

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISILOGIA

**EFEITO DA N-ACETILCISTEÍNA SOBRE PROTEÍNAS DE SINALIZAÇÃO E  
PARÂMETROS OXIDATIVOS EM MEDULA ESPINAL DE RATOS COM  
DOR NEUROPÁTICA**

TESE DE DOUTORADO

ANDRÉA HORST

PORTO ALEGRE, 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISILOGIA

**EFEITO DA N-ACETILCISTEÍNA SOBRE PROTEÍNAS DE SINALIZAÇÃO E  
PARÂMETROS OXIDATIVOS EM MEDULA ESPINAL DE RATOS COM  
DOR NEUROPÁTICA**

Andréa Horst

Orientadora: Prof. Dra. Wania Aparecida Partata

Tese apresentada ao programa de  
Pós-graduação em Ciências  
Biológicas: Fisiologia, da  
Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, como requisito  
parcial para a obtenção do título de  
doutor em Fisiologia

PORTO ALEGRE, 2017

**Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Fisiologia, do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor.**

**Título: EFEITO DA N-ACETILCISTEÍNA SOBRE PROTEÍNAS DE SINALIZAÇÃO E PARÂMETROS OXIDATIVOS EM MEDULA ESPINAL DE RATOS COM DOR NEUROPÁTICA**

**Autora: Andréa Horst**

**Orientadora:** Dra. Wania Aparecida Partata

**Banca Examinadora:** Dra. MAGALI T. QUEVEDO GRAVE – Universidade do Vale do Taquari: UNIVATES

Dr. JOSÉ CLÁUDIO MOREIRA - UFRGS

Dra. ROSELIS M. DA SILVA - UFRGS (Relator)

**“A maior recompensa do  
nosso trabalho não é o  
que nos pagam por ele,  
mas aquilo que ele nos  
transforma.”**

**John Ruskin**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

À professora Dra Wania Aparecida Partata, pela orientação exemplar, determinação e incentivo nos momentos difíceis e, principalmente, pela compreensão e paciência e amizade durante essa trajetória de mais de 10 anos. Foi essa pessoa incrível, que no início da minha graduação, me apresentou ao mundo da pesquisa e me fez me apaixonar pela neurociência, determinando toda minha trajetória profissional e me tornando a pessoa que sou hoje. Não tenho palavras para agradecer toda sua dedicação e amizade.

À minha família, pelo apoio constante e suporte. Aos meus pais, Cristina e Eduardo, pelo incentivo constante à busca pelo crescimento e realização pessoal. Ao meu marido Fernando, pelo carinho, companherismo de todos os dias e por ter sido compreensivo nos momentos difíceis. E a todos aqueles que cuidaram da minha filha Manuela, (dindos, dindas, avós, amigos) para que eu pudesse me dedicar à realização desse trabalho.

Aos colegas do laboratório de Neurobiologia Comparada, pela amizade, convivência e auxílio durante o desenvolvimento dos experimentos. E em especial à Carol, pelo auxílio nos experimentos, mas acima de tudo pela amizade, incentivo, convivência e por tornar o dia a dia muito mais alegre e engraçado.

À professora Maria Flávia M. Ribeiro e aos integrantes do Laboratório de Interação Neuro Humoral, pela disponibilidade e auxílio que permitiram a realização de alguns experimentos.

Ao prof. Luciano Stürmer de Fraga, que auxiliou no desenvolvimento de alguns experimentos e contribuiu significativamente com o seu conhecimento para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos demais professores do PPG Fisiologia, pelos ensinamentos.

Aos colegas da UNIVATES, que me auxiliaram nas atividades da coordenação para que eu pudesse me dedicar a este trabalho e, principalmente, à prof. Adriane Pozzobon, que auxiliou em alguns experimentos.

À FAPERGS e CNPQ, pelo auxílio financeiro que possibilitou a realização desse estudo.

À UFRGS, por toda a minha formação acadêmica, desde a graduação em Biomedicina, passando pelo mestrado e concluindo agora com o Doutorado.

E a todos aqueles professores e amigos que contribuíram de alguma maneira, pessoal ou profissionalmente, durante essa trajetória.

## APRESENTAÇÃO

Esta tese é o resultado da investigação do efeito da administração de N-acetilcisteína sobre a expressão de proteínas de sinalização celular e atividade de parâmetros oxidativos em medula espinal de ratos com dor neuropática.

A tese está estruturada em oito capítulos, onde inicialmente se apresenta a introdução ao tema, que está organizada em quatro subitens de referencial teórico que abordam os achados relativos ao tema, provenientes da literatura científica atual. Em seguida, é apresentada a hipótese, seguida do objetivo do estudo, que está dividido em dois subitens. No primeiro é mostrado o objetivo geral da tese e no segundo os objetivos específicos. O quarto capítulo contém os Materiais e Métodos onde está descrito detalhadamente todos os procedimentos realizados ao longo do estudo. No capítulo cinco estão apresentados os resultados na forma de três artigos científicos, que mostram os materiais e métodos usados e os resultados obtidos nos estudos.

O primeiro artigo apresenta o efeito da administração da N-acetilcisteína sobre a expressão da forma fosforilada da proteína p38 (p-38) em medula espinal de ratos com constrição crônica no nervo isquiático, um modelo de indução de dor neuropática. Nesse artigo é apresentado ainda o efeito desse tratamento sobre a produção de ânion superóxido em medula espinal e sobre o índice funcional do nervo isquiático, uma medida da recuperação após lesão em nervo periférico. Este artigo foi publicado recentemente na revista *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*.

O segundo artigo apresenta o efeito da administração de N-acetilcisteína sobre a capacidade antioxidante total, o dano a hidroperóxidos lipídicos e a concentração de ácido ascórbico em medula espinal de ratos submetidos à dor neuropática por constrição crônica no nervo isquiático. Este artigo foi recentemente aceito para publicação na revista *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*.

O terceiro artigo, que está em redação, mostra o efeito da administração de N-acetilcisteína sobre o padrão de reatividade a enzima NADPH-diaforase, um marcador de neurônios nitrérgicos, assim como o efeito do tratamento sobre o padrão de distribuição da imunorreatividade a proteína p-38 e RNA mensageiro (mRNA) do fator nuclear kappa B (*NF-κB*) em medula espinal de ratos com dor neuropática por constrição crônica no nervo isquiático.

O capítulo seis compreende a discussão, onde os principais resultados dos três artigos científicos são discutidos em conjunto, amparados por achados da literatura. No sétimo capítulo são apresentadas as conclusões deste trabalho de doutorado juntamente com as perspectivas de futuros estudos sobre o tema da tese. No último capítulo encontram-se as referências bibliográficas dos textos científicos consultados apenas para a redação dos capítulos Introdução e Discussão. As referências bibliográficas dos artigos científicos são apresentadas ao final de cada trabalho.



## RESUMO

**Introdução:** A dor neuropática (dor originada como consequência direta de uma lesão ou doença afetando o sistema somatossensorial, em seus elementos periféricos ou no sistema nervoso central - SNC) possui uma alta incidência na população mundial e afeta a qualidade da vida dos pacientes acometidos por ela. O tratamento dessa condição dolorosa é ainda um desafio aos profissionais da saúde, pois os fármacos usados possuem ação limitada e diversos efeitos colaterais. Assim, há um grande interesse na busca por novos fármacos para tratar dor neuropática. Os estudos mostram o envolvimento das espécies reativas de oxigênio (EROs) nos distintos tipos de dor, incluindo a neuropática. Dado ao envolvimento dessas espécies, moléculas com ação antioxidante são fortes candidatas como coadjuvantes no tratamento de condições dolorosas. Diversos estudos mostraram que a administração de N-acetilcisteína (NAC), uma molécula com ações complexas, dentre elas a de antioxidante, produz antinocicepção em animais com constrição crônica no nervo isquiático (CCI, do inglês *chronic constriction injury*), um modelo de dor neuropática. Contudo, ainda são pouco conhecidos os mecanismos envolvidos no efeito antinociceptivo da NAC. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos temporais da administração intraperitoneal de solução salina e NAC, na dose de 150 mg/kg/dia, dado por 1, 3 ou 7 dias, sobre indicadores de comportamento nociceptivo e de recuperação de função locomotora, e moléculas de sinalização celular e parâmetros de estresse oxidativo em medula espinal lombossacral de ratos sem e com CCI. Esse segmento da medula espinal foi escolhido por ser a região de entrada das informações aferentes do nervo isquiático. O projeto que antecedeu o presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de animais da UFRGS (número de protocolo: 23407). **Metodologia:** Foram utilizados 180 ratos Wistar machos, pesando 200-300g, divididos em 3 grupos experimentais: controle (animais que não sofreram nenhuma intervenção cirúrgica), *sham* (animais que tiveram o nervo isquiático direito apenas exposto) e CCI (animais que tiveram o nervo isquiático direito exposto e recebeu 4 amarraduras em seu terço inicial). Estes grupos experimentais foram subdivididos em subgrupos que receberam administração

intraperitoneal de solução salina ou NAC, na dose de 150 mg/kg/dia, por período de 1, 3 ou 7 dias. Os testes de von Frey eletrônico e do índice funcional do isquiático (IFI) avaliaram a sensibilidade mecânica e a recuperação funcional do nervo, respectivamente, nos períodos antes da lesão e 1, 3 e 7 dias após a lesão nervosa. Ao final dos períodos de 1, 3 e 7 dias, os animais foram mortos por decapitação e a medula espinal lombossacral retirada e usada para as determinações: formação do ânion superóxido, hidroperóxidos lipídicos, capacidade antioxidante total (TAC, do inglês *total antioxidant capacity*), ácido ascórbico, expressão da proteína p-38 fosforilada, e quantificação do RNA mensageiro (mRNA) do NFκB. Outros grupos de animais foram perfundidos com paraformaldeído 4% preparado em tampão fosfato salino, 0,2 M, pH 7,4. Após a coleta e a crioproteção em solução de sacarose 15 e 30%, a medula espinal e os gânglios da raiz dorsal do nervo isquiático ipsilateral à lesão foram submetidos às técnicas de imunohistoquímica à proteína p-38 e histoquímica a NADPH-diaforase, essa última para marcação de células com atividade da óxido nítrico sintase (NOS), a enzima envolvida na síntese de NO. Os resultados de sensibilidade foram analisados por ANOVA de medidas repetidas; os demais resultados por ANOVA de três vias (fatores: lesão, tratamento e tempo), exceto os do NFκB, que foram por ANOVA de duas vias. O pós-teste usado foi o de Tukey. O *P* foi considerado significativo quando > 0,05.

**Resultados:** A sensibilidade mecânica aumentou no dia 1 pós-lesão em todos os grupos CCI, e permaneceu elevada nos demais períodos analisados nos ratos com CCI tratados com solução salina. No grupo de ratos com CCI que recebeu tratamento com NAC, o valor da sensibilidade mecânica foi similar ao encontrado na pré-lesão, tanto aos 3 como aos 7 dias. No grupo *sham* que recebeu salina houve aumento na sensibilidade mecânica no dia 1, estando esse parâmetro com valor similar ao encontrado nos ratos controle nos demais períodos analisados. O aumento na sensibilidade mecânica não foi observado nos ratos *sham* que receberam NAC. O IFI melhorou nos ratos com CCI que receberam salina e NAC por 7 dias. Porém, enquanto o percentual de recuperação desse índice foi 28% nos ratos tratados com salina, a administração de NAC provocou recuperação de 44%. Paralelamente a essas mudanças, houve aumento estatisticamente significativo na geração de ânion superóxido na medula espinal de todos os ratos com CCI, independente do tratamento e do período de tempo analisado. Os hidroperóxidos lipídicos aumentaram (823%) na medula espinal de ratos com CCI tratados com salina no dia 1, mas o acréscimo foi de apenas 142% nos ratos com CCI que receberam NAC. Aos 3 e 7 dias, os hidroperóxidos lipídicos estavam ainda aumentados na medula espinal de ratos *sham* e com CCI, mas o aumento foi de 180%. A TAC teve redução apenas nos animais CCI tratados com salina, no dia 7. Os valores de ácido ascórbico aumentaram significativamente na medula espinal de ratos com CCI que receberam salina, nos dias 1 e 3. Apesar de elevado, o valor de ácido ascórbico na medula espinal desses ratos aos 7 dias não foi estatisticamente significativo quando comparado ao encontrado nos ratos controle. Nos ratos com CCI tratados com NAC não houve diferença significativa nos valores de ácido ascórbico da medula espinal comparados àqueles dos ratos controle. Quanto às moléculas de sinalização intracelular, observou-se aumento na expressão da p-38 fosforilada nos ratos *sham* e com CCI tratados com salina, nos dias 1, 3 e 7, comparados aos controles. O tratamento com NAC provocou o retorno da expressão dessa proteína nos ratos *sham* nesses dias, e uma redução de aproximadamente 187% nos ratos com CCI nos dias 3 e 7, sendo no dia 1 o valor similar ao do grupo controle. NAC também reduziu o aumento na imunorreatividade a p-38 em neurônios do gânglio da raiz dorsal e neurônios e células semelhantes à glia da medula espinal, aumentos esses induzidos pela CCI nos dias 1, 3 e 7. NAC também

reduziu o aumento induzido pela CCI no número de neurônios reativos a NADPH-diaforase nas lâminas superficiais do corno dorsal e substância cinzenta localizada em volta do canal central da medula espinal. O tratamento com NAC ainda reduziu o mRNA do NFκB aumentado pela CCI e cirurgia *sham*. **Conclusão:** Estes resultados mostram que a administração intraperitoneal de NAC, na dose de 150 mg/kg/dia, reproduziu o efeito antinociceptivo dessa molécula e promoveu melhora no IFI. Paralelamente, o tratamento modificou parâmetros de estresse oxidativo e sinalização intracelular na medula espinal, os quais possivelmente se relacionam com as melhoras na sensibilidade mecânica e recuperação funcional do nervo isquiático nos ratos com CCI. A partir desses resultados, pode-se dizer que o efeito antinociceptivo da NAC em ratos com dor neuropática por CCI envolve não apenas sua ação antioxidante, mas também seu efeito em vias de sinalização intracelular.

## ABSTRACT

**Introduction:** Neuropathic pain (pain arising as a direct result of an injury or disease affecting the somatosensory system in their peripheral elements or the central nervous system - CNS) has a high incidence in the world population and affects the quality of life of patients affected by it. The treatment of this painful condition is still a challenge for health professionals, since the drugs used have limited action and cause side effects. Thus, there is great interest in the search for new pharmaceuticals to treat neuropathic pain. Research shows the involvement of reactive oxygen species (ROS) in different types of pain, including neuropathic pain. Given the involvement of these species, molecules with antioxidant action are strong candidates as adjuvants in the treatment of painful conditions. Several studies have shown that N-acetylcysteine (NAC), a molecule with complex actions, including an antioxidant one, produces antinociception in animals with chronic constriction of the sciatic nerve (CCI, chronic constriction injury), a neuropathic pain model. However, the mechanisms involved in the antinociceptive effect of NAC are still poorly understood. Thus, this study aimed to evaluate the temporal effects of intraperitoneal administration of saline and NAC at a dose of 150 mg/kg/day, given for 1, 3 or 7 days, on nociceptive behavior and recovery of locomotor function, and cell signaling molecules and oxidative stress parameters in lumbosacral spinal cord of rats with and without CCI. This segment of the spinal cord was chosen because it is the entry region of the sciatic nerve afferent information. The project that preceded this study was approved by the Ethics Committee of UFRGS on the use of animals (protocol number: 23407). **Methods:** We used 180 male Wistar rats, weighing 200-300g, divided in 3 groups: control (animals which underwent no surgery), sham (animals which had only the right sciatic nerve exposed) and CCI (animals that had the right sciatic nerve exposed and received 4 ligatures in its initial third). These experimental groups were subdivided into subgroups receiving intraperitoneal administration of saline or NAC at a dose of 150 mg/kg/day for a period of 1, 3 or 7 days. Electronic von Frey tests and the sciatic functional index (SFI) evaluated the mechanical sensitivity and functional recovery of the nerve, respectively, in the periods before the injury and 1, 3 and 7 days after the nerve injury. At the end of these periods, the animals were killed by decapitation and the lumbosacral spinal cord was removed and used to determine the formation of superoxide, lipid hydroperoxide,

total antioxidant capacity (TAC), ascorbic acid, expression of phosphorylated p-38 protein, and quantification of messenger RNA (mRNA) of NF $\kappa$ B. Other animal groups were perfused with 4% paraformaldehyde prepared in 0.2 M phosphate buffered saline, pH 7.4. After collection and cryoprotection in 15% and 30% sucrose solution, the spinal cord and dorsal root ganglia of the sciatic nerve ipsilateral to the lesion were subjected to immunohistochemistry of protein p-38 and histochemistry of NADPH-diaphorase, the latter for labeling the activity of nitric oxide (NO) synthase, the enzyme involved in the synthesis of NO. The results of sensitivity were analyzed by ANOVA of repeated measures; the other results by three-way ANOVA (factors: injury, treatment, and time), except those of NF $\kappa$ B, which were analyzed by two-way ANOVA. The post-test used was Tukey's. *P* was considered significant when  $<0.05$ . **Results:** Mechanical sensitivity increased on day 1 post-injury in all CCI groups, and remained elevated in the other period analyzed in saline-treated CCI rats. In the group of NAC-treated CCI rats, the value of mechanical sensitivity was close to the pre-injury one, both at 3 and 7 days. In the sham group receiving saline, there was an increase in mechanical sensitivity on day 1, whose value was close to those of control rats in the other periods analyzed. Increased mechanical sensitivity was not observed in sham rats receiving NAC. The SFI improved in CCI rats receiving saline and NAC for 7 days. However, while the recovery rate of this index was 28% in the saline-treated rats, NAC administration caused a recovery of 44%. Alongside these changes, there was a statistically significant increase in the generation of superoxide anion in the spinal cord of all CCI rats, regardless of treatment and time period analyzed. Lipid hydroperoxides increased (823%) in the spinal cord of saline-treated CCI rats on day 1, but the increment was only 142% in CCI rats receiving NAC. At 3 and 7 days, lipid hydroperoxides were further increased in the spinal cord of sham and CCI rats, but the increment was 180%. TAC was reduced only in saline-treated CCI animals, on day 7. Ascorbic acid values increased significantly in the spinal cord of CCI rats receiving saline on days 1 and 3. Although high, ascorbic acid in the spinal cord of these rats on day 7 was not statistically significant as compared to control rats. In NAC-treated CCI rats, there was no significant difference in ascorbic acid values of the spinal cord as compared to control rats. As regards intracellular signaling molecules, increased expression of phosphorylated p-38 was observed in saline-treated CCI and sham rats on days 1, 3 and 7 compared to controls. NAC treatment caused a return of expression of this protein in sham rats on these days, and a reduction of approximately 187% in CCI rats on days 3 and 7, with the value of day 1 close to that of the control group. NAC also reduced the increase in p-38 immunoreactivity in dorsal root ganglion neurons and neurons and cells similar to spinal cord glia, such increases induced by CCI on days 1, 3 and 7. NAC also reduced the CCI-induced increase in the number of NADPH diaphorase reactive neurons in the superficial lamina of the dorsal horn and gray matter located around the central canal of the spinal cord. NAC treatment also reduced the mRNA of NF $\kappa$ B increased by CCI and sham surgery. **Conclusion:** These results show that intraperitoneal administration of NAC at 150 mg/kg/day reproduced the antinociceptive effect of this molecule and promoted improvement in SFI. In addition, the treatment changed oxidative stress parameters and intracellular signaling in the spinal cord, which are possibly related to improvements in mechanical sensitivity and functional recovery of the sciatic nerve in rats with CCI. From these results, one can say that the antinociceptive effect of NAC in rats with neuropathic pain from CCI involves not only its antioxidant action, but also its effect on intracellular signaling pathways.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Vias nociceptivas da periferia ao SNC.

Figura 2: Esquema da medula espinal lombar ilustrando a formação do nervo isquiático pela união das raízes dorsais e ventrais da medula espinal.

Figura 3: Redução do oxigênio molecular ( $O_2$ ) até a formação de água ( $H_2O$ ) pela ação de enzimas NADPH oxidases (NOx) e da fosforilação oxidativa (FOx).

Figura 4: Sequência de procedimentos para a realização da constrição crônica no nervo isquiático de ratos.

Figura 5: Materiais usados no teste de von Frey em ratos.

Figura 6: Representação esquemática dos parâmetros medidos para calcular o Índice Funcional do Isquiático (IFI).

Figura 7: Esquema mostrando possíveis locais de ação da N-acetilcisteína na medula espinal para seu efeito antinociceptivo em ratos com dor neuropática por CCI.

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1: Organização dos grupos experimentais.

Tabela 2: Características dos oligonucleotídeos dos genes de interesse.

## LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA – análise de variância

CAT – enzima catalase

cGMP – guanilato monofosfato cíclico

CCI – constrição no nervo isquiático (do inglês, *chronic constriction injury*)

CN – grupo constrição nervosa

CNn- grupo constrição nervosa tratado com NAC

CNs – grupo constrição nervosa tratado com salina

CREAL – Centro de reprodução e experimentação de animais de laboratório

CT – grupo controle

CTn – grupo controle tratado com NAC

CTs – grupo controle tratado com salina

DRG – gânglio da raiz dorsal

Fox – fosforilação oxidativa

GPx – glutaciona peroxidase

GSH – glutaciona na sua forma reduzida

GST – enzima glutaciona transferase

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

IASP – *International Association for the Study of Pain*

IFI – índice funcional do isquiático

IP3 – inositol-trifosfato



JNK - c-Jun N-terminal cinase  
KCl – cloreto de potássio  
MAPK – proteína quinase ativada por mitógeno  
NAC – N-acetilcisteína  
NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato  
NF-κB – fator nuclear kappa B  
NMDA – receptor de glutamato do tipo N-metil-D-aspartato  
NS – neurônio de segunda ordem  
NO – óxido nítrico  
NOS – óxido nítrico sintase  
NOX – NADPH oxidase  
O<sub>2</sub> - oxigênio molecular  
O<sub>2</sub><sup>•-</sup> - ânion superóxido  
OH<sup>•</sup> - radical hidroxil  
ONOO<sup>-</sup> - peroxinitrito  
PAG – substância cinzenta periaquedutal  
PB – núcleo parabraquial  
PI3 – fosfatidil-inositol-3-quinase  
PMSF – fenil-metil-sulfonil fluoreto  
RMW – bulbo ventromedial rostral  
ROS – espécies reativas de oxigênio (do inglês, *reactive oxygen species*)  
S – grupo Sham  
SAG – geração de ânion superóxido  
Sn – grupo Sham tratado com NAC  
SNC – sistema nervoso central  
SOD – enzima superóxido dismutase  
Ss – grupo Sham tratado com salina  
TAC – capacidade antioxidante total  
TRPM2 – receptores de canais de melastatina do tipo 2

## SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO.....	VII
RESUMO.....	IX
LISTA DE FIGURAS .....	XIV
LISTA DE TABELAS.....	XV
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XVI
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Dor e nocicepção.....	1
1.2 Espécies reativas de oxigênio e defesas antioxidantes.....	6
1.3 Espécies reativas de oxigênio (ROS) e processamento nociceptivo.....	9
1.4 N-aceticisteina .....	10
2. HIPÓTESE.....	13
3.OBJETIVOS.....	14
3.1 Objetivo geral.....	14
3.2 Objetivos específicos.....	14
4.MATERIAL E MÉTODOS.....	16
4.1 Animais: procedência e manutenção.....	16
4.2 Delineamento experimental.....	16
4.3 Constrição do nervo isquiático.....	19
4.4 Determinação do limiar mecânico.....	20

4.5 Determinação do índice funcional do isquiático.....	21
4.6 Preparação das amostras e tecidos.....	22
4.7 Técnica de Western Blot.....	23
4.8 Real Time-PCR.....	24
4.8.1 Extração de RNA.....	24
4.8.2 Quantificação de RNA.....	25
4.8.3 Síntese de DNA complementar (DNAC).....	25
4.8.4 Reação em cadeia da polimerase.....	25
4.8.5 Curva de normalização.....	26
4.9 Técnica de imunistoquímica.....	28
4.10 Técnica de histoquímica da NADPH-diaforase.....	29
4.11 Técnicas de estresse oxidativo.....	30
4.11.1 Ácido ascórbico.....	30
4.11.2 Hidroperóxidos lipídicos.....	30
4.11.3 Capacidade antioxidante total (TAC).....	31
4.11.4 Formação do ânion superóxido.....	31
4.12 Quantificação de proteínas.....	32
4.13 Análise estatística.....	32
4.14 Disposição final dos resíduos.....	33
5. RESULTADOS.....	34
5.1 Artigo 1: N-acetylcysteine downregulates phosphorylated p-38 expression but does not reverse the increased superoxide anion levels in the spinal cord of rats with neuropathic pain.....	34
5.2 Artigo 2: Effects of N-acetylcysteine on spinal-cord oxidative stress biomarkers in rats with neuropathic pain.....	41
5.3Artigo 3: Effects of N-acetylcysteine on NADPH-diaphorase histochemistry and p38 immunoreactivity and NFκB mRNA levels in spinal cord of rats with neuropathic pain .....	65
6. DISCUSSÃO.....	99
7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	110
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	112

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Dor e Nociceção

A dor é uma sensação desagradável, constituindo um dos componentes essenciais do sistema de defesa do organismo (Fein, 2011). De acordo com a definição dada pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP, *International Association for the Study of Pain*), a dor é uma experiência sensorial desagradável associada a um dano tecidual real ou potencial ou descrita em termos que sugerem tal dano. Assim, a dor envolve não apenas componentes sensoriais, mas também emocionais. Ela não é apenas uma expressão direta de um evento sensorial, mas o produto elaborado de uma variedade de sinais neurais processados pelo encéfalo. A subjetividade da sensação dolorosa está vinculada com o aspecto comportamental. Isso ocorre porque a informação nociceptiva atinge não apenas regiões do sistema somatossensorial (sistema que transmite informações táteis, proprioceptivas, nociceptivas, viscerais e térmicas), mas também o sistema límbico, que compreende as várias áreas corticais e subcorticais envolvidas no processamento das emoções (Baliki and Apkarian, 2015; Basbaum et al., 2009; Vanderah, 2007; Beyes e Bonica, 2001; Millan, 1999).

Atualmente a dor representa um dos principais problemas de saúde, estando associada a várias doenças crônicas e agudas. No Brasil, a dor crônica é uma condição fisiopatológica muito frequente, acometendo entre 28 e 43% da população (Leopoldino et

al., 2016; Queiroz & Silva Junior, 2015; Dias et al., 2009). A dor, em sua forma aguda ou crônica, é a principal razão de procura pelo sistema de saúde e está entre as principais causas de incapacitação e absenteísmo ao trabalho (Pimenta, 1999).

Ao se estudar dor é importante distinguir os termos dor e nocicepção. A dor é a percepção de sensações tão diversas como irritação, inflamação, ardência ou latejar, geralmente sensações provenientes de alguma parte do corpo; e constitui uma sensação de caráter subjetivo, neste sentido sendo relacionada somente aos humanos, os quais possuem capacidade de verbalizá-la (Thompkins et al., 2017; Carey & As-Sanie, 2016; Machelska & Celik, 2016; Baliki & Apkarian, 2015; Ossipov et al., 2014; Basbaum et al., 2009; Vanderah, 2007; Loeser et al., 2001; Millan, 1999). Já a nocicepção se refere aos sinais que chegam ao sistema nervoso central resultante da ativação dos receptores sensoriais especializados periféricos, denominados nociceptores. Os nociceptores fornecem informações sobre a lesão tecidual ocasionada por estímulos nocivos, daí a origem da nomenclatura. A dor geralmente acompanha a nocicepção (Fein, 2011), processo no qual o estímulo nocivo detectado por fibras nervosas receptoras periféricas (nociceptores) é codificado como uma mensagem nociceptiva, a qual é progressivamente transmitida e processada em centros nervosos superiores (Figura 1). De um modo geral, os eventos modulatórios da transmissão nociceptiva ocorrem primariamente na região de entrada da informação nociceptiva no sistema nervoso central (SNC), o corno dorsal da medula espinal e núcleos do tronco encefálico. Posteriormente, a informação nociceptiva é modulada em centros talâmicos e estruturas corticolímbicas (Figura 1).

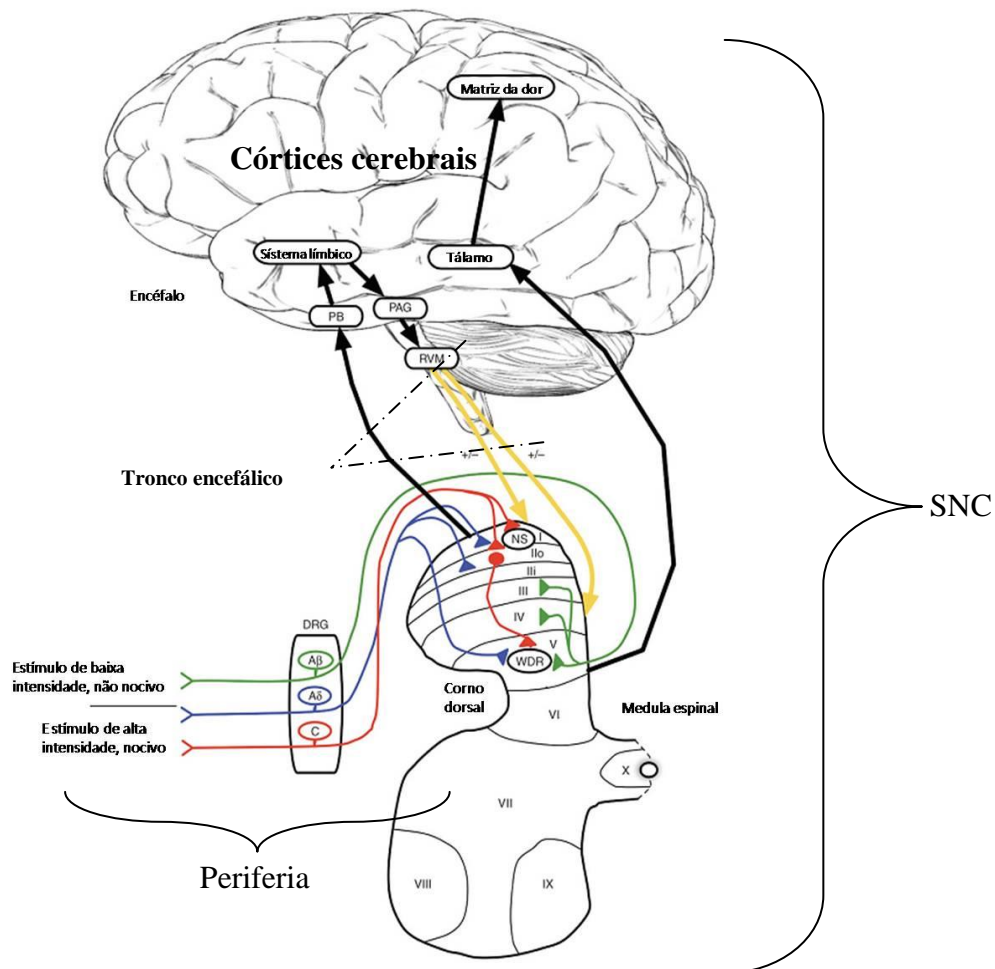
A dor pode ser classificada de várias formas (quanto a sua natureza, duração, intensidade), mas para os propósitos deste texto cabe abordar a diferença entre a dor nociceptiva e a neuropática. A dor nociceptiva tem a finalidade essencial de sinalizar a ocorrência de danos à integridade física, e decorre da ativação fisiológica dos nociceptores. Nesse caso a sensação de dor está diretamente ligada à presença do estímulo nocivo, e cessa assim que este se encerra ou, havendo dano tecidual (não neural) e consequente processo inflamatório, sua duração é limitada ao processo de cura da lesão (Bonica; Loeser, 2001). Entretanto, a dor pode ser desencadeada independente da ativação de terminações nervosas nociceptivas. Nesse contexto se enquadra a dor neuropática, que ocorre em função de lesão ou doença que afeta o sistema somatossensorial (Nickel et al., 2012) em função de traumas mecânicos (secção ou constrição de nervo periférico, lesões no SNC), doenças metabólicas (tais como diabetes) ou nutricionais, alcoolismo, uso de fármacos, exposição a toxinas, neoplasias, lesões vasculares, entre outros (Baron; Binder;

Wasner, 2010). Tanto o sistema nervoso periférico quanto o central podem ser acometidos por tais injúrias, o que caracteriza a dor neuropática em periférica ou central, respectivamente. Como resultado ocorrem diversas alterações (ditas mal adaptativas) ao longo de todo neuroeixo (Cohen; Mao, 2014).

Essas alterações ao longo do neuroeixo podem ocorrer, por exemplo, em decorrência de uma lesão nervosa periférica. Essa lesão acarreta alterações nas expressões de canais iônicos em nociceptores, favorecendo a ocorrência de disparos de potenciais de ação ectópicos, os quais podem contribuir para a sensibilização central (Xu; Yaksh, 2011). Essa condição está relacionada com a transmissão glutamatérgica, a qual parece mediar vias de sinalização envolvendo espécies reativas de oxigênio (Janes et al., 2012). O fenômeno complexo da sensibilização central parece ser ponto chave na fisiopatologia da dor neuropática. Por sua alta complexidade e influência de outras comorbidades, o tratamento da dor neuropática se torna também muito complexo e, muitas vezes, sem sucesso.

Por este motivo há um grande interesse mundial na compreensão dos mecanismos envolvidos na codificação e transmissão da dor neuropática. Outro motivo é sua grande incidência na população. A epidemiologia exata do quadro patológico da dor neuropática é difícil de determinar devido à complexidade no seu diagnóstico (Colloca et al., 2017). Estima-se que entre 7% e 10% da população mundial possui dor neuropática (Colloca et al, 2017; van Hecke et al, 2014; von Hehn et al, 2012; Nickel et al., 2012), que se manifesta na forma de variados sintomas, como dor espontânea, hiperalgesia (dor aumentada frente a um estímulo nocivo) e alodinia (dor frente a um estímulo inócuo) (von Hehn et al, 2012), os quais caracterizam o quadro chamado sensibilização (aumento na responsividade de neurônios à estimulação normal ou recrutamento de uma resposta a estímulos normalmente sublimiáveis).

A dor neuropática reduz significativamente a qualidade de vida dos pacientes acometidos e geralmente está associada à ansiedade, depressão, distúrbios de sono, entre outros (Colloca et al., 2017 Gilron et al., 2006; Rice et al., 2006). McDermott e seus colaboradores (2006) relataram que indivíduos com dor neuropática faltam em média 5,5 dias do trabalho por mês. Esse quadro faz com que a condição de dor neuropática represente altos custos aos sistemas de saúde e, conseqüentemente, aos cofres públicos.



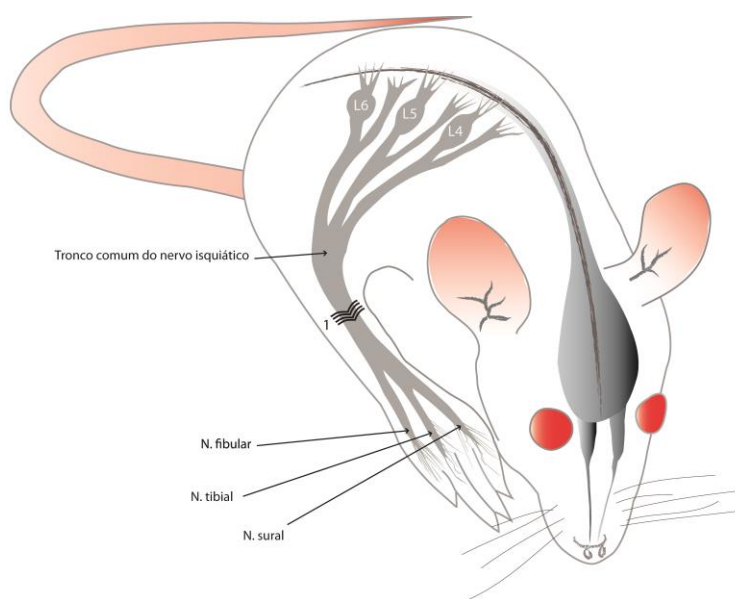
**Figura 01: Vias nociceptivas da periferia ao SNC.** As fibras aferentes primárias (tipos A $\beta$ , A $\delta$  e C), cujos corpos celulares se encontram no gânglio da raiz dorsal (DRG), transmitem impulsos nervosos da periferia ao corno dorsal da medula espinal. Os neurônios de segunda ordem da via nociceptiva (NS) localizam-se principalmente na lâmina superficial do corno dorsal (lâminas I-II), enquanto os neurônios de amplo espectro de resposta (WDRs) se situam profundamente na lâmina V. Os neurônios de projeção da lâmina I inervam regiões encefálicas como o núcleo parabraquial (PB) e a substância cinzenta periaquedutal (PAG), as quais se projetam a regiões que compõem o chamado sistema límbico, que compreende as várias áreas corticais e subcorticais envolvidas no processamento de emoções. Deste sistema e da PAG emergem projeções descendentes que se dirigem a núcleos do tronco encefálico, como os situados no bulbo ventral medial rostral (RMV), envolvidos na modulação de informações nociceptivas na medula espinal. Os neurônios da lâmina V se dirigem principalmente a núcleos do tálamo, de onde se projetam a várias regiões corticais (córtices cerebrais), que compõem a chamada “matriz da dor”. (Adaptado de D’Mello e Dickenson, 2008).

A principal abordagem para o tratamento da dor neuropática é a farmacológica. Dentre os principais fármacos usados no tratamento dessa condição estão a pregabalina (um análogo de GABA), a gabapentina (inibidor de GABA) e antidepressivos tricíclicos (Finnerup e Attal, 2016). Porém, os resultados são pouco satisfatórios e existem variados efeitos adversos em 50 a 70% dos pacientes (Magrinelli et al, 2013). Este insucesso terapêutico parece se relacionar à dificuldade no manejo do complexo quadro patofisiológico estabelecido, cujos mecanismos envolvem, como já mencionado anteriormente, alterações na excitabilidade e na expressão de canais iônicos, bem como de outras moléculas ao longo de todo o SNC (Colloca et al, 2017; Nickel et al, 2012; von Hehn et al, 2012), os quais também estão sujeitos a variações interindividuais e à presença de comorbidades (Cohen & Mao, 2014). Existe, portanto, a necessidade de se esclarecer como ocorrem os processos patofisiológicos e de buscar substâncias que tenham melhor desempenho no alívio da dor neuropática, com menores efeitos adversos.

Na busca de avanços no desenvolvimento de fármacos para o tratamento da dor neuropática, tem-se utilizado amplamente modelos animais que mimetizam certos aspectos deste tipo de dor (Jaggi et al, 2011; Costigan et al., 2009; Klusakova & Dubovy, 2009). Apesar de não possuírem capacidade de comunicação verbal quando em contato com estímulos nociceptivos, esses animais exibem respostas motoras similares às dos humanos. Essas respostas permitem inferir a existência de dor (Kavaliers, 1988; Dubner, 1983). Dentre as diversas abordagens para o estudo da dor neuropática em modelos animais, esse texto destaca o modelo da constrição crônica no nervo isquiático (CCI, do inglês *chronic constriction injury*), também referido como compressão crônica no nervo isquiático. O modelo utilizado neste estudo está representado na Figura 2, que consiste em quatro amarraduras no tronco comum do nervo isquiático.

Em virtude da lesão nervosa, diversos mediadores inflamatórios são produzidos localmente e atuam tanto no local da lesão como no SNC. Estes mediadores contribuem com os sinais característicos da dor neuropática como a hiperalgesia e alodinia (Colloca et al, 2017; von Hehn et al, 2012; Nickel et al, 2012; Basbaum et al., 2009; Mosley et al., 2006; Zimmermann, 2001; Millan, 1999). Dentre os mediadores químicos, será destacada a produção de espécies reativas de oxigênio (do inglês *Reactive oxygen species* - ROS) (Gardiner et al., 2009; Mosley et al., 2006; Khodr & Khalil, 2001; Szabo, 1998; Winrow et al., 1993;). Porém, antes de dar prosseguimento a este tema, será apresentada uma breve descrição das ROS seguida de seu papel na nocicepção, com ênfase na dor neuropática.





**Figura 2** – Esquema da medula espinal lombar ilustrando a formação do nervo isquiático pela união das raízes dorsais e ventrais da medula espinal. Nas raízes dorsais estão mostrados os gânglios das raízes dorsais (L4, L5, L6) do nervo isquiático, o qual é composto por dois nervos, o tibial, que posteriormente se divide também no nervo sural, e o fibular. No tronco comum do nervo isquiático estão mostradas as quatro amarraduras que promovem a constrição no nervo isquiático.

## 1.2 Espécies Reativas de Oxigênio e Defesas Antioxidantes

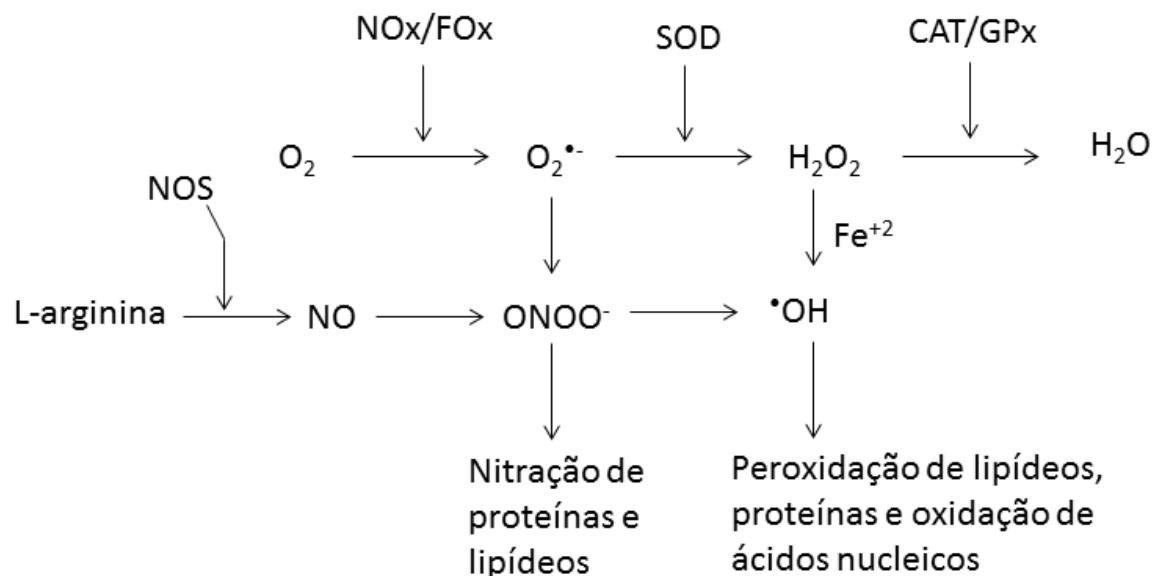
A formação de ROS ocorre em virtude dos processos do metabolismo energético celular (Figura 3). O processo de fosforilação oxidativa mitocondrial e de enzimas NADPH oxidase e citocromo P450 são algumas das fontes endógenas usuais de geração de ROS, como ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), radical hidroxil ( $OH^{\bullet}$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (Poljsak; Suput, Milisav, 2013). O  $O_2^{\bullet-}$  apresenta menor reatividade e por isto pode difundir-se por distâncias consideráveis até encontrar um alvo. A rápida reação do  $O_2^{\bullet-}$  com o óxido nítrico (NO, do inglês *Nitric Oxide*) gera peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) (Roberts et al., 2010; Halliwell, 2012), o qual pode causar nitração a lipídios e proteínas (Roberts et al., 2010). O  $H_2O_2$  pode reagir com metais de transição, como ferro e cobre presentes na célula, dando origem ao radical  $OH^{\bullet}$ . O  $H_2O_2$  e o  $ONOO^-$  podem gerar radical  $OH^{\bullet}$ , que possui pouca capacidade de difusão, mas pode ocasionar peroxidação de lipídeos e proteínas, e oxidação a ácidos nucleicos. Por sua baixa capacidade de difusão, os danos gerados pelo radical  $OH^{\bullet}$  se limitam às proximidades de onde é gerado. Desta forma, a toxicidade de  $O_2^{\bullet-}$  e  $H_2O_2$  é decorrente principalmente da formação de radicais  $OH^{\bullet}$  (Ramos Vasconcelos, 2005). Apesar do potencial de reagir com outras moléculas de forma deletéria, atualmente vem se reconhecendo que essas ROS são fundamentais para a sinalização e manutenção de um ambiente redox adequado às diferentes funções celulares (Levonen, 2014).

Para regular a produção e dispersão das ROS, as células contam com sistemas antioxidantes. As defesas antioxidantes exercem seu papel de diferentes formas e em diferentes momentos, seja evitando a formação dos radicais, ou minimizando algum processo oxidativo já desencadeado. A importância relativa de cada uma delas, portanto, depende destas peculiaridades. Entre as principais defesas antioxidantes celulares estão enzimas que removem cataliticamente as ROS após sua formação. Serão destacadas as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutaciona peroxidase (GPx) e glutaciona transferase (GST) (Sorg, 2004; de Zwart et al., 1999) (Figura 3). A SOD catalisa a conversão do  $O_2^{\bullet-}$  em  $H_2O_2$ . O  $H_2O_2$ , proveniente da ação da SOD ou de outras fontes, pode ser eliminado pela ação da enzima CAT ou de peroxidases como a GPx. A CAT e a GPx utilizam diversas moléculas redutoras no processo, como o ácido ascórbico, a glutaciona (GSH) e a tioredoxina (Fridovich, 1999).

As defesas antioxidantes não-enzimáticas, como o ácido ascórbico, a GSH, o urato, a bilirrubina e o alfa-tocoferol (Lewén et al., 2000) também exercem papel fundamental na manutenção de um ambiente redox adequado às diferentes funções celulares. O ácido ascórbico atua diretamente como *scavenger* de ROS e na reciclagem da vitamina E (May, 2011) e é, particularmente, importante no SNC (Covarrubias-Pinto et al., 2015; May, 2009; Rice, 2000). A GSH é um tripeptídeo de ampla distribuição e importância em animais e plantas e que atua em combinação com outros sistemas de defesa antioxidante, reduzindo e regenerando várias moléculas oxidadas, além de atuar diretamente sobre as ROS (Sies, 1999). A GSH e outros tióis celulares são capazes de reagir com a maioria dos oxidantes fisiológicos, resultando em modificações em seus grupamentos sulfidríla, os quais podem ser regenerados por moléculas como o ácido ascórbico (Winterbourn; Hampton, 2008).

Quando as ROS se sobressaem frente ao sistema antioxidante celular, seja por um aumento em sua geração ou diminuição nas defesas antioxidantes, ocorre o fenômeno de estresse oxidativo, levando a perturbações na sinalização redox e/ou danos às macromoléculas (Sies, 2014; Ray; Huang; Tsuji, 2012). São inúmeros os estudos que relatam a participação de ROS no desenvolvimento das mais diversas patologias por suas ações oxidantes e deletérias sobre proteínas, lipídios e ácidos nucleicos (Shichiri, 2014). Porém, as ROS não possuem apenas papel potencialmente lesivo aos constituintes biológicos. Sua produção, em limites estreitos, parece ser importante para a manutenção da homeostase, pois estas espécies interagem e regulam mensageiros intracelulares em vias de sinalização de vários processos, como proliferação, metabolismo e sobrevivência celular (Kennedy et al., 2012; Ray; Huang; Tsuji, 2012), além de condições de inflamação e

excitotoxicidade (Nishikawa; Haschida; Takakura, 2009; Sorg, 2004;). As ROS podem ainda regular a condutância iônica nas membranas e a liberação de neurotransmissores (Chen et al., 2002; Finkel, 1998; Seutin et al., 1995). Mittal & Murard (1977) foram os primeiros a descreverem o papel sinalizador das ROS. Em seu estudo, o  $O_2^{\bullet-}$  e o  $OH^{\bullet}$  foram capazes de ativar a guanilato ciclase e ocasionar formação de cGMP (guanilato monofosfato cíclico), importante mensageiro intracelular. As ROS também regulam o fator de transcrição NF- $\kappa$ B (fator nuclear kappa B) (Schreck et al., 1992; Schreck & Baeuerle, 1991), o qual desempenha importante papel na medula espinal (Toth et al., 2008). Como o NF- $\kappa$ B se liga a vários sítios promotores no DNA, o estado redox da célula pode controlar indiretamente a transcrição de várias moléculas, como citocinas, fatores de crescimento, moléculas de adesão celular e imunorreceptores (Baeuerle & Henkel, 1994).



**Figura 03:** Redução do oxigênio molecular ( $O_2$ ) até a formação de água ( $H_2O$ ) pela ação de enzimas NADPH oxidases ( $NO_x$ ) e da fosforilação oxidativa ( $FO_x$ ). No esquema é mostrada a formação de ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), de radical hidroxil ( $OH^{\bullet}$ ) e peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), assim como a ação das enzimas antioxidantes superóxido dismutase ( $SOD$ ), glutathione peroxidase ( $GPx$ ) e catalase ( $CAT$ ). Ainda, o esquema mostra a formação de óxido nítrico ( $NO$ ) pela ação da enzima óxido nítrico sintase ( $NOS$ ). NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (Adaptado de Grace et al., 2016).

### 1.3 Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) e Processamento Nociceptivo

Nos estudos da dor neuropática, as principais informações sobre a participação das ROS vem de estudos empregando modelos animais. Nessas condições são descritas alterações tanto em defesas antioxidantes como incrementos na formação de ROS, os quais ocorrem na periferia e no SNC (Grace et al., 2006; Riffel et al., 2016; Horst et al., 2014; Scheid et al., 2013; Gwak; Hassler; Hulsebosch, 2013; Salvemini et al., 2011; Guedes, 2006; 2008; 2009). Em animais com dor neuropática por CCI também foram descritas alterações em parâmetros de estresse oxidativo no local da lesão, demonstrado por uma maior formação de ROS e NO, de produtos da lipoperoxidação (resultado da ação de ROS em lipídios), e redução na concentração de GSH, eventos que parecem relacionar-se à reação inflamatória local e ação de enzimas como as NADPH oxidases, xantina oxidase e NOS (Geis et al., 2017; Mittal et al., 2014;). Porém, as mudanças não se limitam apenas ao local da lesão. Pathak e colaboradores (2014) demonstraram que as modificações em parâmetros de estresse oxidativo, decorrentes da CCI, também podem ser observadas no SNC, inclusive no córtex cerebral.

Uma das formas pela qual as ROS podem modular a função de macromoléculas, como receptores e canais, é pela modificação de sua estrutura (d'Ischia et al., 2011). A nitração de resíduos de tirosina das subunidades do receptor de glutamato do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) leva a um aumento nas correntes de cálcio e incremento sustentado na neurotransmissão nociceptiva (Zanelli; Ashraf; Mishra, 2002). As ROS também podem nitratar e comprometer a função dos transportadores de recaptção de glutamato e cisteína, comprometendo, desta forma, a formação intracelular de GSH (Aoyama et al., 2008) e aumentando a quantidade extracelular de glutamato. Neste caso, a sensibilização pode ser favorecida pela maior excitotoxicidade glutamatérgica associada à diminuição no conteúdo antioxidante tiólico intracelular (Salvemini et al., 2011). As ROS também modulam a atividade de proteínas cinases e modificam o funcionamento e a expressão de canais iônicos (Grace et al., 2016; Salvemini et al., 2011). Uma das proteínas cinases é a proteína cinase C (PKC), a qual possui papel central em várias vias de sinalização neuronal e de células gliais que conduzem à sensibilização periférica e central (Hongpaisan; Winters; Andrews, 2004). A PKC também regula diretamente as ações de NADPH oxidases, uma importante fonte de geração de  $O_2^{\bullet-}$  (Sharma et al., 1991), a qual parece ser importante para a manutenção da sensibilização central (Geis et al, 2017; Grace et al., 2016; Salvemini et al., 2011).

O NO também parece implicado em múltiplos mecanismos envolvidos na dor neuropática, apresentando tanto ações pró-nociceptivas como antinociceptivas. Seu papel parece relacionar-se com diversos fatores do microambiente celular como, por exemplo, a excitabilidade neuronal (CURY et al., 2011). Isso ocorre porque o quadro de hiperalgesia parece relacionar-se também com a presença de ONOO<sup>-</sup> (Grace et al., 2016; Salvemini et al., 2011; Roberts et al., 2010; Trachootham et al., 2008).

Na clínica médica é comum o aparecimento de indivíduos com lesão parcial ou incompleta em nervo periférico. A grande incidência deste tipo de lesão levou Bennett e Xie, em 1988, a desenvolver o modelo de CCI, que permite detectar a dor espontânea e a evocada. Este modelo mimetiza os sintomas da compressão nervosa crônica, que corresponde a causalgia ou síndrome da dor complexa regional (Jaggi et al., 2011; Klusáková & Dubový, 2009). Os tratamentos são empíricos nessas condições dolorosas, e novos trabalhos são necessários para que o processo fisiopatológico envolvido nessas sensações dolorosas seja entendido, efetivo e seguro quando instituído na clínica médica. Um tratamento que induziu redução na hiperalgesia de ratos com CCI foi a administração intraperitoneal de N-acetilcisteína (NAC), efeito esse parcialmente relacionado à modulação de ROS (Naik et al., 2006), como será abordado a seguir.

#### **1.4 N-Acetilcisteína (NAC)**

A NAC é um medicamento bem tolerado e seguro que tem sido usado por várias décadas na clínica médica como agente mucolítico e no tratamento de numerosos transtornos, como a intoxicação por acetaminofeno (paracetamol) (Dhouib et al., 2016; Samuni et al., 2013). Os estudos experimentais mostraram que a NAC possui efeito neuroprotetor (Ercan et al., 2016) e é capaz de inibir a transmissão nociceptiva em humanos e camundongos (Truini et al., 2015), e em ratos com CCI (Horst et al., 2014; Naik et al., 2006). Esses efeitos parecem relacionar-se com a capacidade da NAC de atuar como um antioxidante intracelular e de influenciar processos de sinalização intracelulares. A NAC é um doador de aminoácido L-cisteína, um dos precursores na síntese de GSH (Dhouib et al., 2016; Samuni et al., 2013). Ao agir como doador de cisteína, a NAC contribui para manter as concentrações intracelulares de GSH, molécula que atua como agente protetor e detoxifica ROS, por isso sendo fundamental para a manutenção de um ambiente redox adequado às diferentes funções celulares (Robaczewska et al., 2016; Aoyama et al., 2008). A NAC também atua como um *scavenger* de radicais livres, pois

pode ser oxidada por uma grande variedade de radicais (Dhouib et al., 2016; Samuni et al., 2013).

A NAC também modula vias intracelulares, como a via fosfatidil-inositol-3-quinase (PI3/Akt) e a via Janus Kinase/Transdutores de Sinal e Ativadores de Transcrição 3 (Jak2/STAT3) (Wong et al., 2013). Essas vias desempenham papel importante no desenvolvimento e manutenção da dor neuropática (Popiolek-Barczyk & Mika, 2016). Segundo esses autores, a via das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK, do inglês *mitogen-activated protein kinase*) também possui papel importante na dor neuropática. Uma MAPK tipicamente ativada em condições de dor neuropática é a proteína p-38 (Cheng & Ji, 2008). A forma fosforilada dessa proteína (p-p-38) está aumentada em condições de dor e em presença de citocinas pró-inflamatórias, que sabidamente estão aumentadas na dor neuropática (Zhou et al., 2016; Cheng & Ji, 2008).

Outra proteína relacionada com a dor neuropática é o NF- $\kappa$ B. Em modelo de constrição em nervo periférico, o NF- $\kappa$ B aumentou sua expressão na medula espinal, e esse acréscimo pareceu relacionar-se com a ativação de células gliais (Yin et al., 2015). A administração de um inibidor do NF- $\kappa$ B foi capaz de atenuar a alodinia desencadeada por dor inflamatória (Ledeboer et al., 2005). Lee e col. (2011) demonstraram uma correlação temporal na ativação de p-38 e NF- $\kappa$ B. Nesse estudo, o pico do aumento na expressão de p-p-38 ocorreu aos três dias após a lesão e estava localizado em microglia, enquanto o aumento na expressão de NF- $\kappa$ B fosforilado foi observado aos sete dias após a lesão e estava localizado em astrócitos. Em cultura de células, o aumento em ROS ocasionou a ativação em vias de sinalização de MAPK e induziu a translocação de NF- $\kappa$ B do citosol para o núcleo celular. Essa translocação promoveu síntese de fator de necrose tumoral tipo alfa (TNF- $\alpha$ ) e ativação da isoforma induzida da enzima óxido nítrico sintase (iNOS), aumentando, assim, a secreção de TNF- $\alpha$  e NO (Bordt & Polster, 2014). Segundo esses autores, a NAC poderia regular indiretamente a ativação de vias de sinalização de MAPK e translocação de NF- $\kappa$ B ao atuar como agente protetor e de detoxificação de ROS. Porém, os estudos ainda são poucos sobre NAC e p-38, e inexistente em relação ao NF- $\kappa$ B em ratos com dor neuropática por CCI.

Diversos estudos mostram que a administração de substâncias com ação antioxidante induz antinocicepção (Riffel et al., 2016; Turini et al., 2015; Yowtak et al., 2013; Bernabuci et al., 2012; Kamboj et al., 2008), incluindo a NAC (Horst et al., 2014; Naik et al., 2006). Segundo esses últimos autores, o tratamento com NAC preveniu a redução nos limiares mecânico e térmico, medidas de sensibilidade dolorosa em ratos, os

quais foram reduzidos pela CCI. Esse efeito antinociceptivo parece envolver ações da NAC na periferia e no SNC, pois a NAC possui baixo peso molecular e é sugerido que poderia atravessar livremente a barreira hematencefálica (Samuni et al., 2013; Farr et al., 2003). No SNC, a administração intraperitoneal de NAC reduziu a concentração de metabólitos do NO e aumentou as atividades das enzimas antioxidantes GPx e GST em medula espinal lombossacral de ratos com CCI. Cabe destacar que a medula espinal lombossacral é a região de entrada das aferências do nervo isquiático. Porém, permanece ainda desconhecido o efeito do tratamento com NAC sobre outros parâmetros oxidativos no SNC de ratos com CCI, modelo experimental amplamente utilizado nos estudos da dor neuropática.

## 2. HIPÓTESE

A administração de NAC, na dose de 150 mg/kg/dia administrada intraperitonealmente, provocou antinocicepção em ratos com CCI. Assim, espera-se que o tratamento com NAC, nessa mesma dose, seja capaz de aumentar o limiar mecânico em ratos nessa mesma condição dolorosa, a qual se sabe estar reduzida após o procedimento cirúrgico. Como a NAC possui efeito neuroprotetor, espera-se que a sua administração induza a recuperação mais rápida no índice funcional do nervo isquiático, o qual está reduzido após lesão nervosa. Como a NAC também modula a atividade de moléculas envolvidas na sinalização intracelular e possui atividade antioxidante, espera-se que o tratamento com NAC modifique a expressão da proteína p-p-38 e o mRNA do *NF-κB*, assim como o quadro oxidativo na medula espinal lombossacral.



### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Este trabalho teve como objetivo geral avaliar os efeitos temporais da administração intraperitoneal de NAC sobre a nocicepção e a recuperação funcional do nervo isquiático; além das moléculas de sinalização intracelular; e os parâmetros de estresse oxidativo na medula espinal lombossacral de ratos com constrição do nervo isquiático.

#### **3.2 Objetivos específicos**

Determinar os efeitos da administração intraperitoneal de NAC (150 mg/kg/dia, administrada por 1, 3 ou 7 dias) em ratos com e sem dor neuropática induzida por CCI, sobre:

- a) Parâmetros nociceptivos e de recuperação funcional do nervo isquiático, mediante:
  - Avaliação da sensibilidade mecânica, nos períodos 0 (pré-lesão), 1, 3 e 7 dias após a intervenção cirúrgica;
  - Avaliação do Índice funcional do nervo isquiático (IFI), nos períodos 0 (pré-lesão), 1, 3 e 7 dias após a intervenção cirúrgica.

b) Parâmetros de estresse oxidativo, no segmento lombossacral da medula espinal, mediante determinação da:

- Formação de  $O_2^{\bullet-}$  e concentração de hidroperóxidos lipídicos;
- Concentração de ácido ascórbico e medida da capacidade antioxidante total.

c) Expressão da proteína p-p-38, no segmento lombossacral da medula espinal, mediante realização de:

- técnica de western blot para a p-p38 e a GAPDH (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase), esta última como controle de carga;

e) Quantificação do mRNA do *NF- $\kappa$ B*, no segmento lombossacral da medula espinal, mediante realização de:

- técnica de PCR em tempo real, utilizando  *$\beta$ -actina* como controle.

d) Realização de técnicas histoquímica e imunohistoquímica para:

- Determinar o padrão de reatividade à enzima NADPH-diaforase, a qual é uma NOS, em medula espinal lombossacral;
- Determinar o padrão de imunorreatividade à proteína p-38 em gânglios da raiz dorsal do nervo isquiático ipsilateral à lesão e medula espinal lombossacral.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Animais: procedência e manutenção

Após aprovação pelo Comitê de Ética desta Universidade (#23407), foram solicitados ao Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) ratos da linhagem *Wistar*, machos, com massa corporal entre 200-300g e 60 dias de vida. Os animais foram mantidos no ratário do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, acomodados em caixas criadouros forradas com maravalha (40x30x16cm), com livre acesso à água e alimentação, sob ciclo claro/escuro de 12 horas (das 07h00min às 19h00min) e temperatura ambiente de  $22 \pm 2$  °C. A limpeza das caixas foi realizada a cada dois dias. A transferência destes animais para o Laboratório de Neurobiologia Comparada ocorreu nos dias dos testes comportamentais, da cirurgia e/ou morte.

### 4.2 Delineamento experimental

Os grupos experimentais foram preparados em dois momentos distintos, visando avaliar:

1. O efeito da administração de NAC sobre parâmetros nociceptivos, de estresse oxidativo, e quantificação de mRNA do *NFkB* e expressão da proteína p-38 em ratos controle, *sham* e com CCI no nervo isquiático.

2. Efeito da administração de NAC sobre a reatividade à enzima NADPH-diaforase e imunorreatividade à proteína p-38.

Para todos os experimentos foram preparados três grupos experimentais, conforme segue:

- Grupo controle: ratos que não sofreram intervenção cirúrgica;
- Grupo *sham*: ratos que tiveram o nervo isquiático exposto, porém sem constrição;
- Grupo CCI: ratos que foram submetidos à constrição unilateral no nervo isquiático direito.

Os animais destes grupos experimentais receberam intraperitonealmente solução salina (Solução fisiológica de cloreto de sódio 0,9%) ou NAC, na dose de 150 mg/kg/dia, por 1, 3 ou 7 dias. A administração diária teve início no dia da intervenção cirúrgica (dia 0), após a realização desta e passados os efeitos da anestesia, e nos dias seguintes sempre em mesmo horário, ao fim da tarde. Nos animais do grupo controle, as administrações também iniciaram no dia 0, ao fim da tarde, sempre em mesmo horário. Para as administrações foi utilizada solução injetável de NAC (comercialmente conhecida como Fluimucil – Zambon Laboratórios Farmaceuticos<sup>®</sup>), a qual é facilmente encontrada no comércio local. Essa fórmula farmacêutica é uma solução de NAC na concentração 10%, preparada em água de injeção. Para se atingir o volume desejado de administração, foi simplesmente feito o cálculo para ajuste do volume ao peso corporal do rato, não realizando diluições para que não fosse aumentado o volume a ser administrado ao animal. Assim, o volume administrado diariamente a cada rato não foi maior do que 0,5 mL. O volume a ser administrado ao rato foi retirado do frasco original apenas no momento da administração, pois a NAC é sensível à oxidação quando exposta ao ar.

No **experimento 1**, Todos os ratos deste experimento foram submetidos aos testes comportamentais para avaliação da alteração no limiar mecânico (teste de von Frey) e no IFI (teste da marcação das patas). Esses testes foram realizados no dia 0 (pré-cirurgia) e nos dias 1, 3 e 7 após a cirurgia. Para esse experimento foram realizados 18 grupos experimentais (controle Salina e NAC; *sham* Salina e NAC; CCI Salina e NAC), mortos 1, 3 e 7 dias. Cada grupo experimental foi composto por seis (06) animais, o que totalizou 108 ratos nesta etapa da pesquisa. Os ratos dos diferentes grupos experimentais foram mortos por decapitação 1, 3 ou 7 dias após o início do tratamento para a obtenção do segmento lombossacral da medula espinal (Tabela1).

No **experimento 2** também foram preparados 18 grupos experimentais (igual ao experimento 1), tendo em cada um deles 04 ratos, os quais foram anestesiados e

perfundidos com solução de paraformaldeído 4% preparada em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4. Após a perfusão foram coletados os gânglios da raiz dorsal (DRG) dos segmentos L4-L6 do nervo isquiático ipsilateral à lesão e o segmento lombossacral da medula espinal correspondente.

Somando os dois experimentos, o número total de animais necessários para a realização do presente trabalho foi 180 ratos (Tabela 1).

Tabela 1- Organização dos grupos experimentais:

Grupos Experimentais	Tempo de Tratamento					
	1 Dia		3 Dias		7 Dias	
	Solução Salina	NAC	Solução Salina	NAC	Solução Salina	NAC
EXPERIMENTO 1: Índice funcional do nervo isquiático, Sensibilidade mecânica, Western Blot, Estresse oxidativo e e RT-PCR						
Controle	C1S n=6	C1N n=6	C3S n=6	C3N n=6	C7S n=6	C7N n=6
<i>Sham</i>	S1S n=6	S1N n=6	S3S n=6	S3N n=6	S7S n=6	S7N n=6
Constricção	D1S n=6	D1N n=6	D3S n=6	D3N n=6	D7S n=6	D7N n=6
EXPERIMENTO 2: Imunohistoquímica a p-38 e histoquímica a NADPH-diaforase						
Controle	C1S n=4	C1N n=4	C3S n=4	C3N n=4	C7S n=4	C7N n=4
Sham	S1S n=4	S1N n=4	S3S n=4	S3N n=4	S7S n=4	S7N n=4
Constricção Nervosa	D1S n=4	D1N n=4	D3S n=4	D3N n=4	D7S n=4	D7N n=4

n: número de animais. Controle (C): ratos sem manipulação cirúrgica; *Sham* (S): ratos que tiveram todos os procedimentos cirúrgicos, exceto ligadura no nervo isquiático; Constricção nervosa (D): ratos que receberam 4 amarraduras no tronco comum do nervo isquiático direito; S: tratamento com solução salina; N: tratamento com N-acetilcisteína.

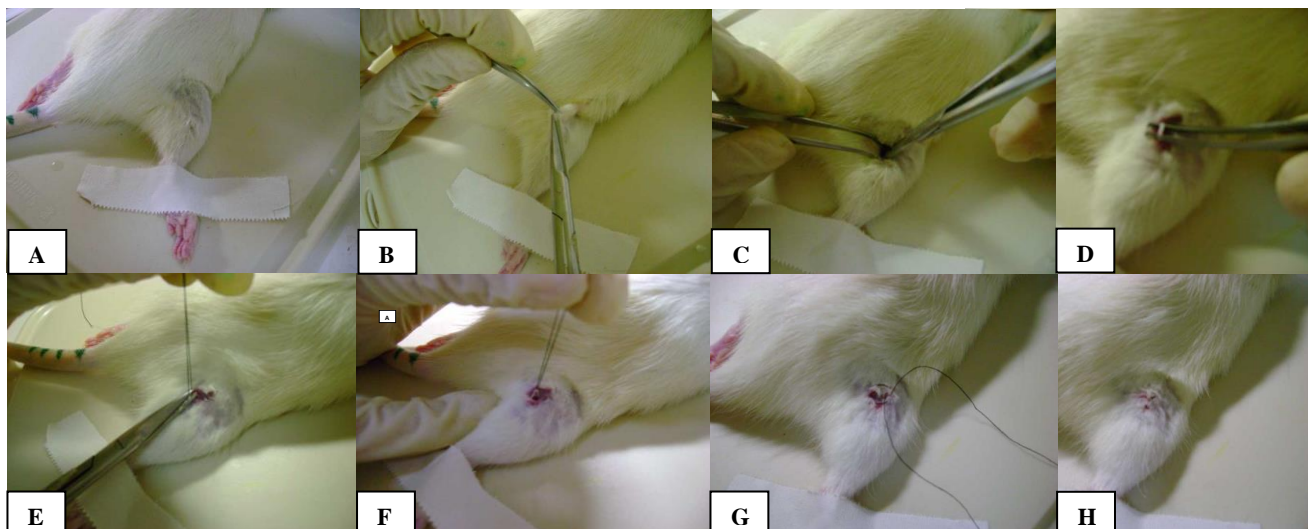
### 4.3 Constrição no nervo isquiático

Para o procedimento de constrição no nervo isquiático, os ratos foram previamente anestesiados com solução mista de quetamina (90 mg/kg de peso corporal) e xilazina (10 mg/kg de peso corporal). Estando anestesiado, o rato foi posicionado em decúbito dorsal para a realização da tricotomia da coxa direita (Figura 4A). A intervenção foi iniciada pela assepsia da pele com álcool iodado 2%, seguida de incisão cutânea e subcutânea longitudinal do membro posterior direito, no terço médio da coxa (Figura 4B,C). Nos animais pertencentes ao grupo *sham* ocorreu a exposição do nervo, em seguida, a região foi suturada (Figura 4D). Nos animais do grupo CCI, o nervo isquiático do membro posterior direito recebeu 4 amarraduras com fio *catgut* cromado em seu terço inicial, com 1 mm de distância entre um nó e outro (Figura 4E,F). Assim, o comprimento do nervo afetado foi de aproximadamente 7,0 mm. O grau de constrição usado retarda, mas não interrompe totalmente a circulação sanguínea da superfície epineural (Bennett e Xie, 1988). Após os procedimentos, o local da incisão foi suturado com fio de nylon não absorvível 4.0 (Somerville) e o antimicrobiano rifamicina (Rifocina Spray® 10 mg/mL, 1 jato) foi aplicado sobre a pele suturada (Figura 4G,H). Os animais controle não sofreram intervenção cirúrgica.

É importante ressaltar, que todos os procedimentos cirúrgicos, de todos os animais avaliados no presente estudo, foram realizados pelo mesmo pesquisador para garantir o mesmo grau de compressão em todos os animais.

Após os procedimentos cirúrgicos, os animais foram acomodados nas caixas com maravalha e mantidos em observação no Laboratório de Neurobiologia até a recuperação do anestésico. Neste período, os ratos receberam alimento e água *ad libidum*. Após a recuperação total da anestesia, os ratos receberam a primeira administração de soluções salina ou de NAC, na dose de 150 mg/kg. Em seguida, os ratos foram levados ao ratário, onde permaneceram até o dia da morte, recebendo durante o período experimental injeções diárias das soluções salina ou de NAC, de acordo com o grupo experimental a que pertencia. Os animais foram mantidos nas mesmas condições descritas no item Animais: Procedência e Manutenção.

Os ratos não receberam nenhuma terapia analgésica para que os efeitos da lesão nervosa e tecidual não fossem mascarados por influências externas ao tratamento.



**Figura 4:** Sequência de procedimentos para a realização da constrição crônica no nervo isquiático de ratos. (A) Animal em posição decúbite dorsal e tricotomia no membro posterior direito. (B) Incisão dos tecidos cutâneos no membro posterior direito. (C) Afastamento dos músculos bíceps femoral e semitendinoso no membro posterior direito. (D) Exposição do tronco comum do nervo isquiático no membro posterior direito. (E) Primeiro nó no tronco comum do nervo isquiático no membro posterior direito. (F) Quarto nó no tronco comum do nervo isquiático no membro posterior direito. (G) Início da sutura dos tecidos cutâneos no membro posterior direito. (H) Animal suturado e pronto para retornar à caixa moradia.

#### 4.4 Determinação do limiar mecânico

Os animais dos diferentes grupos foram testados para determinação do limiar a estímulo mecânico inócua mediante emprego do teste de von Frey. Para a realização do teste dos filamentos de von Frey, os animais foram colocados individualmente em caixas de vidro (12x20x20 cm) apoiadas sobre uma superfície elevada e revestida por tela metálica (Figura 5A). Após aclimatação neste ambiente por 20 minutos, foram aplicados estímulos de ordem crescente de força na superfície plantar do membro posterior direito (ipsilateral à lesão nos ratos lesionados) (Figura 5B), utilizando-se Filamentos de von Frey (North Coast Medical, Inc, USA) de 10 a 100 g (Figura 5C). A força em questão pode ser alcançada pelo dobramento do filamento (Figura 5D), o qual foi aplicado 3 vezes durante 3 s cada. Foram consideradas como respostas positivas aquelas em que o animal realizou o movimento de retirada do membro posterior imediatamente após o estímulo mecânico, e não as respostas seguidas de caminhada. Foi registrada a menor força (filamento de menor peso) capaz de gerar uma resposta de retirada do membro sob o estímulo mecânico. Os

testes foram realizados no dia 0 (pré-cirurgia) e 1, 3 e 7 dias após a cirurgia, entre oito e nove horas da manhã, pelo mesmo experimentador.

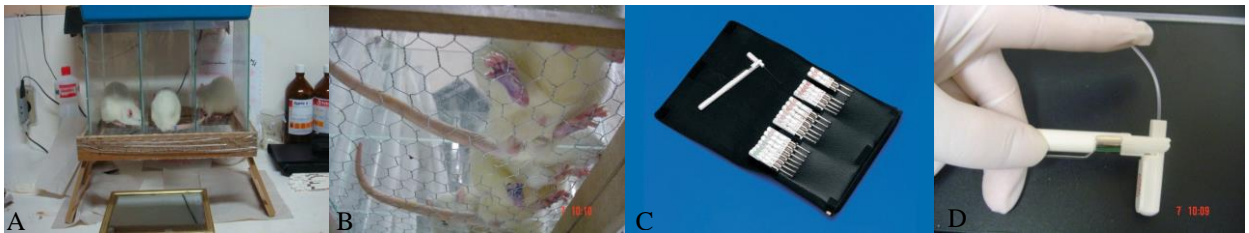


Figura 5: Materiais usados no teste de von Frey em ratos. (A) ratos em aclimação nas caixas de vidro. (B) Superfície plantar de ratos sobre a superfície elevada e revestida por tela metálica na caixa de vidro. (C) Estojo contendo os filamentos de von Frey com diferentes gramaturas. (D) flexão de um filamento de von Frey quando o mesmo atinge o valor máximo de sua gramatura.

#### 4.5 Determinação do índice funcional do isquiático

A avaliação funcional do nervo isquiático foi realizada pelo teste da marca das patas (do inglês, *walking track analysis*), descrito por De Medinacelli (1982). Este teste constitui um método de análise funcional de nervo, que avalia alterações de marcha decorrentes de lesão nervosa por meio da impressão de pegadas. Este teste é normalmente empregado para avaliar as consequências funcionais de lesão direta no nervo isquiático.

No teste, o animal foi colocado em um corredor de madeira (8,5x100 cm) com acesso a um ambiente escuro. O chão do corredor foi forrado com uma tira de papel branco de mesma medida e o rato a ser testado teve suas patas traseiras marcadas com tinta preta. A seguir, o animal foi solto no início do corredor por onde pode se locomover em direção ao ambiente escuro, ao final do corredor, deixando impressas as marcas de suas patas traseiras. Todos os animais foram anteriormente treinados com três passagens pelo corredor, permitindo a adaptação e exploração do local. Foram selecionadas para análise as pegadas com qualidade e clareza de impressão (Figura 6), sendo aferidas as patas operada (direita) e contralateral (esquerda). As aferições foram feitas sempre pelo mesmo examinador e o Índice Funcional do Isquiático (IFI) foi calculado conforme a fórmula a seguir:



$$\text{IFI} = -38,3[(\text{EPL}-\text{NPL})/\text{NPL}] + 109,5[(\text{ETS}-\text{NTS})/\text{NTS}] + 13,3[(\text{EIT}-\text{NIT})-\text{NIT}] - 8,8$$

A pata esquerda, ou normal, corresponde à letra N; a pata lesionada, ou experimental, à letra E. Foram realizadas as medidas: da extensão da pegada (PL: distância da extremidade do 3º dedo até o calcâneo), da largura da mesma (TS: distância entre o 1º e 5º dedo), e da distância entre os dedos intermediários (IT: 2º e 4º dedo) das patas traseiras (Figura 1). Os valores obtidos por esta fórmula foram considerados como um índice da condição funcional do nervo isquiático, expresso em déficit funcional. Variações de zero a  $\pm 11$  estão nos desvios de normalidade da pegada. O zero representa função normal e o -100 representa perda total da função. Os valores intermediários correspondem a déficits parciais de função. Os testes foram realizados nos dias 1, 3 e 7 após a cirurgia, às 07h da manhã, pelo mesmo experimentador.

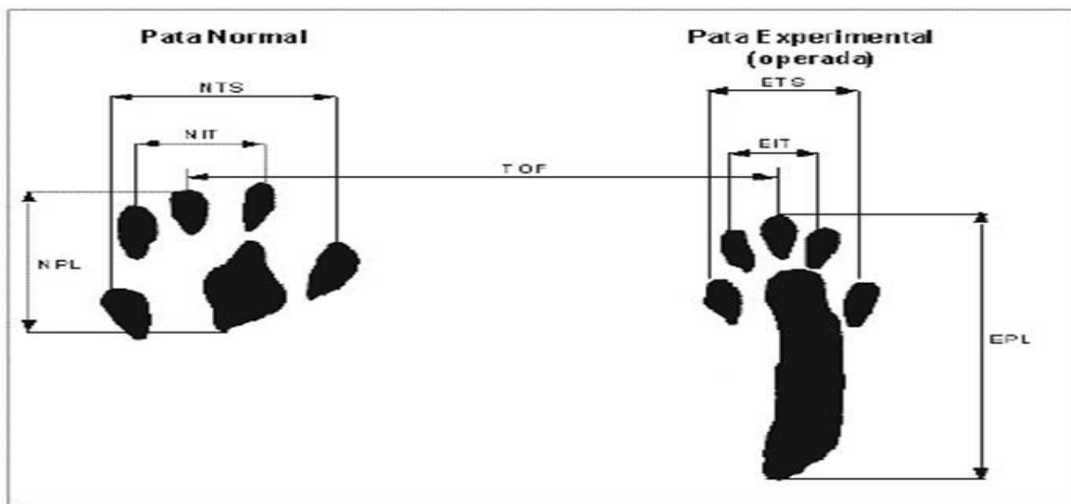


FIGURA 6: Representação esquemática dos parâmetros medidos para calcular o índice Funcional do Isquiático (IFI). N: normal; E: experimental (operada); TS: abertura total dos dedos (1º a 5º); IT: abertura dos dedos intermediários (2º ao 4º); PL: comprimento da pegada (Adaptado de Monte-raso et al., 2006).

#### 4.6 Preparação das amostras

Imediatamente após a decapitação de cada rato, foi retirado o segmento lombossacral da medula espinal, que foi dividido em duas partes. Uma das partes foi homogeneizada para dosagem dos parâmetros oxidativo e utilização nas técnicas de expressão da proteína p-p38 e quantificação do mRNA do *NFkB*. A homogeneização foi realizada em solução contendo cloreto de potássio (KCl) 1,15% e fluoreto de fenil metil sulfonila (PMSF) 100 mM, seguida de centrifugação a 1000 g, por 20 minutos. O sobrenadante foi coletado e armazenado a -70 °C (Buege & Aust, 1987). A outra parte das

amostras foi utilizada para a determinação dos valores de  $O_2^{\bullet-}$ , sendo congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas intactas à temperatura de  $-70\text{ }^\circ\text{C}$ .

Para as análises histoquímica e imunohistoquímica, os ratos dos diferentes grupos experimentais foram anestesiados com solução mista de quetamina (90 mg/kg de peso corporal) e xilazina (10 mg/kg de peso corporal), administrada intraperitonealmente, e, em seguida, submetidos a uma perfusão intracardíaca. Para isso, a árvore vascular de cada rato foi inicialmente lavada com 300 mL de solução salina. Em seguida, foram introduzidos na árvore vascular 300 mL de solução de paraformaldeído 4% preparada em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4 para fixação dos tecidos do animal. Após este processo, os gânglios da raiz dorsal correspondentes aos segmentos L4-L6 e o segmento lombossacral da medula espinal foram retirados e colocados na mesma solução fixadora, por quatro horas, à temperatura ambiente, para pós-fixação. Em seguida, o tecido foi crioprottegido em solução de sacarose de concentrações 15 e 30%, preparada em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4, permanecendo na solução 15% até seu rebaixamento para o fundo do frasco e, em seguida, colocado na solução de concentração 30%, onde permaneceu também até seu afundamento no frasco. Nas soluções de sacarose, a incubação foi feita à temperatura de  $4\text{ }^\circ\text{C}$ . Após, uma parte da medula espinal e os gânglios foram incluídos em parafina para a realização da técnica de imunohistoquímica a p-38, enquanto o outro segmento da medula espinal foi congelado para posteriormente ser cortado em criostato para a técnica da NADPH-diaforase.

#### **4.7 Técnica de western blot**

Após quantificação de proteínas, foi utilizado o sistema *mini-protein* (Bio-Rad®) para a separação das proteínas de interesse por eletroforese em gel SDS-PAGE a 10% (gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio). As amostras foram preparadas com tampão de carga (Tris 65 mM, SDS 10%, glicerol 50%, azul de bromofenol 0,1%) na concentração de 80  $\mu\text{g}$  de proteína/50  $\mu\text{L}$  de amostra. Para a identificação do peso molecular da proteína de interesse, foi utilizado marcador de peso molecular RPN800 (Amersham Pharmacia). Antes de serem submetidas à eletroforese a 120v por 3 horas, as amostras foram aquecidas a  $100\text{ }^\circ\text{C}$ , durante 2 minutos, em banho seco (modelo 330-3D, Nova Ética). A eletroforese foi efetuada na presença de tampão de corrida, contendo glicina 192 mM, Tris 25 mM e SDS 0,1%, pH 8,3. A separação das proteínas foi monitorada pelo azul de bromofenol, presente no tampão de amostra, e pelo marcador de

peso molecular. A seguir, o gel de poliacrilamida foi retirado das placas de vidro e colocado no módulo de eletrotransferência em contato com a membrana de nitrocelulose (Hybond, Amersham) e coberto com tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 192 mM e metanol a 20%, pH 8,3). A transferência foi efetuada a 250 mA por aproximadamente 60 minutos.

Para o bloqueio das ligações de proteínas inespecíficas, as membranas foram incubadas com albumina bovina (Sigma) a 1% em TTBS (Tris 20 mM, NaCl 140 mM e Tween 20 a 0,05%), por 60 minutos à temperatura ambiente. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas a 4 °C por 12 horas, sob agitação constante, com os anticorpos primários para p-p-38 (concentração de 1:100; Merck Millipore, Billerica, MA, USA) e GAPDH (1:2000; Merck Millipore), esse último serviu como controle de carga. Os anticorpos primários foram dos tipos policlonal (p-p-38) e monoclonal (GAPDH), ambos diluídos em TTBS contendo albumina a 2,5 %. Terminado o período de incubação, as membranas foram lavadas com TTBS (três vezes de 10 minutos cada lavagem) e incubadas com o segundo anticorpo, adequado às características do tipo do anticorpo primário. Esta incubação teve duração de duas horas e ocorreu sob agitação constante, em temperatura ambiente. Antes de proceder à revelação por quimiluminescência, as membranas foram lavadas 3 vezes com TBS (Tris 20 mM e NaCl 140 mM). As bandas imunorreativas foram detectadas mediante uso de substrato luminescente, o ECL (Merck Millipore), seguido de exposição da membrana a filme autorradiográfico (GE Healthcare Limited, Buckinghamshire, UK). Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias (valor percentual referente ao total do gel).

## **4.8 Real time-PCR**

### ***4.8.1 Extração de RNA***

Aproximadamente 10mg de tecido foi homogeneizado com o reagente Trizol<sup>®</sup> (Invitrogen). O método de extração de RNA total pelo Trizol é uma adaptação do método original descrito por Chomczynski & Sacchi (1987). A solução contendo o homogeneizado foi transferida para tubos de microcentrífuga e incubados por 5 minutos a temperatura de 15-30 °C. Foram adicionados 0,2 mL de clorofórmio por mL de Trizol e as amostras agitadas vigorosamente por 15 segundos. A seguir, foi incubado por 2-3 minutos a temperatura de 15-30 °C e centrifugado a 12000 xg por 15 minutos, a 4 °C. A amostra foi

separada em fase orgânica (fenol-clorofórmio), interface e fase aquosa contendo o RNA. A fase aquosa foi transferida para tubos novos, onde o RNA foi precipitado com a adição de álcool isopropílico (0,5 mL/mL de Trizol). A partir deste momento, o RNA foi purificado utilizando-se o kit RNAspin Mini (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) seguindo instruções do próprio fabricante, obtendo-se um volume final de 20 µL.

#### ***4.8.2 Quantificação de RNA***

A concentração de RNA foi realizada por espectrofotometria no aparelho L-Quant (Loccus Biotecnologia, São Paulo, Brasil), utilizando-se 2 µL da solução obtida na extração. A pureza do RNA foi considerada satisfatória quando a razão das absorbâncias a 260 e 280 nm foi acima de 1,6.

#### ***4.8.3 Síntese de DNA complementar (DNAc)***

A síntese de DNAc foi feita a partir de 1 µg de RNA total, utilizando-se oligonucleotídeos (primers) complementares à cauda poli-A característica do mRNA, produzindo um DNAc mais puro, exclusivamente a partir do mRNA. Considerando que a fração de mRNA corresponde a aproximadamente 2-3% do RNA total, foi estimado que 1 µg de RNA total daria origem a 20 ng de DNAc. A síntese foi feita utilizando o protocolo do Kit Superscript IIRT (Invitrogen<sup>®</sup>). Ao final da síntese foi obtido 20µL de DNAc, que foi armazenado a -20 °C. Para testar a qualidade da extração e síntese do DNAc, realizou-se a PCR (reação em cadeia da polimerase) convencional para o gene da beta actina, com posterior eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio.

#### ***4.8.4 Reação em Cadeia da Polimerase***

A análise da expressão gênica foi feita pela técnica de RT-PCR em tempo real (reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa, pois se realizou a síntese de DNAc).

O RT-PCR permite a amplificação de enzimas de sequências definidas de RNA, podendo comparar os níveis de mRNA, caracterizar seus padrões de expressão, discriminar entre mRNA bastante relacionados e analisar a estrutura do RNA. O método de RT-PCR

em tempo real é considerado uma técnica bastante sensível, que utiliza um sistema de detecção contínua da cinética da reação de RT-PCR por fluorescência (Bustin, 2000).

Para cada gene no estudo foi realizada uma curva de padronização obtida através de reações de RT-PCR feitas a partir de diluições seriadas de DNAC da medula espinal lombossacral de ratos controles. O momento em que ocorre o aumento exponencial da fluorescência pelo corante utilizado é definido como o CT (ciclo limiar, que é inversamente proporcional ao log da quantidade de DNAC (ng) (Higuchi; Fockler et al., 1993).

### ***Oligonucleotídeos específicos para o gene de interesse***

Os oligonucleotídeos (*primers*) utilizados para a amplificação dos fragmentos de DNAC específicos para o mRNA em estudo, neste caso o *NF-κB*, foram desenhados a partir da sequência publicada de cada gene, obedecendo aos seguintes critérios:

- 18 a 30 nucleotídeos;
- Quando o gene possuir mais de um exon, os oligonucleotídeos serão posicionados preferencialmente nas áreas de transição íntron-éxon, para viabilizar a amplificação indesejada de DNA genômico;
- A proporção de G-C será mantida entre 50 e 60% e equilibrada em cada par de *primers*;
- A extremidade 3' será preferentemente ocupada por C ou G, para fortalecer a hibridização neste ponto crítico;
- A temperatura de fusão (do inglês, *melting temperature*) calculada para um primer deve ser semelhante à do seu par;
- Evitar sequências que resultem em complementaridade dos *primers sense* e *antisense*, para inibir a formação de dímeros.

### ***4.8.5 Curva de normalização***

Para se evitar variação entre as amostras, visto que as mesmas foram obtidas de diferentes animais, amplificou-se o gene de interesse juntamente com um gene normalizador. O gene normalizador ou constitutivo é expresso em níveis constantes entre os diferentes tecidos de um organismo, independente dos estágios do desenvolvimento e

não sofre alteração pelos tratamentos experimentais. Foi utilizado gene como normalizador a beta- actina, amplificado da mesma forma que o gene de interesse.

A Tabela 2 resume a sequência dos oligonucleotídeos de interesse deste estudo, bem como o tamanho dos fragmentos de DNAc amplificados.

Tabela 2– Características dos oligonucleotídeos dos genes de interesse

Gene	Sequência (5'-3')	Tamanho do fragmente (pb)	Referência
<i>NF-κB</i>			
<i>sense</i>	GAGCAACCAAAACAGAGGGG	242	<a href="http://bioinfo.ut.ee/primer3">http://bioinfo.ut.ee/primer3</a>
<i>antisense</i>	CCTGCTGTTACGGTGCATAC		
<i>beta</i>			
<i>Actina</i>		140	<a href="http://bioinfo.ut.ee/primer3">http://bioinfo.ut.ee/primer3</a>
<i>sense</i>	CTGGAACGGTGAAGGTGACAA		
<i>Antisense</i>	AGGGACTTCCTGTAACAATGCA		

A amplificação do DNAc e a quantificação relativa foi realizada utilizando-se o sistema de qPCR em tempo real StepOnePlus (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), utilizando o Kit Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), em um volume total de 25 µL. Foram realizadas amplificação e leitura de cada amostra em duplicata, com o seguinte protocolo para todos os genes: incubação inicial por 2 min a 94 °C, seguida por 45 ciclos (para a *beta- actina*) ou 65 ciclos (para *NF-κB*) de 30s de desnaturação a 95 °C, 30s de anelamento a 58 °C e 30s de extensão a 72 °C.

Para confirmar a especificidade da reação, foi realizada a curva de dissociação para cada par de *primers* com a análise da temperatura de *melting* de cada gene.

#### 4.9 Técnica de imunohistoquímica

Após a inclusão dos tecidos em parafina, os blocos foram seccionados em micrótomo (Leitz), tendo cada corte espessura de 10  $\mu\text{m}$ . As lâminas contendo os cortes foram desparafinizadas em xilol, hidratadas em sequência de álcool, de 100% a 70%, e água. A seguir, as lâminas foram colocadas em PBS, seguido por incubação em solução de  $\text{H}_2\text{O}_2$  3% preparado em metanol a 10%, para inibição da atividade de peroxidases endógenas. A incubação teve duração de 30 minutos e foi realizada à temperatura ambiente. A seguir, os cortes foram lavados em PBS, 3 lavagens de 10 minutos cada uma. Em seguida, fez-se a reativação antigênica mediante aquecimento dos cortes em forno microondas. A reativação consistiu em 3 sequências de aquecimento, tendo cada uma delas duração de 3 minutos e realizada em presença de tampão citrato, pH 5,5. Feito isso, os cortes foram lavados por 3 vezes em PBS, cada banho tendo duração de 10 minutos, e incubados por 30 minutos em solução de soro normal de cabra a 3%, preparada em PBS acrescido de triton 0,2% (PBS-T). Essa incubação foi realizada à temperatura ambiente e serviu para bloquear alguns sítios inespecíficos de união dos anticorpos antes da incubação com o anticorpo primário. O anticorpo primário foi do tipo policlonal, desenvolvido em coelho (Sigma) e diluído em PBS-T, em proporção de 1:100. A incubação teve duração de 24-horas, sendo realizada a 4 °C. A seguir, os cortes foram lavados em PBS, sendo, logo após, incubados com o anticorpo secundário (Sigma), o qual teve diluição de 1:100 em PBS. A incubação foi realizada à temperatura ambiente durante 60 minutos. Após, os cortes foram novamente lavados em PBS e incubados em uma solução de PAP (peroxidase anti-peroxidase) com diluição de 1:500 em PBS, durante 90 minutos, à temperatura ambiente. O complexo PAP reage imunologicamente com o anticorpo secundário, o qual, por sua vez, reconhece o anticorpo primário. Este complexo de reação foi revelado pelo método histoquímico de Graham e Karnovsky (1966), o qual emprega como cromógeno a 3-3'diaminobenzidina (DAB), que ao combinar-se com o  $\text{H}_2\text{O}_2$  resulta no complexo HRP/ $\text{H}_2\text{O}_2$ , o qual adquire cor. Para isso, foi utilizada uma solução de DAB 0,06% em PBS e uma solução de  $\text{H}_2\text{O}_2$  10% em água deionizada. Os cortes foram incubados por 10 minutos na solução de DAB, sendo acrescentado, logo em seguida, 0,005% de solução de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Estes cortes permaneceram neste meio até o aparecimento de um precipitado de cor marrom, o que ocorreu cerca de 10 minutos após o início da incubação. Depois da revelação, os cortes foram lavados em PBS, desidratados em soluções crescentes de álcool, diafanizadas em xilol, cobertas com Entellan (Merck) e lamínulas.

A determinação da especificidade da imunorreatividade foi pela capacidade do anticorpo utilizado reconhecer o antígeno em estudo. Com esse objetivo, foi realizada a substituição do anticorpo primário por PBS. Esse controle foi realizado em diferentes experimentos e os resultados obtidos indicaram se a imunorreatividade observada foi resultado da interação antígeno-anticorpo primário ou se foi decorrente de reações inespecíficas.

As lâminas contendo os cortes foram analisadas no microscópio Nikon Eclipse E-600 acoplado a uma câmera Moticam 5.0 MP.

#### **4.10 Técnica histoquímica da NADPH-diaforase**

Para a técnica histoquímica da NADPH-diaforase, os segmentos da medula espinal em sacarose 30% foram montados em meio de congelação e cortados em criostato a temperatura de  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , em espessura de  $50\text{ }\mu\text{m}$ . A técnica da NADPH-diaforase foi realizada de acordo com Partata et al. (1999). Após a secção, os cortes foram colocados em frascos contendo PBS gelado até o início da técnica histoquímica. Ao término da realização de todos os cortes, o PBS dos frascos foi descartado e substituído por solução de PBS contendo triton X-100, na proporção de  $12\text{ }\mu\text{l}$  de Triton X-100 para  $10\text{ ml}$  de PBS. Essa incubação teve duração de 10 minutos e foi realizada à temperatura ambiente, sob agitação contínua (Agitador orbital, Mod. 255-B, FANEM). Ao término deste período, a solução foi substituída por meio de incubação que continha  $0,5\text{ mg. mL}^{-1}$  de  $\beta$ -NADPH (Sigma),  $0,2\text{ mg. mL}^{-1}$  de azul de nitrotetrazólio (Sigma) e PBS  $0,2\text{ M}$ , pH 7,4 contendo  $12\text{ }\mu\text{L}$  de triton X-100. Neste meio, os cortes foram pré-incubados, em agitação constante, por 5 minutos à temperatura ambiente, sendo, em seguida, colocados a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , onde permaneciam por 4 horas. Após isto, os cortes foram lavados 3 vezes em PBS, coletados em lâminas gelatinizadas, desidratados em álcoois crescentes, clareados em xilol e cobertos com Entellan (Merck) e lamínulas. As células positivas apresentavam coloração azul violeta no corpo e prolongamentos.

As lâminas contendo os cortes foram analisadas no microscópio Nikon Eclipse E-600 acoplado a uma câmera Moticam 5.0 MP.



## 4.11 Técnicas de estresse oxidativo

### 4.11.1 Ácido ascórbico

O ensaio de quantificação do ácido ascórbico foi realizado conforme técnica descrita por Roe & Kuether (1942), com pequenas adaptações. Inicialmente produziu-se uma curva padrão de ácido ascórbico (AA). As diferentes concentrações de AA foram então misturadas com carvão ativado, de granulometria 1-2 mm, tratado previamente com ácido clorídrico (10%), para conversão do AA em sua forma oxidada, o dehidroascorbato. Após, adicionou-se 10  $\mu\text{L}$  de solução de tiouréia (10%) e 75  $\mu\text{L}$  de 2,3-dinitrofenilhidrazina (DNPH) (2%) e os tubos *ependorfs* contendo essa mistura de soluções foram colocados em banho-maria a 37 °C, por 3 horas. Terminado este período de tempo, adicionou-se 375  $\mu\text{L}$  de ácido sulfúrico (85%), gota a gota, com os *ependorfs* em banho de gelo, e aguardou-se 30 minutos para leitura das absorbâncias em espectrofotômetro, a 540 nm (Espectrofotômetro T60, PG Instruments). Na presença de AA desenvolve-se uma coloração alaranjada, proporcional à concentração. As amostras tiveram o mesmo tratamento, porém com a adição de ácido tricloroacético ocorre desproteinização, sendo necessário centrifugar novamente os *ependorfs* por breve período de tempo, e seguir o ensaio utilizando o sobrenadante obtido. A partir da curva padrão, obtiveram-se as concentrações de AA (sob a forma de dehidroascorbato) das amostras em micromolar de AA por miligrama de proteína.

### 4.11.2 Hidroperóxidos lipídicos

O método do xilenol laranja, descrito por Jiang et al. (1991) e adaptado por Sodergren et al. (1998), se baseia na oxidação do  $\text{Fe}^{+2}$  a  $\text{Fe}^{+3}$  na presença de lipoperóxidos, em pH ácido, formando complexos de  $\text{Fe}^{+3}$  xilenol laranja. Em solução ácida, o corante mostra pico a 560 nm e a absorbância cresce linearmente com o aumento da concentração do corante.

As amostras de tecidos foram diluídas, em proporção de 1:10, e separadas em 2 grupos: no primeiro foi acrescentado metanol absoluto (MEOH), e no segundo, trifetilfosfina (TEPP) 10 mmol/L, a qual é responsável por reduzir especificamente os hidroperóxidos. Ambos os grupos foram incubados por 30 minutos, à temperatura ambiente. Após a incubação, foi pipetado, em microplaca, 10  $\mu\text{l}$  de amostra em

quadruplicata (uma duplicata com o metanol, e outra duplicata com o TPP), adicionando-se em seguida 90  $\mu\text{l}$  do reagente de trabalho (RT-XO). Este consistiu em uma mistura de 81% de MEOH 90%, XO 2  $\text{mmol.L}^{-1}$  para concentração final de 100  $\mu\text{M}$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1  $\text{mmol.L}^{-1}$  para concentração final de 25  $\text{mmol.L}^{-1}$ , BHT 40  $\text{mmol.L}^{-1}$  para concentração final de 4  $\text{mmol.L}^{-1}$  e sulfato ferroso amoniacal 10  $\text{mmol.L}^{-1}$  para concentração final de 250  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ .

A placa foi agitada por 30 minutos, em temperatura ambiente e, em seguida, se realizou a leitura em leitora de Elisa a 570 nm. Para os cálculos, os valores de absorvância foram descontados dos valores obtidos das duplicatas do TPP. O resultado foi expresso em nmol por miligrama de proteína.

#### 4.11.3 Capacidade Antioxidante Total (TAC)

Na técnica descrita como TAC e adaptada de Erel (2004), a cor característica do reagente 2,2'-azinobis(3-etilbenzo-tiazolina-6-sulfonato) ( $\text{ABTS}^{*+}$ ) é branqueada pelos antioxidantes presentes na amostra. Esta reação pode ser monitorizada espectrofotometricamente e a taxa de branqueamento é inversamente relacionada à capacidade antioxidante total da amostra. A velocidade da reação é calibrada com Trolox, que é largamente utilizado como um padrão para os ensaios de medição tradicional de capacidade antioxidante, e os resultados expressos em equivalentes de micromol de Trolox por litro ( $\mu\text{mol Trolox Eq.L}^{-1}$ ). O ensaio tem uma excelente precisão, superior a 97%.

#### 4.11.4 Formação de ânion Superóxido

A formação de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  foi estimada pela redução de azul de nitrotetrazol (NBT), conforme técnica descrita por Wang et al. (1998). O método consistiu na reação dos homogeneizados de medula espinal com NBT, após incubação de 90 minutos, para formação de formazan como um indicador da formação do  $\text{O}_2^{\bullet-}$ . A absorvância do formazan foi determinada espectrofotometricamente a 540 nm. A quantidade de formazan reduzido pelo  $\text{O}_2^{\bullet-}$  foi:

$$\text{Redução a formazan} = A \times V / (T \times Wt \times \epsilon \times l)$$

Onde A representa a absorvância do formazan, V o volume de solução, T o período de incubação das amostras com NBT, Wt o peso do tecido,  $\epsilon$  o coeficiente de extinção molar (0,72  $\text{L.mmol}^{-1}.\text{mm}^{-1}$ ), e l representa o caminho óptico. Os resultados foram expressos em picomol por minuto por miligrama de peso do tecido.

#### 4.12 Quantificação de proteínas

A quantificação do conteúdo proteico dos tecidos foi realizada pelo método colorimétrico descrito por Lowry et al. (1951), em espectrofotômetro SP-22, BIOSPECTRO, em comprimento de onda de 625 nm. O conteúdo de proteínas da amostra foi calculado com base nas absorvâncias desta e de um fator de calibração obtido de uma curva-padrão de albumina.

#### 4.13 Análise estatística

O cálculo do “n” (número mínimo de animais) para o experimento 1 foi baseado na análise do teste de von Frey de animais com CCI, no programa *Computer Programs for Epidemiologists* (WIN PEPI – versão 9.1), utilizando-se dados de estudo prévio (Horst et al., 2014). Foi estabelecido um nível de significância de 0,05, poder estatístico de 95%, assumindo uma perda de 10% para esse estudo. Assim, chegou-se a um número amostral de 06 animais por grupo, totalizando 108 animais para a realização desse experimento.

Para o experimento 2 o cálculo do “n” foi baseado na determinação do peróxido de hidrogênio utilizando-se dados de estudo prévio (Horst et al., 2014), considerando os mesmos valores citados acima. Assim, chegou-se a um número amostral de 04 animais por grupo, totalizando 72 animais para a realização desse experimento.

Inicialmente foi avaliado se os valores eram paramétricos, a homogeneidade da variância dos dados foi analisada pelo teste de Levene e a normalidade dos dados foi testada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Com base nos resultados das análises foram calculadas as médias e os erros padrões da média para cada uma das medidas realizadas e para cada um dos grupos estudados. A comparação dos resultados ocorreu mediante emprego do teste de análise de variância (ANOVA) de três vias (variáveis: 1- grupo de lesão; 2- tempo 3- tipo de tratamento). No caso dos experimentos onde foi abordado apenas o dia 3, foi realizada análise de variância (ANOVA) de duas vias (variáveis: 1- grupo de lesão; 2- tipo de tratamento). Havendo diferença estatisticamente significativa, foi utilizado o pós-teste mais indicado para análise, que estará indicado em cada figura. As diferenças foram consideradas significativas quando a análise estatística apresentou  $p < 0,05$  (software Sigma Stat).

#### **4.15 Disposição final dos resíduos da pesquisa**

##### **- Resíduos químicos**

Os resíduos químicos foram acondicionados em embalagem adequada, previamente identificada, e encaminhados ao Centro de Gestão e Tratamento de Resíduos Químicos da UFRGS para procedimento correto de sua eliminação.

##### **- Resíduos biológicos**

O lixo biológico, após acondicionamento correto e identificação, foi encaminhado ao CREAL do Instituto de Ciências Básicas da Saúde para sua devida eliminação.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Artigo 1

Este artigo mostra os efeitos temporais da NAC sobre: 1) o IFI, a fim de avaliar a recuperação funcional pós-lesão nervosa; e 2) a expressão da p-p-38 e a geração de  $O_2^{\bullet-}$ , duas moléculas importantes no processamento da dor neuropática, em medula lombossacral de ratos com CCI. O artigo foi publicado no periódico *Brazilian Journal of Medical and Biology Research*, em fevereiro de 2017.

Citação do artigo: Horst A, de Souza JA, Santos MC, Riffel AP, Kolberg C, Ribeiro MF, de Fraga LS, Partata WA. (2017). N-acetylcysteine downregulates phosphorylated p-38 expression but does not reverse the increased superoxide anion levels in the spinal cord of rats with neuropathic pain. *Braz J Med Biol Res.*, 16;50(2):e5801. doi: 10.1590/1414-431X20165801.

Link: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5343557/>

# N-acetylcysteine downregulates phosphorylated p-38 expression but does not reverse the increased superoxide anion levels in the spinal cord of rats with neuropathic pain

A. Horst<sup>1,2</sup>, J.A. de Souza<sup>1</sup>, M.C.Q. Santos<sup>1</sup>, A.P.K. Riffel<sup>1</sup>, C. Kolberg<sup>1</sup>, M.F.M. Ribeiro<sup>1</sup>,  
L.S. de Fraga<sup>1</sup> and W.A. Partata<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Neurobiologia Comparada, Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil  
<sup>2</sup>UNIVATES, Lajeado, RS, Brasil

## Abstract

We determined the effect of N-acetylcysteine (NAC) on the expression of the phosphorylated p38 (p-p38) protein and superoxide anion generation (SAG), two important players in the processing of neuropathic pain, in the lumbosacral spinal cord of rats with chronic constriction injury (CCI)-induced neuropathic pain. The sciatic functional index (SFI) was also measured to assess the functional recovery post-nerve lesion. Thirty-six male Wistar rats were divided equally into the following groups: Naive (rats did not undergo surgical manipulation); Sham (rats in which all surgical procedures involved in CCI were used except the ligature), and CCI (rats in which four ligatures were tied loosely around the right common sciatic nerve), which received 2, 4, or 8 intraperitoneal injections of NAC (150 mg·kg<sup>-1</sup>·day<sup>-1</sup>) or saline beginning 4 h after CCI. Rats were sacrificed 1, 3, and 7 days after CCI. The SFI was measured on these days and the lumbosacral spinal cord was used for analysis of p-p38 expression and SAG. CCI induced a decrease in SFI as well as an increase in p-p38 expression and SAG in the spinal cord. The SFI showed a partial recovery at day 7 in saline-treated CCI rats, but recovery was improved in NAC-treated CCI rats. NAC induced a downregulation in p-p38 expression at all time-points evaluated, but did not reverse the increased SAG induced by CCI. Since p-p38 is a mediator in neuropathic pain and/or nerve regeneration, modulation of this protein may play a role in NAC-induced effects in CCI rats.

Key words: Sciatic functional index; Chronic constriction; Sciatic nerve; Mitogen-activated protein kinase; Antinociception; Mechanical threshold

## Introduction

Accumulating evidence suggests that the protein p38, a member of the family of mitogen-activated protein kinases (MAPK), contributes to neuropathic pain processing, as do nitric oxide (NO) and reactive oxygen species such as superoxide radicals (1,4). N-acetylcysteine (NAC) is a sulfhydryl donor antioxidant that contributes to the regeneration of glutathione and plays a protective role in neurons of the nervous system (5). NAC also induces antinociception in rats with chronic constriction injury (CCI) of the sciatic nerve (6). CCI, one of the most commonly employed animal models of neuropathic pain, simulates the symptoms of chronic nerve compression that correspond to causalgia or complex regional pain syndrome in patients (7).

Recently, it was demonstrated that NAC treatment reduced NO metabolites in the lumbosacral spinal cord of CCI rats (6). These authors suggested that the inhibition of the p38 protein might have contributed to this reduction in NO metabolites. Since MAPKs are activated by upstream kinases via phosphorylation (8), our study assessed the effect of intraperitoneal administration of NAC (150 mg·kg<sup>-1</sup>·day<sup>-1</sup>), given for 1, 3, or 7 days, on the expression of the phosphorylated p38 (p-p38) protein in the lumbosacral spinal cord of rats with CCI. Since NAC reacts relatively slowly with superoxide (5), and we were unable to find a report on the effect of NAC treatment on superoxide anion generation (SAG) in the spinal cord of rats with CCI, our study also evaluated the effect of the

Correspondence: A. Horst: <[deia.horst@gmail.com](mailto:deia.horst@gmail.com)>

Received September 13, 2016 | Accepted December 12, 2016

Braz J Med Biol Res | doi: 10.1590/1414-431X20165801

administration of NAC on SAG, using the same periods of treatment as above. We also assessed the effects of systemic administration of NAC, given for 1, 3, and 7 days at the same dose, on the sciatic functional index (SFI) in CCI rats, as a proof of functional recovery post-nerve lesion. Analysis of the free walking pattern is a commonly used tool to assess the function of innervated target organs after nerve injury (9).

## Material and Methods

### Animals

All animal procedures were approved by the Animal Ethics Committee of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil (#23407). Thirty-six adult male Wistar rats, weighing 200–300 g, were divided into three experimental groups (Naive, Sham and CCI), and each one was further divided into two subgroups (n=6 in each subgroup), which received NAC (Fluimucil<sup>®</sup>, Zambon Laboratórios Farmacêuticos Ltda., Brazil) at a dose of 150 mg·kg<sup>-1</sup>·day<sup>-1</sup> (6,10,11) or 0.9% saline solution. Rats received 2, 4, or 8 intraperitoneal injections (one injection for day) of saline or NAC beginning 4 h after CCI. Thus, rats were sacrificed 1, 3, and 7 days after CCI (6). Rats were not anesthetized for the injections.

### Induction of chronic constriction injury (CCI) and mechanical threshold assessment

After anesthesia (90 mg/kg ketamine and 10 mg/kg xylazine), the right common sciatic nerve was exposed proximal to its trifurcation, and four ligatures (4.0 Shalon chronic catgut, Brazil) were tied loosely around it as described by Bennett and Xie (12), with slight modifications according to Horst et al. (6). To expose the sciatic nerve of Sham rats, all surgical procedures involved in CCI were used except the ligature.

Rats were subjected to sensitivity assessments before the surgical procedure (day 0) and 1, 3, and 7 days after surgery as described by Horst et al. (6). To measure mechanical sensitivity, responses of the injured hind paw to a range of applied innocuous von Frey filaments (North Coast Medical, Inc., USA) were evaluated. The minimum and maximum stimulus intensity was 1 and 64 g, respectively. The first stimulus was always initiated with the lowest filament. If there was no positive response, the next higher filament was applied. This testing pattern was continued until a withdrawal response was recorded.

### Sciatic functional index (SFI)

Recovery of the right hind limb locomotor activity was monitored by analysis of the free walking pattern according to de Medinaceli et al. (13). The rats' footprints were used to determine the following measurements: 1) distance from the heel to the third toe (the print length, PL); 2) distance from the first to the fifth toe (the toe spread, TS), and 3) distance from the second to the fourth

toe (the intermediate toe spread, ITS). These 3 measurements were obtained from the experimental (E) and normal (N) sides. Several prints of each foot were obtained on each track, but only 3 prints of each foot were used to determine the mean of measurements on the experimental and normal sides. These means were included in the formula for the sciatic functional index (SFI):  $SFI = 38.3 \frac{EPL - NPL}{NPL} + 109.5 \frac{ETS - NTS}{NTS} + 13.3 \frac{EIT - NIT}{NIT} - 8.8$

The result was considered to be an index of the functional condition of the sciatic nerve, where zero ( $\pm 11$ ) represented the normal function and about 100 represented the loss of function resulting from CCI. The SFI was assessed in all groups at days 1, 3, and 7. These tests were conducted at the same time of day (7:00 am) by the same researcher.

### Western blotting

To identify the expression of p-p38 and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), rats were sacrificed by decapitation and the lumbosacral spinal cord was promptly removed, immediately frozen in liquid nitrogen, stored at -80°C prior to processing, and homogenized in lysis buffer. Forty-five µg of protein was separated on a 10% SDS-PAGE gel and blotted onto a nitrocellulose membrane. The membranes were blocked with 10% nonfat dry milk and then incubated overnight at 4°C with rabbit anti-p-p38 (1:100; Merck Millipore, USA) and mouse anti-GAPDH (1:2000; Merck Millipore). Immunoreactive bands were detected using secondary antibodies and ECL (Merck Millipore), followed by exposing the membrane to autoradiography film (GE Healthcare Limited, UK).

### Estimation of superoxide anion generation (SAG)

The lumbosacral spinal cord SAG was estimated using the reduced nitroblue tetrazolium (NBT) method of Wang et al. (14). Briefly, sections of fresh tissue from the lumbosacral spinal cord reacted with NBT to form formazan as an index of superoxide anion generation. The absorbance of formazan was determined spectrophotometrically at 540 nm.

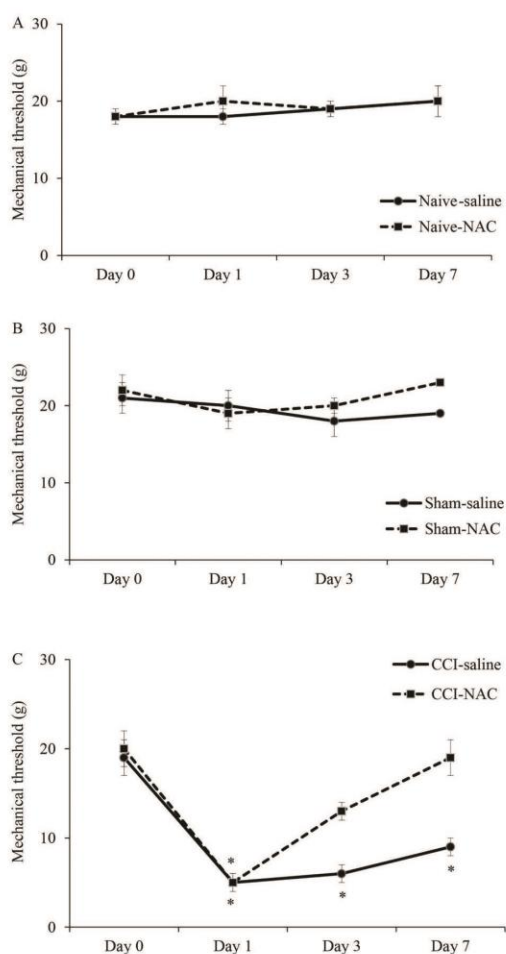
The quantity of NBT reduction =  $A \cdot V / (T \cdot Wt \cdot \epsilon \cdot l)$ , where A is the absorbance of blue formazan at 540 nm, V is the volume of the solution, T is the time period (90 min) during which the rings were incubated with NBT, Wt is the blotted wet weight of the spinal cord portion,  $\epsilon$  is the extinction coefficient of blue formazan (i.e., 0.72 L·mmol<sup>-1</sup>·mm<sup>-1</sup>), and l is the length of the light path. Results are reported as picomoles per minute per milligram of wet tissue.

### Statistical analysis

The results were analyzed using three-way ANOVA (factors: lesion, treatment and time) followed by the Tukey *post hoc* test. Differences were considered to be statistically significant when  $P < 0.05$ .

## Results

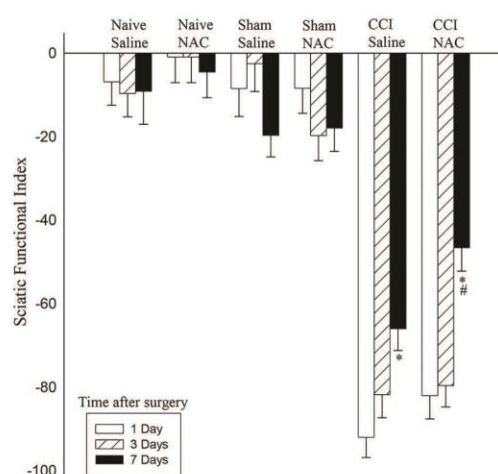
The mechanical threshold did not change significantly in the Naive and Sham groups (Figure 1A and B). After CCI, rats exhibited increases in the mechanical sensitivity (Figure 1C). At days 1 and 3, the mechanical threshold of



**Figure 1.** Assessment of mechanical threshold in rats with chronic constriction injury (CCI) of the sciatic nerve that received 2, 4, or 8 intraperitoneal injections of saline or N-acetylcysteine (NAC; 150 mg·kg<sup>-1</sup>·day<sup>-1</sup>) beginning 4 h after CCI. Rats were sacrificed 1, 3, and 7 days after surgery. In Sham rats, all surgical procedures involved in the CCI were used except the ligature. Day 0: sensitivity assessments before the surgical procedure. Data are reported as means ± SE. \*P < 0.05 compared to pre-nerve lesion values (repeated-measures ANOVA followed by Tukeypost hoc test, n=6).

the saline-treated CCI rats decreased 80% compared to pre-nerve lesion levels. Similar responses were found at day 7. While the mechanical threshold of the NAC-treated CCI rats decreased 80% at day 1, an antinociceptive effect was apparent 3 days after the NAC administration. At this time-point the reduction was 30% in the mechanical threshold of the NAC-treated rats, compared to pre-nerve lesion levels. Compared to saline-treated CCI rats, NAC-treated rats showed an improvement of 133% in the mechanical threshold at day 3. At 7 days after CCI, the mechanical threshold was similar to the pre-nerve lesion level.

SFI values for Sham groups were near zero at all time-points, indicating normal sciatic nerve function. One day after surgery, the walking pattern of all CCI rats showed a dramatic decrease in SFI (Figure 2). The values were near 100, indicating complete loss of sciatic nerve function. At this time-point, the SFI values showed no significant difference among CCI rats. At postoperative day 3, the SFI values were still decreased and no significant change was found in the CCI rats. However, 7 days after the injury, SFI values showed some recovery. While the recovery was 28% in saline-treated CCI rats, the recovery was 44% in NAC-treated CCI rats, compared to values from CCI rats at day 1. Comparison of saline-treated CCI rats with NAC-treated CCI rats at day 7 showed that SFI increased



**Figure 2.** Functional recovery assessed by the Sciatic Functional Index (SFI) in rats with chronic constriction injury (CCI) of the sciatic nerve that received 2, 4, or 8 intraperitoneal injections of saline or N-acetylcysteine (NAC; 150 mg·kg<sup>-1</sup>·day<sup>-1</sup>) beginning 4 h after CCI. Rats were sacrificed 1, 3, and 7 days after surgery. On the Y axis, the results are reported in units, and 0 indicates normality and 100 the total absence of functionality. Data are reported as means ± SE. \*P < 0.05 compared to CCI group at day 1; #P < 0.05 compared to saline-treated CCI group at day 7 (three-way ANOVA followed by Tukeypost hoc test).



approximately 30% in CCI rats that received the NAC treatment, indicating that NAC improved the recovery of the SFI in rats with an injured sciatic nerve.

p-p38 expression did not change significantly in any of the Naive rats. After sham surgery, saline-treated rats exhibited increases in p-p38 expression at days 1, 3, and 7 (Figure 3) compared to Naive rats. After NAC treatment, no significant difference was found between Sham and Naive rats in p-p38 expression at days 1, 3, and 7. Compared to saline, NAC-treated Sham rats showed a reduction of around 65% in p-p38 expression.

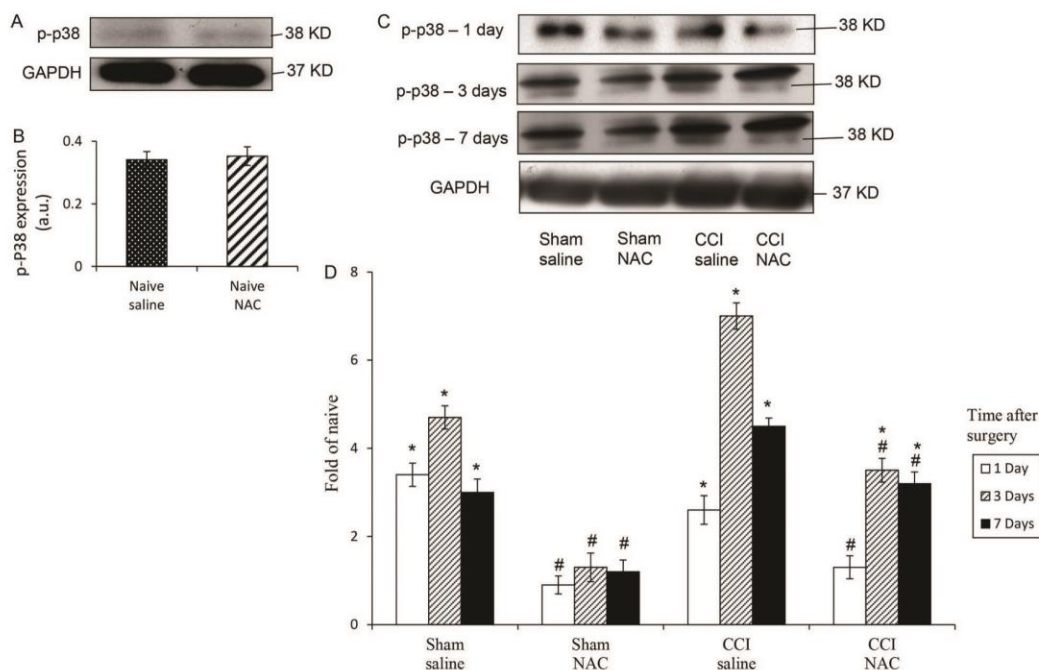
After CCI, rats exhibited increases of 150, 60, and 350% in p-p38 expression at days 1, 3, and 7, respectively, compared to Naive rats. NAC treatment reduced the expression of p-p38 by 46, 50, and 30% at days 1, 3, and 7, respectively, compared to saline-treated CCI rats. Comparing Naive rats and NAC-treated CCI rats, the treatment induced a reduction of around 187% in p-p38 expression at days 3 and 7. At day 1, no significant difference was found between NAC-treated CCI rats and Naive rats.

The level of SAG increased significantly in the lumbosacral spinal cord of the CCI rats (Figure 4). The SAG increased around 40% in the spinal cord of saline-treated CCI rats at days 1 and 3, respectively, and 53% at day 7. Similar percentages were found in the spinal cord of NAC-treated CCI rats, showing that this treatment did not change SAG in the spinal cord. No significant change was found in the Sham groups.

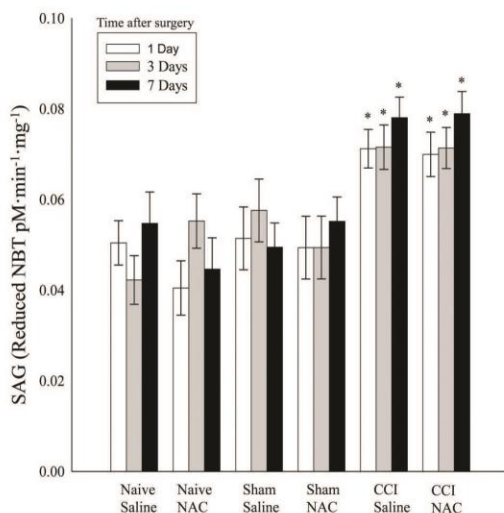
## Discussion

The antinociceptive effect of the intraperitoneal administration of NAC is in line with a previous study that used rats submitted to CCI (6). Thus, our results support the antinociceptive effect of NAC.

Our results showed that on day 7 after surgery, SFI was improved in the CCI rats. Moreover, the NAC-treated CCI rats showed a much better recovery. The SFI is a reliable, repeatable, economical, and quantitative method of evaluating function following sciatic nerve injury (9). Since CCI-induced foot deformities appear to be more



**Figure 3.** Phosphorylated p-38 (p-p38) expression in the spinal cord of rats with chronic constriction injury (CCI) of the sciatic nerve that received 2, 4 or 8 intraperitoneal injections of saline (vehicle) or N-acetylcysteine (NAC; 150 mg·kg<sup>-1</sup>·day<sup>-1</sup>) beginning 4 h after CCI. Rats were sacrificed at 1, 3, and 7 days after surgery. Western blot bands (A,C) and a data summary (B,D) are shown. GAPDH served as loading control. Data are reported as means ± SE in arbitrary units (a.u.) or fold of Naive. \*P < 0.05 compared to the Naive group at the same time-point. #P < 0.05 compared to the group that received only saline at the same time-point (three-way ANOVA followed by Tukeypost hoc test).



**Figure 4.** Superoxide anion generation (SAG) in the spinal cord of rats with chronic constriction injury (CCI) of the sciatic nerve that received 2, 4 or 8 intraperitoneal injections of saline or N-acetylcysteine (NAC; 150 mg·kg<sup>-1</sup>·day<sup>-1</sup>) beginning 4 h after CCI. Rats were sacrificed 1, 3, and 7 days after surgery. In Sham rats, all surgical procedures involved in the CCI were used except the ligature. Data are reported as means ± SE. \*P < 0.05 compared to the Naive and Sham groups (three-way ANOVA followed by Tukeypost hoc test).

related to spontaneous ongoing pain (15), our results suggest that the improved SFI in the NAC-treated CCI rats may be related to attenuation of the spontaneous ongoing pain. In fact, the NAC treatment attenuated the reduction in the mechanical threshold induced by CCI 3 days after the beginning of NAC treatment, but this threshold was similar to pre-nerve lesion level at day 7 (6).

Previous studies have shown that activation of p38 MAPK is involved in neuropathic pain (16,17). A previous study found a significant increase in spinal p-p38 expression at day 3, which was maintained for 2 weeks in rats with CCI (17). Although no information is available, we speculate that this increase might also be present at day 1. In rats with ligation of the L5 spinal nerve, another model of neuropathic pain, p-p38 expression was significantly increased in the spinal cord at day 1 (18). As hypothesized, we detected an increase in p-p38 expression in the spinal cord of the CCI rats at days 1, 3, and 7. This increase might be involved with the critical role of p38 MAPK in regeneration of the sciatic nerve. It has been demonstrated that p38 MAPK has an important physiological role in nerve regeneration and may be important for controlling both initiation of inflammation and

recovery from nerve injury (9). This physiological role may contribute to the improved SFI in saline-treated CCI rats.

NAC, in turn, induced downregulation of p-p38 expression at all time-points evaluated. This reduction could play a role in the antinociceptive effect of NAC in rats with CCI described by Horst et al. (6). Administration of a p-38 inhibitor has been shown previously to reduce hyperalgesia after nerve injury (17). Nevertheless, the effect of NAC on p-p38 expression may be related to the neuroprotector role of these molecules. NAC provides a highly significant effect of neuroprotection in animal nerve injury model (19). p38 MAPK plays critical roles in the differentiation and/or survival of neurons (9). It is probable that additive effects of NAC and p-p38 may have contributed to the decrease in p-p38 expression. The antinociceptive and/or neuroprotector effects of NAC may have contributed to the better recovery in SFI on day 7 after CCI.

It is possible that the reduction in p-p38 may contribute to a decrease in NO metabolites in the spinal cord of rats with CCI, as suggested by Horst et al. (6). It has been demonstrated that neuronal NO synthase, one of the enzymes responsible for NO production, is important for spinal microglial activation after nerve injury (20) and microglial p-p38 plays an important role in CCI-induced nociception (1). However, further studies are necessary to clarify the relationship between NAC, p-38 and NO in the spinal cord of CCI rats.

The increase in SAG in the spinal cord of the saline-treated CCI rats may also be related to pain. Significant evidence links the superoxide anion to pain of several etiologies, including neuropathic pain (21). However, NAC did not reduce the increase in SAG in the spinal cord of rats with CCI. This result may be related to the low capacity of NAC to react with superoxide anions (5).

The reduction in the mechanical threshold in the Sham rats may be due to the procedures involving manipulation of deep tissues, such as muscles and adjacent connective tissue, which induce pain (22). Since NAC also induced downregulation of p-p38 expression in these animals, we suggest that this result reinforces the antinociceptive effect of the NAC in pain conditions.

In summary, our study showed that NAC modulated p-p38 expression in the spinal cord of rats with CCI, but it was unable to reverse the increase of SAG levels induced by CCI. Since p-p38 is an important mediator in neuropathic pain and nerve regeneration, the modulation of this protein may contribute to NAC-induced analgesia and/or functional nerve recovery after CCI.

## Acknowledgments

This work was supported by grants from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

## References

- Ni H-D, Yao M, Huang B, Xu L-S, Zheng Y, Chu Y-X, et al. Glial Activation in the periaqueductal gray promotes descending facilitation of neuropathic pain through the p38 MAPK signaling pathway. *J Neurosci Res* 2016; 94: 50–61, doi: 10.1002/jnr.23672.
- Kim SY, Bae JC, Kim JY, Lee HL, Lee KM, Kim DS, et al. Activation of p38 MAP kinase in the rat dorsal root ganglia and spinal cord following peripheral inflammation and nerve injury. *Neuroreport* 2002; 13: 2483–2486, doi: 10.1097/0001756-200212200-00021.
- Kim HY, Lee I, Chun S W, Kim HK. Reactive oxygen species donors increase the responsiveness of dorsal horn neurons and induce mechanical hyperalgesia in rats. *Neural Plast* 2015; 2015.
- Cury Y, Picolo G, Gutierrez VP, Ferreira SH. Pain and analgesia: The dual effect of nitric oxide in the nociceptive system. *Nitric Oxide* 2011; 25: 243–254, doi: 10.1016/j.niox.2011.06.004.
- Samuni Y, Goldstein S, Dean OM, Berk M. The chemistry and biological activities of N-acetylcysteine. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1830: 4117–4129, doi: 10.1016/j.bbagen.2013.04.016.
- Horst A, Kolberg C, Moraes MS, Finamor IA, Belló-Klein A, Pavanato MA, et al. Effect of N-acetylcysteine on the spinal-cord glutathione system and nitric-oxide metabolites in rats with neuropathic pain. *Neurosci Lett* 2014; 569: 163–168, doi: 10.1016/j.neulet.2014.03.063.
- Jaggi AS, Jain V, Singh N. Animal models of neuropathic pain. *Fundam Clin Pharmacol* 2011; 25: 1–28, doi: 10.1111/j.1472-8206.2009.00801.x.
- Cheng J-K, Ji R-R. Intracellular signaling in primary sensory neurons and persistent pain. *Neurochem Res* 2008; 33: 1970–1978, doi: 10.1007/s11064-008-9711-z.
- Kato N, Matsumoto M, Kogawa M, Atkins GJ, Findlay DM, Fujikawa T. Critical role of p38 MAPK for regeneration of the sciatic nerve following crush injury *in vivo*. *J Neuroinflammation* 2013; 10: 1, doi: 10.1186/1742-2094-10-1.
- Reid AJ, Shawcross SG, Hamilton AE, Wiberg M, Terenghi G. N-acetylcysteine alters apoptotic gene expression in axotomized primary sensory afferent subpopulations. *Neurosci Res* 2009; 65: 148–155, doi: 10.1016/j.neures.2009.06.008.
- Zhang C-G, Welin D, Novikov L, Kellerth J-O, Wiberg M, Hart AM. Motoneuron protection by n-acetyl-cysteine after ventral root avulsion and ventral rhizotomy. *Br J Plast Surg* 2005; 58: 765–773, doi: 10.1016/j.bjps.2005.04.012.
- Bennett GJ, Xie YK. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 1988; 33: 87–107, doi: 10.1016/0304-3959(88)90209-6.
- de Medinaceli L, Freed WJ, Wyatt RJ. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Exp Neurol* 1982; 77: 634–643, doi: 10.1016/0014-4886(82)90234-5.
- Wang HD, Pagano PJ, Du Y, Cayatte AJ, Quinn MT, Brecher P, et al. Superoxide anion from the adventitia of the rat thoracic aorta inactivates nitric oxide. *Circ Res* 1998; 82: 810–818, doi: 10.1161/01.RES.82.7.810.
- Nakazato-Imasato E, Kurebayashi Y. Pharmacological characteristics of the hind paw weight bearing difference induced by chronic constriction injury of the sciatic nerve in rats. *Life Sci* 2009; 84: 622–626, doi: 10.1016/j.lfs.2009.02.014.
- Qu YJ, Zhang X, Fan ZZ, Huai J, Teng YB, Zhang Y, et al. Effect of TRPV4-p38 MAPK pathway on neuropathic pain in rats with chronic compression of the dorsal root ganglion. *Biomed Res Int* 2016; 2016: 6978923.
- Xu L, Huang Y, Yu X, Yue J, Yang N, Zuo P. The influence of p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor on synthesis of inflammatory cytokine tumor necrosis factor alpha in spinal cord of rats with chronic constriction injury. *Anesth Analg* 2007; 105: 1838–1844, doi: 10.1213/01.ane.0000287660.29297.7b.
- Jin SX, Zhuang ZY, Woolf CJ, Ji RR. p38 Mitogen-activated protein kinase is activated after a spinal nerve ligation in spinal cord microglia and dorsal root ganglion neurons and contributes to the generation of neuropathic pain. *J Neurosci* 2003; 23: 4017–4022.
- Reid AJ, Shawcross SG, Hamilton AE, Wiberg M, Terenghi G. N-acetylcysteine alters apoptotic gene expression in axotomized primary sensory afferent subpopulations. *Neurosci Res* 2009; 65: 148–155, doi: 10.1016/j.neures.2009.06.008.
- Kuboyama K, Tsuda M, Tsutsui M, Toyohara Y, Tozaki-Saitoh H, Shimokawa H, et al. Reduced spinal microglial activation and neuropathic pain after nerve injury in mice lacking all three nitric oxide synthases. *Mol Pain* 2011; 7: 50, doi: 10.1186/1744-8069-7-50, doi: 10.1186/1744-8069-7-50.
- Little JW, Doyle T, Salvemini D. Reactive nitroxidative species and nociceptive processing: determining the roles for nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite in pain. *Amino Acids* 2012; 42: 75–94, doi: 10.1007/s00726-010-0633-0.
- Scheid T, Bosco LD, Guedes RP, Pavanato MA, Belló-Klein A, Partata WA. Sciatic nerve transection modulates oxidative parameters in spinal and supraspinal regions. *Neurochem Res* 2013; 38: 935–942, doi: 10.1007/s11064-013-1000-9.

## **5.2 Artigo 2**

Este artigo mostra os efeitos da NAC sobre os hidroperóxidos lipídicos, o conteúdo de ácido ascórbico e a TAC em medula lombossacral de ratos com CCI. O artigo está aceito pelo periódico *Brazilian Journal of Medical and Biology Research*.

**Brazilian Journal of Medical and Biological Research** <  
[bjournal@terra.com.br@manuscriptcentral.com](mailto:bjournal@terra.com.br@manuscriptcentral.com)>

10 de jul (Há 2  
dias)

para mim, deia.horst, jeh.araujo.sou., mahquevedo, anapkr, carolinakolberg, mim

10-Jul-2017

Prezada Dra. Wania Partata,

Temos a satisfação de informar que seu manuscrito "6533.R1 - Effects of N-acetylcysteine on spinal-cord oxidative-stress biomarkers in rats with neuropathic pain" foi aceito quanto ao mérito científico para publicação no Brazilian Journal of Medical and Biological Research.

O processo de publicação do trabalho depende do pagamento de "Publication Charge", e para tanto precisamos das informações abaixo, o mais rapidamente possível.

Para emissão do Boleto Bancário e da Nota Fiscal Eletrônica, precisamos que V.Sa. informe com urgência e clareza, via email ([bjournal@terra.com.br](mailto:bjournal@terra.com.br)):

1. Em nome de quem devera ser emitido o Boleto Bancário e a Nota Fiscal Eletrônica. Ambos os documentos serão remetidos conjuntamente a V.Sa., via email. Certifique-se bem antes de fornecer estes dados pois depois de emitida, a Nota Fiscal Eletrônica NÃO poderá ser refeita com outro nome ou instituição.
2. O CNPJ (Pessoa Jurídica) ou o CPF (Pessoa Física) pois e exigência obrigatória para emissão da Nota Fiscal Eletrônica.
3. Usualmente são fixados 15 dias para o pagamento do boleto. Caso V.Sa. necessite de um prazo maior, informe na hora em que enviar os dados.
4. Para qual endereço deverão ser remetidos os documentos.
5. O Boleto Bancário e a Nota Fiscal Eletrônica, com os dados fornecidos, deve ser pago na data de vencimento. Caso isto não ocorra ja existe uma multa inserida no boleto que devera ser paga por conta do interessado pois NAO SERA POSSIVEL FAZER CANCELAMENTO OU SUBSTITUICAO DE NENHUM DESTES DOCUMENTOS. Esta medida foi adotada por exigências de órgãos financiadores (Fapesp, CNPq, Capes, Universidades federais, estaduais, etc.).

**IMPORTANTE:** Informamos que o trabalho será verificado e preparado pelo Editor de Estilo e o texto corrigido e eventuais questões serão enviadas a V.Sa. via e-mail. A DATA DE ACEITACAO DEFINITIVA SERA INSERIDA NO TEXTO SOMENTE APÓS o pagamento da Publication Charge e APÓS a devolução do texto corrigido pelo Editor de Estilo. Atrasos eventuais serão descontados da data de submissão do trabalho. Neste momento será providenciada a preparação da Prova Gráfica que será lida pela Redatora da revista e enviada para aprovação dos autores.

Estamos a disposição para esclarecer qualquer questão adicional, através do e-mail ([bjournal@terra.com.br](mailto:bjournal@terra.com.br)) ou telefone 16-3630-2778 (Sr. Reinaldo).

Contamos com sua compreensão e colaboração. **POR FAVOR ACUSE O RECEBIMENTO DESTE EMAIL.**

Atenciosamente,

Dr. Joao Leite  
Editor

**Effects of N-acetylcysteine on spinal-cord oxidative-stress biomarkers in rats with neuropathic pain**

Journal:	<i>Brazilian Journal of Medical and Biological Research</i>
Manuscript ID:	6533.R1
Manuscript Type:	Full Paper
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Horst, Andrea; Universidade Federal do Rio Grande do Sul Souza, Jessica; Universidade Federal do Rio Grande do Sul Santos, Maria do Carmo; Universidade Federal do Rio Grande do Sul Riffel, Ana Paula; Universidade Federal do Rio Grande do Sul Kolberg, Carolina; Universidade Federal do Rio Grande do Sul Partata, Wania; Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Fisiologia
Keywords:	Lipid hydroperoxides, Total antioxidant capacity, Ascorbic acid, Chronic constriction injury, Antinociception
Special Sections:	Biomedical Sciences/Neurosciences and Behavior

**Effects of N-acetylcysteine on spinal-cord oxidative-stress biomarkers in rats with neuropathic pain**

Andréa Horst<sup>1,2</sup>, Jéssica A. de Souza<sup>1</sup>, Maria do Carmo Q. Santos<sup>1</sup>, Ana Paula K. Riffel<sup>1</sup>, Carolina Kolberg<sup>1</sup>, Wania A. Partata<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Neurobiologia Comparada, Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, Brazil.

<sup>2</sup>Univates, Lajeado, RS, Brazil.

**Running Title:** NAC affects oxidant markers in spinal cord of rat with CCI

Correspondence: Andrea Horst

Departamento de Fisiologia

Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS

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

Tel.: +55 51 3308 3305; fax: +55 51 3308 3166

E-mail: [deja.horst@gmail.com](mailto:deja.horst@gmail.com)

**Abstract**

N-acetylcysteine (NAC) inhibits nociceptive transmission. This effect has been associated partly with its antioxidant properties. However, it is unknown the effect of nac on the levels of lipid hydroperoxides (a pro-oxidant marker), content of ascorbic acid (a key antioxidant molecule of nervous tissue) and total antioxidant capacity (tac). Thus, our study assessed these parameters in the lumbosacral spinal cord of rats with chronic constriction injury (CCI) of the sciatic nerve, one of the most commonly employed animal models of neuropathic pain. Thirty-six male Wistar rats were divided equally into the following groups: Naive (rats did not undergo surgical manipulation); Sham (rats in which all surgical procedures involved in CCI were used except the ligature), and CCI (rats in which four ligatures were tied loosely around the right common sciatic nerve), which received intraperitoneal injections of NAC ( $150 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$ ) or saline beginning 4 h after surgery. Rats were killed 1, 3, and 7 days after surgery. NAC treatment prevented the CCI-induced increase in lipid-hydroperoxide levels only at day 1, although the amount was higher than that found in naive rats. NAC treatment also prevented the CCI-induced increase in ascorbic-acid content, which occurred at days 1, 3 and 7. No significant change was found in TAC with NAC treatment. The changes observed here may be related to the antinociceptive effect of NAC because modulation of oxidative-stress parameters appears to present an opportunity to help to normalize the spinal-cord oxidative status altered by pain.

**Key words:** Lipid hydroperoxides; Total antioxidant capacity; Ascorbic acid; Chronic constriction injury; Antinociception



## Introduction

Neuropathic pain, which is caused by a lesion or disease of the somatosensory system, has high clinical incidence (7–10% of the general population) and seriously affects the quality of life of patients (1). The pathophysiological mechanisms of neuropathic pain are not fully understood (1,2,3), and the lack of effective analgesics has impelled a continuing search to find novel molecules that have beneficial effects in the management of neuropathic pain.

N-acetylcysteine (NAC) is a well-tolerated and safe medication that has been used for several decades as a mucolytic agent and for the treatment of numerous disorders such as acetaminophen intoxication (4,5). It has been demonstrated that NAC has neuroprotective roles (6) and inhibits nociceptive transmission in humans and mice (7). This molecule also induces antinociception in rats with chronic constriction injury (CCI) of the sciatic nerve (8,9,10). Rats with CCI are one of the most commonly employed animal models of neuropathic pain; CCI simulates the symptoms of chronic nerve compression, which correspond to causalgia or complex regional pain syndrome in human patients (11).

The mechanisms responsible for the beneficial effects of NAC have been associated partly with its antioxidant properties. NAC is a cysteine pro-drug and glutathione (GSH) precursor (4,5). GSH is a protective agent and detoxifies reactive oxygen species (ROS) both enzymatically and nonenzymatically (12). NAC has also a direct role in scavenging reactive oxygen species (ROS) in neurons (6). This scavenging of ROS appears to present an opportunity to help to normalize the oxidative status altered by neuropathic pain, because ROS such as superoxide radicals, hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) and nitric oxide play an important role in the pathogenesis of neuropathic pain (8,9,10,13). In rats with CCI, NAC treatment reduced nitric oxide metabolites and increased the activity of antioxidant enzymes such as glutathione-s-transferase and glutathione peroxidase in spinal cord (9).

The main action site for ROS in neuropathic pain is the spinal cord (14), which is part of the central nervous system (CNS). The CNS has large amounts of polyunsaturated fatty acids, and damage to lipids, i.e. lipid peroxidation, caused by ROS, is a very common event, especially when there is oxidative stress. Oxidative stress may be defined as an excessive amount of ROS, which is the net result of an imbalance between production and destruction of these species (15). A complex antioxidant-defense system exists to reduce the damage from ROS. One important antioxidant molecule of the CNS is ascorbic acid, which is involved in the first line of antioxidant defense, protecting lipid membranes and proteins from oxidative damage. When ascorbic acid carries out its antioxidant activity, it is oxidized; the reduction of the oxidized form is an enzymatic reaction, which may be glutathione-dependent (16).

Since neuropathic pain increases ROS (8,9,10,13) and NAC is a precursor of GSH (4,5), we postulated that NAC treatment would change the levels of lipid hydroperoxides and ascorbic acid in the lumbosacral spinal cord from CCI rats, the region where most afferent fibers of the sciatic nerve enter. Thus, our study assessed the effect of intraperitoneal administration of NAC ( $150 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$ ), given for 1, 3 and 7 days, on the lipid-hydroperoxide and ascorbic-acid levels in the lumbosacral spinal cord of rats with CCI. Since oxidative stress has also been determined by the measurements of a decrease in total antioxidant capacity (tac) (13), we also assessed this parameter in spinal cord of the rats with cci. We think that this measurement is important because nac has an antioxidant action as discussed above.

The dose of nac ( $150 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$ ) was chosen because it showed antinociceptive effect in rats with cci (9,10). The time of study (1, 3 and 7 days) was chosen because these time points were also studied in our previous study with nac treatment (10). This study also demonstrated by electronic von frey test that responses to light mechanical stimulation were

decreased in rats with cci. Since this decrease is a typical sign of allodynia, which is defined as pain resulting from an innocuous stimulation (3), and the tissue homogenates used in the present study were obtained from rats those study (10), it should be mentioned that the rats with cci of the present study showed nociceptive signs after cci. The study also showed that nac treatment, in the same dose used in the present study, induced antinociception in rats with cci. Nac-treated rats showed an improvement of 133% in the mechanical threshold at day 3. At 7 days after cci, the mechanical threshold was similar to the pre-nerve lesion level (10). Thus, the rats of the present study reproduced classical symptoms of allodynia, which were reverted after nac treatment.

## **Material and methods**

### **Animals**

All animal procedures were approved by the Animal Ethics Committee of the Federal University of Rio Grande do Sul (#23407). Adult male Wistar rats, weighing 200–300 g, were divided into three experimental groups (Naive, Sham and CCI), and each one was further divided into two subgroups (n=6 in each subgroup), which received NAC (Fluimucil<sup>®</sup>, Zambon Laboratórios Farmacêuticos Ltda., Indianópolis, São Paulo, Brazil) at a dose of 150 mg·kg<sup>-1</sup>·day<sup>-1</sup> or 0.9% saline solution, intraperitoneally, for 1, 3 or 7 d. The administration started on the day of surgery (beginning 4 h after recovery from anesthesia) and was performed daily at 5 pm by the same researcher (9,10). Rats were not anesthetized for the injections.

### **Induction of chronic constriction injury (CCI)**

CCI was performed based on the procedure described by Bennett and Xie (17), with slight modifications according to Horst et al. (9,10). After anesthesia (90 mg/kg ketamine and 10 mg/kg xylazine), the right common sciatic nerve was exposed via a mid-thigh incision. Proximal to the sciatic trifurcation, the nerve was freed of adhering tissue for about 7 mm, and four ligatures (4.0 Shalon Chromic Catgut) were tied loosely around it, with a 1.0-1.5 mm interval between each ligature. After nerve ligation, the muscle and skin layer was immediately sutured with thread and a topical antibiotic applied. To expose the sciatic nerve in sham rats, all surgical procedures involved in CCI were used except the ligature.

### **Sample preparation**

Rats were killed by decapitation and their lumbosacral spinal cord was promptly dissected out, homogenized in 1.15% KCl diluted 1:5 (w/v) containing 1 mmol·L<sup>-1</sup> phenylmethylsulfonyl fluoride, centrifuged at 1000 x g for 20 min at 4° C, and the supernatant used for assays of lipid hydroperoxides and ascorbic-acid levels and TAC.

### **Determination of lipid hydroperoxides levels**

The lipid hydroperoxides were measured by oxidation of Fe<sup>2+</sup> by LOOH in an acid medium containing xylenol orange dye, which forms a complex with Fe<sup>3+</sup>, as described by Jiang et al. (18). Results are expressed in nmol · mg protein<sup>-1</sup>.

### **Determination of ascorbic acid levels**

Ascorbic acid (AA) content was determined according to method described by Roe and Kuether (19). The assay mixture contained 0.3 mL homogenate treated with charcoal and filtered, 0.01 mL 10 % thiourea and 0.075 mL 2 % DNPH and was incubated at 37° C for 3 h. Following this, color was produced by adding 0.375 mL 85% sulfuric acid and the absorbance was read at 540 nm. Standard curve was prepared by using different concentration of AA and slope was used to express amount of AA as  $\mu\text{mol of AA} \cdot \text{mg protein}^{-1}$ .

### **Determination of TAC**

The TAC was determined with 2,2-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid radical cation (ABTS<sup>\*+</sup>), which in an acid medium is decolorized by antioxidants, according to their concentration and antioxidant capacity (20). Results are expressed in  $\text{mmol} \cdot \text{eq trolox} \cdot \text{g tissue}^{-1}$ .

### **Protein measurement**

Protein was measured by the method of Lowry et al. (21), using bovine serum albumin as the standard.

## Statistical analysis

The results were analyzed using three-way ANOVA (factors: lesion, treatment and time) followed by Tukey post-hoc test. Differences were considered statistically significant when  $p < 0.05$ .

## Results

After CCI, the lipid-hydroperoxide levels increased in the spinal cord at day 1. While the increase was 823% in the spinal cord from saline-treated CCI rats, the increase was only 142% in the NAC-treated CCI rats, compared to naive rats (Figure 1A), showing that the NAC treatment sharply reduced the CCI-induced increase in lipid hydroperoxides at this time point. At postoperative days 3 and 7, the lipid-hydroperoxide levels were still increased (180%) in the spinal cord of CCI rats compared to naive rats, but the levels were similar between saline- and NAC-treated CCI rats (Figure 1B and C). Lipid hydroperoxides also increased in the spinal cord from saline- and NAC-treated sham rats, compared to naive rats (180%), at all time points. The lipid-hydroperoxide level showed no significant change in the spinal cord of naive rats.

CCI induced a significant increase in the ascorbic-acid content in the spinal cord of rats that received saline. The increase was 137% and 53% at days 1 and 3, respectively, compared to naive rats (Figure 2A and B). No significant change was found in the levels of ascorbic acid in the spinal cord from CCI rats treated with saline for 7 days (Figure 2C). However, the ascorbic-acid level increased by around no significant change occurred in ascorbic-acid levels in the spinal cord from nac- treated cci rats at all time points (Figure 2a, b and c). In nac-treated cci rats the ascorbic acid content was similar to that found in

saline- and nac-treated naive rats. This similarity suggests that nac treatment prevented a cci-induced increase in ascorbic-acid content. 31% in these rats compared to naive rats. No significant change was found in the ascorbic-acid levels of naive and sham rats treated with NAC or saline for 1, 3 and 7 days.

The TAC did not show significant changes in the spinal cord from saline- and NAC-treated CCI rats at days 1 and 3 (Figure 3A and B). At day 7, the NAC treatment did not produce a significant change in TAC of the spinal cord from CCI rats, but saline-treated CCI rats showed a significant decrease (11%) in this parameter (Figure 3C). No significant change was found in TAC in the spinal cord from sham and naive rats.

## **Discussion**

Neuropathic pain is a disease of global burden and its prevalence has been estimated to be in the range of 7-10% (1,3). It is suggested that the incidence of neuropathic pain is likely to increase owing to the ageing global population, increased incidence of diabetes mellitus and improved survival from cancer after chemotherapy (1). Diabetic polyneuropathy and neuropathies associated with chronic low back pain are the most frequent causes of neuropathic pain (3). Numerous therapeutic recommendations for neuropathic pain have been proposed (pregabalin, gabapentin duloxetine and various tricyclic antidepressants), but most of these treatments have moderate efficacy based on the number needed to treat the patient (1). Thus, it is important to found new compounds that may be used to treat neuropathic pain.

Our results showed that NAC treatment prevented the early CCI-induced increase in lipid-hydroperoxide levels of the lumbosacral spinal cord, without changing the levels of ascorbic acid and TAC in this tissue, which were increased and decreased, respectively,

after CCI, one of the most commonly employed animal models of neuropathic pain (11). The high spinal-cord lipid-hydroperoxide levels from saline-treated CCI rats at day 1 may be related to an increase in CCI-induced ROS formation. A recent study showed that superoxide-anion generation (SAG) increased by around 40% in the spinal cord of CCI rats treated with saline for 1, 3 and 7 days (10). In the central nervous system, damage to lipids is a very common event caused by ROS, due to the large amounts of polyunsaturated fatty acids (15). Thus, the increase in SAG may have contributed to the elevation in lipid-hydroperoxide levels in the spinal cord after CCI. The lower formation of lipid hydroperoxides in the spinal cord from saline-treated CCI rats at days 3 and 7 may be related to mobilization of antioxidant systems. Catalase, an antioxidant enzyme that catalyzes the breakdown of  $H_2O_2$  to  $H_2O$  and  $O_2$  (20), increases its activity in the spinal cord 3 and 10 days after CCI (22).

NAC treatment, in turn, prevented an accentuated increase in lipid hydroperoxides in the spinal cord from CCI rats at day 1. Lipids are important targets of ROS, as described above. The reduction in lipid-hydroperoxide formation suggests that ROS decreased after the NAC treatment. NAC is a precursor of GSH, an important intracellular antioxidant (4,5,12), and NAC can directly scavenge ROS in neurons (6). These antioxidant actions of NAC may contribute to decrease ROS in the spinal cord. This reduction could lead to less lipid peroxidation, which may explain the decrease in lipid-hydroperoxide levels in the spinal cord from NAC-treated CCI rats after 1 day. Another explanation may be the NAC action on calcium influx. NAC has a protective role in calcium influx, through transient receptor potential melastatin-like 2 (TRPM2) channels (6). According to Sözbir and Nazıroğlu (6), dorsal root-ganglion neurons exhibit TRPM2 channel-dependent ROS generation and calcium influx in neuropathic pain. Thus, it is necessary to consider that the preventive NAC action on lipid peroxidation may be related to its action on calcium influx



through TRPM2 channels. The antioxidant action of NAC for 3 and 7 days of treatment may also help to maintain the levels of lipid hydroperoxides similar to that found at day 1.

Interestingly, lipid hydroperoxides were still significantly increased in the spinal cord of NAC-treated CCI rats at days 3 and 7 compared to naive rats; and the levels were similar to those found in saline-treated CCI rats. Excessive ROS formation needs to be corrected only to prevent the accumulation of oxidative damage, and a slight pro-oxidative balance is necessary for optimal cell-signaling processes (23). Thus, it is probable that the elevated lipid-hydroperoxide levels in the spinal cord from saline- and NAC-treated CCI rats are related to maintenance of necessary conditions for cell-signaling processes. Lipid peroxidation is essential for phospholipase C activity and the inositol-triphosphate-related calcium signal (14), which are signaling mechanisms activated when different molecules exert their nociceptive (1,2,3) and antinociceptive (24) actions.

The lipid-hydroperoxide levels were also elevated in the spinal cord of saline- and NAC-treated sham rats for 1, 3 and 7 days. This increase may be related to surgery-induced ROS formation. These rats were submitted to the procedures involving manipulation of deep tissues, such as muscles and adjacent connective tissue, which induce pain (25). Thus, the higher lipid-hydroperoxide levels in the spinal cord from sham rats may also be related to actions of these molecules discussed above. The difference found in the spinal cord from sham and CCI rats that received saline for 1 day might be related to neuronal sensitization, a key mechanism in the pathology of neuropathic pain. According to Goecks et al. (22), the differences in oxidative-stress parameters between sham and CCI rats could be related to different degrees of sensitization of the nervous tissue in these groups of rats.

In our study, while ascorbic-acid levels increased in the spinal cord of the saline-treated CCI rats for 1, 3 and 7 days, NAC treatment prevented an increase in this tissue at these

time points. This difference may be related to the roles described for ascorbic acid in nervous tissue. In this tissue, ascorbic acid acts as an important antioxidant molecule, a neuromodulator of synaptic activity, and it functions in the metabolic switch of the neurons during brain activity and resting conditions, having its levels increased in response to brain activity (16). Accumulating evidence from diverse animal models of neuropathic pain suggests that neuropathic pain might involve aberrant excitability in the dorsal horn, resulting from multiple functional alterations including increases in the release of glutamate and other neurotransmitters, as well as in ROS formation; loss of function of inhibitory interneurons; and multiple alterations in glial and immune cells of the CNS (1,2,3,26,27,28). Since CCI is a model of neuropathic pain (11), these changes probably occurred in the spinal cord of rats with CCI. Thus, it is probable that the increase in ascorbic-acid levels may be related to CCI-induced changes in the spinal cord from saline-treated CCI rats. Neurons are highly sensitive to oxidative damage, and mechanisms to maintain antioxidant activity are required during physiological activities such as recycling and release of ascorbic acid by astrocytes (16).

NAC treatment prevented the increase in ascorbic acid content. Since nac is a precursor of gsh (4,5), the restoration of intracellular gsh levels may be related to the effect of nac on ascorbic acid content. NAC causes the activity of the l-cystine/l-glutamate membrane exchanger, which is one source of intracellular l-cysteine required for the synthesis of gsh (29,30). These authors showed that the activity of the l-cystine/l-glutamate membrane exchanger reduced after CCI. In addition, protracted oxidative stress and diminished antioxidant defenses are associated with gsh oxidation and depletion (12), a phenomenon observed in diabetic neuropathic pain (6) and CCI-induced neuropathic pain (31). Thus, nac-induced restoration in gsh might explain the lack of a significant increase in ascorbic-acid levels in the spinal cord of the CCI rats that received nac treatment. Despite our study

did not assess GSH levels, our results stress the need to assess this parameter for better understanding of the relation between GSH and changes in lipid hydroperoxides and ascorbic acid.

Since nac is a precursor of GSH (4,5), it appears important to determine if NAC treatment increase antioxidant defenses in spinal cord. According to poljsak et al. (23), the balance between ros and antioxidants is necessary, because both extremes, oxidative and antioxidative stress, are damaging. TAC showed no significant change in the spinal cord from cci rats after nac treatment. This may be related to tight control of intracellular conditions when there is antioxidant supplementation. Thus, the TAC result may be indicating that the nac treatment appears not to disrupt the well-integrated antioxidant defense networks.

However, TAC decreased in the spinal cord from saline-treated CCI rats at day 7. It has been demonstrated that TAC represent the enzymatic and non-enzymatic antioxidant compounds in the body such as superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and GSH (32,33). Some of these antioxidant parameters are reduced in neuropathic pain (6,22,31), while other as catalase activity increase after CCI (22). Nitroxidative species (ROS, reactive nitrogen species and their products) can directly increase the excitability of nociceptive neurons (34). The interrelated changes in pro-oxidant and antioxidant defenses may be related to lack of significant changes in TAC at days 1 and 3 and the significant decrease in this parameter at day 7. However, antioxidant depletion does not necessarily mean that oxidative damage has taken place; it might simply mean that the defense mechanisms have removed ros and protected the system (15). Since ROS are involved in the pathogenesis of neuropathic pain (6,7,8,9, 10,13,19,22,25,27,28,34), it may be suggested that the increase in ROS may be related to a decrease in TAC in the spinal cord of saline-treated CCI rats.

The lack of significant changes in ascorbic-acid levels and TAC in the spinal cord of the sham rats may be related to differences in the degree of central sensitization in sham and CCI rats, as suggested above. According to Goecks et al. (22), CCI injury, differently from the sham condition, probably mobilizes the antioxidant system to a greater degree, in order to prevent the establishment of an oxidative-stress situation, given the greater excitation of central sensory neurons.

In conclusion, our study provided evidence that NAC treatment prevents the early CCI-induced increase in lipid hydroperoxide levels of the lumbosacral spinal cord while prevented the rise of ascorbic-acid content, and the decrease of TAC in later stages. Since NAC has an antinociceptive effect in rats with CCI as showed in our previous study (10), the changes observed here may be related to this effect of NAC because modulation of oxidative-stress parameters appears to present an opportunity to help to normalize the spinal-cord oxidative status altered by pain.

### **Acknowledgements**

This work was supported by grants from the Fundação de Amparo à Pesquisa do estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

## References

1. Colloca L, Ludman T, Bouhassira D, Baron R, Dickenson AH, Yarnitsky D, et al. Neuropathic pain. *Nat Rev Dis Primers* 2017; 16: 17002.
2. Das V. An introduction to pain pathways and pain “targets”. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2015; 131: 1-30.
3. Nickel FT, Seifert F, Lanz S, Maihöfner C. Mechanisms of neuropathic pain. *Eur Neuropsychopharmacol* 2012; 22: 81-91.
4. Dhouib IE, Jallouli M, Annabi A, Gharbi N, Elfazaa S, Lasram MM. A minireview on N-acetylcysteine: An old drug with new approaches. *Life Sci* 2016; 151: 359-363.
5. Samuni Y, Goldstein S, Dean OM, Berk M. The chemistry and biological activities of N-acetylcysteine. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1830: 4117–4129.
6. Sözbir E, Nazıroğlu M. Diabetes enhances oxidative stress-induced TRPM2 channel activity and its control by N-acetylcysteine in rat dorsal root ganglion and brain. *Metab Brain Dis* 2016; 31: 385–393.
7. Truini A, Piroso S, Pasquale E, Notartomaso S, Di Stefano G, Lattanzi R, et al. N-acetyl-cysteine, a drug that enhances the endogenous activation of group-II metabotropic glutamate receptors, inhibits nociceptive transmission in humans. *Mol Pain* 2015;11:14.
8. Naik AK, Tandan SK, Dudhgaonka SP, Jadhav SH, Kataria M, Prakash VR, et al. Role of oxidative stress in pathophysiology of peripheral neuropathy and modulation by N-acetyl-l-cysteine in rats. *Eur J Pain* 2006; 10: 573–579.
9. Horst A, Kolberg C, Moraes MS, Finamor IA, Belló-Klein A, Pavanato MA, et al. Effect of N-acetylcysteine on the spinal-cord glutathione system and nitric-oxide metabolites in rats with neuropathic pain. *Neurosc Lett* 2014; 569: 163-168.
10. Horst A, de Souza JA, Santos MC, Riffel AP, Kolberg C, Ribeiro MF, et al. N-acetylcysteine downregulates phosphorylated p-38 expression but does not reverse the increased superoxide anion levels in the spinal cord of rats with neuropathic pain. *Braz J Med Biol Res.* 2017; 50: e5801.
11. Jaggi AS, Jain V, Singh N. Animal models of neuropathic pain. *Fundam Clin Pharmacol* 2011; 25: 1-28.
12. Robaczewska J, Kedziora-kornatowska K, Kozakiewicz M, Zary-Sikorska E, Pawluk H, Pawliszak W, et al. Role of glutathione metabolism and glutathione-related Antioxidant defense systems in hypertension. *J Physiol Pharmacol* 2016; 67: 331–337.

13. Riffel AP, de Souza JA, Santos M C, Horst A, Scheid T, Kolberg C, et al. Systemic administration of vitamins C and E attenuates nociception induced by chronic constriction injury of the sciatic nerve in rats. *Brain Res Bull* 2016; 121: 169-177.
14. Kim HY, Lee I, Chun S W, Kim HK. Reactive oxygen species donors increase the responsiveness of dorsal horn neurons and induce mechanical hyperalgesia in rats. *Neural Plast* 2015; 2015.
15. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4<sup>th</sup> ed. New York: Oxford University; 2010.
16. Covarrubias-Pinto A, Acuña AI, Beltrán FA, Torres-Díaz L, Castro MA. Old Things New View: Ascorbic acid protects the brain in neurodegenerative disorders. *Int J Mol Sci* 2015; 16: 28194-28217.
17. Bennett GJ, Xie YK. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 1988; 33: 87-107.
18. Jiang ZY, Woollard ACS, Wolff SP. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe<sup>+2</sup> in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids* 1991; 26: 853-856.
19. Roe JH, Kuether CA. The determination of ascorbic acid in whole blood and urine through the 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative of dehydroascorbic acid. *J Biol Chem* 1943; 147: 399-407.
20. Erel, O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem* 2004; 37: 277-285.
- 21- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
22. Goecks CSB, Horst A, Moraes MS, Scheid T, Kolberg C, Bello-Klein A, et al. Assessment of oxidative parameters in rat spinal cord after chronic constriction of the sciatic nerve. *Neurochem Res* 2012; 37: 1952-1958.
23. Poljsak B, Suput D, Milisav I. Achieving the balance between ROS and antioxidants: when use the synthetic antioxidants. *Oxid Med Cell Longev* 2013; 2013: 1-11.
24. Chiou LC, Hu SS, Ho YC. Targeting the cannabinoid system for pain relief? *Acta Anaesthesiol Taiwan* 2013; 51: 161-170.
25. Scheid T, Bosco LD, Guedes RP, Pavanato MA, Bello-Klein A, Partata WA. Sciatic nerve transection modulates oxidative parameters in spinal and supraspinal regions. *Neurochem Res* 2013; 38: 935-942.

26. Tsuda M. Microglia in the spinal cord and neuropathic pain. *J Diabetes Investig* 2016; 7:17-26.
27. Salvemini D, Little JW, Doyle T, Neumann WL. Roles of reactive oxygen and nitrogen species in pain. *Free Radic Biol Med* 2011; 51: 951–966.
28. Geis C, Geuss E, Claudia Sommer C, Schmidt HHHW, Kleinschnitz C. NOX4 is an early initiator of neuropathic pain. *Exp Neurol* 2017; 288: 94-103.
29. Bernabucci M, Notartomaso S, Zappulla C, Fazio F, Cannella M, M. Motolese M, et al. N-acetylcysteine causes analgesia by reinforcing the endogenous activation of type-2 metabotropic glutamate receptors. *Molecular Pain* 2012; 8: 77.
30. Bridges RJ, Natale NR, Patel SA. System xc(-) cystine/glutamate antiporter: an update on molecular pharmacology and roles within the CNS. *Br J Pharmacol* 2012; 165: 20-34.
31. Bhat RA, Lingaraju MC, Pathak NN, Kalra J, Kumar D, Tandan Sk. Effect of ursolic acid in attenuating chronic constriction injury-induced neuropathic pain in rats. *Fundam Clin Pharmacol* 2016; 6: 517–528.
32. Şahin A, Erten S, Altunoğlu A, Işıkoğlu S, Neşelioğlu S, Ergin M. Comparison of serum oxidant and antioxidant parameters in familial mediterranean fever patients with attack free period. *Acta Reumatol Port* 2014; 39: 316-321.
33. Saygili EI, Aksoy SN, Gurler B, Aksoy A, Erel O, Ozaslan M. Oxidant/Antioxidant status of patients with diabetic and senile cataract. *Biotechnol Biotechnol Eq* 2010; 24: 1648-1652.
34. Grace PM, Gaudet AD, Staikopoulos V, Maier SF, Hutchinson MR, Salvemini D. Nitroxidative signaling mechanisms in pathological pain. *Trends Neurosci* 2016; 39: 862-879.

## Figure Legends

**Figure 1.** Lipid hydroperoxide levels in the spinal cord of rats treated with N-acetylcysteine (NAC) ( $150 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$ ) or saline administered intraperitoneally for 1 (A), 3 (B) and 7 (C) days ( $n= 6$  animals/group). Data represent the means  $\pm$  SEM. \* indicates significant difference compared to other groups. # indicates significant difference compared to naive group (Three-way ANOVA followed by Tukey post-hoc test,  $P<0.05$ ). In Sham rats all surgical procedures involved in the CCI were used except the ligature.

**Figure 2.** Ascorbic acid levels in the spinal cord of rats treated with N-acetylcysteine (NAC) ( $150 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$ ) or saline administered intraperitoneally for 1 (A), 3 (B) and 7 (C) days ( $n= 6$  animals/group). Data represent the means  $\pm$  SEM. \* indicates significant difference compared to other groups. # indicates significant difference compared to naive group (Three-way ANOVA followed by Tukey post-hoc test,  $P<0.05$ ). In Sham rats all surgical procedures involved in the CCI were used except the ligature.

**Figure 3.** Total antioxidant capacity (TAC) in the spinal cord of rats treated with N-acetylcysteine (NAC) ( $150 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$ ) or saline administered intraperitoneally for 1 (A), 3 (B) and 7 (C) days ( $n= 6$  animals/group). Data represent the means  $\pm$  SEM. # indicates significant difference compared to naive group (Three-way ANOVA followed by Tukey post-hoc test,  $P<0.05$ ). In Sham rats all surgical procedures involved in the CCI were used except the ligature.



Figure 1

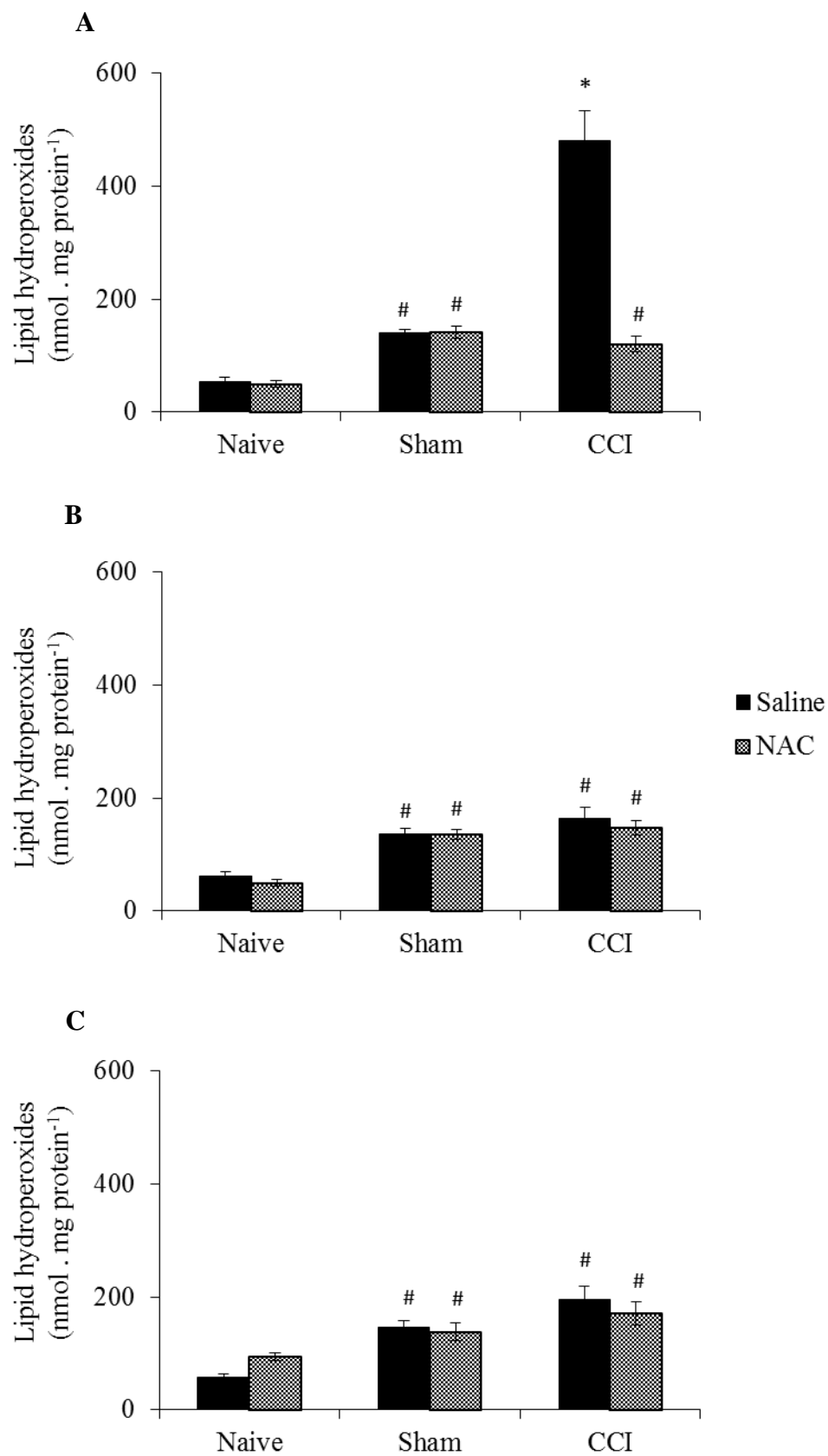


Figure 2

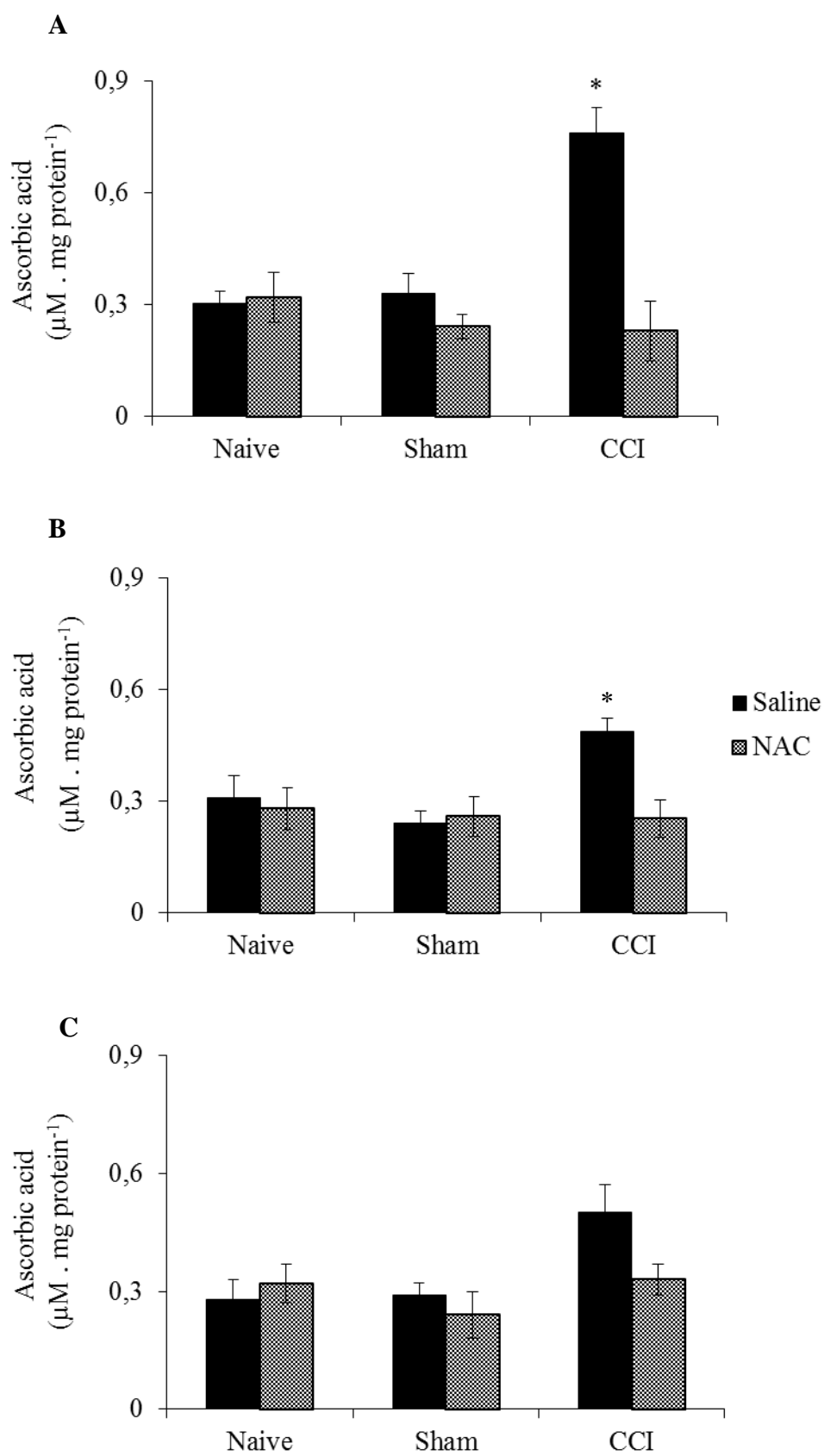
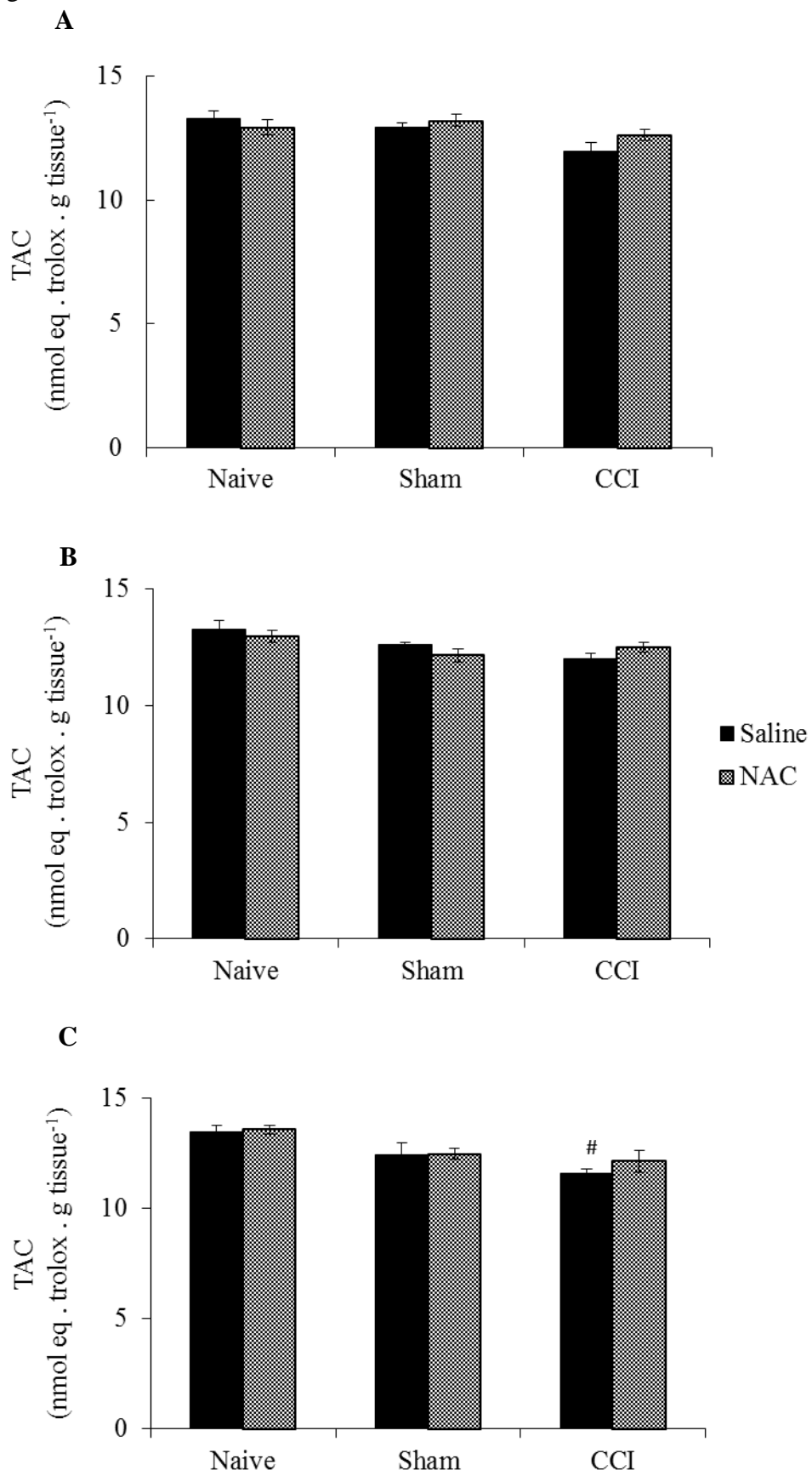


Figure 3



### **5.3 Artigo 3**

Este artigo mostra os efeitos da administração de NAC sobre a distribuição da reatividade a enzima NADPH-diaforase e imunorreatividade a p-38, bem como a quantificação do mRNA do NFκB em medula espinal lombossacral de ratos com dor neuropática. O artigo ainda está em redação.

**Effects of N-acetylcysteine on NADPH-diaphorase histochemistry and p38 immunoreactivity and NFκB mRNA levels in spinal cord of rats with neuropathic pain**

Andréa Horst<sup>1,2</sup>, Jéssica A. de Souza<sup>1</sup>, Maria do Carmo Q. Santos<sup>1</sup>, Ana Paula K. Riffel<sup>1</sup>, Adriane Pozzobon<sup>2</sup>, Paula Rigon da L. Soster<sup>3</sup>, Carolina Kolberg<sup>1</sup>, Luciano S. De Fraga<sup>1</sup>, Wania A. Partata<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Neurobiologia Comparada, Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, Brazil.

<sup>2</sup>Universidade do Vale do Taquari: Univates, Lajeado, RS, Brazil.

<sup>3</sup>Departamento de Ciências Morfológicas, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, Brazil.

**Running Title:** NAC reverses CCI-induced histochemical changes in spinal cord

Correspondence: Andrea Horst

Departamento de Fisiologia

Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS

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

Tel.: +55 51 3308 3305; fax: +55 51 3308 3166

E-mail: deia.horst@gmail.com

**Abstract**

N-acetylcysteine (NAC) shows therapeutic potential for treatment of pain. Nitric oxide (NO), p38 protein and nuclear factor-kappa B (NFκB) play important role in pain processing. Here, we demonstrated the pattern of staining of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-diaphorase (NADPH-d), which correlates with NO synthase enzyme, in lumbosacral spinal cord of rats with chronic constriction injury (CCI) of the sciatic nerve, one of the most commonly employed animal models of neuropathic pain. It was also determined the p38 immunoreactivity and the NFκB mRNA levels in this tissue. Thirty-six male Wistar rats were divided equally into the following groups: Naive (rats did not undergo surgical manipulation); Sham (rats in which all surgical procedures involved in CCI were used except the ligature), and CCI (rats in which four ligatures were tied loosely around the right common sciatic nerve), which received intraperitoneal injections of NAC ( $150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$ ) or saline beginning 4 h after surgery. Rats were killed 1, 3, or 7 days after surgery. At day 3, NAC prevented the increase in the number of NADPH-d labeled neurons in superficial dorsal horn and gray matter around of the central canal, and the increase in NFκB mRNA levels in spinal cord which had been increased by CCI. NAC partially restored the CCI-induced increase in the number of spinal p38-immunoreactive neurons and glia-like cells at days 1, 3 and 7. Altogether, these findings suggest that the analgesic effect of NAC involves NO, p38 and NFκB which plays important roles in the processing of neuropathic pain.

Key words: RT-PCR; Histochemistry; Chronic constriction injury; Sciatic nerve; Antinociception; Dorsal root ganglia

## Introduction

Neuropathic pain, which is defined as pain caused by a lesion or disease of the somatosensory system (1), can be associated with many types of injuries to the nervous system, such as trauma, nerve compression, inflammation, infection, or be a consequence of neurodegenerative diseases, tumor infiltration, surgeries, as well as side effects of drug treatments (1,2). Recently it was suggested that the incidence of neuropathic pain is likely to increase owing to the ageing of global population, increased incidence of diabetes mellitus and improved survival from cancer after chemotherapy (1). However, current treatments have only produced limited relief of the neuropathic pain in a portion of patients (1,2). This appears to be related to complex mechanisms involved in the pathophysiology of neuropathic pain (1).

N-acetylcysteine (NAC), a well-tolerated and safe medication that has been used for several decades as a mucolytic agent and for the treatment of numerous disorders such as acetaminophen intoxication (3), appears to have therapeutic potential for treatment of pain. The NAC administration reduced pain in humans and mice (4). NAC treatment also reduced nociception in rats with chronic constriction injury (CCI) of the sciatic nerve (5,6), one of the most commonly employed animal models of neuropathic pain. CCI simulates the symptoms of chronic nerve compression, which correspond to causalgia or complex regional pain syndrome in human patients (7).

NAC is a cysteine pro-drug and glutathione precursor (3). Glutathione (GSH) is the most abundant intracellular thiol, and the levels of oxidized (GSSG) and reduced GSH besides the GSSG/GSH ratio are important indicators of cell health (8). Take this background into account, we hypothesized that the antinociceptive effect of the NAC could be related to an increased GSSG/GSH ratio in the lumbosacral spinal cord of CCI rats because lumbosacral spinal cord is the region where most afferent fibers of the sciatic

nerve enter. However, in a previous paper, we showed the GSSG/GSH ratio did not change in spinal cord of the CCI rats that received NAC treatment for 3 and 7 days after surgery, although this treatment reduced the levels of nitric oxide (NO) metabolites (5). NO is one of the neurobiological components involved in neuropathic pain, which is generated from L-arginine and oxygen in an enzymatic reaction catalyzed by nitric oxide synthase (NOS) (9). Accordingly to these authors, NOS has three different isoforms: neuronal (nNOS), endothelial (eNOS) and inducible (iNOS). Both nNOS and eNOS isoforms are constitutive with posttranslational regulation whereas iNOS is produced in response to certain stimuli. It has been demonstrated that NAC reduces iNOS (10), but it is still unknown the effect of NAC on the distribution and morphology of nitrergic neurons.

On the other hand, we demonstrated that NAC treatment induces downregulation of phosphorylated p38 protein (p-p38) in lumbosacral spinal cord of NAC-treated CCI rats (6). p38 is one of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) that plays important role in neuropathic pain (11). However, it is still unknown the effect of NAC treatment on distribution of the p38 immunoreactivity in spinal cord of NAC-treated CCI rats. p38 MAPK has numerous direct and indirect interactions with nuclear factor-kappa B (NFκB) (12). NFκB plays a key role in spinal cord (12,13), and this molecule is elevated in neuropathic pain conditions (13). However, it remains unknown the effect of NAC on NFκB mRNA levels in spinal cord of rats with CCI.

Taken account the questions rise above, the present study aimed to demonstrate the effect of intraperitoneal administration of NAC ( $150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$ ) on the distribution and morphology of nitrergic neurons and p38 immunoreactivity in the lumbosacral spinal cord of rats with CCI. It was also determined the effect of NAC on NFκB mRNA levels in this tissue. Nitrergic neurons were identified by using NADPH-d (nicotinamide adenine dinucleotide hydrogen phosphate diaphorase) histochemical staining, which can be used as



a reliable marker to estimate the distribution of NOS enzyme activity in both cell bodies and dendritic process (14). The NF $\kappa$ B mRNA levels were assessed by real time-PCR. Also, NADPH-d was assessed in spinal cord of rats that received treatment for 3 days because this was the time point in which NAC changed NO metabolites in spinal cord from rats with CCI (5). p38 was assessed by immunohistochemistry in ipsilateral dorsal root ganglia of the sciatic nerve and lumbosacral spinal cord of the rats that received treatment for 1, 3 and 7 days. As we have already shown, in these time points NAC downregulated p-p38 protein expression in spinal cord of CCI rats (6). The NF $\kappa$ B mRNA levels were assessed in spinal cord of CCI rats that received treatment for 3 days because the highest expression of spinal-cord p-p38 occurred in this time point in rats with CCI (6). The dose of NAC (150 mg·kg<sup>-1</sup>·day<sup>-1</sup>) was chosen because it showed an antinociceptive effect in rats with CCI (5,6). Antinociceptive effect of NAC has already been assessed in our previous study (5), thus we did not show that data in here.

## **Material and methods**

### **Animals**

All animal procedures were approved by the Animal Care and Use Committee of the Federal University of Rio Grande do Sul (#23407). Adult male Wistar rats, weighing 200–300 g, were divided into three experimental groups (Naive, Sham and CCI), and group was further subdivided into two subgroups (n=6 per subgroup), which received NAC (Fluimucil<sup>®</sup>, Zambon Laboratórios Farmacêuticos Ltda., Indianópolis, São Paulo, Brazil) at a dose of 150 mg·kg<sup>-1</sup>·day<sup>-1</sup> or 0.9% saline solution, intraperitoneally, for 1, 3 or 7 d. The administration started on the day of the surgery (beginning 4h after recovery from

anesthesia) and was performed daily at 5 p.m. by the same researcher (5,6). Rats were not anesthetized for the injections.

### **Induction of chronic constriction injury (CCI)**

CCI was performed based on the procedure described by Bennett and Xie (15), with minor modifications according to Horst et al. (5,6). After anesthesia (90 mg/kg ketamine and 10 mg/kg xylazine), the right common sciatic nerve was exposed via a mid-thigh incision. Proximal to the sciatic trifurcation, the nerve was freed of adhering tissue for about 7 mm, and four ligatures (4.0 Shalon Chromic Catgut) were tied loosely around it, with a 1.0-1.5 mm interval between each ligature. After nerve ligation, the muscle and skin layer was immediately sutured with thread and a topical antibiotic was applied. After CCI, all rats exhibited a decrease in both mechanical and thermal thresholds, as shown in our previous studies (5,6). To expose the sciatic nerve in sham rats, all surgical procedures involved in CCI were used except the ligature.

### **Histochemistry and Immunohistochemistry**

For NADPH-d histochemistry and p38 immunohistochemical procedures the rats were anesthetized (90 mg/kg ketamine and 10 mg/kg xylazine) and after a brief saline flush were perfused intracardially with 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4 (PB). The dorsal root ganglia (DRG) and lumbosacral spinal cord were quickly dissected out, immersed in the same fixative solution for 4 h and then cryoprotected in 15 and 30% sucrose solutions in PB at 4 °C.

NADPH-d histochemistry was performed in spinal cord according to Partata et al. (16). Coronal serial sections (50  $\mu\text{m}$ ) were obtained on a cryostat and collected in cold PB. The free-floating sections were treated with 10 mL PB containing 12  $\mu\text{l}$  Triton X-100 for 10 min and transferred to fresh NADPH-d medium containing 0.5 mg/ml  $\beta$ -NADPH, 0.2 mg/ml nitro blue tetrazolium and 0.2 M PB containing 12  $\mu\text{l}$  Triton X-100. After pre-incubation at room temperature for 5 min under continuous shaking, sections were incubated at 37 °C for 4 h. The reaction was stopped by the addition of excess 0.1 M PB. After, the sections were mounted onto gelatin-coated slides, dehydrated in an ethanol series, cleared, and covered with Entellan (Merck). Control sections were incubated in a reaction medium without substrate.

p38 immunohistochemistry was performed in DRG and spinal cord. These tissues were embedded in paraffin following standard procedures. Coronal serial sections (10  $\mu\text{m}$ ) were obtained on a microtome (Leitz) and mounted onto gelatin-coated slides. After, the sections were treated with 3% hydrogen peroxide in 10% methanol for 30 min and then washed with PB for 30 min. Antigen retrieval was performed by heating the sections (3 x 3 min) immersed in 0.01 M citrate buffer, pH 5.5 utilizing a microwave oven (17). Then, the sections were incubated for 30 min in 3% normal goat serum in PB containing 0.2% Triton X-100 (PB-T). The sections were incubated 24h at 4 °C with a polyclonal anti-p-38 antibody, diluted 1:100 (Sigma). The primary antibody was then removed and the sections washed in PB-T for 30 min. The sections were immersed in a secondary antibody (anti-IgG, Sigma), diluted 1:100 in PB-T, for 1h at room temperature. After washing with PB-T for 30 min, a soluble complex of horseradish peroxidase rabbit anti-horseradish peroxidase diluted 1:500 was applied for 2 h at room temperature. The samples were then washed in PB, incubated in a solution of 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (60 mg/100 mL, Sigma) and 0.005% v/v hydrogen peroxide in PB. After, the sections were dehydrated in

an ethanol series, cleared and covered with Entellan (Merck). Specific immunostaining was abolished when the primary antibody was omitted.

Following NADPH-d histochemistry and p38 immunohistochemistry procedures, the slides were examined and photographed with a Nikon Eclipse E600 microscopy equipped with a Moticam 5.0 MP camera. All images of tissues were captured. The number of NADPH-d reactive cell profiles was counted in a blinded fashion in dorsal superficial horn and gray matter around of the central canal of the spinal cord. Cell sizes were estimated using Nikon Eclipse E600 microscopy. Sections from all experimental groups were run in parallel.

#### **Real time-PCR for NF $\kappa$ B mRNA levels**

Rats were killed by decapitation and their lumbosacral spinal cord was promptly dissected out, homogenized in a 1:5 (w/v) solution of 1.15% KCl containing 1 mmol·L<sup>-1</sup> phenylmethylsulfonyl fluoride, centrifuged at 1000 x g for 20 min at 4° C, and the supernatant used for assay real time-PCR.

**Total RNA extraction:** Samples were processed in a Turrax-like tissue homogenizer (Ultra Stirrer; Stanhope-Seta, Chertsey, Surrey, UK) with TRIzol reagent (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Inc.). The total RNA extraction method by TRIzol was an adaptation from the original method described by Chomczynski and Sacchi (18). Following extraction, the RNA was purified using the RNAspin Mini kit (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, UK) according to the manufacturer's instructions and stored at -80 °C. The concentration and purity of the RNA was assessed by L-Quant spectrophotometer (Loccus Biotecnologia, Cotia, Brazil) at 260 and 280 nm wavelengths. A ratio of ~2.0 was considered appropriate for RNA purity.

**Synthesis of cDNA:** cDNA was synthesized from 1 µg total RNA using the Superscript III First Strand Synthesis System SuperMix (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Inc.) and oligo-dT primers, according to the manufacturer's instructions, and stored at -20 °C.

**Primer design:** The primers used for amplification of cDNA fragments specific for NFκB and Actin were designed from the published sequence of each gene using the online tool Primer3. All primers were synthesized by Invitrogen of Brazil Ltda. Dissociation curve was performed for each primer pair in order to confirm reaction specificity. The melting temperature ( $T_m$ ) is specific to each amplicon. The primer sequences, product length and mean melting temperature of each gene are shown in Table 1.

**The qPCR conditions:** The amplification of cDNA and relative quantification was performed by qPCR with the StepOnePlus Real-Time PCR system (Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific, Inc.). A Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG kit (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Inc.) with a total volume of 25 µl, including 12.5 µl SuperMix, 0.5 µl 50 µmol/l Rox reference dye, 0.3 µl of each primer (10 µmol/l forward and 10 µmol/l reverse), 9.4 µl H<sub>2</sub>O and 2.0 µl 1:20-diluted template cDNA. Duplicate measurements were recorded according to the following protocol: Initial incubation for 2 min at 95 °C, followed by 65 cycles of 30 sec denaturation at 95 °C, 30 sec annealing at 58 °C and 30 sec extension at 72 °C for NFκB and 45 cycles for β-actin. Standard curves were constructed by plotting the cycle threshold values of the qPCR performed on a five-fold dilution series of cDNA standards

## Statistical analysis

The NF $\kappa$ B results were analyzed using two-way ANOVA (factors: lesion and treatment) followed by Tukey post-hoc test. Differences were considered statistically significant when  $p < 0.05$ . The histochemical and immunohistochemical results were qualitatively analyzed.

## Results

### Histochemistry and Immunohistochemistry

In saline- and NAC-treated Naive rats, a strong NADPH-d staining was found in small to medium size neurons (7-15  $\mu$ m) with few noticeable dendrites located in superficial laminae of the dorsal horn (Figure 1A). Larger multipolar or elongated neurons (15-25  $\mu$ m) with clear ramifications were also labelled, but most of them was located in laminae III-VII. Intensely labelled medium to large multipolar neurons (15-30  $\mu$ m) were also found in the gray matter around of the central canal (Figure 2A). In addition, the neuropil in the superficial laminae of the spinal dorsal horn also showed positive staining, and the staining formed a strong blue band in the lamina II (Figures 1A, 2A). NADPH-d reaction showed a similar pattern in spinal cord of Sham rats.

CCI induced changes in the NADPH-d staining in the ipsilateral superficial dorsal horn (Figure 1B). In saline-treated CCI rats, there was an increase in the number of small to medium size strongly labelled neurons (7-15  $\mu$ m) in ipsilateral superficial dorsal horn (Figure 2B). A similar increase was also observed in the superficial laminae of the contralateral spinal dorsal horn. In addition, there was an increase in the number of

strongly stained neurons in the gray matter around of the central canal (Figure 2E). Scarce NADPH-d reactive motor neurons were found in the ventral horn (Figure 1B).

NAC treatment induced a decrease in NADPH-d reaction in CCI rats. In these rats, the number of small to medium size strongly labelled neurons in the superficial laminae was similar to that found in saline- and NAC-treated naive rats (Figure 2C). No difference was detected in the number of NADPH-d neurons of the gray matter around of the central canal (Figure 2F). Scarce reactive motor neurons were still found in the ventral horn (Figure 1C). Sham rats did not show changes in NADPH-d staining of the spinal cord.

In sections from DRG and lumbosacral spinal cord, the p38 antibody produced labeling in the cell cytoplasm. The immunoreactivity appeared as distinct dark brown particles. A consistent labeling pattern was observed for all animals. In DRG of saline- and NAC-treated Naive rats, the p38 immunoreactivity was located in the cytoplasm of few larger (>40  $\mu\text{m}$  in diameter), medium (20-40  $\mu\text{m}$  in diameter), and small (<20  $\mu\text{m}$  in diameter) neurons. Some immunoreactive cells exhibited immunoreaction in the nucleus (Figure 3A). After CCI, there was an increase in the number of p38 immunoreactive cells in DRG of saline-treated rats (Figure 3B,C,E). The immunoreaction was detected mostly in small- to medium-size neurons. Few large neurons exhibited p38 immunoreactivity. The change occurred at days 1, 3 and 7, but the most prominent increase was found at days 3 and 7 (Figure 3C, E). NAC treatment partially prevented the CCI-induced changes in DRG. After treatment, there was a decrease in the number of immunoreactive small to medium-size neurons. In addition, the cytoplasmatic dark brown particles were more scarce in immunoreactive neurons (Figure 3 D, F). Despite immunoreactive neurons were detected at day 1, the number was mostly prominent at days 3 and 7. In NAC-treated CCI rats, some neurons exhibited p38 immunoreactivity in nucleus at days 1, 3 and 7.

In spinal cord of saline- and NAC-treated Naive rats, the p38 immunoreactivity was found in small to medium-size neurons located in both dorsal and ventral horns. The immunoreactive neurons were located bilaterally in spinal cord. In dorsal horn, the immunoreactive neurons were observed in all laminae, but were most numerous in the deeper laminae of the dorsal horn. Immunoreactive small to medium-size neurons were scattered in ventral horn. Some motor neurons showed moderate immunoreaction in its cytoplasm (Figure 4A). No immunoreaction was found in white matter.

After CCI, the number of immunoreactive small- to medium-size neurons increased in dorsal and ventral horns of saline-treated rats (Figure 4B, D). Despite the increase to be bilateral, it was more prominent in ipsilateral side. In dorsal horn, the immunoreactive small- to medium-size neurons were located in superficial and deeper laminae. In ventral horn, immunoreactive small neurons were scattered through this region. A larger number of immunoreactive motor neurons were detected (Figure 4B). Immunoreactive very small cells, which resembled glial cells, were found through all dorsal and ventral horns (Figure 5A, C). These cells occurred in an elevated number through the spinal cord, but they were prominent in superficial dorsal horn. The p38 immunoreactivity was also detected in cells located in white matter. These cells also occurred in an elevated number (Fig 5E). As found for DRG, the most prominent changes occurred at days 3 and 7. In Sham rats, there was an increase in the number of immunoreactive cells, but the number was smaller than that found in saline-treated CCI rats. In addition, the immunoreaction was always weaker in these cells as compared to that found in the spinal cord of the saline-treated CCI rats.

NAC treatment induced a reduction in the number of immunoreactive small- to medium-size neurons scattered to dorsal and ventral horns. Immunoreaction was still detected in many motor neurons (Figure 4C, E). The largest reduction was found in the number of immunoreactive very small cells that resembled glial cells located in dorsal and



ventral horns. Although these cells were still present in these regions, the number of them was smaller than that found in saline-treated CCI rats (Figure 5B, D). There was also a reduction in the number of immunoreactive cells located in the white matter of the spinal cord of NAC-treated CCI rats. In Sham rats, NAC also decreased the number of immunoreactive cells. In these animals, the p38 immunoreactivity was similar to that found in saline-treated naive rats at day 7.

### **NFκB mRNA levels**

NFκB mRNA levels did not change significantly in any of the Naive rats. After Sham surgery, saline-treated rats exhibited increases (222%) in NFκB mRNA levels at day 3 (Figure 6) compared to Naive rats. After NAC treatment, no significant difference was found between Sham and Naive rats in this parameter.

After CCI, rats exhibited increases of 438% in NFκB mRNA levels, compared to Naive rats. NAC treatment reduced this increase. In NAC-treated CCI rats, the NFκB mRNA levels were similar to that found in Naive rats (Figure 6).

### **Discussion**

Our results showed that NAC treatment prevented the increase in the number of NADPH-d labeled cell bodies and NFκB mRNA levels, while only partially prevented the increase in p38 immunoreactivity in lumbosacral spinal cord of rats with CCI.

NADPH-d reactivity may be indicating NOS containing cells. Studies have proposed that there is a good overlap between NADPH-d reaction and NOS immunohistochemistry (19,20). In this context, the increase in the number of NADPH-d stained neurons suggest

that NOS activity and NO production are increased in lumbosacral spinal cord of rats with CCI. Thus, our result is in agreement with other study that showed increase in NO formation in spinal cord of rats with CCI (21).

NAC, in turn, reduced the number of NADPH-d stained neurons in spinal cord. This data suggests that NAC-treatment inhibited the up-regulation of NOS activity and NO production in spinal cord of rats with CCI. We have already shown an inhibitory effect of NAC on NO metabolites in spinal cord of CCI rats at day 3 (5). Here, we demonstrate for the first time this reduction appear to be related to a decrease in the number of activated NO-ergic neurons in the dorsal horn and gray matter around of the central canal. The dorsal horn is the first site of synaptic transmission in the nociceptive pathway and it is a major site for integration and modulation of peripheral afferent signals (22). The neurons in the gray matter around of the central canal of the spinal cord appear also involved in the processing of nociceptive information. These neurons receive some terminals of slow-conducting afferent fibers which originate from subcutaneous nociceptors (23) and the function of these neurons is similar to that of nociceptive specific neurons of the superficial lamina of the dorsal horn (24). Taken into account, these data may suggest that the inhibitory effect of NAC on NADPH-d reaction in neurons of the dorsal horn and gray matter around the central canal may be contributing to antinociceptive effect of NAC. A similar hypothesis was suggested to rats submitted to formalin injection-induced inflammatory pain (25). Since NAC exerts a strong inhibitory effect on the gene expression of iNOS (10) and CCI induces a strong up-regulation of iNOS in the spinal cord (26), it may be suggested that the antinociceptive effect of NAC involves the inhibition of iNOS activity in the neurons of the spinal dorsal horn and gray matter around of the central canal in rats with CCI. Nevertheless it has already been demonstrated a reduction in the number of nNOS immunoreactive neurons in the spinal dorsal horn of rat with CCI-induced

chronic pain (27). In addition, the levels of nNOS and eNOS, collectively referred as constitutive NOS, are higher than iNOS in a model of partial ligation of sciatic nerve-induced neuropathic pain, and constitutive NOS has regulatory effects on neuropathic pain (28). Thus, further studies using specific NOS antibodies are necessary to determine which specific NOS isoform is inhibited following NAC treatment in spinal cord of rats with CCI.

The presence of immunoreaction in the nucleus of some DRG neurons may be related to antibody used, which was a kinase p38- $\alpha$ . The interaction of p38 with PRAK (p38-regulated/activated protein kinase or MK5) leads to both of them being co-localized to the nucleus (29). However, an increase in the number of p38-immunoreactive cells was observed after CCI. This experimental condition increased the number of p38-immunoreactive cells in DRG and spinal cord of saline-treated CCI rats. p38 can be activated through phosphorylation. Most of the studies demonstrate the distribution of p-p38 in DRG and spinal cord of rat submitted to neuropathic pain. In these animals, the upregulation of p-p38 was localized mostly in small- to medium-size DRG neurons (11), besides spinal neurons and activated microglia and astrocytes (30, 31,32). Our study also detected p38 immunoreactivity mostly in small- to medium-size DRG neurons. In spinal cord, the immunoreactivity was localized in neurons and very small cells which resembled glial cells. If these small cells are glial cells, our result is in agreement with studies using p-p38 (30,31). Since astrocytes have been reported to underlie persistent activation in the maintenance of neuropathic pain and microglia being quickly activated in the early stage of this pain (32), it also reinforces our suggestion that the very small cells correspond to activated glial cells in spinal cord of rats with CCI. Thus, it may be suggested that the increase in the number of immunoreactive neurons and glial cells in the spinal cord of rats with CCI may be related to activation of p38 signaling pathway in these cells. Likewise,

the p-p38 expression increased in spinal cord of rats with CCI, and the increase was small at day 1, but more expressive at days 3 and 7 (6). Since the activated p38 pathway can activate transcription factors, producing a variety of cytokines that regulate the synthesis of NO and cell proteins involved in signal transduction and hyperalgesia (31), the activation of p38 signaling pathway may be contributing to the increase in the number of NADPH-d neurons found at day 3 in spinal cord of the rats with CCI.

Here, NAC reduced the number of p38 immunoreactive neurons in DRG and spinal cord of rats with CCI. This treatment also reduced the number of p38 immunoreactive very small cells in spinal cord. It has been demonstrated that the activation of most microglial receptors can converge on p38 phosphorylation which leads to the synthesis and release of multiple inflammatory mediators that enhance synaptic transmission in dorsal horn neurons (32). In this context, the decrease in the number of p38 immunoreactive very small cells may be related to effect of NAC on microglial cells. A previous study showed that NAC significantly suppressed the upregulation of the microglia marker IBA-1 in the spinal cord after the CCI surgery, but NAC did not exhibit notable influence on the astrocytic marker GFAP after both single administration (50, 100, 200 mg. kg<sup>-1</sup>), orally, and continuous administration (100 mg.kg<sup>-1</sup>), orally, for 14 days (32). The presence of small immunoreactive cells in spinal cord of NAC-treated CCI rats found in the present work may be related to the lack of expressive influence of NAC on astrocytic activation.

Some studies have demonstrated that NAC has an inhibitory effect on p-p38 expression in spinal cord of rats with CCI (6,32), and this effect occurred at days 1, 3 and 7 after surgery (6). Since our results showed a reduction in p38 immunoreaction in spinal cord of NAC-treated CCI rats at days 1, 3 and 7, it is possible that the reduction in the number of p38 immunoreactive cells may be related to inhibitory effect of NAC on activation of p38 signaling pathway in these time points. A previous study showed that the intrathecal

administration of a p38 inhibitor blocked p38 phosphorylation and mechanical allodynia in a model of neuropathic pain (11). Our previous studies showed that NAC decreased pain behaviors in rat with CCI and this effect was found at days 1, 3 and 7 after surgery (5). Thus, it may be suggested that the inhibitory effect of NAC on p38 pathway contribute to antinociceptive effect of NAC. As MAPK are implicated in regulate cytokines production (33) and iNOS upregulation (34), the inhibitory effect of NAC on p38 signaling pathway may be contributing to decrease in NADPH-d reaction in spinal cord of rats with CCI observed at day 3.

Our data also showed that the increase of NF $\kappa$ B mRNA levels during neuropathic pain induced by CCI was suppressed by NAC treatment. The elevation of NF $\kappa$ B after CCI is in agreement with other studies (13,35). However, the activation of NF $\kappa$ B was analyzed at day 7 after CCI (13). In the present study we showed that NF $\kappa$ B mRNA levels are already increased at day 3. A previous study revealed that p-p38 is upregulated in microglia following trigeminal nerve injury and that this expression peaked on postoperative day 3, while p-NF $\kappa$ B peaked in astrocyte on postoperative day 7 through 21 (36). It is possible that early elevation in NF $\kappa$ B mRNA levels could be contributing to a late increase in expression of p-NF $\kappa$ B in spinal cord of rats with CCI. However, our study did not analyze the late expression of p-NF $\kappa$ B. Since we found an increase in the number of p38-immunoreactive very small cells, which resembled glial cells, this result suggests an activation of glial cells following CCI. If this is true, it is possible that the elevation in NF $\kappa$ B mRNA levels may be related to activation of glial cells.

In various types of pain, NF $\kappa$ B pathway appears to play an important role in immune and inflammatory responses via the regulation of genes that encode proinflammatory cytokines, adhesion molecules, and chemokines in the spinal cord (13, 35). The inhibitory effect of NAC treatment on NF $\kappa$ B mRNA levels suggests that NAC is an effective anti-

inflammatory agent that inhibits NF $\kappa$ B pathway. In fact, NAC blocked radiation-induced NF $\kappa$ B activity in ECV 304 cells and RAW 264.7 macrophages at doses that inhibited proteasome activity (37). Nevertheless, our study is the first one to demonstrate that NAC inhibit NF $\kappa$ B mRNA levels in spinal cord of rats with CCI. Since the NF $\kappa$ B pathway plays an important role in neuropathic pain because the activation of inflammatory genes (13, 35, 36), the effect of NAC preventing the increase of NF $\kappa$ B mRNA levels may be contributing to NAC-induced antinociception in rats with CCI. As discussed above, NAC induced antinociception in rats with CCI at day 3 (5, 6). Also, NF $\kappa$ B binds to the promoter of many genes that are important for the activation of immune responses as iNOS among others (38). Thus, it is possible that the inhibitory effect of NAC on NF $\kappa$ B activation may be contributing to decrease in NADPH-d reaction in spinal cord of rats with CCI.

Interestingly, Sham rats showed an elevation in NF $\kappa$ B mRNA levels at day 3. These rats also increase the number of p38-immunoreactive cells in spinal cord at day 3. These changes may be related to surgery-induced stress. These rats were submitted to the procedures involving manipulation of deep tissues, such as muscles and adjacent connective tissue (39). Thus, the changes may also be related surgery stress. The difference found in the spinal cord from Sham and CCI rats that received saline might be related to neuronal sensitization, a key mechanism in the pathology of neuropathic pain. According to Goecks et al. (40), the differences between sham and CCI rats could be related to different degrees of sensitization of the nervous tissue in these groups of rats. Since NAC treatment prevented the increase in NF $\kappa$ B mRNA levels in spinal cord of Sham rats, this result reinforces the inhibitory effect of NAC on NF $\kappa$ B mRNA during pain conditions.

In conclusion, our study is the first demonstration that NAC treatment prevented the increase in the number of NADPH-d reactive neurons in superficial dorsal horn and gray matter around of the central canal in lumbosacral spinal cord, which was increased by CCI.

For the first time, it was also demonstrated that NAC treatment reduces the increase in NF $\kappa$ B mRNA levels in spinal cord of rats with CCI. However, this treatment only partially prevented the increase in the number of p38-immunoreactive neurons and glia-like cells in spinal cord of these rats. These data suggest that NAC treatment not only change NO production, but also inhibits p38 and NF $\kappa$ B pathways in spinal cord of rats with CCI-induced neuropathic pain. Since the activation of p38 and NF $\kappa$ B pathways are implicated in regulation of cytokines production (33) and iNOS upregulation (34), the inhibitory effect of NAC on these pathways may be contributing to a decrease in NO production, which was measured in the present study by NADPH-d reaction. All these effects of NAC may be contributing to antinociception induced by NAC treatment in rats with CCI because NO, p38 and NF $\kappa$ B play important roles in neuropathic pain.

### **Acknowledgements**

This work was supported by grants from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

## References

1. Colloca L, Ludman T, Bouhassira D, Baron R, Dickenson AH, Yarnitsky D, et al. Neuropathic pain. *Nat Rev Dis Primers* 2017; 16: 17002.
2. Gao YL, Ji RR. Targeting astrocyte signaling for chronic pain. *Neurotherapeutics* 2010; 7: 482-493.
3. Dhouib IE, Jallouli M, Annabi A, Gharbi N, Elfazaa S, Lasram MM. A minireview on N-acetylcysteine: An old drug with new approaches. *Life Sci* 2016; 151: 359-363.
4. Truini A, Piroso S, Pasquale E, Notartomaso S, Di Stefano G, Lattanzi R, et al. N-acetyl-cysteine, a drug that enhances the endogenous activation of group-II metabotropic glutamate receptors, inhibits nociceptive transmission in humans. *Mol Pain* 2015;11:14.
5. Horst A, Kolberg C, Moraes MS, Finamor IA, Belló-Klein A, Pavanato MA, et al. Effect of N-acetylcysteine on the spinal-cord glutathione system and nitric-oxide metabolites in rats with neuropathic pain. *Neurosc Lett* 2014; 569: 163-168.
6. Horst A, de Souza JA, Santos MC, Riffel AP, Kolberg C, Ribeiro MF, et al. N-acetylcysteine downregulates phosphorylated p-38 expression but does not reverse the increased superoxide anion levels in the spinal cord of rats with neuropathic pain. *Braz J Med Biol Res.* 2017; 50: e5801.
7. Jaggi AS, Jain V, Singh N. Animal models of neuropathic pain. *Fundam Clin Pharmacol* 2011; 25: 1-28.
8. Robaczewska J, Kedziora-kornatowska K, Kozakiewicz M, Zary-Sikorska E, Pawluk H, Pawliszak W, et al. Role of glutathione metabolism and glutathione-related Antioxidant defense systems in hypertension. *J Physiol Pharmacol* 2016; 67: 331–337.
9. Ahlawat A, Rana A, Goyal N, Sharma S. Potential role of nitric oxide synthase isoforms in pathophysiology of neuropathic pain. *Inflammopharmacology* 2014; 22: 269-278.



10. Bergamini S, Rota C, Canali R, Staffieri M, Daneri F, Bini A, et al. N-acetylcysteine inhibits in vivo nitric oxide production by inducible nitric oxide synthase. *Nitric Oxide: Biol Chem* 2001; 5: 349-360.
11. Cheng HT, Dauch JR, Oh SS, Hayes JM, Hong Y, Feldman EL. p38 mediates mechanical allodynia in a mouse model of type 2 diabetes. *Mol Pain* 2010; 19: 6-28.
12. Thompson WL, van Eldik LJ. Inflammatory cytokines stimulate the chemokines CCL2/MCP-1 and CCL7/MCP-3 through NFkB and MAPK dependent pathways in rat astrocytes. *Brain Res* 2009; 1287: 47-57.
13. Hu JY, Li CL, Wang YW. Intrathecal administration of triptolide, a T lymphocyte inhibitor, attenuates chronic constriction injury-induced neuropathic pain in rats. *Brain Res* 2012; 1436: 122-129.
14. Jadhao AG, Biswas SP, Bhoyar RC, Pinelli C. The distribution of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-diaphorase (NADPH-d) in the medulla oblongata, spinal cord, cranial and spinal nerves of frog, *Microhyla ornata*. *J Chem Neuroanat* 2017; 81: 76-86.
15. Bennett GJ, Xie YK. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 1988; 33: 87-107.
16. Partata WA, Krepsky AM, Marques M, Achaval M. Axotomy increases NADPH-diaphorase activity in the dorsal root ganglia and lumbar spinal cord of the turtle *Trachemys dorbigni*. *Braz J Med Biol Res* 1999; 32: 489-493.
17. da Rosa LA, Escott GM, Cavalari FC, Scheneider CM, de Fraga LS, Loss EdaS. Non-classical effects of androgens on testes from neonatal rats. *Steroids* 2015; 93: 32-38.
18. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162: 156-159.
19. Marsala J, Orendáčová J, Lukáčová N, Vanický I. Traumatic injury of the spinal cord and nitric oxide. *Prog Brain Res* 2007; 161: 171-183.

20. González A, Moreno N, López JM. Distribution of NADPH-diaphorase/ nitric oxide synthase in the brain of the caecilian *Dermophis mexicanus* (Amphibia: Gymnophiona): comparative aspects in amphibians. *Brain Behav Evol* 2002; 60: 80-100.
21. Ghasemzadeh MR, Amin B, Mehri S, Mirnajafi-Zadeh SJ, Hosseinzadeh H. Effect of alcoholic extract of aerial parts of *Rosmarinus officinalis* L. on pain, inflammation and apoptosis induced by chronic constriction injury (CCI) model of neuropathic pain in rats. *J Ethnopharmacol* 2016; 194: 117-130.
22. Cury Y, Picolo G, Gutierrez VP, Ferreira SH. Pain and analgesia: The dual effect of nitric oxide in the nociceptive system. *Nitric Oxide* 2011; 25: 243-254.
23. Light AR, Perl ER. Spinal termination of functionally identified primary afferent neurons with slowly conducting myelinated fibers. *J Comp Neurol* 1979; 186:133–150.
24. Nahin RL, Madsen AM, Giesler GJ Jr. Anatomical and physiological studies of the gray matter surrounding the spinal cord central canal. *J Comp Neurol* 1983; 220:321–335.
25. Sun XC, Chen WN, Li SQ, Cai JS, Li WB, Xian XH, et al. Fluorocitrate, an inhibitor of glial metabolism, inhibits the up-regulation of NOS expression, activity and NO production in the spinal cord induced by formalin test in rats. *Neurochem Res* 2009; 34:351-359.
26. Makuch W, Mika J, Rojewska E, Zychowska M, Przewlocka B. Effects of selective and non-selective inhibitors of nitric oxide synthase on morphine- and endomorphin-1-induced analgesia in acute and neuropathic pain in rats. *Neuropharmacology* 2013; 75: 445-457.
27. Goff JR, Burkey AR, Goff DJ, Jasmin L. Reorganization of the spinal dorsal horn in models of chronic pain: correlation with behaviour. *Neuroscience* 1998; 82: 559-574.

28. Tanabe M, Nagatani Y, Saitoh K, Takasu K, Ono H. Pharmacological assessments of nitric oxide synthase isoforms and downstream diversity of NO signaling in the maintenance of thermal and mechanical hypersensitivity after peripheral nerve injury in mice. *Neuropharmacology* 2009; 56: 702-708.
29. Li Q, Zhang N, Zhang D, Wang Y, Lin T, Wang Y, et al. Determinants that control the distinct subcellular localization of p38alpha-PRAK and p38beta-PRAK complexes. *J Biol Chem* 2008; 283:11014-11023.
30. Chen NF, Chen WF, Sung CS, Lu CH, Chen CL, Hung HC, et al. Contributions of p38 and ERK to the antinociceptive effects of TGF- $\beta$ 1 in chronic constriction injury-induced neuropathic rats. *J Headache Pain* 2016; 17:72.
31. Cao J, Wang JS, Ren XH, Zang WD. Spinal sample showing p-JNK and P38 associated with the pain signaling transduction of glial cell in neuropathic pain. *Spinal Cord* 2015; 53:92-97.
32. Li J, Xu L, Deng X, Jiang C, Pan C, Chen L, et al. N-acetyl-cysteine attenuates neuropathic pain by suppressing matrix metalloproteinases. *Pain*. 2016; 157:1711-1723.
33. Zhou J, Wang L, Wang J, Wang C, Yang Z, Wang C, et al. Paeoniflorin and Albiflorin Attenuate Neuropathic Pain via MAPK Pathway in Chronic Constriction Injury Rats. *Evid Based Complement Alternat Med* 2016; 2016: 8082753.
34. Kim JM, Jung HY, Lee JY, Youn J, Lee CH, Kim KH. Mitogen activated protein kinase and activator protein-1 dependent signals are essential for bacteroides fragilis enterotoxin-induced enteritis. *Eur J Immunol* 2005; 35: 2648–2657.
35. Yin Q, Fan Q, Zhao Y, Cheng MY, Liu H, Li J, et al. Spinal NF- $\kappa$ B and chemokine ligand 5 expression during spinal glial cell activation in a neuropathic pain model. *PLoS One*. 2015; 10: e0115120.

36. Lee MK, Han SR, Park MK, Kim MJ, Bae YC, Kim SK, et al. Behavioral evidence for the differential regulation of p-p38 MAPK and p-NF- $\kappa$ B in rats with trigeminal neuropathic pain. *Mol Pain* 2011; 7: 57.
37. Pajonk F, Riess K, Sommer A, McBride WH. N-acetyl-L-cysteine inhibits 26S proteasome function: implications for effects on NF-kappaB activation. *Free Radic Biol Med* 2002; 32: 536-43.
38. Sánchez-Fidalgo S, Villegas I, Rosillo MÁ, Aparicio-Soto M, de la Lastra CA. Dietary squalene supplementation improves DSS-induced acute colitis by downregulating p38 MAPK and NFkB signaling pathways. *Mol Nutr Food Res* 2015; 59: 284-292.
39. Scheid T, Bosco LD, Guedes RP, Pavanato MA, Belló-Klein A, Partata WA. Sciatic nerve transection modulates oxidative parameters in spinal and supraspinal regions. *Neurochem Res* 2013; 38: 935-942.
40. Goecks CSB, Horst A, Moraes MS, Scheid T, Kolberg C, Bello-Klein A, et al. Assessment of oxidative parameters in rat spinal cord after chronic constriction of the sciatic nerve. *Neurochem Res* 2012; 37: 1952-1958.

## Figure Legends

**Figure 1.** NADPH-diaphorase histochemistry in spinal cord of naive rats (A) and rats with chronic constriction injury (CCI) (B, C) that received treatment with saline (B) or N-acetylcysteine (NAC) ( $150 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$ ) (A, C), intraperitoneally, for 3 days. Note the strong NADPH-diaphorase reaction in neurons (thin arrows) located in superficial dorsal horn laminae and strongly stained band in the lamina II (thick arrow). High magnification shows reactive neurons in superficial dorsal horn laminae (A) and ventral horn (B,C). Scale bars:  $300 \mu\text{m}$  (B, C),  $200 \mu\text{m}$  (high magnification in A) and  $100 \mu\text{m}$  (high magnification in B and C).

**Figure 2.** NADPH-diaphorase histochemistry in spinal cord of naive rats (A, D) and rats with chronic constriction injury (CCI) (B, C, E, F) that received treatment with saline (B, E) or N-acetylcysteine (NAC) ( $150 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$ ) (A, C, F), intraperitoneally, for 3 days. Note the strong NADPH-diaphorase reaction in neurons (thin arrows) located in superficial dorsal horn laminae and gray matter around of the central canal (D, E, F). Scale bar:  $200 \mu\text{m}$ .

**Figure 3.** p38 immunoreactivity in the dorsal root ganglia (DRG) of naive rats (A) and rats with chronic constriction injury (CCI) that received treatment with saline (B, C, E) or N-acetylcysteine (NAC) ( $150 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$ ) (D, F), intraperitoneally, for 1 (B), 3 (C,D) or 7 (E, F) days after surgery. Note the immunoreaction in nucleus (A, B, D, F) and cytoplasm (B-F) of DRG neurons (arrows). Scale bar:  $100 \mu\text{m}$ .

**Figure 4.** p38 immunoreactivity in the spinal cord of naive rats (A) and rats with chronic constriction injury (CCI) that received treatment with saline (B, D) or N-acetylcysteine (NAC) ( $150 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$ ) (C,E), intraperitoneally, for 3 (B, C) or 7 (D, E) days after surgery. Note the high number of strongly sensory (thin arrows) and motor (thick arrows) immunoreactive neurons in saline-treated CCI rats (B, D) and the reduction in this number in NAC-treated CCI rats (C, E). Scale bar:  $300 \mu\text{m}$ .

**Figure 5.** p38 immunoreactivity in spinal cord of rats with chronic constriction injury (CCI) that received treatment with saline (A,C,E) or N-acetylcysteine (NAC) ( $150 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$ ) (B, D), intraperitoneally, for 3 (A, B) or 7 (C, D, E) days after surgery. Note the high number of immunoreactive very small cells (thin arrows) and the presence of immunoreaction in sensory (A, C) and motor (B, D) neurons (thick arrows) and in very small cells (thin arrows) located in lateral funiculus (E) from saline-treated CCI rats; and the small number of immunoreactive very small cells in spinal cord from NAC-treated CCI rats (B,D). Scale bar:  $100 \mu\text{m}$ .

**Figure 6.** Real-time PCR quantitation of NF $\kappa$ B mRNA in the spinal cord of rats with chronic constriction injury (CCI) that received treatment with N-acetylcysteine (NAC) ( $150 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$ ) or saline administered intraperitoneally for 3 days. Data represent means $\pm$ SEM. \*indicates significant differences compared to naive groups; #indicates significant differences compared to NAC-treated group (Three-way ANOVA followed by Tukey post-hoc test,  $P<0.05$ ). In sham rats all surgical procedures involved in the CCI were used except the ligature.

**Table 1:** The prime sequence for RT-PCR.

Gene symbol	Primer sequence (5'-3')	Product length (pb)	Mean T <sub>m</sub> (°C)
<i>NF-kB</i>			
<i>sense</i>	GAGCAACCAAAACAGAGGGG	242	59 (°C)
<i>antisense</i>	CCTGCTGTTACGGTGCATAC		
<i>beta Actin</i>			
<i>sense</i>	CTGGAACGGTGAAGGTGACAA	603	87 (°C)
<i>antisense</i>	AGGGAATTCCTGTAACAATGCA		

Figure 1

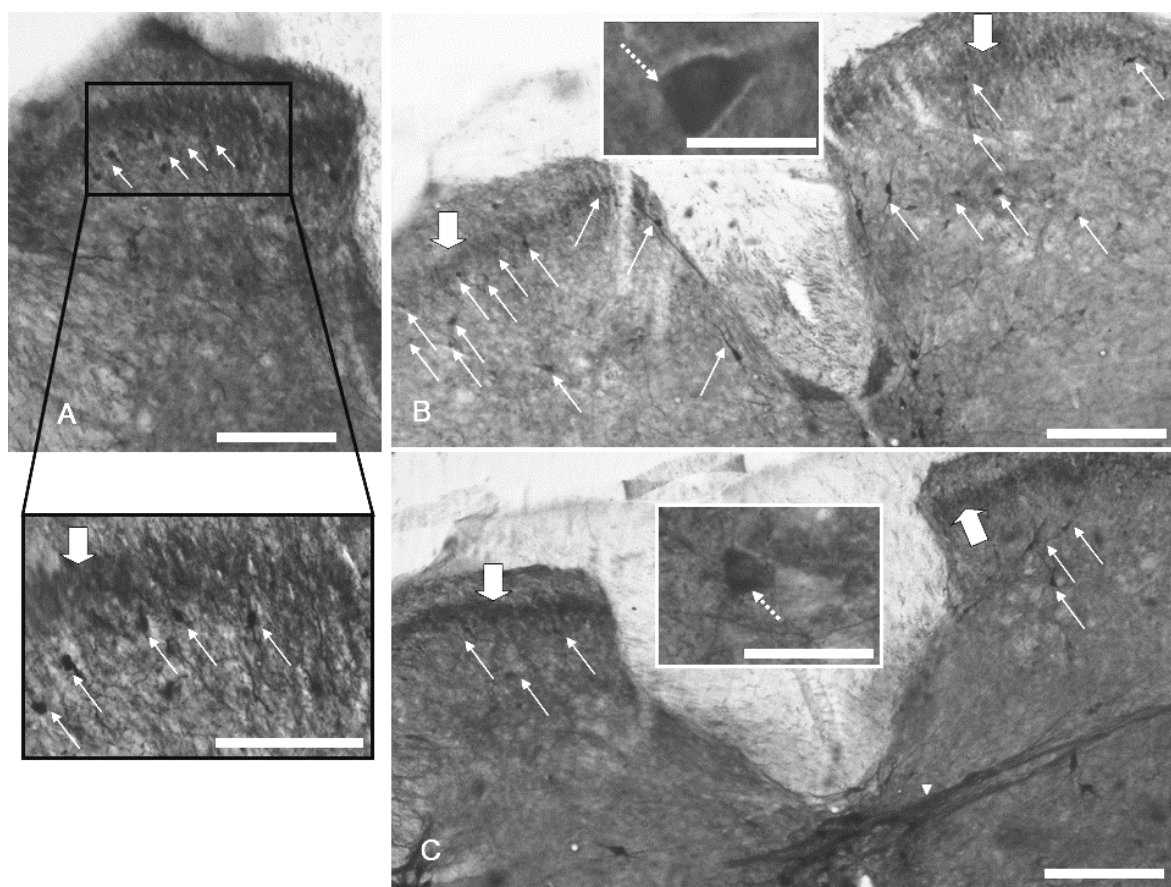




Figure 2

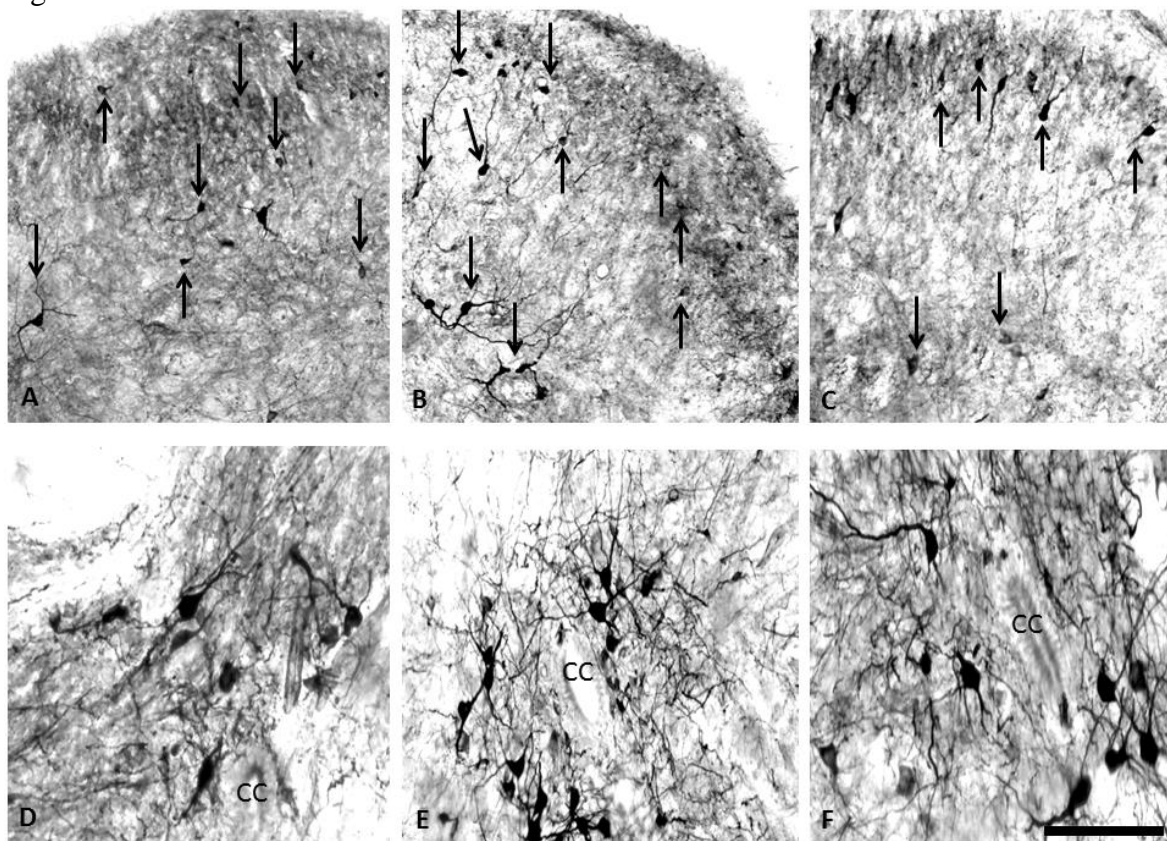


Figure 3

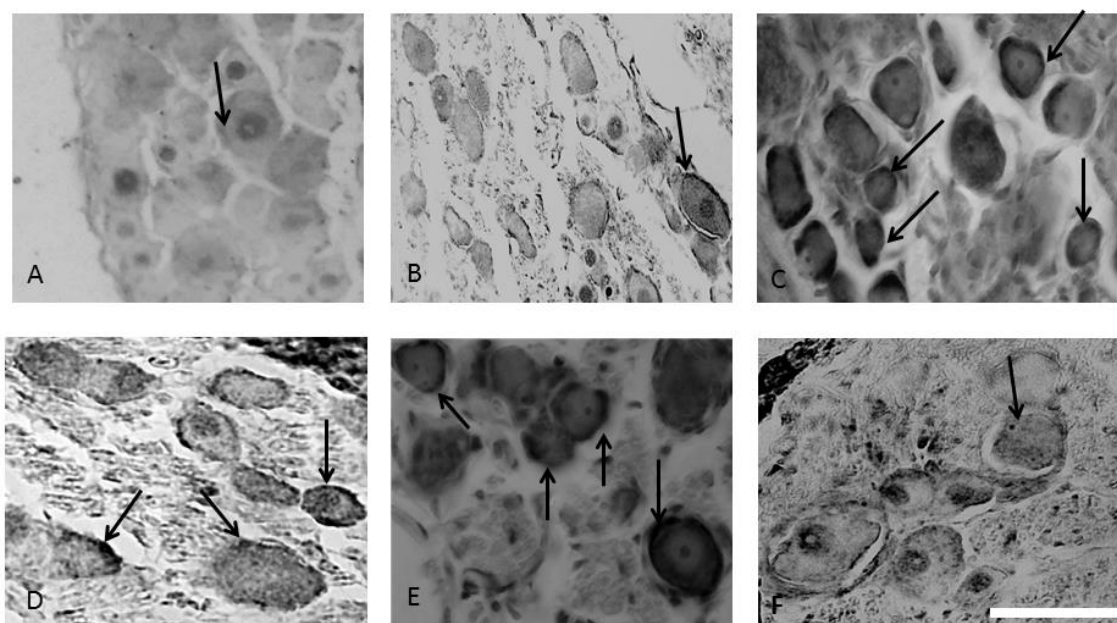


Figure 4

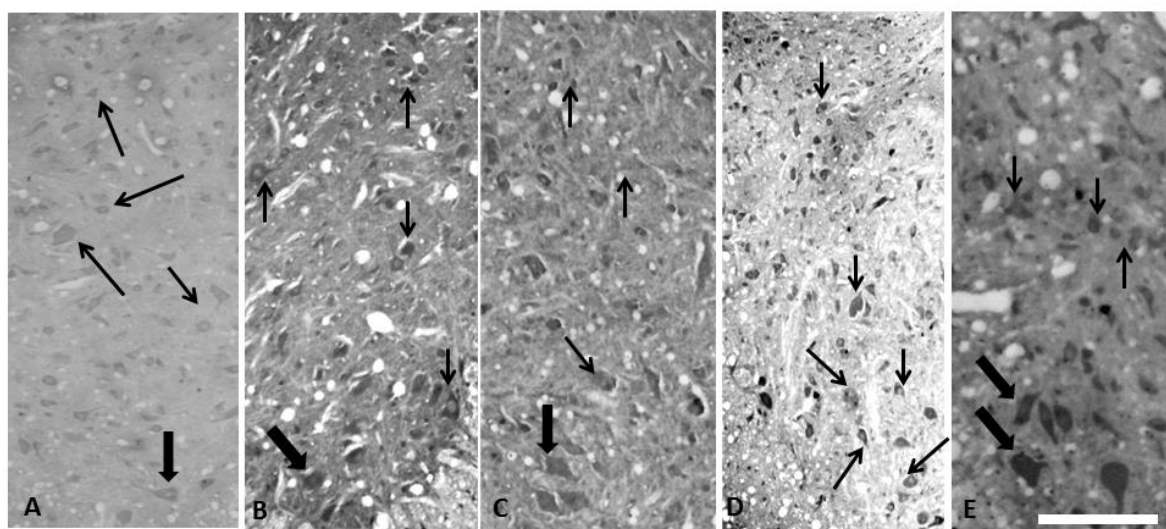


Figure 5

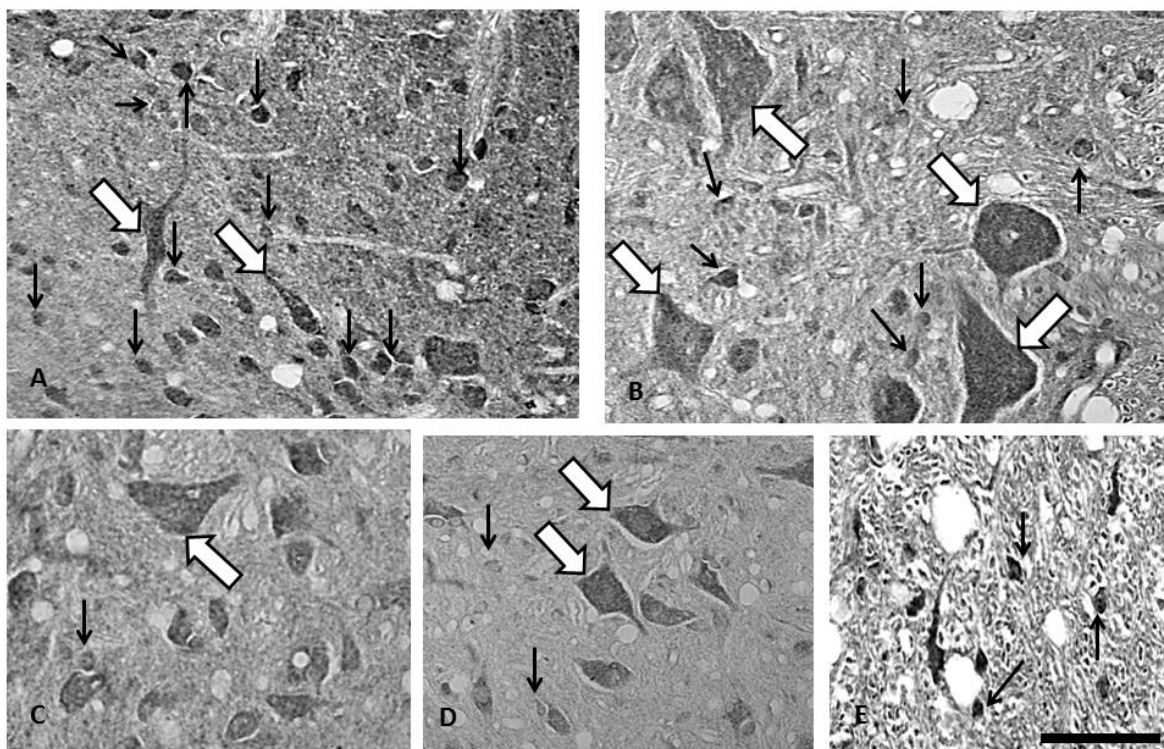
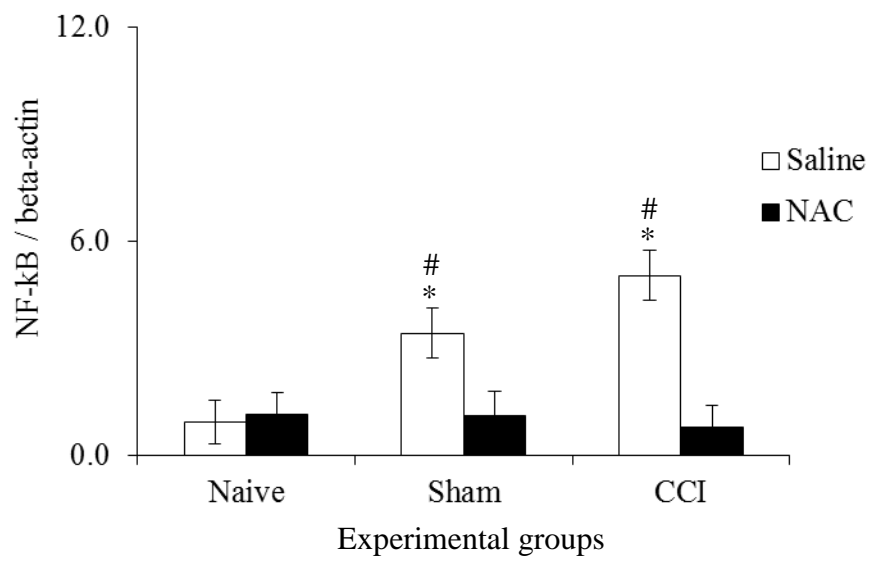


Figure 6



## 6. DISCUSSÃO

O presente estudo analisou o efeito da administração de NAC, na dose de 150 mg/kg/dia, nos períodos de um, três e sete dias, sobre o IFI em ratos submetidos à CCI, um modelo de dor neuropática. Avaliou ainda, nesses animais, o efeito do tratamento com NAC sobre parâmetros de estresse oxidativo (dano a lipídios, formação de  $O_2^{\bullet}$ , TAC e ácido ascórbico), de sinalização intracelular (p-p-38 e mRNA do *NK-kB*), e padrão de distribuição da reatividade a NADPH-diaforase e imunorreatividade a p-38 em medula espinal lombossacral, para tentar correlacionar as alterações bioquímicas com o efeito antinociceptivo da NAC.

Nossos resultados mostraram que o IFI, um método confiável, repetível e quantitativo de avaliação da função após lesão no nervo isquiático (Kato et al., 2013), melhorou ao longo do período considerado no estudo. Porém, o tratamento com NAC foi capaz de acelerar essa melhora, e isso possivelmente se relaciona com o efeito antinociceptivo da NAC. É sugerido que as deformidades na pata, induzidas por CCI, podem relacionar-se com a dor espontânea (Nakazato-Imasato & Kurebayashi, 2009). Nesse contexto, nossos resultados podem estar indicando que o IFI melhorado nos ratos CCI que receberam tratamento com NAC se relaciona com a atenuação da sensação dolorosa nesses animais. Um apoio a essa hipótese é a melhora no limiar mecânico, medido pelo teste de von Frey, nos ratos com CCI tratados com NAC. Deve ser lembrado neste momento que a NAC atenuou a redução do limiar mecânico induzido por

CCI já aos 3 dias após o início do tratamento, sendo que aos 7 dias esse limiar foi similar ao observado no rato antes da indução da CCI (Horst et al., 2014; Horst et al., 2017).

Paralelo às mudanças no IFI e no limiar mecânico, o tratamento com NAC modificou parâmetros de estresse oxidativo na medula espinal, muitos deles em direção oposta àquelas alteradas pela CCI. Em nosso estudo foi observado que o tratamento com NAC preveniu o aumento precoce induzido pela CCI nos valores de hidroperóxido lipídico. Ainda, esse tratamento foi capaz de prevenir o acréscimo nos valores de ácido ascórbico induzidos pela CCI, porém não modificou a formação aumentada de  $O_2^{\bullet-}$  devido à lesão. Outro resultado de nosso estudo foi que o tratamento com NAC não provocou acréscimos na TAC na medula espinal.

O acréscimo na formação de  $O_2^{\bullet-}$  na medula espinal de ratos com CCI que receberam administração de solução salina provavelmente está relacionado com a sensação dolorosa nesses animais. É sugerido que o  $O_2^{\bullet-}$  se relaciona com a dor de várias etiologias, incluindo a neuropática (Little JW et al., 2012; Salvemini et al., 2011). Contudo, apesar dos valores elevados na formação de  $O_2^{\bullet-}$ , os ratos com CCI que receberam tratamento com NAC exibiram antinocicepção quando avaliados pelo teste de von Frey. A falta de efeito do tratamento com NAC sobre a formação de  $O_2^{\bullet-}$  provavelmente se deve à baixa capacidade da NAC de reagir com  $O_2^{\bullet-}$  (Samuni et al., 2013).

É provável que o aumento de aproximadamente 40% na formação de  $O_2^{\bullet-}$  (SAG, do inglês *superoxide anion generation*), o qual já foi encontrado na medula espinal de ratos CCI tratados com solução salina no primeiro dia após a cirurgia e se manteve nos demais períodos (3 e 7 dias), pode ser a causa da elevação nos valores de hidroperóxido lipídico da medula espinal desses ratos. No SNC, o dano a lipídios é um evento muito comum causado por ROS devido às grandes quantidades de ácidos graxos poliinsaturados (Halliwell & Gutteridge, 2010). O efeito preventivo da NAC sobre o aumento acentuado dos hidroperóxidos lipídicos na medula espinal de ratos CCI no dia 1 após a cirurgia provavelmente se relaciona às ações antioxidantes da NAC. Estudos mostram que a NAC é um precursor de GSH, um importante antioxidante intracelular (Dhouib et al., 2016; Samuni et al., 2013; Robaczewska et al., 2016), e pode atuar diretamente como um *scavenger* de ROS em neurônios (Ercan et al., 2016). Estas ações antioxidantes da NAC podem contribuir para diminuir ROS na medula espinal, e com isso provocar menor peroxidação em lipídios e, assim, reduzir a sensação dolorosa já que uma característica de quadros de dor neuropática é acréscimos em ROS na medula espinal (Scheid et al., 2013). Assim, parece plausível considerar que o efeito antioxidante da NAC contribuiu para a

diminuição dos valores de hidroperóxido lipídico na medula espinal dos ratos CCI que receberam tratamento com NAC. Outra explicação também plausível é a ação da NAC sobre o influxo de cálcio. A NAC reduz o influxo de cálcio por receptores de potencial transitório relacionado à melastatina 2 (TRPM2) (Ercan et al., 2016). De acordo com estes autores, os neurônios do gânglio da raiz dorsal formam ROS devido à ativação de canal TRPM2, e uma característica observada em condições de dor neuropática é aumento no influxo de cálcio em neurônios sensoriais envolvidos na transmissão da informação dolorosa. Assim, é necessário considerar que a ação preventiva da NAC sobre a peroxidação lipídica pode estar relacionada à sua ação sobre o influxo de cálcio através de canais TRPM2. A formação mais baixa de hidroperóxidos lipídicos na medula espinal de ratos CCI tratados com solução salina nos dias 3 e 7 pode relacionar-se à mobilização de sistemas antioxidantes. Foi demonstrado que a CAT, uma enzima antioxidante que catalisa a degradação de  $H_2O_2$  a  $H_2O$  e  $O_2$  (Erel, 2004), aumenta sua atividade na medula espinal 3 e 10 dias após CCI (Goecks et al., 2012).

Interessantemente, os hidroperóxidos lipídicos ainda estavam significativamente aumentados na medula espinal de ratos CCI tratados com NAC nos dias 3 e 7, quando comparados aos valores encontrados nos ratos controle. Nesses períodos de tempo, os valores de hidroperóxidos lipídicos da medula espinal de ratos com CCI tratados com NAC foram semelhantes aos encontrados nesse tecido em ratos CCI tratados com solução salina, embora os valores nesses últimos animais fossem bem inferiores àqueles observados no dia 1. A formação excessiva de ROS necessita ser neutralizada para evitar a acumulação de danos oxidativos, porém é necessário que um pequeno acréscimo pró-oxidativo prevaleça no tecido para um adequado equilíbrio em processos de sinalização intracelular (Poljsak et al., 2013). Assim, é provável que a elevação de hidroperóxidos lipídicos na medula espinal de ratos CCI tratados com solução salina e NAC se relaciona com a manutenção das condições necessárias para processos de sinalização intracelular. A peroxidação lipídica é essencial para a atividade da fosfolipase C e sinalização do inositol-trifosfato (IP3) (Kim et al., 2015), mecanismos de sinalização que são ativados quando diferentes moléculas exercem suas ações nociceptivas (Colloca et al., 2017; Nickel et al., 2012) e antinociceptivas (Chiou et al., 2013).

Nosso estudo também mostrou que o teor de ácido ascórbico aumentou na medula espinal dos ratos CCI tratados com solução salina por 1, 3 e 7 dias, enquanto esse parâmetro não alterou significativamente nesse tecido nos ratos com CCI que receberam tratamento com NAC. Esta diferença pode se relacionar aos papéis sugeridos para o ácido



ascórbico no tecido nervoso. Neste tecido, o ácido ascórbico parece atuar como uma importante molécula antioxidante, como um neuromodulador de atividade sináptica e ainda desempenhar importante função na troca metabólica dos neurônios durante atividade cerebral e condições de repouso, tendo seus valores aumentados em resposta à atividade cerebral (Covarrubias-Pinto et al., 2015). Os estudos mostram que em condições de dor neuropática há excitabilidade excessiva no corno dorsal da medula espinal, a qual resulta de múltiplas alterações funcionais na medula espinal, que incluem aumento da liberação de glutamato e outros neurotransmissores, formação de ROS, perda de função dos interneurônios inibitórios e múltiplas alterações nas células gliais e imunes do SNC (Colloca et al., 2017; Nickel et al., 2012; Tsuda M 2016; Salvemini et al., 2011; Geis et al., 2017). Como a CCI é um modelo de dor neuropática (Jaggi et al., 2011), pode-se sugerir que essas alterações provavelmente ocorreram na medula espinal de ratos com CCI. Assim, é provável que o aumento nos níveis de ácido ascórbico podem estar relacionados com as alterações na medula espinal induzidas pela CCI nos ratos tratados com solução salina. Foi demonstrado que os neurônios são altamente sensíveis ao dano oxidativo e mecanismos para manter a atividade antioxidante são necessários durante as atividades fisiológicas, como a reciclagem e a liberação de ácido ascórbico por astrócitos (Covarrubias-Pinto et al., 2015). Contudo, a NAC inibe a transmissão nociceptiva (Ercan e Naziroglu, 2016; Truini et al., 2015; Naik et al., 2006; Horst et al., 2014; Horst et al., 2017) e é capaz de restaurar o potencial antioxidante celular devido a formação de GSH e neutralização de ROS (Dhouib et al, 2016; Samuni et al., 2013). A NAC também promove maior atividade do trocador de membrana L-cistina/L-glutamato, que possui papel importante no fornecimento de L-cisteína intracelular necessária para a síntese de GSH, e que tem sua atividade reduzida após CCI (Bernabucci et al., 2012; Bridges et al., 2012). Estas ações da NAC podem ter contribuído para a falta de aumento significativo no teor de ácido ascórbico na medula espinal dos ratos CCI que receberam administrações de NAC.

Ainda em relação aos antioxidantes na medula espinal de ratos com dor neuropática, a TAC, que avalia não apenas os antioxidantes não enzimáticos (como o ácido ascórbico), mas também a ação dos antioxidantes enzimáticos, também não mostrou mudança significativa na medula espinal de ratos CCI após tratamento com NAC. Isto pode estar relacionado com o controle rigoroso das condições intracelulares quando existe suplementação com antioxidante exógeno. De acordo com Poljsak et al (2013), o equilíbrio entre ROS e antioxidantes é necessário, pois ambos os extremos - estresse oxidativo e estresse antioxidante - são prejudiciais ao funcionamento da célula. O resultado da TAC

pode estar indicando que o tratamento com NAC não perturba as redes bem integradas de defesas antioxidantes. Porém, a TAC diminuiu na medula espinal de ratos CCI tratados com solução salina. A depleção de antioxidantes não significa necessariamente que tenha ocorrido dano oxidativo: pode simplesmente significar que os mecanismos de defesa removeram ROS e protegeram o sistema (Halliwell & Gutteridge, 2010). Como as ROS estão envolvidas na patogênese da dor neuropática (Ercan e Naziroglu, 2016; Truini et al., 2015; Naik et al., 2006; Horst et al., 2014; Horst et al., 2017), o aumento destas espécies pode estar relacionado à diminuição da TAC na medula espinal de ratos CCI tratados com solução salina por 7 dias. Um apoio a essa hipótese é que a formação de  $O_2^{\bullet-}$  está elevada na medula espinal desses ratos também aos 7 dias (Horst et al., 2017).

O aumento nos hidroperóxidos lipídicos e a ausência de alterações significativas no teor de ácido ascórbico e na TAC na medula espinal dos ratos *sham* pode estar relacionada à lesão tecidual. Estes ratos foram submetidos aos procedimentos envolvendo manipulação de tecidos profundos, como músculos e tecido conjuntivo adjacente, o que se sabe que pode induzir dor (Scheid et al., 2013). É provável que o acréscimo nos hidroperóxidos lipídicos se relacione com os efeitos destas moléculas no tecido nervoso, como discutido anteriormente nesse texto. A diferença encontrada na medula espinal de ratos *sham* e CCI quanto aos parâmetros oxidativos estudados provavelmente tenha relação com a sensibilização neuronal, um mecanismo chave na patologia da dor neuropática. De acordo com Goecks et al. (2012), as diferenças em parâmetros de estresse oxidativo entre ratos *sham* e CCI podem relacionar-se aos diferentes graus de sensibilização do tecido nervoso.

Assim, nosso estudo forneceu evidências de que o tratamento com NAC altera precocemente a atividade de parâmetros de estresse oxidativo na medula espinal, já que esse tratamento preveniu o acréscimo nos hidroperóxidos lipídicos 1 dia após a cirurgia. Porém, o efeito antinociceptivo e de melhora locomotora dos ratos com CCI tratados com NAC é observado somente aos 3 e 7 dias após o início do tratamento (Horst et al., 2014, Horst et al., 2017), períodos que, segundo os dados desse estudo e outros da literatura, os sistemas de antioxidantes endógenos já foram acionados (Goeckes et al., 2012). Esses dados sugerem que, o efeito analgésico e neuroprotetor da administração de NAC, está mais relacionado com a sinalização celular no sistema nervoso central do que simplesmente evitando um quadro de estresse oxidativo como antioxidante. Em condições de dor inflamatória, o efeito anti-inflamatório da NAC já foi associado a uma diminuição na atividade do NF- $\kappa$ B e de fatores pró-inflamatórios (Dhouib et al., 2016). Dado ao pouco

conhecimento da ação da NAC em mecanismos de sinalização intracelular em modelos de dor neuropática por CCI, o presente estudo também avaliou parâmetros de sinalização intracelular na medula espinal de ratos com CCI que receberam ou não tratamento com NAC. Para isso foram escolhidos a p-38 e o NF- $\kappa$ B, os quais estão sabidamente envolvidos no processo fisiopatológico da dor neuropática e correlacionados com o estado redox da célula (Nickel et al., 2012).

Está demonstrado ativação da MAPK p-38 na dor neuropática (Qu et al., 2016; Xu et al., 2007). Segundo Xu e cols (2007), há um aumento significativo na expressão de p-p-38 na medula espinal de ratos CCI aos 3 dias após a cirurgia, o qual é mantido por 2 semanas. Porém, em ratos submetidos a dor neuropática por ligadura de nervo espinal próximo à medula espinal, um modelo de dor neuropática, houve aumento significativo na expressão de p-p-38 em medula espinal 1 dia após a cirurgia (Jin et al., 2003). Como cada modelo animal para o estudo da nocicepção se baseia em uma metodologia específica para a indução do quadro doloroso, e os resultados variam amplamente com pequenas alterações na indução da nocicepção, é essencial que dados de diferentes modelos animais para o estudo da dor sejam relatados e interpretados no contexto específico daquele modelo de dor (Jaggi et al., 2011). Assim, especulava-se a presença de acréscimo na atividade da p-38 também 1 dia após a indução de dor por CCI. Nosso estudo mostrou aumento significativo na expressão de p-p-38 na medula espinal dos ratos CCI que receberam solução salina nos dias 1, 3 e 7. A imunorreatividade a p-38 também estava aumentada na medula espinal desses ratos nesses períodos de tempo. Assim, a ativação da p-38 é um evento precoce também na medula espinal de ratos com CCI. Um estudo recente mostrou que a imunorreatividade a p-p-38 se localiza em neurônios e células gliais ativadas (microglia e astrócitos) (Chen et al., 2016). É possível que o acréscimo na expressão da p-p-38 observada em nosso estudo (Horst et al., 2017) também se deve a maior presença dessa proteína em sua forma fosforilada nesses tipos celulares da medula espinal. Na imunohistoquímica a p-38, nosso estudo mostrou maior número de neurônios imunorreativos a essa proteína na medula espinal de ratos com CCI tratados com salina. Embora não tenha sido realizada técnica para marcação específica de células gliais, nossos resultados mostraram a presença de imunorreatividade a p-38 em células semelhantes a células da glia, o que permite inferir que na medula espinal dos ratos com CCI houve imunorreatividade a p-38 também em células gliais da medula espinal.

O aumento na p-38 possivelmente se relaciona ao papel fisiológico crítico dessa MAPK em situações de lesão no nervo isquiático. Foi demonstrado que a p-38 desempenha

um importante papel na regeneração nervosa e, também, parece ser importante na iniciação do processo inflamatório e recuperação da lesão nervosa (Kato et al., 2013). Estes possíveis papéis da p-38 provavelmente contribuíram para a melhora do IFI nos ratos CCI tratados com solução salina. O tratamento com NAC, por sua vez, induziu uma *downregulation* na expressão da p-p-38 (Horst et al., 2017) e uma redução no número de células imunorreativas a p-38 na medula espinal de ratos com CCI, em todos os períodos de tempo avaliados no presente estudo. Como a p-38 é um dos fatores que contribui para a dor após CCI (Xu et al., 2007), é possível que a redução parcial dessa proteína após o tratamento com NAC contribua para o efeito antinociceptivo da NAC nos ratos com CCI (Horst et al., 2014; 2017). Um apoio a essa hipótese é a demonstração de que a administração de um inibidor de p-38 provocou redução na hiperalgesia após lesão nervosa em ratos (Xu et al., 2007).

Porém, ao se falar em efeito antinociceptivo da NAC é preciso considerar outras ações dessa molécula que também podem ter contribuído para a antinocicepção. A NAC tem efeito neuroprotetor em modelo animal de lesão nervosa periférica (Reid et al., 2009). A p-38 desempenha funções críticas na diferenciação e/ou sobrevivência de neurônios (Kato et al., 2013). Desta forma, pode-se sugerir que como NAC e p-38 possuem efeitos neuroprotetores, o tratamento diário com NAC provavelmente contribuiu para reduzir a p-p-38 e o número de células imunorreativas a essa proteína. É possível ainda especular que o efeito neuroprotetor/antinociceptivo da NAC tenha contribuído para a melhor recuperação no IFI no dia 7 após a CCI, assim como para a recuperação das sensibilidades térmica e mecânica exibida pelos ratos com CCI tratados com NAC (Horst et al., 2017; Horst et al., 2014).

A redução na expressão de p-p-38 possivelmente contribuiu também para o decréscimo nos metabólitos de NO na medula espinal de ratos com CCI tratados com NAC, como sugerido por Horst et al. (2014). Foi demonstrado que a NO sintase neuronal, uma das enzimas responsáveis pela produção de NO, é importante para a ativação da microglia espinal após lesão de nervo (Kuboyama et al., 2011), e a p-p-38 microglial desempenha papel importante na nocicepção induzida por CCI (Ni et al., 2016). Li e cols (2016) relataram aumento na fosforilação da p-38 em células gliais 14 dias após lesão por CCI, e o tratamento com NAC, em dose única de 200 mg.kg<sup>-1</sup>, foi capaz de reduzir a fosforilação dessa proteína. Em nosso estudo foi observado que a NAC reduziu a expressão da p-p-38 já a partir do primeiro dia após o tratamento (Horst et al., 2017), e aos 3 dias após o tratamento se encontrou diminuição nos metabólitos de NO (Horst et al., 2014) e

um menor número de neurônios reativos a NADPH-diaforase na medula espinal de ratos CCI tratados com NAC. A técnica histoquímica da NADPH-diaforase é amplamente aceita e usada para marcar neurônios nitrérgicos no tecido nervoso (Jadhao et al., 2017; González & López, 2002; Moreno et al., 2002). Nesse contexto, pode-se especular que o acréscimo na reatividade a NADPH-diaforase se deve ao aumento na formação de NO na medula espinal de ratos com CCI, o que está de acordo com dados da literatura (Cury et al., 2011). Seguindo o mesmo raciocínio, a redução no número de neurônios reativos a NADPH-diaforase após tratamento com NAC reflete decréscimo na formação de NO. Assim, pode-se sugerir que a redução nos metabólitos de NO na medula espinal de ratos com CCI tratados com NAC, descrito por Horst et al (2014), se deve ao menor número de neurônios nitrérgicos em atividade no corno dorsal superficial e substância cinzenta ao redor do canal central da medula espinal, e isso possivelmente se relaciona com a diminuição na expressão de p-p-38, também presente nesse tecido dos ratos com CCI tratados com NAC (Horst et al., 2017).

Paralelo às mudanças em parâmetros de estresse oxidativo e ativação de p-38 em medula espinal de ratos com CCI tratados com salina, o presente estudo observou nesse tecido, no período de 3 dias após a CCI, aumento nos níveis do mRNA do *NF-κB*. A ativação desse fator é um evento comum em situações de dor. Estudos mostram aumento na ativação do NF-κB em gânglio da raiz dorsal e corno dorsal da medula espinal de ratos submetidos a uma condição dolorosa (Miyoshi et al., 2008; Ma e Bisby, 1998; Yin et al., 2015; Hu et al., 2012).

Foi demonstrado em um modelo de dor neuropática do trigêmeo (mialgia do trigêmeo) aumento na expressão da p-p-38 aos 3 dias após a lesão nervosa, e este estava localizado em microglia, enquanto um aumento na expressão de p-NF-κB (NF-κB fosforilado) ocorreu tardiamente, aos 7 dias após a lesão, e se localizou em astrócitos (Lee et al., 2011). Segundo esses autores, a administração de dexametasona, um potente analgésico, inibiu o aumento da expressão de ambas as proteínas, o que sugeriu o envolvimento dessas proteínas no desenvolvimento e na manutenção da dor neuropática trigeminal. Em nosso estudo se observou aumento nos níveis do mRNA do *NF-κB* na medula espinal dos animais CCI tratados com salina por 3 dias. À primeira vista, nossos resultados parecem contradizer aqueles descritos por Lee e cols (2011). Todavia, nós quantificamos o mRNA do *NF-κB*, e nossos resultados indicam um aumento precoce nesse parâmetro. Possivelmente esse aumento encontrado por nós esteja relacionado com a maior expressão tardia da proteína p-NF-κB descrita por Lee e cols (2011). Como a ativação da

via do NF- $\kappa$ B promove ativação de uma série de genes e neurotransmissores que levam a secreção de quimiocinas e hipersensibilidade a dor (Yin et al., 2015; Hu et al., 2012), o acréscimo no mRNA do NF- $\kappa$ B observado no presente estudo pode estar contribuindo para a redução no limiar nociceptivo e valores menores no IFI nos ratos com CCI tratados com salina. Ainda, a ativação da via do NF- $\kappa$ B promove ativação de diversos genes que são importantes para a resposta imune, como a NOS induzida, COX-2 e citocinas, entre outros (Sánchez-Fidalgo et al., 2015). Apesar de ser impossível neste momento relacionar o aumento da reatividade a NADPH-diaforase com ativação de isoforma específica da NOS, pode-se inferir que muitos dos neurônios reativos a essa enzima se relaciona com atividade da NOS induzida, evento esse que pode se relacionar com o acréscimo no mRNA do NF- $\kappa$ B observado no presente estudo.

O tratamento com NAC provocou redução nos níveis do mRNA do *NF- $\kappa$ B* na medula espinal de ratos com CCI. Como já abordado, a via do NF- $\kappa$ B desempenha papel chave na ativação de células imunes (Kuo et al., 1997), e também desempenha importante papel na medula espinal (Toth et al., 2008), onde a informação nociceptiva é processada e transmitida para centros mais superiores do neuroeixo. Como a indução de certos genes envolvidos com processo inflamatório como, por exemplo, as citocinas como o TNF- $\alpha$  e a IL-2 são regulados pela via do NF- $\kappa$ B (Yin et al., 2015; Hu et al., 2012), a redução no mRNA desse fator induzida pelo tratamento com NAC pode ter efeito importante na antinocicepção induzida pela NAC. Nossos dados preliminares, e por este motivo não mostrados no presente trabalho, indicam uma tendência de redução na expressão do gene do *TNF- $\alpha$*  na medula espinal lombossacral de ratos com CCI tratados com NAC por três dias. Frente a isso, nós sugerimos que a possível redução no *TNF- $\alpha$*  pode estar relacionada com a diminuição na expressão da p-p-38, com a redução na imunorreatividade a p-38, e com a diminuição no mRNA do *NF- $\kappa$ B*. Estes eventos podem estar contribuindo para a menor sensibilização central na medula espinal de ratos com CCI tratados com NAC e, assim, para o efeito antinociceptivo dessa molécula nesses ratos. Um apoio a nossa hipótese é a demonstração de relação entre o aumento da p-p-38 em células gliais e o acréscimo na IL-1 $\beta$  observado após a CCI (Li et al., 2016). Nesse estudo, os autores descrevem que a administração de NAC foi capaz de diminuir esses aumentos, reduzir o processo inflamatório e diminuir a sensibilização central.

Interessantemente, o efeito antinociceptivo da NAC não se restringiu apenas aos ratos com CCI. Nos ratos sham, a NAC também foi capaz de induzir efeito antinociceptivo (Horst et al., 2014). A redução do limiar mecânico nos ratos sham pode ser devido aos

procedimentos envolvendo a manipulação de tecidos profundos, como músculos e tecido conjuntivo adjacente, o que induz dor (Scheid et al., 2013), como comentado anteriormente nesse texto. Uma vez que a NAC também reduziu a expressão de p-p-38 e a imunorreatividade a p-38 na medula espinal de ratos sham, nós sugerimos que estes resultados reforçam o efeito antinociceptivo da NAC em condições de dor.

Considerando todos os resultados do presente estudo, e dados anteriores desse grupo de pesquisa (Horst et al., 2014), nós propomos que a CCI induz aumento na formação de  $O_2^{\bullet-}$ , mas não no  $H_2O_2$ ; aumenta a expressão de p-p-38 e a imunorreatividade a p-38; induz acréscimo no mRNA do *NF- $\kappa$ B*; e aumenta o número de neurônios nitrérgicos na medula espinal, com conseqüente aumento na formação de NO. Apesar de não modificar a formação de  $O_2^{\bullet-}$  diretamente, nossa hipótese é que o tratamento com NAC, por sua ação como antioxidante, reduz os efeitos nociceptivos do  $O_2^{\bullet-}$ , o qual possui papel importante na hiperalgesia (Salvemini et al., 2011) e, assim, contribui para manter os valores de  $H_2O_2$  (Figura 7). Está demonstrado que o  $H_2O_2$  influencia a excitabilidade neuronal por modular a transmissão sináptica e a ativação de diversos canais iônicos (Frantseva et al., 1998; Mailly et al., 1999; Avshahunov & Rice, 2002; Bao et al., 2005; Keeble et al., 2009). O tratamento com NAC também é capaz de diminuir a expressão da p-p-38 e a imunorreatividade a p-38, além de reduzir o mRNA do *NF- $\kappa$ B*. Não é possível relacionar o efeito da p-38 com o do mRNA do *NF- $\kappa$ B*, embora seja sugerida alguma interação direta e indireta entre p-38 e *NF- $\kappa$ B* (Thompson & Eldik, 2009). A redução no *NF- $\kappa$ B* leva a uma diminuição na formação de NO e TNF- $\alpha$  (Figura 7), duas moléculas com papel importante na dor neuropática (Cury et al., 2011; Colloca et al., 2017). Foi demonstrado que as MAPKs estão implicadas na regulação da produção de citocinas e na regulação para cima de COX-2 e NOS induzida (Sánchez-Fidalgo et al., 2015). Assim, o efeito antinociceptivo da NAC em ratos com dor neuropática induzida por CCI envolve não apenas a ação antioxidante da NAC, mas também sua ação sobre mecanismos de sinalização intracelular, os quais influenciam posteriormente a formação de NO e de citocinas pró-inflamatórias como, por exemplo, o TNF- $\alpha$  (Figura 7). Estudos futuros poderão detalhar de forma mais refinada como a NAC diretamente determina as alterações descritas em nosso estudo. Isso, com certeza, poderá contribuir para um possível uso da NAC na dor neuropática, constituindo esse fármaco em mais um dos recursos que podem ser usados nessa condição dolorosa de difícil tratamento.

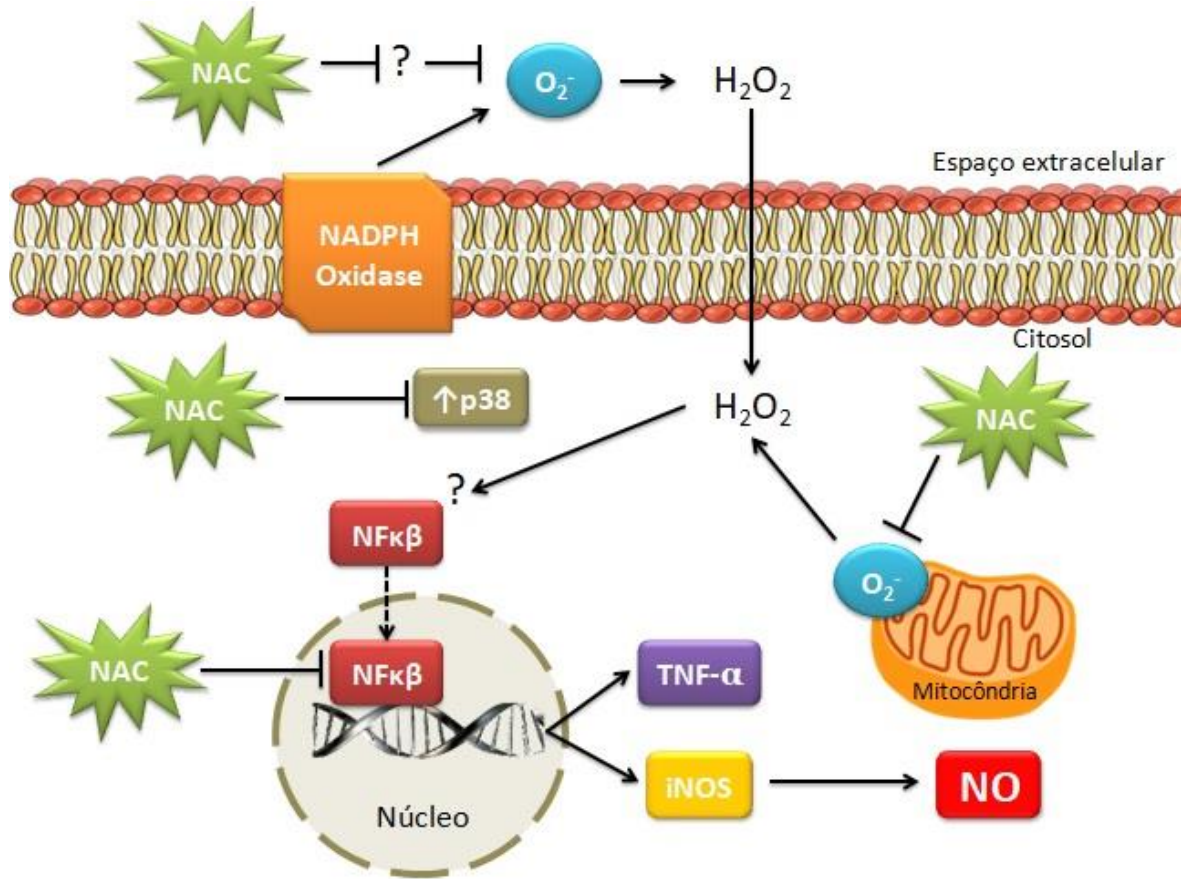


FIGURA 7: Esquema mostrando possíveis locais de ação da N-acetilcisteína (NAC) na medula espinal, os quais parecem contribuir para o efeito antinociceptivo dessa molécula em ratos com dor neuropática por CCI. —> Indica efeito sobre a molécula seguinte; —| indica efeito inibitório sobre a molécula; ----> representa a translocação para o núcleo. NADPH oxidase: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase. NF-κB: fator nuclear kappa B. TNF-alfa: fator de necrose tumoral tipo alfa. iNOS: enzima óxido nítrico sintase induzida. NO: óxido nítrico.  $O_2^{\bullet -}$ : ânion superóxido.  $H_2O_2$ : peróxido de hidrogênio. p38: proteína da família das quinases ativadas por mitógeno (MAPK).



## 7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Nosso estudo mostrou que o tratamento com NAC repetiu seu efeito antinociceptivo, o que já foi observado a partir do terceiro dia de tratamento. Foi demonstrado ainda, pela primeira vez, que esse tratamento determina recuperação mais rápida no IFI em animais com CCI. Paralelamente, o tratamento com NAC diminuiu os hidroperóxidos lipídicos e preveniu o aumento no teor de ácido ascórbico na medula espinal de ratos com CCI já no primeiro dia de tratamento, embora não tenha sido capaz de reduzir o aumento na formação de  $O_2^{\bullet-}$  nesse tecido. O tratamento com NAC também diminuiu na medula espinal dos ratos com CCI a expressão p-p-38 e a imunorreatividade a p-38 já no primeiro dia após o tratamento, além de reduzir o mRNA do *NF-κB* e a reatividade a NADPH-diaforase aos três dias após o início do tratamento. Dado a esse paralelismo entre ação antinociceptiva, melhora no IFI e alterações em mecanismos de sinalização intracelular e parâmetros de estresse oxidativo após tratamento com NAC, pode-se sugerir que o efeito analgésico da NAC se relaciona não apenas com a ação antioxidante da NAC, mas também com o complexo papel modulatório dessa molécula em vias de sinalização intracelular, como a da p-38 e a do *NF-κB*. Nesse sentido, ressalta-se a necessidade de avaliar moléculas de sinalização de apoptose/sobrevivência celular, como Bax e Bcl-2, além de marcadores específicos de neurônios e células da glia para melhor compreender nossos resultados e ampliar o conhecimento dos efeitos da NAC sobre a medula espinal de ratos com CCI.

Nesse sentido, deve ser ressaltado que ao considerarmos nossos resultados juntamente com aqueles da literatura, realizados em ratos e humanos, a NAC aparece como um potente candidato para o tratamento de condições de dor. Assim, pode-se sugerir que esse fármaco venha a auxiliar, como coadjuvante, no tratamento de dor neuropática, bem como de outras condições dolorosas, já que o efeito antinociceptivo da NAC também foi observado em ratos com lesão tecidual apenas, os ratos do grupo sham. Ressalta-se, porém, a importância de estudos em humanos para avaliar a eficácia clínica da NAC na dor neuropática, uma vez que essa condição dolorosa em humanos envolve não apenas aspectos comportamentais, mas também há envolvimento do sistema límbico, e muitas vezes está associada a outras comorbidades, fatores que não foram levados em consideração no presente estudo. Deve ser destacado ainda que nosso estudo avaliou um período de tempo curto, máximo 7 dias, e sabe-se que o quadro doloroso, independente da etiologia, corresponde a quadros de dores crônicas, e que a avaliação temporal em ratos não pode ser simplesmente extrapolada para humanos. Nesse sentido, será de grande relevância a realização de estudos que avaliem a eficácia da NAC em uso contínuo também em humanos.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aoyama K, Matsumura N, Watabe M, Nakaki T. Oxidative stress on EAAC1 is involved in MPTP-induced glutathione depletion and motor dysfunction. *Eur J Neurosci.* 2008; 27(1):20-30.
- Avshalumov M.V., Rice M.E. NMDA receptor activation mediates hydrogen peroxide-induced pathophysiology in rat hippocampal slices *J Neurophysiol.* 2002; 87(6):2896-903.
- Baliki M.N., Apkarian A.V. Nociception, Pain, Negative Moods, and Behavior Selection.) *Neuron.* 2015; 87: 474-491
- Basbaum, A.I., Bautista, D.M., Scherrer, G., Julius, D. Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. *Cell* 2009; 139(2): 267-284.
- Baeuerle, P.A., Henkel, T. *Annu. Rev. Immunol.* 1994; 12: 141-179.
- Bao F, Liu D. Hydroxyl Radicals Generated in the Rat Spinal Cord at the Level Produced by Impact Injury Induce Cell Death by Necrosis and Apoptosis: Protection by A Metalloporphyrin. *Neuroscience* 2004; 126: 285-295.
- Baron R, Binder A, Wasner G. Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment. *Lancet Neurol.* 2010; 9(8):807-19.
- Bennett, G.J.; Xie, Y.K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain*, 1988; 33: 87-107.
- Bernabucci M, Notartomaso S, Zappulla C, Fazio F, Cannella M, Motolese M, Battaglia G, Bruno V, Gradini R, Nicoletti F. N-acetyl-cysteine causes analgesia by

- reinforcing the endogenous activation of type-2 metabotropic glutamate receptors. *Molecular pain* 2012; 8:77-87
- Beyers, M. R.; Bonica, J. J. Peripheral pain mechanisms and nociceptor plasticity. In: Loeser, J. D.; Butler, S. H.; Chapman, R.; Turk, D.C. *Bonica's management of pain*, Lippincott Williams and Wilkins, 2001; 26-27.
- Bonica JJ, Loeser JD. Historis of pain contceps and therapies. In Loeser JD et al., *Bonica's management of pain*. Philadelphia: Linppicott Willians & Wilkins 2001; p:3-25.
- Bordt E.A, Polster B.M. NADPH oxidase- and mitochondria-derived reactive oxygen species in proinflammatory microglial activation: a bipartisan affair? *Free Radic Biol Med*. 2014 Nov;76:34-46.
- Bridges RJ, Natale NR, Patel SA. System xc(-) cystine/glutamate antiporter: an update on molecular pharmacology and roles within the CNS. *Br J Pharmacol* 2012; 165: 20-34.
- Buege, J.A.; Aust, S.D. Microsomal lipid peroxidation, *Methods in Enzymology*, v.52 p.302-310, 1987.
- Carey ET, As-Sanie S. New developments in the pharmacotherapy of neuropathic chronic pelvic pain. *Future Sci OA*. 2016; 5;2(4):FSO148
- Chen X, Tomchick DR, Kovrigin E, Arac D, Machius M, Sudhof TC , Rizo J) Three-dimensional structure of the complexin/SNARE complex. *Neuron*. 2002; 33: 397-409
- Chen NF, Chen WF, Sung CS, Lu CH, Chen CL, Hung HC, et al. Contributions of p38 and ERK to the antinociceptive effects of TGF- $\beta$ 1 in chronic constriction injury-induced neuropathic rats. *J Headache Pain* 2016; 17:72.
- Cheng JK, Ji RR. Intracellular signaling in primary sensory neurons and persistent pain. *Neurochem Res*. 2008; 33(10):1970-8.
- Chiou LC, Hu SS, Ho YC. Targeting the cannabinoid system for pain relief? *Acta Anaesthesiol Taiwan* 2013; 51: 161-170.
- Cohen SP, Mao J. Neuropathic pain: mechanisms and their clinical implications. *BMJ*. 2014 Feb 5;348:f7656.
- Colloca L, Ludman T, Bouhassira D, Baron R, Dickenson AH, Yarnitsky D, et al. Neuropathic pain. *Nat Rev Dis Primers* 2017; 16: 17002.
- Costigan M, Moss A, Latremoliere A, Johnston C, Verma-Gandhu M, Herbert TA, Barrett L, Brenner GJ, Vardeh D, Woolf CJ, Fitzgerald M. T-cell infiltration and

- signaling in the adult dorsal spinal cord is a major contributor to neuropathic pain-like hypersensitivity. *J Neurosci.* 2009; 18;29(46):14415-22.
- Covarrubias-Pinto A, Acuña AI, Beltrán FA, Torres-Díaz L, Castro MA. Old Things New View: Ascorbic Acid Protects the Brain in Neurodegenerative Disorders. *Int J Mol Sci.* 2015; 27;16(12):28194-217.
- Cury Y, Picolo G, Gutierrez VP, Ferreira SH. Pain and analgesia: The dual effect of nitric oxide in the nociceptive system. *Nitric Oxide.* 2011; 30;25(3):243-54.
- Das V. An introduction to pain pathways and pain “targets”. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2015; 131: 1-30.
- de Medinaceli L, Freed WJ, Wyatt RJ. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Exp Neurol.* 1982; 77(3):634-43.
- de Zwart LL, Meerman JH, Commandeur JN, Vermeulen NP. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Radic Biol Med.* 1999; 26(1-2):202-26.
- Dias EC, Rigotto RM, Augusto LG, Cancio J, Hoefel Mda G. Environmental and workers' health, within the framework of primary health care in the Brazilian National Health System (SUS): opportunities and challenges]. *Cien Saude Colet.* 2009; 14(6):2061-70.
- D`Mello R.; Dickenson, A.H. Spinal cord mechanisms of pain. *Br J. Anaesth.* 2008; 101(1) 8-16.
- Dhouib IE, Jallouli M, Annabi A, Gharbi N, Elfazaa S, Lasram MM. A minireview on N-acetylcysteine: An old drug with new approaches. *Life Sci* 2016; 151: 359-363.
- Dubner, R. Pain research in animals. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1983; 75: 128-132.
- d'Ischia M, Napolitano A, Manini P, Panzella L. Secondary targets of nitrite-derived reactive nitrogen species: nitrosation/nitration pathways, antioxidant defense mechanisms and toxicological implications. *Chem Res Toxicol.* 2011; 19;24(12):2071-92.
- Ercan Sözbir E, Nazıroğlu M. Diabetes enhances oxidative stress-induced TRPM2 channel activity and its control by N-acetylcysteine in rat dorsal root ganglion and brain. *Metab Brain Dis* 2016; 31: 385–393.
- Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem.* 2004; 37(4):277-85.

- Farr SA, Poon HF, Dogrukol-Ak D, Drake J, Banks WA, Eyerman E, et al. The antioxidants  $\alpha$ -lipoic acid and N-acetylcysteine reverse memory impairment and brain oxidative stress in aged SAMP8 mice. *J Neurochem*. 2003; 84:1173–83.
- Fein A. *NOCICEPTORS: The Cells That Sense Pain*. 2011
- Finkel T. Oxygen radicals and signaling *Curr. Opin. Cell Biol*. 1998; 10: 248-253.
- Finnerup NB, Attal N. Pharmacotherapy of neuropathic pain: time to rewrite the rulebook? *Pain Manag*. 2016; 6, 1-3
- Frantseva MV, Perez Velazquez JL, Carlen PL. Changes in membrane and synaptic properties of thalamocortical circuitry caused by hydrogen peroxide. *J Neurophysiol*. 1998; 80(3):1317-26.
- Fridovich I. Oxygen toxicity: a radical explanation. *J Exp Biol*. 1998; 201(8):1203-9. Review.
- Gardiner J.; Barton, D.; Overall, R.; Marc J. Neurotrophic support and oxidative stress: converging effects in the normal and diseased nervous system. *Neuroscientist*. 2009; 15: 47-61.
- Geis C, Geuss E, Sommer C, Schmidt HH, Kleinschnitz C. NOX4 is an early initiator of neuropathic pain. *Exp Neurol*. 2017; 288:94-103.
- Gilron I, Watson PN, Cahill M, Moulin DE. Neuropathic pain: a practical guide for clinician. *CMAJ*. 2006; 175: 265 – 275.
- Goecks CS, Horst A, Moraes MS, Scheid T, Kolberg C, Belló-Klein A, Partata WA. Assessment of oxidative parameters in rat spinal cord after chronic constriction of the sciatic nerve. *Neurochem Res*. 2012; 37(9):1952-8.
- González A, Moreno N, López JM. Distribution of NADPH-diaphorase/ nitric oxide synthase in the brain of the caecilian *Dermophis mexicanus* (Amphibia: Gymnophiona): comparative aspects in amphibians. *Brain Behav Evol* 2002; 60: 80-100.
- Grace PM, Gaudet AD, Staikopoulos V, Maier SF, Hutchinson MR, Salvemini D, Watkins LR. Nitroxidative Signaling Mechanisms in Pathological Pain. *Trends Neurosci*. 2016; 39(12):862-879.
- Graham RC Jr, Karnovsky MJ. The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: ultrastructural cytochemistry by a new technique. *J Histochem Cytochem*. 1966 Apr;14(4):291-302.

- Guedes RP , Dal Bosco L, Teixeira CM, Araújo ASR, Llesuy S, Belló-Klein A, Ribeiro MFM, Partata WA. Neuropathic Pain Modifies Antioxidant Activity in Rat Spinal Cord. *Neurochem Res* 2006; 31: 603–609.
- Guedes RP , Araújo ASR, Janner, D., Belló-Klein A, Ribeiro MFM, Partata WA. Increase in reactive oxygen species and activation of Akt signaling pathway in neuropathic pain. *Cell. Mol. Neurobiol.* 2008; 28(8): 1049-56.
- Guedes RP , Dal Bosco L, Araújo ASR, Belló-Klein A, Ribeiro MFM, Partata WA. Sciatic nerve transection increase glutathione antioxidant system activity and neuronal nitric oxide synthase expression in the spinal cord. *Brain Res. Bull.* 2009 80(6): 422-7.
- Gwak YS, Hassler SE, Hulsebosch CE. Reactive oxygen species contribute to neuropathic pain and locomotor dysfunction via activation of CamKII in remote segments following spinal cord contusion injury in rats. *Pain.* 2013; 154(9):1699-708.
- Halliwell B, Gutteridge J. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4th edn. New York: Oxford University Press Inc. 2007
- Halliwell B. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutr Rev.* 2012; 70(5):257-65
- Hongpaisan J, Winters CA, Andrews SB. Strong calcium entry activates mitochondrial superoxide generation, upregulating kinase signaling in hippocampal neurons. *J Neurosci.* 2004; 1;24(48):10878-87.
- Horst A, Kolberg C, Moraes MS, Finamor IA, Belló-Klein A, Pavanato MA, et al. Effect of N-acetylcysteine on the spinal-cord glutathione system and nitric-oxide metabolites in rats with neuropathic pain. *Neurosc Lett* 2014; 569: 163-168.
- Horst A, de Souza JA, Santos MC, Riffel AP, Kolberg C, Ribeiro MF, et al. N-acetylcysteine downregulates phosphorylated p-38 expression but does not reverse the increased superoxide anion levels in the spinal cord of rats with neuropathic pain. *Braz J Med Biol Res.* 2017; 50: e5801.
- Hu JY, Li CL, Wang YW. Intrathecal administration of triptolide, a T lymphocyte inhibitor, attenuates chronic constriction injury-induced neuropathic pain in rats. *Brain Res* 2012; 1436: 122-129.
- IASP – International Association for the Study of Pain. Subcommittee on taxonomy. Classification of chronic pain. Description of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. *Pain, Suppl.* 2008; 3: S1-S226.

- Jadhao AG, Biswas SP, Bhoyar RC, Pinelli C. The distribution of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-diaphorase (NADPH-d) in the medulla oblongata, spinal cord, cranial and spinal nerves of frog, *Microhyla ornata*. *J Chem Neuroanat* 2017; 81: 76-86.
- Jaggi AS, Jain V, Singh N. Animal models of neuropathic pain. *Fundam Clin Pharmacol* 2011, 25: 1-28.
- Janes K, Neumann WL, Salvemini D. Anti-superoxide and anti-peroxynitrite strategies in pain suppression. *Biochim Biophys Acta*. 2012; 1822(5):815-21.
- Jin SX, Zhuang ZY, Woolf CJ, Ji,RR. p38 Mitogen-activated protein kinase is activated after a spinal nerve ligation in spinal cord microglia and dorsal root ganglion neurons and contributes to the generation of neuropathic pain. *J Neurosci* 2003; 23: 4017–4022.
- Kamboj SS, Chopra K, Sandhir R. Neuroprotective effect of N-acetylcysteine in the development of diabetic encephalopathy in streptozotocin-induced diabetes. *Metab Brain Dis*. 2008; 23(4):427-43.
- Kato N, Matsumoto M, Kogawa M, Atkins GJ, Findlay DM, Fujikawa T. Critical role of p38 MAPK for regeneration of the sciatic nerve following crush injury *in vivo*. *J Neuroinflammation* 2013; 10: 1
- Kavaliers, M. Evolutionary and comparative aspects of nociception. *Brain Res. Bull*. 1988; 21:923-931.
- Keeble JE, Bodkin JV, Liang L, Wodarski R, Davies M, Fernandes ES, Coelho Cde F, Russell F, Hydrogen peroxide is a novel mediator of inflammatory hyperalgesia, acting via transient receptor potential vanilloid 1-dependent and independent mechanisms. *Pain*. 2009;141(1-2):135-42
- Kennedy KA, Sandiford SD, Skerjanc IS, Li SS. Reactive oxygen species and the neuronal fate. *Cell Mol Life Sci*. 2012; 69(2):215-21.
- Khodr B, Khalil Z. Modulation of inflammation by reactive oxygen species implications for aging and tissue repair. *Free Rad. Biol. Med*. 2001; 30: 1-8.
- Kim HY, Lee I, Chun S W, Kim HK. Reactive oxygen species donors increase the responsiveness of dorsal horn neurons and induce mechanical hyperalgesia in rats. *Neural Plast* 2015; 2015.
- Kuo CT, Veselits ML, Leiden JM. A transcriptional regulator of single-positive T cell quiescence and survival. *Science* 1997; 277: 1986–1990.



- Klusáková, I.; Dubový, P. Experimental models of peripheral neuropathic pain based on traumatic nerve injuries – An anatomical perspective. *Ann. Anat.* 2009; 181: 248-259.
- Kuboyama K, Tsuda M, Tsutsui M, Toyohara Y, Tozaki-Saitoh H, Shimokawa H, et al. Reduced spinal microglial activation and neuropathic pain after nerve injury in mice lacking all three nitric oxide synthases. *Mol Pain* 2011; 7: 50.
- Ledeboer A, Gamanos M, Lai W, Martin D, Maier SF, Watkins LR, Quan N: Involvement of spinal cord nuclear factor kappaB activation in rat models of proinflammatory cytokine-mediated pain facilitation. *Eur. J. Neurosci.* 2005; 22:1977-1986
- Leopoldino AA, Diz JB, Martins VT, Henschke N, Pereira LS, Dias RC, Oliveira VC. Prevalence of low back pain in older Brazilians: a systematic review with meta-analysis. *Rev Bras Reumatol* 2016 56(3):258-69.
- Lewén, A.; Matz, P.; Chan, P.H. Free radical pathways in CNS injury. *J. of Neurot.* 2000; 179(10) 871-90.
- Li J, Xu L, Deng X, Jiang C, Pan C, Chen L, et al. N-acetyl-cysteine attenuates neuropathic pain by suppressing matrix metalloproteinases. *Pain.* 2016; 157:1711-1723.
- Little JW, Doyle T, Salvemini D. Reactive nitroxidative species and nociceptive processing: determining the roles for nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite in pain. *Amino Acids* 2012; 42: 75-94.
- Lee MK, Han SR, Park MK, Kim MJ, Bae YC, Kim SK, et al. Behavioral evidence for the differential regulation of p-p38 MAPK and p-NF-κB in rats with trigeminal neuropathic pain. *Mol Pain* 2011; 7: 57.
- Levonen AL Activation of stress signaling pathways by oxidized and nitrated lipids. *Free Radic Biol Med.* 2014;75 Suppl 1:S8.
- Loeser JD The future. Will pain be abolished or just pain specialists? *Minn Med.* 2001; 84(7):20-1.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193(1):265-75.
- Ma W, Bisby MA: Increased activation of nuclear factor kappa B in rat lumbar dorsal root ganglion neurons following partial sciatic nerve injuries. *Brain Res* 1998; 797: 243-254.
- Machelska H, Celik MÖ. Recent advances in understanding neuropathic pain: glia, sex differences, and epigenetics. *F1000Res.* 2016; 22;5:2743.

- Magrinelli F, Zanette G, Tamburin S. Neuropathic pain: diagnosis and treatment. *Pract Neurol.* 2011; 13(5):292-307.
- Mailly F, Marin P, Israël M, Glowinski J, Prémont J. Increase in external glutamate and NMDA receptor activation contribute to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced neuronal apoptosis. *J Neurochem.* 1999; 73(3):1181-8.
- Marsala J, Orendáčová J, Lukáčová N, Vanický I. Traumatic injury of the spinal cord and nitric oxide. *Prog Brain Res* 2007; 161: 171-183.
- May JM. The SLC23 family of ascorbate transporters: ensuring that you get and keep your daily dose of vitamin C. *Br J Pharmacol.* 2011; 164(7):1793-801
- May JM, Qu ZC, Qiao H. Transfer of ascorbic acid across the vascular endothelium: mechanism and self-regulation. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2009; 297(1):C169-78.
- McDermott AM, Toelle TR, Rowbotham DJ, Schaefer CP, Dukes EM. The burden of neuropathic pain: results from a cross-sectional survey. *Eur J Pain.* 2006; 10(2):127-35.
- Millan, J. M.. The induction of pain: an integrative review. *Prog. Neurobiol.* 1999; 57: 1-164,
- Mittal, C. K., Murad, F., Properties and oxidative regulation of guanylate cyclase. *J. Cyclic Nucleotide Research.* 1977; 3 (6): 381-91
- Mittal M, Siddiqui MR, Tran K, Reddy SP, Malik AB. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxid Redox Signal.* 2014; 1;20(7):1126-67.
- Miyoshi K, Obata K, Kondo T, Okamura H, Noguchi K. Interleukin-18-mediated microglia/astrocyte interaction in the spinal cord enhances neuropathic pain processing after nerve injury. *J. Neurosci.* 2008; 28:12775-12787
- Monte-Raso, V.V.; Barbieri, C.H.; Mazzer, N. Fazan, V.P.S. Os efeitos do ultra-som terapêutico nas lesões por esmagamento do nervo ciático de ratos: análise funcional da marcha. *Revista Brasileira de Fisioterapia* 2006, v.10, n.1, p.113-119.
- Moreno N, López JM, Sánchez-Camacho C, Crespo M, Muñoz M, González A. Early development of NADPH diaphorase-expressing neurons in the brain of the urodele amphibian *Pleurodeles waltl*. *Brain Res Bull* 2002; 57: 409-412.
- Mosley RL, Benner EJ, Kadiu I, Thomas M, Boska MD, Hasan K, Laurie C, Gendelman HE. Neuroinflammation, oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Clin. Neurosci Res.* 2006; 6(5): 261-281.

- Naik AK, Tandan SK, Dudhgaonkar SP, Jadhav SH, Kataria M, Prakash VR, Kumar D. Role of oxidative stress in pathophysiology of peripheral neuropathy and modulation by N-acetyl-L-cysteine in rats. *European Journal of Pain*; 2006; 10: 573 – 579.
- Nakazato-Imasato E, Kurebayashi Y. Pharmacological characteristics of the hind paw weight bearing difference induced by chronic constriction injury of the sciatic nerve in rats. *Life Sci* 2009; 84: 622-626.
- Ni H-D, Yao M, Huang B, Xu L-S, Zheng Y, Chu Y-X, et al. Glial Activation in the Periaqueductal Gray Promotes Descending Facilitation of Neuropathic Pain Through the p38 MAPK Signaling Pathway. *J Neurosc Res* 2016; 94: 50–61.
- Nickel FT, Seifert F, Lanz S, Maihöfner C. Mechanisms of neuropathic pain. *Eur Neuropsychopharmacol* 2012; 22: 81-91.
- Nishikawa, M.; Haschida, M.; Takakura, Y. Catalase delivery for inhibiting ROS-mediated tissue injury and tumor metastasis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2009; 61(4): 319-26.
- Ossipov MH, Morimura K, Porreca F. Descending pain modulation and chronification of pain. *Curr Opin Support Palliat Care*. 2014; 8(2):143-51.
- Pathak NN, Balaganur V, Lingaraju MC, Kant V, Latief N, More AS, Kumar D, Kumar D, Tandan SK. Atorvastatin attenuates neuropathic pain in rat neuropathy model by down-regulating oxidative damage at peripheral, spinal and supraspinal levels. *Neurochem Int*. 2014; 68:1-9.
- Partata WA, Krepsky AM, Marques M, Achaval M. Axotomy increases NADPH-diaphorase activity in the dorsal root ganglia and lumbar spinal cord of the turtle *Trachemys dorbigni*. *Braz J Med Biol Res* 1999; 32: 489-493.
- Pimenta CA. Cultural concepts and the pain experience]. *Rev Esc Enferm USP*. 1998; 32(2):179-86
- Poljsak B, Šuput D, Milisav I. Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants. *Oxid Med Cell Longev*. 2013; 2013:956792.
- Popiolek-Barczyk K, Mika J. Targeting the Microglial Signaling Pathways: New Insights in the Modulation of Neuropathic Pain *Curr Med Chem*. 2016; 23(26):2908-292

- Qu YJ, Zhang X, Fan ZZ, Huai J, Teng YB, Zhang Y, et al. Effect of TRPV4-p38 MAPK Pathway on Neuropathic Pain in Rats with Chronic Compression of the Dorsal Root Ganglion. *Biomed Res Int* 2016; 2016: 6978923.
- Queiroz LP, Silva Junior AA. The prevalence and impact of headache in Brazil. *Headache*. 2015 ;55:32-8.
- Ramos-Vasconcelos GR, Cardoso LA, Hermes-Lima M. Seasonal modulation of free radical metabolism in estivating land snails *Helix aspersa*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2005; 140(2):165-74.
- Ray PD, Huang BW, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal*. 2012; 24(5):981-90.
- Reid AJ, Shawcross SG, Hamilton AE, Wiberg M, Terenghi G. N-acetylcysteine alters apoptotic gene expression in axotomised primary sensory afferent subpopulations. *Neurosci Res* 2009; 65: 148-155.
- Rice ASC, Hill RG. New Treatments For Neuropathic Pain. *Annu Rev. Med*; 2006; 57:535–51.
- Rice, M. E. and Russo-Menna, I. Differential compartmentalization of brain ascorbate and glutathione between neurons and glia. *Neuroscience* 1998; 82, 1213-1223.
- Rice ME. Ascorbate regulation and its neuroprotective role in the brain. *Trends Neurosci*. 2000; 23(5):209-16.
- Riffel AP, de Souza JA, Santos M C, Horst A, Scheid T, Kolberg C, et al. Systemic administration of vitamins C and E attenuates nociception induced by chronic constriction injury of the sciatic nerve in rats. *Brain Res Bull* 2016; 121: 169-177.
- Robaczewska J, Kedziora-kornatowska K, Kozakiewicz M, Zary-Sikorska E, Pawluk H, Pawliszak W, et al. Role of glutathione metabolism and glutathione-related Antioxidant defense systems in hypertension. *J Physiol Pharmacol* 2016; 67: 331–337.
- Roberts, R.A.; Smith, R.A.; Safe, S.; Szabo, C.; Tjalkens, R.B.; Robertson, F.M. Toxicological and pathophysiological roles of reactive oxygen and nitrogen species. *Toxicology*, 2010; v.276(2), p.85-94
- Salvemini D, Little JW, Doyle T, Neumann WL. Roles of reactive oxygen and nitrogen species in pain. *Free Radic Biol Med*. 2010; 1;51(5):951-66.
- Samuni Y, Goldstein S, Dean OM, Berk M. The chemistry and biological activities of N-acetylcysteine. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1830: 4117–4129.

- Sánchez-Fidalgo S, Villegas I, Rosillo MÁ, Aparicio-Soto M, de la Lastra CA. Dietary squalene supplementation improves DSS-induced acute colitis by downregulating p38 MAPK and NFkB signaling pathways. *Mol Nutr Food Res* 2015; 59: 284-292.
- Scheid T, Bosco LD, Guedes RP, Pavanato MA, Belló-Klein A, Partata WA. Sciatic nerve transection modulates oxidative parameters in spinal and supraspinal regions. *Neurochem Res* 2013; 38: 935-942.
- Schreck, R., Rieber, P., Baeuerle, P.A. *EMBO J.* 199; 10. 2247-58.
- Schreck, R., Albermann, K., Baeuerle, P.A. (1992). *Free Radic. Res. Commun.* 17. 221-237.
- Seutin V, Scuvée-Moreau J, Massotte L, Dresse A. Hydrogen peroxide hyperpolarizes rat CA1 pyramidal neurons by inducing an increase in potassium conductance. *Brain Res.* 1995 ; 19;683(2):275-8
- Sies H Role of metabolic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation: redox signaling and oxidative stress. *J Biol Chem.* 2014; 28;289(13):8735-41.
- Sorg O. Oxidative stress: a theoretical model or biological reality? *C R Biol.* 2004; .327: 649-662.
- Sharma P, Evans AT, Parker PJ, Evans FJ. NADPH-oxidase activation by protein kinase C-isotypes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991; 28;177(3):1033-40.
- Shichiri M. The role of lipid peroxidation in neurological disorders. *J Clin Biochem Nutr.* 2014; 54(3):151-60
- Szabo C. Role of poly(ADP-ribose)synthetase in inflammation. *Eur. J. Pharmac.* 1998; 350:1-19.
- Tompkins DA, Hobelmann JG, Compton P. Providing chronic pain management in the "Fifth Vital Sign" Era: Historical and treatment perspectives on a modern-day medical dilemma. *Drug Alcohol Depend.* 2017; 1;173 Suppl 1:S11-S21.
- Thompson WL, van Eldik LJ. Inflammatory cytokines stimulate the chemokines CCL2/MCP-1 and CCL7/MCP-3 through NFkB and MAPK dependent pathways in rat astrocytes. *Brain Res* 2009; 1287; 47-57.
- Toth C, Martinez JA, Liu WQ, Diggle J, Guo GF, Ramji N, Mi R, Hoke A, Zochodne DW. Local erythropoietin signaling enhances regeneration in peripheral axons. *Neuroscience* 2008; 154: 767–783.
- Trachootham D, Lu W, Ogasawara MA, Nilsa RD, Huang P. Redox regulation of cell survival. *Antioxid Redox Signal.* 2008;10(8):1343-74.

- Truini A, Piroso S, Pasquale E, Notartomaso S, Di Stefano G, Lattanzi R, et al. N-acetylcysteine, a drug that enhances the endogenous activation of group-II metabotropic glutamate receptors, inhibits nociceptive transmission in humans. *Mol Pain* 2015;11:14.
- Tsuda M. Spinal dorsal horn astrocytes: New players in chronic itch. *Allergol Int.* 2017 Jan;66(1):31-35.
- Vanderah, T.W Pathophysiology of pain. *Med Clin North Am.* 2007; 91(1):1-12.
- Van Hecke, O, Austin SK, Khan RA, Smith BH, Torrance N: Neurophatic pain in the general population: a systemathic review of epidemiological studies.. *Pain* 2014; 155: 654-662
- von Hehn CA, Baron R, Woolf CJ. Deconstructing the neuropathic pain phenotype to reveal neural mechanisms. *Neuron.* 2012 Feb 23;73(4):638-52.
- Xu JT, Xin WJ, Wei, XH, Wu CY, Ge YX, Liu YL, Zang Y, Zhang T, Li YY, Liu XG. p38 activation in uninjured primary afferent neurons and spinal microglia contributes to the development of neuropathic pain induced by selective motor fiber injury. *Experimental Neurobiology.* 2007; 204: 355 – 365.
- Xu Q, Yaksh TL. A brief comparison of the pathophysiology of inflammatory versus neuropathic pain. *Curr Opin Anaesthesiol.* 2011; 24(4):400-7
- Zanelli SA, Ashraf QM, Mishra OP. Nitration is a mechanism of regulation of the NMDA receptor function during hypoxia. *Neuroscience.* 2002; 112(4):869-77.
- Zimmermann, M Pathobiology of neuropathic pain. *Eur. J. Pharmacol.* 2001 429: 23-37.
- Zhou J, Wang L, Wang J, Wang C, Yang Z, Wang C, et al. Paeoniflorin and Albiflorin Attenuate Neuropathic Pain via MAPK Pathway in Chronic Constriction Injury Rats. *Evid Based Complement Alternat Med* 2016; 2016: 8082753.
- Wang HD, Pagano PJ, Du Y, Cayatte AJ, Quinn MT, Brecher P, et al. Superoxide anion from the adventitia of the rat thoracic aorta inactivates nitric oxide. *Circ Res* 1998; 82: 810-818.
- Winrow VR, Winyard PG, Morris CJ, Blake DR. Free radicals in inflammation: second messengers and mediators of tissue destruction. *Br. Med. Bull.* 1993; 49: 506-522.
- Winterbourn CC, Hampton MB. Thiol chemistry and specificity in redox signaling. *Free Radic Biol Med.* 2008; 1;45(5):549-61.

- Wong CM<sup>1</sup>, Marcocci L, Das D, Wang X, Luo H, Zungu-Edmondson M, Suzuki YJ. Mechanism of protein decarbonylation *Free Radic Biol Med*. 2013 Dec;65:1126-33
- Yin Q, Fan Q, Zhao Y, Cheng MY, Liu H, Li J, et al. Spinal NF- $\kappa$ B and chemokine ligand 5 expression during spinal glial cell activation in a neuropathic pain model. *PLoS One*. 2015; 10: e0115120.
- Yowtak, J., Lee K. Y., Kim, H.Y., Wang, J., Kim, H.K., Chung, K ., Chung, J. M. Reactive oxygen species contribute to neuropathic pain by reducing spinal GABA release. *International Association for the Study of Pain* 2013; 152(4): 844-52