

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 DO TRATAMENTO COM N-ACETILCISTEÍNA SOBRE PARÂMETROS
NOCICEPTIVO E DE ESTRESSE OXIDATIVO E NITROSATIVO EM MEDULA
ESPINAL DE RATOS COM CONSTRIÇÃO NO NERVO ISQUIÁTICO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ANDRÉA HORST

PORTO ALEGRE, 2011

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 DO TRATAMENTO COM N-ACETILCISTEÍNA SOBRE PARÂMETROS
NOCICEPTIVO E DE ESTRESSE OXIDATIVO E NITROSATIVO EM MEDULA
ESPINAL DE RATOS COM CONSTRIÇÃO NO NERVO ISQUIÁTICO**

Andréa Horst

Orientadora: Prof. Dra. Wania Aparecida Partata

Dissertação 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
mestre em Fisiologia

PORTO ALEGRE, 2011

**“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.

À minha família, principalmente aos meus pais, Cristina e Eduardo, pelo incentivo constante à busca pelo crescimento e realização pessoal.

Ao Fernando, pelo carinho, companherismo de todos os dias e por ter sido compreensivo nos momentos difíceis.

Aos colegas de laboratório de Neurobiologia Comparada pela amizade, e convivência. Principalmente à Taína e a Maira pelo auxílio na realização 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.

Ao pessoal do Laboratório de Espécies Ativas de Oxigênio pela disponibilidade e auxílio que permitiu a realização de alguns experimentos.

À FAPERGS e CNP pelo auxílio financeiro que possibilitou a realização desse trabalho.

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

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	VII
LISTA DE FIGURAS.....	IX
LISTA DE TABELAS.....	XI
RESUMO.....	XII
INTRODUÇÃO.....	01
OBJETIVOS.....	12
1. Objetivo geral.....	12
2. Objetivos específicos.....	12
MATERIAL E MÉTODOS.....	14
1. Animais: procedência e manutenção.....	14
2. Crupos experimentais.....	14
3. Constrição no nervo isquiático.....	16
4. Tratamento com N-acetilcisteína.....	18
5. Teste da placa quente.....	19
6. Teste dos Filamentos de Von Frey.....	20
7. Preparação das amostras.....	21
7. Determinação da atividade da Glutaciona Peroxidase (GPx).....	21
8. Determinação da atividade da Glutaciona Transferase (GST).....	22
9. . Determinação da razão de Glutaciona oxidada /reduzida.....	22
10. Determinação de Peróxido de Hidrogênio.....	23
11. Determinação de Nitritos+Nitratos.....	23

12. Avaliação de parâmetros bioquímicos no plasma.....	24
13. Técnica de Hematoxilina e Eosina no tecido hepático.....	24
14. Análise Estatística.....	26
RESULTADOS.....	27
1. Teste da placa quente.....	27
2. Teste dos Filamentos de Von Frey.....	29
3. Atividade da enzima Glutathione peroxidase.....	31
4. Atividade da enzima Glutathione transferase.....	33
5. Razão da Glutathione oxidada/reduzida.....	35
6. Valores de Peróxido de Hidrogênio.....	37
7. Valores de Nitritos+Nitratos.....	39
8. Resultados das determinações no plasma.....	41
9. Hematoxilina e eosina no tecido hepático.....	42
DISCUSSÃO.....	43
CONCLUSÃO.....	49
CONSIDERAÇÕES FINAIS	50
REFERÊNCIAS.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA – análise de variância
ATP – adenosina trifosfato
CAT – enzima catalase
CDNB – 1-cloro-2,4 dinitro benzeno
cGMP – guanilato monofosfato cíclico
CN – grupo constrição nervosa
CNn- grupo constrição nervosa tratado com NAC
CNs – grupo constrição nervosa tratado com salina
CT – grupo controle
CTn – grupo controle tratado com NAC
CTs – grupo controle tratado com salina
DNP-SG – 2,4-dinitro-fenil-glutationa
DTPA – ácido dietilenotriamina penta acético
EROs – espécies reativas de oxigênio
Gama GT - gama glutamiltransferase
G6P – glicose 6 fosfato
G6PDH – glicose 6 fosfato desidrogenase
GPx – glutaciona peroxidase
GSH – glutaciona na forma reduzida
GSSG – glutaciona na forma oxidada
GST – enzima glutaciona transferase
H₂O₂ – peróxido de hidrogênio
IASP – *International Association for the Study of Pain*
JNK - c-Jun N-terminal cinase
NAC – N-acetilcisteína
NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NEM - N-etilmaleimida
NF-κB – fator nuclear κB
NO – óxido nítrico

NOS – óxido nítrico sintase

NR – nitrato redutase

O₂ - oxigênio molecular

O₂^{•-} - ânion superóxido

OH[•] - radical hidroxil

ONOO⁻ - peroxinitrito

PMSF – fenilmetilsulfonil fluoreto

S – grupo Sham

Sn – grupo Sham tratado com NAC

SNC – sistema nervoso central

SOD – enzima superóxido dismutase

Ss – grupo Sham tratado com salina

TBARS – substância reativa ao ácido tiobarbitúrico

TBOOH – hidroperóxido de ter-butila

TGO – transaminase glutâmica oxalacética

TGP – transaminase glutâmica pirúvica

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 – Vias nociceptivas da periferia ao SNC.

Figura 02 – Redução tetravalente do oxigênio molecular (O_2) na mitocôndria até a formação de água (H_2O).

Figura 03 – Ilustração do sistema antioxidante enzimático e não-enzimático.

Figura 04 – Esquema de um segmento da medula espinal ilustrando a formação do nervo isquiático pela união das raízes dorsais e ventrais da medula espinal.

Figura 05 – Aparelho utilizado no teste da placa quente.

Figura 06 – Aparelho utilizado no teste de Von Frey.

Figura 07 – Latência de resposta (segundos) ao teste de sensibilidade térmica na placa quente em ratos que receberam administração intraperitoneal de solução salina e N-acetilcisteína na dose de 150 mg/kg/dia.

Figura 08 – Respostas ao teste de sensibilidade mecânica aos filamentos de Von Frey em ratos que receberam administração intraperitoneal de solução salina e N-acetilcisteína na dose de 150 mg/kg/dia.

Figura 09 – Atividade da enzima glutatona peroxidase (expressa em nmoles/min/mg proteína) em medula espinal de ratos que receberam administração intraperitoneal de solução salina e N-acetilcisteína, na dose de 150 mg/kg/dia, por 3 e 10 dias após serem submetidos à manipulação e à constrição no nervo isquiático direito.

Figura 10 – Atividade da enzima glutatona transferase (expressa em pmol/min/mg proteína) em medula espinal de ratos que receberam administração

intraperitoneal de solução salina e N-acetilcisteína, na dose de 150 mg/kg/dia, por 3 e 10 dias após serem submetidos à manipulação e à constrição no nervo isquiático direito.

Figura 11 – Razão entre glutatona reduzida e oxidada (expressa em mmol/mg de tecido) em medula espinal de ratos que receberam administração intraperitoneal de solução salina e N-acetilcisteína, na dose de 150 mg/kg/dia, por 3 e 10 dias após serem submetidos à manipulação e à constrição no nervo isquiático direito.

Figura 12 – Quantificação de peróxido de hidrogênio (em nmoles H_2O_2 /mg tecido) em medula espinal de ratos que receberam administração intraperitoneal de solução salina e N-acetilcisteína, na dose de 150 mg/kg/dia, por 3 e 10 dias após serem submetidos à manipulação e à constrição no nervo isquiático direito.

Figura 13 – Relação de Nitritos+Nitratos (expressa em mmol/L) em medula espinal de ratos que receberam administração intraperitoneal de solução salina e N-acetilcisteína, na dose de 150 mg/kg/dia, por 3 e 10 dias após serem submetidos à manipulação e à constrição no nervo isquiático direito.

Figura 14 – Fotomicrografias de secções coronais de fígado de ratos que receberam administração intraperitoneal de solução salina e N-acetilcisteína, na dose de 150 mg/kg/dia, por 3 e 10 dias.

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Organização dos grupos experimentais

Tabela 02 – Valores de gama GT, TGO, TGP, bilirrubina e creatinina em plasma de ratos que receberam administração intraperitoneal de solução salina e N-acetilcisteína, na dose de 150 mg/kg/dia, por 3 e 10 dias.

RESUMO

Estudos mostram o envolvimento das espécies reativas de oxigênio (EROs) nos distintos tipos de dor, porém ainda se desconhece o papel efetivo dessas espécies no sistema nervoso central (SNC). Um modelo para o estudo da dor neuropática (dor originada como consequência direta de uma lesão ou doença afetando o sistema somatossensorial, em seus elementos periféricos ou no SNC) é a constrição nervosa periférica. Nesta condição um quadro de estresse oxidativo é estabelecido no local da lesão. A administração de N-acetilcisteína (NAC) tem efeito analgésico nesses animais, o qual parece resultar do papel antioxidante dessa molécula no local da lesão. Como a NAC atravessa a barreira hematoencefálica, a hipótese do presente estudo foi que o efeito analgésico dessa molécula também envolveria ação no SNC. Assim, este trabalho avaliou os efeitos temporais da administração intraperitoneal de NAC, na dose de 150 mg/kg/dia, sobre parâmetros nociceptivo e de estresse oxidativo e nitrosativo em medula espinal de ratos com constrição no nervo isquiático direito. Como controle foi utilizado administração de solução salina nas mesmas condições. O projeto que antecedeu o presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no uso de animais da UFRGS (número de protocolo: 19037).

Para a realização desse estudo 72 ratos *Wistar* machos, pesando 200-300g, foram divididos em 3 grupos (n=24/grupo): controle (animais que não sofreram nenhuma intervenção cirúrgica), *sham* (animais onde o nervo isquiático direito foi exposto, mas não sofreu constrição) e com constrição nervosa (animais onde o nervo isquiático direito foi exposto e recebeu 4 amarraduras em seu terço inicial). Estes grupos experimentais foram subdivididos em subgrupos (n=6/subgrupo) que receberam administração intraperitoneal de solução salina ou de NAC, na dose de 150 mg/Kg/dia, por período de 3 e 10 dias. Os testes de Von Frey e da placa quente avaliaram as sensibilidades mecânica e térmica, respectivamente, antes da lesão e 1 e 3 dias, e 1, 3, 5, 7 e 10 dias após a lesão periférica nos grupos 3 e 10 dias, respectivamente. Após, os animais foram decapitados, a medula espinal lombossacral retirada e usada para as determinações de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (técnica de oxidação do vermelho fenol), atividade das enzimas antioxidantes glutatona peroxidase (GPx, pela técnica descrita por Flohé e Gunzler, 1984) e glutatona transferase (GST, pela técnica descrita por Habig, 1974), razão entre glutatona reduzida e oxidada (GSH/GSSG, conforme técnica descrita por Akerboom e Sies, 1981), e nitritos+nitratos (pela reação de Griess). De cada animal ainda foi coletada uma amostra de sangue para avaliação de indicadores plasmáticos de função hepática (gama glutamiltransferase, transaminase glutâmica oxalacética, transaminase glutâmica pirúvica e bilirrubina) e renal (creatinina), por meio de utilização de kits comerciais. Foi coletada também uma amostra de fígado dos ratos que receberam administração de solução salina e de NAC nos intervalos considerados nesse estudo para determinação da morfologia dos hepatócitos pela técnica de hematoxilina e eosina.

As sensibilidades aumentaram no dia 1 pós-lesão nos grupos constrição nervosa, e permaneceram elevadas nos demais períodos analisados apenas no grupo constrição nervosa tratado com solução salina. No grupo constrição nervosa que recebeu tratamento com NAC, os valores das sensibilidades foram similares aos do pré-lesão nos períodos de 3, 5, 7 e 10 dias. No grupo *sham*, o aumento da sensibilidade mecânica ocorreu apenas no dia 1, permanecendo nos demais períodos analisados similar ao valor pré-lesão, tanto nos ratos tratados com solução salina como naqueles que receberam NAC. Porém, enquanto a sensibilidade térmica aumentou nos períodos de 3 e 5 dias após a lesão tecidual nos ratos tratados com NAC, nenhuma alteração significativa ocorreu no grupo que recebeu solução salina (ANOVA de amostras repetidas, $p < 0,05$). Paralelamente a estas alterações de sensibilidades, na medula espinal lombossacral ocorreu redução estatisticamente significativa nos valores de H_2O_2 nos grupos com constrição nervosa, independente do tratamento recebido, nos períodos de 3 e 10 dias. A razão GSH/GSSG aumentou significativamente aos 3 dias após a constrição nervosa nos animais que receberam solução salina. Nesse mesmo período ocorreu aumento estatisticamente significativo na atividade da GST nesses animais. A atividade dessa enzima também teve acréscimo nos ratos *Sham* que receberam solução salina e nos animais constrição nervosa tratados com NAC, ambos por 10 dias. Nesse mesmo período, a atividade da GPx estava significativamente aumentada nesses grupos experimentais (*sham* tratado com solução salina e constrição nervosa tratado com NAC). Os valores de nitritos+nitratos aumentaram significativamente apenas no grupo constrição nervosa que recebeu administração de solução salina por 3 dias. Nesse período, os valores desses metabólitos estavam significativamente reduzidos nos grupos constrição nervosa e *sham* tratados com NAC. Aos 10 dias, foi observada redução significativa nos valores de nitritos+nitratos apenas no grupo *sham* tratado com solução salina (ANOVA de três vias, seguida do pós-teste de Tukey, $p < 0,05$).

Estes resultados mostram que a administração intraperitoneal de NAC, na dose de 150 mg/kg/dia, reproduz o efeito analgésico dessa molécula e modifica parâmetros de estresse oxidativo e nitrosativo na medula espinal, os quais possivelmente se relacionam com as mudanças de sensibilidades nos ratos *sham* e com constrição nervosa. Assim, o efeito analgésico da NAC também envolve sua ação no SNC.

INTRODUÇÃO

DOR E NOCICEPÇÃO

Dor é a percepção de sensações tão diversas como irritação, inflamação, ardência ou latejar, geralmente sensações oriundas de alguma parte do corpo, tratando-se assim de uma experiência desagradável. Ela também pode constituir uma sensação de caráter subjetivo, neste sentido sendo relacionada somente aos humanos, os quais possuem capacidade de verbalizá-la (Millan, 1999; Loeser et al., 2001; Vanderah, 2007; Basbaum et al., 2009). Atualmente a dor representa um dos principais problemas de saúde, estando associada a várias doenças crônicas e agudas. Dor, na 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).

A nocicepção, por sua vez, relaciona-se aos processos neurais de codificação e processamento de estímulos nocivos (IASP, 2008). Dessa maneira, o estímulo nociceptivo detectado pelos receptores periféricos é codificado como uma mensagem nociceptiva, a qual é progressivamente transmitida e processada em centros nervosos superiores (Figura 1). A subjetividade da sensação dolorosa está vinculada com o aspecto comportamental. Isso ocorre porque a informação nociceptiva atinge não apenas regiões do sistema somatossensorial, mas também o sistema límbico (Millan, 1999; Beyes e Bonica, 2001; Vanderah, 2007; Basbaum et al., 2009).

De uma forma geral, os eventos modulatórios da transmissão nociceptiva ocorrem primariamente no corno dorsal da medula espinal e em núcleos do tronco encefálico e, secundariamente, em centros talâmicos e estruturas corticolímbicas (Figura 1). Entretanto, sob certas condições patológicas, como secção de nervo periférico, constrição nervosa periférica ou dano ao Sistema Nervoso Central (SNC), a dor pode ser desencadeada independentemente da ativação das terminações nervosas nociceptivas periféricas. Nesse contexto se enquadra o

conceito de dor neuropática, que é a dor originada como consequência direta de uma lesão ou doença afetando o sistema somatossensorial, em seus elementos periféricos (dor neuropática periférica) ou no SNC (dor neuropática central) (IASP, 2008).

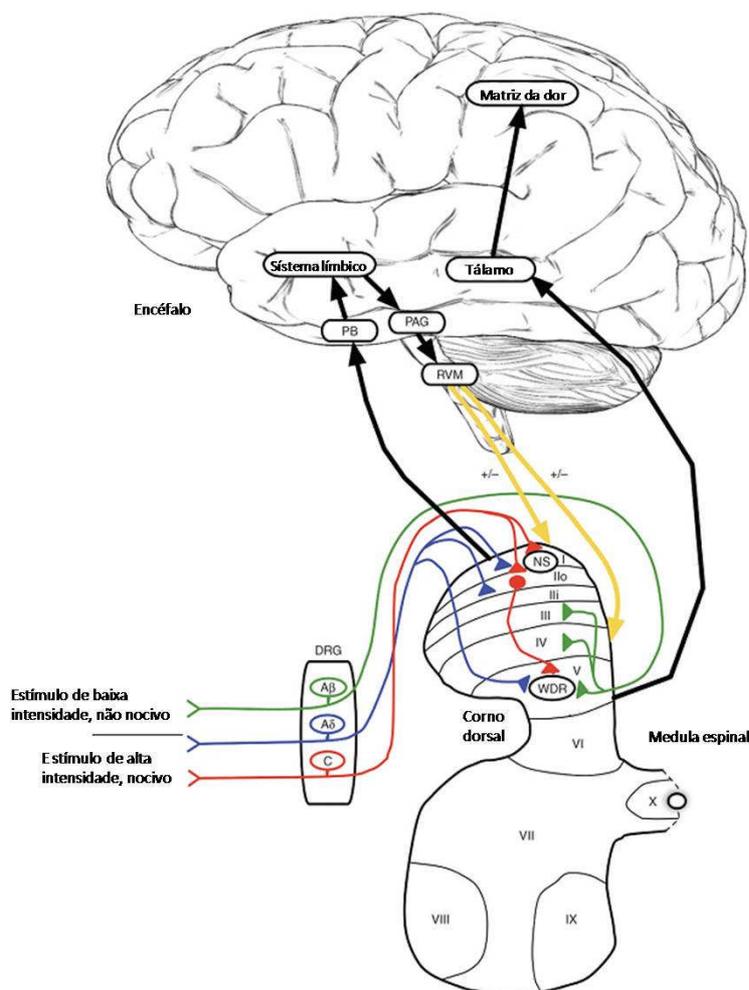


Figura 01: Vias nociceptivas da periferia ao SNC. Fibras aferentes primárias (tipos A β , A δ e C), cujos corpos celulares encontram-se no gânglio da raiz dorsal (DRG), transmitem impulsos nervosos da periferia ao corno dorsal da medula espinal. Neurônios de segunda ordem da via nociceptiva (NS) encontram-se principalmente na lâmina superficial do corno dorsal (lâminas I-II), enquanto neurônios de amplo espectro de resposta (WDRs) localizam-se profundamente (lâmina V). Neurônios de projeção da lâmina I inervam regiões como o núcleo parabraquial (PB) e a substância cinzenta periaquedutal (PAG), as quais se comunicam com o sistema límbico. Deste sistema e da PAG emergem projeções descendentes que se dirigem a núcleos do tronco encefálico, como o bulbo ventral medial rostral (RVM), que modulam o processamento nociceptivo espinal. Neurônios da lâmina V dirigem-se principalmente ao tálamo (trato espinotalâmico), de onde se projetam a várias regiões corticais (córtex somatossensorial primário e secundário, córtices insular, cingulado anterior e pré-frontal) que compõem a “matriz da dor”. (Adaptado de D’Mello e Dickenson, 2008).

Atualmente há um grande interesse na compreensão dos mecanismos envolvidos na codificação e transmissão da dor neuropática devido à sua incidência na população. Segundo Pasero (2004), a dor neuropática acomete 1,5% da população dos Estados Unidos e 1% daquela do Reino Unido. Este pequeno percentual provavelmente se deve ao fato da dor neuropática se apresentar, em grande parte, com uma série de sintomas adjacentes, o que dificulta o diagnóstico correto da mesma e leva a uma lentidão na entrada destes dados nas estatísticas oficiais. Este tipo de dor reduz significativamente a qualidade de vida, representando altos custos aos sistemas de saúde (Chong et al., 2003; Gilron et al., 2006; Head, 2006; Rice et al., 2006). Esses fatos geram um interesse mundial na realização de estudos que busquem o esclarecimento dos mecanismos patofisiológicos da dor neuropática.

Para a compreensão dos mecanismos envolvidos na dor neuropática, os mamíferos são os modelos mais empregados. 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 (Dubner, 1983; Kavaliers, 1988). Entre as diversas abordagens para o estudo da dor neuropática em modelos animais, podem ser citadas a secção completa e a constrição de um nervo periférico. Várias espécies de animais submetidas a essas situações são utilizadas como modelos para o estudo da fisiopatologia da dor neuropática (Sommer e Myers, 1995; Zimmermann, 2001; Takeuchi et al, 2007; Xie et al, 2008; Klusáková e Dubový, 2009).

Após a injúria, as principais anormalidades sensoriais observadas nos animais são hiperalgesia (aumento na sensibilidade dolorosa) e alodinia (dor em resposta a um estímulo inócuo). Essas alterações são geradas por diversos mecanismos, entre eles mudanças na expressão e inserção de canais iônicos, aumento na atividade sináptica e no fenômeno de comunicação não-sináptica entre neurônios, onde uma célula nervosa modifica a atividade das células adjacentes (Amir e Devor, 1996; Lekan et al., 1996; Millan, 1999; Takeuchi et al., 2007; Xie et al., 2008; Huang e Song, 2008).

Muitos moduladores neuroquímicos estão envolvidos no surgimento e na manutenção da dor neuropática. Em virtude da lesão nervosa, diversos mediadores inflamatórios são produzidos no local da lesão e atuam tanto nesse

local como no SNC. Estes mediadores contribuem com os sinais característicos desse tipo de dor (Millan, 1999; Zimmermann, 2001; Mosley et al., 2006, Basbaum et al., 2009). Dentre os mediadores químicos, será destacada a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Winrow et al., 1993; Szabo, 1998; Khodr e Khalil, 2001; Mosley et al., 2006; Gardiner et al., 2009). Porém, antes de dar prosseguimento a este tema, será apresentada uma breve descrição das EROs seguida de seu papel na nocicepção, com ênfase na dor neuropática.

ESPÉCIES ATIVAS DE OXIGÊNIO E DEFESAS ANTIOXIDANTES

A formação de EROs ocorre em virtude dos processos do metabolismo energético celular. Estes, por sua vez, são decorrentes da produção de ATP, que ocorre por meio da transferência de elétrons ao longo da cadeia mitocondrial. Para a realização desses processos bioquímicos é necessária a presença de oxigênio (O_2). No entanto, durante a redução tetravalente do O_2 à água ocorre formação de EROs, as quais são responsáveis pela toxicidade deste íon. O ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o radical hidroxil (OH^{\bullet}) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) são as EROs formadas a partir da redução do oxigênio à água (Figura 02) (Fridoviche, 1998; Gabbita et al., 2000).

Estima-se que cerca de 1-4% do oxigênio utilizado é incompletamente reduzido pela ação do citocromo mitocondrial devido ao “escape fisiológico” durante a produção de ATP (Turrens et al., 1982). As EROs podem ser radicalar, como o íon $O_2^{\bullet-}$ e o radical OH^{\bullet} , ou não, como H_2O_2 e oxigênio singlete. O $O_2^{\bullet-}$ apresenta menor reatividade e por isto pode difundir-se por distâncias consideráveis até encontrar um alvo. Assim, ele pode provocar grandes danos celulares por meio da formação de radicais OH^{\bullet} . Este radical, por sua vez, é uma das espécies químicas com maior reatividade. Ele reage rapidamente com diversos tipos de moléculas celulares. Em função de sua elevada reatividade, o radical hidroxil apresenta pouca capacidade de difusão, provocando danos nas proximidades onde é gerado. O H_2O_2 é formado a partir do radical $O_2^{\bullet-}$ ou como subproduto de enzimas oxidases, e pode reagir com metais de transição, como ferro e cobre presentes na célula, dando origem ao radical OH^{\bullet} . Desta forma, a

toxicidade de O_2^\bullet e H_2O_2 é decorrente principalmente da formação de radicais OH^\bullet (Ramos Vasconcelos, 2005).

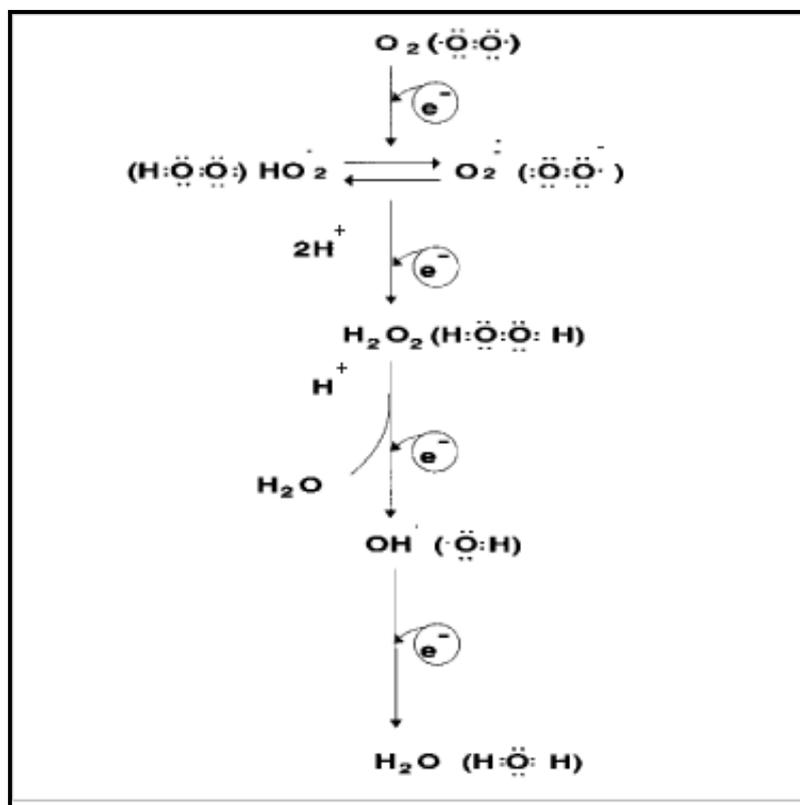


Figura 02: Redução tetraivalente do oxigênio molecular (O_2) na mitocôndria até a formação de água (H_2O). Várias espécies reativas de O_2 são formadas no processo. Consulte texto para mais detalhes. (Adaptado de Cohen M.V.)

Frente à ação fortemente oxidante do O_2 e às diversas situações onde a geração de EROs escapa ao controle, são previstas consequências deletérias aos componentes celulares, caso não sejam eliminadas ou neutralizadas por um eficiente sistema antioxidante. A partir deste contexto surge o conceito de estresse oxidativo, uma situação onde as oxidações indesejadas induzidas pelo O_2 não são eficientemente neutralizadas, levando a um metabolismo anormal, perda de funções fisiológicas, doenças e morte celular (Sorg, 2004).

Assim, qualquer organismo que viva em presença de O_2 possui um sistema frequentemente complexo de defesa capaz de capturar intermediários reativos antes que eles oxidem biomoléculas ou capazes de intervir em algum processo oxidativo já desencadeado reduzindo os efeitos deletérios. Tendo em vista as diferentes EROs formadas, as distintas biomoléculas alvo, e todos os

compartimentos celulares em que a ação destas espécies deletérias pode ocorrer, existem também variados antioxidantes característicos para cada condição (Sorg, 2004).

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. Os mais eficientes são enzimas que removem cataliticamente as EROs após sua formação: enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx) e outras peroxidases, e glutathiona transferase (GST) (Zwart et al., 1999; Sorg, 2004) (Figura 3).

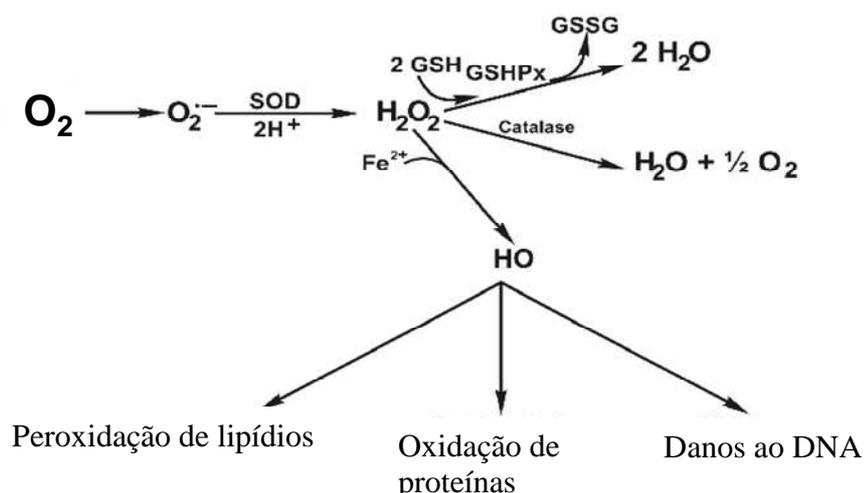


Figura 03: Redução trivalente do oxigênio molecular (O_2) até a formação de água (H_2O), mostrando a ação das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GSHPx) e catalase, e formação do radical hidroxil (HO), que ocasiona, por sua vez, peroxidação de lipídios, oxidação de proteínas e danos ao DNA.

A SOD catalisa a dismutação do radical superóxido, formado principalmente na mitocôndria, em H_2O_2 . Este atravessa facilmente as membranas celulares, sendo posteriormente neutralizado pela ação da catalase e GPx, resultando na formação de água e oxigênio. Embora o $\text{O}_2^{\bullet -}$ sozinho não represente maior periculosidade à célula, sua combinação com o óxido nítrico (NO) resulta em

um forte oxidante, o peroxinitrito, cujos produtos de decomposição são igualmente reativos (OH^\bullet e NO) (Fridovich, 1975; Mruk et al., 2002).

A CAT é uma hemoproteína amplamente distribuída nos peroxissomas e membranas mitocondriais do organismo, especialmente no fígado, rins e eritrócitos (Mruk et al., 2002; Nishikawa et al., 2009). Como já mencionado, ela catalisa a degradação do H_2O_2 , cujo maior perigo está em sua interação com metais formando o radical OH^\bullet . O H_2O_2 é formado via ações das enzimas SOD, glicose oxidase, monoamina oxidase, entre outras. Tanto a CAT quanto a GPx, outra importante detoxificadora de peróxidos, são encontradas em neurônios, astrócitos e oligodendrócitos (Baud et al., 2004). A GPx, por sua vez, catalisa a conversão tanto do H_2O_2 quanto de hidroperóxidos orgânicos em produtos menos reativos, empregando para isso a glutatona em sua forma reduzida (GSH) como doador de elétrons. A forma oxidada do tripeptídeo glutatona (GSSG) é novamente reduzida pela ação da enzima glutatona redutase (GR) e do NADPH como doador de elétrons. Existem ao menos quatro tipos distintos de GPx. A forma mais ubíqua é a GPx1, citosólica. As outras formas, GPx2, 3 e 4 são encontradas principalmente no plasma, intestino e gônadas, respectivamente (Baud et al., 2004).

Finalmente, outra família de enzimas que emprega a glutatona em seus processos catalíticos é a GST. Este grupo de enzimas citosólicas tem como principal papel a eliminação de substâncias exógenas, como fármacos, poluentes e aditivos alimentares. Algumas delas atuam, assim como a GPx, na eliminação de hidroperóxidos orgânicos, (Halliwell e Gutteridge, 2007).

Existem ainda outro grupo de moléculas, bastante diversas entre si, e que possuem também papel na neutralização de EROs. Sua grande vantagem é a capacidade de regeneração por ciclos enzimáticos que as recompõem novamente em moléculas reduzidas. São membros deste grupo de antioxidantes a glutatona (GSH), o urato, o ascorbato, a bilirrubina e o alfa-tocoferol (Lewén et al., 2000). O ascorbato e a glutatona são os antioxidantes de baixo peso molecular mais abundantes no SNC, estando o primeiro em maior concentração em neurônios e o segundo em células da glia (Rice e Russo-Menna, 1998).

A glutatona (L- γ -glutamil-L-cisteinilglicina) é um peptídeo de baixo peso molecular amplamente distribuído em animais e plantas, que atua em muitos processos bioquímicos celulares como um “tampão redox” de grupamentos tióis,

transferindo seus elétrons e podendo ser reduzida e oxidada diversas vezes. Como já mencionado, participa na neutralização de radicais juntamente com vários sistemas enzimáticos, além de atuar sozinha como um agente redutor de EROs (Sies, 1999).

Porém, as EROs não possuem apenas papel potencialmente lesivo aos constituintes biológicos. Sua produção, em limites estreitos, parece ser importante para a manutenção da homeostase. Estudos mostram que as EROs podem atuar em mecanismos de defesa e processos proliferativos (Dröge, 2002). Além disso, estas moléculas podem regular a condutância iônica nas membranas e a liberação de neurotransmissores, participando ainda em processos de sinalização celular (Seutin et al., 1995; Finkel, 1998; Chen et al., 2002). Mittal e Murard (1977) foram os primeiros a descreverem esse papel sinalizador das EROs. Em seu estudo, o ânion $O_2^{\bullet-}$ e o radical OH^{\bullet} foram capazes de ativar a guanilato ciclase e ocasionar formação de cGMP (guanilato monofosfato cíclico). As EROs também parecem regular processos de transcrição celular. Foi demonstrada a ativação do fator de transcrição NF- κ B (fator nuclear κ B) pelo aumento de H_2O_2 e outros hidroperóxidos lipídicos (Schreck e Baeuerle, 1991; Schreck et al., 1992). Como o NF- κ B se liga a vários sítos 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 e Henkel, 1994).

ESTRESSE OXIDATIVO E NITROSATIVO E PROCESSAMENTO NOCICEPTIVO

No local da lesão já está demonstrado o aumento na produção de EROs (Liu et al., 1999; Liu et al., 2000; Bao e Liu, 2004), que podem derivar de várias fontes, especialmente a partir de neutrófilos ativados (Winrow et al., 1993; Szabo, 1998; Khodr e Khalil, 2001). Sua formação ocorre em virtude dos processos do metabolismo energético celular.

A ativação de nociceptores provoca liberação de glutamato e ativação de seus receptores, ocasionando posteriormente produção de óxido nítrico, eventos chaves na sensação dolorosa e hiperexcitabilidade da medula espinal (Chen et al., 2004; Xu et al., 2007). O óxido nítrico (NO) é produzido a partir da L-arginina pela

ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS). Os neurônios da medula espinal possuem NOS e o aumento bilateral da atividade desta enzima após estímulo nocivo sugere participação do NO no processamento da informação nociceptiva (Lam et al., 2003). Essa molécula, por sua vez, parece participar também de mecanismos antinociceptivos (Khalil e Khodr, 2001); porém, um excesso na sua produção promove dano tecidual pela alta produção de radicais livres (Levy e Zochodne, 2004). Foi sugerido que o aumento dos disparos dos nociceptores após dor neuropática, e a consequente ativação de células na medula espinal, ocasionaria, nesta região do SNC, acréscimos na respiração mitocondrial e influxo de cálcio no meio intracelular com consequente aumento na produção de ERO e NO (Naik et al., 2006; Cury et al., 2011).

Como na clínica médica é comum a ocorrência de injúria parcial ou incompleta de nervo periférico, isto levou ao desenvolvimento do modelo de constrição nervosa crônica por Bennett e Xie, em 1988. Este modelo permite detectar tanto a dor espontânea como a evocada. Estudos mostram que este modelo se assemelha a muitas síndromes dolorosas dos humanos, como é o caso da síndrome do túnel do carpo (McMahon et al., 2006; Klusáková e Dubový, 2009). Com relação às ERO, foi demonstrado que o estresse oxidativo é um importante determinante das consequências neuropatológicas e comportamentais decorrentes da constrição de nervo periférico (Wagner et al., 1998). Ratos com constrição crônica no nervo isquiático teve aumento na concentração do metabólito malondialdeído nesse nervo, havendo ainda redução da glutathiona reduzida e acréscimo na atividade da SOD. A CAT não alterou sua atividade local nestes animais (Naik et al., 2006). Ainda, houve acréscimo no TBARS (substância reativa ao ácido tiobarbitúrico) e na concentração total de cálcio também nesse nervo (Muthuraman et al., 2008). Estes resultados mostram a importante participação das EROs neste modelo de dor neuropática, no local da lesão. Porém, está demonstrado que as alterações nas atividades das enzimas SOD e CAT, e aumento na lipoperoxidação, também ocorrem em regiões do SNC após constrição no nervo isquiático (Goecks, 2011).

Considerando os dados até aqui apresentados, os mesmos sugerem envolvimento de EROs e NO nos mecanismos de codificação e processamento da dor neuropática, tanto na periferia como no SNC.

N-ACETILCISTEÍNA

Nos últimos anos, estudos tem mostrado a eficiência do tratamento com antioxidantes na redução da sensação dolorosa em diferentes modelos de dor neuropática (Hacimuftuoglu et al., 2006; Kim et al., 2006; Naik et al., 2006). Um antioxidante comum nesses estudos é a N-acetilcisteína (NAC). Esta substância química é um agente mucolítico e um doador de aminoácido L-cisteína, um dos precursores na síntese de glutathione. Ela atua ainda como um *scavenger* de radicais livres, interagindo com radical OH^\cdot e H_2O_2 (Yan et al., 1995; Kamata et al., 1996; Han et al., 1997).

Em ratos com constrição crônica no nervo isquiático, o tratamento com NAC reduziu a hiperalgesia e a alodinia (Naik et al., 2006). Em um modelo de trauma cerebral, a administração de NAC aumentou a atividade das enzimas antioxidantes SOD e GPx (Hiedonmez et al., 2006). Nos neurônios, a glutathione atua como removedor de radicais livres (Cooper e Kristal, 1997). Ao agir como doador de cisteína, a NAC mantém os níveis intracelulares de glutathione, tendo um efeito neuroprotetor tanto em neurônios como em outros tipos celulares, agindo ainda como modulador da nocicepção (Mayer e Noble, 1994; Seaton et al., 1997). Naik e colaboradores (2006) sugerem que o tratamento com NAC poderia reduzir EROs e NO devido à presença de um grupamento sulfidril em sua estrutura. Para estes autores, se o tratamento com NAC pode produzir analgesia por redução das EROs, isso implicaria que essas espécies em excesso são importantes na geração de sensação dolorosa após constrição de nervo periférico. Porém, o estudo desses autores se limitou apenas ao nervo periférico, não se estendendo ao SNC. O NAC possui baixo peso molecular e quando na corrente sanguínea poderia agir centralmente por atravessar livremente a barreira hematoencefálica (Farr et al., 2003). Assim, seu efeito analgésico também poderia decorrer de sua ação central. Está demonstrado que a administração periférica de NAC possui efeito neuroprotetor na encefalopatia do diabetes (Kamboj et al., 2008). Deste modo, a hipótese do presente estudo foi que o efeito analgésico dessa molécula também envolveria ação no SNC.

Com o intuito de fornecer subsídios ao esclarecimento dessa hipótese, o presente estudo propôs determinar o efeito temporal do tratamento com NAC sobre parâmetros nociceptivo e de estresse oxidativo e nitrosativo em medula

espinal lombossacral de ratos com constrição no nervo isquiático, uma vez que este segmento da medula espinal é a região de entrada das informações nociceptivas deste nervo periférico. Para conhecimento dos efeitos temporais desta condição experimental, este trabalho avaliou dois intervalos de tempo após a indução da lesão nervosa periférica, 3 e 10 dias. A escolha dessas janelas temporais decorreu do fato de que os estudos até agora realizados se limitaram apenas ao intervalo de 15 dias, analisando somente parâmetros oxidativo e nitrosativo no nervo lesionado (Wagner et al., 1998; Naik et al., 2006). Contudo, este grupo de pesquisadores da UFRGS mostrou que mudanças significativas em distintos marcadores de estresse oxidativo e nitrosativo já estão presentes aos 3 e 7 dias após secção nervosa periférica (Guedes et al., 2006; 2008; 2009), períodos onde já ocorre perda neuronal após constrição nervosa periférica (Adam, 2009). A escolha pela administração de NAC decorreu de sua utilização na clínica médica. Este antioxidante é muito utilizado no tratamento de doenças pulmonares, cardiovasculares, renais, hepáticas e neurais (Zafarullah et al., 2003). Optou-se pela administração de uma dose diária após a constrição no nervo isquiático como uma tentativa de simular as condições que ocorreria na clínica médica, visto que a administração de NAC em condições patológicas ocorre após o estabelecimento da condição. Um estudo prévio mostrou que a administração de NAC, por *gavage*, após constrição de nervo periférico, foi capaz de reduzir a hiperalgesia térmica dos animais nos intervalos de 1, 3, 5 e 7 horas após a injeção (Wagner et al., 1998). Assim, o presente estudo avaliou também a sensibilidade térmica (teste da placa quente) e a sensibilidade mecânica (teste dos filamentos de Von Frey) nos intervalos de 1, 3, 5, 7 e 10 dias após a indução da lesão. A escolha da dose de 150 mg/kg/dia decorreu do fato de que os estudos anteriores mostraram efeitos analgésicos significativos de NAC administrada em doses de 100 e 300 mg/kg (Wagner et al., 1998; NAIK et al., 2006) e uma diminuição na perda neuronal com uma dose de 150 mg/kg/dia (Adam et al., 2009). Assim, optou-se por essa dose intermediária.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

O presente estudo avaliou os efeitos temporais da administração intraperitoneal de NAC, na dose de 150 mg/kg/dia, sobre parâmetros nociceptivo e de estresse oxidativo e nitrosativo em medula espinal de ratos com manipulação e constrição no nervo isquiático direito, nos períodos experimentais de 3 e 10 dias após a intervenção cirúrgica a fim de determinar a variação temporal destes indicadores, e utilizando como controle a administração de solução salina nas mesmas condições.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar, mediante o emprego do teste da placa quente, o qual avalia a sensibilidade térmica, os efeitos da administração intraperitoneal de solução salina e de NAC, na dose de 150 mg/kg/dia, sobre essa sensação em ratos controle, com manipulação e constrição no nervo isquiático, nos períodos de 3 e 10 dias após a intervenção cirúrgica, realizando as determinações 1 e 3 dias, no grupo 3 dias, e 1, 3, 5, 7, e 10 dias, no grupo 10 dias;
- Avaliar, mediante o emprego do teste dos Filamentos de Von Frey, o qual avalia a sensibilidade mecânica, os efeitos da administração intraperitoneal de solução salina e de NAC, na dose de 150 mg/kg/dia, sobre essa sensação em ratos controle, com manipulação e constrição no nervo isquiático, nos períodos de 3 e 10 dias após a intervenção cirúrgica, realizando as determinações 1 e 3 dias, no grupo 3 dias, e 1, 3, 5, 7, e 10 dias, no grupo 10 dias;

- Determinar, ao terceiro e décimo dias após a manipulação e a constrição unilateral do nervo isquiático, a atividade das enzimas antioxidantes GST e GPx em homogeneizado de medula espinal lombossacral de ratos controle, com manipulação e constrição do nervo isquiático tratados com solução salina e NAC na dose de 150 mg/kg/dia;
- Determinar, ao terceiro e décimo dias após a manipulação e a constrição unilateral no nervo isquiático, os valores da razão entre glutathiona reduzida e oxidada (GSH/GSSG) em medula espinal lombossacral de ratos controle, com manipulação e constrição no nervo isquiático tratados com solução salina e NAC, na dose de 150 mg/kg/dia;
- Determinar, ao terceiro e décimo dias após a manipulação e a constrição unilateral no nervo isquiático, a concentração de H_2O_2 em cortes de medula espinal lombossacral de ratos controle, com manipulação e constrição no nervo isquiático tratados com solução salina e NAC, na dose de 150 mg/kg/dia;
- Determinar, ao terceiro e décimo dias após a manipulação e a constrição unilateral no nervo isquiático, a concentração de nitritos+nitratos em homogeneizado de medula espinal lombossacral de ratos controle, com manipulação e constrição no nervo isquiático tratados com solução salina e NAC, na dose de 150 mg/kg/dia;
- Determinar os efeitos da administração por 3 e 10 dias de solução salina e NAC, na dose de 150 mg/kg/dia, sobre indicadores plasmáticos de função hepática e renal, mediante as seguintes dosagens: gama glutamiltransferase (gama GT), transaminase glutâmica oxalacética (TGO), transaminase glutâmica pirúvica (TGP), bilirrubina e creatinina;
- Determinar, mediante utilização de técnica de coloração por hematoxilina e eosina, a morfologia dos hepatócitos em ratos que receberam administração de solução salina e de NAC, na dose de 150 mg/kg/dia, por 3 e 10 dias.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais: Procedência e Manutenção

Foram utilizados neste estudo 72 ratos da linhagem *Wistar*, adultos, machos, com peso de 200-300g, os quais foram obtidos do Biotério Central da UFRGS, com 60 dias de vida. Estes animais permaneceram no ratário do Departamento de Farmacologia, desta mesma universidade após os procedimentos cirúrgicos, onde foram alimentados com ração adequada *ad libitum* e mantidos sob condições controladas de luz (ciclo claro/escuro de 12 horas) e temperatura (22-24° C). Para a realização dos experimentos, os animais foram separados aleatoriamente e acondicionados em caixas de plástico adequadas (três animais/caixa), com assoalho de maravalha e livre acesso à alimentação e água. A limpeza das caixas foi realizada, no máximo, a cada dois dias. O projeto referente a esse trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS (número do protocolo: 19037).

GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os ratos foram divididos nos seguintes grupos experimentais, cada um composto por 06 (seis) animais:

a) Grupo controle (CT): animais que não sofreram nenhuma intervenção cirúrgica. Este grupo foi subdividido em subgrupos, conforme o tratamento recebido: CTs (animais CT que receberam administração intraperitoneal diária de solução salina) e CTn (animais CT que receberam administração intraperitoneal diária de NAC na dose de 150 mg/kg). Cada um destes subgrupos foi dividido em dois, de acordo com o tempo até a morte dos animais. Assim, um subgrupo foi morto aos 03 dias após a intervenção cirúrgica e o outro aos 10 dias após este procedimento.

b) Grupo *Sham* (S): animais que sofreram a incisão dos tecidos até a visualização do nervo isquiático. Este grupo foi subdividido em subgrupos, conforme o tratamento recebido: Ss (animais S que receberam administração intraperitoneal diária de solução salina) e Sn (animais S que receberam administração intraperitoneal diária de NAC na dose de 150 mg/kg). Cada um destes subgrupos foi dividido em dois, de acordo com o tempo até a morte dos animais. Assim, um subgrupo foi morto aos 03 dias após a intervenção cirúrgica e o outro aos 10 dias após este procedimento.

c) Grupo com constrição nervosa (CN): animais onde o nervo isquiático direito foi isolado e recebeu em seu terço inicial 04 (quatro) amarraduras. Este grupo foi subdividido em subgrupos, conforme o tratamento recebido: CNs (animais CN que receberam administração intraperitoneal diária de solução salina) e CNn (animais CN que receberam administração intraperitoneal diária de NAC na dose de 150 mg/kg). Cada um destes subgrupos foi dividido em dois, de acordo com o tempo até a morte dos animais. Assim, um subgrupo foi morto aos 03 dias após a intervenção cirúrgica e o outro aos 10 dias após este procedimento.

Os ratos destes grupos experimentais foram mortos por decapitação e coletado de cada um deles 2 mL de sangue, o segmento lombossacral da medula espinal e uma amostra de fígado. O sangue foi utilizado para determinações de indicadores plasmáticos de função hepática e renal. A medula espinal foi usada para determinações de parâmetros de estresse oxidativo e nitrosativo. A amostra de fígado foi utilizada para a visualização do aspecto morfológico dos hepatócitos. Para uma melhor compreensão, o número de animais de cada grupo e a organização dos grupos como mencionado acima está mostrado na Tabela 01:

TABELA 1 – Organização dos grupos experimentais.

	Grupo 3 dias		Grupo 10 dias	
Grupo CONTROLE (Ratos que não sofrerão nenhuma intervenção cirúrgica)	ratos tratados com solução salina (n=06)	ratos tratados com NAC (n=06)	ratos tratados com solução salina (n=06)	ratos tratados com NAC (n=06)
Grupo SHAM (Ratos que sofreram a incisão dos tecidos até a visualização do nervo isquiático)	ratos tratados com solução salina (n=06)	ratos tratados com NAC (n=06)	ratos tratados com solução salina (n=06)	ratos tratados com NAC (n=06)
Grupo com CONSTRIÇÃO NERVOSA (Ratos em que o nervo isquiático direito foi isolado e recebeu em seu tronco comum 04 (quatro) amarraduras)	ratos tratados com solução salina (n=06)	ratos tratados com NAC (n=06)	ratos tratados com solução salina (n=06)	ratos tratados com NAC (n=06)

n: número de animais (Numero total de ratos: 72)

Constrição do nervo isquiático (CN)

Para o procedimento de CN, os ratos foram previamente anestesiados com solução mista de cetamina (90 mg/kg de peso corporal) e xilazina (10 mg/kg de peso corporal). Após anestesia, os animais foram posicionados em decúbito ventral e tiveram seu membro posterior direito fixado em uma superfície rígida para a incisão dos tecidos moles e visualização do nervo isquiático. A intervenção cirúrgica iniciava após tricotomia e assepsia da pele da coxa direita do animal com álcool-iodado 2%. Feito este procedimento, seguia-se a incisão cutânea e subcutânea longitudinal do membro, no terço médio da coxa, para expor o músculo bíceps femoral, o qual era afastado para permitir a visualização do nervo isquiático. O procedimento de constrição deste nervo foi realizado de acordo com a técnica descrita por Bennett e Xie (1988), a qual está esquematicamente mostrada na Figura 4. A constrição compreendia 4 amarraduras com fio de sutura do tipo *catgut* cromado 4.0 tipo c bioabsorvível (Shalon) em torno do nervo, com

uma distância de 1 mm entre elas. Assim, o comprimento afetado do nervo foi de aproximadamente 7 mm. O grau de contração foi determinado pela percepção do pesquisador do movimento reflexo da pata lesionada do rato à medida que o aperto do nó de sutura era efetuado. Todas as contrações foram feitas pelo mesmo pesquisador para que a percepção do grau de contração fosse a mesma aplicada a todos os animais. Este grau de contração retarda, mas não interrompe totalmente a circulação sanguínea da superfície epineural. Finalizado este procedimento, o local da incisão foi suturado com fio de nylon não absorvível 4.0 (Somerville) e desinfetado com solução de rifamicina.

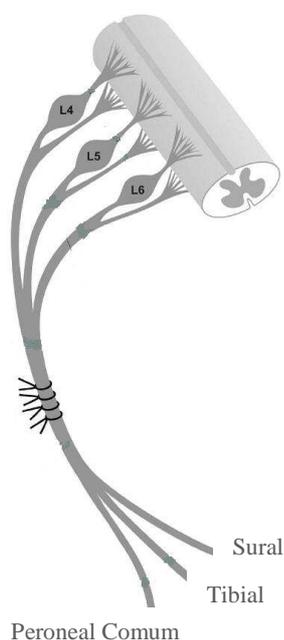


Figura 04: Esquema de um segmento da medula espinhal ilustrando a formação do nervo isquiático pela união das raízes dorsais e ventrais da medula espinhal. Nas raízes dorsais estão mostrados os gânglios das raízes dorsais (L4, L5 e L6) do nervo isquiático, o qual é composto por dois nervos, o tibial, que posteriormente se divide também no nervo sural, e o nervo peroneal comum. No tronco comum do nervo isquiático estão mostradas as quatro amarraduras (Baseado em Klusáková e Dubový, 2009).

Os animais pertencentes ao grupo S foram submetidos ao procedimento anestésico e de isolamento do nervo isquiático, porém não sofreram nenhuma contração neste nervo. Os animais do grupo controle não passaram por nenhuma intervenção cirúrgica.

Após os procedimentos cirúrgicos, os animais foram acomodados em caixas forradas com maravalha e levados ao biotério do Departamento de Farmacologia, onde permaneceram até o dia da morte. Neste período, eles receberam alimento e água *ad libitum*, além de injeções diárias de solução salina e NAC na concentração de 150 mg/kg/dia, e foram submetidos a um ciclo 12 horas claro e 12 horas escuro. A administração foi iniciada no primeiro dia após a cirurgia e teve duração de 3 dias, no grupo de ratos que foram mortos aos 3 dias, e 10 dias no grupo que morreu aos 10 dias após a intervenção cirúrgica. A administração de NAC e solução salina foram feitas sempre pelas mesmas pessoas e realizadas ao final da tarde.

Tratamento com N-acetilcisteína (NAC)

Para o tratamento com NAC foi utilizada solução injetável de NAC (comercialmente conhecida como Fluimucil – Zambon Laboratórios Farmaceuticos), facilmente encontrada no comércio local. Essa fórmula farmacêutica é uma solução na concentração de 100 mg/mL de N-acetilcisteína, diluída em água para injeção.

Os animais que foram tratados com NAC receberam injeções intraperitoneais diárias, na dose de 150 mg/kg/dia. O volume total injetado nunca ultrapassou 1 mL. A administração foi realizada sempre no período da tarde, no mesmo horário e pela mesma pessoa.

A administração de solução salina, utilizada como controle, também ocorreu nas mesmas condições descritas para a NAC. O início destas administrações ocorreu no dia da cirurgia para isolamento e constrição do nervo isquiático, e diariamente após a realização da intervenção cirúrgica. No grupo 3 dias, estes tratamentos tiveram duração de 3 dias. No grupo 10 dias, as administrações duraram 10 dias.

Teste da placa Quente

Para a determinação da sensibilidade térmica nos ratos CT, S e CN foi usado o teste da placa quente (Guedes et al., 2006). Para isto cada animal foi inicialmente aclimatado, por um período de 5 minutos, no aparelho (Figura 5) em temperatura ambiente. Após este procedimento, a placa foi aquecida à temperatura de 50° C. Então, cada animal foi colocado sobre a placa e, neste momento, foi disparado o cronômetro do equipamento para mensuração do tempo de latência de retirada da pata. Assim que o animal apresentou o reflexo de retirada da pata, o mesmo foi rapidamente retirado da placa aquecida para evitar lesão tecidual, e o tempo decorrido até o início do reflexo de retirada foi anotado e considerado como limiar de sensibilidade térmica. O tempo máximo de permanência na placa, caso o animal não demonstrasse reação, foi de 30 segundos, para evitar uma queimadura nas patas. Os testes foram realizados antes do procedimento cirúrgico e nos dias 1 e 3, no grupo 3 dias, e 1, 3, 5, 7 e 10 dias no grupo 10 dias, para avaliar a progressão do quadro patológico.

Estes testes foram realizados sempre em ambiente silencioso e ao início da manhã. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média da latência dos ratos CT, S e CN nos períodos 1 e 3 dias, no grupo 3 dias, e 1, 3, 5, 7 e 10 dias no grupo 10 dias após a lesão.



Figura 05: Aparelho utilizado no teste da placa quente. Note o rato sobre a placa quente, cujos indicadores luminosos mostram temperatura de 50° C (à esquerda) e marcador de tempo em segundos (à direita).

Teste dos Filamentos de Von Frey

Os animais dos grupos CT, S e CN foram testados para determinação de sua sensibilidade mecânica. 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 6A). Após aclimação neste ambiente por 20 minutos, foram aplicados estímulos de ordem crescente de força na superfície plantar da pata posterior direita (ipsilateral à lesão nos ratos lesionados), utilizando-se Filamentos de Von Frey (North Coast Medical, Inc, USA) de 10 a 100 g (Figura 6B). A força em questão pode ser alcançada pelo dobramento do filamento (Figura 6C), o qual foi aplicado 3 vezes durante 3 segundos cada aplicação. Foram consideradas como respostas positivas aquelas em que o animal realizou o movimento de retirada do membro posterior imediatamente após o estímulo mecânico, e foram descartadas as respostas seguidas de caminhada. Foi registrada a menor força (filamento de menor peso) capaz de gerar uma resposta de retirada da pata sob o estímulo mecânico (Yowtak et al., 2011). Este teste foi realizado antes do procedimento cirúrgico e nos dias 1 e 3, no grupo 3 dias, e 1, 3, 5, 7 e 10 dias no grupo 10 dias. Sempre foram realizados em ambiente silencioso e ao início da manhã. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média das respostas pré e pós-lesão dos ratos CT, S e CN nos períodos considerados neste estudo.

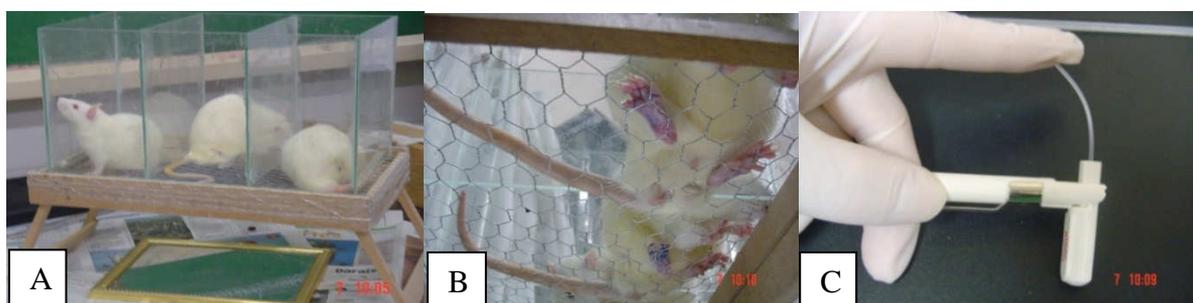


Figura 06: Aparelho utilizado no teste de Von Frey. A) Caixas individualizadas apoiadas em uma superfície elevada de madeira, cujo assoalho é revestido por tela e as laterais por vidro. Cada compartimento possui um rato. Abaixo do aparelho encontra-se um espelho, o qual é empregado para melhor visualização da porção inferior das patas dos ratos. B) Detalhe da porção inferior dos compartimentos mostrados em A para visualização do

revestimento em tela onde se nota as porções plantares de patas posteriores de ratos. As aberturas da tela permitem a aplicação do filamento de Von Frey em uma determinada região da pata do rato. Note como este filamento se curva ao ser aplicada uma força em sua extremidade superior (C).

Preparação das amostras

Os animais dos diferentes grupos experimentais foram mortos por decapitação para a retirada da medula espinal lombossacral. O tecido foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido. Posteriormente foram homogeneizados em solução de KCl 1,15% e PMSF 1 mmol/L. Essas amostras foram centrifugadas a 1000 g, por 20 minutos, e o sobrenadante coletado e armazenado à temperatura de -70°C.

Esse homogeneizado foi utilizado nas técnicas de estresse oxidativo e nitrosativo na medula espinal, com exceção da determinação dos valores de H₂O₂. Para essa técnica, a medula espinal foi retirada e congelada em nitrogênio líquido como nas demais, porém o tecido foi armazenado intacto à temperatura de -70°C, sem homogeneização.

Determinação da Atividade da Glutathione Peroxidase (GPx)

A enzima GPx catalisa a reação de hidroperóxidos com a glutathione reduzida (GSH) para formar glutathione oxidada (GSSG) e o produto da redução do hidroperóxido. Logo, sua atividade pode ser determinada medindo-se o consumo de NADPH na reação de redução acoplada à reação da GPx.

Na realização da técnica, se mediu a atividade da glutathione peroxidase em espectrofotômetro (marca Varian, modelo Cary), em comprimento de onda de 340 nm, em um meio de reação que continha: solução tampão fosfato 0,1 M, NADPH; DTPA 5 mM, GSH, glutathione reductase (GR) e, por fim, hidroperóxido de ter-butila 0,5 mmol/L (TBOOH) (Flohé e Gunzler, 1984). Inicialmente se adicionou na cubeta do espectrofotômetro 955 µL de tampão, 30 µL de homogeneizado, e 15 µL de

TBOOH. O registro da absorbância foi feito por um período de aproximadamente 1 minuto. Os resultados foram expressos em nmoles por minuto por mg de proteína. (Flohé e Gunzler, 1984).

Determinação da atividade da Glutathione Transferase (GST)

As GST são um grupo de enzimas que catalisam reações de conjugação de glutathione com vários xenobióticos, tendo um importante papel na detoxificação de agentes alquilantes. Todas as transferases são ativas com o composto 1-cloro-2,4 dinitro benzeno (CDNB). A GST catalisa a reação de conjugação da glutathione reduzida (GSH) com outras substâncias tóxicas, que possam vir a prejudicar o funcionamento celular. Essa combinação forma os conjugados de glutathione que são exportados para fora da célula. Desse modo, essa enzima desempenha um papel importante na detoxificação celular.

O ensaio usado foi baseado na capacidade da GST de combinar o CDNB com a GSH, formando 2,4-dinitro-fenil-glutathione (DNP-SG), que é um composto colorido. A formação do DNP-SG foi observada espectrofotometricamente no comprimento de onda de 340 nm, utilizando os seguintes reagentes: tampão fosfato de sódio (0,2 M, pH 6,5), GSH (20 mM) e CDNB (20 mM).

Na preparação foram adicionados à cubeta 960 μ L de tampão, 40 μ L de amostra, e 200 μ L de GSH (na concentração final de 1 mM). Após zerar o espectrofotometro em 340 nm, adicionou-se 100 μ L de CDNB e se observou a formação de DNP-SG. Os resultados foram expressos em pmoles/minuto/mg de proteína (Habig, 1974; Mannervik e Gluthemberg, 1981).

Determinação da razão entre Glutathione Reduzida e Oxidada

A razão entre glutathione reduzida e oxidada (GSH/GSSG) foi determinada por meio da avaliação da concentração de glutathione total e da sua forma oxidada, conforme técnica descrita por Akerboom e Sies (1981). Para a determinação da concentração total de glutathione, o tecido foi desproteinizado com ácido perclórico

2 mol/L e centrifugado por 10 min a 1000 g. O sobrenadante foi neutralizado com hidróxido de potássio 2 mol/L. O ensaio foi realizado adicionando à amostra tampão fosfato 100 mmol/L (pH 7,2), nicotinamida dinucleotídeo fosfato (NADPH) 2 mmol/L, glutatona redutase 0,2 U/mL, e 5,5 ditobis (2-nitro ácido benzóico) 70 µmol/L. Para a determinação da glutatona oxidada, foi adicionado ao sobrenadante 20 mmol/L de N-etilmaleimida (NEM) e, após neutralização das amostras com hidróperóxido de potássio 2 mmol/L, o ensaio seguiu como descrito para a glutatona total. A leitura foi realizada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 412 nm e os resultados expressos pela razão GSH/GSSG (estado redox).

Determinação de Peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

O método foi baseado na oxidação do vermelho de fenol pelo H₂O₂, mediado pela peroxidase de rabanete. Para isto fatias de tecido foram incubadas por 30 minutos em tampão fosfato 10 mmol/L (NaCl 140 mmol/L e dextrose 5 mmol/L). O meio de incubação foi coletado e adicionado à solução tampão de vermelho de fenol 0,28 mmol/L e peroxidase de rabanete 8,5 U/mL. Após intervalo de 5 minutos, foi adicionado NaOH 1 N e efetuada a leitura a 610 nm. Os resultados foram expressos em µmoles de H₂O₂/g de tecido (Pick e Keisari, 1980).

Determinação de Nitritos+Nitratos

As concentrações de nitritos+nitratos foram avaliadas pelo método de Granger e colaboradores (1996), o qual se baseia na reação das amostras com o reagente de Griess. Alíquotas de 50 µl das amostras foram incubadas com cofatores enzimáticos e nitrato redutase por 30 minutos, em temperatura ambiente, para conversão de nitrato em nitrito. O nitrito formado foi, então, analisado pela reação desse composto com o reagente de Griess, formando um composto colorido que foi medido em leitora de Elisa, no comprimento de onda de 540 nm. A quantificação das concentrações de nitratos foi realizada utilizando-se os reagentes: reativo de Griess (1g de sulfanilamina, 0,1g de naftilendiamina, 1,3 mL

de ácido ortofosfórico 85%, 97,7 mL de água); TRIS 1M, pH 7,5; NADPH 0,02 mmol/L; glicose-6-fosfato (G6P) 50 mmol/L; glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH) 100 U/ml e nitrato redutase (NR) 10 U/ml.

Ensaio para nitratos: foi adicionado 50 µL de amostra, 10 µL de NADPH, 7µL de Tris, 23 µL de uma mistura de G6P/G6PDH e 10 µL de NR. Em seguida, o ensaio foi incubado à temperatura ambiente, sob agitação, por 30 minutos. Ensaio para nitritos: esse ensaio iniciou-se aos 30 minutos de incubação do ensaio anterior. Adicionou-se 100 µL de amostra e 100 µL do reagente de Griess à microplaca; o ensaio foi incubado à temperatura ambiente, sob agitação, por 10 minutos e, então, a absorbância lida a 540 nm. Os resultados foram avaliados comparando-se uma curva utilizando-se nitrito de sódio 1 mmol/L para o resultado de nitratos (Granger et al., 1996).

Avaliação de parâmetros bioquímicos no plasma

Para determinar o efeito da administração intraperitoneal por 3 e 10 dias de NAC, na dose de 150 mg/kg/dia, sobre a função hepática e renal foram dosados os seguintes parâmetros no plasma dos animais tratados: gama glutamiltransferase (gama GT), transaminase glutâmica oxalacética (TGO), transaminase glutâmica pirúvica (TGP), bilirrubina e creatinina. Como controle foi utilizado o plasma dos ratos que receberam administração de solução salina nos mesmos intervalos de tempo. Para estas determinações foi coletado o sangue que fluía de cada animal após a sua decapitação. Este sangue foi imediatamente coletado em tubos *ependorff* de 2 mL, individuais, contendo uma gota de anticoagulante heparina. Os tubos contendo o sangue foram imediatamente centrifugados por 20 minutos, a 1000 g, em centrífuga refrigerada (Sorvall RC 5B – Rotor SM 24). Após este procedimento, o plasma de cada tubo foi coletado e aliquoteado em tubos tipo *ependorff* de 2 mL e armazenados à temperatura de -70° C. Para as determinações descritas acima foram utilizados *kits* comerciais (LABTEST).

Obtenção e preparação do fígado para a técnica de hematoxilina e eosina

Ao final dos períodos experimentais, os animais dos diferentes grupos experimentais foram mortos por decapitação e uma amostra do fígado de cada rato foi rapidamente retirada e colocada no fixador de Bouin. Este fixador consistia em uma solução saturada de ácido pícrico, formol e ácido acético (Romeis, 1928). Nesta solução, as amostras permaneciam por 02 (duas) horas. Após isto, as amostras foram lavadas várias vezes em álcool 70° e armazenadas nesta solução alcoólica até a inclusão das mesmas em parafina.

Inclusão em parafina

Esta técnica iniciava com a desidratação das amostras de fígado em soluções alcoólicas de concentrações crescentes – álcool 96° (duas trocas de uma hora cada) e álcool 100° (três trocas de uma hora cada). Após, as amostras foram submetidas à dois banhos de clorofórmio, por uma hora cada, e então três banhos de parafina, de uma hora cada. Ao término desse procedimento, as peças foram incluídas em blocos de parafina. Após o endurecimento da parafina (12 horas), o bloco foi montado em tacos de madeira e cortados. Os cortes de 20 µm de espessura foram obtidos em micrótomo tipo Wetzlar (Leitz), os quais foram colocados em banho de água termostaticado (40-45° C) e montados em lâminas albuminizadas. Em seguida, estas lâminas foram colocadas em estufa a 37° C para secagem (Romeis, 1928).

Técnica de Hematoxilina e eosina no tecido hepático

As lâminas contendo os cortes de fígado foram inicialmente hidratadas e, em seguida, colocadas em solução de hematoxilina de Mayer (0,5 g de Hematoxilina, 100 mg de Iodato de Sódio, 25 g de alúmen de Potássio, 0,5 g de

ácido cítrico, 25 g de hidrato de cloral dissolvidos em 500 mL de água destilada) por 8 minutos, em temperatura ambiente. Ao término deste período, as lâminas foram lavadas em água corrente, por 20 minutos. Em seguida, foram colocadas, por 15 a 30 segundos, em solução de eosina 0,5% (500 mg de eosina dissolvida em 100 mL de água destilada). A seguir, passaram rapidamente por álcool 95% e 100%, sendo posteriormente colocadas, por 1 minuto, em carboxilol, seguida de duas passagens em xilol, tendo cada uma delas duração de 1 minuto. Ao término destas etapas, as lâminas foram montadas com Entellan e lamínulas.

Análise estatística

O cálculo do “n” (número de animais) foi baseado na análise da atividade da glutatona reduzida em animais com constrição periférica, no programa Computer Programs for Epidemiologists (WIN PEPI – versão 9.1), utilizando-se dados de um estudo prévio (Naik et al., 2006). Foi estabelecido um nível de significância de 0,05, poder estatístico de 90% e desvio padrão assumido de 0,01. Nenhuma perda foi assumida para esse estudo. Assim, chegou-se a um número amostral de 06 animais por grupo (12 grupos = 72 animais no total).

Os dados dos testes de sensibilidades térmica (Teste da Placa Quente) e mecânica (Teste dos filamentos de Von Frey) foram analisados pelo teste de análise de variância (ANOVA) de amostras repetidas. Foram comparados os valores pré-lesão e pós-lesão dentro de cada grupo na análise dos resultados. Os testes bioquímicos foram analisados por ANOVA de três vias seguida do pós-teste de Tukey. Os fatores considerados foram os tipos de intervenções cirúrgicas, tratamento e tempo. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de p foi $<0,05$. Para a realização dos testes estatísticos foi utilizado o software *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS), versão 16,0.

RESULTADOS

Teste da placa Quente

A latência das respostas obtidas antes da lesão periférica (pré-lesão) nos animais dos grupos CT, S e CN não diferiram significativamente no teste da placa quente. Esta latência de resposta também não modificou significativamente nos ratos do grupo controle tratados com solução salina e NAC por 3 e 10 dias (Fig. 7A), mostrando que a administração intraperitoneal destas soluções não altera a sensibilidade térmica dos animais.

No grupo S, a latência de resposta ao teste da placa quente estava significativamente reduzida aos três dias após a lesão tecidual apenas no grupo de ratos tratados com NAC. Aos cinco dias, a redução na latência de resposta a este teste se manteve nos animais tratados com NAC. Nos demais períodos analisados (7 e 10 dias após a lesão tecidual), não foram observadas alterações estatisticamente significativas nas respostas a este teste. Os valores obtidos nesses períodos foram similares àqueles ocorridos na pré-lesão, o que sugere recuperação da lesão tecidual (Fig. 7 B). Nos animais tratados com solução salina não houve alteração significativa do tempo de latência nos períodos analisados.

No grupo de ratos CN, a latência de resposta ao teste da placa quente estava significativamente reduzida um dia após a constrição no nervo isquiático, tanto nos ratos tratados com solução salina como naqueles que receberam NAC. Porém, enquanto a administração de solução salina foi incapaz de aumentar a latência de resposta a este teste nos períodos de 3, 5, 7 e 10 dias após a intervenção cirúrgica, o tratamento com NAC produziu aumento estatisticamente significativo nesta latência de resposta aos 3, 5, 7 e 10 dias após a lesão nervosa periférica. Nestes períodos, os valores obtidos na latência do teste da placa quente foram similares àqueles ocorridos antes da lesão nervosa, mostrando que a redução da hipersensibilidade térmica ocorreu mais precocemente nos ratos tratados com NAC do que com solução salina (Fig. 7C).

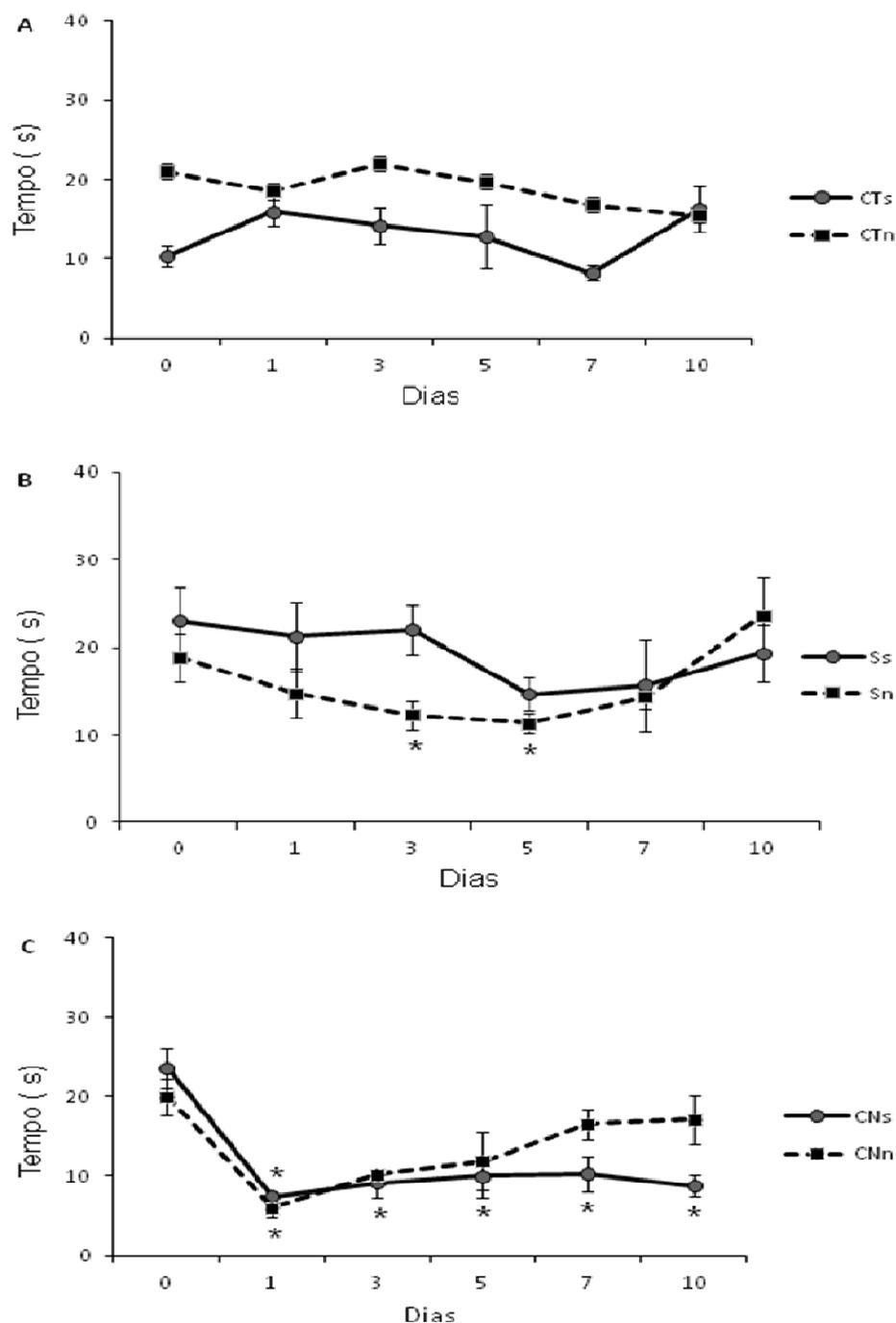


Figura 07: Latência de resposta (s, segundos) ao teste de sensibilidade térmica na placa quente em ratos que receberam administração intraperitoneal de solução salina (s) e N-acetilcisteína (n), na dose de 150 mg/kg/dia. Estão representadas as respostas pré (Dia 0) e pós-lesão (Dia 1, 3, 5, 7 e 10) de ratos sem qualquer manipulação cirúrgica (CTs salina CTn NAC) e submetidos à manipulação (Ss salina, Sn NAC) e constrição do nervo isquiático direito (CNs salina, CNn NAC). *expressa diferença significativa em relação ao valor pré-lesão (ANOVA de amostras repetidas, $p < 0,05$).

Teste com os Filamentos de Von Frey

As respostas ao teste de sensibilidade mecânica aos filamentos de Von Frey, obtidas antes da lesão periférica (pré-lesão) nos animais dos grupos CT, S e CN, não diferiram significativamente no teste. Esta resposta também não modificou significativamente nos ratos do grupo controle tratados com solução salina e NAC por 3 e 10 dias (Fig. 8A), mostrando que a administração intraperitoneal destas soluções não altera a sensibilidade mecânica dos animais.

No grupo S, a resposta ao teste de sensibilidade mecânica estava significativamente reduzida ao primeiro dia após a lesão tecidual, tanto nos animais tratados com solução salina quanto naqueles tratados com NAC. Nos demais períodos analisados (3, 5, 7 e 10 dias após a lesão tecidual), não foram observadas alterações estatisticamente significativas nas respostas a este teste. Os valores obtidos foram similares àqueles ocorridos na pré-lesão, o que sugere a recuperação da lesão tecidual em ambos os tratamentos (Fig. 8B).

No grupo de ratos CN, a resposta ao teste de sensibilidade mecânica estava significativamente reduzida um dia após a constrição do nervo isquiático, tanto nos ratos tratados com solução salina como naqueles que receberam NAC. Porém, enquanto a administração de solução salina foi incapaz de aumentar o limiar de resposta a este teste nos períodos de 3, 5, 7 e 10 dias após a intervenção cirúrgica, a administração de NAC produziu aumento estatisticamente significativo neste limiar de resposta já aos 3 dias após a lesão nervosa periférica, o qual se manteve nos demais intervalos analisados (5, 7 e 10 dias). Nestes períodos, os valores obtidos no teste de Von Frey não diferiram significativamente daqueles obtidos antes da lesão nervosa, mostrando a recuperação da sensibilidade mecânica apenas nos ratos que receberam tratamento com NAC. (Fig. 9C).

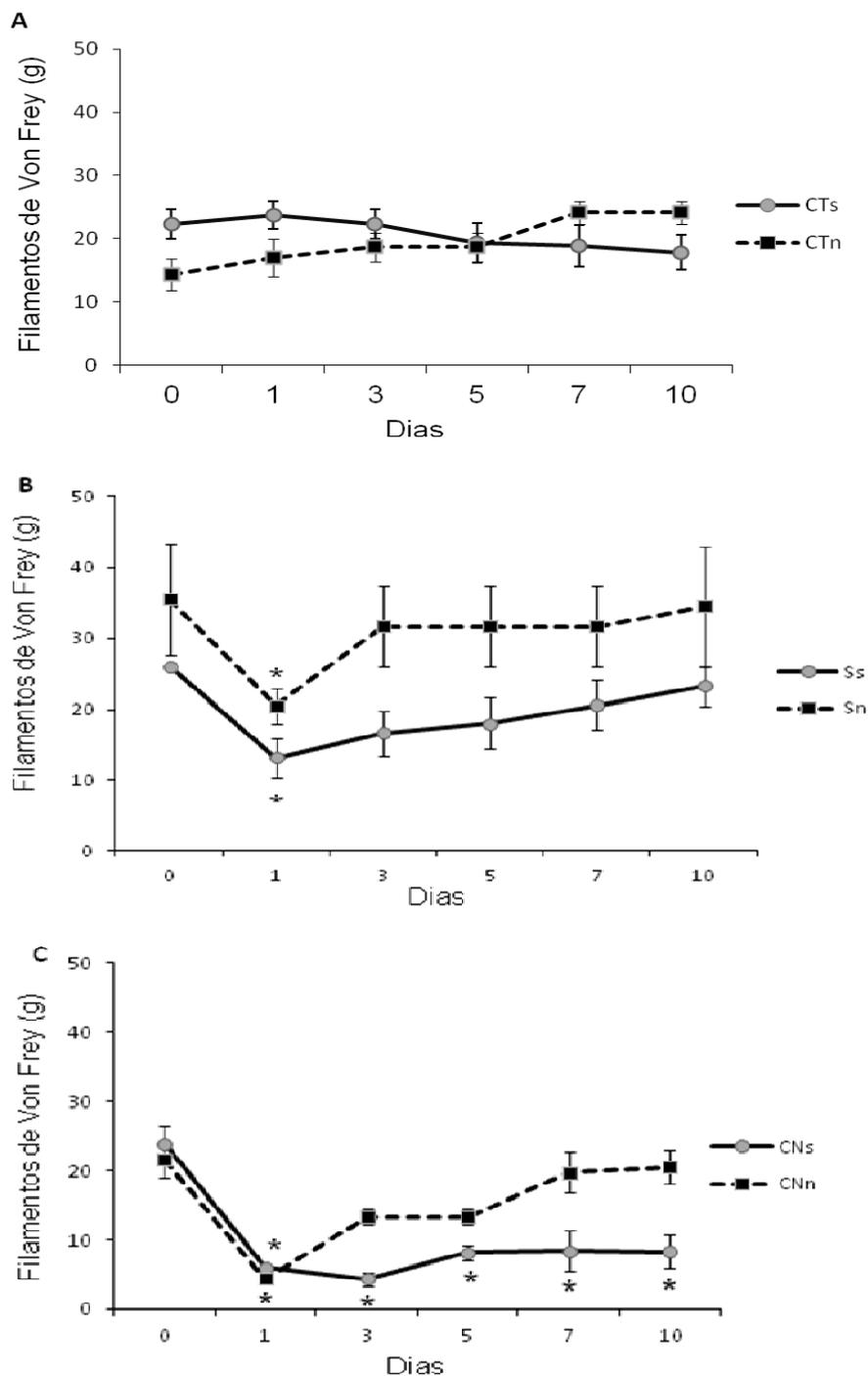


Figura 08: Respostas ao teste de sensibilidade mecânica aos filamentos de Von Frey em ratos que receberam administração intraperitoneal de solução salina (s) e N-acetilcisteína (n) na dose de 150 mg/kg/dia. Estão representadas as respostas pré (Dia 0) e pós-lesão (Dia 1, 3, 5, 7 e 10) de ratos sem qualquer manipulação cirúrgica (CTs: salina CTn NAC) e submetidos à manipulação (Ss salina, Sn NAC) e constrição no nervo isquiático direito (CNs salina, CNn NAC). *expressa diferença significativa em relação ao valor pré-lesão (ANOVA de amostras repetidas, $p < 0,05$).

Determinação da Atividade da Glutathione Peroxidase (GPx)

A atividade da enzima GPx não variou significativamente na medula espinal dos animais controles com a administração de NAC ou de solução salina por 3 e 10 dias (Figura 09).

Aos três dias após a lesão periférica, a atividade da GPX não mudou significativamente no grupo *Sham*, tanto nos animais tratados com solução salina como naqueles que receberam administração de NAC. Porém, aos 10 dias após a lesão tecidual ocorreu aumento estatisticamente significativo na atividade da GPx no grupo *Sham* que recebeu solução salina, quando estes valores foram comparados àqueles obtidos nos grupos controle e constrição nervosa tratados com solução salina por 10 dias. Contudo, no grupo *Sham* que recebeu NAC a atividade da GPx foi similar àquela encontrada no grupo controle tratado com NAC dos 10 dias (Figura 09).

No grupo constrição nervosa, a atividade dessa enzima na medula espinal se manteve inalterada aos três dias. Nesse período, os valores encontrados não diferiram significativamente nem nos animais tratados com solução salina nem naqueles tratados com NAC. Porém, aos 10 dias houve aumento significativo da atividade da GPx nos animais que sofreram lesão nervosa periférica e receberam tratamento com NAC, quando seus valores foram comparados aos dos grupos controle e *Sham* que receberam NAC por 10 dias. Contudo, esse aumento não foi observado nos animais com constrição nervosa tratados com solução salina por 10 dias após a intervenção cirúrgica (Figura 09).

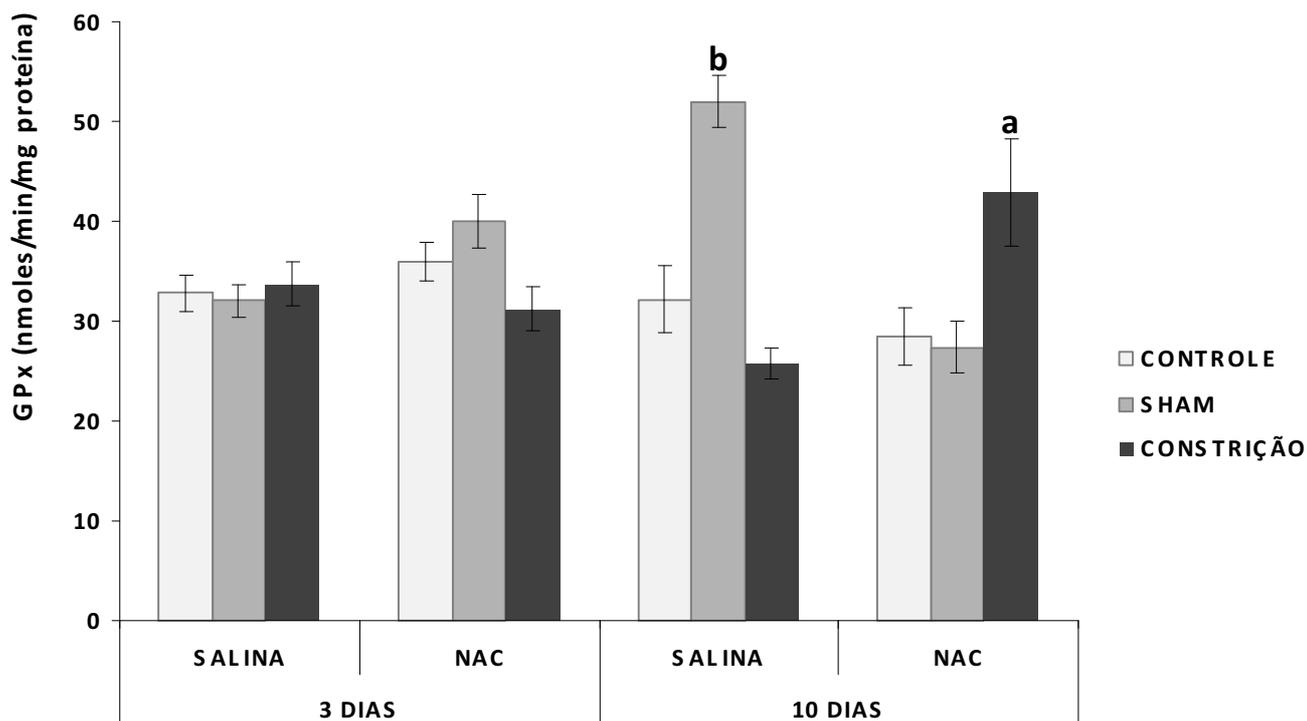


Figura 09: Atividade da enzima glutathiona peroxidase (GPx) (expressa em nmoles/min/mg proteína) em medula espinal de ratos que receberam administração intraperitoneal de solução salina e N-acetilcisteína (NAC), na dose de 150 mg/kg/dia, por 3 e 10 dias após serem submetidos à manipulação (Sham) e à constrição no nervo isquiático direito. Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão da média, número de animais/grupo=6. (a) indica diferença significativa quando comparado aos grupos *Sham* e controle do mesmo período. (b) indica diferença significativa quando comparado aos grupos controle e constrição nervosa do mesmo período ($p < 0,05$, ANOVA de três vias seguida de pós-teste de Tukey).

Determinação da atividade da Glutathione Transferase (GST)

A atividade da enzima GST na medula espinal dos animais controle não alterou significativamente com a administração de NAC ou solução salina por 3 e 10 dias (Figura 10).

No grupo Sham dos 3 dias, a atividade da GST na medula espinal dos ratos tratados com solução salina e NAC foram similares àquelas encontradas no grupo controle desse período. Contudo, aos 10 dias após a lesão tecidual houve aumento estatisticamente significativo na atividade dessa enzima no grupo Sham que recebeu solução salina, quando estes valores foram comparados aos dos grupos controle e constrição nervosa que receberam solução salina. Este aumento não ocorreu no grupo *Sham* NAC aos 10 dias após a intervenção cirúrgica (Figura 10).

Diferente dos animais do grupo *Sham*, os ratos do grupo constrição nervosa tratados com solução salina apresentaram aumento significativo na atividade da GST na medula espinal 3 dias após a lesão nervosa periférica, quando estes valores foram comparados àqueles encontrados nos grupos controle e *Sham* tratados com solução salina, nesse intervalo de tempo. Contudo, este acréscimo não foi observado no grupo constrição nervosa que recebeu administração de NAC por 3 dias, mostrando que a administração dessa substância impediu o aumento na atividade da GST. Porém, aos 10 dias a atividade da GST no grupo constrição nervosa tratado com solução salina não diferiu significativamente daquela observada nos animais controle que receberam solução salina, mas aumentou significativamente na medula espinal dos ratos com constrição nervosa e tratamento com NAC, quando estes valores foram comparados àqueles do grupo controle tratado com NAC por 10 dias (Figura 10).

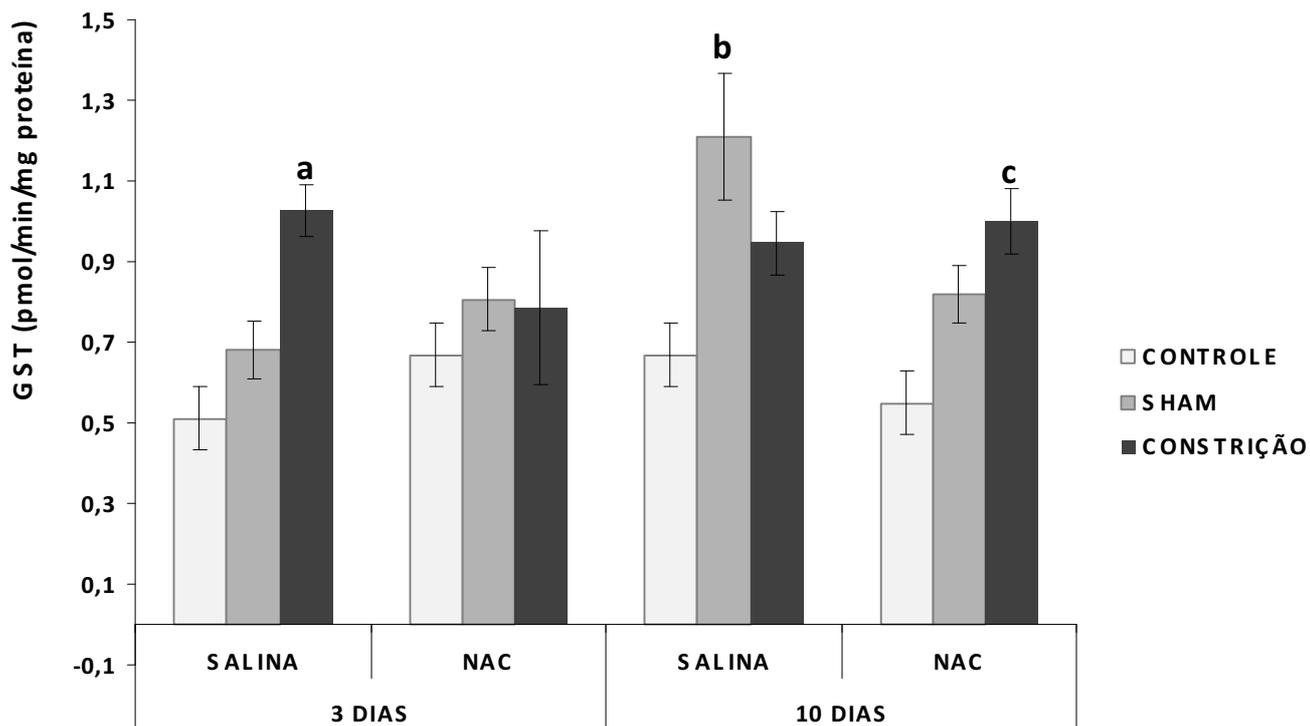


Figura 10: Atividade da enzima glutatona transferase (GST) (expressa em pmol/min/mg proteína) em medula espinal de ratos que receberam administração intraperitoneal de solução salina e N-acetilcisteína (NAC), na dose de 150 mg/kg/dia, por 3 e 10 dias após serem submetidos à manipulação (*Sham*) e à constrição no nervo isquiático direito. Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão da média, número de animais/grupo=6. (a) indica diferença significativa quando comparado aos grupos *Sham* e controle do mesmo período. (b) indica diferença significativa quando comparado aos grupos controle e constrição do mesmo período. (c) indica diferença significativa em relação ao grupo controle deste período ($p < 0,05$ ANOVA de três vias seguida de pós-teste de Tukey).

Determinação da razão entre Glutathiona Reduzida e Oxidada (GSH/GSSG)

A razão GSH/GSSG na medula espinal dos animais controles não modificou significativamente com a administração de solução salina e NAC por 3 e 10 dias (Figura 11).

Assim como no grupo controle, no grupo *Sham* também não foram encontradas alterações significativas nesta razão nos períodos considerados neste estudo, tanto nos ratos *Sham* que receberam solução salina como naqueles que receberam NAC, mostrando que a lesão tecidual não modifica a razão GSH/GSSG na medula espinal (Figura 11).

Contudo, no grupo constrição nervosa tratado com solução salina esta razão estava significativamente aumentada 3 dias após a constrição no nervo isquiático. Este acréscimo não ocorreu no grupo constrição nervosa que recebeu administração de NAC, mostrando que a NAC foi capaz de impedir o acréscimo nessa razão. Aos 10 dias após a constrição nervosa, os grupos constrição nervosa tratados com solução salina e constrição nervosa que recebeu administração de NAC apresentaram valores na razão GSH/GSSG que não diferiram significativamente dos encontrados nos grupos controle e *Sham* de cada um dos tratamentos (Figura 11).

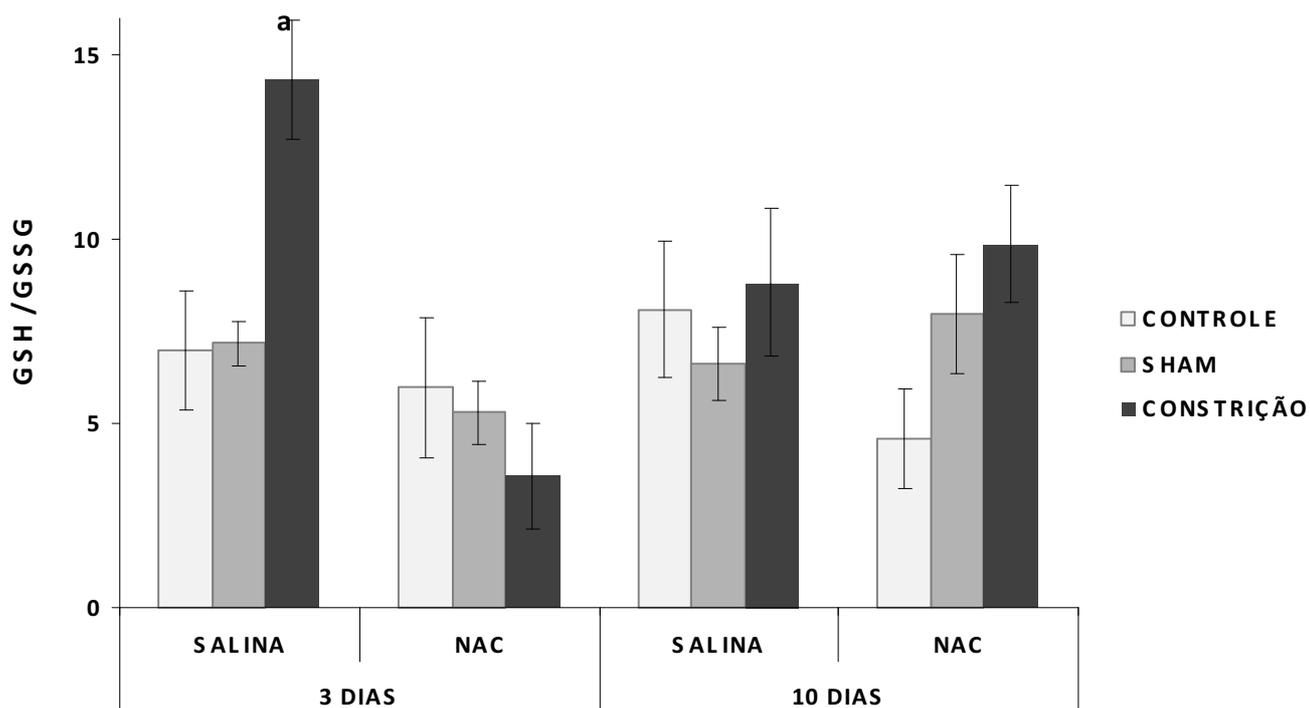


Figura 11: Razão entre glutathiona reduzida e oxidada (GSH/GSSG) em medula espinal de ratos que receberam administração intraperitoneal de solução salina e N-acetilcisteína (NAC), na dose de 150 mg/kg/dia, por 3 e 10 dias após serem submetidos à manipulação (*Sham*) e à constrição no nervo isquiático direito. Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão da média, número de animais/grupo=6. (a) indica diferença significativa quando comparado aos grupos *Sham* e controle do mesmo período ($p < 0,05$, ANOVA de três vias seguida de pós-teste de Tukey).

Determinação de Peróxido de hidrogênio

Os valores de H_2O_2 não modificaram significativamente na medula espinal lombossacral dos animais controle e *Sham* nos períodos de tempo considerados nesse estudo, ou seja, 3 e 10 dias. Estes valores também não foram significativamente alterados nesses grupos experimentais pela administração de solução salina e NAC.

Porém, a constrição no nervo isquiático provocou uma redução estatisticamente significativa nesses valores, a qual ocorreu tanto nos grupos constrição que recebeu solução salina como naqueles que receberam NAC por 3 e 10 dias após a lesão nervosa periférica (Figura 12). Assim, este tipo de lesão nervosa ocasionou diminuição nos valores de H_2O_2 independente do tratamento com solução salina ou NAC.

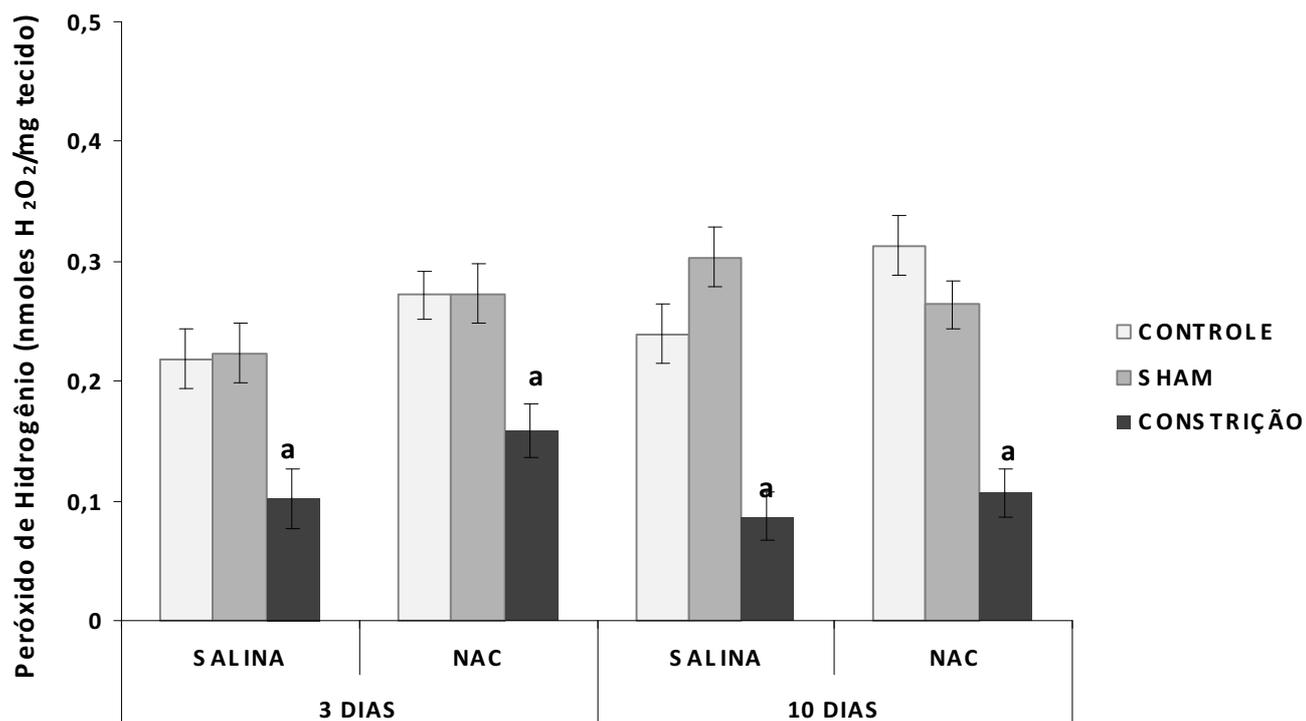


Figura 12: Quantificação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂ - em nmoles H₂O₂/mg tecido) em medula espinal de ratos que receberam administração intraperitoneal de solução salina e N-acetilcisteína (NAC), na dose de 150 mg/kg/dia, por 3 e 10 dias após serem submetidos à manipulação (*Sham*) e à constrição no nervo isquiático direito. Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão da média, número de animais/grupo=6. (a) indica diferença significativa quando comparado aos grupos *Sham* e controle do mesmo período ($p < 0,05$, ANOVA de três vias seguida de pós-teste de Tukey)

Determinação de Nitritos+Nitratos

Os valores de nitritos+nitratos na medula espinal dos animais controles não modificaram significativamente com a administração de solução salina e NAC por 3 e 10 dias (Figura 13).

Nos animais *Sham* dos 3 dias, os metabólitos do NO tiveram redução significativa apenas no grupo que recebeu NAC, não ocorrendo alterações significantes nos valores de nitritos+nitratos nos animais que receberam solução salina. Neste grupo, os valores encontrados foram similares àqueles obtidos no grupo controle desse período. Uma diminuição estatisticamente significativa nos metabólitos do NO no grupo *Sham* tratado com solução salina ocorreu aos 10 dias após a intervenção cirúrgica, quando estes valores foram comparados àqueles obtidos nos grupos controle e constrição nervosa tratados com solução salina por 10 dias. Porém, nos ratos do grupo *Sham* que receberam administração de NAC, os valores de nitritos+nitratos obtidos aos 10 dias após a lesão tecidual não diferiram significativamente em relação aos dos grupos controle e constrição desse período (Figura 13).

Nos animais que sofreram constrição nervosa, um aumento estatisticamente significativo nos valores de nitritos+nitratos foi observado aos 3 dias no grupo que recebeu solução salina, quando estes valores foram comparados àqueles encontrados nos grupos controle e *Sham* tratados com solução salina por 3 dias. Contudo, nos animais que receberam administração de NAC, por 3 dias, houve redução significativa desses metabólitos, quando estes valores foram comparados ao grupo controle tratado com NAC desse período. Aos 10 dias após a lesão nervosa periférica, os valores de nitritos+nitratos do grupo constrição nervosa que recebeu NAC não diferiram significativamente daqueles encontrados nos grupos controle e *Sham* tratados com NAC. Porém, nos animais que receberam solução salina os metabólitos do NO estavam significativamente reduzidos aos 10 dias após a intervenção cirúrgica, quando estes valores foram comparados àqueles obtidos no grupo controle tratado com solução salina nesse período (Figura 13).

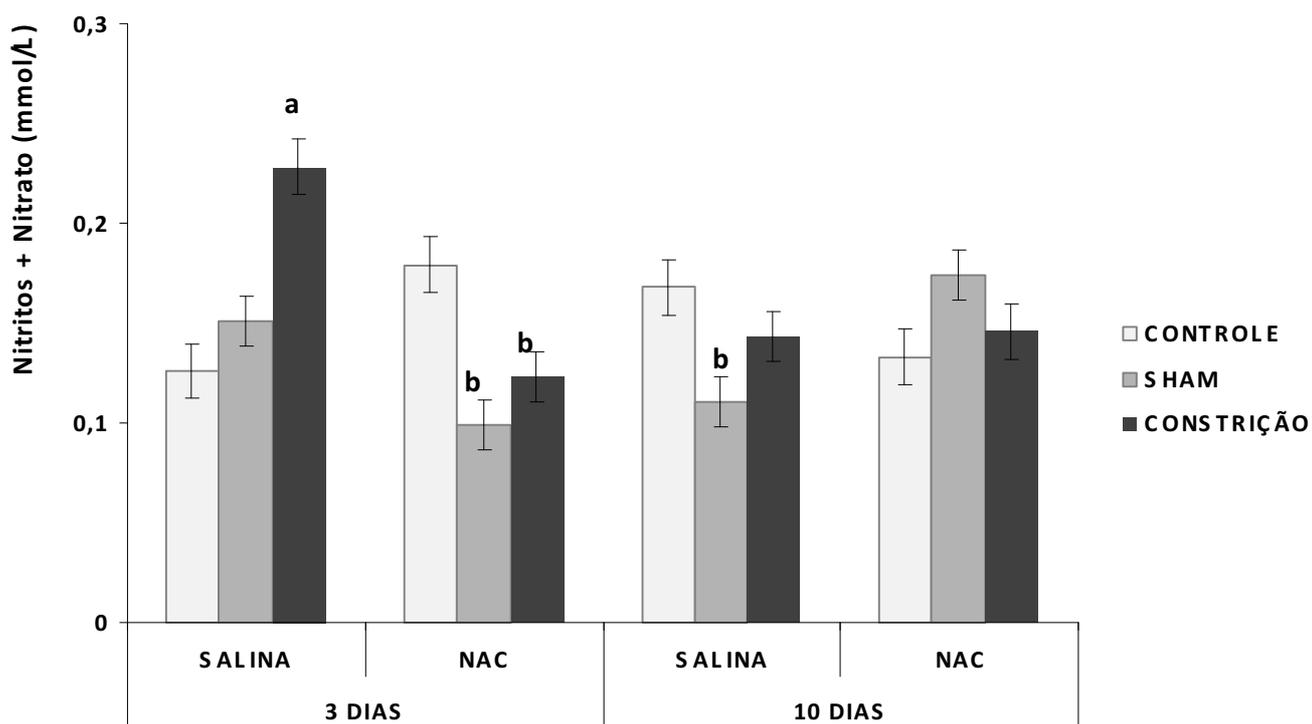


Figura 13: Relação de Nitritos+Nitratos (expressa em mmol/L) em medula espinal de ratos que receberam administração intraperitoneal de solução salina e N-acetilcisteína (NAC), na dose de 150 mg/kg/dia, por 3 e 10 dias após serem submetidos à manipulação (Sham) e à constrição no nervo isquiático direito. Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão da média, número de animais/grupo=6. (a) indica diferença significativa quando comparado aos grupos Sham e controle do mesmo período. (b) indica diferença significativa em relação ao grupo controle do mesmo período ($p < 0,05$ ANOVA de três vias seguida de pós-teste de Tukey).

Indicadores plasmáticos de função hepática e renal

Os indicadores plasmáticos de função hepática (gama GT, TGO, TGP e bilirrubina) e de função renal (creatinina) não modificaram significativamente com a administração de NAC por 3 e 10 dias. Estes valores foram similares àqueles encontrados nos ratos que receberam administração de solução salina nesses mesmos intervalos de tempo (Tabela 2). Esses resultados mostram que a administração de NAC, na dose utilizada nesse estudo, não foi hepatotóxica e nefrotóxica para os animais.

Tabela 2: Valores de gama GT, TGO, TGP, bilirrubina e creatinina em plasma de ratos que receberam administração intraperitoneal de solução salina e N-acetilcisteína (NAC), na dose de 150 mg/kg/dia, por 3 e 10 dias.

	Administrações por 10 dias	
	Solução salina	NAC
TGO (mmol/L)	103,66 ± 4,50	120,61 ± 9,89
TGP (mmol/L)	55,81 ± 2,78	57 ± 5,50
GAMA GT (mmol/L)	54,21 ± 9,18	29,86 ± 4,22
BILIRRUBINA TOTAL (mmol/L)	1,08 ± 0,10	1,16 ± 0,15
BILIRRUBINA DIRETA (mmol/L)	0,75 ± 0,17	1,11 ± 0,14
CREATININA (mmol/L)	0,12 ± 0,04	0,11 ± 0,04

Os resultados referentes aos 3 dias não foram mostrados por serem similares àqueles obtidos aos 10 dias. Os valores estão expressos em média±erro padrão da média. Gama GT (gama glutamiltransferase), TGO (transaminase glutâmica oxalacética), TGP (transaminase glutâmica pirúvica). Não houve diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

Hematoxilina e eosina no tecido hepático

Os cortes de fígado, corados por técnica de hematoxilina e eosina, não mostraram alterações em seu aspecto morfológico em ratos que receberam administração intraperitoneal de solução salina e NAC, na dose de 150 mg/kg/dia, por 3 e 10 dias (Figura 14).

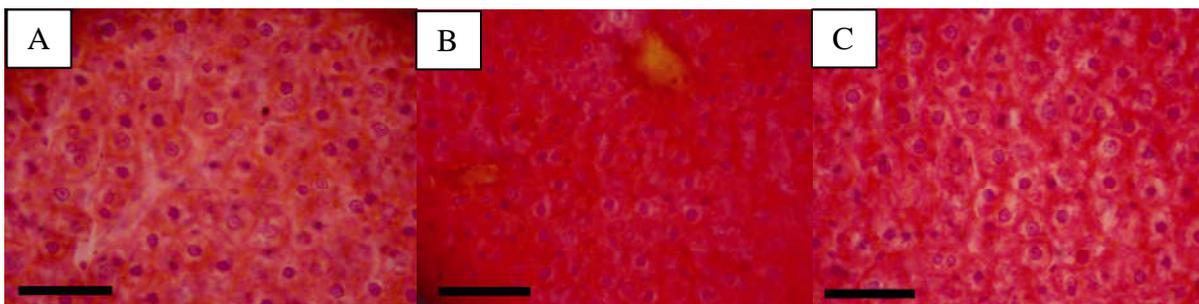


Figura 14: Fotomicrografias de seções coronais de fígado de ratos que receberam administração intraperitoneal de solução salina (A) e N-acetilcisteína (NAC), na dose de 150 mg/kg/dia, por 3 (B) e 10 (C) dias. Note o aspecto morfológico similar dos hepatócitos corados por técnica de Hematoxilina e Eosina nas três fotomicrografias. Barras de calibração: 5 μ m (A, B e C).

DISCUSSÃO

No presente estudo demonstramos aumento nas sensibilidades mecânica e térmica após indução de lesão nervosa por constrição no nervo isquiático de ratos. A administração de NAC ocasionou o retorno dessas sensibilidades aos valores obtidos antes da lesão nervosa periférica. Paralelamente a essas alterações de sensibilidade, ocorreram modificações em parâmetros de estresse oxidativo e nitrosativo na medula espinal lombossacral desses animais, muitas das quais foram modificadas pelo tratamento com NAC.

A dose de 150 mg/kg/dia de NAC, durante os intervalos de 3 e 10 dias de tratamento, não modificou significativamente os indicadores plasmáticos de função hepática e renal. Além disso, a análise histológica do fígado não revelou a ocorrência de alterações na morfologia dos hepatócitos. A mesma dose já havia sido empregada por outros pesquisadores, porém nenhum deles avaliou parâmetros plasmáticos de função hepática e renal (Hart et al., 2004; Naik et al., 2006; Welin et al., 2009; Hanci et al., 2010; Rossato et al., 2010). Assim, os resultados dos indicadores plasmáticos dessas funções foram importantes para demonstrar que esta dose diária de NAC, por 10 dias, não é hepatotóxica e nefrotóxica, o que possibilita sua possível utilização clínica como agente analgésico.

A alteração das sensibilidades mecânica e térmica nos ratos do grupo CN que receberam administração de solução salina está de acordo com dados da literatura que demonstram acréscimo nessas sensibilidades em vários modelos de lesão nervosa periférica, inclusive na lesão por constrição no nervo isquiático utilizada em nosso estudo (Khalil, 2001; Cizcova et al., 2002; Khodr e Kim, 2004; Gabay, 2004; Varija et al., 2009; Constandil et al., 2011; Kawano et al., 2011). A administração de NAC também reproduziu os efeitos analgésicos dessa molécula já descritos na literatura (Naik et al., 2006). Recentemente, em um modelo de dor inflamatória (Rossato et al., 2010), a administração de NAC após a indução do

processo inflamatório também provocou analgesia. Porém, está demonstrado que as alterações neuroquímicas não são as mesmas em modelos de dor inflamatória e neuropática (Haddad, 2007). Assim, os resultados do presente estudo são relevantes por demonstrar a capacidade da NAC provocar analgesia também em modelo de dor neuropática.

Paralelamente ao efeito analgésico promovido pela administração de NAC, mudanças em parâmetros de estresse oxidativo e nitrosativo ocorreram na medula espinal lombossacral dos ratos submetidos à lesão periférica, tanto nos animais que receberam administração de NAC como de solução salina. No local da lesão, foi demonstrado que a administração de antioxidante promove redução de EROs, evidenciando a participação dessas espécies na nocicepção (Liu et al., 1999, Liu et al., 2000, Bao and Liu, 2004). Também foi demonstrado correlação entre EROs e nitrogênio e processamento de dor neuropática na medula espinal (Yowtak et al., 2011). Em nosso estudo, as mudanças na medula espinal lombossacral, região de entrada das informações sensoriais no modelo experimental utilizado, não ocorreram somente pela lesão nervosa por constrição, mas também pela lesão tecidual gerada para isolamento do nervo isquiático. Como a lesão tecidual também foi capaz de promover aumentos nas sensibilidades térmica e mecânica nos animais que receberam solução salina, pode-se sugerir a ocorrência de sensibilização neste grupo [sensibilização, segundo IASP (2008), é o aumento na responsividade de neurônios à estimulação normal ou recrutamento de uma resposta a estímulos normalmente sublimiares]. Contudo, a sensibilização teve menor duração nos ratos *Sham*, uma vez que o retorno aos valores pré-lesão ocorreu mais rapidamente nesses animais do que no grupo CN. Este mesmo padrão de resposta hiperalgésica precoce foi observado em ratos *Sham* de outros estudos com modelo de dor neuropática, um com constrição no nervo isquiático (Goecks, 2011) e outro com secção deste nervo (Guedes et al., 2006), os quais também relacionaram esta ocorrência com lesão tecidual e sensibilização.

Ao analisarmos as sensibilidades térmica e mecânica nos animais do grupo *Sham*, observa-se que o retorno aos valores pré-lesão ocorreram paralelamente, não parecendo haver efeito analgésico da administração de NAC nesses animais.

Possivelmente estes resultados se relacionam com a diferença de sensibilização presente nos grupos *Sham* e CN.

Ao considerarmos os parâmetros de estresse oxidativo aqui estudados, se observa que a redução de H_2O_2 ocorreu tanto no grupo salina com constrição nervosa periférica como naquele com esta mesma lesão que recebeu administração de NAC. Assim, esta redução parece ser característica da lesão nervosa. É provável que o decréscimo na formação de H_2O_2 no grupo CN contribua para a facilitação da transmissão da informação nociceptiva, uma vez que a transmissão sináptica parece ser reduzida diante de acréscimo nessa molécula (Geniatullin et al., 2006; Rice, 2011). O efeito promovido pela administração de NAC foi mudanças na rota antioxidante para a manutenção dos valores baixos de H_2O_2 . Enquanto a atividade da enzima GST e a razão GSH/GSSG aumentaram aos 3 dias na medula espinal dos ratos com constrição nervosa periférica que receberam solução salina, a administração de NAC aumentou a atividade das enzimas GST e GPx aos 10 dias após a intervenção cirúrgica, não modificando significativamente a razão GSH/GSSG nos intervalos de tempo considerados neste estudo.

A manutenção da atividade da enzima GPx na medula espinal dos ratos CN que receberam solução salina indica a utilização de outra via para a neutralização do H_2O_2 . É sabido que a catalase neutraliza o H_2O_2 , resultando de sua atuação água e O_2 (Mruk et al., 2002; Nishikawa et al., 2009). Um estudo recente mostrou acréscimo na atividade desta enzima em medula espinal de ratos submetidos à constrição no nervo isquiático, tanto aos 3 como aos 10 dias após a lesão nervosa periférica (Goecks, 2011), o que permite sugerir que a catalase seja a enzima envolvida na neutralização de H_2O_2 nos animais que receberam administração de solução salina. Contudo, sabe-se que a atividade da SOD está diminuída na medula espinal lombossacral de ratos 3 dias após a lesão nervosa periférica, mas não aos 10 dias após esta intervenção cirúrgica (Goecks, 2011). Como no presente estudo estavam aumentados os metabólitos do NO na medula espinal de ratos com constrição no nervo isquiático e tratamento com solução salina por 3 dias, é possível que a diminuição da atividade da SOD nesse período se deve ao efeito inibitório do NO sobre a atividade desta enzima (Joe e Lokesh, 1997; Khalil e Khodr, 2001; Naik et al., 2006). Esta menor atividade da SOD

provavelmente também contribuiu para os menores valores de H₂O₂ aos 3 dias no grupo CN tratado com solução salina.

O acréscimo tardio na atividade da GPx nos ratos CN que receberam administração de NAC se deve provavelmente à maior disponibilidade de glutathiona, já que a NAC é capaz de doar aminoácidos cisteína, os quais são precursores na síntese de glutathiona (Hart et al., 2008). Está demonstrado que a glutathiona atua como doador de elétrons para a GPx, possuindo também ação direta na detoxificação de EROs (Cooper e Kristal, 1997). Possivelmente essa ação direta seja a causa da inexistência de alterações significativas na atividade da GPx e na razão GSH/GSSG aos 3 dias nos ratos CNn. Estudos mostram que a depleção de glutathiona, particularmente na mitocôndria, aumenta a suscetibilidade dos neurônios a uma variedade de estímulos tóxicos e ao estresse oxidativo (Ratan et al., 1994; Cooper e Kristal, 1997; Wullner et al., 1999).

Como a GST também é detoxificadora de hidroperóxidos orgânicos (Halliwell e Gutteridge, 2007), o aumento de sua atividade no grupo CN que recebeu solução salina provavelmente se relaciona com o acréscimo de hidroperóxidos lipídicos. Um estudo recente deste grupo mostrou aumento nos hidroperóxidos lipídicos na medula espinal de ratos com constrição no nervo isquiático (Goecks, 2011). Como este mesmo autor observou a ocorrência de aumento nos hidroperóxidos lipídicos em medula espinal de ratos *Sham* aos 10 dias após a lesão tecidual, é provável que o acréscimo da atividade da GST na medula espinal dos ratos *Sham* aos 10 dias também se relacione à atividade detoxificadora desta enzima. Esta mesma hipótese pode ser sugerida para o aumento da atividade da GST aos 10 dias no grupo CN tratado com NAC. Porém, nesses animais é preciso considerar ainda a capacidade desta enzima de catalisar a reação de combinação da glutathiona reduzida (GSH) com outras substâncias tóxicas que possam vir a prejudicar o funcionamento celular. Essa combinação forma os conjugados de glutathiona que serão exportados para fora do meio interno da célula (Halliwell e Gutteridge, 2007). Deste modo, esta enzima pode estar desempenhando um papel fundamental na detoxificação celular pelo maior período de administração de NAC.

Interessantemente, a diferença nos tratamentos com soluções salina e NAC está na formação dos metabólitos do NO. A administração de NAC provocou

redução nesses metabólitos já aos 3 dias, enquanto os mesmos estavam elevados na medula espinal dos ratos que receberam solução salina. Estes animais mostraram redução desses metabólicos aos 10 dias após a intervenção cirúrgica. O aumento de NO na medula espinal provavelmente contribuiu para a manutenção do acréscimo nas sensibilidades térmica e mecânica dos ratos com constrição no nervo isquiático tratados com solução salina. Um apoio a esta hipótese é a demonstração que uma das modificações observadas após constrição no nervo isquiático é acréscimo na formação de NO (Khalil e Khodr, 2001; Naik et al., 2006). Esta condição experimental promove ainda *upregulation* na expressão e na atividade da enzima NOS (Zhang et al., 1993; Cizkova et al., 2002). A ativação do receptor glutamatérgico do tipo NMDA (N-Metil-D-Aspartato), o qual sabidamente está ativado em situações de dor (Woolf and Thompson, 1991, Ultenius et al., 2006), resulta também em liberação de íons superóxido, aumento na concentração intracelular de cálcio e formação de NO (Khalil et al., 1999; McInnis et al., 2002). Assim, é possível que a redução na formação de NO, descrita em nosso estudo, tenha contribuído para o retorno mais precoce das sensibilidades térmica e mecânica nos ratos CN tratados com NAC. Outro apoio a esta hipótese são os estudos onde a inibição da enzima NOS promoveu diminuição na hiperalgesia (Moore et al., 1991; Meller et al., 1994).

Neste contexto, os resultados ocorridos nos ratos do grupo *Sham* são intrigantes. Nestes animais, a redução nos metabólitos do NO ocorreu aos 3 dias com a administração de NAC e coincidiu com o retorno da sensibilidade mecânica aos valores pré-lesão. Contudo, a sensibilidade térmica estava aumentada neste grupo, nesse período. Esta sensibilidade só retornou aos valores pré-lesão aos 7 dias após a intervenção cirúrgica. Neste momento, não podemos explicar esta diferença. É possível que a mesma se relacione ao papel contraditório do NO no controle da nocicepção. Estudos mostram que esta molécula atua tanto provocando hiperalgesia como anti-nocicepção dependendo de sua concentração e de sua localização espacial no tecido (Cheng e Ji, 2008).

Dado ao papel contraditório do NO, ao se relacionar esta molécula com NAC e nocicepção outros mecanismos precisam também ser considerados. Foi demonstrado *in vitro* que a NAC é capaz de suprimir a ativação de uma das proteínas cinases da família de proteínas ativadas por mitógenos, a p38 (Floyd, 1999; Junn e Mouradian, 2001). Esta proteína está envolvida em processos de

sensibilização, que está presente na condição de dor neuropática (Anand et al., 2011; Jeon et al., 2011). A sua provável inibição pela presença de NAC nos animais com lesão nervosa periférica que receberam este tratamento deve ser considerada como um possível fator contribuinte na redução da hiperalgesia desses animais. Outro mecanismo que também deve ter favorecido na diminuição das sensibilidades térmica e mecânica nos ratos lesionados tratados com NAC é a inibição da atividade da enzima c-Jun N-terminal cinase (do inglês c-Jun N-terminal kinase) (Park et al., 1996). Está demonstrado que a ativação desta enzima ocasiona alodinia (Mei et al. 2011; Shiiba, et al. 2011). Estudos mostram que a lesão nervosa induz uma rápida (< 1 dia), mas transitória (< 10 dias) ativação da enzima c-Jun N-terminal cinase em neurônios nociceptivos localizados no gânglio da raiz dorsal (Cheng e Ji, 2008). Como a NAC é capaz de inibir a atividade desta enzima (Park et al., 1996), este mecanismo também pode estar envolvido no efeito analgésico da NAC.

É sabido que a ativação das vias JNK/SAPK e p38 por espécies reativas (Rouse et al., 1994) leva à ativação de NF- κ B e AP-1 (Sanchez et al., 1994), o que resulta em *upregulation* da iNOS (forma induzida da NOS). Estas enzimas podem ser inibidas por antioxidantes (Tsai et al., 2011) Neste contexto, pode-se sugerir que a diminuição dos metabólitos do NO após a administração de NAC seja consequência da inibição da fosforilação dessas duas proteínas. Assim, a realização de estudos abordando a relação temporal entre lesão nervosa periférica, tratamento com NAC, NO, p38 e c-Jun N-terminal cinase trarão subsídios para um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na ação analgésica da NAC, o que, sem dúvida, permitirá melhor entendimento e, conseqüentemente, a possível utilização clínica da NAC no tratamento da dor neuropática.

CONCLUSÃO

A partir dos resultados do presente estudo pode-se concluir que a constrição unilateral no nervo isquiático, um modelo de dor neuropática, promoveu aumento nas sensibilidades térmica e mecânica, os quais foram revertidos pela administração intraperitoneal de NAC, na dose de 150 mg/Kg/dia, já aos 3 dias após o início do tratamento.

Os valores de H_2O_2 na medula espinal lombossacral reduziram nos animais com constrição no nervo isquiático, sendo este efeito precoce, dependente da lesão nervosa e independente da administração de NAC. A administração de NAC parece apenas modificar a rota antioxidante utilizada para manter os baixos valores de H_2O_2 nos animais lesionados. Este tratamento também foi capaz de reduzir os valores de nitritos+nitratos aumentados com a constrição nervosa periférica.

Assim, o presente estudo mostra que a administração intraperitoneal de NAC, na dose de 150 mg/kg/dia, reproduz o efeito analgésico dessa molécula e modifica parâmetros de estresse oxidativo e nitrosativo na medula espinal, os quais possivelmente se relacionam com as mudanças de sensibilidades nos ratos *sham* e com constrição nervosa. Deste modo, fica evidente que o efeito analgésico da NAC também envolve sua ação no SNC.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para melhor compreensão dos resultados do presente estudo sugere-se a avaliação tanto da expressão como da atividade da enzima óxido nítrico sintase (NOS) nos intervalos de tempo considerados nesse estudo. Além disso, deve ser avaliada a formação do ânion superóxido nesses mesmos períodos de tempo. Isto permitirá determinar se a redução nos metabólitos do óxido nítrico nos animais que receberam administração de NAC é em decorrência de uma diminuição na geração de NO e, ainda, inferir sobre a formação de peroxinitrito.

É preciso avaliar ainda a expressão das proteínas p38 e c-Jun N-terminal cinase, além de outras proteínas de sinalização intracelular envolvidas na codificação e transmissão da informação nociceptiva que podem ter sua atividade modificada pela administração de NAC.

REFERÊNCIAS

- Adam J. Reid, Susan G. Shawcrossa, Alex E. Hamilton, Mikael Wiberg, Giorgio Terenghi (2009). N-Acetylcysteine alters apoptotic gene expression in axotomised primary sensory afferent subpopulations. *Neuroscience Research* 65: 148–155
- Adams, J.M., Cory, S., (2007). Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential. *Curr. Opin. Immunol.* 19: 488–496.
- Amir R, Devor M. (1996). Chemically mediated cross-excitation in rat dorsal root ganglia. *J. Neurosci.* 16: 4733-4741.
- Anand P, Shenoy R, Palmer JE, Baines AJ, Lai RY, Robertson J, Bird N, Ostefeld T, Chizh BA. (2011). Clinical trial of the p38 MAP kinase inhibitor diltiazem in neuropathic pain following nerve injury. *Eur J Pain.* 15(10): 1040-1048
- Apkarian, AV; Lavarello, S; Randolph, A; Berra, HH; Chialvo, DR; Besedovsky, HO; del Rey, A. (2006). Expresión of the IL-1 beta in supraspinal brain regions in rats with neuropathic pain. *Neurosci Lett.* 407: 176-181.
- Akerboom T, Sies H. (1981). Assay of glutathione disulfide and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Meth Enzymol*; 77: 373-82
- Basbaum, A.I., Bautista, D.M., Scherrer, G., Julius, D. (2009). Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. *Cell* 139(2): 267-284.
- Baeuerle, P.A., Henkel, T. (1994). *Annu. Rev. Immunol.* 12: 141-179.
- Bao F, Liu D. (2004) 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*; 126: 285-295.
- Baud, O.; Greene, A. E.; Li, J.; Wang, H.; Volpe, J. J.; Rosenberg, P. A. (2004). Glutathione peroxidase-catalase cooperativity is required for resistance to hydrogen peroxide by mature rat oligodendrocytes. *The J. of Neurosc.*, 24(7): 1531-40.
- Bennett, G.J.; Xie, Y.K. (1988). A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain*, 33: 87-107.
- Beyers, M. R.; Bonica, J. J. Peripheral pain mechanisms and nociceptor plasticity. In: Loeser, J. D.; Butler, S. H.; Chapman, R.; Turk, D.C. (2001) *Bonica's management of pain*, Lippincott Williams and Wilkins, 26-27.
- Chang, L.K., Putcha, G.V., Deshmukh, M., Johnson Jr., E.M., (2002). Mitochondrial involvement in the point of no return in neuronal apoptosis. *Biochimie* 84: 223–231.

- Chen X, Tomchick DR, Kovrigin E, Arac D, Machius M, Sudhof TC , Rizo J (2002) Three-dimensional structure of the complexin/SNARE complex. *Neuron* 33: 397–409
- Chen, H., Lamer, T.J., Rho, R.H., Marshall, K.A., Sitzman, B.T., Ghazi, S.M., Brewer, R.P. (2004). Contemporary management of neuropathic pain for the primary care physician. *Mayo Clin Proc.* 79(12): 1533-1545.
- Cheng JK, Ji RR. (2008). Intracellular signaling in primary sensory neurons and persistent pain. *Neurochem Res.*33(10):1970-8.
- Chong MS, Bajwa ZH. (2003). Diagnosis and Treatment of Neuropathic Pain. *J Pain Symptom Manage*; 25: S4 – S11.
- Cizkova D, Lukanova N, Marsala M, Marsala J. (2002). Neuropathic pain is associated with alterations of nitric oxide synthase immunoreactivity and catalytic activity in dorsal root ganglia and spinal dorsal horn. *Brain Res Bull*; 58: 161 – 171.
- Constandil L, Aguilera R, Goich M, Hernández A, Alvarez P, Infante C, Pelissier T. (2011) Involvement of spinal cord BDNF in the generation and maintenance of chronic neuropathic pain in rats. *Brain Res Bull.* 25;86(5-6):454-459
- Cooper AJ, Kristal BS. (1997). Multiple roles of glutathione in central nervous system. *Biol Chem*; 378: 793–802.
- Coric V, Taskiran S, Pittenger C, Wasylink S, Mathalon DH, Valentine G, Saksa J, Wu Y-T, Gueorguieva R, Sanacora G, Malison RT, Krystal JH. (2005). Riluzole augmentation in treatment-resistant obsessive-compulsive disorder: an open-label trial. *Biol Psychiatry.*; 58(5):424-428.
- Cury Y, Picolo G, Gutierrez VP, Ferreira SH. (2011). Pain and analgesia: The dual effect of nitric oxide in the nociceptive system. *Nitric Oxide.* 30;25(3):243-54.
- Droge W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002; 82:47-95.
- D`Mello R.; Dickenson, A.H. (2008). Spinal cord mechanisms of pain. *Br J. Anaesth.* 101(1) 8-16.
- Dubner, R. (1983). Pain research in animals. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 75: 128-132.
- Farr SA, Poon HF, Dogrukol-Ak D, Drake J, Banks WA, Eyerman E, et al. (2003). The antioxidants α -lipoic acid and N-acetylcysteine reverse memory impairment and brain oxidative stress in aged SAMP8 mice. *J Neurochem*;84:1173–83.
- Finkel T. Oxygen radicals and signaling. (1998). *Curr. Opin. Cell Biol*; 10: 248-253.
- Finkel, T.; Holbrook, N.J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature.* 408:239-247.

- Flohé, L., Günzler, W.A. (1984) Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol*: 105:114-21.
- Floyd RA. (1999). Antioxidants, oxidative stress, and degenerative neurological disorders. *Proc Soc Exp Biol Med*. 222(3):236-45
- Fridovich I. (1998). Oxygen toxicity: a radical explanation. *J Exp Biol*. 201(8):1203-9. Review.
- Gabay, E.; Tal, M. (2004). Pain behavior and nerve electrophysiology in the CCI model of neuropathic pain. *Pain* 110: 354-360.
- Gabbita, S.P.; Robinson, K.A.; Stewart, C.A.; Floyd, R.A.; Hensley, K. (2002). Redox regulatory mechanisms of cellular signal transduction. *Arq. Biochem. Biophys*. 376: 1-13.
- Gardiner J.; Barton, D.; Overall, R.; Marc J. (2009). Neurotrophic support and oxidative stress: converging effects in the normal and diseased nervous system. *Neuroscientist* 15: 47-61.
- Geniatullin, A.R.; Darios, F.; Shakirzyanova, A.; Davletov, B.; Geniatullin, R. (2006). SNAP-25 is a pre-synaptic target for the depressant action of reactive oxygen species on transmitter release. *J. Neurochem* 98(6): 1789-97.
- Gillardon, F., Wickert, H., Zimmermann, M., (1994). Differential expression of bcl-2 and bax mRNA in axotomized dorsal root ganglia of young and adult rats. *Eur. J. Neurosci*. 6, 1641–1644.
- Gilron I, Watson PN, Cahill M, Moulin DE. (2006). Neuropathic pain: a practical guide for clinician. *CMAJ*; 175: 265 – 275.
- Goecks, C.B., (2011). Avaliação de parâmetros oxidativos na medula espinal, tronco encefálico e neocórtex de ratos em uma situação de dor neuropática. Dissertação de mestrado. UFRGS
- Guedes RP , Dal Bosco L, Teixeira CM, Araújo ASR, Llesuy S, Belló-Klein A, Ribeiro MFM, Partata WA. (2006). Neuropathic Pain Modifies Antioxidant Activity in Rat Spinal Cord. *Neurochem Res* 31: 603–609.
- Guedes RP , Araújo ASR, Janner, D., Belló-Klein A, Ribeiro MFM, Partata WA. (2008). Increase in reactive oxygen species and activation of Akt signaling pathway in neuropathic pain. *Cell. Mol. Neurobiol*. 28(8): 1049-56.
- Guedes RP , Dal Bosco L, Araújo ASR, Belló-Klein A, Ribeiro MFM, Partata WA. (2009). Sciatic nerve transection increase glutathione antioxidant system activity and neuronal nitric oxide synthase expression in the spinal cord. *Brain Res. Bull*. 80(6): 422-7.
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB (1974) Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 249 25:7130-7139
- Hacimuftuoglu A, Handy CR, Goettl VM, Lin CG, Dane S, Stephens Jr RL. (2006). Antioxidants attenuate multiple phases of formalin-induced nociceptive response in mice. *Behavioural Brain Research* 173: 211 – 216.

- Hanci, V., G. Erdogan, R.D. Okyay, B.S. Yurtlu, H. Ayoglu, Y. Baydilek and I.O. Turan, 2010. Effects of fentanyl-lidocaine-propofol and dexmedetomidine-lidocaine-propofol on tracheal intubation without use of muscle relaxants. *Kaohsiung J. Med. Sci.*, 26: 224-250.
- Haddad JJ. On the enigma of pain and hyperalgesia: A molecular perspective. (2007). *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;353(2):217-24.
- Head KA. (2006). Peripheral Neuropathy: Pathogenic Mechanisms and Alternative Therapies. *Alternative Medicine Review*;11: 294 – 329.
- Halliwell B, Gutteridge J.(2007) *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4th edn. New York: Oxford University Press Inc.
- Han D, Sen CK, Roy S, Kobayashi MS, Tritschler HJ, Packer L. (1997). Protection against glutamate-induced cytotoxicity in C6 glial cells by thiol antioxidants. *Am J Physiol*;273:R1771–8.
- Hart, A.M., Terenghi, G., Kellerth, J.O., Wiberg, M., (2004). Sensory neuroprotection, mitochondrial preservation, and therapeutic potential of N-acetyl-cysteine after nerve injury. *Neuroscience* 125, 91–101.
- Hayashi M, (2009). Oxidative stress in developmental brain disorders. *Neuropathology.* 29, 1-8.
- Hiedonmez T, Kanter M, Tiryaki M, Parsak T, Cobanoglu S.(2006). Neuroprotective Effects of N-acetylcysteine on Experimental Closed Head Trauma in Rats. *Neurochem Res*; 31: 473 – 481.
- Huang ZJ and Song XJ.(2008). Differing alterations of sodium currents in small dorsal root ganglion compression and peripheral nerve injury. *Molec Pain.* 4: 20.
- IASP – International Association for the Study of Pain. (2008). Subcommittee on taxonomy. Classification of chronic pain. Description of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. *Pain, Suppl.* 3: S1-S226.
- Joe and Lokesh (1997). Studies on the inactivation of superoxide dismutase activity by nitric oxide from rat peritoneal macrophages. *Molecular and Cellular Biochemistry* 168: 87-93
- Jeon HJ, Han SR, Lim KH, Won KA, Bae YC, Ahn DK.(2011) Intracisternal administration of NR2 subunit antagonists attenuates the nociceptive behavior and p-p38 MAPK expression produced by compression of the trigeminal nerve root. *Mol Pain.* 2011 Jun 8;7:46
- Junn, E., Mourandian, M.M.(2001). Apoptotic signaling in dopamine – induced cell death: the role of oxidative stress, p38 mitogen-activated protein kinase, cytochrome c and caspases. *J. Neurochem.* 78: 374-383.
- Kalivas PW, Volkow N, Seamans J.(2005). Unmanageable motivation in addiction: a pathology in prefrontal-accumbens glutamate transmission. *Neuron.*;45 (5):647-650.
- Kamata H, Tanaka C, Yagisawa H, Matsuda S, Gotoh Y, Nishida E, et al. (1996). Suppression of nerve growth factor-induced neuronal differentiation of

- PC12 cells. N-acetylcysteine uncouples the signal transduction from ras to the mitogen-activated protein kinase cascade. *J Biol Chem*;271:33018–25.
- Kamboj SS, Chopra K, Sandhir R. Neuroprotective effect of N-acetylcysteine in the development of diabetic encephalopathy in streptozotocin-induced diabetes. *Metab Brain Dis.* 23(4):427-43.
- Kavaliers, M. (1988) Evolutionary and comparative aspects of nociception. *Brain Res. Bull.* 21:923-931.
- Kawano T, Soga T, Chi H, Eguchi S, Yamazaki F, Kumagai N, Yokoyama M.(2011) Role of the neurosteroid allopregnanolone in the hyperalgesic behavior induced by painful nerve injury in rats. *J Anesth.* Aug 31. [Epub ahead of print]
- Khalil, Z.; Sanderson, K.; Modig, M.; Nyberg, F. (1999). Modulation of peripheral inflammation by locally administered endomorphin-1. *Inflamm. Res.* 48(10): 550-56.
- Khodr B, Khalil Z. (2001). Modulation of inflammation by reactive oxygen species implications for aging and tissue repair. *Free Rad. Biol. Med.*;30: 1-8.
- Kim, H.K.; Park, S.K.; Zhou, J.L.; Tagliabatella, G.; Chung, K.; Koggeshall, R.E.; Chung, J.M. (2004). Reactive oxygen species (ROS) play an important role in a rat model of neuropathic pain. *Pain* 111: 116-24.
- Kim HK, Kim JH, Gao X, Zhou JL, Lee I, Chung K, Chung JM.(2006). Analgesic effect of vitamin E is mediated by reducing central sensitization in neuropathic pain. *Pain*; 122: 53 – 62.
- Klusáková, I.; Dubový, P. (2009). Experimental models of peripheral neuropathic pain based on traumatic nerve injuries – An anatomical perspective. *Ann. Anat.*, 181, 248-259.
- Korsmeyer, S.J., Shutter, J.R., Veis, D.J., Merry, D.E., Oltvai, Z.N., (1993). Bcl-2/Bax: a rheostat that regulates an anti-oxidant pathway and cell death. *Semin. Câncer Biol.* 4, 327–332.
- Lafleur DL, Pittenger C, Kelmendi B, Gardner T, Wasyluk S, Malison RT, Sanacora G, Krystal JH, Coric V. (2006). N-acetylcysteine augmentation in serotonin reuptake inhibitor refractory obsessive-compulsive disorder. *Psychopharmacology (Berl.)*;184(2):254-256.
- Lekan HÁ, Carlton SM, Coggeshall RE. (1996). Sprouting of B-HRP fixed fibers of the L5 spinal nerve following L5 and L6 spinal ligation in the rat. *Neurosci. Lett.* 208: 147-150.
- Levy, D., Zochodne, D.W. (2004). NO pain: potential roles of nitric oxide in neuropathic pain. *Pain Practice* 4(1): 11-18
- Lewén, A.; Matz, P.; Chan, P.H. (2000). Free radical pathways in CNS injury. *J. of Neurot.*, 179(10) 871-90.
- Lin HH, Chen CH, Hsieh WK, Chiu TH, Lai CC.(2003). Hydrogen peroxide increases the activity of rat sympathetic preganglionic neurons in vivo and in vitro. *Neuroscience*; 121(3):641-7.

- Liu D, Liu J, Wen J. (1999). Elevation of Hydrogen Peroxide After Spinal Cord Injury Detected By Using The Fenton Reaction. *Free Rad. Biol. Méd.*;27:478-482.
- Liu T, Knight KR, Tracey DJ.(2000). Hyperalgesia Due To Nerve Injury – Role of Peroxidenitrite. *Neuroscience*;91:125-131.
- Mannervik, B., Gluthemberg, C, (1981). Glutathione transferase. *Meth. Enzymol.* 77: 231-235
- Mason, MR; Lieberman, AR; Grenningloh, G; Anderson, PN. (2002). Transcriptional upregulation of SCG10 and CAP-23 is correlated with regeneration of the axons of peripheral and central neurons in vivo. *Mol Cell Neurosci.* 20: 595-615.
- Mayer M, Noble M. (1994). N-acetyl-L-cysteine is pluripotent protector against cell death and enhancer of trophic factor-mediated cell survival in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA*;91:7496–500.
- McFarland K, Lapish CC, Kalivas PW.(2003). Prefrontal glutamate release into the core of the nucleus accumbens mediates cocaine-induced reinstatement of drugseeking behavior. *J Neurosci.*;23(8):3531-3537.
- McInns, J., Wang, C., Anastasio, N., Hultman, M., Ye, Y., Salvemini, D.,(2002). The role of superoxide and nuclear factor-kappaB signaling in N-methyl-D-aspartate-induced necrosis and apoptosis. *J. Pharmacol Exp. Ther.* 301: 478-87.
- McMahon et al (2006). Dimerization of substrate adaptors can facilitate cullin-mediated ubiquitylation of proteins by a "tethering" mechanism: a two-site interaction model for the Nrf2-Keap1 complex. *J Biol Chem.* 25;281(34):24756-68.
- Mei XP, Zhang H, Wang W, Wei YY, Zhai MZ, Wang W, Xu LX, Li YQ.(2011) Inhibition of spinal astrocytic c-Jun N-terminal kinase (JNK) activation correlates with the analgesic effects of ketamine in neuropathic pain. *J Neuroinflammation.* 24;8(1):6.
- Meller, S.T., Dykstra, C., Grzybycki, D., Murphy, S., Gebbart, G.F.(1994). The possible role of glia in nociceptive processing and hyperalgesia in the spinal cord of the rat. *Neuropharmacology.* 33: 1471-78.
- Millan, J. M. (1999). The induction of pain: an integrative review. *Prog. Neurobiol.* 57: 1-164,
- Mittal, C. K., Murad, F., (1977). Properties and oxidative regulation of guanylate cyclase. *J. Cyclic Nucleotide Research.* 3 (6): 381-91
- Mônica A. G. de Lima; Robson Neves; Sylvia Sá; Cibele Pimenta.(2005). Atitude frente à dor em trabalhadores de atividades ocupacionais distintas: uma aproximação da psicologia cognitivo-comportamental *Ciênc. saúde coletiva* vol.10 no.1 Rio de Janeiro Jan./Mar.
- Moore, P.K., Oluyomi, A.O., Babbedge, R.C., Wallace, P., Hart, S.L. (1991). I-NG-nitro arginine methyl ester exhibits antinociceptive activity in the mouse. *Br. J. Pharmacology.* 102: 198-202.

- Mosley RL et al.(2006). Neuroinflammation, oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Clin. Neurosci Res.* 6(5): 261-281.
- Mruk, D.D.; Silvestrini, B.; Mo, M.; Cheng, C.Y. (2002). Antioxidant superoxide dismutase – a review: its function, regulation in the testis and role in the male fertility. *Contraception* 65: 303-11.
- Muthuraman, A.; Jaggi, AS; Singh, N; Singh, D. (2008). Ameliorative effects of amiloride and prolidoxine in chronic constriction injury and vincristin-induced painful neuropathy in rats. *Eur J Pharmacol.* 587: 104-111.
- Naik AK, Tandan SK, Dudhgaonkar SP, Jadhav SH, Kataria M, Prakash VR, Kumar D. (2006). Role of oxidative stress in pathophysiology of peripheral neuropathy and modulation by N-acetyl-L-cysteine in rats. *European Journal of Pain*; 10: 573 – 579.
- Navarro, X; Vivó, M; Valero-Cabré, A.(2007). Neural plasticity after peripheral nerve injury and regeneration. *Prog Neurobiol.* 82: 163-201.
- Nishikawa, M.; Haschida, M.; Takakura, Y. (2009). Catalase delivery for inhibiting ROS-mediated tissue injury and tumor metastasis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61(4): 319-26.
- Park DS, Stefanis L, Yan CY, Farinelli SE, Greene LA. (1996). Ordering the cell death pathway. Differential effects of BCL2, an interleukin-1-converting enzyme family protease inhibitor, and other survival agents on JNK activation in serum/nerve growth factor-deprived PC12 cells. *J Biol Chem.* 271(36):21898-905.
- Pasero, C.(2004). Pathophysiology of neuropathic pain. *Pain Management Nursing*, 5 (1), 3-8.
- Pick, E.; Keisari, Y. (1980). A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J Immunol Methods*, v.38, p.161-170,
- Pimenta CA.(1998). Cultural concepts and the pain experience]. *Rev Esc Enferm USP.* 32(2):179-86
- Ramos-Vasconcelos GR, Cardoso LA, Hermes-Lima M. (2005). Seasonal modulation of free radical metabolism in estivating land snails *Helix aspersa*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 140(2):165-74.
- Ratan, P.R., Murphy, T.H. and Barban, J.M. (1994) Oxidative stress induces apoptosis in embryonic cortical neurons. *J. Neurochem.*, **62**, 376–379
- Rice ASC, Hill RG. (2006). New Treatments For Neuropathic Pain. *Annu Rev. Med*; 57:535–51.
- Rice, M. E. and Russo-Menna, I. (1998) Differential compartmentalization of brain ascorbate and glutathione between neurons and glia. *Neuroscience* 82, 1213-1223.
- Romeis, B., (1928). *Taschenbuch d. mikrosk. Technik.* Munich (Oldenbourg).

- Rossato, M.F.; Veloso, N.A.; Oliveira Ferreira, A. P.; Mello, C.F.; Ferreira, J. (2010). Spinal levels of nonproteins thiols are related to nociception in mice. *J. Pain*. 11(6): 545-54.
- Rouse, J., Cohen, P., Trigon, S., Morange, M., Alonso-Llamazares, A., Zamanillo, D., Hunt, T., Nebreda, A.R., (1994). *Cell* 78:1027-1037.
- Saadé, NE; AlMin,H; Abdel Baki, S; Chalouhi, S; Jabbur, SJ; Atweh, SF. (2007). Reversible attenuation of neuropathic-like manifestations in rats by lesions or local block of the intralaminar or the medial thalamic nuclei. *Exp Neurol*. 204:205-219.
- Sanchez, I., Hughes, R.T., Mayer, B. J., Yee, K., Woodgett, J.R., Avruch, J., Kyriakis, J.M., Zon, L.I. (1994). *Nature* 372: 794-798.
- Schaible, H-G; Richter, F. (2004). Pathophysiology of pain. *Langenbecks Arch Surg*. 389: 237-243.
- Schreck, R., Rieber, P., Baeuerle, P.A. (1991). *EMBO J*. 10. 2247-58.
- Schreck, R., Albermann, K., Baeuerle, P.A. (1992). *Free Radic. Res. Commun*. 17. 221-237.
- Seaton TA, Cooper JM, Schapira AH. (1997). Free radical scavengers protect dopaminergic cell line from apoptosis induced complex I inhibitors. *Brain Res*;777:110–8.
- Seutin V, Scuvée-Moreau J, Massotte L, Dresse A. (1995). Hydrogen peroxide hyperpolarizes rat CA1 pyramidal neurons by inducing an increase in potassium conductance. *Brain Res*. 19;683(2):275-8
- Shiiba SJ, Yamamoto S, Sasaki H, Nishi M, Ishikawa K, Yasuda S, Tokuda N, Nakanishi O, Ishikawa T.(2011) Cutaneous Magnetic Stimulation Reduces Rat Chronic Pain via Activation of the Supra-Spinal Descending Pathway. *Cell Mol Neurobiol*. Oct 4. [Epub ahead of print]
- Sies H. (1999). Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic Biol Med*; 27:916-21.
- Siniscalco D et al.(2007). Role of reactive oxygen species and spinal cord apoptotic genes in the development of neuropathic pain. *Pharmacological research*. 55, 158-166.
- Sommer, C.; Myers, R.R. (1995). Neurotransmitters in the spinal cord dorsal horn in a model of painful neuropathy and in nerve crush. *Acta Neuropathol*. 90: 478-485.
- Sorg O. (2004). Oxidative stress: a theoretical model or biological reality? *C R Biol* 327: 649-662.
- Szabo C. (1998). Role of poly(ADP-ribose)synthetase in inflammation. *Eur. J. Pharmac.*;350:1-19.
- Takeuchi Y et al, (2007). Neurochemical evidence that supraspinally administered gabapentin activates the descending noradrenergic system after peripheral nerve injury. *European Journal of Pharmacology*. 556: 69-74.

- Tsai, C.W.; Lin, C.Y.; Lin, H.H.; Cheg, J.H. (2011). Carnosic acid, a Rosemary phenolic compound, induces apoptosis through reactive oxygen species – mediated p38 activation in human neuroblastoma IMR-32 cells. *Neurochem. Res.* August 2011
- Turreans, J.F., Freeman, B.A., Levitt, J.G., Crapo, J.D.(1982). The effect of hyperoxia on superoxide production by lung submitochondrial particles. *Arch. Biochem. Biophys.* 217: 401-410
- Uçeyler, N; Tschärke, A; Sommer, C. (2008). Early cytokine gene expression in mouse CNS after peripheral nerve lesion. *Neurosci Lett.* 436: 259-264.
- Ulfenius, C., Linderöth, B., Meyerson, B.A., Wallin, J.(2006). Spinal MND A receptor phosphorylation correlates with the presence of neuropathic signs following peripheral nerve injury in the rat. *Neurosci. Lett.* 399(1): 85-90.
- Vanderah, T.W.(2007). Pathophysiology of pain. *Med Clin North Am.*;91(1):1-12.
- Varija, D.; Kumar, K.P.; Reddy, V.K. (2009). Prolonged constriction of sciatic nerve affecting oxidative stressors and antioxidant enzymes in rats. *Indian J. Med. Res.* 129: 587-592.
- Veal EA, Day AM, Morgan BA. (2007). Hydrogen Peroxide Sensing and Signaling. *Molecular Cell*; 26: 1 – 11.
- Vizzard MA, Erdman SL, de Groat WC. (1995). Increased expression of neuronal nitric oxide synthase (NOS) in visceral neurons after nerve injury. *J Neurosci*; 15: 4033 – 4045.
- Xie W et al, (2008). Involvement of LPA receptor signaling in the organization of spinal input through Abeta-fibers in mice with partial sciatic nerve injury. *Molec Pain.* 4: 46-50
- Xu JT, Xin WJ, Wei, XH, Wu CY, Ge YX, Liu YL, Zang Y, Zhang T, Li YY, Liu XG. (2007). 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*; 204: 355 – 365.
- Zafarullah M, Li WQ, Sylvester J, Ahmad M. (2003). Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cell. Mol. Life. Sci.*; 60: 6 – 20.
- Zhang ZG, Chopp M, Zaloga C, Pollock JS, Förstermann U. (1993). Cerebral endothelial nitric oxide synthase expression after focal cerebral ischemia in rats. *Stroke.*24(12):2016-21
- Zhao, P; Waxman, SG; Hains, BC. (2004). Sodium channel expression in the ventral posterolateral nucleus of the thalamus after peripheral nerve injury. *Mol Pain.* 2:27.
- Zimmermann, M.(2001). Pathobiology of neuropathic pain. *Eur. J. Pharmacol.* 429: 23-37.
- Wagner, R; Heckman, HM; Myers, RR. (1998). Wallerian degeneration and hyperalgesia after peripheral nerve injury are glutathione-dependent. *Pain.* 77: 173-179.

- Welin D, Novikova LN, Wiberg M, Kellerth JO, Novikov LN. (2009). Effects of N-acetyl-cysteine on the survival and regeneration of sural sensory neurons in adult rats. *Brain Res.* 1;1287:58-66.
- Winrow VR, Winyard PG, Morris CJ, Blake DR. (1993). Free radicals in inflammation: second messengers and mediators of tissue destruction. *Br. Med. Bull*;49: 506-522.
- Woolf, C.J., Thompson, S.W., (1991). The induction and maintenance of central sensitization is dependent on N-methyl-D-aspartic acidreceptor activation; implications for the treatment of post injury pain hypersensitivity states. *Pain* 44(3): 293-299.
- Wullner U, Kornhuber J, Weller M, Schulz JB, Loschmann PA, Riederer P, Klockgether T (1999) Cell death and apoptosis-regulating proteins in Parkinson's disease—a cautionary note. *Acta Neuropathol (Berl)* 97:408–412.
- Yan CY, Ferrari G, Greene LA. (1995). N-acetylcysteine - promoted survival of PC12 cells is glutathione-independent but transcription-dependent. *J Biol Chem*;270:26827–32.
- 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* 152(4): 844-52
- Yu, RP. (1994). Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol. Rev.* 74: 139162.
- Yuan, J., Yankner, B.A.,(2000). Apoptosis in the nervous system. *Nature* 407, 802–809. Zafarullah, M., Li, W.Q., Sylvester, J., Ahmad, M., 2003. Molecular mechanisms of Nacetylcysteine actions. *Cell. Mol. Life Sci.* 60, 6–20.