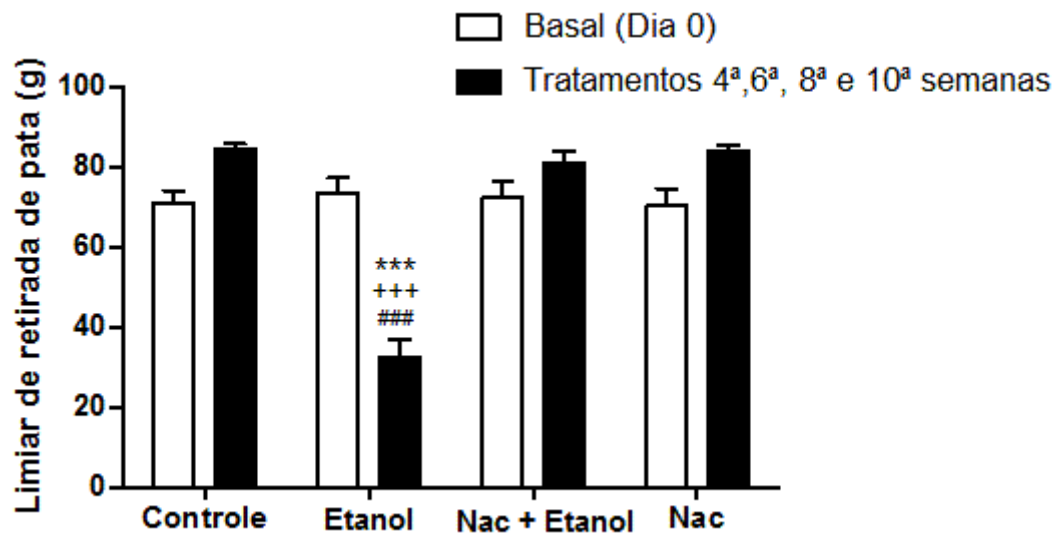
Nesta seção, serão apresentados os resultados obtidos após a realização dos testes nociceptivos (von Frey, Randall Sellito e Tail Flick), Rota – Rod, Imunofluorescência para expressão da proteína c – Fos, Peso dos animais, Campo aberto e Análise macroscópica do estômago.

5.1 NAC PREVINE O DESENVOLVIMENTO DA ALODINIA MECÂNICA NA NEUROPATIA INDUZIDA POR ETANOL

O gráfico 1A mostra a média do limiar de retirada de pata (g) na 4^a, 6^a, 8^a e 10^a semanas de cada grupo, com seus respectivos tratamentos (colunas pretas) em relação ao limiar de retirada de pata (g) antes do tratamento (basal – colunas brancas), de cada grupo avaliado, pelo teste von Frey eletrônico, a alodinia mecânica. Os animais do grupo Controle, antes do tratamento ($70,95 \pm 3,05$ g), não apresentaram diferença significativa em relação ao limiar de retirada de pata apresentado pelos animais do grupo Etanol antes do início do tratamento ($73,56 \pm 3,61$ g). No entanto, após as 10 semanas de tratamento, a média do limiar de retirada de pata na 4^a, 6^a, 8^a e 10^a semanas destes mesmos animais (grupo Etanol) apresentaram diminuição ($32,37 \pm 4,43$ g), quando comparados a eles próprios, antes do tratamento ($73,56 \pm 3,61$ g), bem como quando comparados ao grupo Controle após as 10 semanas de tratamento com água ($84,55 \pm 1,12$).

Em relação aos grupos que receberam NAC, antes do tratamento, o limiar de retirada de pata do grupo NAC + Etanol ($72,22 \pm 4,11$ g) não apresentou diferença significativa em relação ao limiar de retirada de pata do seu controle, grupo NAC, antes do tratamento ($70,11 \pm 4,32$ g) e, também, em relação ao grupo Etanol antes do tratamento ($73,56 \pm 3,61$ g). Entretanto, após o tratamento por 10 semanas do grupo NAC + Etanol, a média do limiar de retirada de pata na 4^a, 6^a, 8^a e 10^a semanas ($81,06 \pm 2,89$ g) se manteve elevado em comparação com a média do limiar de retirada de pata do grupo Etanol na 4^a, 6^a, 8^a e 10^a semanas ($32,37 \pm 4,43$ g), assim como também se manteve elevado em relação ao seu limiar de retirada de pata antes do tratamento ($72,22 \pm 4,11$ g). Estes resultados sugerem que a NAC foi capaz de prevenir na neuropatia alcoólica a alodinia mecânica.

Gráfico 1A - Efeito do tratamento crônico da *N*-acetilcisteína (NAC) na alodinia mecânica induzida por etanol, o teste nociceptivo foi realizado utilizando o von Frey eletrônico.

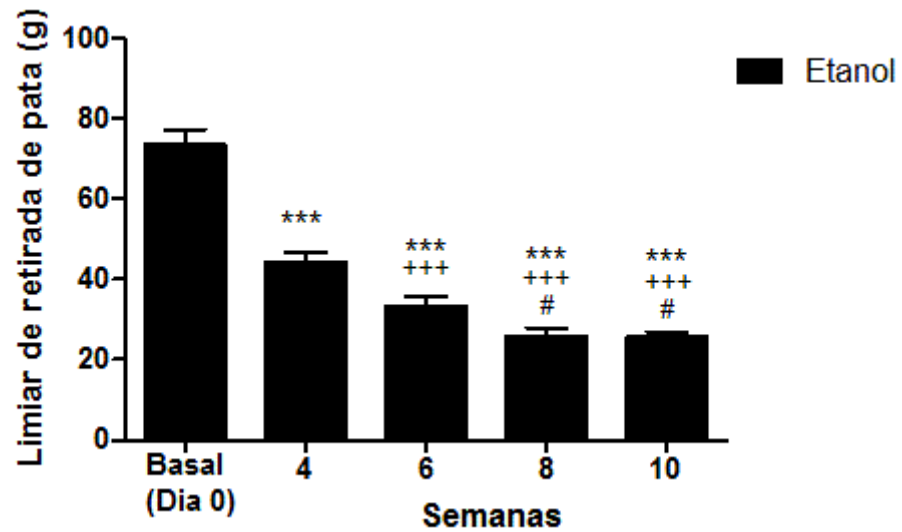


Fonte: Do autor.

Nota: Os dados foram expressos como a média \pm EPM e analisados por Two – Way ANOVA seguido do pós - teste de Bonferroni. *** $P < 0,001$ diferença entre o grupo Etanol e o grupo Controle após as 10 semanas de tratamento. ### $P < 0,001$ diferença entre o grupo Etanol e o grupo NAC + Etanol após 10 semanas de tratamento. +++ $P < 0,001$ diferença entre o grupo Etanol e o seu basal, antes do tratamento (n de 16 a 8).

O gráfico 1B mostra detalhadamente a diminuição do limiar de retirada de pata (g) do grupo Etanol ao longo das 10 semanas de tratamento. A 4ª ($44,49 \pm 2,14$ g), 6ª ($33,49 \pm 2,14$ g), 8ª ($25,94 \pm 1,91$ g) e 10ª ($25,56 \pm 1,31$ g) semanas apresentaram uma diminuição significativa no limiar de retirada de pata em relação ao dia 0, basal ($73,56 \pm 3,61$ g), anterior ao início do tratamento. Assim como em relação à 4ª semana ($44,49 \pm 2,14$ g), a 6ª ($33,49 \pm 2,14$ g), 8ª ($25,94 \pm 1,91$ g) e 10ª ($25,56 \pm 1,31$ g) semanas apresentaram, também, uma diminuição significativa no limiar de retirada de pata. O mesmo aconteceu ao se comparar a 8ª ($25,94 \pm 1,91$ g) e a 10ª ($25,56 \pm 1,31$ g) semanas em relação à 6ª semana de tratamento ($33,49 \pm 2,14$ g), uma diminuição no limiar de retirada de pata também foi observada. Estes resultados sugerem que o tratamento com etanol foi capaz de induzir alodinia mecânica nos animais tratados apenas com etanol.

Gráfico 1B – Efeito do tratamento crônico com Etanol na alodinia mecânica pelo teste von Frey eletrônico.



Fonte: Do autor.

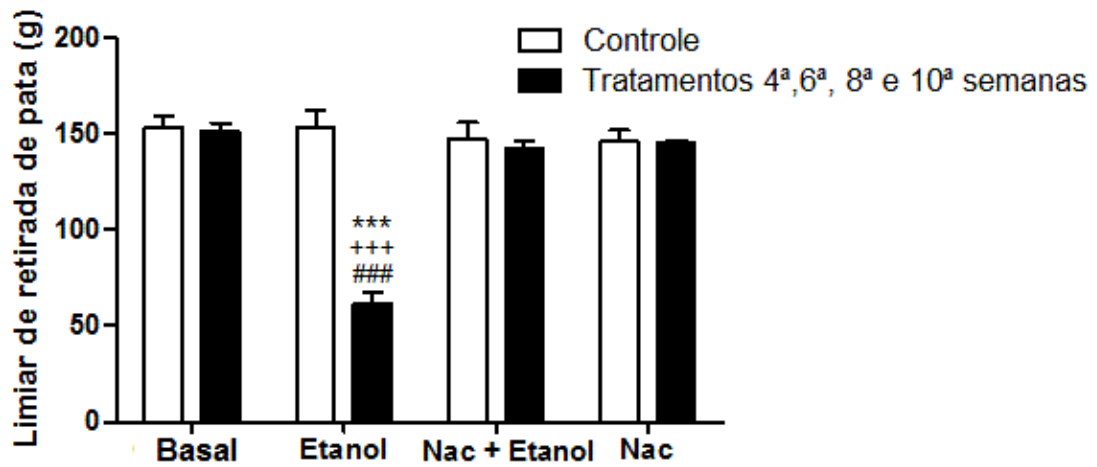
Nota: Os dados foram expressos como a média \pm EPM e analisados por Two – Way ANOVA seguido do pós – teste de Bonferroni. *** $P < 0,001$ diferença do tratamento na 4^a, 6^a, 8^a e 10^a semanas em relação ao dia 0. +++ $P < 0,001$ diferença do tratamento na 6^a, 8^a e 10^a semanas em relação a 4^a semana de tratamento. # $P < 0,05$ diferença do tratamento na 8^a e 10^a semanas em relação a 6^a semana de tratamento (n de 16 a 8).

5.2 NAC PREVINE O DESENVOLVIMENTO DA HIPERALGESIA MECÂNICA NA NEUROPATIA INDUZIDA POR ETANOL

O gráfico 2A mostra a média do limiar de retirada de pata (g) na 4^a, 6^a, 8^a e 10^a semanas de cada grupo, com seus respectivos tratamentos (colunas pretas) em relação ao limiar de retirada de pata (g) antes do tratamento (basal – colunas brancas) de cada grupo avaliado, pelo teste Randall Selitto, a hiperalgesia mecânica. O limiar de retirada de pata basal do grupo Controle antes do tratamento ($153,04 \pm 5,79$ g) não apresentou diferença significativa em relação ao limiar de retirada de pata basal do grupo Etanol ($153,68 \pm 8,86$ g). Contudo, após 10 semanas de tratamento, uma diminuição significativa na média do limiar de retirada de pata do grupo Etanol na 4^a, 6^a, 8^a e 10^a semanas ($61,51 \pm 6,16$ g) ocorreu em relação ao seu limiar de retirada de pata basal ($153,68 \pm 8,86$ g) e também em relação à média do limiar de retirada de pata do grupo Controle na 4^a, 6^a, 8^a e 10^a semanas ($151,21 \pm 4,27$ g).

Em relação aos grupos que receberam NAC, o limiar de retirada de pata basal do grupo NAC + Etanol ($147,08 \pm 8,86$ g) não apresentou diferença significativa em relação ao limiar de retirada de pata basal do grupo NAC ($146,07 \pm 5,89$ g) e do grupo Etanol ($153,68 \pm 8,86$ g). No entanto, após o tratamento por 10 semanas, a média do limiar de retirada de pata do grupo NAC + Etanol ($142,67 \pm 4,06$ g) manteve-se elevado em relação ao seu limiar de retirada de pata basal ($147,08 \pm 8,86$ g) e em relação à média do limiar de retirada de pata do grupo NAC na 4^a, 6^a, 8^a e 10^a semanas ($145,39 \pm 1,36$ g). Essa mesma manutenção da média do limiar foi observada ao se comparar a média do limiar de retirada de pata do grupo NAC + Etanol na 4^a, 6^a, 8^a e 10^a semanas ($142,67 \pm 4,06$ g) com a média do limiar de retirada de pata do grupo Etanol na 4^a, 6^a, 8^a e 10^a semanas de tratamento ($61,51 \pm 6,16$ g). Assim, estes resultados sugerem que a NAC foi efetiva em prevenir o desenvolvimento a hiperalgesia mecânica na neuropatia alcoólica.

Gráfico 2A - Efeito do tratamento crônico da *N*-acetilcisteína (NAC) na hiperalgesia mecânica induzida por etanol, o teste nociceptivo foi realizado utilizando o teste Randall Selitto.

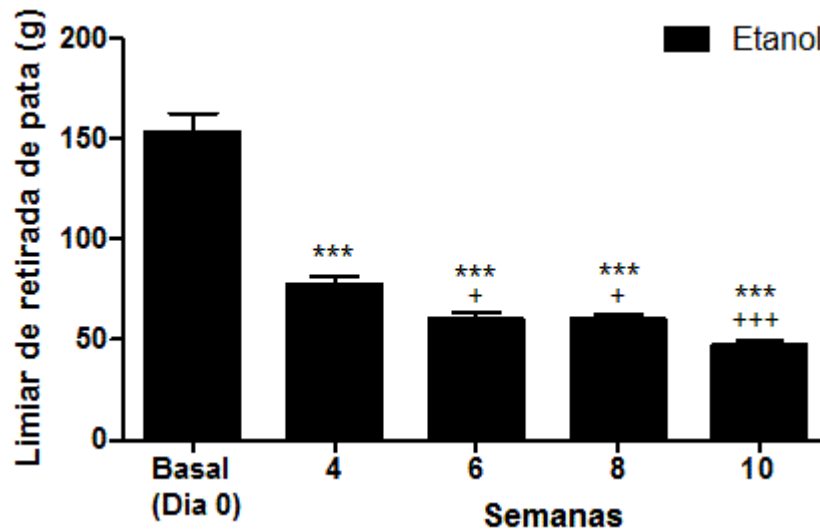


Fonte: Do autor.

Nota: Os dados foram expressos como a média \pm EPM e analisados por Two – Way ANOVA seguido do pós – teste de Bonferroni. *** $P < 0,001$ diferença entre o grupo Etanol e o grupo Controle após as 10 semanas de tratamento. ### $P < 0,001$ diferença entre o grupo Etanol e o grupo NAC + Etanol após 10 semanas de tratamento. +++ $P < 0,001$ diferença entre o grupo Etanol e o seu basal, antes do tratamento (n de 16 a 8).

O gráfico 2B mostra detalhadamente a diminuição no limiar de retirada de pata (g) do grupo Etanol ao longo das 10 semanas de tratamento. Uma diminuição significativa no limiar de retirada de pata na 4^a ($77,61 \pm 3,86$ g), 6^a ($60,37 \pm 2,95$ g), 8^a ($60,44 \pm 2,09$ g) e 10^a ($47,61 \pm 2,01$ g) semanas em relação ao dia 0 ($153,68 \pm 8,86$ g), basal, foi observada. Essa mesma diminuição também foi observada ao se comparar o limiar de retirada de pata na 6^a ($60,37 \pm 2,95$ g), 8^a ($60,44 \pm 2,09$ g) e 10^a ($47,61 \pm 2,01$ g) semanas em relação ao limiar de retirada de pata na 4^a semana de tratamento ($77,61 \pm 3,86$ g). Estes resultados sugerem que o etanol foi capaz de induzir hiperalgesia mecânica nos animais tratados apenas com etanol.

Gráfico 2B – Efeito do tratamento crônico com etanol na hiperalgesia mecânica pelo teste Randall Selitto.



Fonte: Do autor.

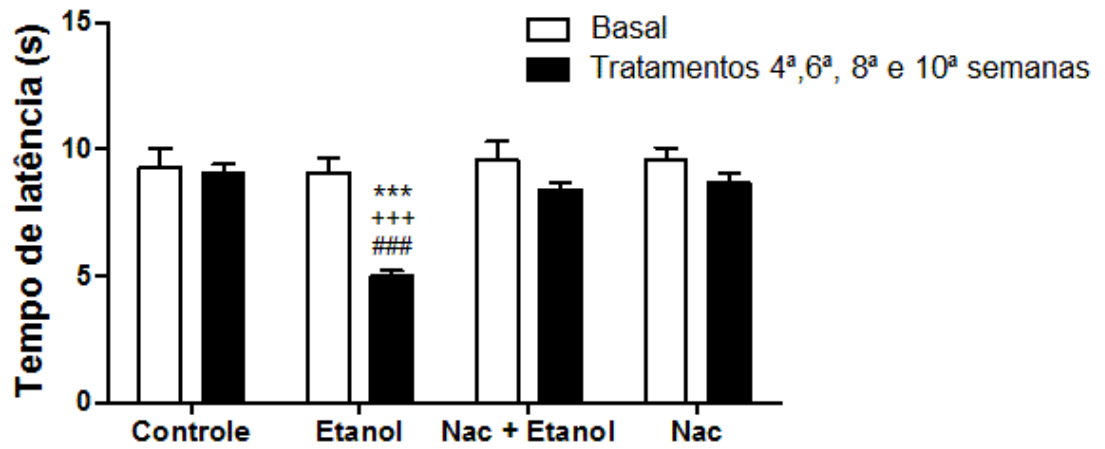
Nota: Os dados foram expressos como a média ± EPM e analisados por Two – Way ANOVA seguido do pós - teste Bonferroni. ***P<0,001 diferença do tratamento do grupo etanol na 4^a, 6^a, 8^a e 10^a semanas em relação ao dia 0 do grupo etanol. +P<0,05 e +++P<0,001 diferença do tratamento do grupo do etanol na 6^a, 8^a e 10^a semanas em relação a 4^a semana de tratamento do grupo etanol (n de 14 a 8).

5.3 NAC PREVINE O DESENVOLVIMENTO DA HIPERALGESIA TÉRMICA NA NEUROPATIA INDUZIDA POR ETANOL

O gráfico 3 expõe a média do tempo de latência (s) de cada grupo na 4^a, 6^a, 8^a e 10^a semanas de tratamento em relação ao tempo de latência (s) basal de cada grupo para avaliar, pelo teste de retirada de cauda (Tail Flick), a hiperalgesia térmica. Antes do início do tratamento, o tempo de latência basal do grupo Etanol ($9,08 \pm 0,57$ s, $P > 0,05$) não era diferente do tempo de latência basal do grupo Controle ($9,27 \pm 0,77$ s, $P > 0,05$). No entanto, após o tratamento, a média do tempo de latência do grupo Etanol na 4^a, 6^a, 8^a e 10^a semanas ($4,995 \pm 0,209$ s, $P < 0,001$) diminuiu significativamente em relação ao seu tempo de latência basal ($9,08 \pm 0,57$ s, $P > 0,05$) e em relação à média do tempo de latência do grupo Controle na 4^a, 6^a, 8^a e 10^a semanas ($9,063 \pm 0,333$ s, $P > 0,05$).

Já os grupos que foram tratados com NAC, antes do tratamento, o tempo de latência basal do grupo NAC + Etanol ($9,542 \pm 0,761$ s, $P > 0,05$) não diferiu do tempo de latência basal do seu grupo controle ($9,590 \pm 0,467$ s, $P > 0,05$), grupo que recebeu apenas NAC, e do tempo de latência basal do grupo Etanol ($9,084 \pm 0,570$ s, $P > 0,05$). Após o tratamento por 10 semanas, a média do tempo de latência do grupo NAC + Etanol ($8,390 \pm 0,261$ s, $P > 0,05$) continuou não diferindo da média do tempo de latência do grupo NAC na 4^a, 6^a, 8^a e 10^a semanas ($8,682 \pm 0,392$ s, $P > 0,05$), porém, ao ser comparado com a média do tempo de latência do grupo Etanol na 4^a, 6^a, 8^a e 10^a semanas ($4,995 \pm 0,209$ s, $P < 0,001$), este se manteve elevado, sugerindo assim que o tratamento com a NAC é efetivo em prevenir o desenvolvimento da hiperalgesia térmica na neuropatia experimental induzida por etanol.

Gráfico 3 - Efeito do tratamento crônico da *N*-acetilcisteína (NAC) na hiperalgesia térmica induzida por etanol, o teste nociceptivo foi realizado utilizando o teste de retirada de cauda (Tail Flick).



Fonte: Do autor.

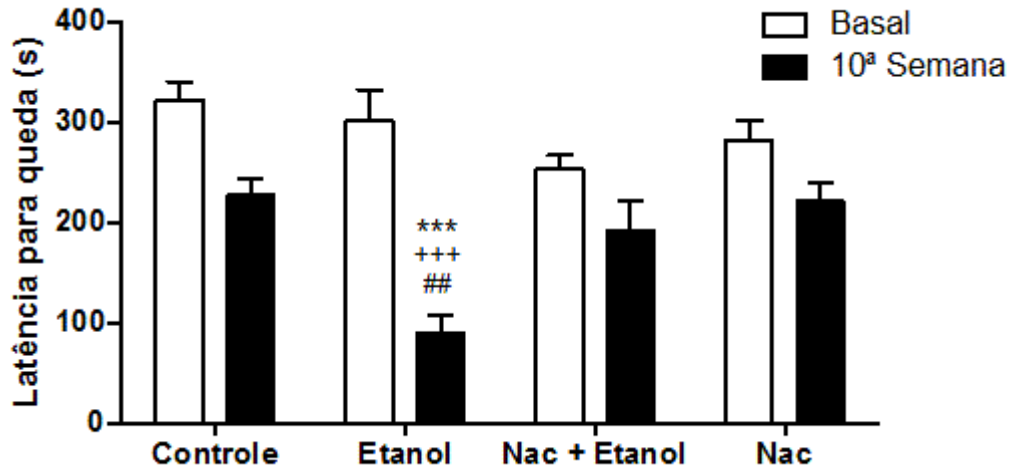
Nota: Os dados foram expressos como a média \pm EPM e analisados por Two – Way ANOVA seguido do pós - teste Bonferroni. *** $P < 0,001$ diferença entre o grupo etanol e o grupo controle após as 10 semanas de tratamento. ### $P < 0,001$ diferença entre o grupo etanol e o grupo Nac + etanol após 10 semanas de tratamento. +++ $P < 0,001$ diferença entre o grupo etanol e o seu basal, antes do tratamento (n = 8).

5.4 NAC PREVINE ALTERAÇÕES NO EQUILÍBRIO E COORDENAÇÃO MOTORA NA NEUROPATIA INDUZIDA POR ETANOL

O gráfico 4 mostra a latência para queda (s) de cada grupo na 10^a semana de tratamento em relação a latência para queda (s) basal de cada grupo para avaliar, através do teste de locomoção forçada em cilindro giratório (Rota – Rod), o equilíbrio e a coordenação motora. No dia 0, basal, a latência para queda do grupo Etanol ($300,77 \pm 30,831$ s, $P>0,05$) não era diferente em relação da do grupo Controle ($321,835 \pm 17,978$ s, $P>0,05$). Contudo, após o tratamento, a média da latência para queda do grupo Etanol na 10^a semana ($88,860 \pm 18,062$ s, $P<0,001$) diminuiu significativamente quando comparado com a sua latência para queda basal ($300,777 \pm 30,831$ s, $P>0,05$) e com a média da latência para queda do grupo Controle na 10^a semana ($226,610 \pm 16,722$, $P>0,05$).

Em relação ao tratamento com NAC, antes do tratamento, a latência para queda basal do grupo NAC + Etanol ($253,500 \pm 13,527$ s, $P>0,05$) não diferiu da latência para queda do grupo NAC ($281,390 \pm 19,984$ s, $P>0,05$) e do grupo Etanol ($300,777 \pm 30,831$ s, $P>0,05$). Após as 10 semanas de tratamento, a latência para queda do grupo NAC + Etanol ($191,907 \pm 30,222$ s, $P>0,05$) em relação a latência para queda do grupo NAC ($220,693 \pm 18,906$ s, $P>0,05$) continuou a não diferir, porém, ao ser comparado com a latência do grupo Etanol na 10^a semana ($88,860 \pm 18,062$ s, $P<0,01$), este se manteve elevado, o que não ocorreu com o grupo Etanol, que após as 10 semanas de tratamento, teve sua latência para queda ($88,860 \pm 18,062$ s, $P<0,001$) em relação à basal ($300,777 \pm 30,831$ s, $P>0,05$) diminuída significativamente, sugerindo que o tratamento com a NAC foi capaz de prevenir alterações no equilíbrio e coordenação motora dos animais tratados apenas com etanol.

Gráfico 4 - Efeito do tratamento crônico da *N* – acetilcisteína (NAC) no equilíbrio e coordenação motora dos animais com neuropatia induzida por etanol através do teste da locomoção forçada em cilindro giratório (Rota – Rod).



Fonte: Do autor.

Nota: Os dados foram expressos como a média \pm EPM e analisados por Two – Way ANOVA seguido do pós - teste Bonferroni (n = 6). ***P<0,001 diferença entre o grupo Etanol e o grupo Controle após as 10 semanas de tratamento. ##P<0,01 diferença entre o grupo Etanol e o grupo NAC + Etanol após 10 semanas de tratamento. +++P<0,001 diferença entre o grupo Etanol e o seu basal, antes do tratamento.

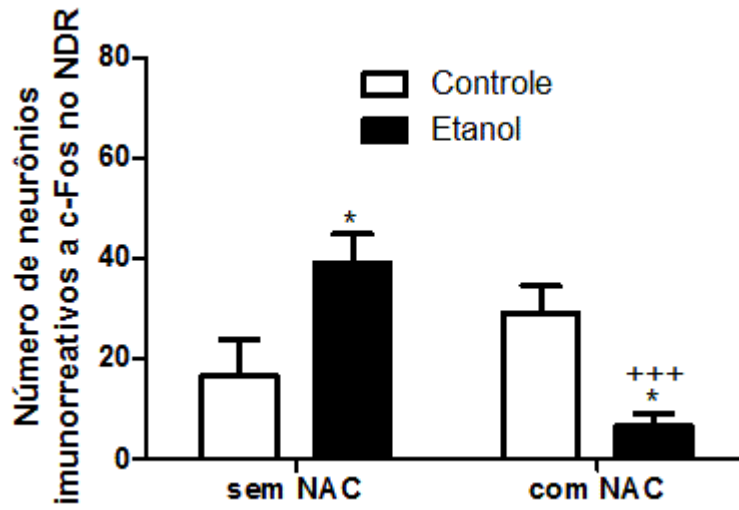
5.5 NAC PREVINE AUMENTO NO NÚMERO DE NEURÔNIOS IMUNORREATIVOS PARA C- FOS INDUZIDO PELO ETANOL

Os gráficos 5A, 5B, 5C e 5D e as figuras 5A, 5B e 5C mostram o número de neurônios imunorreativos para c-Fos nos núcleos NDR, PVN e PAG após 10 semanas de tratamento. Os animais tratados com Etanol e que não receberam NAC apresentaram um aumento significativo do número de neurônios imunorreativos a c-Fos no NDR em comparação aos animais controle ($16,7 \pm 7,0$ versus $39,0 \pm 5,8$ neurônios, $P < 0,05$). O tratamento com NAC não somente preveniu este aumento induzido pelo Etanol ($39,0 \pm 5,8$ versus $6,7 \pm 2,4$ neurônios, $P < 0,001$) como reduziu o número de neurônios marcados para C-Fos para valores mais baixos que os encontrados no grupo controle ($29,0 \pm 5,4$ versus $6,7 \pm 2,4$ neurônios, $P < 0,05$).

O mesmo padrão de resposta foi observado nas porções parvocelulares do PVN. O tratamento com Etanol aumentou o número de neurônios imunorreativos a c-Fos ($27,6 \pm 3,6$ versus $52,7 \pm 4,5$ neurônios, $P < 0,05$), enquanto que o tratamento com NAC preveniu esta resposta induzida pelo Etanol ($52,7 \pm 4,5$ versus $17,3 \pm 3,8$ neurônios, $P < 0,01$). Novamente o tratamento com NAC em animais que receberam Etanol reduziu o número de neurônios positivos para c-Fos para valores inferiores aos observados no grupo Controle ($45,5 \pm 10,2$ versus $17,3 \pm 3,8$ neurônios, $P < 0,05$). Na porção lateral magnocelular do PVN, o tratamento com Etanol também aumentou significativamente o número de núcleos imunorreativos a c-Fos ($3,5 \pm 1,2$ versus $13,6 \pm 4,2$ neurônios, $P < 0,05$). Mais uma vez, o tratamento com NAC foi efetivo em reduzir a imunomarcção para c-Fos neste sub-núcleo ($13,6 \pm 4,2$ versus $4,2 \pm 1,4$ neurônios, $P < 0,05$).

O tratamento com Etanol também induziu aumento de quase 100% no número de neurônios imunorreativos a c-Fos na PAG ($47,5 \pm 8,43$ versus $84,8 \pm 8,3$ neurônios, $P < 0,05$), sendo este aumento prevenido em presença do tratamento com NAC ($84,8 \pm 8,3$ versus $39,7 \pm 12,1$ neurônios, $P < 0,01$).

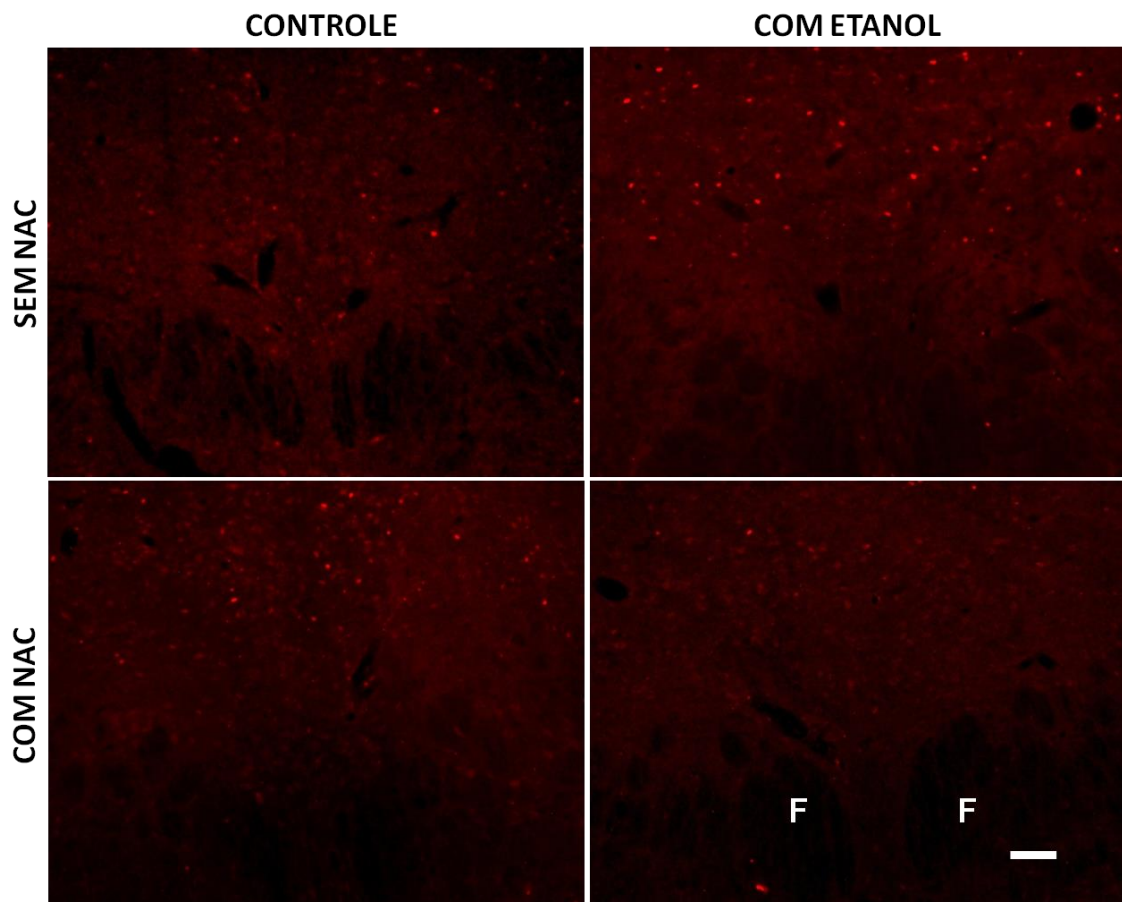
Gráfico 5A – Número de neurônios imunorreativos a c-Fos no NDR.



Fonte: Do autor.

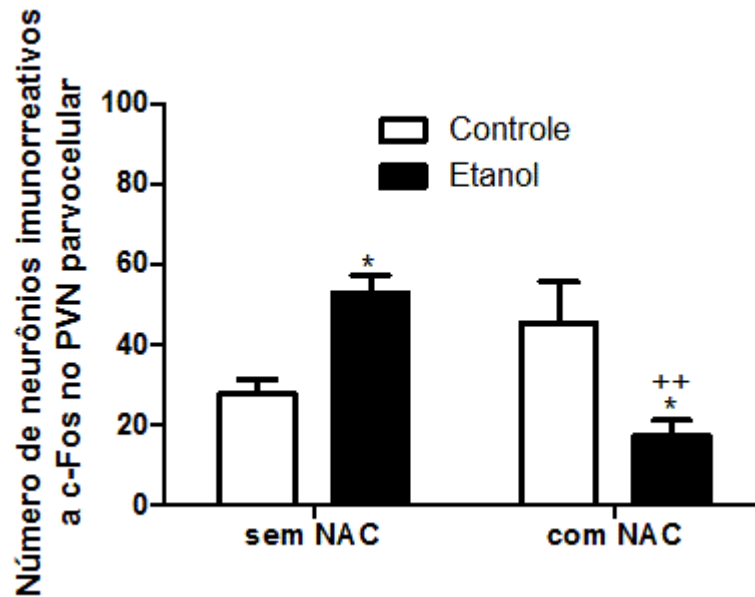
Nota: Análise por Two-Way ANOVA seguido do pós-teste de Newman-Keuls. * $P < 0,05$ versus o respectivo grupo controle, +++ $P < 0,001$ versus o grupo Etanol sem Nac (n = 5 e 4).

Figura 10A – Fotomicrografias representativas do Núcleo Dorsal da Rafe (NDR) de animais controles e tratados com Etanol que receberam ou não N-acetilcisteína (NAC), mostrando a marcação fluorescente para a proteína c-Fos (em vermelho). Escala: 50 μ m. F: fascículo longitudinal medial.



Fonte: Do autor.

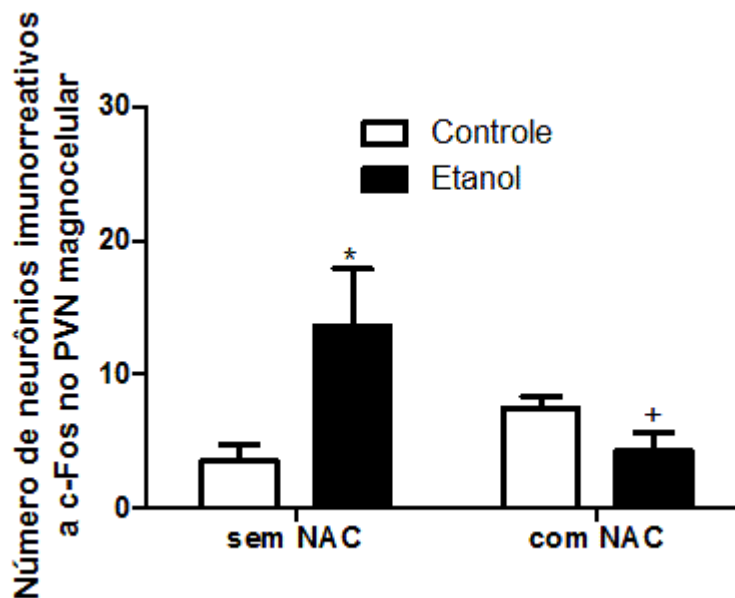
Gráfico 5B – Número de neurônios imunorreativos a c-Fos nas porções parvocelulares do PVN.



Fonte: Do autor.

Nota: Análise por Two-Way ANOVA seguido do pós-teste de Newman-Keuls. * $P < 0,05$ versus o respectivo grupo controle, ++ $P < 0,01$ versus o grupo Etanol sem NAC (n = 5 e 4).

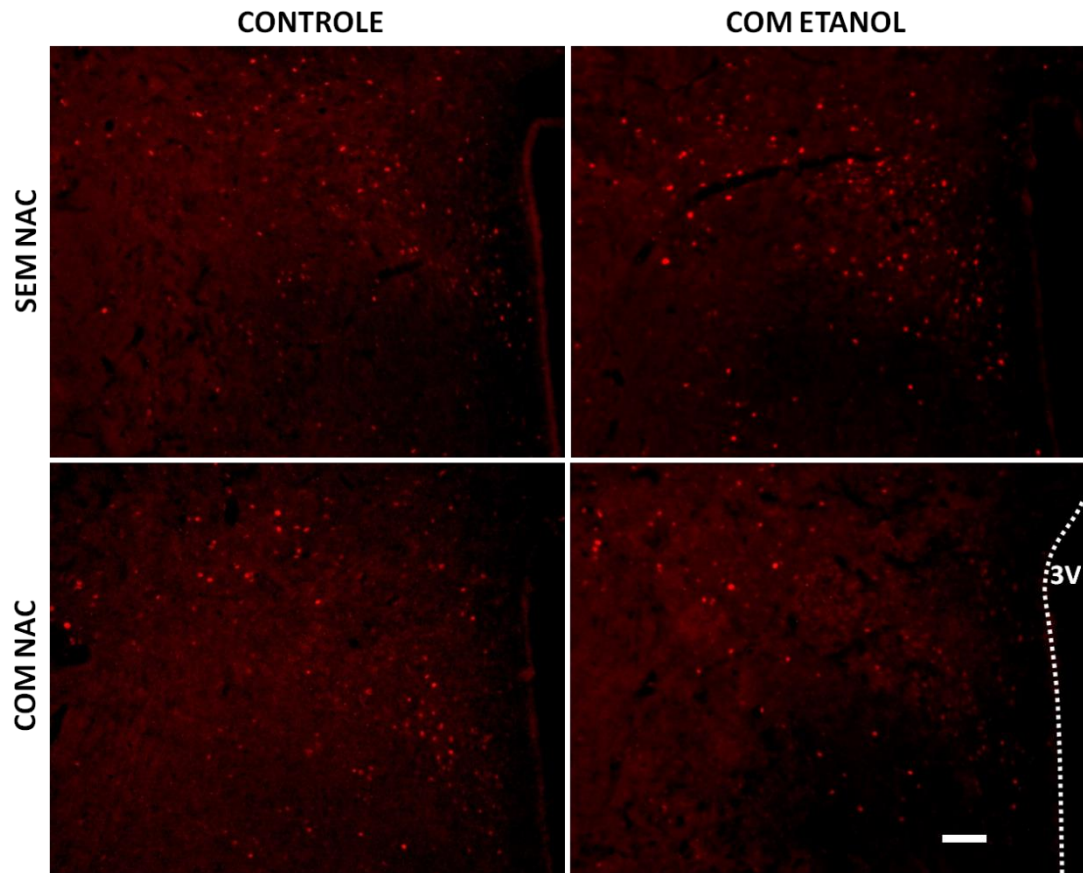
Gráfico 5C – Número de neurônios imunorreativos a c-Fos na porção lateral magnocelular do PVN.



Fonte: Do autor.

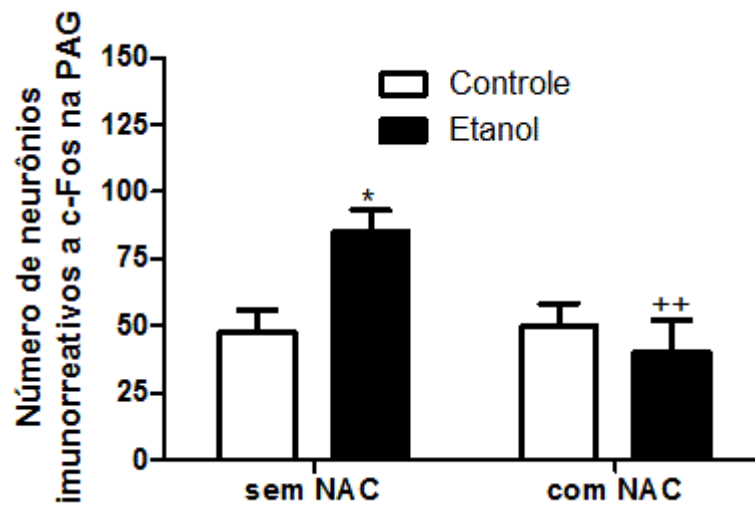
Nota: Análise por Two-Way ANOVA seguido do pós-teste de Newman-Keuls. * $P < 0,05$ versus o respectivo grupo controle, + $P < 0,05$ versus o grupo Etanol sem NAC (n = 5 e 4).

Figura 10B – Fotomicrografias representativas do Núcleo Paraventricular do hipotálamo (PVN) de animais controles e tratados com Etanol que receberam ou não N-acetilcisteína (NAC), mostrando a marcação fluorescente para a proteína c-Fos (em vermelho). Escala: 50 μ m. 3V: terceiro ventrículo.



Fonte: Do autor.

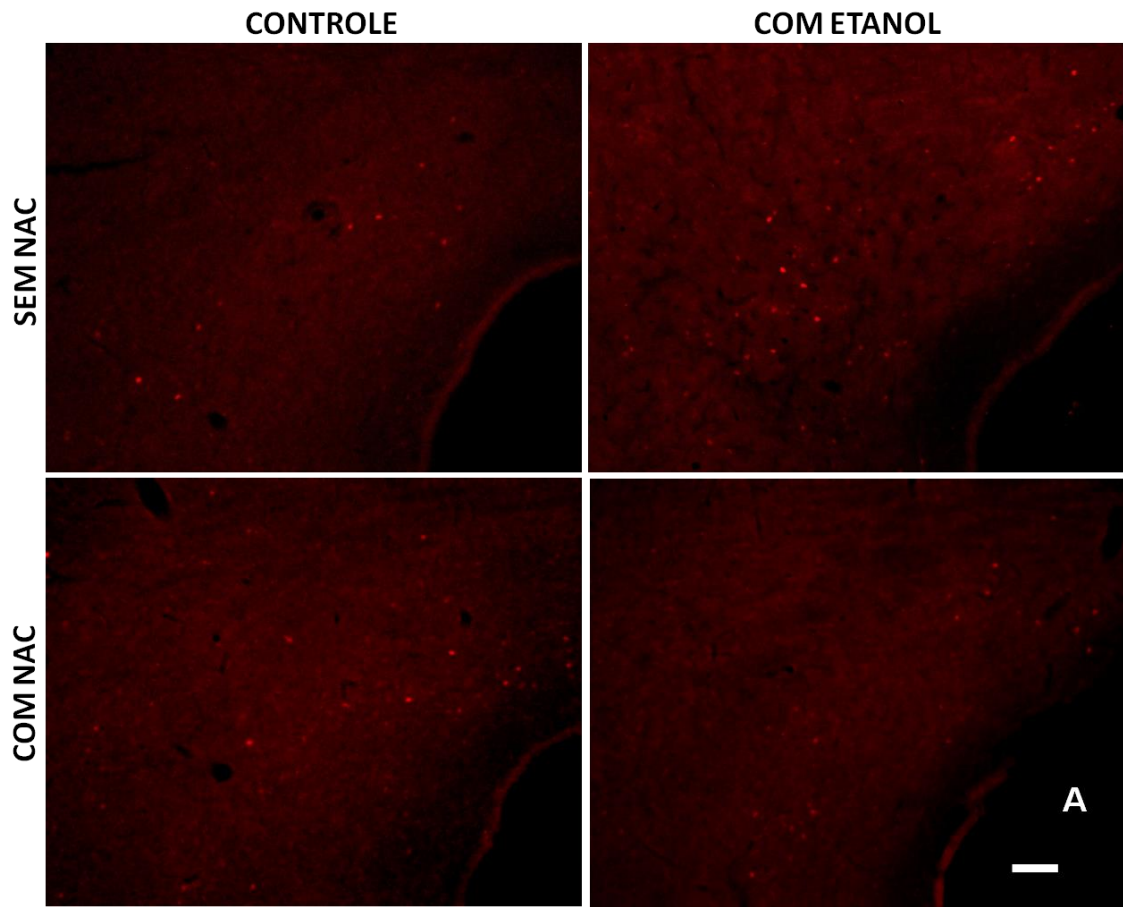
Gráfico 5D – Número de neurônios imunorreativos a c-Fos na PAG.



Fonte: Do autor.

Nota: Análise por Two-Way ANOVA seguido do pós-teste de Newman-Keuls. * $P < 0,05$ versus o respectivo grupo controle, ++ $P < 0,01$ versus o grupo Etanol sem Nac (n de 5 a 4).

Figura 10C – Fotomicrografias representativas da Substância Cinzenta Periaquedutal (PAG) de animais controles e tratados com Etanol que receberam ou não N-acetilcisteína (NAC), mostrando a marcação fluorescente para a proteína c-Fos (em vermelho). Escala: 50 μ m. A: aqueduto de Sylvius.



Fonte: Do autor.

5.6 PESO DOS ANIMAIS

A tabela 2 mostra o ganho de peso (g) dos animais de cada grupo ao longo das 10 semanas de tratamento, com o objetivo de avaliar se o tratamento com o Etanol estaria influenciando no ganho de peso desses animais. Os animais do grupo Etanol em relação aos animais do grupo Controle não apresentaram diferença de peso ao longo das 10 semanas de tratamento ($363,5 \pm 5,9$ g *versus* $390,4 \pm 9,6$ g), assim como também não apresentaram diferença no ganho de peso em relação aos animais do grupo NAC ($363,5 \pm 5,9$ *versus* $344,5 \pm 10,5$ g). Entretanto, o grupo NAC teve um aumento de ganho de peso menor que os animais do grupo Controle a partir da 6ª semana de tratamento ($316,4 \pm 8,9$ g *versus* $350,2 \pm 7,9$ g, $P < 0,05$) e continuou assim até a 10ª semana ($344,5 \pm 10,5$ g *versus* $390,4 \pm 9,6$ g, $P < 0,01$). O mesmo aconteceu com o grupo NAC+Etanol, este também teve um aumento de ganho de peso menor que o grupo Controle a partir da 4ª semana de tratamento ($280,4 \pm 10,3$ g *versus* $318,9 \pm 7,3$, $P < 0,05$) e persistiu até a 10ª semana ($325,7 \pm 13,9$ g *versus* $390,4 \pm 9,6$ g, $P < 0,001$). O grupo NAC+Etanol, na 10ª semana de tratamento, também começou a apresentar um ganho de peso menor que o grupo Etanol ($325,7 \pm 13,9$ g *versus* $363,5 \pm 5,9$ g, $P < 0,05$). Apesar de ocorrer essa diferença no ganho de peso dos animais dos grupos citados, nenhum grupo ao longo das 10 semanas de tratamento apresentou perda de peso, ou seja, durante todo o tratamento os animais de cada grupo apresentaram um aumento no peso corporal.

Tabela 2 - Ganho de peso (g) dos animais de cada grupo ao longo das 10 semanas de tratamento.

	Peso (g) 1ª Semana	Peso (g) 4ªSemana	Peso (g) 6ª Semana	Peso (g) 8ª Semana	Peso (g) 10ª Semana
Controle	230,3 ± 7,1	318,9 ± 7,3	350, 2 ± 7,9	375,9 ± 9,5	390, 4 ± 9,6
Etanol	218,9 ± 7,2	301,2 ± 6,2	326,7 ± 6,2	352,8 ± 6,4	363,5 ± 5,9
Nac + Etanol	217,0 ± 12,6	280,4 ± 10,3 ^{\$}	305,5 ± 11,9 ^{\$\$}	323,2 ± 12,7 ^{\$\$\$}	325,7 ± 13,9 ^{\$\$\$#}
Nac	214,9 ± 8,4	291,0 ± 6,1	316,4 ± 8,9 [°]	339,7 ± 10,7 [°]	344,5 ± 10,5 ^{°°}

Fonte: Do autor.

Nota: Os dados foram expressos como a média ± EPM e analisados por Two – Way ANOVA seguido do pós - teste Bonferroni de (n de 16 a 8). ^{\$}P<0,05, ^{\$\$}P<0,01 e ^{\$\$\$}P<0,001 diferença entre o grupo Controle e o grupo NAC + Etanol. [°]P<0,05 e ^{°°}P<0,01 diferença entre o grupo Controle e o grupo NAC. [#]P<0,05 diferença entre o grupo Etanol e o grupo NAC + Etanol.

5.7 ETANOL E NAC NÃO AFETARAM A MOTIVAÇÃO DOS ANIMAIS EM EXPLORAR O AMBIENTE

A tabela 3 mostra a atividade locomotora dos animais de cada grupo após as 10 semanas de tratamento. O intuito do experimento utilizando o teste de campo aberto foi para certificar que a administração do Etanol e da NAC não induz efeitos inespecíficos em nível central sobre a motivação dos animais em explorar o ambiente. Os dados apresentados demonstraram que os grupos que receberam Etanol com ou sem NAC, tanto em relação ao número de quadros cruzados e ao número de rearing, não apresentaram diferença dos seus respectivos controles, indicando assim que tanto a administração do Etanol como a da NAC não induziram nenhum efeito debilitante nos animais.

Tabela 3 - Atividade locomotora no campo aberto dos animais de cada grupo após as 10 semanas de tratamento.

	Quadros Cruzados	Número de Rearing
Controle	46,000 ± 7,474	24,625 ± 3,645
Etanol	46,167 ± 8,392	31,833 ± 5,344
Nac + Etanol	39,227 ± 3,227	24,750 ± 1,377
Nac	45,200 ± 10,210	24,600 ± 4,456

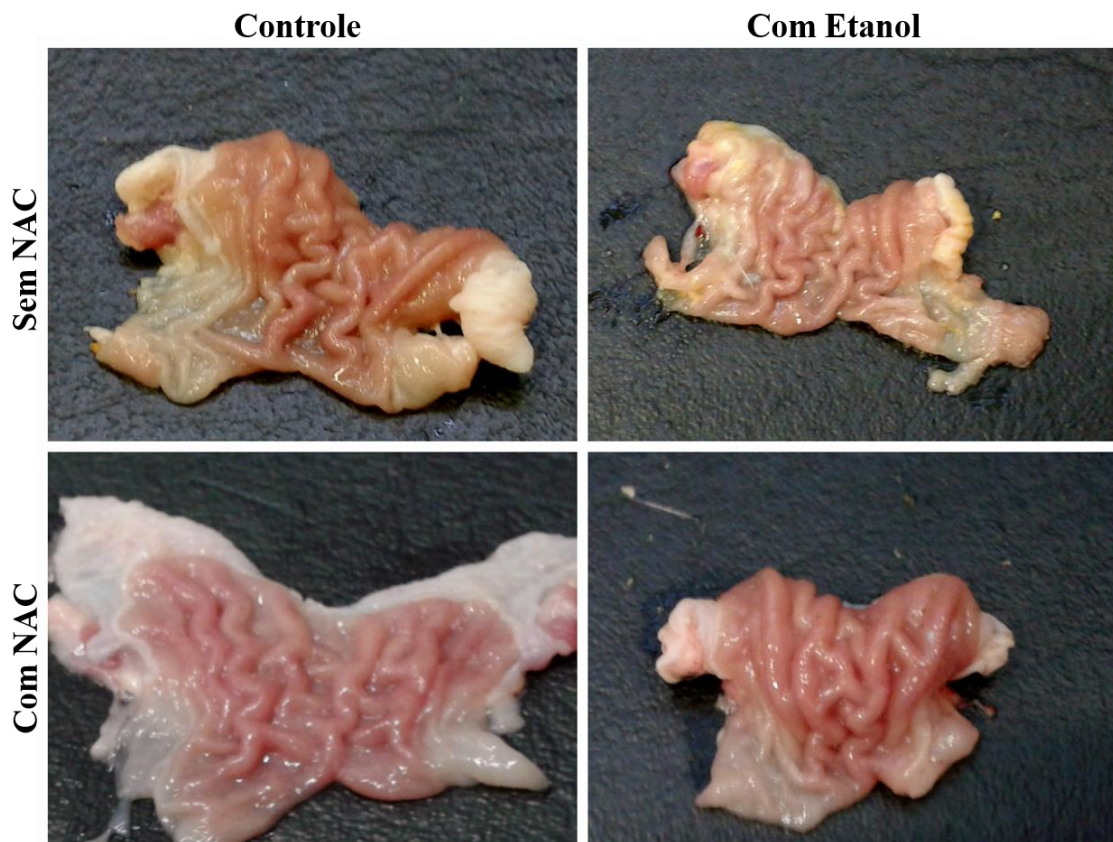
Fonte: Do autor.

Nota: Os dados foram expressos como a média ± EPM e analisados por Two – Way ANOVA seguido do pós - teste Bonferroni (n de 16 a 8).

5.8 ETANOL NÃO FOI CAPAZ DE INDUZIR ÚLCERA GÁSTRICA NOS ANIMAIS TRATADOS COM ETANOL COM OU SEM NAC

A figura 11 mostra o exame macroscópico do estômago dos animais após as 10 semanas de tratamento. Essa análise foi realizada para verificar se a porcentagem de Etanol administrada diariamente aos ratos seria capaz de induzir úlcera gástrica, a qual poderia debilitar os animais, interferir no desenvolvimento da neuropatia alcoólica e nos resultados obtidos pelo tratamento com a NAC. Ao fim das 10 semanas de tratamento, a análise macroscópica do estômago dos animais de cada grupo não indicou a presença de lesões hemorrágicas na mucosa gástrica, inferindo assim, que os animais que receberam Etanol com ou sem NAC, não apresentavam um quadro de úlcera gástrica induzido pela administração crônica do Etanol.

Figura 11 - Exame macroscópico do estômago dos animais de cada grupo após as 10 semanas de tratamento.



Fonte: Do autor.

6 DISCUSSÃO

O etilismo crônico é um problema social e de saúde pública em todo o mundo. O consumo crônico do etanol é a causa para o desenvolvimento da polineuropatia alcoólica. Esta é caracterizada por um distúrbio no sistema nervoso periférico, acometendo a função dos nervos sensoriais, motores e autônomos (PETERS et al., 2006). Os pacientes que apresentam esta patologia queixam-se de dor em forma de queimação espontânea, hiperalgesia e alodinia (TIWARI; KUHAD; CHOPRA, 2009).

Dina et al. (2000) desenvolveram o primeiro modelo de dor neuropática experimental induzido por etanol. Os autores observaram que após 12 semanas de tratamento com etanol, seus animais apresentavam alterações na função de nociceptores aferentes primários e na via de sinalização da PKC³⁹, que contribuíam para o desenvolvimento da hiperalgesia.

Atualmente, sabe-se que três fatores primários são responsáveis pela hiperalgesia presente na dor neuropática: a produção de descargas ectópicas provindas do axônio lesionado, as quais ocorrem devido a porção proximal à lesão que persiste e forma um neuroma; liberação de mediadores inflamatórios tais como TNF- α ⁴⁰ e IL-1 β ⁴¹ provenientes das células nervosas danificadas; mudanças plásticas nas vias sensoriais que fazem comunicação com a medula espinhal e o sistema nervoso central. Já em relação à hiperalgesia térmica, a diminuição no tempo de latência térmica, é ocasionada por uma sensibilização dos neurônios centrais devido a lesões ou danos nos nervos motores, bem como nas fibras sensoriais (KANDHARE et al., 2012).

No presente estudo, a administração crônica de etanol por 10 semanas induziu a redução significativa no limiar nociceptivo dos animais experimentais, sendo evidenciado através da diminuição do tempo de latência no teste Tail Flick (hiperalgesia térmica – GRÁFICO 3) e da diminuição no limiar de retirada de pata nos testes Randall Selitto (hiperalgesia mecânica – GRÁFICO 2B) e von Frey eletrônico (alodinia mecânica – GRÁFICO 1B). Os resultados aqui apresentados estão de acordo com dados anteriores de outros grupos de pesquisa (DINA et al., 2000; KANDHARE et al., 2012; NARITA et al., 2006; TIWARI; KUHAD; CHOPRA, 2009), demonstrando assim, que um estado semelhante a dor neuropática estava presente nos ratos após a administração crônica de etanol.

³⁹ Proteína quinase C

⁴⁰ Fator de necrose tumoral α

⁴¹ Interleucina – 1 - β

O estresse oxidativo é considerado um fator muito importante no desenvolvimento de doenças neurodegenerativas agudas ou crônicas, em lesões cerebrais traumáticas e, também está envolvido na manutenção da dor persistente (KIM et al., 2004; TAL, 1996; THIEMERMANN, 2003). O consumo exagerado do etanol, e com a posterior produção de metabólitos, tem a capacidade de aumentar a concentração de ROS⁴² e de diminuir os mecanismos de defesa, como a remoção de ROS pela presença de eliminadores de ROS, aumentando assim a oxidação de proteínas, lipídios e DNA⁴³. Desta forma, o etanol garante a formação de ROS, que aumenta o estresse oxidativo, levando ao dano neuronal (TIWARI; KUHAD; CHOPRA, 2012).

O tratamento com antioxidantes vem sendo amplamente utilizado para a obtenção da melhora dos nervos danificados pelo uso crônico do etanol, o qual esgota as reservas endógenas de antioxidantes e aumenta o estresse oxidativo, levando ao dano neuronal. Pesquisas com Vitamina E e com Epigalotequina – 3 – galato, uma catequina presente no chá verde, foram realizadas para investigar, se as propriedades antioxidantes dessas substâncias possuíam potencial de proteção na neuropatia alcoólica. Ao término das 10 semanas de tratamento, o resultado para ambos antioxidantes foi o aumento do limiar de retirada de pata, bem como do tempo de latência, que possivelmente está relacionado com as propriedades antioxidantes de ambos compostos, na proteção contra o estresse oxidativo mediado pela ativação da via de sinalização da PKC⁴⁴, supressão do estresse nitrosativo, através da diminuição da concentração da óxido nítrico sintase (NOS) e do $\bullet\text{NO}$ ⁴⁵, e de citocinas, como TNF – α ⁴⁶ e IL – 1 β ⁴⁷, presentes no plasma sanguíneo e no nervo ciático dos ratos com neuropatia alcoólica induzida (TIWARI; KUHAD; CHOPRA, 2010 e 2009).

A NAC é uma substância que possui propriedades antioxidantes, já que possui a capacidade de atuar como doadora de grupos sulfidrilas, contribuir para a formação da glutatona, e reagir diretamente com as ROS.

A administração crônica de etanol é capaz de aumentar o estresse oxidativo no sistema nervoso central de ratos, através do aumento exacerbado de ROS que são evidenciados pelo aumento de certos parâmetros bioquímicos como o malondialdeído (MDA), produto da

⁴² Espécies reativas do oxigênio

⁴³ Ácido desoxirribonucléico

⁴⁴ Proteína quinase C

⁴⁵ Óxido nítrico

⁴⁶ Fator de necrose tumoral α

⁴⁷ Interleucina – 1 - β

lipoperoxidação, e $\bullet\text{NO}$ ⁴⁸ e, diminuição das SODs⁴⁹, GSH⁵⁰ e CAT⁵¹. No entanto, a administração de NAC⁵² garante uma diminuição da lipoperoxidação e do $\bullet\text{NO}$, e aumentou as reservas de GSH, SODs e CAT, inferindo que a NAC atenua os efeitos tóxicos do etanol sobre o sistema oxidante/antioxidante presente no cérebro (AYDIN, 2002).

Os receptores mGlu5⁵³ estão relacionados na modulação da dor inflamatória no corno dorsal da medula espinhal, através da ativação de segundos mensageiros e de proteínas quinases, principalmente ativação da PKC⁵⁴ (CODERRE, 1992; FISHER; CODERRE, 1996; KARIM et al., 2001; YOUNG et al., 1997). O estudo de Miyoshi et al. (2007) avaliou se os receptores mGlu5 e a PKC estavam envolvidos no desenvolvimento e/ou manutenção da dor neuropática desenvolvida pelo consumo crônico de etanol. Após ser estabelecida a neuropatia alcoólica, a utilização de inibidores seletivos de receptores mGlu5 e da PKC reverteram significativamente a indução da dor neuropática. Assim, os autores sugeriram que tanto os receptores mGlu5 e a PKC estão envolvidos no estabelecimento da neuropatia alcoólica, já que o etanol é capaz de modular a ativação dos receptores mGlu5, que resulta na hidrólise do fosfoinosítídeo pela fosfolipase C, que conduz a liberação de cálcio presente em reservas intracelulares e consequente estimulação da PKC.

Sun et al. (2012) investigaram os efeitos da NAC na ativação dos receptores mGlu5⁵⁵ do grupo I (mGlu 1⁵⁶ e mGlu5) para a ocorrência de apoptoses em linhagens de células gliais C6 e células neuronais dopaminérgicas MN9D, e no modelo animal (ratos) de doença de Parkinson. Os resultados indicaram que a NAC preveniu a formação de ROS⁵⁷ e a oxidação da GSH celular e, da subsequente ativação dos receptores mGlu5 do grupo I (mGlu 1 e mGlu5), nos modelos experimentais que foram utilizados. Além disso, esses resultados sugerem que a NAC pode exercer uma função regulatória na atividade dos receptores mGlu5 do grupo I, atuando tanto na neuroproteção e na neurotoxicidade através da redução do estresse oxidativo. Portanto, a NAC pode representar um novo tratamento para uma variedade de doenças neurodegenerativas que possam ser associadas com receptores mGlu5⁵⁸ do grupo I, como a neuropatia alcoólica.

⁴⁸ Óxido nítrico

⁴⁹ Superóxido Dismutases

⁵⁰ Glutathione

⁵¹ Catalase

⁵² N - acetilcisteína

⁵³ Receptor de glutamato metabotrópico 5

⁵⁴ Proteína quinase C

⁵⁵ Receptores de glutamato metabotrópicos

⁵⁶ Receptor de glutamato metabotrópicos 1

⁵⁷ Espécies reativas do oxigênio

⁵⁸ Receptores de glutamato metabotrópicos

Já Naik et al. (2006) em seu estudo verificaram o efeito da administração de NAC⁵⁹ em ratos com neuropatia periférica por constrição do nervo ciático. Após realizarem a constrição crônica do nervo ciático, os testes comportamentais indicaram diminuição nos limiares térmicos e mecânicos, sugerindo efeito hiperalgésico, e os parâmetros bioquímicos indicavam aumento na concentração do MDA⁶⁰, diminuição na concentração da glutatona reduzida e na concentração das SODs⁶¹, dados que indicam a participação do estresse oxidativo na manutenção da dor neuropática. Porém, a NAC teve a capacidade de reverter os resultados anteriores, ou seja, ela aumentou os limiares térmicos e mecânicos e, também manteve dentro dos padrões da normalidade os parâmetros bioquímicos. Assim, esses resultados sugerem que a NAC pode ser um candidato com grande potencial para o tratamento da dor neuropática.

Em 2010, Kamboj et al. observaram o efeito neuroprotetor da NAC no comportamento nociceptivo, bioquímico e estrutural do nervo ciático na neuropatia diabética. Após 8 semanas de tratamento com a estreptozotocina, indutor da diabetes, os ratos apresentaram neuropatia diabética, que foi evidenciada através da diminuição do tempo de latência no teste Tail Flick, o que indicou hiperalgesia térmica. No entanto, o tratamento com a NAC foi capaz de melhorar essa hiperalgesia, pois esta conseguiu atenuar o estresse oxidativo e a ocorrência de apoptoses, que são os possíveis causadores da neuropatia diabética. Desta forma, esses resultados sugerem que a NAC possui um potencial terapêutico na atenuação da neuropatia diabética.

Com base nos estudos anteriormente citados, observou-se que seria interessante investigar o efeito da NAC no comportamento nociceptivo associado ao consumo crônico de etanol em ratos. Dos resultados obtidos neste estudo, a diminuição do tempo de latência no teste Tail Flick (GRÁFICO 3) e a diminuição no limiar de retirada de pata nos testes Randall Selitto (GRÁFICO 2B) e von Frey eletrônico (GRÁFICO 1B) indicaram alteração do limiar nociceptivo nos ratos tratados com etanol. Entretanto, após as 10 semanas de tratamento com NAC, os ratos do grupo NAC + Etanol mantiveram tanto o tempo de latência (GRÁFICO 3) como os limiares de retirada de pata elevados (GRÁFICOS 1A e 2A), indicando que a nocicepção desses animais não havia sido alterada pelo etanol, ou seja, da mesma forma que para a neuropatia diabética, a NAC⁶² também demonstrou importante função neuroprotetora, impedindo o desenvolvimento das hiperalgesias térmica, mecânica e da alodinia.

⁵⁹ N - acetilcisteína

⁶⁰ Malondialdeído

⁶¹ Superóxido dismutases

⁶² N - acetilcisteína

Os animais que receberam apenas etanol também exibiram acentuado prejuízo na coordenação motora (GRÁFICO 4), além da hiperalgesia (GRÁFICOS 2B e 3) e da alodinia (GRÁFICO 1B). Foi observado uma diminuição significativa na latência para queda desses animais (GRÁFICO 4) no teste da locomoção forçada em cilindro giratório (Rota – rod - teste utilizado para observar alteração na coordenação motora). A disfunção neuropática pode desencadear este tipo de alteração na motricidade, indicando possíveis alterações no tônus dos músculos sóleo e extensor longo dos dedos (TORREJAIS et al., 2002). Os resultados deste estudo obtidos após a administração de etanol no teste Rota – rod, corroboram com os dados de Kandhare et al. (2012), os quais, após 10 semanas de tratamento, também apresentaram uma diminuição significativa no tempo de queda de seus animais.

Estudos sobre a histologia do nervo ciático mostraram que, a administração crônica de etanol é capaz de diminuir o tamanho das fibras neurais, de aumentar o número dos nervos periféricos regenerativos e também de garantir a perda da sua inervação nos músculos esqueléticos, potencializando assim a manutenção da dor neuropática e de maiores alterações na coordenação motora (MELLION et al., 2013).

Além da perda da inervação, outra causa que poderia gerar alteração na coordenação motora seria uma disfunção na atividade da Na^+ , K^+ - ATPase. O decréscimo na atividade dessa enzima, aumenta a concentração de sódio intra – axonal e bloqueia a despolarização da membrana (COPPEY et al., 2000; POP – BUSUI et al., 2002). Com isso, ocorreria a diminuição na velocidade da condução nervosa motora, contribuindo para os sintomas clínicos de fraqueza e fadiga muscular.

No estudo de Raygude et al. (2012), a administração crônica de etanol desenvolveu neuropatia alcoólica nos ratos, sendo evidenciada pela presença de hiperalgesia e alodinia. Além dessas duas características, o etanol teve a capacidade de diminuir a latência de queda no teste Rota - rod, reduzir a velocidade de condução nervosa motora e de diminuir a atividade da Na^+ , K^+ - ATPase. Esses resultados mostram que o consumo de etanol tem o poder de alterar a atividade da Na^+ , K^+ - ATPase e a velocidade de condução nervosa motora no nervo ciático que, por sua vez, levam a alterações na coordenação motora.

No presente estudo, o tratamento com NAC^{63} , além de prevenir o aparecimento da hiperalgesia térmica (GRÁFICO 3), mecânica (GRÁFICO 2A) e alodinia (GRÁFICO 1A), também preveniu a alteração da motricidade, mantendo elevada a latência para queda no teste Rota – rod dos animais do grupo $\text{NAC} + \text{Etanol}$ (GRÁFICO 4). O mesmo efeito foi obtido no

⁶³ N - acetilcisteína

estudo de Kamboj et al. (2010); após 8 semanas de tratamento, os animais com neuropatia diabética tratados com NAC mostraram aumento da latência para queda quando comparados aos não tratados com NAC. Neste estudo ainda, a NAC conseguiu aumentar a atividade da Na^+ , K^+ - ATPase no nervo ciático desses animais.

Mediante isso e lembrando que, o etanol é capaz de aumentar a ROS⁶⁴ e a NAC é capaz de manter os marcadores bioquímicos que estão relacionados com o estresse oxidativo dentro dos padrões da normalidade, o efeito benéfico do tratamento da NAC nas funções motoras sugere que o estresse oxidativo e a redução na atividade da Na^+ , K^+ - ATPase possam estar envolvidos nos danos que ocorrem na função motora.

Além do interesse em investigar o efeito da NAC no comportamento nociceptivo e na coordenação motora de ratos tratados com etanol, foi realizado imunofluorescência para observar também o efeito da NAC no número de neurônios imunorreativos para c – Fos.

Quando um neurônio é ativado de forma intensa desencadeia – se síntese de proteínas específicas que demandam ativação de genes de expressão imediata, dentre eles o mais conhecido é o c – Fos. Este gene está relacionado à ativação neuronal e é expresso em situações onde o animal é exposto a novas situações, como um estímulo doloroso. Há evidências que mostram que o estímulo nocivo pode induzir, no sistema nervoso central, variações de longa duração nos processos celulares pela modulação da expressão dos genes de ativação imediata como a c – Fos. A distribuição da c- Fos no sistema nervoso central após a estimulação nociva inclui: estruturas envolvidas com respostas emocionais que parecem ter um papel importante no componente afetivo da dor, ou seja, o quão desagradável é a experiência da dor (núcleo paraventricular hipotalâmico - PVN); estruturas usualmente responsáveis à nocicepção, no entanto podem atuar também como componente afetivo da dor (substância cinzenta periaquedutal - PAG) e núcleos da rafe; e áreas que participam na modulação do impulso nociceptivo (PAG – região ventral) (PRADO; DEL BEL, 1998).

No presente estudo, os animais que foram tratados com Etanol e em seguida submetidos ao teste Randall Selitto, apresentaram um aumento no número de neurônios imunorreativos para c-Fos na porção lateral magnocelular do PVN⁶⁵ e nas porções parvocelulares do PVN (GRÁFICOS 5c e 5b e, FIGURA 10b), no núcleo dorsal da rafe (NDR) (GRÁFICO 5a e FIGURA 10a) e, na PAG⁶⁶ (GRÁFICO 5d e FIGURA 10c), o que corrobora com outros estudos de dor (NARITA, 2003; RODELLA et al., 1998; TAKEDA et al. 2009).

⁶⁴ Espécies reativas do oxigênio

⁶⁵ Núcleo paraventricular hipotalâmico

⁶⁶ Substância cinzenta periaquedutal

Os grupos de neurônios magnocelulares do hipotálamo estão organizados em dois núcleos: o PVN e o núcleo supraóptico (SON). Destas áreas partem axônios que se projetam à neuro-hipófise e liberam os neuro-hormônios vasopressina (AVP) e ocitocina (OT) na circulação porta-hipofisária. Os neurônios magnocelulares do PVN são subdivididos nas porções medial (PaMM) e lateral (PaLM), sendo que esta última subárea apresenta uma predominância de neurônios vasopressinérgicos. Além destas, que são as porções magnocelulares mais características do PVN, este núcleo possui ainda neurônios magnocelulares nas regiões periventricular (PeM) e comissural anterior (AC) (ARMSTRONG, 1995). O único destino conhecido para os axônios dos neurônios magnocelulares, como já mencionado, é a neuro-hipófise, passando pela camada interna da eminência mediana.

Em nosso estudo, o tratamento com Etanol promoveu um aumento no número de neurônios imunorreativos para c-Fos na porção lateral magnocelular do PVN (GRÁFICO 5C e FIGURA 10B), o que corrobora achados prévios da literatura. Já foi demonstrado que o tratamento com Etanol por quatro semanas aumenta a secreção de AVP⁶⁷ e a expressão de seu RNA mensageiro no PVN e SON⁶⁸ (DA SILVA et al, 2013). O aumento nos níveis circulantes de AVP parece contribuir de maneira significativa para o desenvolvimento de quadro hipertensivo nestes animais, uma vez que o tratamento com um antagonista dos receptores vasopressinérgicos V1 reverte a hipertensão induzida pelo tratamento com Etanol (RESSTEL et al, 2008).

Quando comparado ao SON, que só contém neurônios magnocelulares, o PVN mostra-se muito mais complexo quanto à sua citoarquitetura, porque, além dos neurônios magnocelulares, o PVN apresenta seis subnúcleos parvocelulares (ARMSTRONG, 1995). Dentre eles, destacamos a porção medial parvocelular (PaMP), cujos neurônios, em sua maioria, se projetam para a camada externa da eminência mediana. Fenotipicamente, esses neurônios são caracterizados como CRH-érgicos, vasopressinérgicos ou ocitocinérgicos, estando associados à ativação do eixo hipotálamo hipófise-adrenal, lembrando que, além do CRH⁶⁹, os neuro-hormônios AVP⁷⁰ e OT⁷¹, uma vez liberados na eminência mediana, também agem como secretagogos de ACTH⁷² na adeno-hipófise (KISS et al, 1984). Também já foi demonstrado que neurônios parvocelulares do PaMP⁷³ se projetam para outras áreas, como os órgãos

⁶⁷ Vasopressina

⁶⁸ Núcleo supraóptico

⁶⁹ Hormônio liberador de corticotrofina

⁷⁰ Vasopressina

⁷¹ Ocitocina

⁷² Hormônio adrenocorticotrófico

⁷³ Porção medial parvocelular

circunventriculares, provavelmente participando de respostas integrativas no controle da osmolalidade e do volume do líquido extracelular (LARSEN, 1991). O PaMP⁷⁴ está entre as porções parvocelulares do PVN⁷⁵ avaliadas no presente estudo, sendo que nossos resultados demonstraram um aumento na ativação destes neurônios em decorrência do tratamento com Etanol (GRÁFICO 5B e FIGURA 10B), o que indica uma provável ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal nestes animais. De fato, já foi demonstrado que o tratamento com Etanol por 4 semanas aumenta significativamente a secreção de corticosterona em ratos (DA SILVA, 2012). Além disso, animais tratados com Etanol por períodos prolongados tendem a desenvolver um quadro progressivo de desidratação (DA SILVA, 2012; DA SILVA et al., 2013), o que justifica a ativação, via PaMP, de áreas osmossensíveis (órgãos circunventriculares), as quais estão envolvidas no recrutamento de respostas comportamentais homeostáticas como a sede (MCKINLEY; JOHNSON, 2004).

Adicionalmente, um grupo distinto de neurônios parvocelulares se projeta para alvos extra-hipotalâmicos, particularmente para centros autonômicos do bulbo e para a medula espinhal, como é o caso das porções Dorsomedial cap (PaDC) e a porção parvocelular ventral (PaV) (ARMSTRONG, 1995). Estes subnúcleos aparentemente estão envolvidos com a modulação pré-autonômica no controle da pressão arterial e frequência cardíaca. Nosso estudo demonstrou em animais tratados com Etanol um aumento no número de neurônios parvocelulares ativados notadamente na região PaV⁷⁶ (GRÁFICO 5B e FIGURA 10B), o que pode indicar o recrutamento de mecanismos de ajuste cardiovascular nestes animais. De fato, como já mencionado, animais tratados por 4 semanas com doses crescentes de Etanol na água de beber (5 a 20% v/v) desenvolvem um aumento progressivo da pressão arterial média, sem alteração na frequência cardíaca (DA SILVA, 2012; DA SILVA et al., 2013). Além disso, esses animais também apresentam alterações vasculares importantes, como o aumento da responsividade a agentes vasoconstritores (CRESTANI et al, 2014).

Como citado anteriormente, o PVN⁷⁷ é um núcleo que está envolvido com o componente afetivo da dor, assim, quando o animal, que possui alterações no seu comportamento nociceptivo, é exposto a um estímulo nocivo, uma maior expressão no número de neurônios imunorreativos para c – Fos ocorrerá neste núcleo também, o que foi evidenciado no presente estudo. Os ratos tratados apenas com Etanol e que apresentaram neuropatia alcoólica, ao serem

⁷⁴ Porção medial parvocelular

⁷⁵ Núcleo paraventricular hipotalâmico

⁷⁶ Porção parvocelular ventral

⁷⁷ Núcleo paraventricular hipotalâmico

submetidos a um estímulo nocivo, Randall Selitto, apresentaram um aumento difundido no número de neurônios imunorreativos para c – Fos no PVN (GRÁFICOS 5B e 5C e, FIGURA 10B), mostrando então que esta área do cérebro está envolvida com o processamento nociceptivo causado pelo estímulo nocivo nos ratos com neuropatia alcoólica induzida.

Este resultado está de acordo com Takeda et al. (2009), cujo estudo demonstrou que ratos com dor neuropática, devido a constrição crônica do nervo ciático, quando submetidos ao teste Randall Selitto apresentaram aumento significativo no número de neurônios imunorreativos para c – Fos no PVN, confirmando a participação deste núcleo no processamento nociceptivo, devido à um estímulo nocivo em animais que estavam sensibilizados a dor.

Outro núcleo importante que está relacionado a nocicepção é o NDR⁷⁸. Anatomicamente, o NDR está inserido na parte ventro – medial da substância cinzenta periaquedutal presente no mesencéfalo, mas devido a sua citoarquitetura diferente, projeções dos seus neurônios, liberação de neurotransmissores e características fisiológicas, ele não é reconhecido como parte da PAG⁷⁹. Além disso, o NDR⁸⁰ é um núcleo neuroquímico heterogêneo sendo composto principalmente por neurônios serotonérgicos. Ele está envolvido em várias funções fisiológicas, sendo que a mais significativa é sua função antinociceptiva, e os neurotransmissores mais envolvidos nessa função antinociceptiva são a serotonina, os opióides e o ácido aminobutírico – δ (GABA) (WANG; NAKAI, 1994).

O NDR é um núcleo presente no mesencéfalo, recrutado na elaboração do processo antinociceptivo após estímulo nocivo (FREITAS et al., 2005). O NDR faz parte da via descendente da transmissão da dor e sua participação na antinocicepção ocorre através da inibição da propagação do estímulo nocivo que é enviado pela medula espinhal (WANG; NAKAI, 1994). A maioria das fibras serotonérgicas originadas no NDR se projetam para o corno dorsal da medula espinhal e, vários tipos de estímulos nocivos estão associados à liberação de serotonina no corno dorsal. Assim, esta resposta é capaz de modular o processo de sensação da dor. A estimulação elétrica ou de microinjeções de morfina no NDR acarretam em intensa antinocicepção. Estudos radioautográficos e imunohistoquímicos mostraram que a serotonina e os seus receptores são difusamente localizados no NDR (DESCARRIES et al., 1982; WANG; NAKAI, 1994).

⁷⁸ Núcleo dorsal da rafe

⁷⁹ Substância cinzenta periaquedutal

⁸⁰ Núcleo Dorsal da Rafe

No presente estudo, os animais do grupo Etanol submetidos ao teste Randall Selitto, apresentaram um aumento no número de neurônios imunorreativos para c – Fos, quando comparados aos ratos do grupo Controle, que só receberam água (GRÁFICO 5A e FIGURA 10A). Este resultado também está de acordo com o trabalho de Takeda et al. (2009), já que os animais que foram submetidos à cirurgia de constrição crônica do nervo ciático e posterior estímulo pelo teste Randall Selitto também apresentaram aumento no número de neurônios imunorreativos para c – Fos.

O estímulo nocivo, ao qual os ratos com neuropatia alcoólica foram submetidos, foi eficaz também em aumentar o número de neurônios imunorreativos para c – Fos na PAG⁸¹ (GRÁFICO 5D e FIGURA 10C), aumento que corrobora também com o estudo prévio de Takeda et al. (2009). Anatomicamente, a PAG é uma região presente no mesencéfalo e que circunda o aqueduto de Sylvius. Ela também é considerada como um importante sítio para a modulação da nocicepção, já que participa da transmissão ascendente da dor. A PAG recebe terminações nervosas dos neurônios nociceptivos aferentes, presentes na medula espinhal e envia projeções para o núcleo talâmico, que processa a nocicepção. Ela também é um componente importante no sistema inibitório da dor descendente. A ativação deste sistema inibe os neurônios nociceptivos presentes no corno dorsal da medula espinhal (BEHBEHANI, 1995). Após estimulação elétrica ou administração de aminoácidos excitatórios, a PAG é capaz de coordenar a atividade descendente das vias noradrenérgicas e serotoninérgicas que suprimem a transmissão nociceptiva no corno dorsal da medula espinhal, sugerindo que alterações na PAG podem desencadear a dor neuropática (LI et al., 2014).

Como mencionado anteriormente, a PAG⁸² é um componente substancial na modulação da dor descendente e exerce controle inibitório ou excitatório sobre a transmissão da dor através da região ventromedial rostral da medula espinhal, local da sinapse do neurônio sensitivo de primeira ordem. Essas descobertas são particularmente interessantes, devido o papel central da PAG na integração das respostas somatomotoras, autonômicas e comportamentais frente a dor (GUO et al., 2014). Seria interessante notar, a partir de nossos resultados, que, apesar da necessidade de outras evidências, estas respostas poderiam estar associadas com o efeito do consumo crônico do etanol (GRÁFICO 5D e FIGURA 10C).

A caracterização dos mecanismos envolvidos na indução da c – Fos por lesão do nervo periférico pode fornecer uma pista para elucidar as alterações funcionais que ocorrem nos neurônios de nervos lesionados a longo prazo. O estudo de Narita et al. (2003) demonstrou que

⁸¹ Substância cinzenta periaquedutal

⁸² Substância cinzenta periaquedutal

os níveis de c – Fos na PAG aumentaram significativamente após a ligação do nervo ciático de ratos. Este resultado fornece evidência direta de que a lesão no nervo ciático pode conduzir a uma mudança acentuada no nível de expressão da c – Fos no cérebro de ratos, podendo levar à dor neuropática associada à plasticidade sináptica.

Após estabelecida a dor neuropática devido a constrição crônica do nervo ciático e subsequente aplicação de estímulo nocivo, um aumento na expressão de c – Fos na PAG também foi observada no estudo de Takeda et al. (2009).

Como mencionado anteriormente, nos resultados, os ratos com neuropatia alcoólica submetidos ao teste Randall Selitto, também apresentaram aumento na expressão de neurônios imunorreativos para c – Fos na PAG (GRÁFICO 5D e FIGURA 10C), sugerindo assim, que a PAG também possa ser uma área cerebral envolvida no processamento nociceptivo ao estímulo doloroso da neuropatia induzida pelo consumo crônico de etanol. Além disso, o grupo NAC + Etanol garantiu a diminuição no número de neurônios imunorreativos para c – Fos em todas as áreas cerebrais analisadas (PVN⁸³, porção magnocelular lateral e porções parvocelulares, NDR e PAG) que, quando comparadas ao grupo Etanol, haviam apresentado aumento da expressão dessa proteína, ratificando a possível função neuroprotetora da NAC na ingestão crônica de etanol, contra a neuropatia alcoólica (GRÁFICOS 5A, 5B, 5C e 5D e, FIGURAS 10A, 10B e 10C).

Uma explicação para tal diminuição na expressão dos números de neurônios imunorreativos para c – Fos nas áreas analisadas pode ter sido a capacidade antioxidante da NAC⁸⁴ e ao fato dela servir de substrato para a formação da GSH⁸⁵, que também é conhecida como um poderoso antioxidante endógeno. Assim, o tratamento com a NAC possivelmente foi capaz de reduzir a produção de ROS⁸⁶, manter os marcadores bioquímicos relacionados ao estresse oxidativo dentro dos padrões da normalidade e reduzir o próprio estresse oxidativo, sendo este último, um vilão em potencial para o desenvolvimento da neuropatia alcoólica, já que o etanol pode aumentar seus níveis, levando ao dano neuronal e à consequente dor neuropática (CHOPRA; TIWARI, 2011). Desta forma, como a NAC preveniu o aparecimento da neuropatia alcoólica, informação que pode ser comprovada pela ausência de hiperalgesia térmica, mecânica e alodinia (depois de 10 semanas de tratamento do grupo NAC + Etanol), possivelmente não ocorreu a sensibilização das fibras neurais periféricas e o estímulo nocivo,

⁸³ Núcleo paraventricular hipotalâmico

⁸⁴ N - acetilcisteína

⁸⁵ Glutathione

⁸⁶ Espécies reativas do oxigênio

antes acentuado nas neuropatias, não desencadeou aumento exagerado da despolarização de neurônios presentes no corno dorsal da medula espinhal, que por sua vez não teve a capacidade de ativar uma quantidade exacerbada de neurônios nos sítios nociceptivos analisados no cérebro.

7 CONCLUSÃO

Pode-se concluir com este estudo, que o tratamento da neuropatia alcoólica experimental utilizando a NAC foi eficaz em prevenir o desenvolvimento da dor neuropática, já que os animais tratados concomitantemente com NAC e Etanol não apresentaram, em nenhum momento do tratamento, os sinais característicos que definem a neuropatia alcoólica, a citar, as hiperalgesias térmica e mecânica e a alodinia. Assim, pela primeira vez na literatura, fica evidenciado que a NAC possui efeito neuroprotetor na neuropatia alcoólica.

REFERÊNCIAS

ABREU, M. M. A.; LIMA, J. B. L.; ALVES, T. A. O impacto do álcool na mortalidade em acidentes de trânsito: uma questão de saúde pública. **Esc Anna Nery R Enferm.**, v. 10, n. 1, p. 87–94, 2006.

ALBERT EINSTEIN. EINSTEIN. **Frases de Albert Einstein**. 1929. Disponível em: <http://pensador.uol.com.br/frases_de_albert_einstein/>. Acesso em: 10 dez. 2014.

ALBINI A. et al. Inhibition of angiogenesis driven Kaposi's, sarcoma tumor growth in nude mice by oral N-acetylcysteine. **Cancer Res.**, v. 61, p. 8171-8178, 2001.

AMMENDOLA, A. et al. Peripheral neuropathy in chronic alcoholism: a retrospective cross-sectional study in 76 subjects. **Alcohol Alcohol.**, v. 36, p. 271–75, 2001.

AOYAMA, K. et al. Neuronal glutathione deficiency and age-dependent neurodegeneration in the EAAC1 deficient mouse. **Nat Neurosci.**, v. 9, p. 119–126, 2006.

ARMSTRONG, W. E. **Hypothalamic supraoptic and paraventricular nuclei: the rat nervous system**. New York: Academic Press, 1995.

ARUOMA, O. I. et al. The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. **Free Radic Biol Med.**, v. 6, p. 593–7, 1989.

AYDIN, S. et al. N –acetylcysteine reduced the effect of ethanol on antioxidant system in rat plasma and brain tissue. **Tohoku J Exp Med.**, v.198, p. 71–77, 2002.

BEHBEHANI, M. M. Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. **Prog Neurobiol.**, v. 46, n. 6, p. 575–605, 1995.

BORGSTROM, L.; KAGEDAI, B.; PAULSEN, O. Pharmacokinetics of N – acetilcisteína in man. **Eur J Clin Pharmacol.**, v. 31, p. 217, 1986.

BOSCH, E. P. et al. Animal models of alcoholic neuropathy: morphologic, electrophysiologic and biochemical findings. **Muscle Nerve.**, v. 2, p. 133–144, 1979.

BOSCH – MORELL F. et al. Chronic ethanol feeding induces cellular antioxidants decrease and oxidative stress in rat peripheral nerves: effect of s – adenosyl – l – methionine and n – acetyl – l – cysteine. **Free Radic Biol Med.**, v. 25, p. 365-368, 1998.

CENTRO DE INFORMAÇÕES SOBRE SAÚDE E ÁLCOOL. CISA. **O que é alcoolismo?** 2014. Disponível em: <<http://www.cisa.org.br/>>. Acesso em: 10 dez. 2014.

CHOPRA, K.; TIWARI, V. Alcoholic neuropathy: possible mechanisms and future treatment possibilities. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 73, n. 3, p. 348–362, 2011.

CODERRE, T. J. Contribution of protein kinase C to central sensitization and persistent pain following tissue injury. **Neurosci Lett.**, v. 140, p. 181–184, 1992.

COPPEY, L. J. et al. Slowing of motor nerve conduction velocity in streptozotocin – induced diabetic rats is precede by impaired vasodilation in arterioles that overlie the sciatic nerve. **Int J Exp Diabete Res.**, v. 1, n. 2, p. 131–43, 2000.

CRESTANI, C. C. et al. Cardiovascular alterations at different stages of hypertension development during ethanol consumption: Time-course of vascular and autonomic changes. **Toxicol Appl Pharmacol.**, v. 280, n. 2, p. 245–55, 2014.

CREWS, F. T.; NIXON, K. Mechanisms of neurodegeneration and regeneration in alcoholism. **Alcohol Alcohol.**, v. 44, p. 115–127, 2009.

DA SILVA, A. Caracterização dos efeitos humorais e cardiovasculares decorrentes do consumo de etanol em ratos. **Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto: USP, Tese de Doutorado**, 2012.

DA SILVA, A. L. et al. Time-course of neuroendocrine changes and its correlation with hypertension induced by ethanol consumption. **Alcohol Alcohol.**, v. 48, n. 4, p. 495–504, 2013.

DE VRIES, N.; DE FLORA, S. N-acetyl-l-cysteine. **J Cell Biochem Suppl.**, v. 17F, p. 270–277, 1993.

DESCARRIES, L. et al. The serotonin neurons in nucleus raphe dorsalis of adult rat: a light and electron microscope radioautographic study. **J Comp Neurol.**, v. 207, n. 3, p. 239–54, 1982.

DINA, O. A. Et al. Key role for the epsilon isoform of protein kinase C in painful alcoholic neuropathy in the rat. **Journal of Neuroscience**, v. 20, p. 8614–8619, 2000.

DINA, O. A. et al. Severity of alcohol-induced painful peripheral neuropathy in female rats: role of estrogen and protein kinase (A and C epsilon). **Neuroscience**, v. 145, p.350–6, 2007.

DRINGEN, R.; HAMPRECHT, B. N-acetylcysteine, but not methionine or 2-oxothiazolidine-4-carboxylate, serves as cysteine donor for the synthesis of glutathione in cultured neurons derived from embryonal rat brain. **Neurosci Lett.**, v. 259, p. 79–82, 1999.

ESKIOCAK S. et al. The effect of N-acetylcysteine on brain tissue of rats fed with high cholesterol diet. **Turk. J Biochem.**, v. 33, p. 58-63, 2008.

FARR, S. A. et al. The antioxidants alphalipoic acid and N-acetylcysteine reverse memory impairment and brain oxidative stress in aged SAMP8 mice. **J Neurochem.**, v. 84, p. 1173–1183, 2003.

FERNÁNDEZ – SOLÀ, J. et al. Evidence of apoptosis in chronic alcoholic skeletal myopatyy. **Hum Pathol.**, v. 34, p. 1247–1252, 2003.

FERRARI, G.; YAN, C. Y.; GREENE, L. A. N-acetylcysteine (D- and L-stereoisomers) prevents apoptotic death of neuronal cells. **J Neurosci.**, v. 15, p. 2857–2866, 1995.

FILHO G. P. et al. Role of N-acetylcysteine on fibrosis and oxidative stress in cirrhotic rats. **Arq Gastroenteral.**, v. 45, p. 156-162, 2008.

FISHER, K., CODERRE, T. J. The contribution of metabotropic glutamate (mGlu) receptors to formalin-induced nociception. **Pain**, v. 68, p. 255–263, 1996.

FREITAS, R. L. et al. Intrinsic neural circuits between dorsal midbrain neurons that control fear – induced responses and seizure activity and nucleio f the pain inhibitory system elaborating postictal antinociceptive processes: a functional neuroanatomical and neuropharmacological study. **Exp Neurol.**, v. 191, n. 2, p. 225–42, 2005.

GIANOULAKIS, C.; DAI, X.; BROWN, T. Effect of chronic alcohol consumption on the activity of the hypothalamic – pituitary – adrenal axis and pituitary b-endorphin as a function of alcohol intake, age and gender. **Alcoholism, Clinical and Experimental Research**, v. 27, p. 410–423, 2003.

GONZÁLEZ – REIMERS, E. et al. Alcoholism: A systemic proinflammatory condition. **World J Gastroenterol.**, v. 20, n. 40, p. 14660–14671, 2014.

GRASSI C.; MORANDINI G. C. A controlled trial of intermittent oral acetylcysteine in the long term treatment of chronic bronchitis. **J Clin Pharmacol Eur.**, v. 9, p. 393–396, 1976.

GUO, J. et al. Contributions of purinergic P2X3 receptors within the mid brain periaqueductal gray to diabetes – induced neuropathic pain. **J Physiol Sci.**, v. 65, n. 1, p. 99–104, 2015.

GUO, R.; KANDADI, M. R.; REN, J. Facilitated ethanolmetabolism promotes cardiomyocyte contractile dysfunction through autophagy in murine hearts. **Autophagy.**, v. 8, p. 593–608, 2012.

HANDI, M. Toxic neuropathy. Review. **Curr Opin Neurol.**, v. 24, p. 484-490, 2011.

HARADA, D. et al. Determination of reduced, protein-unbound, and total concentrations of n-acetyl-L-cysteine and l-cysteine in rat plasma by postcolumn ligand substitution highperformance liquid chromatography. **Analytical Biochemistry.**, v. 290, p. 251–259, 2001.

HARPER, C. The neuropathology of alcohol-related brain damage. **Alcohol Alcohol.**, v. 44, n. 2, p. 136–40, 2009.

HARPER, C. The neurotoxicity of alcohol. **Hum Exp Toxicol.**, v. 26, p. 251–257, 2007.

HEYMAN S. N. et al. N-acetylcysteine ameliorates renal microcirculation: studies in rats. **Kidney Int.**, v. 63, p. 634-641, 2003.

HILLBOM M.; WENNERBERG A. Prognosis of alcoholic peripheral neuropathy. **J Neurol Neurosurg Psychiatry.**, v. 47, p. 699-703, 1984.

KAMBOJ S. S.; VASISHTA, R. K.; SANDHIR, R. N – acetylcysteine inhibits hyperglycemia – induced oxidative stress and apoptosis markers in diabetic neuropathy. **Journal of Neurochemistry.**, v. 112, p. 77–91, 2010.

KAMPER – JORGENSEN, M. et al. Alcohol and cirrhosis: dose – response or threshold effect? **J Hepatol.**, v. 41, p. 25–30, 2004.

KANDHARE, A. D. et al. Therapeutic role of curcumin in prevention of biochemical and behavioral aberration induced by alcoholic neuropathy in laboratory animals. **Neuroscience Letters.**, v. 511, p. 18–22, 2012.

KARIM, F.; WANG, C. C.; GEREAU, R. W. Metabotropic glutamate receptor subtypes 1 and 5 are activators of extracellular signal-regulated kinase signaling required for inflammatory pain in mice. **J Neurosci.**, v. 21, p. 3771–3779, 2001.

KIM, H. K. et al. Reactive oxygen species (ROS) play an important role in a rat model of neuropathic pain. **Pain.**, v. 111, p. 116–124, 2004.

KISS, J. Z.; MEZEY, E.; SKIRBOLL, L. Corticotrophin-releasing factor immunoreactive neurons of the paraventricular nucleus become vasopressin-positive after adrenalectomy. **Proc Natl Acad Sci.**, v. 81, n. 6, p. 1854–1858, 1984.

KLATSKY, A. L.; FRIEDMAN, G.D.; ARMSTRONG, M.A. The relationships between alcoholic beverage use and other traits to blood pressure: a new Kaiser Permanente study. **Circulation**, v. 73, p. 628–636, 1986.

KOIKE, H. et al. Alcoholic neuropathy is clinicopathologically distinct from thiamine-deficiency neuropathy. **Ann Neurol.**, v. 54, p. 19–29, 2003.

KOIKE, H. et al. Painful alcoholic polyneuropathy with predominant small-fiber loss and normal thiamine status. **Neurology.**, v. 56, p. 1727–32, 2001b.

KOIKE, H. et al. Postgastrectomy polyneuropathy with thiamine deficiency is identical to beriberi neuropathy. **Nutrition.**, v. 20, p. 961–6, 2004.

KOIKE, H.; SOUBE, G. Alcoholic neuropathy. **Curr Opin Neurol.**, v. 19, p. 481–6, 2006.

KOIKE, H. et al. Postgastrectomy polyneuropathy with thiamine deficiency. **J Neurol Neurosurg Psychiatry.**, v. 71, p. 357–62, 2001a.

LARSEN, P. J.; MOLLER, M.; MIKKELSEN, J. D. Efferent projections from the periventricular and medial parvocellular subnuclei of the hypothalamic paraventricular nucleus to circumventricular organs of the rat: a Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin (PHA-L) tracing study. **J Comp Neurol.**, v. 306, n. 3, p. 462–479, 1991.

- LAUTERBURG, B. H.; CORCORAN G. B.; MITCHELL J. R. Mechanism of action of N-acetylcysteine in the protection against the hepatotoxicity of acetaminophen in rats in vivo. **J Clin Invest.**, v. 71, p. 980–991, 1983.
- LI, S. F. et al. Antihyperalgesic effect of 5 – HT7 receptor activation on the midbrain periaqueductal gray in a rat model of neuropathic pain. **Pharmacol Biochem Behav.**, v. 127C, p. 49–55, 2014.
- LIN, Y. K. et al. Oxidative stress on pulmonar vein and left atrium arrythmogenesis. **Circ J.**, v. 74, p. 1547–1556, 2010.
- MANDAYAM, S.; JAMAL, M. M.; MORGAN, T. R. Epidemiology of alcoholic liver disease. **Semin Liver Dis.**, v. 24, p. 217–232, 2004.
- MANN R. E.; SMART, R. G.; GOVONI, R. The epidemiology of alcoholic liver disease. **Alcohol Res Health.**, v. 27, p. 209–219, 2003.
- MAYER, M.; NOBLE, M. N – Acetyl – L – cysteineis a pluripotent protector against cell death and enhancer of trophic fator – mediated cell survival in vitro. **Proc Natk Acad Sci.**, v. 91, p. 7496–7500, 1994.
- MCDONOUGH, K. H. Antioxidant nutrients and alcohol. **Toxicology**, v. 189, p. 89–97, 2003.
- MCKINLEY, M. J.; JOHNSON, A. K. The physiological regulation of thirst and fluid intake. **News Physiol Sci.**, v. 19, p. 1–6, 2004.
- MELLION, M.; GILCHRIST, J.; DE LA MONTE, S. Alcohol-related peripheral neuropathy: nutritional, toxic or both? Review. **Muscle Nerve**, v. 43, p. 309–316, 2010.
- MELLION, M. L. et al. Experimental model of alcohol – related peripheral neuropathy. **Muscle Nerve**, v. 48, p. 204–211, 2013.
- MELLO, T. et al. Alcohol induced hepatic fibrosis: role of acetaldehyde. **Mol Aspects Med.**, v. 29, p. 17–21, 2008.
- MEZEY, E. Alcoholic liver disease: roles of alcohol and malnutrition. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 33, p. 2709–2718, 1980.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. PORTAL BRASIL. **Alcoolismo - Instituições de Prevenção, Tratamento e Redução de Danos Ajudam a Afastar o Vício**. 2012. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/sobre/saude/dependencia-quimica/alcoolismo>>. Acesso em: 10 dez. 2014.

MIYOSHI, K. et al. mGlu5 receptor and protein kinase C implicated in the development and induction of neuropathic pain following chronic ethanol consumption. **Eur J Pharmacol.**, v. 562, p. 208–11, 2007.

MODI M. et al. Co-administration of zinc and N-acetylcysteine prevents arsenic induced tissue oxidative stress in male rats. **J Trace Elem Med Biol.**, v. 20, p. 197-204, 2006.

MONJE, M. L.; TODA, H.; PALMER, T. D. Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis. **Science**, v. 302, p. 1760–1765, 2003.

MONTOLIU, C. et al. Ethanol induced oxygen radical formation and lipid peroxidation in rat brain: effect of chronic alcohol consumption. **J Neurochem.**, v. 6, 1855–62, 1994.

MOOSMANN, B.; BEHL, C. Antioxidants as treatment for neurodegenerative disorders. **Expert Opin Investig Drugs.**, v. 11, p. 1407–1435, 2002.

NAIK, A. K. et al. Role of oxidative stress in pathophysiology of peripheral neuropathy and modulation by N – acetyl – L – cysteine in rats. **European Journal of Pain**, v.10, p. 573–579, 2006.

NARITA, M. et al. Change in the expression of c – Fos in the rat brain following sciatic nerve ligation. **Neurosci Lett.**, v. 352, n. 3, p. 231–3, 2003.

NARITA, M. et al. Involvement of microglia in the ethanol-induced neuropathic pain-like state in the rat. **Neurosci Lett.**, v. 414, p. 21–5, 2007.

NEUMAN, R. B. et al. Oxidative stress markers are associated with persistente atrial fibrillation. **Clin Chem.**, v. 53, p. 1652–1657, 2007.

NGUYEN, V. A. et al. Impaired insulin/IGF signaling in experimental alcohol-related myopathy. **Nutrients.**, v. 4, p. 1058–1075, 2012.

NIXON, K.; CREWS, F. T. Binge ethanol exposure decreases neurogenesis in adult rat hippocampus. **J Neurochem.**, v. 83, p. 1087–1093, 2002.

NORDIN, N. et al. Anti – ulcerogenic effect of methanolic extracts from *Enicosanthellum pulchrum* (King) Heusden against Ethanol – induced acute gastric lesion in animal models. **Plos One**, v. 9, n. 11, p. e111925.

NORDSTRÖM, P. et al. Risk factors in late adolescence for young-onset dementia in men: a nationwide cohort study. **JAMA Intern Med.**, v. 173, p. 1612–1618, 2013.

NOVAK, D. J.; VICTOR, M. The vagus and sympathetic nerves in alcoholic polyneuropathy. **Arch Neurol.**, v. 30, p. 273–84, 1974.

OCAL K. et al. N-acetylcysteine on oxidative stress in intestine and bacterial translocation after thermal injury. **Burns.**, v. 30, p. 778-784, 2004.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. OMS. **Global Status Report on Alcohol and Health**. 2011. Disponível em: <http://www.who.int/substance_abuse/publications/global_alcohol_report/en>. Acesso em: 10 dez. 2014.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. OMS. **Involvement of Nurses and Midwives in Screening and Brief Interventions for Hazardous and Harmful Use of Alcohol and Other Psychoactive Substances. A Literature Review**. 2010. Disponível em: <<http://www.who.int/hrh/resources/substances/en>>. Acesso em: 10 dez. 2014.

PAROLA, M.; ROBINO, G. Oxidative stress – related molecules and liver fibrosis. **J Hepatol.**, v. 35, p. 297–306, 2001.

PASCALE, R. et al. Inhibition by ethanol of rat liver plasma membrane Na⁺/K⁺ ATPase: protective effect of s-adenosyl-L-methionine, L-methionine, and N-acetylcysteine. **Toxicol Appl Pharmacol.**, v. 97, p. 216–229, 1989.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. 7. ed. New York: Academic Press, 2013.

PETERS, T. J. et al. Treatment of alcoholic polyneuropathy with vitamin B complex: a randomised controlled trial. **Alcohol Alcohol.**, v. 41, p. 636–642, 2006.

POP – BUSUI, R. et al. Dissection of metabolic, vascular, and nerve conduction interrelationships in experimental diabetic neuropathy by cyclooxygenase inhibition and acetyl – L – carnitine administration. **Diabetes**, v. 51, n. 8, p. 2619–28, 2002.

PRADO P. T. C.; DEL BEL E. A. c – Fos, um gene de ativação imediata como marcador neural de nocicepção. **Medicina, Ribeirão Preto**, v. 31, p. 424–433, 1998.

PREEDY, V. R. et al. Alcoholic skeletal muscle myopathy: definitions features, contribution of neuropathy, impact and diagnosis. **Eur J Neurol.**, v. 8, p. 677–687, 2001.

RATAN, R. R.; MURPHY, T. H.; BARABAN, J. M. Macromolecular synthesis inhibitors prevent oxidative stress – induced apoptosis in embryonic cortical neurons by shunting cysteine from protein synthesis to glutathione. **J Neurosci.**, v. 14, p. 4385–4392, 1994.

RAYGUDE, K. S. et al. Evaluation of ameliorative effect of quercetin in experimental alcoholic neuropathy in rats. **Inflammopharmacology**, v. 20, n. 6, p. 331-41, 2012.

RESSTEL, L. B. et al. Increased circulating vasopressin may account for ethanol-induced hypertension in rats. **Am J Hypertens.**, v. 21, n. 8, p. 930–5, 2008.

RINTALA, J. et al. Evidence of acetaldehyde-protein adduct formation in rat brain after lifelong of alcohol-related brain damage. **Nat Rev Neurol.**, v. 7, p. 284–294, 2011.

ROCCO, A. et al. Alcoholic disease: liver and beyond. **World J Gastroenterol.**, v. 20, n. 40, p. 14652–14659, 2014.

RODELLA, L. et al. Expression of Fos immunoreactivity in the rat supraspinal regions following noxious visceral stimulation. **Brain Res Bull.**, v. 47, n. 4, p. 357–66, 1998.

RONIS M. J. J. et al. Effects of N-acetylcysteine on ethanolinduced hepatotoxicity in rats fed via total enteral nutrition. **Free Radic Biol Med.**, v. 39, p. 619-30, 2005.

ROTHSTEIN, J. D. et al. Chronic inhibition of superoxide dismutase produces apoptotic death of spinal neurons. **Proc Natl Acad Sci.**, v. 91, p. 4155–4159, 1994.

RUSHWORTH, G. F.; MEGSON, I. L. Existing and potencial therapeutic uses for N – acetylcysteine: The need for conversion to intracellular glutathione for antioxidant benefits. **Pharmacol Ther.**, v. 141, n. 2, p. 150–159, 2014.

RYLE, P. R.; THOMSON, A. D. Nutrition and vitamins in alcoholism. **Contemporary Issues in Clinical Biochemistry**, v. 1, p. 188–224, 1984.

SAGARA, M. et al. Inhibition with N-acetylcysteine of enhanced production of tumor necrosis factor in streptozotocin-induced diabetic rats. **Clin Immunol Immunopathol.**, v. 71, p. 333–337, 1994.

SETH, D. et al. Pathogenesis of alcohol – induced liver disease: classical concepts and recent advances. **J Gastroenterol Hepatol.**, v. 26, p. 1089–1105, 2011.

SHARMA, S. S.; SAYYED, S. G. Effects of Trolox on nerve dysfunction, thermal hyperalgesia and oxidative stress in experimental diabetic neuropathy. **Clin Exp Pharmacol Physiol.**, v. 33, p. 1022–102, 2006.

SIDORENKOV, O. et al. Premature cardiovascular mortality and alcohol consumption before death in Arkhangelsk, Russia: an analysis of a consecutive series of forensic autopsies. **Int J Epidemiol.**, v. 40, p. 1519–1529, 2001.

SINGAL, A. K.; ANAND, B. S. Recent trends in the epidemiology of alcoholic liver disease. **Clin Liver Dis.**, v. 2, p. 53–56, 2013.

SINGLETON, C. K.; MARTIN, P. R. Molecular mechanisms of thiamine utilization. **Curr Mol Med.**, v. 1, p. 197–207, 2001.

SONG, M. et al. Evidence that glutathione depletion is a mechanism responsible for the anti-inflammatory effects of ethyl pyruvate in cultured lipopolysaccharide - stimulated RAW264.7 cells. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 308, p. 307–316, 2004.

SUAREZ, W. T. Desenvolvimento de processos analíticos para a determinação de n-acetilcisteína em produtos farmacêuticos. **Universidade Federal de São Carlos, São Carlos – Dissertação de Mestrado.** 2005.

SUN, L. et al. N – acetylcysteine protects against apoptosis through modulation of group I metabotropic glutamate receptor activity. **Plos ONE**, v. 7, n. 3, p. e32503.

TAIWO, Y. O.; CODERRE, T. J.; LEVINE, J. D. The contribution of training to sensitivity in the nociceptive paw-withdrawal test. **Brain Res.**, v. 487, p. 148–51, 1989.

TAKEDA, R. et al. Analgesic effect of milnacipran is associated with c – Fos expression in the anteriorcingulate cortex in the rat neuropathic pain model. **Neurosci Res.**, v. 64, n. 4, p. 380–4, 2009.

TAL, M. A novel antioxidant alleviates heat hyperalgesia in rats with an experimental painful peripheral neuropathy. **Neuroreport.**, v. 7, p. 1382–1384, 1996.

TAN E. et al. Alcoholic vagal neuropathy: recovery following prolonged abstinence. **J Neurol Neurosurg Psychiatry.**, v. 47, p. 1335-7, 1984.

THIEMERMANN, C. Membrane – permeable radical scavengers (tempol) for shock, ischemia – reperfusion injury, and inflammation. **Crit Care Med.**, v. 31, p. S76–S84, 2003.

TIWARI, V.; KUHAD, A.; CHOPRA, K. Amelioration of functional, biochemical and molecular deficits by epigallocatechin gallate in experimental model of alcoholic neuropathy. **European Journal of Pain**, v. 15, p. 286–292, 2010.

TIWARI, V.; KUHAD, A.; CHOPRA, K. Neuroprotective effect of vitamin E isoforms against chronic alcohol – induced peripheral neurotoxicity: Possible involvement of oxidative – nitroductive stress. **Phytother Res.**, v. 26, p. 1738–1745, 2012.

TIWARI, V.; KUHAD, A.; CHOPRA, K. Tocotrienol ameliorates behavioral and biochemical alterations in the rat model of alcoholic neuropathy. **Pain**, v. 145, p. 129–135, 2009.

TORREJAIS, M. M. et al. Histochemical and SEM evaluation of the neuromuscular junctions from alcoholic rats. **Tissue Cell**, v. 34, n. 2, p. 117 – 23, 2002.

UPADHYA, S. C.; RAVINDRANATH, V. Detection and localization of proteinacetaldehyde adducts in rat brain after chronic ethanol treatment. **Alcohol Clin Exp Res.**, v. 26, p. 856–863, 2002.

URBANO – MARQUEZ, A. et al. The effects of alcoholism on skeletal and cardiac muscle. **N Engl J Med.**, v. 320, p. 409–415, 1989.

VERHASSELT, V. et al. N-acetyl-L-cysteine inhibits primary human T cell responses at the dendritic cell level: association with NF-kappaB inhibition. **J Immunol.**, v. 162, p. 2569–2574, 1999.

WALSH, R. N.; CUMMINS, R. A. The open-field test: a critical review. **Psychol Bull.**, v. 83, n. 3, p. 482–504, 1976.

WANG, Q. P.; GUAN, J. L.; NAKAI, Y. Immunoelectron microscopy of enkephalinergic innervation of GABAergic neurons in the periaqueductal gray. **Brain Res.**, v. 665, n. 1, p. 39-46, 1994.

WINDEBANK A. J. **Polyneuropathy due to nutritional deficiency and alcoholism: peripheral neuropathy.** 3. ed. Philadelphia: Saunders, 1993.

YAN, C. Y.; FERRARI, G.; GREENE, L. A. N-acetylcysteine-promoted survival of PC12 cells is glutathione-independent but transcription-dependent. **J Biol Chem.**, v. 270, p. 26827–26832, 1995.

YERDELEN D.; KOC F.; UYSAL H. Strength – duration properties of sensory and motor axons in alcoholic polyneuropathy. **Neurol Res.**, v. 30, p. 746-50, 2008.

YOUNG, M. R. et al. Behavioural and electrophysiological evidence supporting a role for group I metabotropic glutamate receptors in the mediation of nociceptive inputs to the rat spinal cord. **Brain Res.**, v. 777, n. 1–2, p. 161–169, 1997.

ZAHR, N. M.; KAUFMAN, K. L.; HARPER, C. G. Clinical and pathological features of alcohol – related brain damage. **Nat Ver Neurol.**, v. 7, n. 5, p. 284–94, 2011.

ZOU, J.; CREWS, F. Induction of innate immune gene expression cascades in brain slice cultures by ethanol: key role of NF- κ B and proinflammatory cytokines. **Alcohol Clin Exp Res.**, v. 34, n.5, p. 777–789, 2010.