



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CAMPUS DE SOBRAL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

SALMA SUELLEN DE MELO INGELSRUD

**EFEITO DO TRATAMENTO COM LISDEXANFETAMINA NO
NEURODESENVOLVIMENTO DE RATOS E SUA REPERCUSSÃO NA FASE
ADULTA**

SOBRAL

2016

SALMA SUELLEN DE MELO INGELSRUD

**EFEITO DO TRATAMENTO COM LISDEXANFETAMINA NO
NEURODESENVOLVIMENTO DE RATOS E SUA REPERCUSSÃO NA FASE
ADULTA**

**Dissertação apresentada ao Programa
de Pós- Graduação em Biotecnologia
da Universidade Federal do Ceará,
Faculdade de Medicina de Sobral,
como requisito parcial para obtenção
do título de Mestre em Biotecnologia.**

Orientador: Dr. Gerardo Cristino Filho

**Coorientadora: Dra. Lissiana Magna
Vasconcelos Aguiar**

SOBRAL

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

I37e Ingelsrud, Salma Suellen de Melo.

Efeito do tratamento com lisdexanfetamina no neurodesenvolvimento de ratos e sua repercussão na fase adulta / Salma Suellen de Melo Ingelsrud. – 2016.
76 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Campus de Sobral, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Sobral, 2016.

Orientação: Prof. Dr. Gerardo Cristino Filho .

Coorientação: Profa. Dra. Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar.

1. Dimesilato de Lisdexanfetamina. 2. Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade.
3. Estresse oxidativo. I. Título.

CDD 660.6

SALMA SUELLEN DE MELO INGELSRUD

**EFEITO DO TRATAMENTO COM LISDEXANFETAMINA NO
NEURODESENVOLVIMENTO DE RATOS E SUA REPERCUSSÃO NA FASE
ADULTA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina de Sobral, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

APROVADA EM 24/08/2016

BANCA EXAMINADORA

Prof^o. Dr. Gerardo Cristino Filho (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^a. Dra. Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar (Coorientadora)
Universidade federal do Ceará (UFC)

Prof^o. Dr. Thiago Sousa de Melo
Instituto Superior de Teologia Aplicada (INTA)

Ao meu amor, Israel Leal, por sonhar e viver todos
os obstáculos deste sonho ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida, pela família e por tantas bênçãos imerecidas. Imensamente grato está o meu coração por alcançar esta vitória. A Ele toda a Honra e Glória!

Ao meu esposo, Israel, por sua fiel e amável companhia em todos os momentos. Sonhamos juntos, estudamos, viajamos incontáveis quilômetros, somamos ideias e forças para não desistir, apesar da distância, das ausências e abdições, do cansaço e das adversidades. Juntos, concluímos mais uma etapa. Continuemos a sonhar!

À minha linda família, por todo amor e pelas incansáveis orações. Em especial, aos meus pais, por todo zelo e carinho, sempre acreditando e me incentivando a dar um novo passo. Aos meus irmãos, por poder compartilhar cada momento com vocês, mesmo havendo quilômetros de distância entre nós.

Ao Prof^o. Dr. Gerardo Cristino, pelo apoio e orientações e à Prof^a Dra Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar, por se dispor a compartilhar seu tempo e conhecimentos, com preciosas contribuições ao meu trabalho. Obrigada por acreditar e compreender os desafios de morar e desempenhar atividades acadêmicas e de pesquisa em lugares diferentes.

Ao João Victor, pela valiosa parceria desenvolvida ao longo deste trabalho. Obrigada por sua disponibilidade e incansáveis contribuições.

Aos integrantes do Laboratório de Fisiologia e Neurociências por compartilhar conhecimentos e experiências, em especial Tarcízio, Thomas, Nyanne, Bruna e Suélli, e aos demais amigos da pós-graduação em Biotecnologia, pelas boas lembranças e aprendizados.

À CAPES, pelo apoio financeiro à pesquisa.

Aos meus pequeninos pacientes que sentem minhas ausências e compartilham valiosos momentos, e aos seus familiares pela compreensão e apoio.

À todos que de alguma forma contribuíram para que esta conquista fosse alcançada. Muito obrigada!

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos.”

(Isaac Newton)

RESUMO

O Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH) está entre os transtornos psiquiátricos mais comuns da infância e adolescência, com taxa de prevalência entre 3,5% a 5,6% da população jovem, e é definido como um padrão persistente de desatenção e/ou hiperatividade-impulsividade, com sintomas evidentes antes dos 12 anos de idade. O Dimesilato de Lisdexanfetamina (LDX) é um novo psicoestimulante utilizado para o tratamento do TDAH com resultados promissores, mas são necessários estudos que verifiquem seus efeitos a longo prazo. Desta forma, o presente estudo se propôs a investigar o efeito do tratamento com LDX no neurodesenvolvimento e sua repercussão na fase adulta, avaliando alterações nos parâmetros comportamentais e neuroquímicos. Foram utilizados ratos Wistar machos, com 21 dias de nascidos, submetidos ao Teste de Campo Aberto e divididos em dois grupos: o grupo experimental, tratado com LDX nas doses de 2mg/kg e 5mg/kg, e o grupo controle, que recebeu solução salina. A droga foi administrada por gavagem ao longo de 10 dias e no último dia de tratamento foi realizado teste comportamental. Decorridos 30 dias após o período de tratamento, sem nenhum procedimento experimental, os animais foram novamente avaliados no Teste de Campo Aberto, sacrificados e dissecados, extraíndo suas áreas cerebrais para a realização de testes neuroquímicos, nos quais foram mensurados os níveis de estresse oxidativo por meio da determinação da concentração de nitrito/nitrato, produção de substâncias ácidas reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) e através da análise dos níveis de Glutathiona Reduzida (GSH). Os resultados dos estudos comportamentais e neuroquímicos apontam o aumento da atividade comportamental, elevação da concentração de nitrito/nitrato e da peroxidação lipídica e decréscimos nos níveis de GSH em ratos tratados com 5 mg/kg de LDX em períodos posteriores ao consumo da droga, com alterações na concentração da dopamina e estresse oxidativo persistentes na fase adulta do animal, sugerindo que tratamentos farmacológicos realizados durante a infância e a adolescência podem interferir no neurodesenvolvimento e causar repercussões na idade adulta de seus usuários.

Palavras-chave: Dimesilato de Lisdexanfetamina; Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade; Estresse oxidativo.

ABSTRACT

The Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD) is among the most common psychiatric disorders of childhood and adolescence, with prevalence rates from 3.5% to 5.6% of the young population, and it is defined as a persistent pattern of inattention and/or hyperactivity-impulsivity, with obvious symptoms before 12 years old. The lisdexamfetamine dimesylate (LDX) is a new psychostimulant used to treat ADHD with promising results, but lack studies to verify their long term effects. Thus, the present study was investigated the effect of treatment with LDX in neurodevelopment and its repercussions in adulthood, assessing changes in behavioral and neurochemical parameters. Wistar male rats were used, with 21 days of born, submitted to Open Field Test and divided into two groups: the experimental group, treated with LDX at doses of 2 mg/kg and 5 mg/kg and the control group, which received saline solution. The drug was administered by gavage over 10 days and the last day of treatment the behavioral testing was performed. 30 days after the treatment period, no experimental procedure, the animals were again evaluated in the Open Field Test, sacrificed and dissected, extracting their brain areas for the realization of neurochemical tests, in which the levels of oxidative stress were measured through determining the concentration of nitrite/nitrate, the production of acid reactive substances to thiobarbituric acid (TBARS) and by analyzing the levels of reduced glutathione (GSH). The results of behavioral and neurochemical studies indicate the increased behavioral activity, increased concentration of nitrite/nitrate or lipid peroxidation and decrease in GSH levels in mice treated with 5 mg/kg LDX in periods after using the drug, with changes in the concentration of dopamine and persistent oxidative stress in the adult animal, which suggests that pharmacological treatments performed during childhood and adolescence may interfere the brain development and cause repercussions in adulthood of the members.

Key-words: Lisdexamfetamine Dimesylate; Attention Deficit Hyperactivity Disorder; Oxidative Stress.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	ANÁLISE DE VARIÂNCIA
BDNF	FATOR NEUROTRÓFICO DERIVADO DO CÉREBRO
CAT	CATALASE
CE	CORPO ESTRIADO
CF	CÓRTEX PRÉ-FRONTAL
CEUA	COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
COBEA	COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
DA	DOPAMINA
D-ANF	D-ANFETAMINA
DSM V	MANUAL DIAGNÓSTICO E ESTATÍSTICO DE TRANSTORNOS MENTAIS – 5º EDIÇÃO
ERN	ESPÉCIES REATIVAS DO NITROGÊNIO
ERO	ESPÉCIES REATIVAS DO OXIGÊNIO
GPx	GLUTATIONA PEROXIDASE
GR	GLUTATIONA REDUTASE
GSH	GLUTATIONA REDUZIDA
HC	HIPOCAMPO
LDX	DIMESILATO DE LISDEXANFETAMINA
MAO	MONOAMINO OXIDASE
MDA	MALONILDILALDEÍDO
MFD	METILFENIDATO
NB	NÚCLEOS DA BASE
OMS	ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE
PFC	CÓRTEX PRÉ-FRONTAL
RL	RADICAIS LIVRES
SNC	SISTEMA NERVOSO CENTRAL
SOD	SUPERÓXIDO DISMUTASE
TBARS	ESPÉCIES REATIVAS DO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO
TDAH	TRANSTORNO DO DÉFICIT DE ATENÇÃO E HIPERATIVIDADE
UFC	UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura Molecular do Dimesilato de Lisdexanfetamina.....	22
Figura 2 – Formação mitocondrial de Espécies reativas do oxigênio.....	24
Figura 3 - Estresse Oxidativo.....	25
Figura 4 - Ratos Wistar ao 21º dia de nascidos.....	29
Figura 5 - Delineamento Experimental do tratamento com D-anfetamina em ratos.....	32
Figura 6 - Caixa de madeira utilizada para a realização do Teste do Campo Aberto.....	33
Figura 7 - Teste de Campo Aberto em ratos.....	34
Figura 8 - Efeito da LDX (2 e 5 mg/kg) sobre o Número de Cruzamentos no teste de Campo Aberto uma hora (60 minutos) após a administração da droga no 10º dia de tratamento.....	38
Figura 9 - Efeito da LDX (2 e 5 mg/kg) sobre o Número de <i>Rearings</i> no teste de Campo Aberto uma hora (60 minutos) após a administração da droga no 10º dia de tratamento.....	40
Figura 10 - Efeito da LDX (2 e 5 mg/kg) sobre o Número de <i>Groomings</i> no teste de Campo Aberto uma hora (60 minutos) após a administração da droga no 10º dia de tratamento.....	42
Figura 11 - Efeito da LDX (2 e 5 mg/kg) no 30º dia pós-tratamento sobre o Número de Cruzamentos no teste de Campo Aberto.....	44
Figura 12 - Efeito da LDX (2 e 5 mg/kg) no 30º dia pós-tratamento sobre o Número de <i>Rearings</i> no teste de Campo Aberto.....	46
Figura 13 - Efeito da LDX (2 e 5 mg/kg) no 30º dia pós-tratamento sobre o Número de <i>Groomings</i> no teste de Campo Aberto.....	48
Figura 14 - Teores de MDA (marcador de peroxidação lipídica) no Córtex Pré-frontal de ratos no 30º dia pós-tratamento com LDX (2 e 5 mg/kg).....	51
Figura 15 - Teores de MDA (marcador de peroxidação lipídica) no Hipocampo de ratos no 30º dia pós-tratamento com LDX (2 e 5 mg/kg).....	52

Figura 16 - Teores de MDA (marcador de peroxidação lipídica) nos Núcleos da Base de ratos no 30º dia pós-tratamento com LDX (2 e 5 mg/kg).....	53
Figura 17 - Efeitos da LDX (2 e 5 mg/kg) no 30º dia pós-tratamento sobre os níveis de Nitrito/Nitrato em Núcleos da Base	56
Figura 18 - Efeitos da LDX (2 e 5 mg/kg) no 30º dia pós-tratamento sobre os níveis de Nitrito/Nitrato no Córtex Pré-Frontal	56
Figura 19 - Efeitos da LDX (2 e 5 mg/kg) no 30º dia pós-tratamento sobre os níveis de Nitrito/Nitrato no Hipocampo	57
Figura 20 - Efeitos da LDX (2 e 5 mg/kg) no 30º dia pós-tratamento sobre os níveis de Glutaciona Reduzida (GSH) no Córtex Pré-Frontal.....	59
Figura 21 - Efeitos da LDX (2 e 5 mg/kg) no 30º dia pós-tratamento sobre os níveis de Glutaciona Reduzida (GSH) no Hipocampo.....	60
Figura 22 - Efeitos da LDX (2 e 5 mg/kg) no 30º dia pós-tratamento sobre os níveis de Glutaciona Reduzida (GSH) nos Núcleos da Base.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Divisão dos animais em baixo ou alto exploradores com base na atividade exploratória.....	30
Tabela 2 - Definição dos comportamentos observados no Teste do Campo Aberto.....	33
Tabela 2 - Efeito da LDX (2 e 5 mg/kg) no 30º dia pós-tratamento sobre o comportamento de ratos wistar no teste de Campo Aberto	49

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	16
1.1	Transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH).....	16
1.2	Neurobiologia do TDAH.....	18
1.3	Comportamento hiperativo e o Teste de Campo Aberto	19
1.4	Tratamentos farmacológicos.....	20
1.5	Dimesilato de lisdexanfetamina (LDX).....	21
1.6	Estresse oxidativo.....	23
2.	OBJETIVOS	28
2.1	Objetivo geral.....	28
2.2	Objetivos específicos.....	28
3.	METODOLOGIA.....	29
3.1	Animais.....	29
3.2	Delineamento experimental.....	30
3.3	Teste do Campo Aberto.....	32
3.4	Determinação da produção de substâncias ácidas reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	34
3.5	Determinação da concentração de Nitrito/Nitrato.....	34
3.6	Determinação da Glutathiona Reduzida (GSH)	35
3.7	Análise Estatística.....	35
4.	RESULTADOS.....	37
4.1	Estudo comportamental.....	37
4.1.1	Análise do número de cruzamentos realizados por ratos wistar no teste de campo aberto após 10 dias de tratamento com LDX.....	37
4.1.2	Análise do número de rearing realizados por ratos wistar no teste de campo aberto após 10 dias de tratamento com LDX.	39
4.1.3	Análise do número de <i>Groomings</i> realizados por ratos wistar no Teste de Campo Aberto após 10 dias de tratamento com LDX.....	41
4.1.4	Análise do número de cruzamentos realizados por ratos wistar 30 dias após o término do tratamento com LDX	43

4.1.5	Análise do número de rearing realizados por ratos wistar 30 dias após o término do tratamento com d-anfetamina.....	45
4.1.6	Análise do número de <i>Groomings</i> realizados por ratos wistar 30 dias após o término do tratamento com LDX.....	47
4.1.7	Análise das alterações comportamentais em ratos wistar 30 dias após o término do tratamento com LDX.....	49
4.2	Estudos neuroquímicos.....	50
4.2.1	Efeitos da administração da d-anfetamina em substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	50
4.2.2	Efeitos da administração da LDX sobre os níveis de Nitrito/Nitrato.....	54
4.2.3	Efeitos da administração da LDX sobre os níveis de Glutathione Reduzida (GSH).....	58
5.	DISCUSSÃO.....	62
6.	CONCLUSÃO.....	69
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
	APÊNDICE A - CÁLCULO DA DOSE DE VENIVANSE A SER ADMINISTRADA A RATOS WISTAR	75

1. INTRODUÇÃO

O aumento no consumo de medicamentos ocorrido desde a segunda metade do século XX pode ser explicado pelo crescimento da indústria farmacêutica, pela facilidade de acesso aos medicamentos e pelo processo de mercantilização e medicalização da saúde (POLI NETO; CAPONI, 2007). Aliado ao fortalecimento do paradigma biomédico, doenças e transtornos do desenvolvimento tornaram-se objeto de estudo, promovendo a elucidação e divulgação dos novos conhecimentos a sociedade, gerando a conscientização e o diagnóstico adequado de tais distúrbios, aumentando ainda mais o uso de fármacos pela sociedade.

Para os autores Mattos, Rohde e Polanczyk (2012) a medicalização gera preocupações, especialmente acerca do tratamento excessivo em crianças e adolescentes. Em seus estudos sobre o Transtorno do Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH), afirmam que os estimulantes são a primeira linha de tratamento adotada para crianças em idade escolar, levantando questionamentos quanto as possíveis consequências da utilização de drogas estimulantes do sistema nervoso sobre o neurodesenvolvimento.

1.1 Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH)

O Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH) está entre os transtornos psiquiátricos mais comuns da infância e adolescência, com taxa de prevalência entre 3,5% a 5,6% da população jovem, e é mais comum entre meninos do que entre meninas (LECENDREUX; KONOFAL; FARAONE, 2011).

O DSM V (Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais – 5ª edição, 2013) define o TDAH como um padrão persistente de desatenção e/ou hiperatividade-impulsividade, com sintomas evidentes antes dos 12 anos de idade. O subtipo predominantemente desatento do TDAH caracteriza-se por comportamentos de divagação, falta de persistência, desorganização e dificuldades para manter o foco, não havendo relação com déficits na capacidade de compreensão. O subtipo predominantemente hiperativo/impulsivo pode ser descrito por uma intensa atividade motora inapropriada, inquietude extrema e/ou ações

precipitadas e momentâneas, com significativo potencial para o dano à pessoa. O subtipo combinado apresenta tanto sintomas de desatenção quanto de hiperatividade e impulsividade, evidentes nos últimos seis meses.

O TDAH é um transtorno invasivo cujos sintomas estão presentes em dois ou mais ambientes, promovendo prejuízos ou diminuição da qualidade de funcionamento no âmbito social, acadêmico e/ou ocupacional do indivíduo. Transtornos comórbidos são frequentes em pessoas com diagnóstico de TDAH, como a associação com o Transtorno de conduta (CD) e o Transtorno de Oposição Desafiante (TOD), favorecendo o aumento dos índices de fracasso escolar (LECENDREUX; KONOFAL; FARAONE, 2011).

Além da problemática da sintomatologia do transtorno, multiplicam-se estudos que apontam o grande risco de abuso de substâncias em pacientes que fazem uso de psicoestimulantes, indicando que crianças diagnosticadas com TDAH que não forem acompanhadas adequadamente poderão utilizar substâncias de abuso com o decorrer do tempo (KATUSIC *et al.*, 2003).

Um estudo realizado por Kerekes *et al.* (2013), apontou que crianças e adultos com TDAH apresentam uma alta propensão para a busca por novidades, com traços de impulsividade, desordem, agitação e inquietação. Embora estes dados sinalizem déficits nas funções executivas e prejuízos na atenção, a curiosidade, generosidade e extroversão em situações da vida social são traços positivos do perfil comportamental do TDAH.

Ao realizar uma revisão de literatura, Marcelo e Caciene Reinhardt (2013) encontraram diversas situações que conferem ao TDAH um grau de urgência para seu diagnóstico e tratamento, por apresentar diversas comorbidades e riscos ao sujeito, como envolvimento em acidentes, risco de suicídio e adição, exposição à violência ou risco de abuso de internet e abuso sexual. Os autores consideram que sua alta prevalência e seus sintomas apresentam-se como um problema de saúde pública, reforçando a importância de seu reconhecimento e adequado tratamento.

1.2 Neurobiologia do TDAH

A etiologia do TDAH é incerta, mas fatores como baixo peso ao nascer, exposição pré-natal ao álcool ou cigarro, idade e saúde materna, duração do parto, sofrimento fetal e componentes genéticos, com estimativa de herdabilidade entre 0,5-0,9%, podem atuar aumentando o risco de desenvolvimento do transtorno entre parentes de primeiro grau (SPENCER *et al.*, 2002).

Estudos apontam o caráter combinatório do TDAH, resultante da soma de fatores biológicos, genéticos, sociais e ambientais. Considerada uma doença neurobiológica, estudos sugerem a existência de alterações em áreas específicas do cérebro, como o córtex pré-frontal e parietal, os gânglios da base e circuitos associados. As alterações nestas regiões podem favorecer mudanças no controle inibitório, na memória de trabalho, na capacidade atencional e em outras funções executivas (GONÇALVES *et al.*, 2013).

Castellanos e Proal (2012) abordaram a relação entre o circuito de controle executivo e a sintomatologia do TDAH. Os circuitos fronto-parietal formados pelo lobo frontal, córtex cingulado, núcleo caudado e cerebelo envolvem funções como a flexibilidade mental e tomada de decisões. Barkley e colaboradores (2008) também discutiram a presença de alterações nos substratos neuronais que regulam as funções executivas. A falha nos processos inibitórios favorece a baixa tolerância à espera, a ausência de comportamento governado por regras e a emissão de respostas rápidas e imprecisas, necessitando de recompensas imediatas.

Ao estudar a neurobiologia do TDAH, Faraone e Biederman (1998) concluíram que embora não haja uma única fisiopatologia, muitos dados indicam uma disfunção nas vias fronto-corticais que controlam o comportamento e a atenção e diferenças morfológicas e fisiológicas nos sistemas pré-frontal – estriado, que são ricos em dopamina. Assim, o TDAH estaria associado ao DAT, uma fosfoproteína neural que remove o neurotransmissor dopamina do espaço sináptico e regula sua disponibilidade para os receptores pré e pós sinápticos. Esta desregulação do nível de dopamina causado pela função inapropriada do DAT está presente em muitas doenças neurológicas, incluindo a depressão e o abuso de psicoestimulantes.

1.3 Comportamento Hiperativo e o Teste de Campo Aberto

Movimentos frequentes de mãos ou pés, dificuldades para manter-se parado em uma cadeira, realizando movimentos que contorcem o corpo ou levantar-se com frequência para locomover-se no espaço, são sintomas hiperativos que repercutem negativamente em atividades sociais, acadêmicas e/ou profissionais do indivíduo (DSM V, 2013). Em experimentos com animais, padrões comportamentais hiperativos podem ser observados através da quantificação de cruzamentos, rearings e groomings realizados durante o Teste de Campo Aberto.

O teste de Campo Aberto (Open field) está entre os testes mais utilizados para a mensuração da atividade locomotora e comportamento exploratório em animais de laboratório. Desprovido de marcos visuais, pistas olfativas e sonoras, o teste é realizado em um ambiente tranquilo que incentiva a exploração e a deambulação do animal em uma arena delimitada por paredes que impedem sua saída (SAMSON *et al.*, 2015).

Os resultados obtidos no Campo Aberto são clinicamente relevantes, coletados através de uma metodologia não invasiva que permite sua reaplicação ao longo do estudo. Cuidados com as condições ambientais e critérios de observação e manipulação pelo experimentador são fundamentais para evitar interferências sobre os dados comportamentais dos animais em estudo (TATEM *et al.*, 2014).

O Campo Aberto é utilizado para avaliar a progressão de doenças, a eficácia de fármacos e efeitos neurológicos em uma ampla variedade de paradigmas experimentais, como a indução de lesão cerebral e a administração de psicoestimulantes. Outros fatores como estresse, ansiedade, gênero, envelhecimento e fatores ambientais também podem ser analisados através do teste de Campo Aberto (WALI *et al.*, 2014).

A administração de psicoestimulantes tem sido associada ao aumento da atividade locomotora e exploratória, favorecendo o comportamento hiperativo em roedores (MADUREIRA *et al.*, 2007; RIEGEL *et al.*, 2009). Tendo em vista a ampla utilização e confiabilidade do teste de Campo Aberto, este foi aplicado no presente estudo para avaliar o efeito de um novo psicoestimulante utilizado no tratamento do TDAH sobre o comportamento de ratos Wistar.

1.4 Tratamentos Farmacológicos

O metilfenidato (Ritalina®) tem sido usado com eficácia no tratamento do TDAH desde 1950, por ser eficaz na remissão dos sintomas de desatenção, hiperatividade e impulsividade, gerando melhorias no desempenho escolar e acadêmico de seus usuários (ITABORAHY; ORTEGA, 2013). Diversos estudos sugerem que o metilfenidato (MFD) age aumentando o nível de dopamina extracelular no cérebro, dando suporte para estudos pré-clínicos que mostram que o MFD atua bloqueando os transportadores de dopamina (DAT), assim como os transportadores de noradrenalina (HUMPHREYS, *et al.*, 2013).

Louzã e Mattos (2007), em um estudo sobre o tratamento de adultos com TDAH concluiu que o metilfenidato é considerado extremamente eficaz, apresentando um perfil de segurança considerado satisfatório, mas que depende da adesão do paciente ao tratamento, que é sempre de longo prazo. Entretanto, Gomes (2006) pesquisou os efeitos da administração crônica de metilfenidato em ratos jovens e identificou alterações nos parâmetros de estresse oxidativo, com aumento da peroxidação de lipídeos no cerebelo, córtex pré-frontal, hipocampo e estriado de animais jovens expostos cronicamente ao metilfenidato, assim como dano oxidativo a proteínas.

Scherer (2010) também estudou os efeitos da administração crônica de MFD em ratos jovens e verificou a ocorrência de mudanças comportamentais e neuroquímicas, com prejuízos na cognição, aprendizagem e memória dos animais. O MFD promoveu alterações em processos cerebrais importantes para a maturação e desenvolvimento do SNC, como a estimulação da atividade das enzimas Na^+/K^+ ATPase e Acetilcolinesterase (AChE) e a diminuição dos níveis do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (relacionado ao estresse oxidativo). Para Scherer (2010), seus achados corroboram com estudos que apontam os malefícios da exposição do cérebro imaturo ao MFD, como: a alteração da expressão dos genes imediatos c-fos e fos-B; a ativação da via de sinalização da proteína cinase A no córtex pré-frontal; a predisposição à ansiedade; e a indução de persistentes alterações catecolaminérgicas durante o período de desenvolvimento do organismo, que podem afetar os processos de sinaptogênese, gliogênese e mielinização.

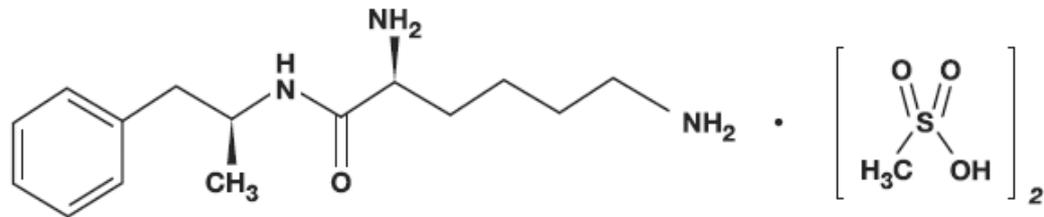
Segundo dados da ONU (2011), em 2010, foram produzidos mundialmente 43 toneladas de psicoestimulantes. Deste total, a produção do MFD foi responsável por 56%. Apesar de sua grande utilização, o metilfenidato é visto como um fraco estimulante do SNC por sua rápida metabolização em ácido ritalínico, atingindo seu pico de ação em duas horas, com meia-vida de 1 a 3 horas (FAGUNDES, 2007). Assim, mudanças estão ocorrendo na forma de tratamento do transtorno, com a inserção de psicoestimulantes de liberação prolongada, a fim de obter maior durabilidade de seus efeitos. Se antes as crianças permaneciam sobre o efeito da droga apenas durante o período escolar, ao longo de um ou dois anos, atualmente muitas crianças permanecem sobre os efeitos de medicamentos de longa-duração durante e após o período escolar, por um período de tempo indeterminado, enquanto o tratamento for avaliado como necessário ao bom funcionamento do sujeito (CALIMAN; DOMITROVIC, 2013).

1.5 Dimesilato de Lisdexanfetamina (LDX)

O Dimesilato de Lisdexanfetamina (LDX) é um novo psicoestimulante aprovado para uso no Brasil em 2011, cuja fração farmacologicamente ativa, a α -anfetamina, é gradualmente liberada por hidrólise. Ele é vendido comercialmente como Venvanse® e deve ser administrado por via oral, em doses de 30, 50 ou 70mg. É indicado para o tratamento do Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade em crianças e adultos, a partir dos 6 anos de idade.

O LDX é um pró-fármaco de d-anfetamina farmacologicamente inativo ligado covalentemente ao aminoácido lisina (Figura 1). Ao ser hidrolisado no intestino, a lisina (aminoácido essencial reaproveitado pelo organismo) separa-se da d-anfetamina, que se torna ativa e promove mudanças no organismo, atingindo concentrações plasmáticas máximas entre os primeiros 25 minutos até 3 horas após a sua ingestão (HUTSON; PENNICK; SECKER, 2014).

Figura 1 - Estrutura Molecular do Dimesilato de Lisdexanfetamina (Venvanse®)



Uma revisão sistemática realizada por Mattos (2014) avaliou a eficácia da LDX no tratamento de crianças e adolescentes com TDAH. Nos 31 artigos analisados, foi verificado que seus benefícios terapêuticos são obtidos em até 1,5 horas após administração e se estendem até 13 horas, com eficácia comparável ou superior à dos demais psicoestimulantes disponíveis. Para Boellner e colaboradores (2010), a extensão na duração do efeito do medicamento ao longo do dia contribui para uma melhor adesão e eficácia do tratamento, extinguindo a necessidade da administração do medicamento durante as horas escolares. Esse fator torna-se importante ao considerarmos que grande parte dos pacientes beneficiários deste tratamento está em idade escolar.

Em seus estudos, Boellner e colaboradores (2010) analisaram 3 estudos randomizados, duplo-cegos, de LDX em crianças e adultos, e identificaram como eventos adversos do uso desta medicação: diminuição do apetite, insônia, dor abdominal superior, dor de cabeça, anorexia e boca seca, um perfil sintomatológico similar ao advindo da administração de outras drogas psicoestimulantes.

Considerando o panorama atual de diagnóstico e tratamento de transtornos como o TDAH, que favorecem a utilização de fármacos por longos períodos, e tendo em vista que o dimesilato de lisdexanfetamina é um novo psicoestimulante com resultados promissores, são imprescindíveis estudos que verifiquem os efeitos gerados a longo prazo em decorrência de tratamentos com este pró-fármaco, especialmente no público infantil.

Um estudo realizado por Queiroz (2012) verificou alterações neuroquímicas no corpo estriado, córtex pré-frontal e hipocampo de ratos Wistar, com 75 dias de nascidos, após 7 dias de tratamento com doses de 10 e 30 mg/kg de

LDX. A pesquisa identificou fatores favoráveis ao desequilíbrio oxidativo, com decréscimos nos níveis de glutathiona reduzida (GSH) e incrementos na peroxidação lipídica nos grupos que receberam LDX quando comparados com grupos controles, tratados com solução salina.

Decréscimos em níveis de agentes antioxidantes como a GSH comprometem a capacidade de defesa celular e favorecem a peroxidação lipídica, responsável pelo rompimento das pontes dissulfureto dos lipídios, alterando a integridade da célula, desestabilizando-a e podendo ocasionar a sua morte (COLARES *et al.*, 2016).

1.6 Estresse Oxidativo

Os Radicais Livres (RL) são moléculas reativas que possuem uma quantidade ímpar de elétrons em suas camadas de valência. São produzidos principalmente pelas mitocôndrias, membranas celulares e citoplasma, e desempenham importante papel em processos celulares, como a transdução e transcrição nuclear. Fatores exógenos como radiações ionizantes, metais pesados, tabagismo e ingestão de álcool também podem contribuir para o aumento na produção destes radicais (BARBOSA *et al*, 2010).

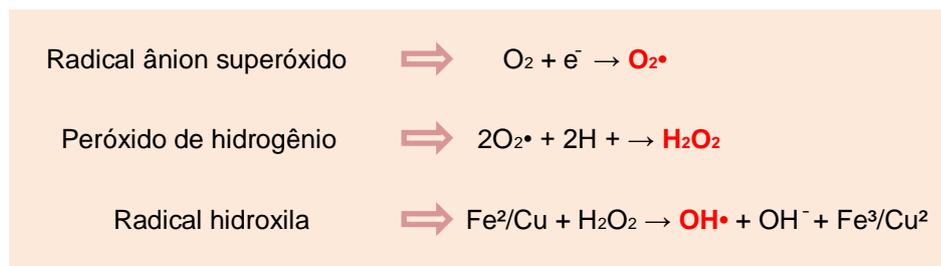
Continuamente RL são produzidos para atuarem em funções biológicas importantes, como a transferência de elétrons em reações bioquímicas, geração de ATP (energia) na cadeia transportadora de elétrons e atuação nos mecanismos de defesa frente a processos inflamatórios. O aumento exacerbado em sua produção, no entanto, tem efeito patogênico para o organismo, intensificando as ações pró-oxidantes, que atacam componentes das membranas celulares, proteínas RNA e DNA, ocasionando mutações, e está associado ao desenvolvimento de doenças como o câncer, a aterosclerose e o acidente vascular cerebral (BARREIROS; DAVID, 2006; GOTTLIEB *et al*, 2010).

Os RL são instáveis e possuem grande potencial para reagir com outros compostos, originando espécies reativas do oxigênio (EROs), como o peróxido de

hidrogênio (H_2O_2), superóxido (O_2) e hidroxila ($\text{OH}\cdot$), e espécies reativas do nitrogênio (ERN), como o peroxinitrito (ONOO) (VÉLEZ, ARIAS, 2012).

Em organismos aeróbicos, a principal utilização de O_2 ocorre nas mitocôndrias, onde sofre redução tetravalente, com a aceitação de quatro elétrons e formação de água (H_2O). A enzima citocromo oxidase é a catalizadora da reação e atua no controle da geração de radicais livres, de modo a impedir sua excessiva produção. Do oxigênio metabolizado nas mitocôndrias, cerca de 2% a 5% é reduzido de forma univalente dando origem as EROs. O radical superóxido é originado pela adição de um elétron a uma molécula de oxigênio (O_2) em estado fundamental e é o ponto de partida para a formação das demais EROs (Figura 2). O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é fruto da dismutase espontânea ou enzimática de O_2 , que por sua vez produz o radical hidroxila ($\text{OH}\cdot$) na presença de íons de metais de transição, como o ferro (Fe^2) e o cobre (Cu) (GANDRA *et al*, 2006; MAGLIARO *et al*, 2009).

Figura 2 – Formação mitocondrial de Espécies reativas do oxigênio.



Fonte: Arquivo pessoal da autora.

Embora o H_2O_2 não seja um RL por não apresentar elétron desemparelhado em sua última camada de valência, possui elevado poder reativo, participando da produção de $\text{OH}\cdot$, o mais reativo dos radicais, com potencial ação deletéria sobre a estrutura de células circunvizinhas. O H_2O_2 é capaz de ultrapassar as barreiras da membrana celular e gerar efeitos tóxicos em seu interior (VINCENT *et al*, 2007).

A molécula de oxigênio (O_2) também participa de reações com outros RL, como o óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$), gerando espécies reativas de nitrogênio (ERN), dentre

elas, o peroxinitrito (ONOO), que pode causar dano à estrutura da célula, alterando sua funcionalidade. O NO• atua como neurotransmissor no SNC e periférico, mas a elevação em sua concentração pode gerar ação neurotóxica, induzindo a apoptose das células neuronais, o que favorece o estresse oxidativo e o aparecimento de quadros patológicos como a isquemia cerebral, neurodegeneração e inflamação (MAITI, ILAVAZHAGAN, 2010).

O estresse oxidativo é definido como um quadro de dano ao organismo ocasionado por um persistente desequilíbrio entre a produção de radicais livres (RL) e espécies reativas (EROs e ERNs) e a atuação das defesas antioxidantes (Figura 3). A principal função do sistema de defesa antioxidante é a manutenção dos fatores pró-oxidantes em limites que asseguram o bem-estar fisiológico e que são passíveis de regulação, inibindo o excesso em sua produção e consequentes danos sistêmicos irreparáveis (BARBOSA *et al*, 2010; COLARES *et al.*, 2016)

Figura 3 - Estresse Oxidativo



Fonte: Arquivo pessoal da autora.

Legenda: Ilustração representativa do desequilíbrio entre as defesas antioxidantes e os fatores pró-oxidantes característico de um quadro de Estresse oxidativo.

O sistema de defesa antioxidante é formado por componentes endógenos e exógenos. Os antioxidantes endógenos são compostos de defesa que podem possuir ação enzimática, como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutathiona peroxidase (GPx), ou não enzimática, como a glutathiona reduzida (GSH), melatonina e a coenzima Q (Q10) (GOTTLIEB *et al.*, 2010; COLARES *et al.*, 2016).

Os antioxidantes exógenos podem ser obtidos por meio de uma dieta alimentar rica em vitaminas e minerais, contribuindo para a modulação do processo de estresse oxidativo ao atuar de forma positiva sobre biomarcadores específicos, como o malonildialdeído e o isoprostanos, relacionados à oxidação de lipídeos. Através da atuação destas moléculas antioxidantes ocorre a inativação ou a redução na formação de RLs, EROs e ERNs (BARBOSA *et al.*, 2010).

O aumento desordenado de RLs e espécies reativas aliado a diminuição na produção e eficácia das defesas antioxidantes provocam um grave desequilíbrio no organismo, levando a ocorrência do estresse oxidativo, responsável pela degradação da membrana, disfunção celular e consequente apoptose (EGER, 2016).

Os efeitos deletérios do estresse oxidativo sobre o delicado funcionamento neuronal apresentam alta correlação com doenças neurodegenerativas, convulsões, distúrbios do humor, déficits cognitivos e quadros sintomatológicos de doenças crônicas, como as doenças cardiovasculares, a obesidade, a aterosclerose e a hipertensão, além de estar associada a muitos componentes da síndrome metabólica (SM), como a resistência a insulina, aumentos dos lipídeos e de marcadores inflamatórios, assim como a disfunção endotelial (GOTTLIEB *et al.*, 2010; BARBOSA *et al.*, 2010).

O metilfenidato, usado com eficácia no tratamento do TDAH há mais de 50 anos, vem sendo estudado a fim de elucidar o efeito de seu consumo sobre o funcionamento do organismo, especialmente a nível neuroquímico. Achados apontam alterações nos parâmetros de estresse oxidativo em animais jovens expostos cronicamente a este medicamento (SCHERER, 2010), sinalizando o potencial dano induzido por sua administração crônica ao funcionamento e maturação do SNC.

A LDX foi inserida recentemente no mercado e alguns estudos verificaram alterações nos padrões neuroquímicos do SNC, com fatores favoráveis a ocorrência de estresse oxidativo (RIEGEL, 2009; QUEIROZ, 2012.; EGER, 2016). Estudos longitudinais, nos entanto, são escassos.

Desta forma, o presente estudo se propôs a investigar a repercussão da administração da LDX em ratos jovens, com 21 dias de nascidos, sobre a atividade locomotora e padrões neuroquímicos em sua fase adulta. Estudos desta natureza são de grande importância para verificar o perfil de segurança da LDX a longo prazo, tendo em vista o atual panorama de diagnóstico e tratamento de transtornos como o TDAH e a utilização de fármacos por longos períodos, em especial pelo público infantil.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar o efeito do tratamento com Lisdexanfetamina no neurodesenvolvimento e sua repercussão na fase adulta.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Investigar as mudanças comportamentais ocorridas durante o tratamento com Lisdexanfetamina.

- ✓ Realizar comparações entre o padrão de comportamento de ratos Wistar no 10º dia de tratamento com LDX e no 30º dia após o término da administração da droga.

- ✓ Analisar a repercussão do tratamento com Lisdexanfetamina sobre a fase adulta de ratos Wistar com 60 dias de nascidos através da análise de parâmetros pró-oxidantes e antioxidantes, por meio da mensuração da peroxidação lipídica, dos teores de nitrito/nitrato e dos níveis de GSH, em córtex pré-frontal, hipocampo e núcleos da base.

3. METODOLOGIA

3.1 Animais:

Para a realização do presente estudo, foram utilizados ratos Wistar machos, com 21 dias de nascidos, fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Medicina da UFC – *Campus* Sobral. Os animais foram colocados em caixas de polipropileno com no máximo 8 animais, sob condições específicas de biotério, com temperatura constante ($24^{\circ} \pm 1$), submetidos a um ciclo de claro/escuro de 12 em 12 horas, recebendo ração padrão e água à vontade (Figura 4).

Figura 4 - Ratos Wistar ao 21^o dia de nascidos



Fonte: Arquivo pessoal da autora.

Legenda: Ratos Wistar machos com 21 dias de nascidos em caixa de polipropileno.

Os experimentos seguiram as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e esforços foram feitos para minimizar o sofrimento dos animais. A pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Ceará - UFC, com protocolo nº 21/2015.

3.2 Delineamento Experimental:

Aos 21 dias de nascidos (período correspondente à infância) os ratos foram submetidos ao Teste de Campo aberto para análise da atividade de locomoção e exploração, segundo a metodologia descrita por Piazza e colaboradores (1989), na qual os mais ativos, denominados alto exploradores, são selecionados para a composição do grupo experimental, visto que, animais alto-exploradores, assim como os humanos mais ativos, estão mais propensos a receberem o diagnóstico de TDAH. Os animais com menor atividade motora, os baixo exploradores, foram alocados para o grupo controle. Esta estratégia de seleção com base na resposta locomotora em um ambiente novo é parâmetro para medir o comportamento exploratório e a busca por novidades (KABBAJ et al., 2000).

Tabela 1. Divisão dos animais em baixo ou alto exploradores com base na atividade exploratória.

GRUPO CONTROLE – BAIXO EXPLORADORES			
Animais	Cruzamentos	Rearing	Total
Animal 1	45	26	71
Animal 2	49	21	70
Animal 3	38	17	55
Animal 4	37	17	54
Animal 5	33	22	55
Animal 6	45	24	69
Animal 7	39	33	72
Animal 8	51	19	70
GRUPO EXPERIMENTAL – ALTO EXPLORADORES			
Animais	Cruzamentos	Rearing	Total
Animal 1	54	28	82
Animal 2	64	36	100
Animal 3	53	41	94
Animal 4	54	34	88
Animal 5	70	60	130
Animal 6	49	32	81
Animal 7	41	40	81
Animal 8	68	27	95
Animal 9	47	34	81

Animal 10	61	49	110
Animal 11	72	24	96
Animal 12	53	39	92
Animal 13	50	30	80
Animal 14	59	32	91
Animal 15	51	39	90
Animal 16	59	34	93

Após a realização do Teste de Campo Aberto e formação dos grupos experimental e controle (Tabela 1), os animais foram tratados com dimesilato de lisdexanfetamina (Venvanse®) e solução salina, respectivamente, ao longo de 10 dias, ou seja, do 21º ao 30º dia de nascidos, mimetizando o protocolo de tratamento do TDAH em humanos, que geralmente ocorre por volta dos seis aos catorze anos de idade. A via de administração utilizada foi a gavagem.

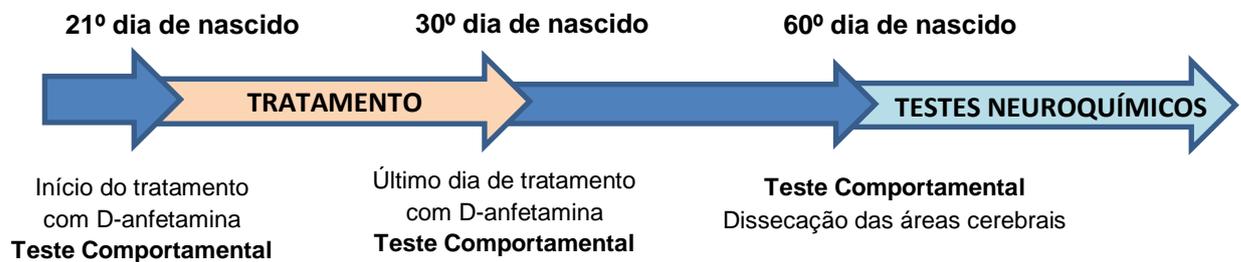
O grupo experimental foi subdividido em dois grupos. O primeiro grupo recebeu 2mg/kg de Venvanse, que corresponde a 1,15 mg de D-anfetamina base, segundo a metodologia de Reagan-shaw e colaboradores (2007), e representa a dose clínica diária mais baixa indicada para o tratamento do TDAH (30mg/dia) em humanos. O segundo grupo recebeu a dose clínica diária mais alta (70mg/dia), ou seja, 5mg/kg de Venvanse, correspondente a 3,39 mg de D-anfetamina base. Os cálculos realizados para adequar as concentrações de Venvanse administrada à ratos aos valores administrados em humanos estão descritos no Apêndice A.

No último dia de tratamento, quando os animais completaram 30 dias de nascidos, foram submetidos ao Teste de Campo Aberto uma hora (60 minutos) após a administração da droga. Nos 30 dias seguintes não houve tratamento ou procedimento experimental.

Ao completarem 60 dias de nascidos (período correspondente a fase adulta), os ratos foram novamente avaliados no Teste de Campo Aberto e sacrificados, decapitados em guilhotina. Suas áreas cerebrais (Córtex pré-frontal, Hipocampo e Núcleos da base) foram imediatamente dissecadas sobre o gelo, colocados em papel alumínio, pesados e armazenados em baixa temperatura (- 80º) até a realização dos testes neuroquímicos, nos quais foram avaliados os níveis de estresse oxidativo por meio da determinação da concentração de nitrito/nitrato, da

produção de substâncias ácidas reativas ao Ácido Tiobarbitúrico e através da análise dos níveis de Glutathione Reduzida (GSH) (Figura 5).

Figura 5 - Delineamento Experimental do tratamento com LDX em ratos.



3.3 Teste de Campo Aberto

O Teste do Campo Aberto é baseado na metodologia de Sielgel (1946), validada por Archer (1973). O Teste é realizado em uma arena com paredes que isolam o ambiente e impedem a saída do animal. A arena tem seu assoalho dividido em pequenos quadrantes a fim de possibilitar a análise e quantificação da atividade locomotora do animal (Figura 6).

Em um ambiente escuro e sem a interferência de estímulos sonoros e luminosos, o animal é colocado no centro do campo e observado durante 5 minutos, com o auxílio de uma luz vermelha que permite a visão apenas do observador, que registra os comportamentos descritos na tabela 2 e ilustrados na figura 7.

Figura 6 - Caixa de madeira utilizada para a realização do Teste do Campo Aberto.

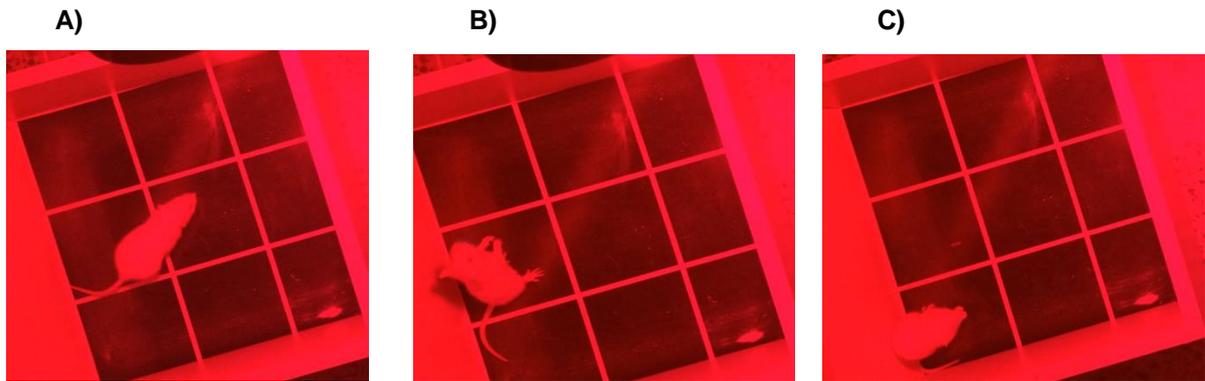


Fonte: <http://www.scienlabor.com.br>

Tabela 2. Definição dos comportamentos observados no Teste do Campo Aberto

Comportamentos	Descrição
Cruzamento	Cruzar uma das linhas dos quadrantes com as quatro patas
Rearing	Erguer o corpo sobre as patas traseiras
Grooming	Comportamento de auto-limpeza

Figura 7 - Teste de Campo Aberto em ratos.



Fonte: Arquivo pessoal da autora.

Legenda: Ilustrações dos comportamentos observados no Teste de Campo Aberto. A) Número de Cruzamentos; B) Rearing; C) Grooming.

3.4 Determinação da produção de substâncias ácidas reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

Para verificar a reação do malonildialdeído, originário do processo oxidativo, com o ácido tio barbitúrico, foi preparado o tampão fosfato, 150nM, e colocou-se 250µl do homogenato 10% no eppendorf. Em seguida, o homogenato foi colocado em banho-maria, à 37°C, durante 1 hora. Precipitou-se o preparo com 400µl de ácido perclórico 35% e centrifugou-se a 14000rpm, durante 15 minutos, com temperatura de 4°C.

O sobrenadante foi transferido para outro eppendorf, onde foi adicionado 200µl de ácido tiobarbitúrico 1,2%. A solução foi colocada em banho-maria, na temperatura de 95-100°C por 30 minutos e, após esfriar, realizou-se a leitura no espectrofotômetro à 532nm.

3.5 Determinação da concentração de Nitrito/Nitrato

Para determinar a produção de Nitrito/Nitrato foi preparado uma curva padrão, através da pesagem de 6,9 mg de NaNO₂ dissolvido logo em seguida em 10 mL de água destilada. Foram feitas diluições em série (10 e 20x), deixando 1 Mm,

100 μM , 10 μM , 5 μM , 2,5 μM , 1,25 μM , 0,625 μM , 0,312 μM , e realizou-se a equação da reta para o cálculo das concentrações do teste.

Foram preparados homogenatos de cada área cerebral a 10% (p/v) em solução de fosfato de potássio 150 Nm, com Ph 7,4. Após centrifugação (11000g por 15 minutos, à 4°C), foram coletados os sobrenadantes e a produção de óxido nítrico (NO) foi determinada pela reação de Griess. Por meio de uma alíquota de 10 μL do sobrenadante, incubada com 100 μL do reagente de Griess a temperatura ambiente por 10 minutos, a absorbância foi medida em espectrofotômetro a 540 nm. A curva padrão de NaNO_2 foi utilizada para determinar a concentração de Nitrito.

3.6 Determinação da Glutathiona Reduzida (GSH)

As defesas endógenas que atuam contra o estresse oxidativo foram avaliadas através da mensuração dos níveis de GSH. As áreas cerebrais coletadas foram homogeneizadas em tampão de 0,02 M de EDTA (10% p/v) e adicionadas à uma solução de ácido tricloroacético a 50%. Em seguida, o homogeneizado foi centrifugado (3000 rpm/ 15 min), o sobrenadante foi colocado em um eppendorf e misturado a 0,4 M de tampão tris-HCl, pH 8,9 e 0,01 de DTNB. A determinação dos níveis de GSH foi realizada em um espectrofotômetro a 412nm e os resultados foram expressos em mcg/g de tecido.

3.7 Análise Estatística

Os dados obtidos no presente estudo foram organizados em planilhas, utilizando o programa Microsoft Excell 2010 e posteriormente foram analisados no software GraphPad Prism versão 5.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA., EUA).

Os resultados obtidos nos estudos comportamentais foram expressos em média \pm EPM (erro padrão da média) da atividade locomotora (número de cruzamentos, *rearings* e *groomings*) dos animais submetidos ao teste de campo aberto. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni.

A análise dos resultados obtidos no estudo neuroquímico foi expressa em média \pm EPM (erro padrão da média) utilizando ANOVA seguido do pós-teste de

Bonferroni. Em todas as análises, os dados foram considerados estatisticamente significativos com intervalos de confiança de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

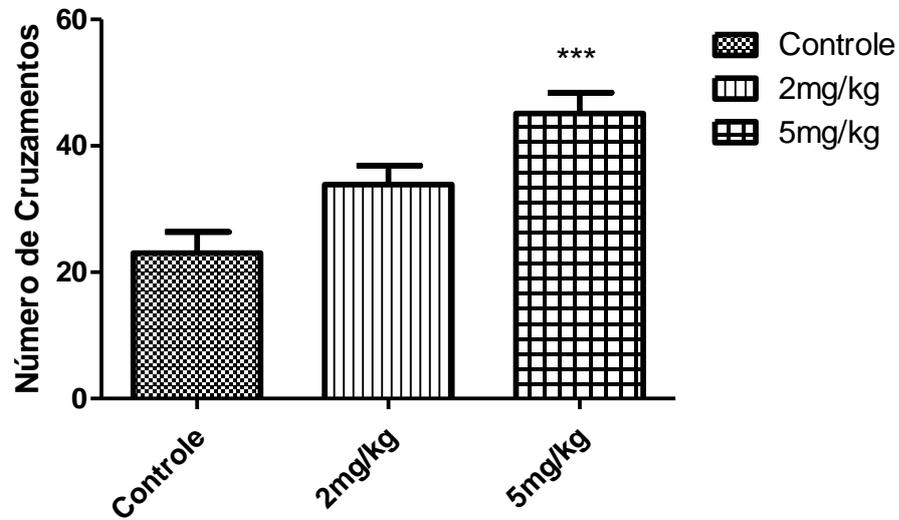
4.1 Estudo comportamental

4.1.1 Análise do número de Cruzamentos realizados por ratos Wistar no Teste de Campo Aberto após 10 dias de tratamento com LDX.

Após a administração de LDX nas doses de 2mg/kg e 5mg/kg durante os 10 dias de tratamento, os animais foram submetidos ao teste de Campo aberto no 10º dia, uma hora após a administração da droga, para observação e quantificação de sua atividade locomotora expressa através do número de cruzamentos realizados pelo animal.

A figura 8 mostra um percentual de deslocamento (96,22%) maior no grupo tratado com 5mg/kg de LDX ($45,13 \pm 9,39$), quando comparado com o grupo controle ($23,0 \pm 9,52$), tratado com solução salina. Não houve diferença significativa no número de cruzamentos realizados pelo grupo tratado com LDX na dose menor ($33,88 \pm 8,51$) em relação ao grupo controle.

Figura 8 - Efeito da LDX (2 e 5 mg/kg) sobre o Número de Cruzamentos no teste de Campo Aberto uma hora (60 minutos) após a administração da droga no 10º dia de tratamento.



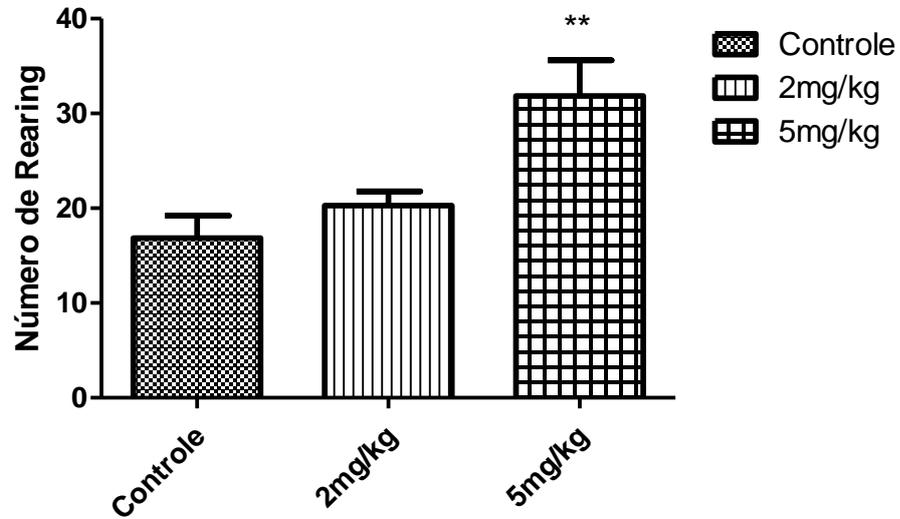
Os valores representam a média \pm EPM (n=8) da atividade locomotora dos ratos expressa pelo Número de Cruzamentos realizados. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni. Valor significativo quando comparados ao controle (***) $p < 0,001$.

4.1.2 Análise do número de *Rearings* realizados por ratos Wistar no Teste de Campo Aberto após 10 dias de tratamento com LDX.

Ao serem submetidos ao teste de Campo Aberto uma hora após a administração de LDX nas doses de 2mg/kg e 5mg/kg durante 10 dias de tratamento, os animais foram submetidos ao teste de Campo aberto para quantificação de sua atividade motora expressa através do número de *rearing*s realizados pelo animal.

O grupo que recebeu a maior dose de LDX (5 mg/kg) ($31,86 \pm 9,97$) apresentou maior número de *rearing* durante os 5 minutos de teste quando comparado com o grupo controle ($16,86 \pm 6,26$) e o grupo que recebeu uma dose menor de LDX (2mg/kg) ($20,29 \pm 3,99$), conforme demonstrado na figura 9. Os valores relativos ao grupo experimental de 5mg/kg foram significativos quando comparados com o grupo controle e com o grupo de 2mg/kg (** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$, respectivamente).

Figura 9 - Efeito da LDX (2 e 5 mg/kg) sobre o Número de *Rearings* no teste de Campo Aberto uma hora (60 minutos) após a administração da droga no 10^o dia de tratamento.



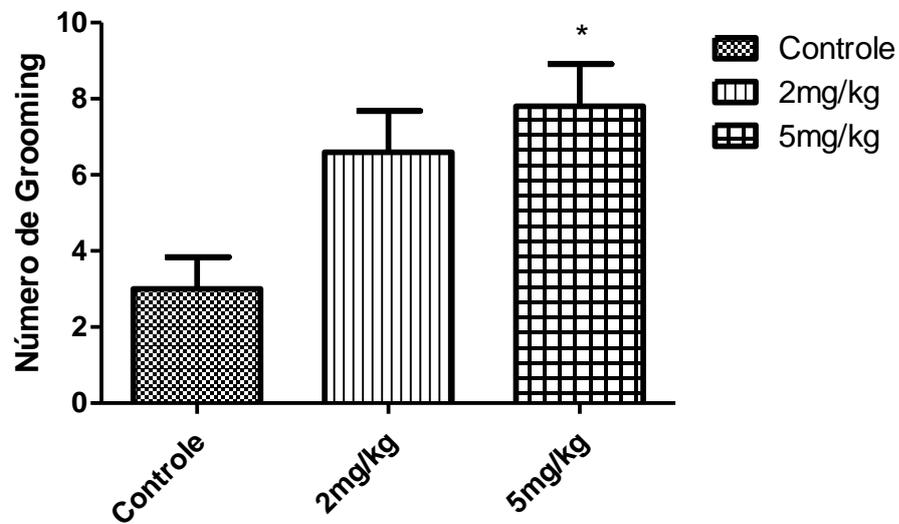
Os valores representam a média ± EPM (n=7) da atividade locomotora dos ratos expressa pelo Número de *Rearings* realizados. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni. Valores significativos comparados ao controle (** p < 0,01).

4.1.3 Análise do número de *Groomings* realizados por ratos Wistar no Teste de Campo Aberto após 10 dias de tratamento com LDX.

Ao serem submetidos ao teste de Campo Aberto uma hora após a administração de LDX nas doses de 2mg/kg e 5mg/kg durante 10 dias de tratamento, os animais foram submetidos ao teste de Campo aberto para quantificação de sua atividade motora expressa através do número de *groomings* realizados pelo animal.

O grupo que recebeu a maior dose de LDX (5 mg/kg) ($7,8 \pm 2,49$) apresentou maior número de *groomings* durante os 5 minutos de teste quando comparado com o grupo controle ($3 \pm 1,87$) e o grupo que recebeu uma dose menor de LDX (2mg/kg) ($6,6 \pm 2,41$).), conforme demonstrado na figura 10. Os valores relativos ao grupo experimental de 5mg/kg foram significativos quando comparados com o grupo controle (* $p < 0,05$).

Figura 10 - Efeito da LDX (2 e 5 mg/kg) sobre o Número de *Groomings* no teste de Campo Aberto uma hora (60 minutos) após a administração da droga no 10º dia de tratamento.



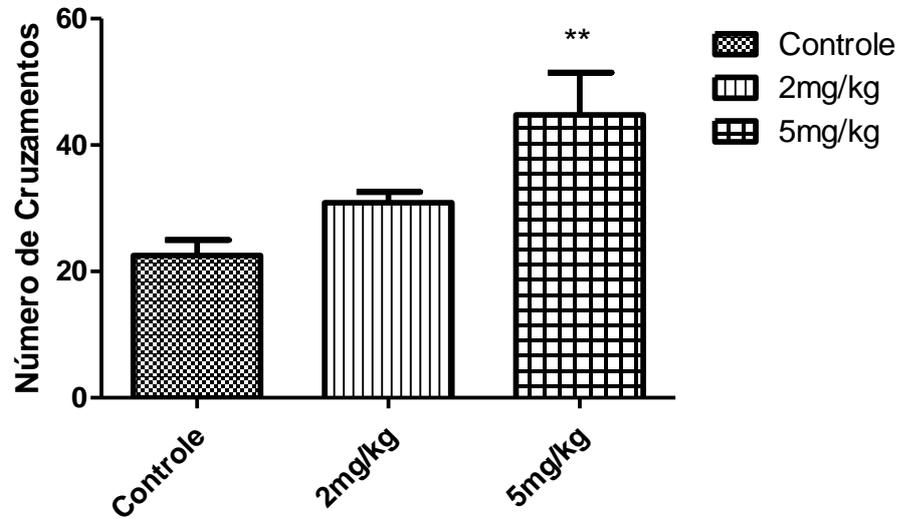
Os valores representam a média \pm EPM (n=6) do Número de *Groomings* realizados pelos animais dos grupos experimentais e controle. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni. Valores significativos comparados ao controle (*p<0,05).

4.1.4 Análise do número de Cruzamentos realizados por ratos Wistar 30 dias após o término do tratamento com LDX.

Os grupos experimentais tratados com dose máxima e mínima e o grupo controle foram submetidos novamente ao teste de Campo Aberto no 30º dia após o término do tratamento de 10 dias com LDX. A atividade locomotora expressa através do Número de cruzamentos realizados pelo animal na arena experimental foi observada e quantificada ao longo de 5 minutos.

A figura 11 demonstra uma atividade locomotora aumentada em 98.88% no grupo tratado com 5mg/kg ($44,75 \pm 19,08$) de LDX quando comparado com o grupo controle ($22,5 \pm 6,99$), tratado com solução salina, O grupo que recebeu a menor dose ($30,88 \pm 4,85$) não apresentou diferenças significativas ao ser comparado com o grupo controle e com o grupo de dose maior.

Figura 11 - Efeito da LDX (2 e 5 mg/kg) no 30º dia pós-tratamento sobre o Número de Cruzamentos no teste de Campo Aberto.



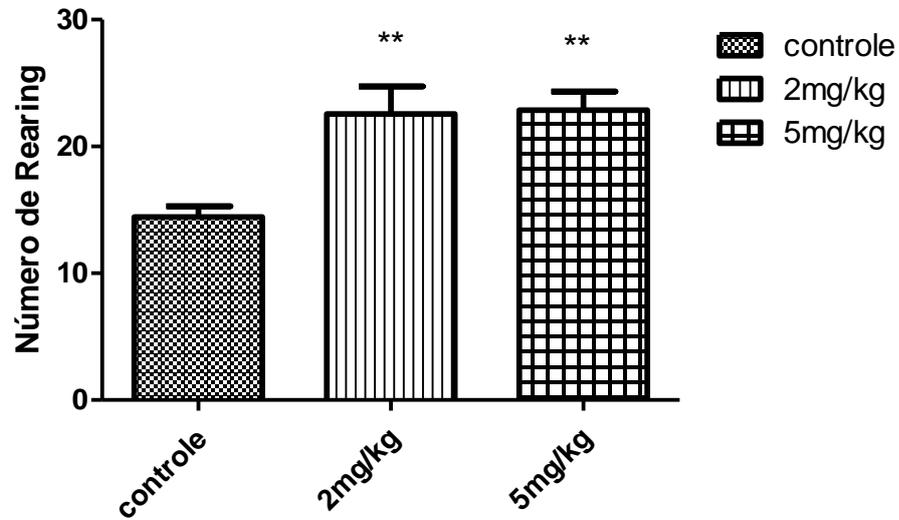
Os valores representam a média \pm EPM (n=8) da atividade locomotora dos ratos expressa pelo Número de Cruzamentos realizados. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni. Valores significativos comparados ao controle (** p<0,01).

4.1.5 Análise do número de *Rearings* realizados por ratos Wistar 30 dias após o término do tratamento com LDX.

Decorridos 30 dias do término do tratamento com LDX, os grupos experimentais e o grupo controle foram reavaliados no teste de Campo Aberto. O número de *rearing* realizado por cada animal foi quantificado ao longo de 5 minutos para avaliação da atividade motora.

Os grupos que receberam a LDX nas doses de 2 e 5 mg/kg, apresentaram aumento do comportamento de *rearing* em cerca de 56,41 e 58,42% respectivamente, quando comparado ao grupo controle ($14,43 \pm 2,30$) (** $p < 0,01$). Não houve diferença significativa entre a dose maior ($22,86 \pm 3,93$) e a dose menor ($22,57 \pm 5,71$) (Figura 12).

Figura 12 - Efeito da LDX (2 e 5 mg/kg) no 30º dia pós-tratamento sobre o Número de *Rearings* no teste de Campo Aberto.



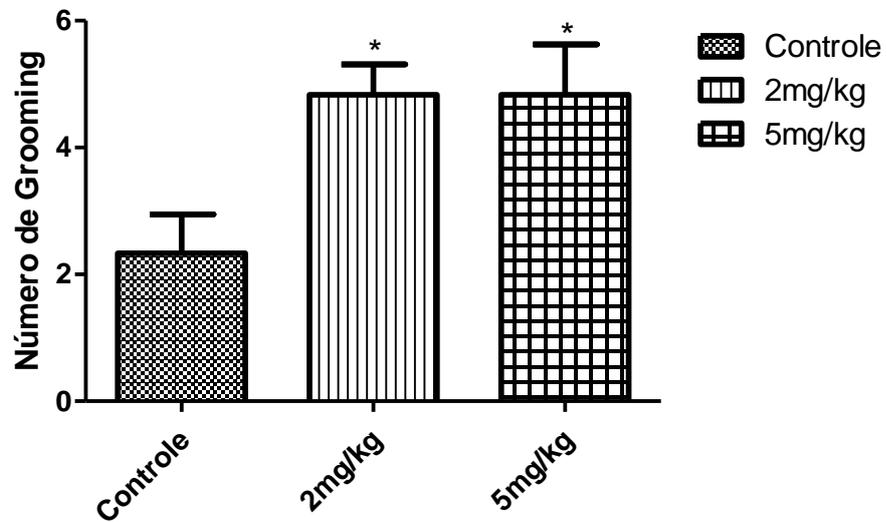
Os valores representam a média \pm EPM (n=7) da atividade locomotora dos ratos expressa pelo Número de *rearings* realizados. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni. Valores significativos comparados ao controle (** p<0,01).

4.1.6 Análise do número de *Groomings* realizados por ratos Wistar 30 dias após o término do tratamento com LDX.

Decorridos 30 dias do término do tratamento com LDX, os grupos experimentais e o grupo controle foram reavaliados no teste de Campo Aberto. O número de *grooming* realizado por cada animal foi quantificado ao longo de 5 minutos.

Os grupos que receberam a LDX nas doses de 2 e 5 mg/kg, apresentaram aumento do comportamento de *grooming* em cerca de 106 e 107,30% respectivamente, quando comparado ao grupo controle ($2,33 \pm 1,5$) (* $p < 0,05$). Não houve diferença significativa entre a dose maior ($4,83 \pm 1,94$) e a dose menor ($4,8 \pm 1,17$) (Figura 13).

Figura 13. - Efeito da LDX (2 e 5 mg/kg) no 30º dia pós-tratamento sobre o Número de *Groomings* no teste de Campo Aberto.



Os valores representam a média \pm EPM (n=6) do Número de *Groomings* realizados pelos animais dos grupos experimentais e controle. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni. Valores significativos comparados ao controle (*p<0,05).

4.1.7 Análise das alterações comportamentais em ratos Wistar 30 dias após o término do tratamento com LDX.

Os dados comportamentais de número de cruzamentos, rearing e grooming realizados por ratos Wistar 30 dias após o término do tratamento, revelam aumento da atividade motora exploratória e de comportamentos de limpeza nos grupos que receberam a maior dose (5 mg/kg) de LDX em 98,88 , 58,42 e 107,30%, respectivamente, conforme demonstra a Tabela 3.

Tabela 3. Efeito da LDX (2 e 5 mg/kg) no 30º dia pós-tratamento sobre o comportamento de ratos wistar no teste de Campo Aberto.

Grupo	Cruzamentos	Rearing	Grooming
Controle	22,5 ± 6,99	14,43 ± 2,30	2,33 ± 1,5
2 mg/kg	30,88 ± 4,85	22,57 ± 5,71	4,8 ± 1,17
5 mg/kg	44,75 ± 19,08**	22,86 ± 3,93**	4,83 ± 1,94*

Os valores representam a média ± EPM (n=6-8) do comportamento dos animais dos grupos experimentais e controle. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni. Valores significativos para a dose maior comparada ao controle (*p<0,05; **p<0,01).

4.2 Estudos Neuroquímicos

4.2.1 Efeitos da administração da LDX em substâncias reativas ao tiobarbitúrico (TBARS).

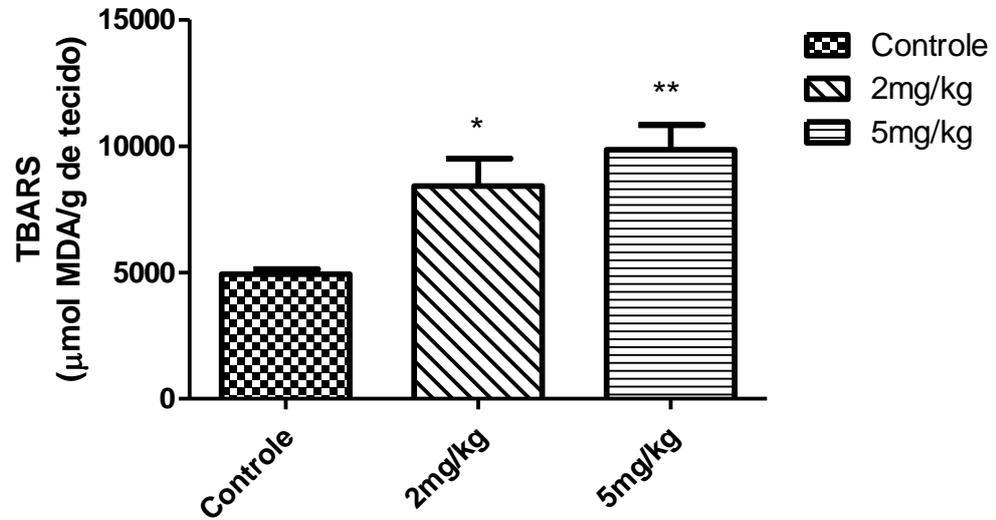
No córtex pré-frontal os teores de MDA demonstraram aumento de aproximadamente 70,80 e 99,98% na peroxidação lipídica nas duas doses (2mg/kg e 5mg/kg, respectivamente) de LDX, com valores significativos para ambas quando comparadas com o grupo controle (controle: $4926,46 \pm 471,76$; 2mg/kg: $8414,50 \pm 2437,96$, * $p < 0,05$; 5mg/kg: $9852,12 \pm 2176,22$, ** $p < 0,01$) (Figura 14).

No Hipocampo, também foi verificado uma elevação da ação da peroxidação lipídica. Foi observado aumento em cerca de 69,03% no grupo tratado com a maior dose de LDX (5 mg/kg) (** $p < 0,01$) quando comparado com o grupo controle (controle: $3843,98 \pm 1526,38$; 2mg/kg: $5584,83 \pm 1304,98$; 5mg/kg: $6497,68 \pm 843,42$) (Figura 15).

Por fim, os Núcleos da Base apresentaram aumento nos teores de MDA em cerca de 71,25% nos animais tratados com 5 mg/kg de LDX, quando comparado com o grupo controle (controle: $5481,97 \pm 843,92$; 2mg/kg: $6473,95 \pm 1505,89$, ** $p < 0,01$; 5mg/kg: $9387,75 \pm 1571,05$, *** $p < 0,001$) (Figura 16).

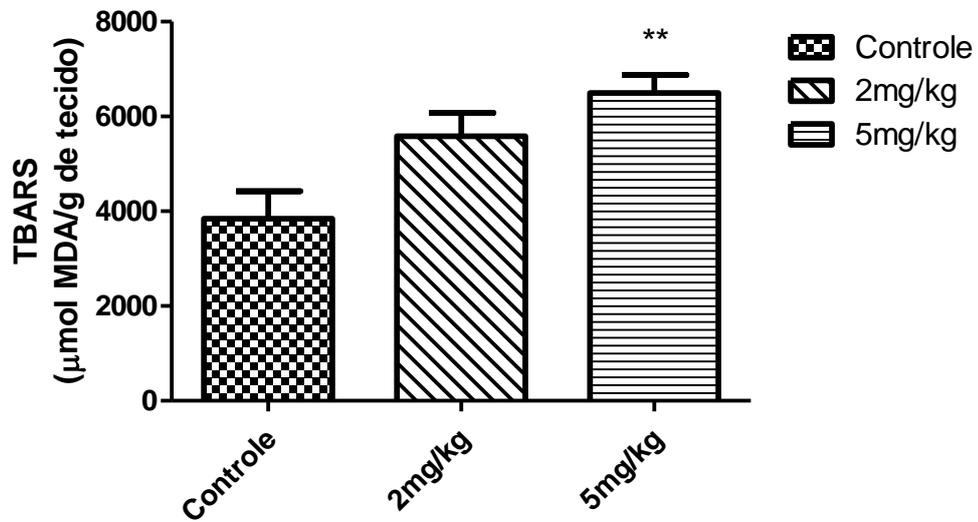
Nas três áreas cerebrais analisadas observou-se o aumento da peroxidação lipídica na dose de 5mg/kg, favorecendo um quadro de estresse oxidativo.

Figura 14 - Teores de MDA (marcador de peroxidação lipídica) no Córtex Pré-frontal de ratos no 30º dia pós-tratamento com LDX (2 e 5 mg/kg).



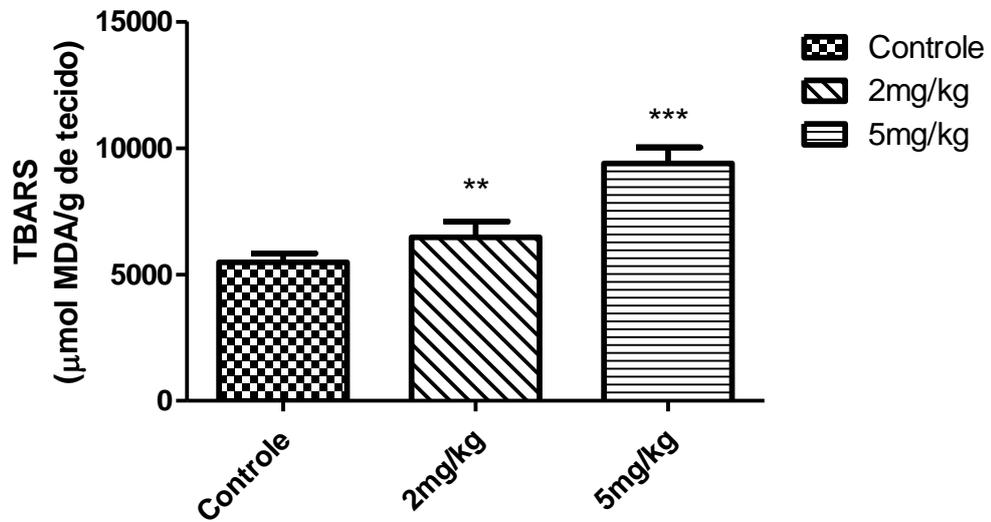
Os valores representam a média \pm EPM (n=8). Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni. Valores significativos comparados ao controle (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Figura 15 - Teores de MDA (marcador de peroxidação lipídica) no Hipocampo de ratos no 30º dia pós-tratamento com LDX (2 e 5 mg/kg).



Os valores representam a média \pm EPM (n=8). Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni. Valores significativos comparados ao controle (**p<0,01).

Figura 16 - Teores de MDA (marcador de peroxidação lipídica) nos Núcleos da Base de ratos no 30º dia pós-tratamento com LDX (2 e 5 mg/kg).



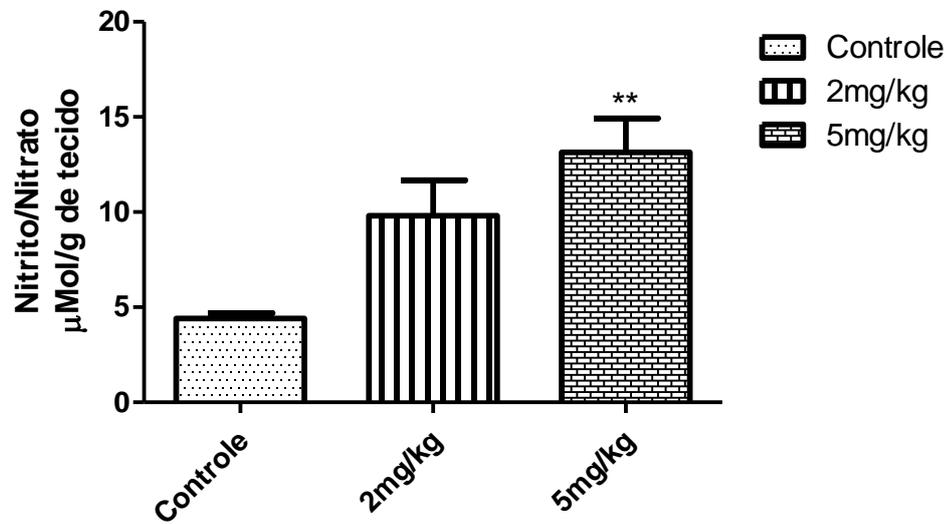
Os valores representam a média \pm EPM (n=8). Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni. Valores significativos comparados com o grupo de maior dose e com o controle, respectivamente (**p<0,01; ***p<0,001).

4.2.2 Efeitos da administração da LDX sobre as concentrações de Nitrito/Nitrato.

Os resultados revelam elevação da concentração de nitrito/nitrato nos Núcleos da Base nas doses de 2mg/kg e 5mg/kg de LDX, respectivamente, com valores significativos para a maior dose (5mg/kg) quando comparada ao grupo controle (controle: $0,044 \pm 0,007$; 2mg/kg: $0,098 \pm 0,045$; 5mg/kg: $0,131 \pm 0,044$, $**p < 0,001$) (Figura 17).

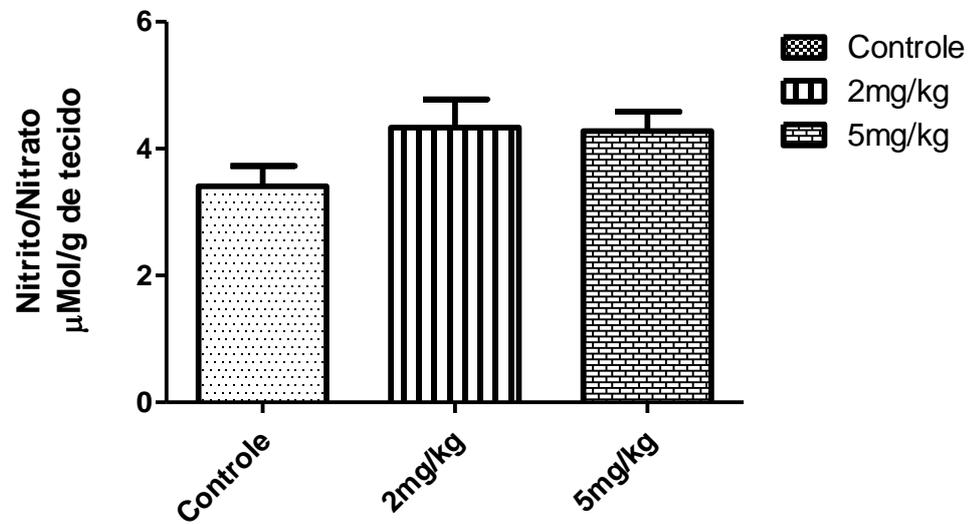
Em Córtex Pré-frontal (Figura 18) e Hipocampo (Figura 19) não houveram alterações significativas quando comparadas ao controle ou entre as doses administradas. Desta forma, observou-se significativa elevação na concentração de nitrito/nitrato apenas nos Núcleos da Base com a dose de 5mg/kg, quando comparada com o grupo controle.

Figura 17 - Efeitos da LDX (2 e 5 mg/kg) no 30º dia pós-tratamento sobre os níveis de Nitrito/Nitrato em Núcleos da Base.



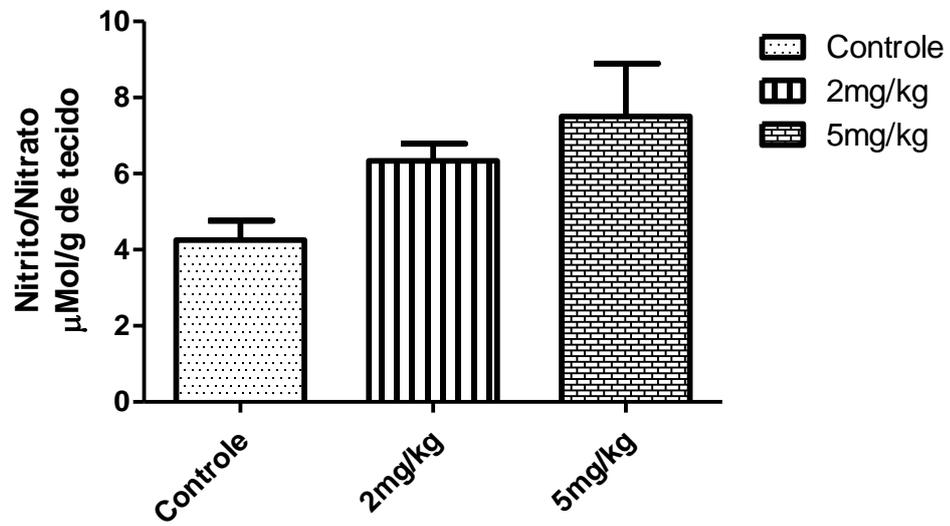
Os valores representam a média \pm EPM (n=6). Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni. Valores significativos comparados ao controle (** $p < 0,01$).

Figura 18 - Efeitos da LDX (2 e 5 mg/kg) no 30º dia pós-tratamento sobre os níveis de Nitrito/Nitrato no Córtex Pré-Frontal.



Os valores representam a média \pm EPM (n=6). Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni.

Figura 19 - Efeitos da LDX (2 e 5 mg/kg) no 30º dia pós-tratamento sobre os níveis de Nitrito/Nitrato no Hipocampo.



Os valores representam a média \pm EPM (n=6). Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni.

4.2.3 Efeitos da administração da LDX sobre os níveis de Glutathiona Reduzida (GSH).

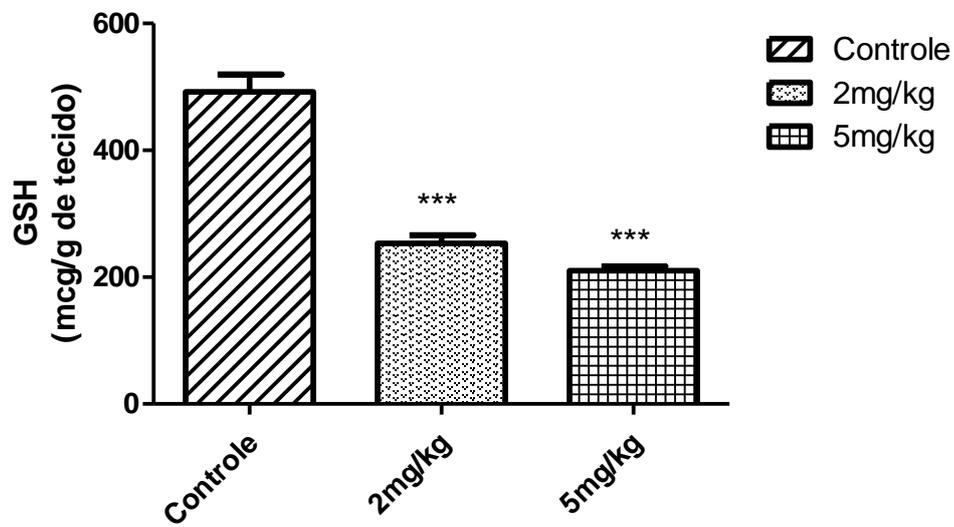
No Córtex Pré-frontal houve um decréscimo nos níveis de GSH de aproximadamente 48,62% e 57,31% nas doses de 2mg/kg e 5mg/kg de LDX, respectivamente, com valores significativos para ambas quando comparadas com o grupo controle (controle: $492,43 \pm 62,21$; 2mg/kg: $253,01 \pm 37,19$, *** $p < 0,001$; 5mg/kg: $210,21 \pm 20,16$, *** $p < 0,001$) (Figura 20).

No Hipocampo, também foi verificado decréscimos nos níveis de GSH. Foi observada diminuição em cerca de 47,09% no grupo tratado com a maior dose de LDX (5 mg/kg) (*** $p < 0,001$) quando comparado com o grupo controle (controle: $454,33 \pm 52,30$; 2mg/kg: $263,38 \pm 54,68$; 5mg/kg: $240,38 \pm 46,87$) (Figura 21).

Por fim, os Núcleos da Base tiveram decréscimos nos níveis de GSH em cerca de 46,12% nos animais tratados com 5 mg/kg de LDX, quando comparado com o grupo controle (controle: $407,55 \pm 55,85$; 2mg/kg: $248,88 \pm 43,03$, *** $p < 0,001$; 5mg/kg: $219,58 \pm 28,97$, *** $p < 0,001$) (Figura 22).

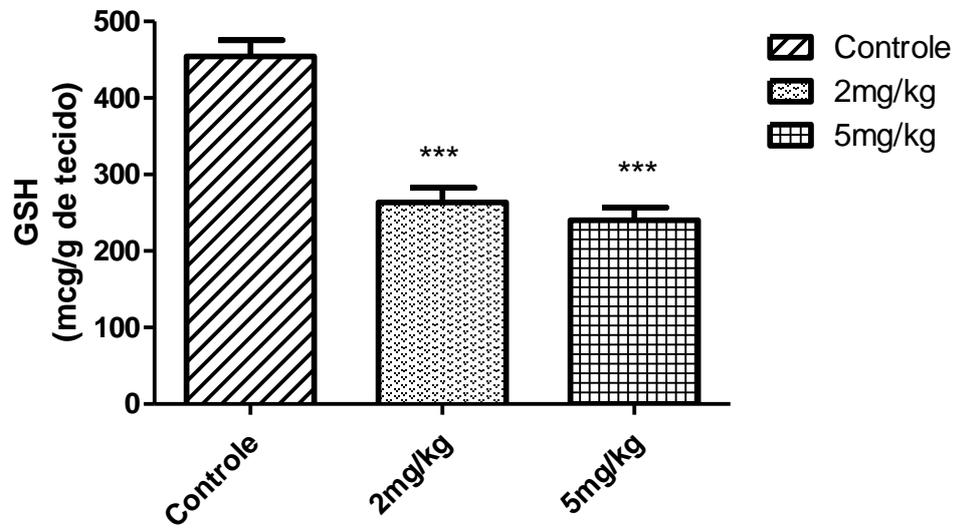
Nas três áreas cerebrais analisadas observou-se um decréscimo significativo nos níveis de GSH na dose de 5mg/kg quando comparado com o controle.

Figura 20 - Efeitos da LDX (2 e 5 mg/kg) no 30º dia pós-tratamento sobre os níveis de Glutathiona Reduzida (GSH) no Córtex Pré-Frontal.



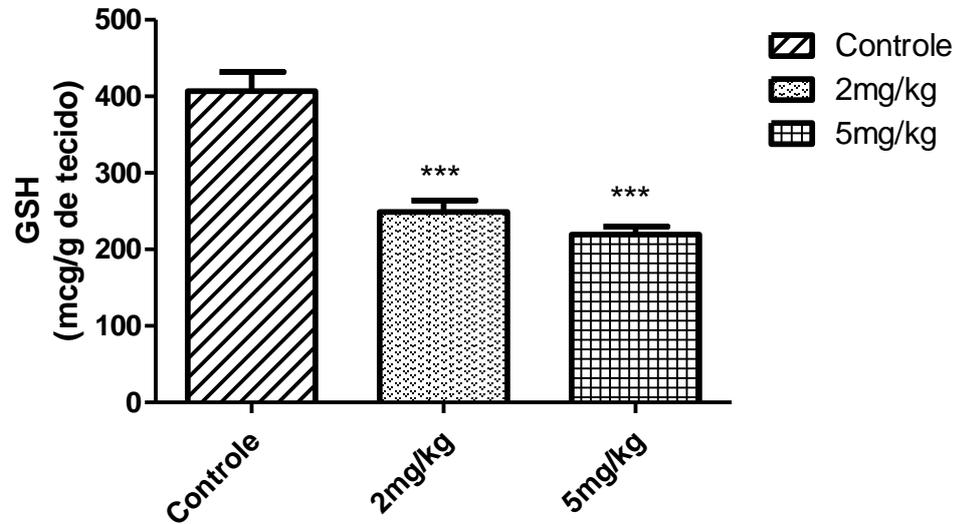
Os valores representam a média \pm EPM (n=8). Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni. Valores significativos comparados ao controle (***) $p < 0,001$.

Figura 21 - Efeitos da LDX (2 e 5 mg/kg) no 30º dia pós-tratamento sobre os níveis de Glutathiona Reduzida (GSH) no Hipocampo.



Os valores representam a média \pm EPM (n=8). Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni. Valores significativos comparados ao controle (**p<0,001).

Figura 22 - Efeitos da LDX (2 e 5 mg/kg) no 30º dia pós-tratamento sobre os níveis de Glutathiona Reduzida (GSH) nos Núcleos da Base.



Os valores representam a média \pm EPM (n=8). Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni. Valores significativos comparados ao controle (***p<0,001).

5 DISCUSSÃO

O presente estudo verificou o efeito da administração da LDX no organismo analisando as mudanças comportamentais em ratos Wistar tratados por via oral, durante 10 dias, utilizando as doses 2 mg e 5mg/kg de LDX equivalentes, segundo os cálculos de extrapolação de dose humanos/animais descritos por Reagan-shaw e colaboradores (2007), às doses mínima e máxima (30mg e 70 mg/dia, respectivamente) recomendadas para o tratamento dos sintomas do TDAH em humanos. Os resultados demonstraram aumento significativo na atividade locomotora e exploratória (número de cruzamentos e rearings) dos animais que receberam a maior dose de LDX.

Estudos realizados por Queiroz (2012) e Eger e colaboradores (2016) corroboram com os achados desta pesquisa, ao verificarem um aumento na frequência locomotora em ratos tratados por via oral com LDX nas doses de 10 e 30mg/kg durante 7 dias. Hutson e colaboradores (2014) realizaram um tratamento com LDX por um período de 60 dias, e também observaram o aumento na atividade locomotora dos animais. Segundo os pesquisadores, estas mudanças comportamentais são condizentes com a ação de estimulantes sobre o organismo.

A repetida administração de D-anfetamina tem sido associada ao comportamento hiperativo em roedores. Este quadro de euforia está relacionado à liberação de dopamina (RIEGEL, *et al.*, 2009). Enquanto o descontrole da atividade dopaminérgica está relacionado à hiperatividade, baixos níveis de dopamina favorecem a desatenção (MADUREIRA, *et al.*, 2007).

As anfetaminas atuam predominante sobre o sistema nervoso central, gerando a liberação de dopamina e outros neurotransmissores, como a serotonina, a noradrenalina, e inibindo a sua recaptção no terminal axônico pré-sináptico. Este mecanismo de ação é responsável por seus efeitos farmacológicos, assim como por sua ação tóxica sobre o organismo (GOODMAN; GILMAN, 2010). Desta forma, a repetida administração de LDX, um derivado anfetamínico, favorece a liberação de dopamina no espaço sináptico e ocasiona, assim como os demais estimulantes,

estimulação locomotora, euforia e excitação, podendo gerar também comportamentos estereotipados (MARCON, *et al.*, 2012).

Os dados obtidos nos testes comportamentais com ratos na idade adulta (60 dias de nascidos) demonstram que os animais tratados com LDX permanecem com atividade locomotora (horizontal e vertical) aumentada quando comparados com o grupo controle, mesmo após 30 dias sem a ingestão do fármaco (Tabela 3). Estes resultados sugerem que as alterações nos níveis de dopamina relacionadas ao aumento da atividade de locomoção nos ratos jovens que receberam o tratamento com LDX durante 10 dias, permanecem atuando sobre o comportamento do animal na fase adulta, mesmo após a interrupção do tratamento.

Além do aumento na atividade comportamental de rearing e números de cruzamentos, que são parâmetros para a avaliação da atividade exploratória vertical e horizontal, respectivamente, os resultados do presente estudo revelam também a elevação na frequência de comportamentos de grooming (auto-limpeza), conforme demonstrado na figura 13. Estudos apontam que a neurotransmissão dopaminérgica também está relacionada à expressão do comportamento de grooming (SERAFIM; FELICIO, 2001).

Os comportamentos de limpeza estão presentes em diversas espécies de animais e, embora possam ser modulados por vários neurotransmissores, a dopamina está particularmente envolvida em sua modulação. Estudos indicam que lesões em regiões ricas em receptores dopaminérgicos podem alterar a expressão do comportamento de limpeza, ou seja, este se encontra sob a influência de fatores endócrinos (SERAFIM; FELICIO, 2001).

Um estudo realizado por Lima (2005) verificou a redução no comportamento de grooming em roedores no teste de campo aberto mediante a redução da dopamina na região do córtex motor, por meio da administração de uma droga ansiolítica. Receptores dopaminérgicos desempenham, portanto, um importante papel em funções motoras como locomoção, rearing, catalepsia, sniffing e grooming em roedores. Agonistas favorecem o aumento da função dopaminérgica, aumentando a atividade motora, como o agonista do receptor D1, SKF-38393, que

aumenta o grooming e o sniffing em ratos, enquanto antagonistas desempenham efeito oposto (JACKSON; WESTLIND-DANIELSSON, 1994; LIMA, 2005).

A administração repetida de LDX é responsável, além da indução da atividade locomotora, pelo aumento do dano oxidativo lipídico e protéico em áreas cerebrais (RIEGEL, 2009). Queiróz (2012) verificou o teor de MDA (principal espécie reativa ao ácido tiobarbitúrico) nas áreas do cérebro (CPF, HC, CE) estudadas em sua pesquisa, e encontrou um aumento significativo da peroxidação lipídica nos grupos tratados com LDX quando comparados com o grupo controle. Os incrementos na peroxidação lipídica (fator pró-oxidante) e decréscimos nos níveis de GSH (fator anti-oxidante) obtidos nos testes neuroquímicos, segundo a pesquisadora, ocasionaram um desequilíbrio oxidativo intimamente relacionado à presença da dopamina.

Os dados obtidos no presente estudo corroboram com os estudos acima citados. A administração de LDX provocou um aumento na peroxidação lipídica no córtex pré-frontal, hipocampo e núcleos da base nos grupos tratados com a maior dose de LDX (5mg/kg). Segundo Zuluaga e colaboradores (2016), o MDA é resultante da peroxidação lipídica da membrana celular por radicais livres, sendo considerado como um biomarcador de estresse oxidativo primário.

A dopamina é um neurotransmissor de extrema importância para o bom funcionamento das funções cognitivas e motoras do cérebro e para a regulação do humor (GAINETDINOV; BEAULIEU, 2011). A elevação patológica na neurotransmissão da dopamina está associada ao excesso de formação de espécies reativas ao oxigênio, podendo ocasionar a disfunção celular, o estresse oxidativo e a apoptose (BERK, *et al.*, 2011).

Ao estudar o efeito da administração de LDX em ratos, Eger e colaboradores (2016) também estabeleceram umnexo causal entre a peroxidação lipídica resultante do tratamento com LDX e o metabolismo da dopamina. Com o aumento da dopamina extracelular, sua oxidação poderia produzir superóxidos e peróxidos de hidrogênio, com potencial para formar radicais de hidroxila na presença de alguns metais.

Além das espécies reativas do oxigênio (EROs), espécies reativas do nitrogênio (ERNs) também possuem ação neurotóxica sobre o SNC em doses alteradas, sendo responsáveis pela indução de apoptose das células neuronais, o que favorece o estresse oxidativo e o aparecimento de quadros patológicos (MAITI; ILAVAZHAGAN, 2010). A análise das concentrações de nitrito/nitrato no presente estudo revelou a presença de óxido nítrico (NO•) na região dos núcleos da base nos ratos expostos a maior dose de LDX, tornando as células neuronais desta região suscetíveis a danos estruturais e funcionais.

O GSH é um importante agente antioxidante produzido pelas células animais, sendo encontrado em sua forma oxidada (GSSG) ou reduzida (GSH) (POMPELLA *et al*, 2003). Sua principal função é a manutenção dos fatores pró-oxidantes em limites que asseguram o bem-estar fisiológico e que são passíveis de regulação, inibindo o excesso em sua produção e consequentes danos sistêmicos irreparáveis (BARBOSA *et al*, 2010; COLARES *et al.*, 2016). Reduções em seu conteúdo podem ocorrer em situações de infecções e algumas doenças, como Alzheimer e Parkinson, nas quais enzimas antioxidantes respondem ao persistente aumento do estresse oxidativo com o aumento compensatório de sua atividade. A análise das concentrações de GSH em córtex pré-frontal, hipocampo e núcleos da base do grupo tratado com 5 mg/kg de LDX apontou diminuição em seu teor, corroborando com os achados de Queiroz (2012) e Eger (2016).

O aumento desordenado de RLs, EROs e ERNs, aliado à diminuição na produção e eficácia das defesas antioxidantes, provocam um grave desequilíbrio no organismo, levando a ocorrência do estresse oxidativo (COLARES *et al*, 2016; EGER, 2016). Assim, o aumento dos níveis de MDA e nitrito/nitrato e o decréscimo no GSH encontrados nas áreas cerebrais dos grupos expostos às doses de 2mg/kg e 5mg/kg de LDX no presente estudo, favorecem o desequilíbrio entre a atuação dos fatores pró-oxidantes e antioxidantes em favor do primeiro, sinalizando a ocorrência de estresse oxidativo e potencial dano às estruturas e ao bom funcionamento do cérebro.

A literatura tem demonstrado estreita correlação entre o estresse oxidativo e danos celulares envolvidos nos mecanismos fisiopatológicos de várias doenças. Estudos apontam que diversos transtornos mentais, como a esquizofrenia

e a mania, estão associados à alteração na neurotransmissão da dopamina, e ao excesso de produção de espécies reativas (BERK, 2009). Evidências científicas também sugerem que doenças neurodegenerativas e crônicas como as doenças cardiovasculares, a obesidade e a diabetes mellitus tipo 2 estão relacionadas ao estresse oxidativo, condição favorável à ocorrência da síndrome metabólica e suas manifestações, como a aterosclerose, a hipertensão e a obesidade (GOTTLIEB *et al.*, 2010).

A alta prevalência do transtorno entre a população infantil implica uma urgência por tratamentos farmacológicos seguros que garantam a integridade do sistema nervoso, visto que este se encontra em constante desenvolvimento. Após o nascimento, o cérebro continua a crescer em tamanho e a desenvolver a funcionalidade específica de cada uma de suas áreas, até a fase adulta. Sua estrutura nervosa não é fixa ou impermeável, mas encontra-se suscetível às influências do ambiente. O saudável desenvolvimento cerebral é, portanto, essencial para o desenvolvimento pleno dos aspectos físicos, cognitivos e emocionais do ser humano (CHAPMAN *et al.*, 2003).

Os dados deste estudo possuem grande relevância ao apontar a existência de alterações na atividade comportamental, na peroxidação lipídica, nos níveis de nitrito/nitrato e GSH em ratos tratados com LDX em períodos posteriores ao consumo da droga (30 dias após o término do tratamento), sugerindo que tratamentos farmacológicos realizados durante a infância e a adolescência podem gerar repercussões na idade adulta de seus usuários. Estudos desta natureza são escassos e de grande importância para assegurar a eficácia e segurança dos tratamentos farmacológicos utilizados, especialmente em crianças e adolescentes.

Embora os mecanismos de atuação da LDX e os efeitos de sua utilização sobre o organismo em desenvolvimento ainda não estejam plenamente elucidados, estudos demonstram efeitos duradouros do MFD sobre o desenvolvimento do sistema dopaminérgico em ratos após a exposição durante o período pós-natal. Em um estudo realizado por Scherer (2010), ratos jovens com 25 dias de nascidos foram submetidos à administração aguda de MFD e apresentaram alterações no metabolismo energético cerebral, com estimulação da produção de ATP e aumento na atividade da enzima $\text{Na}^+, \text{K}^+, \text{-ATPase}$ intrinsecamente relacionados ao aumento da

dopamina e noradrenalina nas fendas sinápticas, A administração crônica de MFD prejudicou a aprendizagem, a memória de trabalho e diminuiu os níveis de BDNF em ratos com 15 dias de nascidos. Estas alterações no SNC confirmam o papel modulador de psicoestimulantes sobre o sistema dopaminérgico e a participação do MFD na promoção de alterações cerebrais importantes no processo de maturação e desenvolvimento do SNC.

Apesar da incerta definição fisiopatológica do TDAH, estudos comprovam a existência de anormalidades no sistema de sinalização catecolaminérgica, envolvendo a liberação da dopamina nas áreas do lobo frontal e no sistema límbico. Uma possível etiologia do TDAH estaria na hipofunção dopaminérgica da região fronto-estriatal do cérebro. O lobo frontal e, de maneira mais específica, o córtex pré-frontal exercem um importante papel no controle atencional e em processos regulatórios, como o controle inibitório. Já a região estriatal está relacionada às atividades motoras e, conseqüentemente, ao comportamento hiperativo. Assim, as características clínicas do TDAH estariam diretamente relacionadas às áreas cerebrais envolvidas em sua possível etiologia. No entanto, há pacientes que não respondem aos estimulantes convencionais, sugerindo causalidades diferentes à hipofunção dopaminérgica (NIEHAUS *et al.*, 2010; CONTINI *et al.*, 2013; JABOINSKI *et al.*, 2015).

Ao apontar aumentos nos índices de MDA e decréscimos nos valores de GSH nas três áreas cerebrais analisadas (córtex pré-frontal, hipocampo e núcleos da base), assim como a significativa elevação da concentração de nitrito/nitrato nos núcleos da base no grupo experimental tratados com a maior dose de LDX (5mg/kg), o estudo revela que estruturas cerebrais relacionadas à sintomatologia do TDAH estão potencialmente vulneráveis a ação do estresse oxidativo, tornando-se suscetíveis à degradações na membrana, disfunção celular e apoptose (EGER, 2016). Esta ação potencialmente danosa da LDX não afetou o organismo apenas durante a infância, período em que ocorreu a administração da droga, mas permaneceu durante a fase adulta dos animais em estudo, alterando parâmetros neuroquímicos importantes para o bom funcionamento do SNC, promovendo o estresse oxidativo.

Como já citado anteriormente, as alterações do controle inibitório, da memória, da atenção e demais funções executivas características do TDAH são frutos de alterações no bom funcionamento de áreas específicas do cérebro, como o córtex pré-frontal e parietal, os gânglios da base e circuitos associados (GONÇALVES, 2013). Assim, o estudo sugere que estas áreas cerebrais também estão suscetíveis aos efeitos deletérios advindos da utilização da LDX, podendo ocasionar ou agravar danos ao seu funcionamento. Estes danos podem perdurar e repercutir na fase adulta, mesmo depois de vários dias sem tratamento, como nos mostram os resultados dos testes neuroquímicos, que revelam alterações em parâmetros de grande participação no estresse oxidativo em período posterior ao término do tratamento com LDX. .

Evidências demonstram que repetidas injeções de anfetaminas são responsáveis pelo aumento do comportamento hiperativo em ratos e pela elevação de danos oxidativos lipídicos e protéicos em áreas do cérebro como o córtex pré-frontal, o hipocampo e o corpo estriado (RIEGEL ET AL. 2009).

De maneira geral, os resultados dos estudos comportamentais e neuroquímicos revelam alterações na atividade locomotora e aumento nos níveis de dopamina e do estresse oxidativo em regiões cerebrais de grande participação na etiologia do transtorno, levantando questionamentos sobre a real eficácia do tratamento com LDX a longo prazo, especialmente ao considerar que um grande público usuário da droga encontra-se em fase de desenvolvimento e maturação do SNC. Como citado anteriormente, a indução de persistentes alterações catecolaminérgicas durante o período de desenvolvimento do organismo podem afetar os processos de sinaptogênese, gliogênese e mielinização, assim como altas concentrações de estresse oxidativo estão relacionadas à doenças neurodegenerativas, crônicas (doenças cardiovasculares, obesidade), e síndromes metabólicas.

6 CONCLUSÃO

✓ O tratamento com Lisdexanfetamina provocou mudanças comportamentais em ratos Wistar machos aumentando a atividade locomotora do animal, expressa pelo número de cruzamentos, rearings e groomings.

✓ As alterações comportamentais decorrentes do tratamento com Lisdexanfetamina mantiveram-se após 30 dias do término do tratamento, com valores de rearing, grooming e cruzamentos significativamente maiores quando comparados ao grupo controle.

✓ O tratamento com Lisdexanfetamina provocou elevação nos teores de MDA e diminuição nos níveis de GSH nas três áreas cerebrais estudadas e aumento nos níveis de nitrito/nitrato nos núcleos da base de ratos wistar após 30 dias do término do tratamento com LDX, gerando um quadro de desequilíbrio entre as forças pró-oxidantes e antioxidantes.

O tratamento com Lisdexanfetamina durante o 21º e o 30º dia de nascido de ratos Wistar machos gerou repercussões comportamentais e neuroquímicas na fase adulta do animal (aos 60 dias de nascido), favorecendo um quadro de estresse oxidativo. Estas alterações sugerem interferências nos processos de maturação e desenvolvimento do SNC, com potencial dano estrutural e funcional do córtex pré-frontal, hipocampo e núcleos da base.

REFERÊNCIAS

- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition (DSM-V)**. Arlington, VA: American Psychiatric Association, 2013
- BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. **Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios**. Rev. Nutr., Campinas, 23(4):629-643, jul./ago., 2010.
- BARKLEY, R. A., ANASTOPOULOS, A. D., ROBIN, A. L., LOVETT, B. J., *et al.* **Transtorno de déficit de atenção/hiperatividade: manual para diagnóstico e tratamento (3º ed.)**. Porto Alegre: Artmed, 2008.
- BARREIROS, A. L. B. S., DAVID, J. M. **Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo**. Quim. Nova, Vol. 29, No. 1, 113-123, 2006.
- BERK, M. **Neuroprogression: pathways to progressive brain changes in bipolar disorder**. Int J Neuropsychopharmacol 12:441-445, 2009.
- BERK, M.; KAPCZINSKI, F.; ANDREAZZA, A. C.; DEAN, O. M.; GIORLANDO, F.; MAES, M.; YUCEL, M.; GAMA, C. S.; DODD, S.; DEAN, B.; MAGALHÃES, P. V.; AMMINGER, P.; MCGORRY, P.; MALHI, G. S. **Pathways underlying neuroprogression in bipolar disorder: focus on inflammation, oxidative stress and neurotrophic factors**. Neurosci Biobehav Rev 35:804-817, 2011.
- BOELLNER, S. W.; STARK J.G.; KRISHNAN, S.; ZHANG, Y. **Pharmacokinetics of lisdexamfetamine dimesylate and its active metabolite, d-amphetamine, with increasing oral doses of lisdexamfetamine dimesylate in children with attention-deficit/hyperactivity disorder: a single-dose, randomized, open-label, crossover study**. Clin Ther, 2010 Feb;32(2):252-64.
- CALIMAN, L. V.; DOMITROVIC, N.; **Uma análise da dispensa pública do metilfenidato no Brasil: o caso do Espírito Santo**. Physis Revista de Saúde Coletiva, Rio de Janeiro, 23 [3]: 879-902, 2013.
- CASTELLANOS, F. X., PROAL, E. **Large-scale brain systems in ADHD: Beyond the prefrontal–striatal model**. Trends in Cognitive Sciences, 16(1), 17-26, 2012.
- CHAPMAN, S. B.; MAX, J. E.; GAMINO, J. F.; MCGLOTINH, J. H.; CLIFF, S. N. **Discourse plasticity in children after stroke: Age at injury and lesion effects**. Pediatric Neurology, 29(1), 34-41, 2003.
- CHASE, T.D.; BROWN, R.E.; CARREY, N.; WILKINSON, M. **Daily methylphenidate administration attenuates c-fos expression in the striatum of prepubertal rats**. Neuroreport, v. 15, p. 769-772, 2003.

COLARES, J. R., SCHEMITT, E. G., HARTMANN, R. M., MOURA, R. M., MORGAN-MARTINS, M. I., FILLMANN, H. S., FILLMANN, L., MARRONI, P. **Effect of lecithin on oxidative stress in an experimental model of rats colitis induced by acetic acid.** J. Coloproctol, Rio Janeiro. vol.36 no.2 Apr./June 2016

CONTINI V., ROVARIS D. L., VICTOR M. M., GREVET E. H., ROHDE L. A., BAU C. H. **Pharmacogenetics of response to methylphenidate in adult patients with Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD): a systematic review.** Eur Neuropsychopharmacol, 2013.

EGER, G. A.; FERREIRA, V. V.; BATISTA, C. R.; BONDE, H.; DE LIMA, D. D.; WYSE, A. T.; S.; DA CRUZ, J. B.; RODRIGUES, A. F.; DAL MAGRO, D. D.; DA CRUZ, J. G. P. **Antioxidant effect of simvastatin through oxidative imbalance caused by lisdexamfetamine dimesylate.** Anais da Academia Brasileira de Ciências, 2016.

FAGUNDES, A. O. N. **Efeito da administração de metilfenidato sobre a cadeia respiratória mitocondrial em cérebro de ratos jovens.** Criciúma: Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, CDD. 21^a ed, 2007.

FARAONE, S.V.; BIEDERMAN, J. **Neurobiology of attention deficit hyperactivity disorder.** Biol Psychiatry. 44:951-958, 1998

GAINETDINOV, R. R.; BEAULIEU, J.M. **The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors.** Pharmacol rev. 2011.

GANDRA, P. G.; MACEDO, D. V.; ALVES, A. A. **Fontes de espécies reativas de oxigênio na musculatura esquelética durante o exercício.** Rev. Bras de Bioquímica e Biologia Molecular, 2006.

GONÇALVES, H. A.; MOHR, R. M., MORAES, A.L.; SIQUEIRA1, L. S.; PRANDO, M. L. FONSECA. R. P.; **Componentes atencionais e de funções executivas em meninos com TDAH: dados de uma bateria neuropsicológica flexível;** J Bras Psiquiatria, 62(1):13-21, 2013.

GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica.** Rio de Janeiro: McGrawHill, 2010.

GOTTLIEB, M. G. V.; DA CRUZ, I. B. M.; SCHWANKE, C. H. A.; BODANESE, L. C. **Estresse oxidativo como fator de risco cardiometabólico emergente.** Scientia Médica. Porto Alegre, volume 20, número 3, p. 243-249, 2010.

HUMPHREYS KL, ENG T, LEE SS. **Stimulant medication and substance use outcomes: a meta-analysis.** JAMA Psychiatry;70:740-9, 2013.

HUTSON P. H.; PENNICK, M.; SECKER, R. **Preclinical pharmacokinetics, pharmacology and toxicology of lisdexamfetamine: a novel d-amphetamine pro-drug.** Neuropharmacology. Dec;87:41-50, 2014.

ITABORAHY C., ORTEGA F. **O metilfenidato no Brasil: uma década de publicações.** Ciência & Saúde Coletiva, 18(3):803-816, 2013

JABOINSKI, J.; CABRAL, J. C. C.; CAMPOS, R.; BARROS, D. M. **Exposure to methylphenidate during infancy and adolescence in non-human animals and sensitization to abuse of psychostimulants later in life: a systematic review.** Trends Psychiatry Psychother. vol.37. Porto Alegre, 2015.

JACKSON, D. M.; WESTLIND-DANIELSSON, A. Dopamine receptors: molecular biology, biochemistry and behavioural aspects. Pharmacol. Ther., v. 64, p. 291-370, 1994

KABBAJ, M.; DEVINE, D. P.; SAVAGE, V. R.; AKIL, H. **Neurobiological correlates of individual differences in novelty-seeking behavior in the rat: differential expression of stress-related molecules.** J. Neurosci 2000; 20:6983-8

KATUSIC, S.F.; BARBARESI, W.; COLLING, R.C.; WEAVER, A.L.; MRAZEK, D.A; JACOBSEN, S.J.; **The impact of psychostimulant treatment on drug/alcohol abuse among children with ADHD.** J. Dev. Behav. Pediatr. 24: 396-397, 2003.

KEREKES N, BRANDSTROM S, LUNDSTROM S, RASTAM M, NILSSON T, ANCKARSATER H. **ADHD, autism spectrum disorder, temperament, and character: phenotypical associations and etiology in a Swedish childhood twin study.** Comprehensive Psychiatry,54(8):1140–7., 2013.

LECENDREUX, M.; KONOFAL, E.; FARAONE, S. V. **Prevalence of attention deficit hyperactivity disorder and associated features among children in France.** J Atten Disord. Aug;15(6):516-24, 2011.

LIMA, V. T. M. **Avaliação dos efeitos centrais da iangambina isolada de Ocotea duckei Vattimo: estudo comportamental e neuroquímico em córtex motor e corpo estriado de camundongo.** Tese de Doutorado em Farmacologia. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2005.

LOUZÃ, M.; MATTOS, P. **Questões atuais no tratamento farmacológico do TDAH em adultos com metilfenidato.** J. bras. psiquiatr. vol.56 suppl.1 Rio de Janeiro 2007.

MAITI P, SINGH SB, ILVAZHAGAN G. **Nitric oxide system is involved in hypobaric hypoxia-induced oxidative stress in rat brain.** Acta Histochemica 2010.

MARCON, C.; SILVA, L. A. M.; MORAES, C. M. B.; MARTINS, J. S.; CARPES, A. D. **Uso de anfetaminas e substâncias relacionadas na sociedade contemporânea.** Disciplinarum Scientia. Série: Ciências da Saúde, Santa Maria, v. 13, n. 2, p. 247-263, 2012.

MADUREIRA, D. Q.M.; DE CARVALHO, L. A. V.; CHENIAUX, E. **Modelagem neurocomputacional do circuito tálamo-cortical.** Arq Neuropsiquiatria;65(4-A):1043-1049, 2007.

MAGLIARO BC, SALDANHA CJ. **Clozapine protects PC-12 cells from death due to oxidative stress induced by hydrogen peroxide via a cell-type**

specific mechanism involving inhibition of extracellular signal-regulated kinase phosphorylation. Brain Research ;1283:14-24, 2009.

MATTOS, P. **Lisdexamfetamedimesylate in the treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder: pharmacokinetics, efficacy and safety in children and adolescents.** Rev. psiquiatr. clín. vol.41 no.2 São Paulo Mar./Apr. 2014

MATTOS, P.; ROHDE L. A.; POLANCZYK, G.V. **O TDAH é subtratado no Brasil.** Rev. Bras. Psiquiatr. vol.34 no.4 São Paulo Dec. 2012

NIEHAUS J. L., MURALI M., KAUER J. A. **Drugs of abuse and stress impair LTP at inhibitory synapses in the ventral tegmental area.** Eur J Neurosci, 32:108-17, 2010.

POLI NETO, P., CAPONI, S. N. C. **A Medicalização da Beleza.** Interface, **11(23), 569-584. 2007.**

QUEIROZ. A.I.G. **Efeitos do Dimesilato de Lisdexanfetamina em ratos: relevância como modelo animal do episódio de mania.** Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012. 82 f: il.

REAGAN-SHAW, S.; NIHAL, M.; AHMAD, N. **Dose translation from animal to human studies Revisited.** The FASEB Journal, Vol. 22, 2007.

REINHARDT, M. C.; REINHARDT, C. A. U. **Attention deficit-hyperactivity disorder, comorbidities, and risk situations.** J Pediatr (Rio J), 89:124-30, 2013.

RIEGEL, R. E.; VALVASSORI, S. S.; ELIAS, G.; REUS, G. Z.; STECKERT, A. V.; DE SOUZA, B.; PETRONILHO, F.; GAVIOLI, E.C.; DAL-PIZZOL, F.; QUEVEDO, J. **Animal model of mania induced by ouabain: Evidence of oxidative stress in submitochondrial particles of the rat brain.** Neurochem Int. 55: 491-495, 2009.

ROWLEY, H. L.; KULKARNI, R.; GOSDEN J.; BRAMMER, R.; HACKETT, D.; HEAL, D. J. **Lisdexamfetamine and immediate release d-amphetamine - differences in pharmacokinetic/pharmacodynamic relationships revealed by striatal microdialysis in freely-moving rats with simultaneous determination of plasma drug concentrations and locomotor activity.** Neuropharmacology. 2012

SAMSON, A. L.; JU, L.; KIM, H. A.; ZHANG, S. R.; LEE, J. A. A.; STURGEON, S. A.; SOBEY, C. G.; JACKSON, S. P.; SCHOENWAELDER, S. M. **MouseMove: an open source program for semi-automated analysis of movement and cognitive testing in rodents.** *Scientific Reports* 5, Article number: 16171 (2015) doi: 10.1038/srep16171

SCHERER, E; B; S; **Metilfenidato causa alterações neuroquímicas e comportamentais em ratos.** Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2010.

SERAFIM, A. P.; FELICIO, L F. **Reproductive experience influences grooming behavior during pregnancy in rats.** Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 2001. 34: 1465-1470

TATEM, K. S.; QUINN, J. L.; PHADKE. A.; YU, Q.; GORDISH-DRESSMAN, H.; NAGARAJU, K. Behavioral and Locomotor Measurements Using an Open Field Activity Monitoring System for Skeletal Muscle Diseases. Journal of Visualized Experiments, September 2014 | 91 | e51785 | Page 1 of 7

VELÉZ, A. Z.; ARIAS, D. G. **Una mirada al estrés oxidativo en la célula.** Revista médica Risaralda vol.18 no.2 Pereira July/Dec. 2012

VINCENT HK, INNES KE, VINCENT KR. **Oxidative stress and potential interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity.** Diabetes Obes. Metab. 2007; 9(6):813-39

WALI, B., ISHRAT, T., WON, S., STEIN, D. G.; SAYEED, I. **Progesterone in experimental permanent stroke: a dose-response and therapeutic time-window study.** *Brain* **137**, 486–502, doi: 10.1093/brain/awt319 (2014).

ZULUAGA, A. M.; SILVEIRA, G.; MARTÍNEZ, J. R. **Nitric oxide and malondialdehyde in gastric contents and blood in an equine model of gastric ulcer induced by phenylbutazone.** Rev Colom Cienc Pecua vol.29 no.1 Medellín Jan./Mar. 2016

APÊNDICE A - CÁLCULO DA DOSE DE VENVANSE A SER ADMINISTRADA A RATOS WISTAR

CÁLCULO DA DOSE DE VENVANSE A SER ADMINISTRADA A RATOS WISTAR EM VALORES PROPORCIONAIS À CONCENTRAÇÃO ADMINISTRADA EM HUMANOS

Dose mais baixa: 30 mg/dia para um indivíduo de 60kg.

$$\begin{array}{l} 30 \text{ mg} \text{ ----- } 60 \text{ kg} \\ X \text{ ----- } 1 \text{ kg} \end{array} \quad x = 0,5 \text{ mg/kg em humano}$$

Convertendo para rato (REAGAN-SHAW *et al.*, 2007):

$$\text{Dose em humano (mg/kg)} = \text{Dose animal} \times \frac{\text{Km animal}}{\text{Km Humano}} \quad \begin{array}{l} \text{Km animal} = 6 \\ \text{Km humano criança} = 25 \end{array}$$

$$0,5 = X \times \frac{6}{25} \quad X = 25 \times \frac{0,5}{6} \quad \boxed{X = 2 \text{ mg/kg (equivale a 1,15 mg de D-ANF base)}}$$

Dose mais alta: 70 mg/dia para um indivíduo de 60kg.

$$\begin{array}{l} 70 \text{ mg} \text{ ----- } 60 \text{ kg} \\ X \text{ ----- } 1 \text{ kg} \end{array} \quad x = 1,16 \text{ mg/kg em humano}$$

Convertendo para rato (REAGAN-SHAW *et al.*, 2007):

$$\text{Dose em humano (mg/kg)} = \text{Dose animal} \times \frac{\text{Km animal}}{\text{Km Humano}} \quad \begin{array}{l} \text{Km animal} = 6 \\ \text{Km humano criança} = 25 \end{array}$$

$$1,16 = X \times \frac{6}{25} \quad X = 25 \times \frac{1,16}{6} \quad \boxed{X = 5 \text{ mg/kg (equivale a 3,39 mg de D-ANF base)}}$$