



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

MARIANA LIMA FEITOSA

**ESTUDO DO CLORIDRATO DE BENZIDAMINA: EFEITOS
COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICOS EM CAMUNDONGOS E
POSSÍVEIS EFEITOS CITOTÓXICOS EM CULTURA DE CÉLULAS DE
ASTRÓCITOS.**

FORTALEZA-CE

2016

MARIANA LIMA FEITOSA

ESTUDO DO CLORIDRATO DE BENZIDAMINA: EFEITOS COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICOS EM CAMUNDONGOS E POSSÍVEIS EFEITOS CITOTÓXICOS EM CULTURA DE CÉLULAS DE ASTRÓCITOS.

Tese apresentada à Coordenação do programa de Pós-graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará para a obtenção do título de Doutora em Farmacologia.

Orientadora:

Profa. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa

FORTALEZA-CE

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)

F336e Feitosa, Mariana Lima.

Estudo do cloridrato de benzidamina: efeitos comportamentais e neuroquímicos em camundongos e possíveis efeitos citotóxicos em cultura de células de astrócitos. / Mariana Lima Feitosa. – 2016.

131 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2016.

Orientação: Profa. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa.

1. Benzidamina. 2. Monoaminas. 3. Citotoxicidade. 4. Apoptose. I. Título.

CDD 615.1

MARIANA LIMA FEITOSA

ESTUDO DO CLORIDRATO DE BENZIDAMINA: EFEITOS COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICOS EM CAMUNDONGOS E POSSÍVEIS EFEITOS CITOTÓXICOS EM CULTURA DE CÉLULAS DE ASTRÓCITOS.

Tese apresentada a Coordenação do Programa de Pós-graduação em Farmacologia para a obtenção do título de Doutora em Farmacologia.

Aprovada em / / .

BANCA EXAMINADORA

**Prof^a. Dr^a. Francisca Cléa Florenço de Sousa - Orientadora
Universidade Federal do Ceará – UFC Fortaleza**

**Prof^a. Dr^a. Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar
Universidade Federal do Ceará- UFC Sobral**

**Prof. Dr. Daniel Freire de Sousa
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-brasileira –
UNILAB Redenção**

**Prof. Dra. Carla Thiciane Vasconcelos de Melo
Universidade Federal do Ceará - UFC Sobral**

**Prof. Dr. Emiliano Ricardo Vasconcelos Rios
Faculdade Metropolitana da Grande Fortaleza – FAMETRO Fortaleza**

**Este trabalho é dedicado a Deus,
que me deu forças para sempre
seguir em frente e família e amigos
para nunca me faltar amor.**

**“Quando se ama tudo é alegria, a
cruz não pesa, o martírio não se
sente, vive-se mais no Céu que na
Terra.”**

Santa Teresa dos Andes

AGRADECIMENTOS

Me considero uma pessoa de algumas qualidades e de MUITOS defeitos. Não tenho nada a oferecer aos outros além da minha humilde amizade e ajuda sem interesse, sempre que precisarem. Agradeço a Deus por sempre colocar na minha vida pessoas que me ajudam a crescer, me fazendo sempre querer ser mais do que sou, pessoas que vêem minhas qualidades acima dos meus muitos defeitos. A vocês, anjos que Deus me envia todos os dias para que minha vida seja sempre leve como uma pluma, meu muitíssimo obrigada!!!

À minha família (Ana Rosa, João Batista, Ana Márcia e Ana Cláudia), por me darem toda força psicológica necessária para seguir em frente e nunca desistir. Fizeram de tudo que puderam para eu estar aqui hoje!

Ao meu marido, Janio Emanuel, por ter abdicado do conforto da nossa casa e de muitos passeios para estar ao meu lado me dando todo apoio que eu tanto precisava!

À razão da minha vida, presente que Deus me enviou para me fazer melhor, me mostrar tudo de bom que posso ser, minha filha amada, meu anjinho, minha Ana Cecília.

À minha orientadora, profa. Cléa, por ter aberto as portas para esse mundo maravilhoso da pesquisa, mundo que quero seguir para sempre. Obrigada por toda ajuda dedicada a mim!!

À minha amiga Edith, amiga de todas as horas, por, mesmo de longe, sempre estar presente! Você mora no meu coração para todo o sempre, amiga!

Às minhas outras amigas, presentes que Deus me deu no momento mais difícil do meu doutorado, Roberta e Ayane. Como sou grata pela amizade de vocês! Vocês moram no meu coração!!

À Profa. Danielle, por sempre ser uma luz na vida dos estudantes. Apenas uma conversa com a senhora fazia a nossa tão difícil pesquisa parecer bem mais simples. Obrigada pelas conversas de corredor que eu sempre perturbava a senhora e a senhora sempre com muita paciência me ouvia e sempre me ajudava!

Aos meus queridos amigos Daniel, Thiago, Tatiane, Isabelle, Germana, Naiara, Manel, Caren, Adriano, Alana, Klistenes, Camila Nayane, Greicy, Pedro, Dayane, Ludmila, Valdécio, Jales e todos os outros. O dia com vocês é sempre mais alegre! Obrigada!!

À Vilani e Lena, muito obrigada por toda a ajuda e pelos dias de muitas risadas no laboratório!

A todos que aqui não descrevi, pois são muitos que fazem parte dessa história! Meu muito obrigada!!!

RESUMO

ESTUDO DO CLORIDRATO DE BENZIDAMINA: EFEITOS COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICOS EM CAMUNDONGOS E POSSÍVEIS EFEITOS CITOTÓXICOS EM CULTURA DE CÉLULAS DE ASTRÓCITOS.

O cloridrato de benzidamina (BEN) trata-se um anti-inflamatório não esteroidal comercialmente vendido em muitos países e que tem propriedades anestésicas locais e para o alívio da dor. Altas doses de BEN administradas de forma aguda podem causar efeitos psicoestimulantes. O objetivo do presente estudo foi Investigar os efeitos psicoestimulantes em camundongos e citotóxicos em cultura de astrócitos do BEN. Para os testes comportamentais (campo aberto, inibição pré-pulso, labirinto em Y, reconhecimento de objetos, interação social e *rota rod*) e para a dosagem de monoaminas, foram utilizados um protocolo de tratamento agudo e um de dose repetida por sete dias com as doses de 50, 100 e 200 mg/kg do BEN por via oral. Para a dosagem de BDNF, utilizou-se apenas o protocolo de administração de dose repetida. O estudo de citotoxicidade iniciou-se com o teste do MTT, onde foi realizado um *screening* de doses, sendo utilizadas as doses: 3,1; 6,2; 12,5; 25; 50 e 100 µg/mL por um período de incubação de 12 ou 24 horas. A análise por citometria para a investigação do tipo de morte celular envolvido com a citotoxicidade do BEN utilizou as doses de IC₅₀, IC_{50x2} e IC_{50/2} do período de incubação de 24h. Para as imunofluorescências, usou-se a dose de IC₅₀ do período de incubação de 24h. Nossos resultados mostraram que BEN causou aumento da atividade locomotora, déficit no filtro sensorio-motor, diminuição de cognição e isolamento social em ambos os períodos de tratamento, sendo esses resultados semelhantes a outras drogas de abuso. A droga em estudo também causou alterações nas monoaminas, com aumento da taxa de metabolização da dopamina e depleção dos níveis de serotonina no tratamento agudo e aumento da taxa de metabolização da dopamina e aumento dos níveis de serotonina no tratamento de dose repetida. BEN também causou diminuição dos níveis de BDNF em corpo estriado. Os experimentos *in vitro* mostraram que BEN causou diminuição da viabilidade celular no teste do MTT, sendo essa citotoxicidade causada pela ativação da via apoptótica verificada pela citometria de fluxo. Através de imunofluorescência, pôde-se confirmar que a via apoptótica envolvida com a citotoxicidade de BEN é a extrínseca, pois houve

aumento da expressão da enzima caspase-8 e do Fator de Transcrição NFκB p65, enquanto que a enzima caspase-9, ativada pela via intrínseca da apoptose, não apresentou diferença de expressão significativa em relação ao grupo controle. Esse trabalho mostrou que BEN, assim como outras drogas de abuso, possui efeitos deletérios no Sistema Nervoso Central (SNC) vistos através dos testes comportamentais, sendo esses efeitos causados por alterações de monoaminas e BDNF e ativação da via extrínseca da apoptose em astrócitos.

Palavras-Chave: Benzidamina; Monoaminas; Citotoxicidade; Apoptose.

ABSTRACT

STUDY OF BENZIDAMINE CHLORIDRATE: BEHAVIORAL AND NEUROCHEMICAL EFFECTS IN MICE AND POSSIBLE CYTOTOXIC EFFECTS IN CULTURE OF ASTROCYTE CELLS.

Benzylamine hydrochloride (BEN) is a non-steroidal anti-inflammatory commercially sold in many countries that has local anesthetic and relief pain properties. Acute high doses of BEN can cause psychostimulant effects. The aim of this study was to investigate the psychostimulant effects in mice and the cytotoxic effect in astrocyte cultures. For the behavioral tests (open field, pre-pulse inhibition, Y-maze, object recognition, social interaction and *rota rod*) and for the monoamines assay, it was used an acute treatment protocol and a repeated dose for seven days protocol with BEN doses of 50, 100 and 200 mg/kg orally. For BDNF measure, we used only the repeated dose administration protocol. The cytotoxicity study began with the MTT test, which was performed a *screening* of doses (3.1; 6.2; 12.5; 25; 50 and 100 $\mu\text{g/ml}$) for a period of 12 or 24 hour of incubation. The cytometric analysis, used to investigate the type of cell death involved in the cytotoxicity of BEN, used the doses of IC_{50} , $\text{IC}_{50}\times 2$ and $\text{IC}_{50}/2$ of the 24h incubation period. For immunofluorescence, it was used the IC_{50} dose of the 24h incubation period. Our results showed that BEN causes increased locomotor activity, deficit in sensorimotor filter, decreased cognition and social isolation in both periods of treatment, and these results are similar to other abuse drugs. The study drug also caused changes in monoamines, with increased dopamine metabolism rate and depletion of serotonin levels in the acute treatment and increased dopamine metabolism rate and increased serotonin levels in the repeated dose treatment. BEN also caused decreased BDNF levels in the striatum. *In vitro* experiments showed that BEN caused a decrease in cell viability in the MTT test, and this cytotoxicity is because of the activation of the apoptotic pathway verified by flow cytometry. By immunofluorescence, it was possible to confirm that the apoptotic pathway involved in BEN cytotoxicity is the extrinsic one, because there was an increase in the caspase-8 enzyme expression and in the NF κ B p65 transcription factor, whereas the caspase-9 enzyme, activated by intrinsic apoptosis pathway, there was no significant difference when compared to control group. In summary, this study showed that BEN, as well as other abuse drugs, has deleterious

effects on the Central Nervous System (CNS) seen through the behavioral tests, and these effects are caused by changes in monoamines and BDNF levels and activation of the extrinsic apoptotic pathway in astrocytes cells.

Key-words: Benzydamine; Monoamines; Cytotoxic effect; Apoptosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	- Via mesolímbica dopaminérgica.....	25
Figura 2	- Vias serotoninérgicas centrais.....	27
Figura 3	- Estrutura química da Benzidamina.....	28
Figura 4	- Patologia astrogliol.....	35
Figura 5	- Representação esquemática da sinalização apoptótica extrínseca e intrínseca.....	40
Figura 6	- Protocolo experimental do tratamento agudo.....	48
Figura 7	- Protocolo experimental do tratamento de dose repetida por sete dias.....	48
Figura 8	- Esquema dos parâmetros analisados no teste do campo aberto....	49
Figura 9	- Esquema de registro da amplitude do reflexo auditivo de sobressalto (ASR) e da amplitude de sobressalto após inibição por estímulo prévio (PPI).....	51
Figura 10	- Esquema do experimento labirinto em Y.....	52
Figura 11	- Esquema do experimento reconhecimento de objetos.....	53
Figura 12	- Foto do aparelho do experimento de interação social.....	54
Figura 13	- Esquema do experimento <i>rota rod</i>	54
Figura 14	- Efeito de BEN sobre a atividade locomotora espontânea (ALE) e <i>rearing</i> no teste do campo aberto após tratamento agudo.....	62
Figura 15	- Efeito de BEN sobre a atividade locomotora espontânea (ALE) e <i>rearing</i> no teste do campo aberto após tratamento de dose repetida de 7 dias.....	63
Figura 16	- Percentual de Inibição Pré-Pulso após o tratamento agudo ou de 7 dias.....	65
Figura 17	- Percentagem do número de alternâncias corretas no teste do labirinto em Y após tratamento agudo e de dose repetida por 7 dias de BEN nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg.....	67
Figura 18	- Índice de Reconhecimento de Objetos após tratamento agudo e de dose repetida por 7 dias com BEN nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg.....	69

Figura 19	- Efeito de BEN no teste de Interação Social após tratamento agudo.....	71
Figura 20	- Efeito de BEN no teste de Interação Social após tratamento de dose repetida de 7 dias.....	72
Figura 21	- Número de quedas no teste do <i>rota rod</i> após tratamento agudo e de sete dias com BEN.....	74
Figura 22	- Efeito do tratamento agudo com BEN nas doses de 50, 100 e 200mg/kg sobre as concentrações estriatais de Dopamina, DOPAC e HVA.....	77
Figura 23	- Efeito do tratamento agudo com BEN nas doses de 50, 100 e 200mg/kg sobre a taxa de renovação de DA.....	78
Figura 24	- Efeito do tratamento de dose repetida de sete dias com BEN nas doses de 50, 100 e 200mg/kg sobre as concentrações estriatais de Dopamina, DOPAC e HVA.....	79
Figura 25	- Efeito do tratamento de dose repetida de sete dias com BEN nas doses de 50, 100 e 200mg/kg sobre a taxa de renovação de DA... ..	80
Figura 26	- Efeito do tratamento agudo com BEN nas doses de 50, 100 e 200mg/kg sobre as concentrações estriatais de Serotonina (5-HT) e de ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA).....	82
Figura 27	- Efeito do tratamento agudo com BEN nas doses de 50, 100 e 200mg/kg sobre a taxa de renovação de 5-HT.....	83
Figura 28	- Efeito do tratamento de dose repetida de sete dias com BEN nas doses de 50, 100 e 200mg/kg sobre as concentrações estriatais de Serotonina (5-HT) e de 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA).....	84
Figura 29	- Efeito do tratamento de dose repetida de sete dias com BEN nas doses de 50, 100 e 200mg/kg sobre a taxa de renovação de 5-HT. ..	85
Figura 30	- Efeito do tratamento de dose repetida de sete dias com BEN nas doses de 50, 100 e 200mg/kg sobre as concentrações do Fator Neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) no corpo estriado (A) e em hipocampo (B).....	87
Figura 31	- Efeito de BEN sobre a viabilidade de astrócitos pelo método do MTT após 12 horas ou 24 horas de incubação.....	88

Figura 32	- Citometria de Fluxo para a avaliação do tipo de morte celular envolvido na citotoxicidade de BEN após 24 horas de incubação com as doses IC50/2 (13,06 µg/mL), IC50 (26,13 µg/mL) e IC50X2 (52,26 µg/mL).....	90
Figura 33	- Quantificação do tipo de morte envolvido na citotoxicidade de BEN após 24 horas de incubação com as doses IC50/2 (13,06 µg/mL), IC50 (26,13 µg/mL) e IC50X2 (52,26 µg/mL) através do experimento da Citometria de Fluxo.....	91
Figura 34	- Dupla coloração por imunofluorescência de culturas de astrócitos corticais para caspase-8 e DAPI após tratamento de 24h com BEN.....	93
Figura 35	- Quantificação da intensidade de imunofluorescência (IF) para caspase-8 em culturas de astrócitos corticais após tratamento de 24h com BEN.....	94
Figura 36	- Dupla coloração por imunofluorescência de culturas de astrócitos corticais para caspase-9 e DAPI após tratamento de 24h com BEN.....	95
Figura 37	- Quantificação da intensidade de imunofluorescência (IF) para caspase-9 em culturas de astrócitos corticais após tratamento de 24h com BEN.....	96
Figura 38	- Dupla coloração por imunofluorescência de culturas de astrócitos corticais para NFκB p65 e DAPI após tratamento de 24h com BEN.....	97
Figura 39	- Quantificação da intensidade de imunofluorescência (IF) para NFκB p65 em culturas de astrócitos corticais após tratamento de 24h com BEN.....	98

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1	- Esquema de distribuição dos animais dentre os grupos do estudo para os ensaios comportamentais após tratamento agudo com BEN.....	46
Tabela 2	- Esquema de distribuição dos animais dentre os grupos do estudo para os ensaios comportamentais após tratamento de dose repetida por sete dias com BEN.....	46
Quadro 1	- Esquema geral dos efeitos da transmissão dopaminérgica (DA) e serotoninérgica (5-HT) nos parâmetros avaliados no teste do campo aberto em estriado.....	101

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BEN	- Cloridrato de Benzidamina
SNC	- Sistema Nervoso Central
VTA	- Área Tegumentar Ventral
DA	- Dopamina
TDAH	- Transtorno de déficit de atenção e hiperatividade
5-HT	- Serotonina
mg	- miligrama
Mmol	- Milimol
L	- Litro
DL50	- Dose Letal de 50%
Kg	- Kilograma
i.p.	- Intraperitoneal
MTT	- 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
ROS	- Espécies Reativas de Oxigênio
TNFR	- Receptor para o Fator de Necrose Tumoral
TNFR1	- Receptor para o Fator de Necrose Tumoral Tipo 1
DISC	- Complexo de Sinalização Indutor de Morte
FADD	- Domínio de Morte Associado ao Fas
TRADD	- Domínio de morte associado ao TNFR
TRAF2	- Fator associado ao TNFR tipo 2
RIP1	- Proteína integrada ao receptor serina/treonina cinase tipo 1
FasL	- Fas Ligante
TRAIL	- Ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF
TRAILR	- Receptor do ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF
NFκB	- Fator Nuclear <i>kappa</i> B
IAPs	- Proteínas Inibidoras de Apoptose
Cit c	- Citocromo c
Apaf-1	- Fator Ativador de Protease Apoptótica 1
BDNF	- Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
rpm	- Rotações por minuto
7-AAD	- 7-amino-actino-micina
IF	- Imunofluorescencia

TPCS	- Tempo de permanência na câmara social
TIS	- Tempo de interação social
NECS	- Número de entradas na câmara social
CCET	- Circuito cortico-estriado-talâmico
DAPI	- 4,6-diamidino-2-fenilindol
SERT	- Transportadores de 5-HT
LSD	- Dietilamida do ácido lisérgico
GFAP	- Proteína ácida fibrilar glial
siRNA	- Pequenos fragmentos de RNA
GC	- Guanina-citosina
MAPKs	- Proteínas cinases ativadas por mitógenos
BH3	- Proteínas Bcl-2 homólogas 3
ATP	- Trifosfato de adenosina
ALE	- Atividade locomotora espontânea
IPP	- Inibição pré-pulso
ASR	- Reflexo auditivo de sobressalto
PPI	- Inibição por estímulo prévio
HPLC	- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
SOS	- Ácido octanosulfônico sódico
DOPAC	- Ácido 3,4-di-hidroxifenilacético
HVA	- Ácido homovanílico
5-HIAA	- Ácido 5-hidroxiindoleacético
PBS	- Solução salina tamponada com fosfato
ELIZA	- Ensaio imunoenzimático
DMEM	- Meio de Eagle modificado por Dulbecco
SDS	- Dodecilsulfato de sódio
BSA	- Soro bovino fetal
MDMA	- Metilenodioximetanfetamina
NADH	- nicotinamida adenina dinucleotídeo
IKKs	- Cinases IκB

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
1.1	Drogas de Abuso.....	21
1.2	Dopamina e Serotonina: Principais Neurotransmissores envolvidos nos efeitos das Drogas de Abuso.....	24
1.3	Benzidamina como droga de abuso.....	28
1.4	Estudos pré-clínicos para avaliação dos efeitos das drogas de abuso.....	32
1.4.1	Importância do estudo de citotoxicidade em astrócitos.....	33
1.4.2	Estudo das vias de morte celular.....	36
2	RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA.....	42
3	OBJETIVOS.....	44
3.1	Geral.....	44
3.2	Específicos.....	44
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	46
4.1	Animais.....	46
4.2	Drogas e Reagentes.....	47
4.3	Protocolo de administração.....	47
4.4	PROTOCOLO 1: Ensaio Comportamentais.....	49
4.4.1	Teste do Campo Aberto.....	49
4.4.2	Teste da Inibição pré-pulso.....	49
4.4.3	Teste do Labirinto em Y.....	51
4.4.4	Teste do Reconhecimento de objetos.....	52
4.4.5	Teste de Interação Social.....	53
4.4.6	Teste do <i>Rota Rod</i>	54
4.5	PROTOCOLO 2: Análise Neuroquímica.....	55
4.5.1	Determinação da concentração de monoaminas e seus metabólitos com HPLC em Corpo Estriado.....	55
4.5.2	Determinação das concentrações do Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF) em corpo estriado e hipocampo após tratamento de dose repetida com BEM.....	56
4.6	PROTOCOLO 3: Ensaio <i>in vitro</i> de Viabilidade celular.....	56

4.6.1	Linhagem e cultivo celular.....	56
4.6.2	Avaliação do efeito citotóxico do BEN através do ensaio com MTT	56
4.6.3	Avaliação do mecanismo de morte celular envolvido no efeito citotóxico do BEN por citometria de fluxo.....	57
4.6.4	Avaliação da via apoptótica envolvida com o efeito citotóxico do BEN através de imunofluorescência para caspase 8, caspase 9 e NFκB.....	57
4.7	Análise estatística.....	58
5	RESULTADOS.....	60
5.1	PROTOCOLO 1: Ensaio Comportamentais.....	60
5.1.1	Campo Aberto.....	60
5.1.2	Inibição Pré-pulso (IPP).....	63
5.1.3	Teste do Labirinto em Y.....	65
5.1.4	Teste do Reconhecimento de Objetos.....	67
5.1.5	Teste de Interação Social.....	69
5.1.6	Teste do <i>Rota rod</i>	72
5.2	PROTOCOLO 2: Análise Neuroquímica.....	74
5.2.1	Determinação das concentrações de dopamina e seus metabólitos (DOPAC e HVA) no corpo estriado.....	74
5.2.2	Determinação das concentrações de Serotonina e seu metabólito (5-HIAA) no corpo estriado.....	79
5.2.3	Determinação das concentrações do Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF) em corpo estriado e hipocampo após tratamento de dose repetida com BEN.....	84
5.3	PROTOCOLO 3: Ensaio <i>in vitro</i> de Viabilidade celular.....	85
5.3.1	Ensaio com MTT.....	85
5.3.2	Citometria de Fluxo para avaliação do mecanismo de morte celular envolvido no efeito citotóxico de BEN.....	87
5.3.3	Imunofluorescência para caspase 8, caspase 9 e NFκB.....	90
6	DISCUSSÃO.....	100
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	114
8	CONCLUSÃO.....	117
	REFERÊNCIAS.....	119

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Drogas de Abuso

Drogas psicoativas são compostos químicos que influenciam nossa percepção subjetiva e/ou nosso comportamento. Quando é dada a oportunidade aos seres humanos, assim como aos animais (WIENS et al., 2008), eles geralmente consomem drogas psicoativas voluntariamente (ABEL, 1981; WALDORF; REINARMAN; MURPHY, 1992). Embora esteja atualmente em debate se o uso controlado de drogas psicoativas pode, em determinadas circunstâncias, ter efeitos benéficos para o desempenho comportamental, a realização dos objetivos de vida ou o bem-estar (HAGEN et al., 2009; MÜLLER; SCHUMANN, 2011a, 2011b), tem que se reconhecer que o comportamento de consumo de droga psicoativa é estabelecido pela maioria dos seres humanos no mundo ocidental e constitui um traço comportamental bastante estável.

Grandes investigações com consumidores nos Estados Unidos (CENTER FOR BEHAVIORAL HEALTH STATISTICS, 2010) e na Europa (EMCDDA, 2012) mostram que a maioria dos consumidores regulares de drogas legais, como o álcool, ou de drogas ilícitas, como maconha ou cocaína, pode exercer um controle permanente sobre o seu consumo na medida em que não aumentem seu uso (AHMED, 2010; MÜLLER; SCHUMANN, 2011b). No entanto, uma minoria significativa daqueles indivíduos que estabeleceram comportamentos de procura e consumo de drogas, perdem o controle e desenvolvem um padrão compulsivo de consumo (CHEN; ANTHONY, 2004; DEGENHARDT et al., 2012; WAGNER; ANTHONY, 2002).

O uso de drogas de abuso tem aumentado desde a década de 1990 e suas consequências na vida do indivíduo e na sociedade são consideradas um problema social e de saúde pública, no Brasil e no mundo. O Relatório Mundial sobre Drogas, publicado em 2011, revela que o número de usuários dessas substâncias passou de 180 milhões em 2009 para 210 milhões em 2010 (JANG; KIM, 2013).

Os resultados da VI Pesquisa Nacional sobre o Uso de Drogas Psicotrópicas entre estudantes do Ensino Básico e Secundário (SENAD, 2010) complementa este cenário, revelando que 42,4% dos estudantes brasileiros relataram ter consumido álcool no ano anterior e 9,9% relataram ter consumido

qualquer droga (exceto álcool e tabaco). Estes resultados indicam a necessidade para o desenvolvimento e a implementação de atividades de prevenção e promoção da saúde, com o objetivo de reduzir os danos causados pelo consumo excessivo de álcool e outras drogas. Escolas têm sido consideradas um espaço privilegiado para tais intervenções.

O abuso de drogas e medicamentos continua a ser um importante problema de saúde. O *United Nations Office on Drugs and Crime* (UNODC) reportou, em 2010, que cerca de 5% da população mundial abusava de uma droga ilícita e 27 milhões de pessoas (~0,6% da população adulta mundial) podem ser classificadas como consumidoras problemáticas de drogas de abuso (UNODC, 2010).

O aumento do consumo de drogas e, conseqüentemente, da comercialização e ou tráfico, levou moradores de muitas comunidades à exposição das conseqüências desse contexto marcado por problemas sociais, econômicos, legais e de saúde, que envolvem violências e criminalidade, problemas no trabalho e desagregação de famílias. Algumas comunidades estão mais expostas às drogas de abuso e ao impacto decorrente do seu uso, ampliando a percepção e a discussão sobre os problemas sociais existentes e o impacto das drogas na qualidade de vida e saúde da população (FERTIG; DE SOUZA; SCHNEIDER, 2013; MARÍN-LEÓN et al., 2007; SELEGHIM; GALERA; OLIVEIRA, 2014; TIRADO OTÁLVARO et al., 2012).

Além de causar a morte, o abuso de drogas é também responsável por significativa morbidade e o tratamento da dependência de drogas acarreta um enorme ônus para a sociedade. O UNODC estima que os custos de todo o mundo relacionados com o tratamento dos toxicodependentes de US \$200 - \$250 bilhões de dólares (~0,3-0,4% do PIB mundial). Além disso, estima-se que apenas 20% dos toxicodependentes em 2010 foram efetivamente tratados para a sua dependência (CHAKRAVARTHY; SHAH; LOTFIPOUR, 2013).

Os psicotrópicos, ou substâncias psicoativas, são compostos (sejam eles xenobióticos ou endobióticos) que atuam primeiramente no Sistema Nervoso Central (SNC), alterando temporariamente a percepção, humor, estado de consciência e o comportamento. Podem, de acordo com o estado sócio-legal, exibir uso lícito (psicofármacos; que podem também estar sujeitos a abuso) e ilícito (drogas de abuso). As drogas de abuso representam um grupo heterogêneo de compostos com mecanismos de ação muito diversos (KATZUNG; MASTERS; TREVOR, 2012).

A trajetória do uso de drogas até o vício começa num contexto de vulnerabilidade baseada em fatores genéticos e ambientais. Com o uso contínuo de drogas de abuso, a plasticidade neuronal atípica pode ocorrer dentro de circuitos importantes do cérebro, o que contribui para o desenvolvimento e manutenção da dependência. Enquanto os circuitos dopaminérgicos e glutamatérgicos têm um papel definitivo na neuroplasticidade causada pela dependência, importantes avanços na compreensão dos mecanismos serotoninérgicos nos processos que causam dependência têm sido feitos nos últimos anos. Além disso, há evidências crescentes de que a desregulação do sistema da serotonina (5-HT) por exposição de longo prazo a drogas de abuso pode ser a base da alta taxa de perturbações afetivas (por exemplo, depressão) com a dependência de drogas (KIRBY; ZEEB; WINSTANLEY, 2011).

O vício é a sensação que impele ou motiva de forma compulsiva à obtenção e ao consumo da 'droga' para manter determinado nível de atividade, euforia ou de bem-estar, mesmo em face das consequências negativas. Com o passar do tempo o consumo torna-se compulsivo. É considerada uma doença neuropsiquiátrica que pode existir sem que se verifique dependência e ocorre mais facilmente com xenobióticos que produzem intenso prazer (euforia, felicidade), ou seja, recompensa (VEENHOVEN, 2003). Apenas uma percentagem dos consumidores desenvolve adição, o que é facilmente demonstrado no decurso da terapêutica analgésica com opióides.

Já outras drogas de abuso, como os alucinógenos, não causam adição; alteram a percepção, sem causar sensações de recompensa e de euforia. Ao contrário das drogas aditivas, que têm como principal alvo o sistema mesolímbico dopaminérgico, os alucinógenos atuam nos circuitos corticais e talâmicos (KATZUNG; MASTERS; TREVOR, 2012). O LSD, por exemplo, ativa o receptor 5-HT_{2A} no córtex pré-frontal, facilitando a transmissão serotoninérgica para neurônios piramidais. Já a cetamina produz uma sensação de separação do corpo da mente (sendo por isso designada de anestésico dissociativo) e, em doses mais altas, letargia e coma. O principal mecanismo de ação é a inibição dependente da utilização de receptores do glutamato do tipo N-metil-D-aspartato.

Modelos pré-clínicos em animais para avaliar drogas psicoativas tem a habilidade de fornecer aos pesquisadores informações valiosas a este respeito. Os modelos animais permitem aos pesquisadores manipular sistematicamente o

funcionamento do cérebro em diferentes níveis através da realização de experimentos que não são possíveis usando seres humanos. Os resultados destes estudos podem, então, ser traduzidos para compreender a condição humana. Assim, estudos pré-clínicos têm a capacidade de melhorar significativamente a nossa compreensão da dependência, bem como uma variedade de distúrbios psiquiátricos em que são observados déficits no controle de impulsos, contribuindo para o desenvolvimento de tratamentos eficazes (KIRBY; ZEEB; WINSTANLEY, 2011).

1.2 Dopamina e Serotonina: Principais Neurotransmissores envolvidos nos efeitos das Drogas de Abuso

Desde a descoberta das funções fisiológicas da 3-hidroxitiramina (dopamina), um metabólito do aminoácido tiramina, mais de 50 anos atrás (CARLSSON; LINDQVIST; MAGNUSSON, 1957), esse neurotransmissor catecolaminérgico tem atraído uma enorme atenção. De uma maneira similar a outros neurotransmissores monoaminérgicos, DA geralmente exerce suas ações nos circuitos neurais através de uma modulação relativamente lenta da neurotransmissão rápida mediada pelo glutamato e GABA. Quatro grandes vias dopaminérgicas foram identificadas no cérebro de mamíferos: nigroestriatal, mesolímbica, mesocortical e tuberoinfundibular (ANDEN et al., 1964; DAHLSTROEM; FUXE, 1964). Estes neurônios estão criticamente envolvidos em várias funções vitais do SNC, incluindo o movimento voluntário, a alimentação, afeto, recompensa, sono, atenção, memória de trabalho e aprendizagem.

Uma combinação de estudos pré-clínicos e clínicos revelou que o sistema mesolímbico dopaminérgico é o principal alvo das drogas de abuso. Este sistema tem origem na área tegumental ventral (VTA), uma pequena estrutura no tronco cerebral (mesencéfalo) que se projeta para o núcleo accumbens, a amígdala, o hipocampo e o córtex pré-frontal (KATZUNG; MASTERS; TREVOR, 2012). Como regra geral, todas as drogas aditivas ativam o sistema mesolímbico da DA (Figura 1).

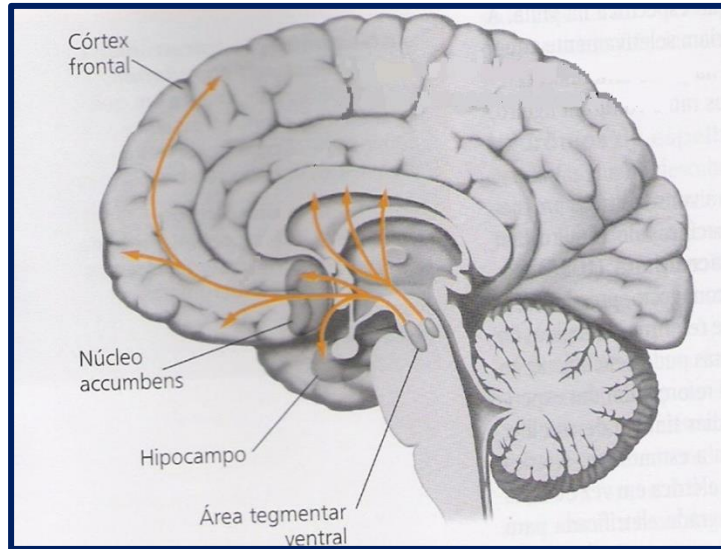


FIGURA 1. Via mesolímbica dopaminérgica. FONTE: <http://slideplayer.com.br/slide/9920802/>

A plasticidade anormal dos mecanismos de recompensa que tem sido associada ao abuso e dependência de drogas sugere que a dopamina exerce um papel importante nesta condição patológica (DI CHIARA; BASSAREO, 2007; HYMAN; MALENKA; NESTLER, 2006; KOOB; VOLKOW, 2010). Um conjunto de sinalizações dopaminérgicas anormais também está envolvido em muitos outros transtornos cerebrais, como o transtorno bipolar, a depressão maior, discinesias e muitas desordens somáticas, incluindo hipertensão e disfunção renal (APERIA, 2000; CARLSSON et al., 2001; IVERSEN et al., 2007; MISSALE et al., 1998).

Em seres humanos, estudos de imagem mostraram que as drogas de abuso aumentam de liberação de DA no corpo estriado (incluindo o *núcleo accumbens*), e estes aumentos foram associados com a experiência subjetiva da recompensa (DREVETS et al., 2001; LARUELLE et al., 1995; VOLKOW et al., 1999). Um grande avanço na pesquisa sobre o cérebro foi feito na década de 1970, quando o potencial papel da DA na dependência foi descoberto. Este avanço resultou da constatação de que ratos iam espontaneamente e repetidamente auto-estimular áreas específicas no cérebro com eletricidade, um processo que os pesquisadores chamaram reforço positivo. Uma série de estudos subsequentes em grande parte baseados nos Estados Unidos revelou que o bloqueio dos receptores de DA com neurolépticos prejudica os efeitos reforçadores estimulantes em ratos e primatas. Essa pesquisa claramente colocou a DA como neurotransmissor central na dependência por estimulantes (WISE; BOZARTH, 1987) e sugeriu que ele tem

papéis na recompensa, motivação e comportamento (ROBINSON; BERRIDGE, 1993).

A descoberta crucial do papel de sistema dopaminérgico humano na dependência veio em 1994, quando foi demonstrado que a combinação de infusão intravenosa de uma droga estimulante central e imagem neuroquímica por tomografia computadorizada por emissão de fóton único ou por tomografia por emissão de pósitrons dos receptores de dopamina D2/3 pôde ser usado para medir indiretamente a liberação de dopamina no estriado humano (LARUELLE et al., 1995; VOLKOW et al., 1994). A magnitude deste aumento foi mostrada mais tarde para prever a euforia (LARUELLE et al., 1995), ou "alta" (VOLKOW et al., 1999), produzida pela droga. Os resultados foram interpretados como prova de que a experiência do prazer (a ação gratificante) de drogas estimulantes em humanos foi mediada pela liberação de dopamina no estriado, assim como em ratos (DI CHIARA; IMPERATO, 1988).

Uma sucessão de outros estudos em humanos se seguiram, o que mostrou que o álcool (BARRETT et al., 2004; BOILEAU et al., 2003; URBAN et al., 2010) o tabaco, a cetamina (VOLLENWEIDER et al., 2000) e o cannabis (BOSSONG et al., 2009) aumentam de liberação de DA no estriado em participantes saudáveis e em usuários de drogas não-dependentes, proporcionando, assim, um apoio para a teoria do vício causado pela DA. A teoria da DA no vício rapidamente se tornou aceita pelo campo científico, e drogas que induzem a liberação de DA são, conseqüentemente, consideradas por representar um risco de abuso.

Outro neurotransmissor bastante envolvido com a euforia causada por várias substâncias psicoestimulantes é a serotonina (5-HT). Nos últimos anos, a 5-HT (5-hidroxitriptamina) tornou-se um dos sistemas de neurotransmissão que exerce crescente interesse na área da aprendizagem e memória (BERT et al., 2008; DAYAN; HUYS, 2009; EAGLE; BARI; ROBBINS, 2008; MENDELSON; RIEDEL; SAMBETH, 2009; ÖGREN et al., 2008). Estudos mostram que as áreas cerebrais implicadas com esses processos cognitivos recebem vias serotoninérgicas (JACOBS; AZMITIA, 1992; ZOLA-MORGAN; SQUIRE, 1993), incluindo o córtex pré-frontal, hipocampo, amígdala, etc (MENESES, 1999).

A maior parte dos neurônios serotoninérgicos do tronco encefálico localiza-se na formação reticular, nos nove núcleos da rafe que se estendem na linha média, do bulbo ao mesencéfalo (Figura 2). Os axônios originados nos núcleos

situados em níveis mais altos têm trajeto ascendente, projetando-se para quase todas as estruturas do prosencéfalo, incluindo córtex cerebral, hipotálamo e sistema límbico (Figura 2), e participam da regulação do ciclo sono-vigília, de comportamentos motivacionais e emocionais (MACHADO; HAERTEL, 2014).

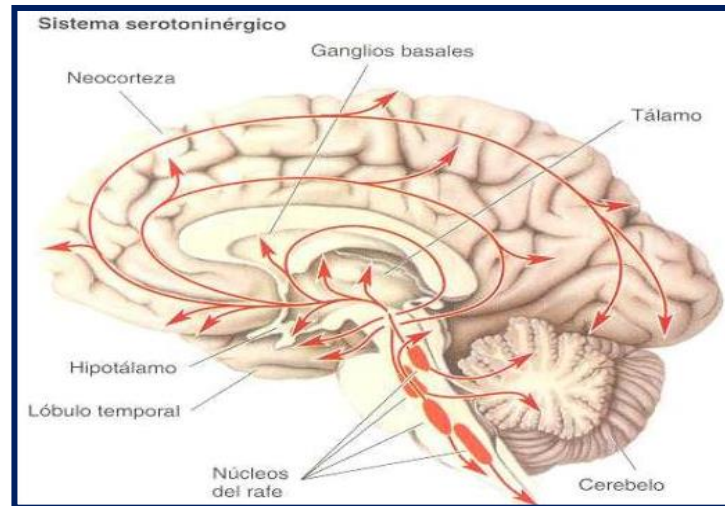


FIGURA 2. Vias serotoninérgicas centrais. FONTE:

<http://www.slideshare.net/WalterCarlosKrainbuh/presentacion-sobre-psicodelicos-y-psicoterapia>

A serotonina exerce seus efeitos através de 14 diferentes receptores, os quais foram caracterizados geneticamente, farmacologicamente e funcionalmente (FINK; GÖTHERT, 2007; HANNON; HOYER, 2008) e a recaptação dos níveis sinápticos de 5-HT é regulada por transportadores de 5-HT chamados "SERT" (KALUEFF et al., 2010; MURPHY et al., 2008). Em adição, manipulações genéticas e farmacológicas no SERT são conhecidas por modificar o desempenho de memória de humanos e roedores (CHOW; POLLOCK; MILGRAM, 2007; MONLEÓN et al., 2008; SAVASKAN et al., 2008).

As substâncias que agem no sistema serotoninérgico são chamadas de psicodélicas. Essas substâncias constituem uma classe heterogênea de moléculas, entre os quais a dietilamida do ácido lisérgico (LSD) e a psilocibina são as duas moléculas mais conhecidas e estudadas (WINTER, 2009). Essas drogas induzem imagens fenomenologicamente complexas, que podem misturar alucinações visuais, sinestesia e estados alterados de consciência (GEYER; VOLLENWEIDER, 2008). Embora tenha havido muito debate sobre o mecanismo farmacológico exato dos psicodélicos, o modo mais comumente admitido da atividade desta classe de drogas é a estimulação do receptor 5HT_{2A} serotoninérgico nos neurônios corticais

(GONZÁLEZ-MAESO et al., 2009; VOLLENWEIDER; KOMETER, 2010). A hiperativação cortical dos receptores 5HT_{2A} pode afetar o funcionamento das alças córtico-estriato-tálamo-cortical. Foi proposto que este processo desencadeia uma quebra da integridade cognitiva e resulta na ocorrência subsequente de sentimentos e percepções aberrantes (GEYER; VOLLENWEIDER, 2008).

Nos últimos anos, vários autores propuseram uma reavaliação do papel do receptor 5HT_{2A} na psicose (GEYER; VOLLENWEIDER, 2008; GONZÁLEZ-MAESO et al., 2009). Entretanto, formas de psicose induzidas por psicodélicos diferem da psicose semelhante à esquizofrenia, em especial sobre o aspecto clínico das alucinações. Alucinações visuais são típicas dos psicodélicos, enquanto alucinações auditivas são bem mais raras (STUDERUS et al., 2011).

1.3 Benzidamina como droga de abuso

O nome químico da substância Benzidamina é 1-benzil-3-(3-dimetilaminopropil)-1-H-indazol e sua fórmula estrutural é apresentada na figura 3. Trata-se de uma base fraca, diferindo de muitos medicamentos como a aspirina, que são ácidos ou metabolizados em ácidos. As vias de metabolização mais relevantes descritas em ratos e seres humanos são: N-oxidação, hidroxilação do anel benzeno ou grupo benzílico, eliminação do grupo dimetilaminopropil e desmetilação da função amino (KÖPPEL; TENCZER, 1985).

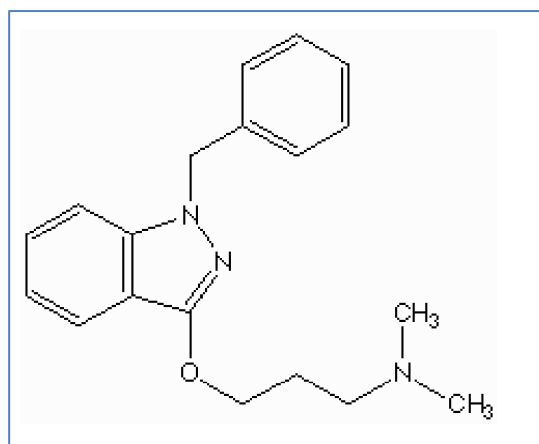


FIGURA 3. Estrutura química da Benzidamina. FONTE: <http://pt.crenelab.com/other/14036673.html>

A benzidamina é pouco absorvida através da pele e mucosas, sendo rapidamente absorvida através do trato gastrointestinal e sua concentração plasmática atinge o pico em 2 horas (QUANE; GRAHAM; ZIEGLER, 1998). A meia-

vida de eliminação é de aproximadamente 13 horas. A difusão e a solubilidade deste fármaco estão dependentes do pH do meio, verificando-se a pH 9 uma maior fração não-ionizada. No entanto, verificou-se um aumento da permeabilidade deste através das membranas com o aumento do pH na faixa de 5 a 7,6, em que para valores de pH superiores esta relação deixa de se verificar, possivelmente, devido a uma diminuição da solubilidade (SARVEIYA; TEMPLETON; BENSON, 2005).

Com relação aos efeitos centrais, vários são os casos reportados de pacientes que fazem uso do cloridrato de benzidamina (BEN) em superdosagens para obter seus efeitos alucinógenos e em muitos desses casos, ocorre a associação com bebidas alcoólicas. Nenhuma investigação mais aprofundada sobre o mecanismo por detrás desses efeitos centrais é relatado (ACAR et al., 2014; BALABAN et al., 2013; DO et al., 2006; GÓMEZ-LÓPEZ et al., 1999; GÜRÜ et al., 2012; SALDANHA; PLEIN; JORNADA, 1993; SCHVARTSMAN C, 1986). Em 2009, houve a publicação de um relato de caso onde uma paciente esquizofrênica com quadro clínico estável voltou a apresentar quadros alucinatorios após o uso do BEN em doses posológicas consideradas terapêuticas (DOKSAT, 2009).

Outros estudos com efeitos periféricos mostraram que BEN, em altas concentrações, pode inibir a função parassimpática da traquéia e reduzir a contração induzida por metacolina no músculo liso traqueal, reduzindo ataques asmáticos quando administrado em pacientes com faringite ou mucosite oral (WANG et al., 2015).

O cloridrato de benzidamina é uma droga anti-inflamatória não esteroidal comercialmente vendida em muitos países e que tem propriedades anestésicas locais e para o alívio da dor (TURNBULL, 1995). Essa droga estava disponível no Brasil em forma de cápsula, anti-séptico bucal, creme cutâneo, aerosol e preparações para assepsias vaginais, porém a RDC Nº 13 de 24 de março de 2015 realizou uma atualização do Anexo I na Listas de Substâncias Entorpecentes, Psicotrópicas, Precursoras e Outras sob Controle Especial, da Portaria SVS/MS nº 344, de 12 de maio de 1998, proibindo a importação, produção, manipulação, aquisição, venda e dispensação de medicamento de uso sistêmico à base dessa substância, retirando do mercado a apresentação de cápsulas e tornando as outras apresentações com controle especial de venda (BRASIL, 2015).

Esta substância trata-se de um anti-inflamatório não esteroidal usado para o tratamento de muitas enfermidades, como faringites, processos inflamatórios

tumefativos e dolorosos, laringites, gengivites, vulvo-vaginites, estomatites, dentre outros. Esse fármaco possui como um de seus mecanismos de ação a inibição da síntese das prostaglandinas, sendo esse mesmo mecanismo o responsável pelos efeitos renais e gastrointestinais indesejáveis. Um grande contraste com fármacos, como a aspirina, é revelada pelo fato de BEN ser um fraco inibidor da síntese de prostaglandinas, possuindo outras propriedades que podem contribuir para a sua atividade antiinflamatória (KATZUNG; MASTERS; TREVOR, 2012). Essas propriedades incluem a inibição da síntese de citocinas inflamatórias e do fator de necrose tumoral- α , possui também a capacidade de estabilizar as membranas, o que é demonstrado por várias ações, incluindo inibição da liberação de grânulos de neutrófilos em concentrações que variam de 3 a 30 mmol/L e de estabilização de lisossomas (QUANE; GRAHAM; ZIEGLER, 1998).

Até pouco antes de ser retirado do mercado, era comum o uso não terapêutico do BEN no Brasil, especialmente entre menores de rua, como droga de abuso devido aos seus efeitos psicoestimulantes (ACAR et al., 2014; BALABAN et al., 2013; DO et al., 2006; GÜRÜ et al., 2012; MOTA et al., 2010). Dados sobre o uso após a proibição da produção e comercialização são ainda desconhecidos.

Dentre os efeitos colaterais periféricos mais descritos estão eritema, urticária, fotossensibilidade, prurido, disfunção renal e broncoespasmo. A dosagem oral máxima diária de BEN é de 200 mg/dia. Excitação, alucinações, hiperatividade, boca seca, paranoia e convulsões já foram relatados em doses entre 500-3000 mg/dia. O uso recreativo do BEN é considerado popular no Brasil e em países como Polônia e Turquia (DO et al., 2006; OPALEYE et al., 2009).

Altas doses do BEN administradas de forma aguda podem causar delírio, comportamentos anormais, alucinações, dor de cabeça, diplopia, nistagmo, zumbido, visão turva, tonturas, convulsões, letargia, discinesia, perda da consciência e coma (DO et al., 2006). Estudos de Silvestrini e colaboradores mostraram que a toxicidade aguda do BEN está significativamente relacionada com a via de administração. Em camundongos, a proporção da DL50 intraperitoneal (515 mg/kg) para a DL50 oral é de cerca de 1:5, enquanto que em ratos (1050 mg/kg, i.p.) é de cerca de 1:10. Doses letais produzem incordenação, prostração, e convulsões clônicas. Porém, os efeitos mais comuns observados por esses pesquisadores foram a redução do tônus muscular e sedação em baixas doses, e convulsões clônicas em doses mais elevadas (SILVESTRINI et al., 1967).

São inúmeras as preparações do BEN em muitos países e casos de uso indevido já foram registrados (ACAR et al., 2014; BALLESTEROS; RAMÓN; MARTÍNEZ-ARRIETA, 2009; SCHIFANO et al., 2013). Na Turquia, preparações do BEN podiam, até pouco tempo atrás, ser vendidas sem receita. Porém, em 2012, após o aumento do número de casos de abuso dessa substância, o Ministério da Saúde da Turquia proibiu a venda dessas preparações sem receita médica. De forma semelhante ao ocorrido na Turquia, o Brasil, no ano de 2015, proibiu a manipulação e/ou comercialização dessa substância devido aos altos índices de uso recreativo da mesma.

No ano de 2003, foram realizadas 2.807 entrevistas com crianças e adolescentes de todas as capitais brasileiras entre dez e dezoito anos de idade que mostraram que o uso de medicamentos para fins não terapêuticos foi revelado em algumas capitais específicas, predominando a Região Nordeste. Foi relatado o uso mensal e de forma recreacional de Benflogin® (cloridrato de benzidamina) em quatro capitais, em especial São Luís (8%) e Fortaleza (6%) (CEBRID, 2003). A especialidade farmacêutica Benflogin®, que, segundo dados de sites não oficiais, era a mais utilizada com fins não terapêuticos, possuía tarja vermelha e deveria ser dispensada mediante prescrição médica antes de ser retirada do mercado. Na sua bula constava que a superdosagem do cloridrato de benzidamina poderia causar alucinações e que este fármaco não deveria ser associado à ingestão de bebidas alcoólicas (ACHE LABORATÓRIOS FARMACÊUTICOS, 2005).

Quase todos os casos de relatos de abuso do BEN são através da via oral. O uso de álcool é relatado como uma das formas de aumentar os efeitos centrais do BEN (OPALEYE et al., 2009). Doses terapêuticas de BEN podem causar efeitos colaterais psiquiátricos em pacientes que já apresentam algum transtorno psiquiátrico e a overdose pode resultar em psicose crônica (DOKSAT, 2009; GÜRÜ et al., 2012).

1.4 Estudos pré-clínicos para avaliação dos efeitos das drogas de abuso

Há uma longa e rica história de pesquisas pré-clínicas tanto *in vivo* como *in vitro* que levaram a importantes descobertas sobre a natureza dos sistemas neurobiológicos subjacentes ao abuso de drogas. Essas respectivas drogas exercem seus efeitos por agirem artificialmente sobre os sistemas neurais endógenos envolvidos em respostas a incentivos naturais, como comida, água ou sexo. Isso sugere que se pode pensar em drogas de abuso como uma classe especial de reforçadores positivos e que se pode, portanto, aplicar os mesmos métodos comportamentais para estudar o reforço dessas drogas, como tem sido aplicado com sucesso para o estudo dos fatores que influenciam o início e a manutenção dos comportamentos naturalmente reforçadores (ETTENBERG, 2009).

Dentre os estudos *in vivo* usados em roedores para avaliar os efeitos as drogas de abuso, temos o campo aberto. Esse experimento tem a capacidade de mostrar alterações na atividade locomotora dos animais, efeito esse demonstrado por muitas substâncias psicoativas (NIWA; YAN; NABESHIMA, 2008).

Outro teste bastante usado é o da inibição pré-pulso, que avalia o funcionamento do filtro sensório-motor. Esse filtro age como um protetor do processamento de informações, limitando a entrada de informações sensoriais, evitando, assim, a sobrecarga no processamento cortical e as conseqüentes alterações na percepção dos estímulos (NORRIS; BLUMENTHAL, 1996).

Os déficits cognitivos causados pelas drogas de abuso podem ser avaliados pelos testes do labirinto em Y e o teste do reconhecimento de objetos. Esses experimentos avaliam a memória de trabalho e memória de curto prazo, respectivamente. A primeira se trata de uma memória imediata que dura de frações a poucos segundos e não deixa “traços” ou não forma “arquivos” (BADDELEY, 1992; SQUIRE; ZOLA, 1996). Já a última avalia a memória de curto prazo, que engloba o tempo durante o qual a memória está sendo consolidada e convertida à memória remota, de longo prazo (SQUIRE; ZOLA, 1996).

Já o isolamento social que muitas drogas causam pode ser analisado pelo teste da interação social, onde os níveis desse experimento em roedores têm sido usados para avaliar efeitos farmacológicos na ansiedade (FILE; HYDE, 1978a; FILE; SETH, 2003).

Além dos estudos comportamentais, os testes *in vitro* são uma ferramenta valiosa para se conhecer os mecanismos pelos quais as substâncias podem

produzir seus efeitos a nível celular (LYGRE et al., 1995). Assim, lise celular, mudanças no crescimento e na permeabilidade da membrana celular podem ser verificadas *in vitro*, revelando efeitos citotóxicos ocasionados pelas substâncias testadas. Testes *in vitro* também fornecem informações valiosas a respeito da morfologia, proliferação e adesão celular e comportamento das células simulando o ambiente celular e molecular.

Em comparação com testes *in vivo*, os estudos *in vitro* são mais facilmente controlados, financeiramente acessíveis e apresentam melhor reprodutibilidade. A realização de ensaios *in vitro* ainda permite redução no número de animais utilizados na avaliação do mecanismo de ação ou da citotoxicidade de uma substância (FRESHNEY, 2000).

Vários métodos *in vitro* para avaliar a toxicidade de drogas foram padronizados utilizando-se culturas celulares (citotoxicidade). Estes testes de citotoxicidade consistem em colocar o material direta ou indiretamente em contato com uma cultura de células de mamíferos, verificando-se as alterações celulares por diferentes mecanismos, entre os quais a incorporação de corantes vitais ou a inibição da formação de colônias celulares (CRUZ et al., 1987; GUESS et al., 1965; ROGERO et al., 2000a, 2000b).

O parâmetro mais utilizado para avaliar a citotoxicidade é a viabilidade celular, sendo que um dos testes mais utilizados para avaliação da citotoxicidade *in vitro* é o teste do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio), que avalia a atividade mitocondrial, onde somente células viáveis conseguem converter o sal amarelo MTT em cristais de formazan, de cor púrpura. Essa produção de formazan é então quantificada através da leitura da densidade óptica das amostras.

1.4.1 Importância do estudo de citotoxicidade em astrócitos

A principal unidade computacional do cérebro é a sinapse. A descoberta de que os astrócitos participam em muitos aspectos da função sináptica, incluindo o seu desenvolvimento, refinamento e modulação da atividade ajudou a estabelecer firmemente a opinião de que os astrócitos não são reguladores simplesmente passivos de homeostase cerebral, mas na verdade são grandes contribuintes para a cognição, aprendizagem e memória (ULLIAN et al., 2001).

Astrócito é o tipo de célula glial mais numeroso no SNC (FILOSA et al., 2016; MACVICAR; NEWMAN, 2015) participando de uma variedade de mecanismos

moleculares (exocitose, transportadores de membrana ou difusão através de canais), através da secreção de numerosos neurotransmissores, neurohormônios e fatores tróficos (MALARKEY; PARPURA, 2008; PARPURA; GRUBIŠIĆ; VERKHRATSKY, 2011) que regulam a formação e manutenção das transmissões sinápticas, a sincronização das redes neuronais e de sinais para outras células (microglia, oligodentrócitos, células endoteliais, entre outras). Ao nível de todo o cérebro, os astrócitos formam os limitantes da glia, aumentam o fluxo sanguíneo e a oxigenação local, além de captar a glicose do sangue, convertê-la em lactato e depois liberá-la para os neurônios para uso local de energia (MAGISTRETTI, 2006; RANSOM, 2012; VERKHRATSKII; BUTT, 2013).

Os astrócitos mantem a homeostase do SNC, que está diretamente relacionada à capacidade neuroprotetora dessas células. Insultos ao SNC, independentemente da sua etiologia, desequilibram a homeostase do órgão e são os astrócitos que, através de cascatas moleculares específicas, protegem os neurônios contra a excitotoxicidade glutamatérgica, a sobrecarga extracelular de K^+ e as espécies reativas de oxigênio (ROS). Os astrócitos também fornecem substratos energéticos aos neurônios estressados (VERKHRATSKY et al., 2014).

Alguns pesquisadores mostraram que os astrócitos expressam receptores para neurotransmissores e a liberação desses neurotransmissores pode regular bidirecionalmente as funções astrocitárias e neuronais (MARTÍN et al., 2015). A atividade neuronal aumenta os níveis de K^+ extracelular que; se não controlado durante altos níveis de atividade, esse excesso de K^+ pode despolarizar potenciais de membrana neuronais para estados patológicos. Astrócitos controlam as concentrações extracelulares de K^+ através de interiorização por canais de K^+ chamados Kir 4.1 (BUTT; KALSI, 2006). Esses canais retiram o excesso de K^+ através de difusão passiva por gradiente eletroquímico e, a perda desse canal, resulta em profunda vacuolização da mielina, morte neuronal e letalidade prematura (NEUSCH et al., 2001, 2006).

Astrócitos também regulam as mudanças de volume dependente de atividade do espaço extracelular, controlando homeostase da água através do canal de água aquaporina-4 (NAGELHUS; MATHIISEN; OTTERSEN, 2004). Estes mesmos canais de água são o principal alvo dos anticorpos na neuromielite óptica, uma patologia astrocitária auto-imune que resulta em profunda desmielinização no SNC. Assim, os astrócitos desempenham papéis essenciais no controle da

excitabilidade neuronal e da homeostase do cérebro, regulando o volume cerebral e as concentrações de K^+ .

A perda dessas críticas funções astrocíticas permite e/ou exacerba a progressão de várias doenças, como a esclerose lateral amiotrófica, encefalopatias tóxicas e neurodegeneração. Somando a isso, astrócitos são capazes de montar uma resposta defensiva específica, geralmente conhecida como astrogliose reativa (Figura 4), uma remodelação de componentes múltiplos e complexos da astroglia desencadeada por lesões no SNC (BURDA; SOFRONIEW, 2014; PEKNY; WILHELMSSON; PEKNA, 2014; SOFRONIEW, 2009; VERKHRATSKY et al., 2014).

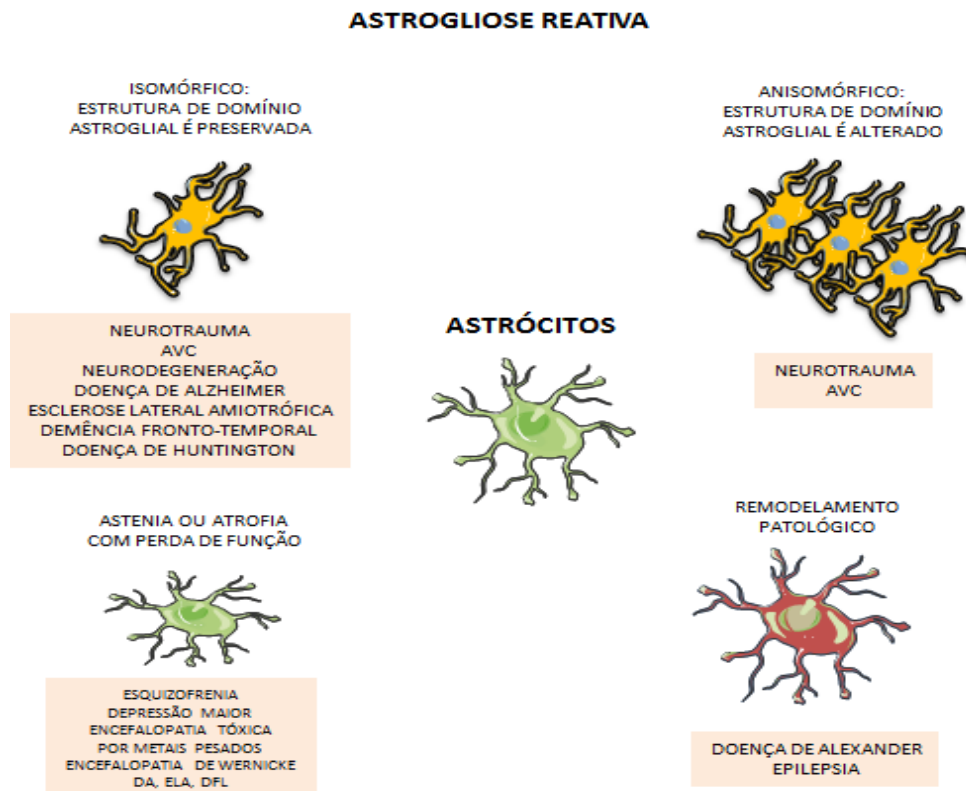


FIGURA 4. Patologia astrogliar. Astrócitos sofrem alterações morfo-funcionais em patologias cerebrais (ver texto para detalhes). DA, doença de Alzheimer; ELA, esclerose lateral amiotrófica; DFL, demência fronto-temporal. FONTE: Adaptado de (VERKHRATSKY et al., 2015)

Além da reatividade astrogliar, numerosas doenças neurológicas estão associadas com degeneração ou atrofia astrogliar e astenia funcional (Figura 4), incluindo transtornos psiquiátricos e neurodegeneração (HAZELL, 2009; RAJKOWSKA; STOCKMEIER, 2013; ROSSI et al., 2008; VERKHRATSKY;

RODRÍGUEZ; STEARDO, 2014; VERKHRATSKY et al., 2014). Essas alterações também foram reportadas em material humano *pós-mortem* de diferentes formas de dependência (ARMSTRONG et al., 2004; BÜTTNER; WEIS, 2006; FATTORE et al., 2002; MIGUEL-HIDALGO; SHOYAMA; WANZO, 2009; WEBER et al., 2013).

O tratamento de animais com diferentes drogas de abuso, incluindo cocaína (BOWERS; KALIVAS, 2003; FATTORE et al., 2002), metanfetamina (FRIEND; KEEFE, 2013; GUILARTE et al., 2003) e morfina (SONG; ZHAO, 2001) resultaram em supra-regulação na expressão de GFAP e de astrogliose reativa. Ao mesmo tempo, uma exposição prolongada ao álcool etílico levou a uma diminuição na expressão de GFAP e atrofia morfológica dos astrócitos (FRANKE, 1995; RINTALA et al., 2001). Em tecidos humanos *pós-mortem* obtidos de alcoólatras, astrócitos hipertróficos foram encontrados junto com áreas depletadas de perfis gliais GFAP positivas (CULLEN; HALLIDAY, 1994; MIGUEL-HIDALGO, 2005).

1.4.2 Estudo das vias de morte celular

A morte celular é essencial para a homeostase corporal e pode ser classificada em dois principais tipos: necrose e apoptose. A necrose foi o primeiro tipo de morte a ser encontrado, e, em seguida, no ano de 1972, o termo apoptose começou a ser utilizado (DUPREZ et al., 2009).

A necrose foi descrita em detalhes somente em 1988 por Walter e colaboradores (WALKER et al., 1988) e tem sido considerada por um longo tempo como uma forma de morte celular acidental e não controlada. A morte celular por necrose é morfológicamente caracterizada por um aumento no volume celular, inchaço das organelas e ruptura da membrana plasmática, seguido de perda do conteúdo intracelular. Além disso, esse tipo de morte mostra comprometimento bioenergético, degradação aleatória do DNA e leva à liberação de fatores envolvidos na estimulação da resposta imune ou ativação dos processos de reparação (ZONG; THOMPSON, 2006).

A necrose é a morte celular que é observada principalmente em resposta a tensões severas, como ocorre após lesão física ou isquemia prolongada (DEGTEREV; YUAN, 2008; DUPREZ et al., 2009; HOTCHKISS et al., 2009). Na realidade, quantidades excessivas de estímulos indutores de apoptose levam à necrose. Os mecanismos responsáveis pelo desencadeamento da necrose geralmente recebem pouca atenção pelo fato de ter se pensado tratar-se apenas um

processo físico não regulado. Hoje sabe-se que a necrose pode ser regulada e pode ocorrer como uma via alternativa de morte celular geneticamente codificado independente de apoptose (DEGTEREV; YUAN, 2008; HENRIQUEZ et al., 2008; HITOMI et al., 2008).

A identificação de produtos químicos capazes de inibir a necrose assim como os pequenos fragmentos de RNA (siRNA) envolvidos na regulação do processo sugerem fortemente que, em muitos casos, o processo de morte celular é regulado (DEGTEREV; YUAN, 2008; GANGADHAR; STOCKWELL, 2007; HITOMI et al., 2008). Embora a necrose possa ocorrer como parte de um processo fisiológico normal, tais como certos aspectos do desenvolvimento, é comum somente em células nas quais a via apoptótica normal é bloqueada. Desse modo, a necrose, assim como a morte celular por autofagia, pode apresentar a função de ser um sistema de backup para células suicidas no caso de a principal via apoptótica estiver defeituosa (DEGTEREV; YUAN, 2008; EISENBERG et al., 2010).

Para a identificação por citometria de fluxo de células em processo de morte por necrose, existem hoje vários marcadores, dentre eles a 7-amino-actinomicina (7-AAD). Esse marcador trata-se de um composto químico fluorescente com uma forte afinidade pela molécula de DNA. Ele se intercala com a dupla fita de DNA através de sua alta afinidade com regiões ricas no par de bases GC. Dessa forma, 7-AAD somente penetra células que apresentem dano membranar (LIU; CHEN; PATEL, 1991).

Em 1972, o termo "apoptose" foi usado pela primeira vez para descrever uma forma de morte celular associada com características morfológicas específicas. Desde então, a apoptose tem sido extensivamente estudada e eventos de sinalização subjacentes são agora bem caracterizados. Morfologicamente, a apoptose está associada com encolhimento celular, formação de bolhas membranares e condensação da cromatina. Trata-se de um mecanismo de morte programada das células que resulta na degradação controlada das mesmas em corpos apoptóticos que são, subsequentemente, reconhecidos e englobados pelos fagócitos circundantes. Duas principais famílias de proteínas evolutivamente conservadas estão envolvidas na apoptose, nomeadamente da família Bcl-2 de proteínas, que controlam a integridade mitocondrial (YOULE; STRASSER, 2008), e as proteases cisteinil-aspartato específicas ou caspases, que medeiam a fase de execução da apoptose (FUENTES-PRIOR; SALVESEN, 2004).

A apoptose é um mecanismo geneticamente programado que permite à célula iniciar um processo de morte programada (DUPREZ et al., 2009; FULDA et al., 2010; HOTCHKISS et al., 2009; WYLLIE, 2010). A apoptose é criticamente importante para a sobrevivência de organismos multicelulares por se livrar de células danificadas ou infectadas que podem interferir com a função normal (LABBÉ; SALEH, 2008; VICENCIO et al., 2008). A anexina V se mostrou útil na detecção de células apoptóticas em decorrência de sua ligação preferencial a fosfolípidos negativamente carregados, como a fosfatidilserina exposta no início do processo apoptótico (FRIES et al., 2014). As vias extrínseca e intrínseca representam os dois principais processos apoptóticos mais bem estudados (DUPREZ et al., 2009; SPRICK; WALCZAK, 2004).

A via extrínseca é mediada por um sub-grupo de uma superfamília de receptores do Fator de Necrose Tumoral (TNFR) que inclui TNFR, Fas e TRAILR. A ativação desses receptores leva ao recrutamento e ativação de caspases iniciadoras, como as caspases 8 e 10 (Figura 5). O processo envolve a formação e ativação de complexos tais como o complexo de sinalização indutor de morte (DISC). Nesse complexo, o Domínio de Morte Associado ao Fas (FADD) recruta as caspases iniciadoras 8 e/ou 10 através de interações por domínios de morte homotípicos (PETER; KRAMMER, 2003). Em contraste com a sinalização induzida por Fas e TRAILR, a agregação de TNFR1 leva à formação sequencial de dois complexos (WILSON; DIXIT; ASHKENAZI, 2009). O complexo I é formado na membrana plasmática e é constituído pelas seguintes moléculas: TNFR1, TRADD (Domínio de morte associado ao TNFR), TRAF2 (Fator associado ao TNFR tipo 2), RIP1 (Proteína integrada ao receptor serina/treonina cinase tipo 1) e as Proteínas Inibidoras de Apoptose (IAPs) cIAP1 e cIAP2. Essas proteínas são importantes mediadores da ativação induzida por TNF de NF- κ B e MAPKs. A endocitose do TNFR1 é seguida pela formação do complexo II, o qual é análogo do receptor proximal DISC induzido por FasL e TRAIL e inclui as seguintes moléculas: TRADD, FADD (Domínio de morte associado ao Fas) e caspase 8 e/ou 10. A ativação das caspases 8 e 10 leva à ativação sequencial das caspases executoras, tipicamente a caspase 3 (DUPREZ et al., 2009). A caspase 3 ativada é responsável pela clivagem dos chamados "substratos da morte" que levam às bem conhecidas marcas características de uma célula apoptótica descritas anteriormente (DUPREZ et al., 2009; WHELAN; KAPLINSKIY; KITSIS, 2010).

A via intrínseca é ativada por vários estímulos, como dano ao DNA e insultos citotóxicos, e age via mitocôndria, que é controlada pela família de proteínas Bcl-2 (YOULE; STRASSER, 2008). Em condições homeostáticas, os membros anti-apoptóticos da família Bcl-2 mantêm a integridade mitocondrial através da prevenção dos danos mitocondriais provenientes dos membros pró-apoptóticos da família Bcl-2, Bax e Bak. Durante o estresse celular, as proteínas Bcl-2 homólogas 3 (BH3) são ativadas e antagonizam os membros anti-apoptóticos da família Bcl-2. Consequentemente deixa de haver a inibição das proteínas Bax e Bak, levando às suas oligomerizações e formação de um canal mitocondrial pelo qual o citocromo c (cit c) é liberado para o citosol. Dessa forma, cit c associa-se com Apaf-1 (Fator Ativador de Protease Apoptótica1) e ATP, formando uma plataforma para recrutamento e ativação da pró-caspase 9 (RIEDL; SALVESEN, 2007). A caspase 9 ativada cliva e ativa as caspases executoras 3, 6 e 7 (LACASSE et al., 2008). A figura 3 mostra um esquema das vias de apoptose.

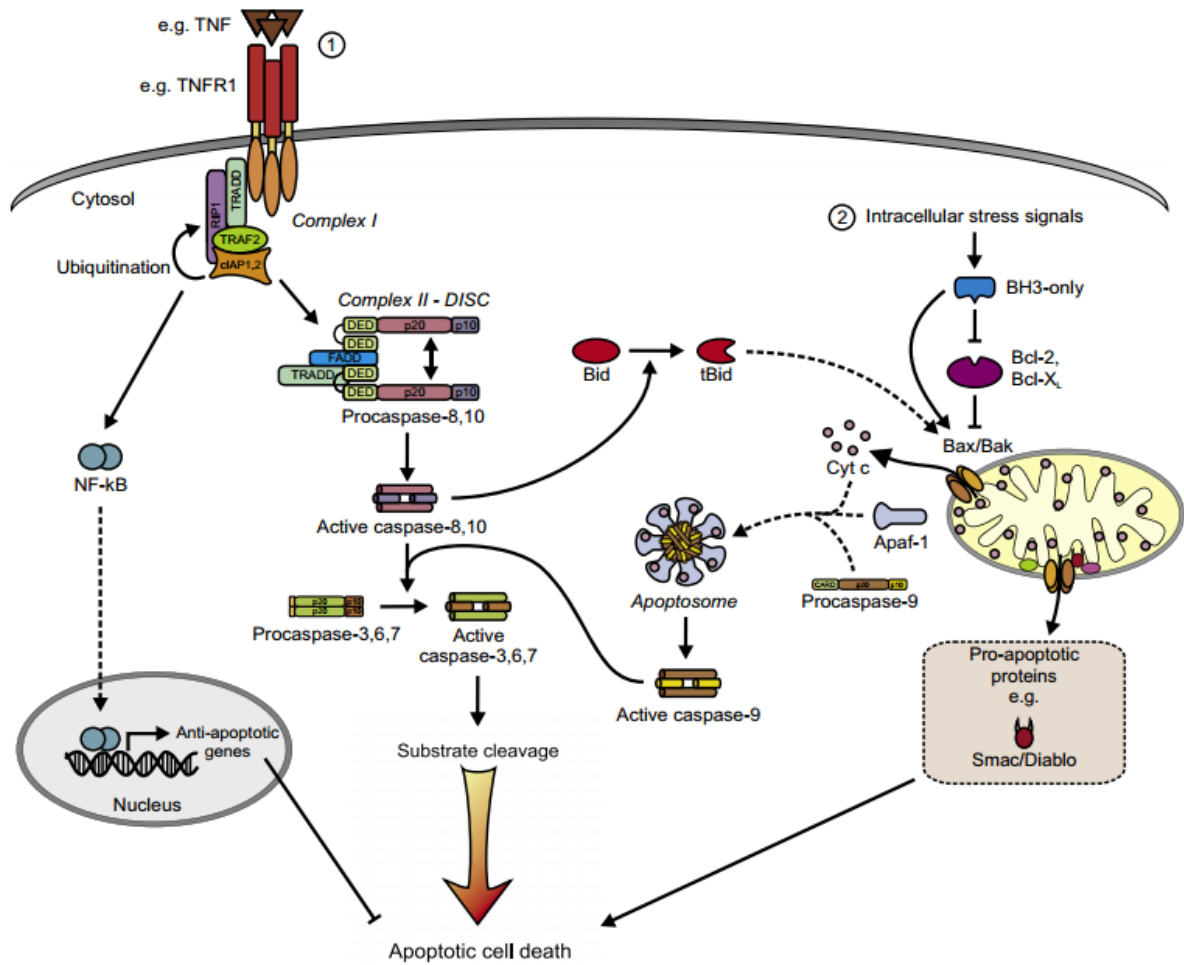


FIGURA 5. Representação esquemática da sinalização apoptótica extrínseca e intrínseca. Estimulação de, por exemplo, TNFR1 inicia a via extrínseca da apoptose (1). Sobre a estimulação de TNF, o complexo I é formado, resultando na ativação de NF-κB e subsequente transcrição de genes anti-apoptóticos. Depois da endocitose de TNFR1, o complexo II é formado, em que a caspase-8 é recrutada e ativada. A subsequente ativação das caspases executoras conduz à clivagem dos seus substratos e à morte celular. A via intrínseca da apoptose (2) é ativada por sinais de stress intracelulares a nível mitocondrial. Ativação de Bax e Bak induz a liberação de vários mediadores de apoptose mitocondrial. A formação subsequente dos apoptossomos resulta na ativação de caspase-9. Além disso, a clivagem de Bid mediada por caspase 8 amplifica a via extrínseca da apoptose através da ativação das vias mitocondriais. FONTE: (DUPREZ et al., 2009).

RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

No Brasil, o consumo de drogas pode ser considerado um dos maiores problemas sociais, sendo mesmo comparado a uma epidemia. Está claro que o uso indiscriminado de substâncias entorpecentes, além de causar danos irreparáveis à saúde do usuário, desestrutura famílias e destrói vidas, numa perspectiva física, psíquica e social (CASSIMIRO, 2009).

Não por acaso, mas diferente dos outros itens à venda, o preço pago pelo consumo de droga é alto, afinal com ela são vendidos os falsos e efêmeros gozos do prazer e da felicidade. Para aqueles que não conseguem controlar a ingestão dessas substâncias, o preço pode ser ainda mais alto. Num crescente, pode custar a própria vida (VETULANI, 2001).

O uso abusivo de medicamentos, a exemplo da benzidamina, representa uma ameaça à sociedade e à família, na medida em que pode trazer sérias consequências sociais, sobretudo, a desestruturação familiar, podendo ainda envolver um consumo considerável de recursos econômicos da sociedade (SCHENKER & MINAYO, 2003). Isto implica que o custo de oportunidade da alocação de recursos para o tratamento das consequências produzidas por esse problema é sabidamente muito elevado, inclusive para o tratamento e reabilitação dos dependentes.

Benzidamina é um anti-inflamatório não esteroideal muito utilizado e sintomas psicóticos foram relatados após abuso ou overdose, porém não existe nenhuma evidência clara sobre o mecanismo pelo qual a BEN provoca as alucinações. Estes sintomas transitórios podem resultar em complicações fatais ou em doenças crônicas (ACAR et al., 2014; BALABAN et al., 2013; DO et al., 2006; GÓMEZ-LÓPEZ et al., 1999; GÜRÜ et al., 2012).

Devido a todos os fatores sociais, econômicos e outros, faz-se importante um maior controle dessas drogas, além de um maior conhecimento sobre a ação das mesmas. Por isso, nosso estudo faz-se importante para o melhor conhecimento da substância cloridrato de benzidamina, que vem sendo usada abusivamente por jovens para obter sensações prazerosas em eventos informais.

OBJETIVO

3OBJETIVOS

3.1 Geral

Investigar os efeitos comportamentais e neuroquímicos em camundongos e os possíveis efeitos citotóxicos em cultura de células de astrócitos após tratamento com cloridrato de benzidamina.

3.2 Específicos

➤ Investigar os efeitos centrais de BEN nos testes comportamentais de campo aberto, inibição pré-pulso, labirinto em Y, reconhecimento de objetos, interação social e *rota rod* após tratamento agudo e de dose repetida por sete dias.

➤ Avaliar a concentração de monoaminas em corpo estriado durante o tratamento agudo e de dose repetida por sete dias com BEN através da técnica de HPLC e calcular a taxa de renovação das respectivas monoaminas.

➤ Determinar a concentração de BDNF em corpo estriado e hipocampo após o tratamento de dose repetida por sete dias com BEN.

➤ Avaliar a viabilidade celular *in vitro* de astrócitos corticais após incubação com BEN através do teste do MTT.

➤ Análisar o tipo de morte celular induzido pelo BEN em cultura de astrócitos após incubação com BEN através de citometria de fluxo.

➤ Investigar a possível via apoptótica envolvida na morte celular astrocitária após incubação com BEN através da marcação por imunofluorescência para caspase-8, caspase-9 e NFκB nas células astrocitárias após incubação com BEN.

MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos *Swiss* machos adultos (21-25 g), provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (UFC), mantidos a um ciclo claro/escuro de 12 h e ambientados em grupos de 15 animais por gaiola com livre acesso a comida e água. O projeto foi submetido ao Comitê de ética e pesquisa animal (Protocolo nº 27/15) do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC e os experimentos foram conduzidos de acordo com o Guia de Cuidados e Usos de Animais de Laboratório do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos da América. As tabelas 1 e 2 apresentam a distribuição dos animais nos grupos experimentais após tratamento agudo e de dose repetida por sete dias, respectivamente.

TABELA 1. Esquema de distribuição dos animais dentre os grupos do estudo para os ensaios comportamentais após tratamento agudo com BEN.

TRATAMENTO AGUDO					
TESTE COMPORTAMENTAL	Controle	BEN 50 mg/kg	BEN 100 mg/kg	BEN 200 mg/kg	TOTAL
Campo Aberto	8	8	8	8	32
Inibição Pré-pulso	8	8	8	8	32
Rota-rod	8	8	8	8	32
Y-maze	8	8	8	8	32
Reconhecimento de objeto	8	8	8	8	32
Interação Social	8	8	8	8	32
TOTAL	48	48	48	48	192

TABELA 2. Esquema de distribuição dos animais dentre os grupos do estudo para os ensaios comportamentais após tratamento de dose repetida por sete dias com BEN.

TRATAMENTO 7 DIAS					
TESTE COMPORTAMENTAL	Controle	BEN 50 mg/kg	BEN 100 mg/kg	BEN 200 mg/kg	TOTAL
Campo Aberto	8	8	8	8	32
Inibição Pré-pulso	8	8	8	8	32
Rota-rod	8	8	8	8	32
Y-maze	8	8	8	8	32
Reconhecimento de objeto	8	8	8	8	32
Interação Social	8	8	8	8	32
TOTAL	48	48	48	48	192

4.2 Drogas e Reagentes

Para o desenvolvimento da presente pesquisa foi utilizado o Cloridrato de Benzidamina (Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA) nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg. A compra da substância foi devidamente realizada para fins de pesquisa.

Para o preparo da droga teste, a substância foi dissolvida em água destilada para a obtenção de doses finais anteriormente citadas. Os controles receberam veículo (água destilada, 10 mL/kg). A droga teste e o veículo foram administrados por gavagem conforme cada protocolo experimental descrito adiante.

Para os testes de imunofluorescência foram usados os anticorpos “Anti-rabbit caspase 8 (SC-7890)”, “Anti-rabbit caspase 9 (SC-7885)” e “Anti-rabbit NFκB p65 (SC-372)” provenientes da empresa Santa Cruz Biotechnology®. “Alexa Fluor 488 Donkey Anti-rabbit (A21206)” e “DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, D1306)” foram obtidos pela empresa Invitrogen® (Carlsbad, CA). “Fluoromalt (S3023) foi obtida pela empresa DAKO® (Dinamarca).

4.3 Protocolo de administração

Três grupos de animais (n = 8 a 10) foram tratados com BEN (50, 100 e 200 mg/kg) durante 1 ou 7 dias consecutivos, enquanto o grupo controle recebeu água destilada pelo mesmo período. Após o tratamento, os animais foram submetidos aos testes do campo aberto, inibição pré-pulso, labirinto em Y, reconhecimento de objetos, interação social e *rota rod* para a avaliação dos efeitos centrais após 60 minutos da 1ª ou da 7ª administração da droga teste ou controle. Posteriormente às determinações comportamentais, os camundongos foram sacrificados por decapitação e o corpo estriado foi dissecado, rapidamente congelado e armazenado a -80° C até a realização dos ensaios neuroquímicos. As figuras 6 e 7 representam os esquemas dos protocolos experimentais agudo e de dose repetida de sete dias, respectivamente.

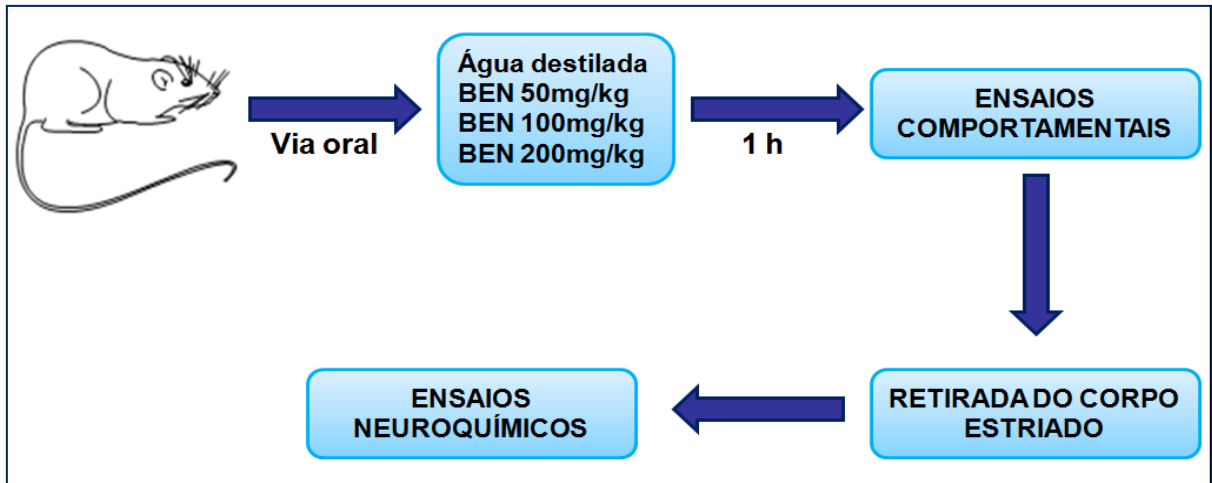


FIGURA 6. Protocolo experimental do tratamento agudo. Os animais foram divididos em quatro grupos: Controle (administrou-se água destilada), BEN 50mg/kg, BEN 100mg/kg e BEN 200mg/kg. A administração foi realizada de forma aguda 1 hora antes dos ensaios comportamentais. Para cada ensaio, utilizou-se grupos diferentes de animais. Após os ensaios, os animais foram sacrificados e seus corpos estriados removidos para as análises neuroquímicas.

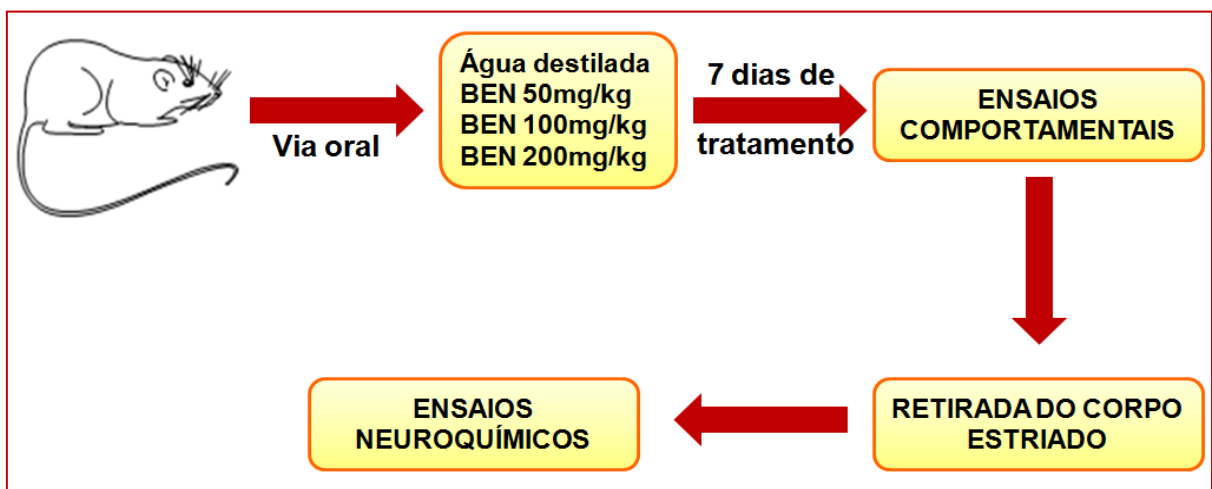


FIGURA 7. Protocolo experimental do tratamento de dose repetida por sete dias. Os animais foram divididos em quatro grupos: Controle (administrou-se água destilada), BEN 50mg/kg, BEN 100mg/kg e BEN 200mg/kg. A administração foi realizada durante sete dias seguidos. Após 1 h da administração do sétimo dia, realizou-se os ensaios comportamentais. Para cada ensaio, utilizou-se grupos diferentes de animais. Após os ensaios, os animais foram sacrificados e seus corpos estriados removidos para as análises neuroquímicas.

4.4 PROTOCOLO 1: Ensaios Comportamentais

4.4.1 Teste do Campo Aberto

O presente experimento é utilizado para avaliar a atividade exploratória do animal (ARCHER, 1973). Os animais foram colocados em um campo aberto, com área de 30 x 30 cm. Previamente, foram habituados durante 1 minuto ao campo aberto e, posteriormente, submetidos ao teste durante 5 minutos. O parâmetro para observação foi o número de cruzamentos com as quatro patas (movimentação espontânea ou atividade locomotora espontânea/ALE), Atividade de exploração vertical (*rearing*) e atividade de auto-limpeza (*grooming*), registrados durante um período de 5 minutos.



FIGURA 8. Esquema dos parâmetros analisados no teste do campo aberto. FONTE: Arquivo pessoal.

4.4.2 Teste da Inibição pré-pulso

Inibição pré-pulso (IPP) é caracterizada pela redução do reflexo de sobressalto a um estímulo acústico intenso (pulso), quando imediatamente precedido por um estímulo de menor intensidade (pré-pulso) (HOFFMAN; ISON, 1980b; SWERDLOW et al., 2008a).

Os animais foram colocados em um contensor (4,5 x 5,0 x 5,5 cm) com barras de aço inoxidável de 3,0 mm de diâmetro e espaçamento de 0,8 cm de distância. O contensor foi mantido preso sobre uma balança, chamada de plataforma de resposta, através de quatro parafusos em miniatura. Um alto-falante localizado a 15 cm do contensor foi usado para fornecer os estímulos de pulso, pré-pulso e ruído

de fundo. O contensor, a plataforma e o alto-falante foram localizados dentro de uma câmara acústica ventilada (64 x 60 x 40 cm). Procedimentos de calibração foram realizados antes dos experimentos para garantir sensibilidades equivalentes das plataformas de resposta ao longo do período de teste.

A sessão de testes começou ao colocar um animal no contensor para a aclimatização e consistiu em uma exposição de 5 minutos ao ruído de fundo (65 dB). Após o período de aclimatização, os camundongos foram apresentados a uma série de 10 estímulos de treino (pulso sozinho – 120 dB, 50ms de duração), com um ensaio de intervalo de 20s. O objetivo dessa fase foi permitir a habituação da resposta de sobressalto do animal. Posteriormente, a modulação IPP de sobressalto foi testada no seguinte protocolo: consistiu de 74 ensaios pseudorandomizados divididos em oito categorias diferentes, apresentados com um intervalo interestímulos de 20s: 20 apresentações de pulso sozinho (120 dB, 50ms de duração), 8 apresentações de cada intensidade de pré-pulso sozinho (70, 75 e 80 dB, frequência de 3000 Hz, 20ms de duração), 10 apresentações de cada intensidade de pré-pulso + intensidade de pulso (com intervalo de 50ms entre pré-pulso e pulso) e ausência de estímulo (nesse bloco o animal só recebeu o estímulo de ruído de fundo) (LEVIN et al., 2011). Foram utilizadas três intensidades de pré-pulso diferentes para que o teste tivesse maior veracidade, como se o mesmo fosse feito em triplicata.

A média da amplitude de resposta de sobressalto aos ensaios de pulso sozinho (P) e pré-pulso + pulso (PP + P) foi calculada para cada animal. O nível de IPP em cada camundongo foi definido como a porcentagem da redução da amplitude do sobressalto nos ensaios de PP + P em comparação com a amplitude do sobressalto nos ensaios de P, de acordo com a seguinte fórmula: $\%IPP = 100 - [100 \times (PP + P/P)]$. Usando essa fórmula, um valor de IPP de 0% denota que não houve diferença entre a amplitude da resposta de sobressalto do pulso sozinho e do pré-pulso + pulso e, conseqüentemente, não houve IPP (LEVIN et al., 2011).

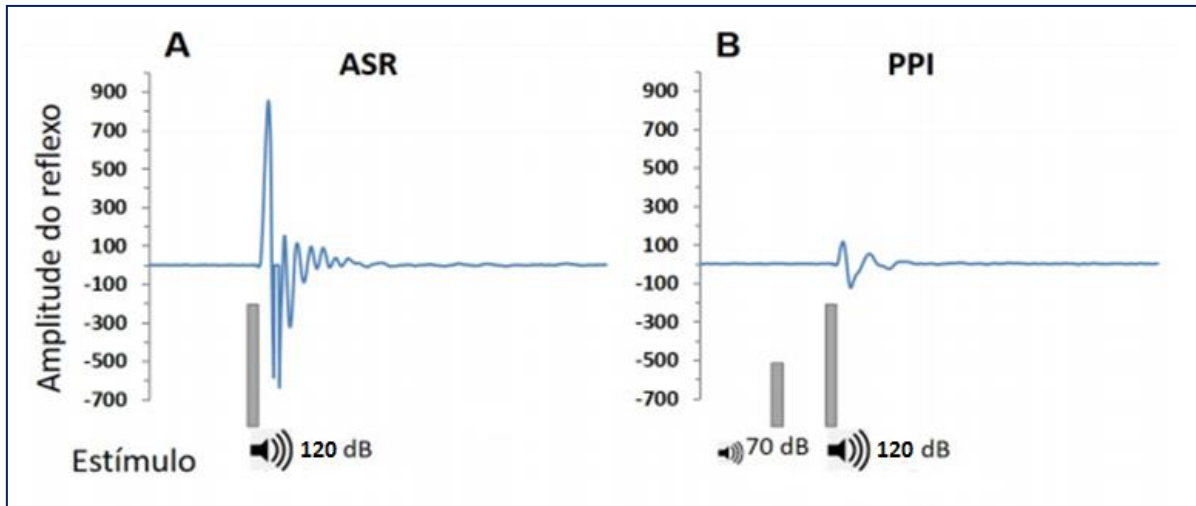


FIGURA 9. Esquema de registro da amplitude do reflexo auditivo de sobressalto (ASR) e da amplitude de sobressalto após inibição por estímulo prévio (PPI). Em A, a apresentação de um estímulo sonoro de alta intensidade (120 dB) desencadeia uma resposta de sobressalto no animal com grande amplitude. Em B, a amplitude do reflexo diminui após o estímulo sonoro desencadeante ser precedido por um estímulo sonoro de menor intensidade (70 dB). FONTE: Adaptado de: http://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/137935/martins_mg_me_bot_par.pdf?sequence=3&isAllo wed=y.

4.4.3 Teste do Labirinto em Y

A memória de trabalho foi avaliada por meio de um teste de Labirinto em Y, que permite avaliar o comportamento cognitivo exploratório. O labirinto consiste em 3 braços idênticos de 40 cm de comprimento, 25 cm de altura e 6 cm de largura cada convergindo a um ângulo igual. Cada camundongo foi colocado na extremidade de um braço e deixado para explorar o ambiente por 8 minutos. A sequência dos braços em que os animais entram foi então anotada e as informações analisadas de forma a determinar o número de entradas no braço sem repetição. Uma alternância foi considerada correta se o animal visitar um novo braço e não retornar ao braço anteriormente visitado. Assim, a porcentagem das alternâncias foi calculada como a razão entre as alternâncias corretas (n) e o número de visitas realizadas durante o período de observação ($n-2$), multiplicado por 100 (DALL'IGNA et al., 2007; YAMADA et al., 1996).

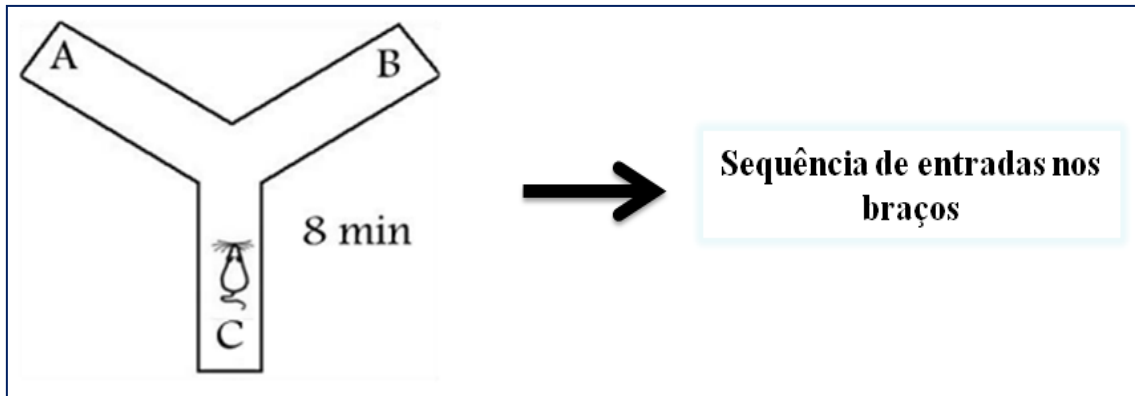


FIGURA 10. Esquema do experimento labirinto em Y. FONTE: Arquivo pessoal.

4.4.4 Teste do Reconhecimento de objetos

A memória de reconhecimentos de objetos é a capacidade de discriminar entre os objetos que tenham sido previamente encontrados e objetos que não tenham. Roedores possuem uma tendência natural para gastar mais tempo explorando novos objetos que aqueles conhecidos. Após um período de reconhecimento de cinco minutos no campo aberto que foi realizado 24h antes do experimento, os animais foram submetidos a uma adaptação de cinco minutos a dois objetos de plástico semelhantes entre si que foram colocados em locais equidistantes um do outro. Em seguida, os animais foram retirados do campo aberto por um período de 2 minutos. Após esse período, os animais retornaram ao campo aberto, que agora possuía um dos objetos familiares e um novo objeto que possuía cor e forma diferentes. No teste foram registrados os seguintes parâmetros: tempo gasto para explorar cada objeto (novo e familiar), sendo considerado exploração quando o animal ficou com o focinho até 0,5 cm do objeto. A principal medida foi a razão de discriminação dos objetos, sendo estabelecida pelo tempo gasto em explorar o novo objeto dividido pela soma dos tempos gastos para explorar o novo objeto e o objeto familiar ($t_{\text{novo}}/t_{\text{novo}} + t_{\text{familiar}}$) (ENNACEUR; DELACOUR, 1988).

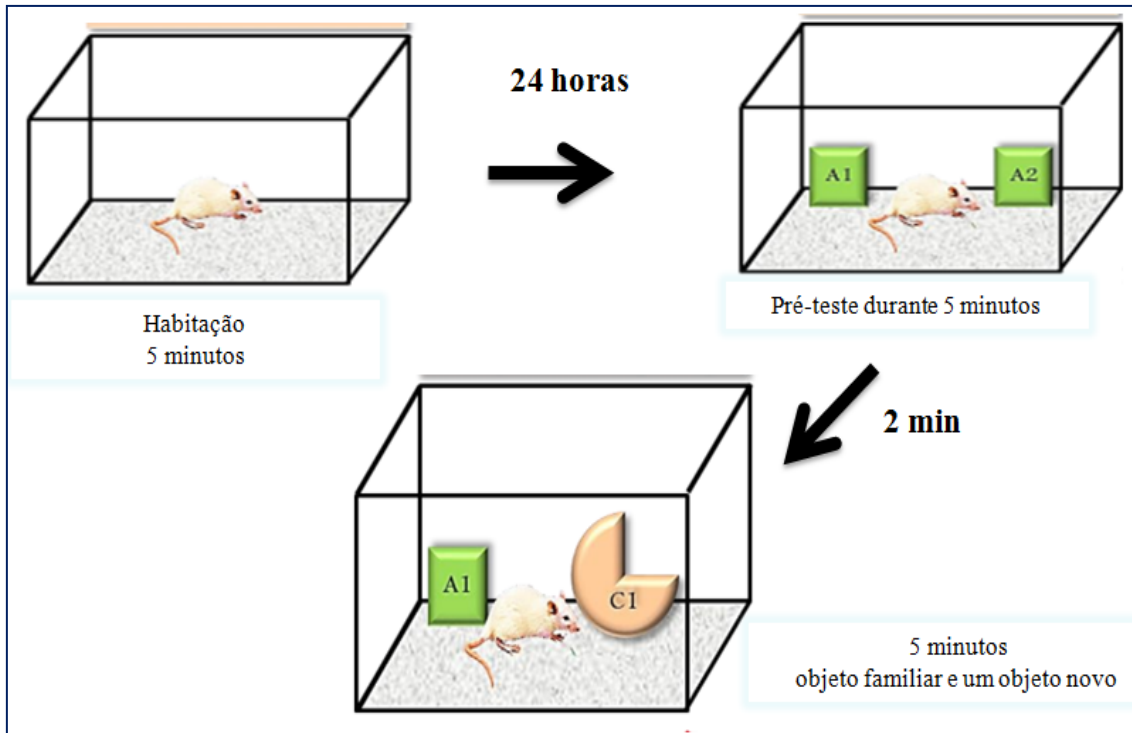


FIGURA 11. Esquema do experimento reconhecimento de objetos. FONTE: Arquivo pessoal.

4.4.5 Teste de Interação Social

Os animais foram inseridos em um aparato de acrílico (60 × 40 cm) dividido em três compartimentos. Em um dos compartimentos da lateral havia uma gaiola de ferro contendo um animal do mesmo sexo e idade (câmara social), na outra lateral havia uma gaiola de ferro sem animal em seu interior (câmara oposta) e no meio a caixa ficará livre. Os animais foram inseridos na câmara do meio e seus comportamentos registrados durante cinco minutos (RADYUSHKIN et al., 2009). Foi avaliado: o tempo (em segundos) que o animal permanece explorando o compartimento com animal (TPCS), assim como, o tempo gasto (em segundos) cheirando a gaiola com animal (TIS) e o número total de entradas na câmara com animal (NECS).



FIGURA 12. Foto do aparelho do experimento de interação social. FONTE: <http://www.cebiolog.com.br/comportamento--labirinto--rastreamento.html>.

4.4.6 Teste do *Rota Rod*

Para o teste do *rota rod*, os animais foram colocados com as quatro patas sobre uma barra de 2,5 cm de diâmetro, a 25 cm acima do chão, a qual esteve em rotação a 12 rpm. Para cada animal, foram registrados o número de quedas e o tempo de permanência sobre a barra por 1 min (DUNHAM; MIYA, 1957). Antes da administração do BEN ou da água destilada para o grupo controle, os animais foram submetidos a um pré-teste para excluir do tratamento aqueles animais que já apresentavam um déficit motor.

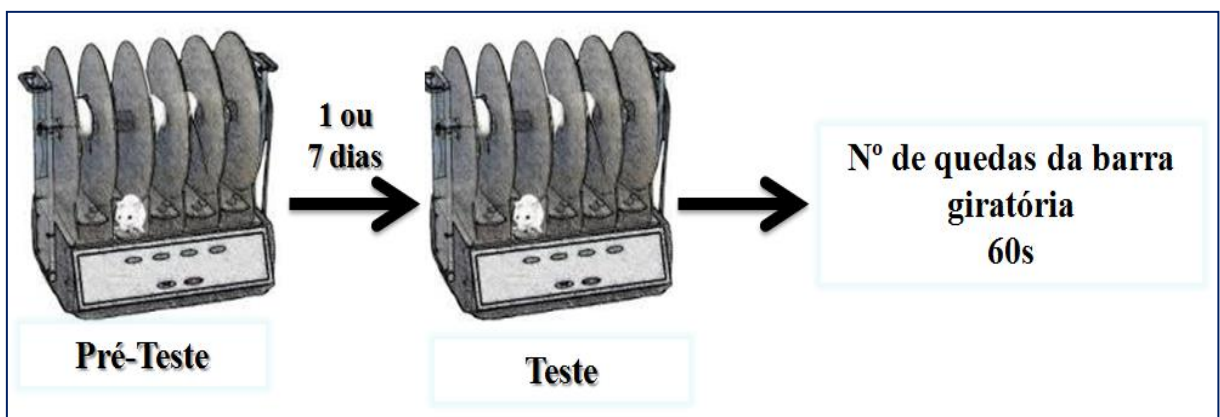


FIGURA 13. Esquema do experimento *rota rod*. FONTE: Arquivo pessoal.

4.5 PROTOCOLO 2: Análise Neuroquímica

4.5.1 Determinação da concentração de monoaminas e seus metabólitos com HPLC em Corpo Estriado

Para a determinação dos níveis de catecolaminas foi utilizado o equipamento de HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Performance). Na cromatografia líquida clássica, um adsorvente (alumina ou sílica) é empacotado em uma coluna e é eluído por um líquido ideal (fase móvel). Uma mistura para ser separada é introduzida na coluna e é carregada através da mesma por um líquido eluente (fase móvel). Se um composto da mistura (soluto) é adsorvido fracamente pela superfície da fase sólida estacionária, ele atravessará a coluna mais rapidamente que um outro soluto que seja mais fortemente adsorvido. Então, a separação dos solutos é possível se existem diferenças na adsorção pelo sólido. Os detectores eletroquímicos medem a condutância do eluente ou a corrente associada com a oxidação ou redução dos solutos. Para ser capaz de detectar no primeiro caso, os solutos devem ser iônicos e no segundo caso, os solutos devem ter a característica de serem relativamente fáceis de oxidarem ou reduzirem.

Detectores eletroquímicos que medem corrente associada com a redução ou oxidação de solutos são chamados detectores amperométricos ou colométricos. Neste estudo foi utilizado o tipo amperométrico que reage com uma quantidade muito menor de soluto, em torno de 1 %. Todas as técnicas eletroquímicas envolvem a aplicação de um potencial para um eletrodo (geralmente de carbono vítreo), oxidação da substância que está sendo estudada próximo à superfície do eletrodo seguindo a amplificação e medida da corrente produzida. As catecolaminas são oxidadas nos grupos de anel hidroxil para produzir um derivado ortoquinona com a liberação de dois elétrons.

Os tecidos cerebrais foram homogeneizados em ácido perclórico (HClO_4) 1% e centrifugados por 15 minutos em centrífuga refrigerada (4°C) a 15.000 rpm. A amostra foi filtrada e uma alíquota de 20 μL do sobrenadante foi, então, injetada no equipamento de HPLC, para a análise química.

Para a análise das catecolaminas, uma coluna BDS HYPERSIL C18 com comprimento de 250 mm, calibre 4,6 mm e de partícula de 5 μm , da ThermoScientific, foi utilizada. A fase móvel utilizada foi composta por tampão ácido

cítrico 0,163 M, pH 3,0, contendo ácido octanosulfônico sódico(SOS) 0,69 M, como reagente formador do par iônico, acetonitrila 4% v/v e tetrahidrofurano 1,7% v/v. NA, DA, DOPAC, HVA, 5-HT e 5-HIAA foram eletronicamente detectados usando um detector amperométrico (Modelo L-ECD-6A da Shimadzu, Japão) pela oxidação em um eletrodo de carbono vítreo fixado em 0,85V relativo a um eletrodo de referência de Ag-AgCl (HALLMAN; JONSSON, 1984).

4.5.2 Determinação das concentrações do Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF) em corpo estriado e hipocampo após tratamento de dose repetida com BEN

Após homogeneização das áreas cerebrais a 20 volumes com tampão PBS pH 7,4 adicionado de inibidores de protease (Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA). O nível de BDNF de cada amostra foi quantificado por ensaio imunoenzimático (ELIZA; R&D Systems, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Os resultados foram expressos em picograma de BDNF/g de tecido total.

4.6 PROTOCOLO 3: Ensaios *in vitro* de Viabilidade celular

4.6.1 Linhagem e cultivo celular

As células astrocitárias corticais imortalizadas foram gentilmente cedidas pela Professora Dra. Soraya Smaili Soubhi (Laboratório de Sinalização de Cálcio e Morte Celular - Universidade Federal de São Paulo). A linhagem de células astrocitárias transformadas foi mantida e tratada no Laboratório de Cultivo Celular (LCC) do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal do Ceará sob a coordenação da Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins.

As células foram cultivadas em Meio DEMEM suplementado com soro bovino fetal (10%), antibióticos (100.000U/mL de penicilina, 10mg/mL estreptomicina), incubadas em estufa a 37°C, atmosfera de 95% de umidade e 5% de CO₂. A cada três dias a metade do meio de cultura foi trocada por um novo meio.

4.6.2 Avaliação do efeito citotóxico do BEN através do ensaio com MTT

Os astrócitos foram tratados com BEN nas concentrações de 3,1 µg/mL, 6,2 µg/mL, 12,5 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL e 100 µg/mL por um período de 12 ou 24 horas. Após os tratamentos das células, o substrato da cultura foi retirado e então adicionado 10µL de 3-(4,5-dimetilazil-2-il)-2,5 difeniltetrazólico (MTT) dissolvido em PBS (500µg/mL). Este método baseou-se na atividade metabólica de células viáveis, formando um produto colorido (sal de formazan, que é insolúvel em água). Após incubação por 4 horas à 37°C em estufa com 5% de CO₂, o sobrenadante foi removido e adicionado SDS (10%) em HCl 0,01N para solubilizar os cristais de formazan. As placas foram incubadas por 17h e, em seguida, uma leitura espectrofotométrica foi realizada em um comprimento de onda de 570nm (MOSMANN, 1983).

4.6.3 Avaliação do mecanismo de morte celular envolvido no efeito citotóxico do BEN por citometria de fluxo

Para esse teste, foi utilizado a IC₅₀, IC_{50/2} e IC_{50x2} de BEN do período de incubação de 24horas. Nesse estudo, as células foram incubadas com BinsVT (100 e 50 µg/mL) e PBS (controle negativo) por 24 horas em placas de 24 poços. Em seguida, o sobrenadante de cultivo foi removido e centrifugado a 2000 rpm por 5 minutos para coleta de células em suspensão. Adicionalmente, as células aderidas foram lavadas com PBS, tripsinizadas e misturadas ao *pellet* obtido do sobrenadante. As misturas foram mais uma vez centrifugadas e o precipitado obtido foi lavado 2 vezes com PBS e ressuspensão em 490 µL de tampão de ligação (Hepes/NaOH 10 mM, NaCl 140 mM, CaCl₂ 2,5 mM, pH 7,4). As suspensões foram tratadas com solução de Anexina V-PE e 7-amino-actino-micina (7-AAD) (BD Pharmigen®, ambos na concentração final de 5µg/mL) por 15 minutos ao abrigo da luz. Por fim, as amostras foram centrifugadas, ressuspensas em 500 µL de tampão de ligação e analisadas em citômetro de fluxo (FACSCalibur®, BD Pharmigen) para contagem de células não-marcadas, marcadas unicamente com 7-AAD ou anexina V-PE ou marcadas duplamente.

4.6.4 Avaliação da via apoptótica envolvida com o efeito citotóxico do BEN através de imunofluorescência para caspase 8, caspase 9 e NFκB

Para esse teste, foi utilizado a IC₅₀ do período de incubação de 24 horas. Para o ensaio de imunofluorescência, os astrócitos cultivados (1x10⁵ células/mL) foram lavados (5 minutos) com solução salina tamponada com fosfato (PBS) e fixados em metanol arrefecido em gelo durante 10 min. Após a fixação, as células foram permeabilizadas e bloqueadas através de incubação das mesmas em um tampão de permeabilização/bloqueio (0,25% de Triton X-100 e 1% de BSA em PBS) durante 1 h à temperatura ambiente. As células foram então lavadas três vezes com tampão de lavagem (0,025% de Triton X-100, 0,2% de BSA em PBS) e incubadas com anticorpo primário diluído em tampão de lavagem para caspase-8 (1: 100), caspase-9 (1: 100) ou NFκBp65 (1 : 100) durante a noite a 4°C. Em seguida, as células foram lavadas em tampão de lavagem e coradas com anticorpos secundário anti-coelho conjugado com Alexa488 (1: 500) a 37°C durante 1 h. Seguindo o protocolo, os núcleos foram corados com DAPI. No final do protocolo de coloração, as células foram montadas em lâminas de vidro utilizando fluoromalt (DAKO). As imagens foram obtidas por meio de um microscópio confocal (LM 710, Zeiss, Alemanha), utilizando uma objetiva de 40x / NA 1.4. A intensidade de imunofluorescência (IF) foi obtida através do programa ImageJ (NIH, Bethesda, EUA) e foi calculada como a densidade integrada por célula corrigida para o fundo.

4.7 Análise estatística

A análise dos dados foi realizada através do *software GraphPad Prism*, versão 6.0 para *Windows*, expressos como média ± erro padrão da média (EPM). Para os ensaios comportamentais e neuroquímicos foi utilizado o One-way ANOVA seguido por Student Newman Keuls. O ensaio comportamental de inibição pré-pulso utilizou o Two-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

Para a análise do teste de MTT e da citometria de fluxo, utilizou-se o ANOVA seguido de Dunnet. Para a análise das imunofluorescências, utilizou-se o teste não-pareado Student's *t*-test.

Os dados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 PROTOCOLO 1: Ensaio Comportamentais

5.1.1 Campo Aberto

Os parâmetros analisados nesse teste foram: atividade locomotora espontânea (ALE) e atividade de exploração vertical (*rearing*). As figuras 14 e 15 mostram os resultados desse experimento.

No tratamento agudo, BEN em todas doses aumentou ALE [Controle: $32,63 \pm 3,88$; 50mg/kg: $50,13 \pm 6,60$; 100mg/kg: $56,57 \pm 4,64$; 200mg/kg: $55,40 \pm 5,10$] em relação ao grupo controle. As doses de 50 e 100 mg/kg foram capazes de aumentar o *rearing* [Controle: $1,62 \pm 0,70$; 50mg/kg: $10,67 \pm 1,54$; 100mg/kg: $6,33 \pm 0,61$] quando comparados com o grupo controle, diferentemente da dose de 200mg/kg [$2,67 \pm 0,76$] (FIGURA 14).

Em relação ao tratamento de 7 dias, BEN na dose de 200mg/kg aumentou ALE em relação ao grupo controle [Controle: $40,83 \pm 5,04$; 200mg/kg: $69,00 \pm 7,11$], diferentemente das doses mais baixas [50mg/kg: $34,00 \pm 6,43$; 100mg/kg: $40,57 \pm 5,21$]. Todas as doses foram capazes de diminuir o *rearing* quando comparados com o grupo controle [Controle: $4,80 \pm 0,86$; 50mg/kg: $1,40 \pm 0,68$; 100mg/kg: $2,20 \pm 0,37$; 200mg/kg: $1,33 \pm 0,42$] (FIGURA 15).

TRATAMENTO AGUDO

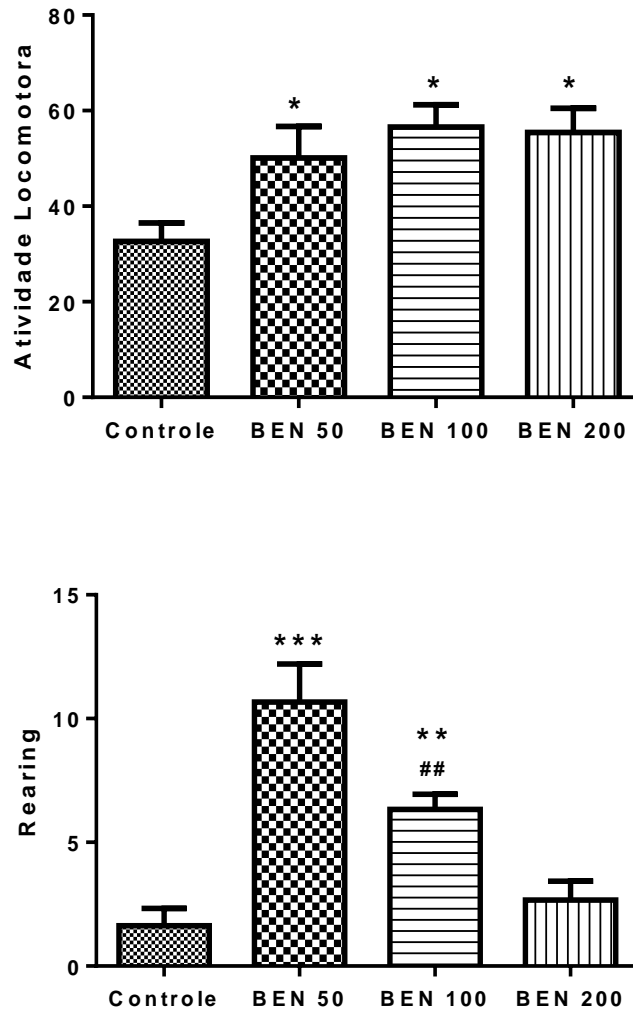


FIGURA14 -Efeito de BEN sobre a atividade locomotora espontânea (ALE) e rearing no teste do campo aberto após tratamento agudo. Controle (água destilada) e Benzidamina (BEN: 50, 100 ou 200 mg/kg) foram administrados por via oral 1h antes do experimento. Os valores da figura representam a média \pm EPM durante 5 min de experimento. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ quando comparados ao grupo controle. ## $p < 0,01$ quando comparado ao grupo BEN 50mg/kg.

TRATAMENTO 7 DIAS

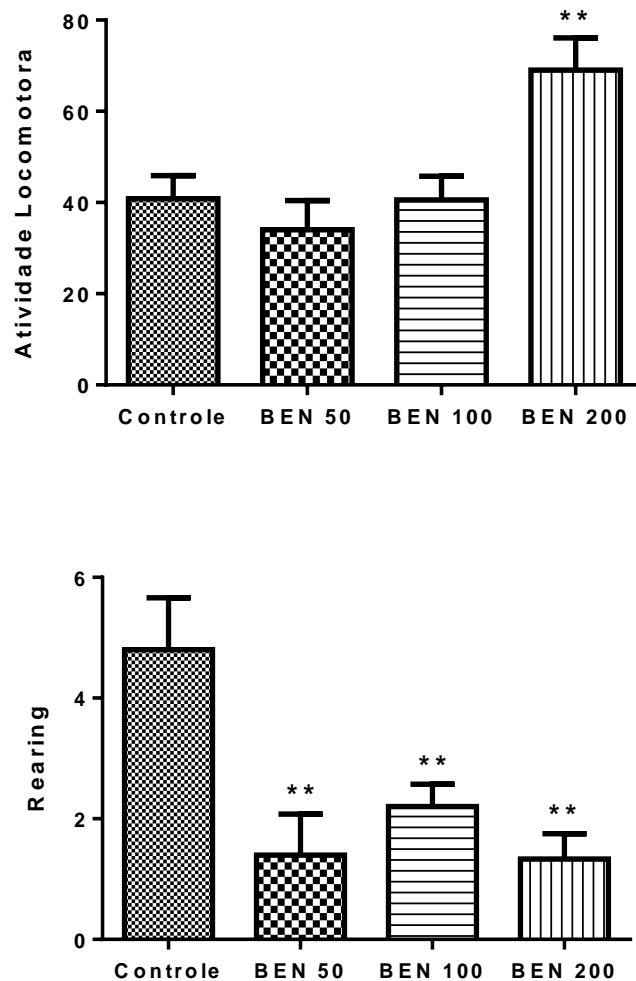


FIGURA 15- Efeito de BEN sobre a atividade locomotora espontânea (ALE) e *rearing* no teste do campo aberto após tratamento de dose repetida de 7 dias. Controle (água destilada) e Benzidamina (BEN: 50, 100 ou 200 mg/kg) foram administrados por 7 dias por via oral. O experimento foi realizado 1h depois do tratamento realizado no último dia. Os valores da figura representam a média ± EPM durante 5 min de experimento. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls. ** $p < 0,01$ quando comparado ao grupo controle.

5.1.2 Inibição Pré-pulso (IPP)

A análise dos dados do teste de Inibição pré-pulso por two-way ANOVA dos animais tratados com BEN mostrou efeito significativo do tratamento apenas na dose de 200mg/kg tanto no tratamento agudo [$F(3, 66) = 14,99$, $P < 0,0001$] como no de 7 dias [$F(3, 60) = 23,57$, $P < 0,0001$]. As menores doses não apresentaram alteração significativa em ambos os períodos de tratamento. A análise post hoc pelo teste de Bonferroni revelou uma diminuição significativa da IPP nos animais tratados com BEN 200 em ambos os tratamentos agudo e de 7 dias nas intensidades de pulso de 70, 75 e 80 em comparação com animais controle, não havendo alterações significativas nos animais tratados com BEN 50 e BEN 100 em ambos os períodos de administração da droga. A figura 16 mostra os resultados desse experimento.

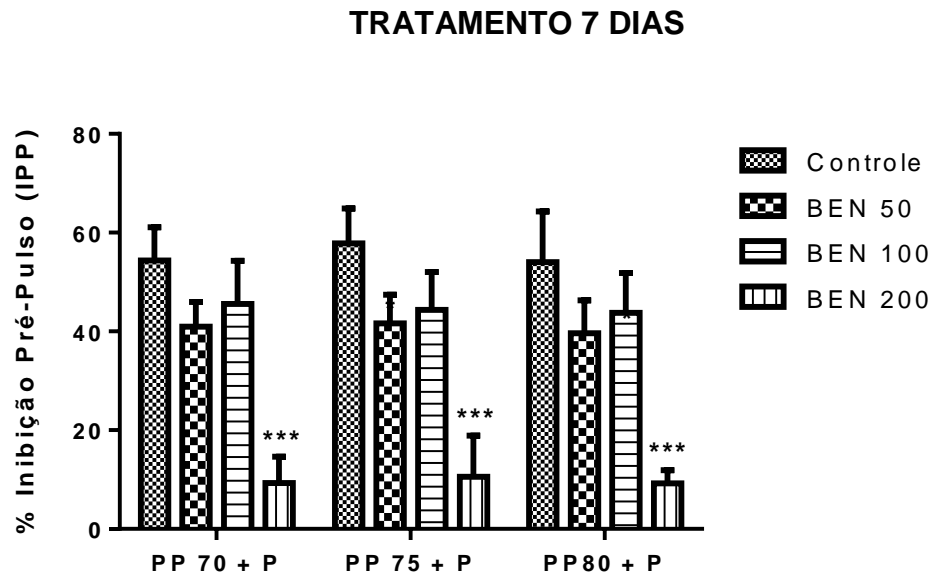
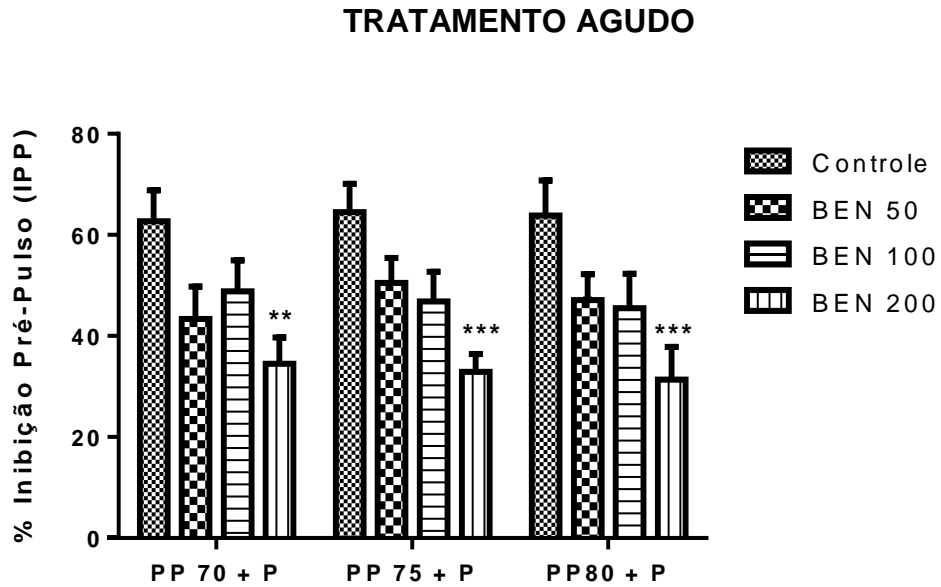


FIGURA 16 -Percentual de Inibição Pré-Pulso após o tratamento agudo ou de 7 dias. Controle (água destilada) e Benzidamina (BEN: 50, 100 ou 200 mg/kg) foram administrados por 7 dias por via oral. O experimento foi realizado 1h depois do tratamento realizado no último dia. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. Two-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni foram utilizados para a análise. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ quando comparados ao grupo controle.

5.1.3 Teste do Labirinto em Y

Na figura 17, a análise de percentual de alternâncias corretas pelo teste do labirinto em Y mostrou que a administração de BEN nas três doses e em ambos os tratamentos conseguiu reduzir significativamente o número de alternâncias corretas [AGUDO: Controle: $79,26 \pm 4,82$; 50mg/kg: $63,05 \pm 2,90$; 100mg/kg: $62,47 \pm 3,01$; 200mg/kg: $56,79 \pm 4,66$] [7 DIAS: Controle: $71,82 \pm 2,24$; 50mg/kg: $60,79 \pm 2,70$; 100mg/kg: $60,14 \pm 3,05$; 200mg/kg: $55,55 \pm 4,04$] quando comparados ao grupo controle tanto no tratamento agudo como no sub-crônico.

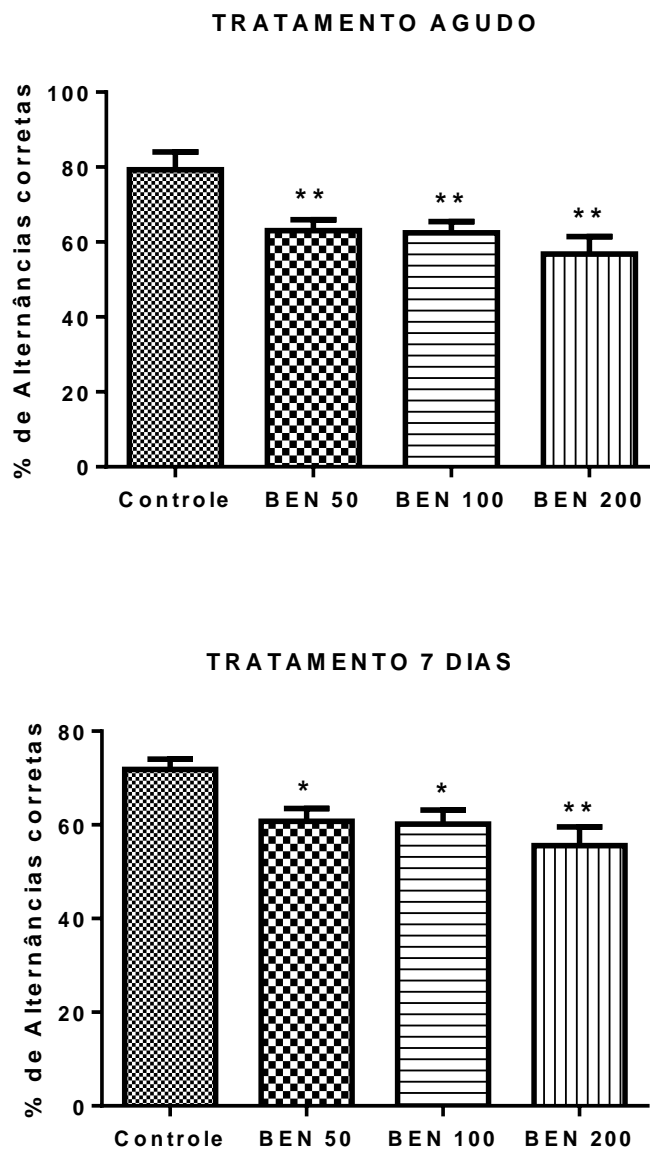


FIGURA 17–Percentagem do número de alternâncias corretas no teste do labirinto em Y após tratamento agudo e de dose repetida por 7 dias de BEN nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg. Controle (água destilada) e Benzidamina (BEN: 50, 100 ou 200 mg/kg) foram administrados por via oral. No tratamento agudo, o experimento realizou-se 1h após as administrações. No tratamento de sete dias, o experimento foi realizado 1h depois do tratamento realizado no último dia. Os valores da figura representam a média \pm EPM durante 8 min de experimento. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ quando comparado ao grupo controle.

5.1.4 Teste do Reconhecimento de Objetos

No teste reconhecimento de objeto, avaliamos a memória de curto prazo. A administração de BEN nas três doses e em ambos os tratamentos conseguiu reduzir a memória de curto prazo [AGUDO: Controle: $0,58 \pm 0,02$; 50mg/kg: $0,35 \pm 0,03$; 100mg/kg: $0,40 \pm 0,02$; 200mg/kg: $0,38 \pm 0,04$] [7 DIAS: Controle: $0,60 \pm 0,08$; 50mg/kg: $0,35 \pm 0,05$; 100mg/kg: $0,33 \pm 0,06$; 200mg/kg: $0,37 \pm 0,08$] quando comparados ao grupo controle tanto no tratamento agudo como no sub-crônico. A figura 18 mostra os resultados desse experimento.

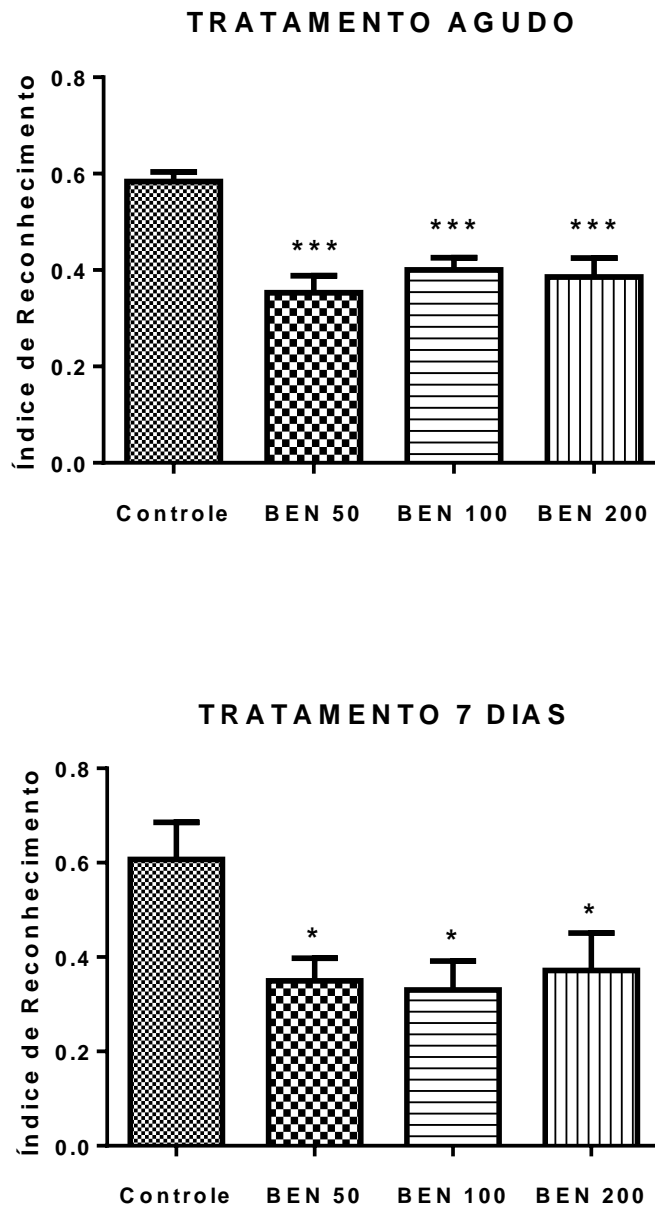


FIGURA 18– Índice de Reconhecimento de objetos após tratamento agudo e de dose repetida por 7 dias com BEN nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg. Controle (água destilada) e Benzidamina (BEN: 50, 100 ou 200 mg/kg) foram administrados por via oral. No tratamento agudo, o experimento realizou-se 1h após as administrações. No tratamento de sete dias, o experimento foi realizado 1h depois do tratamento realizado no último dia. Os valores da figura representam a média ± EPM. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ quando comparado ao grupo controle.

5.1.5 Teste de Interação Social

No teste de interação social, BEN nas doses de 100 e de 200 mg/kg foi capaz provocar um isolamento social significativo visto pelos parâmetros TPCS [Controle: $163,7 \pm 6,53$; 100mg/kg: $121,9 \pm 8,07$; 200mg/kg: $134,4 \pm 8,17$] e TIS [Controle: $67,64 \pm 4,86$; 100mg/kg: $49,09 \pm 5,08$; 200mg/kg: $37,33 \pm 5,37$] quando comparados ao grupo controle no tratamento agudo. Não houve alteração significativa no parâmetro NECS (FIGURA 19).

Já no tratamento de sete dias, somente a maior dose de BEN (200mg/kg) conseguiu causar um isolamento social significativo visto nos parâmetros TPCS [Controle: $167,00 \pm 10,49$; 200mg/kg: $91,00 \pm 24,7$] e TIS [Controle: $52,5 \pm 6,69$; 200mg/kg: $10,40 \pm 4,41$] quando comparado ao grupo controle. Não houve alteração significativa no parâmetro NECS (FIGURA 20).

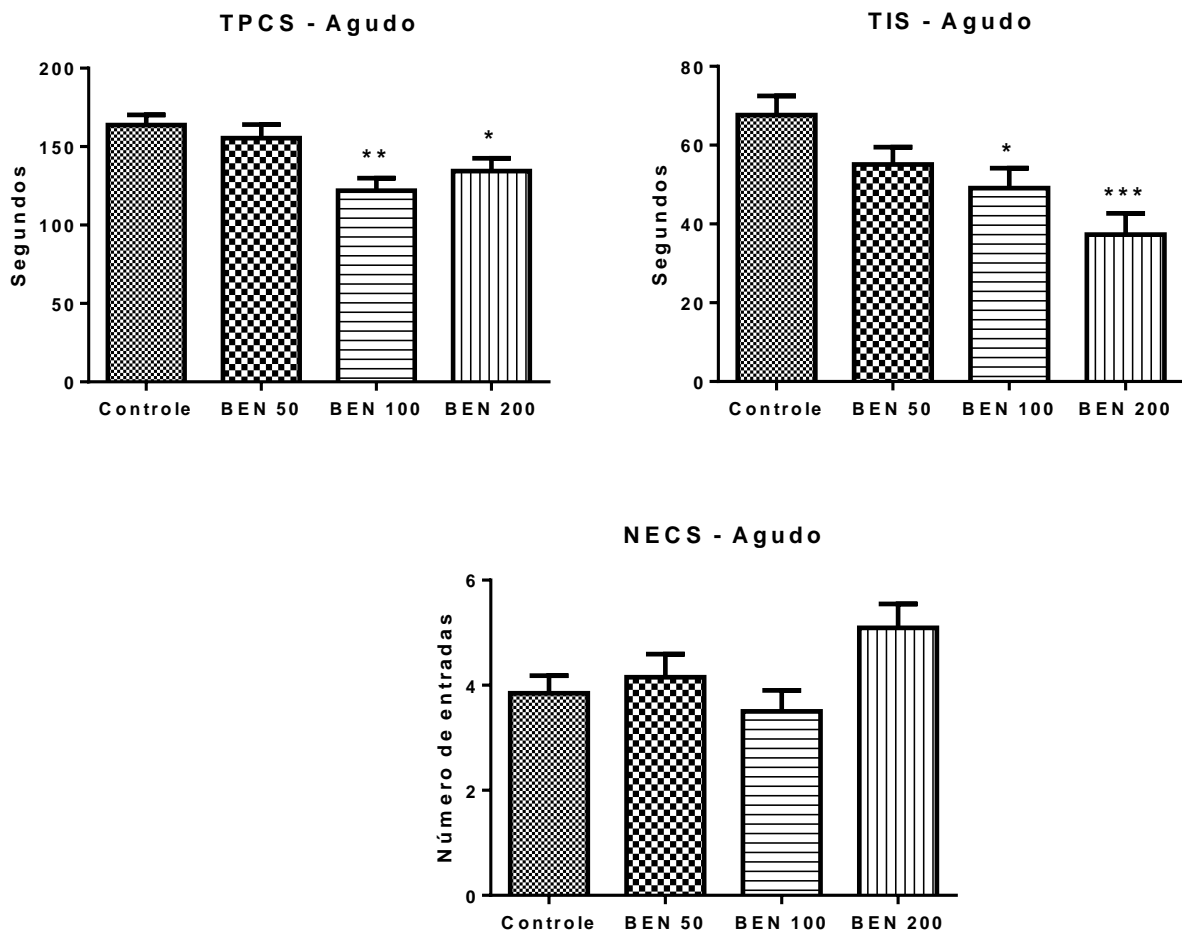


FIGURA 19- Efeito de BEN no teste de Interação Social após tratamento agudo. Controle (água destilada) e Benzidamina (BEN: 50, 100 ou 200 mg/kg) foram administrados 1 hora antes do experimento por via oral. Os valores da figura representam a média \pm EPM durante 5 min de experimento. TPCS: Tempo de permanência na câmara social; TIS: Tempo de interação social; NECS: Número de entradas na câmara social. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ quando comparados ao grupo controle.

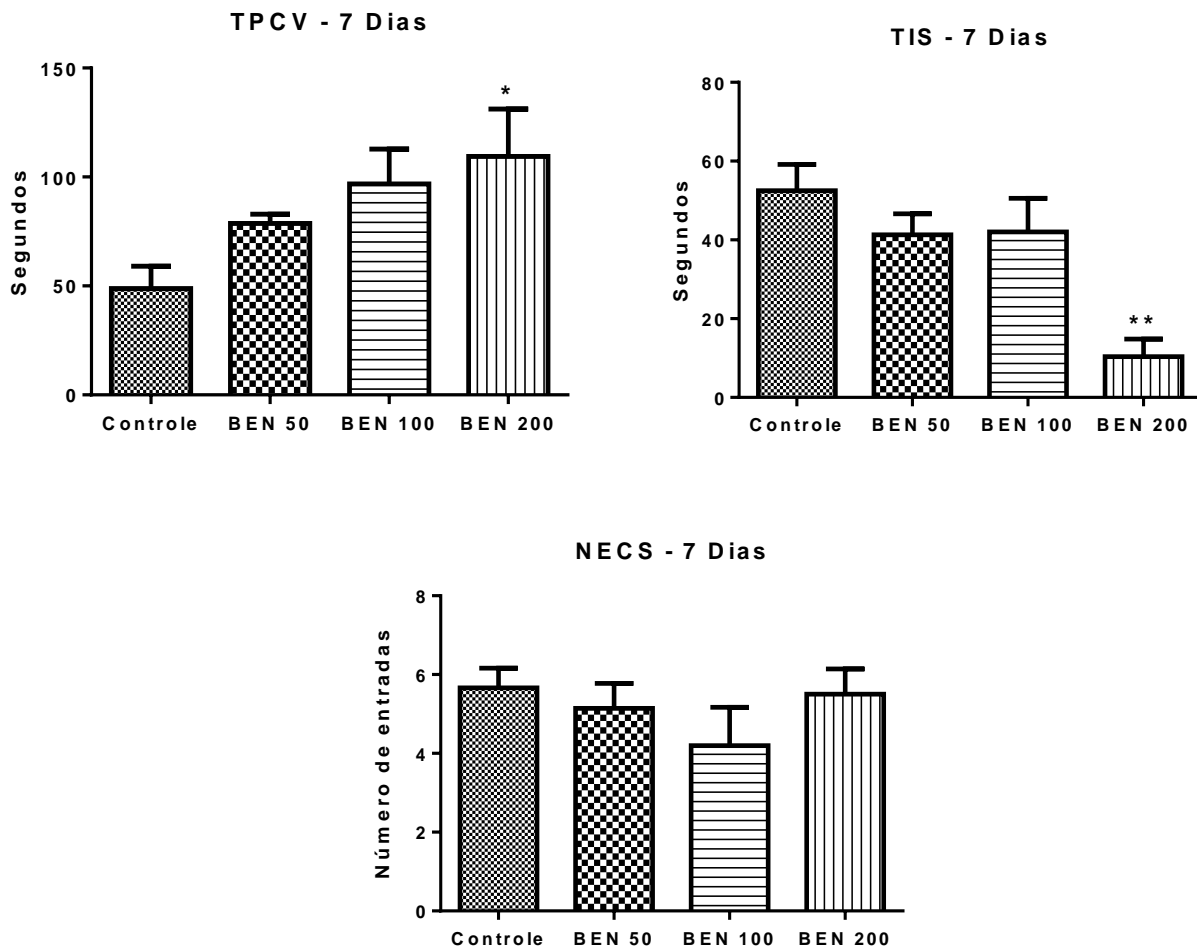


FIGURA 20- Efeito de BEN no teste de Interação Social após tratamento de dose repetida de 7 dias. Controle (água destilada) e Benzidamina (BEN: 50, 100 ou 200 mg/kg) foram administrados durante 7 dias e o experimento foi realizado 1 hora depois da administração do último dia. Os valores da figura representam a média \pm EPM durante 5 min de experimento. TPCS: Tempo de permanência na câmara social; TIS: Tempo de interação social; NECS: Número de entradas na câmara social. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ quando comparados ao grupo controle.

5.1.6 Teste do *Rota rod*

No teste *rota rod* foi avaliado a atividade de coordenação motora, observando o número de quedas durante 60 segundos. BEN, em ambos os tratamentos e em todas as doses, não alterou significativamente o número de quedas [AGUDO: Controle: $0,57 \pm 0,14$; 50mg/kg: $0,47 \pm 0,13$; 100mg/kg: $0,44 \pm 0,18$; 200mg/kg: $0,37 \pm 0,18$] [7 DIAS: Controle: $0,00 \pm 0,00$; 50mg/kg: $0,60 \pm 0,24$; 100mg/kg: $0,75 \pm 0,25$; 200mg/kg: $0,57 \pm 0,20$] quando comparado ao grupo controle (FIGURA 21).

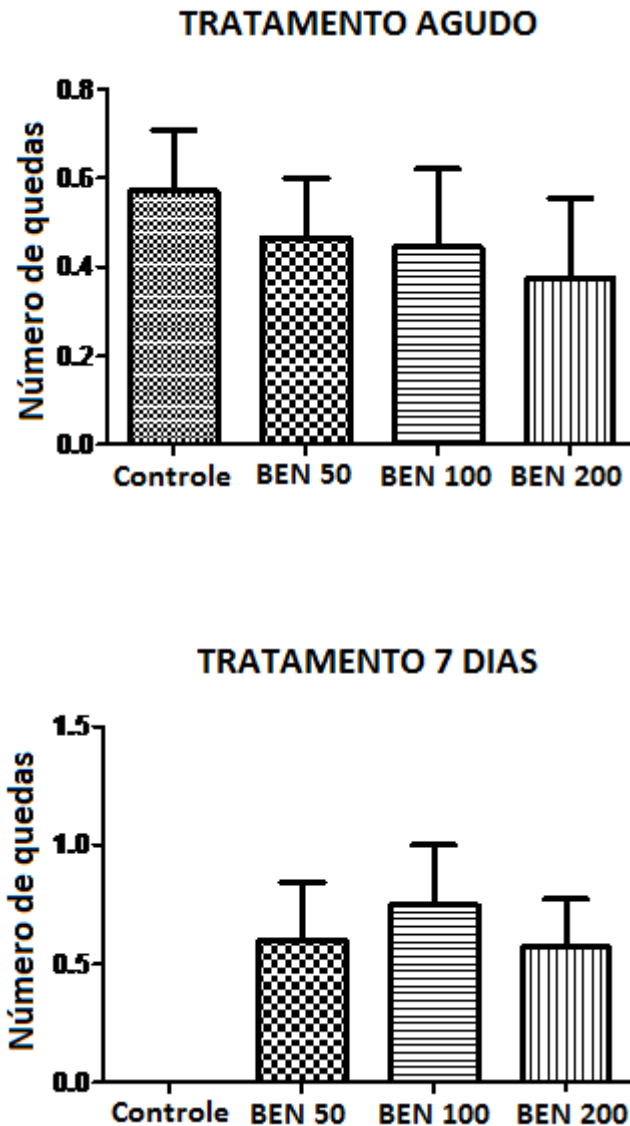


FIGURA 21–Número de quedas no teste do *rota rod* após tratamento agudo e de sete dias com BEN. Controle (água destilada) e Benzidamina (BEN: 50, 100 ou 200 mg/kg) foram administrados por via oral. No tratamento agudo, o experimento realizou-se 1h após as administrações. No tratamento de sete dias, o experimento foi realizado 1h depois do tratamento realizado no último dia. Os valores da figura representam a média \pm EPM. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls.

5.2 PROTOCOLO 2: Análise Neuroquímica

5.2.1 Determinação das concentrações de dopamina e seus metabólitos (DOPAC e HVA) no corpo estriado

No tratamento agudo, BEN nas três doses administradas conseguiu reduzir os níveis de dopamina presentes no corpo estriado quando comparados ao grupo controle [Controle: $3,83 \times 10^{-8} \pm 2,95 \times 10^{-9}$; 50mg/kg: $8,33 \times 10^{-9} \pm 9,57 \times 10^{-10}$; 100mg/kg: $3,39 \times 10^{-9} \pm 7,71 \times 10^{-10}$; 200mg/kg: $2,63 \times 10^{-9} \pm 4,66 \times 10^{-10}$]. Os níveis de DOPAC não foram alterados de forma significativa [CONTROLE: $1,37 \times 10^{-8} \pm 1,17 \times 10^{-9}$; 50mg/kg: $1,25 \times 10^{-8} \pm 5,81 \times 10^{-10}$; 100mg/kg: $1,63 \times 10^{-8} \pm 1,78 \times 10^{-9}$; 200mg/kg: $1,30 \times 10^{-8} \pm 7,91 \times 10^{-10}$]. Já os níveis de HVA foram aumentados significativamente nas três doses quando comparados ao grupo controle [Controle: $3,01 \times 10^{-9} \pm 2,30 \times 10^{-10}$; 50mg/kg: $6,11 \times 10^{-9} \pm 1,49 \times 10^{-10}$; 100mg/kg: $7,15 \times 10^{-9} \pm 6,58 \times 10^{-10}$; 200mg/kg: $6,51 \times 10^{-9} \pm 8,83 \times 10^{-10}$] (FIGURA 22).

A taxa de renovação no tratamento agudo aumentou nas doses de 100 e 200 mg/kg tanto para DOPAC como para HVA e para a taxa de metabolização total quando comparados ao grupo controle. A dose de 50mg/kg não apresentou diferença significativa. [DOPAC/DA: Controle: $0,39 \pm 0,02$; 50mg/kg: $2,24 \pm 0,44$; 100mg/kg: $4,66 \pm 1,42$; 200mg/kg: $4,86 \pm 0,46$] [HVA/DA: Controle: $0,09 \pm 0,003$; 50mg/kg: $0,82 \pm 0,12$; 100mg/kg: $2,38 \pm 0,66$; 200mg/kg: $2,72 \pm 0,36$] [DOPAC+HVA/DA: Controle: $0,35 \pm 0,04$; 50mg/kg: $2,06 \pm 0,42$; 100mg/kg: $4,66 \pm 1,42$; 200mg/kg: $4,47 \pm 0,42$] (FIGURA 23).

Já no tratamento de dose repetida, BEN na dose de 50 mg/kg conseguiu reduzir os níveis de dopamina quando comparados ao grupo controle [Controle: $4,02 \times 10^{-8} \pm 9,37 \times 10^{-9}$; 50mg/kg: $2,53 \times 10^{-8} \pm 1,60 \times 10^{-9}$], enquanto as outras doses não tiveram mudanças significativas [100mg/kg: $3,20 \times 10^{-8} \pm 3,30 \times 10^{-9}$; 200mg/kg: $3,90 \times 10^{-8} \pm 2,44 \times 10^{-9}$]. DOPAC apresentou seus níveis elevados nas três doses em relação ao grupo controle [Controle: $1,22 \times 10^{-8} \pm 5,13 \times 10^{-10}$; 50mg/kg: $3,29 \times 10^{-8} \pm 2,07 \times 10^{-9}$; 100mg/kg: $3,62 \times 10^{-8} \pm 2,39 \times 10^{-9}$; 200mg/kg: $2,87 \times 10^{-8} \pm 2,19 \times 10^{-9}$]. HVA, assim como o DOPAC, apresentou níveis elevados após tratamento com as três doses de BEN quando comparados ao grupo controle [Controle: $5,40 \times 10^{-9} \pm 6,72 \times 10^{-10}$].

¹⁰; 50mg/kg: $1,02 \times 10^{-8} \pm 8,33 \times 10^{-10}$; 100mg/kg: $1,37 \times 10^{-8} \pm 5,50 \times 10^{-10}$; 200mg/kg: $1,24 \times 10^{-8} \pm 1,20 \times 10^{-9}$] (FIGURA 24).

A taxa de renovação no tratamento de dose repetida aumentou nas doses de 50 e 100 mg/kg tanto para DOPAC como para HVA e para a taxa de metabolização total quando comparados ao grupo controle. A dose de 200mg/kg não apresentou diferença significativa. [DOPAC/DA: Controle: $0,54 \pm 0,14$; 50mg/kg: $1,49 \pm 0,09$; 100mg/kg: $1,22 \pm 0,14$; 200mg/kg: $0,69 \pm 0,07$] [HVA/DA: Controle: $0,20 \pm 0,04$; 50mg/kg: $0,45 \pm 0,03$; 100mg/kg: $0,43 \pm 0,03$; 200mg/kg: $0,31 \pm 0,03$] [DOPAC+HVA/DA: Controle: $0,54 \pm 0,14$; 50mg/kg: $1,53 \pm 0,09$; 100mg/kg: $1,29 \pm 0,14$; 200mg/kg: $0,69 \pm 0,07$] (FIGURA 25).

TRATAMENTO AGUDO

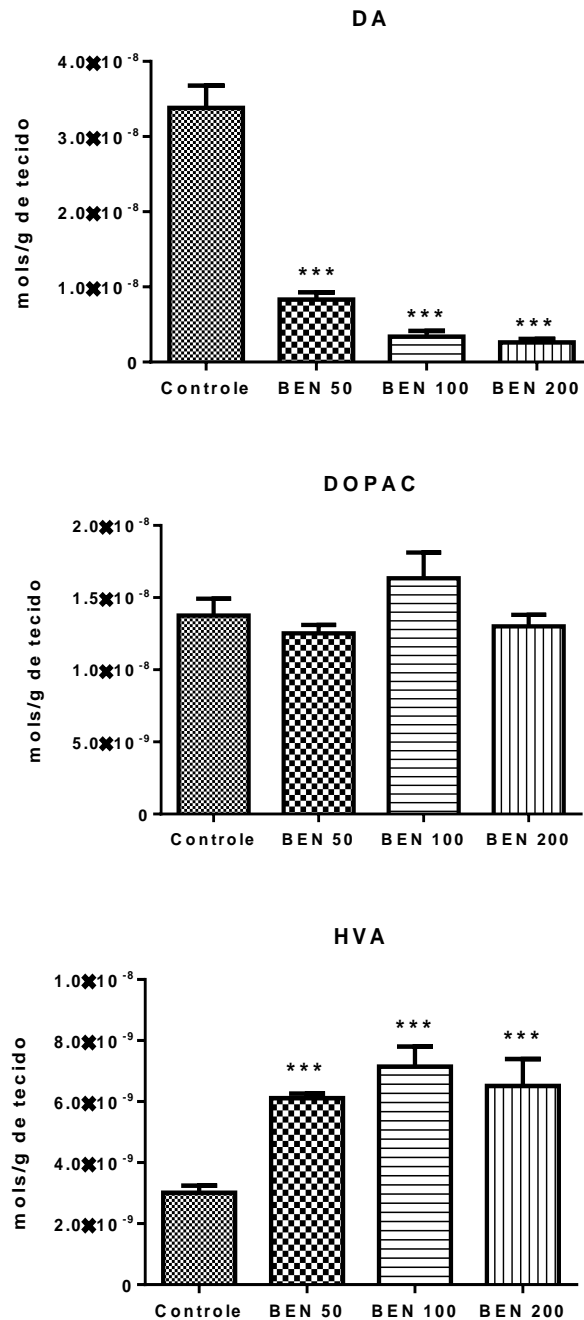


Figura 22– Efeito do tratamento agudo com BEN nas doses de 50, 100 e 200mg/kg sobre as concentrações estriatais de dopamina, DOPAC e HVA. Controle (água destilada) e Benzidamina (BEN: 50, 100 ou 200 mg/kg) foram administrados por via oral 1 hora antes da retirada dos corpos estriados para análise em HPLC. Os valores da figura representam a média \pm EPM. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls. *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo controle.

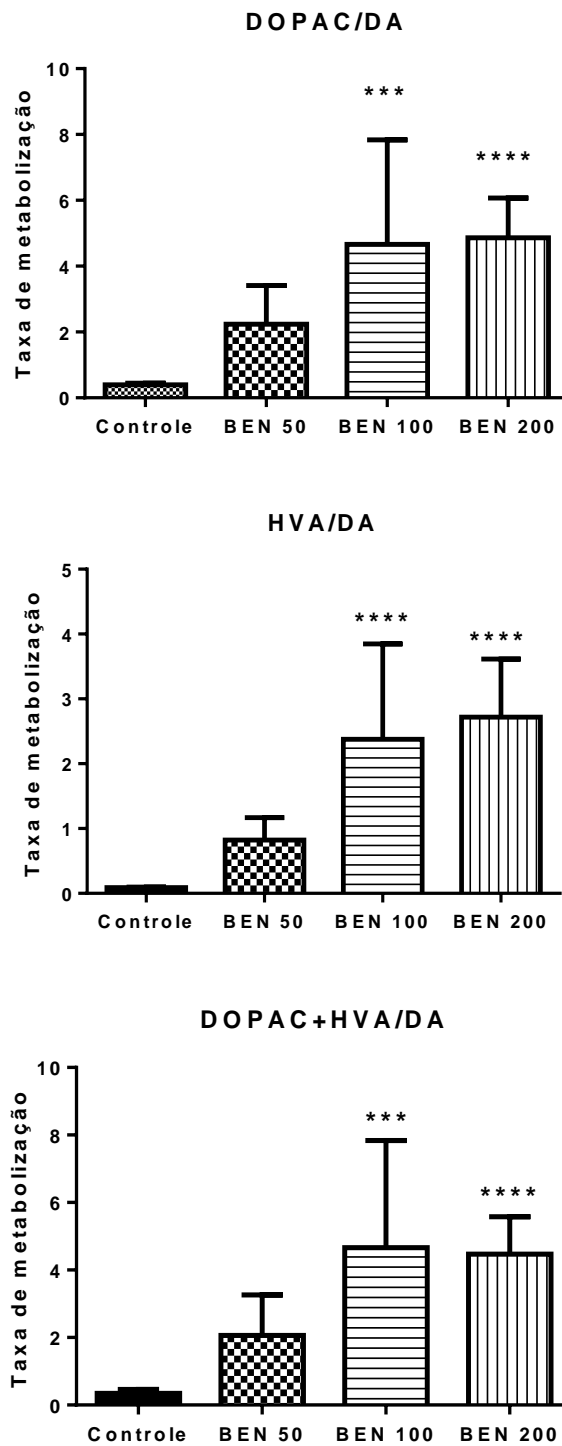


Figura 23– Efeito do tratamento agudo com BEN nas doses de 50, 100 e 200mg/kg sobre a taxa de renovação de DA. Controle (água destilada) e Benzidamina (BEN: 50, 100 ou 200 mg/kg) foram administrados por via oral 1 hora antes da retirada dos corpos estriados para análise em HPLC. Os valores da figura representam a média ± EPM. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Dunnet. *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo controle.

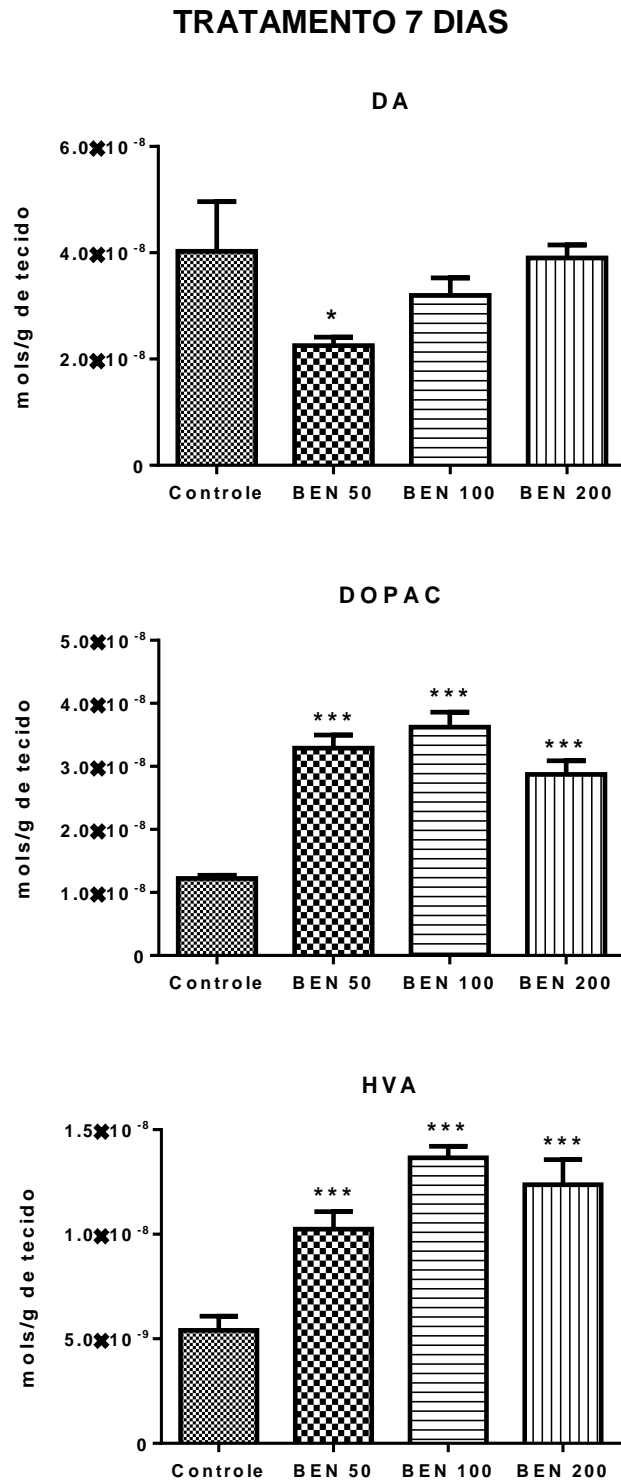


Figura 24– Efeito do tratamento de dose repetida de sete dias com BEN nas doses de 50, 100 e 200mg/kg sobre as concentrações estriatais de dopamina, DOPAC e HVA. Controle (água destilada) e Benzidamina (BEN: 50, 100 ou 200 mg/kg) foram administrados por via oral durante 7 dias e os corpos estriados foram retirados 1 hora depois da administração do último dia para análise em HPLC. Os valores da figura representam a média ± EPM. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo controle.

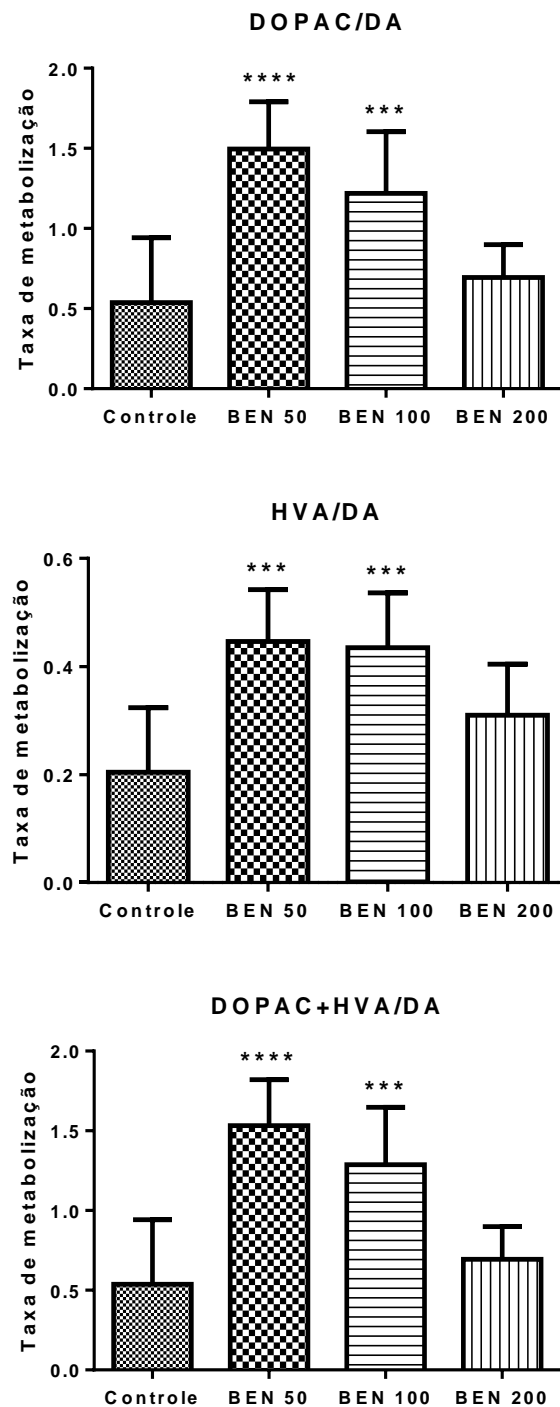


Figura 25– Efeito do tratamento de dose repetida de sete dias com BEN nas doses de 50, 100 e 200mg/kg sobre a taxa de renovação de DA. Controle (água destilada) e Benzidamina (BEN: 50, 100 ou 200 mg/kg) foram administrados por via oral durante 7 dias e os corpos estriados foram retirados 1 hora depois da administração do último dia para análise em HPLC. Os valores da figura representam a média \pm EPM. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Dunnet. *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ quando comparado ao grupo controle.

5.2.2 Determinação das concentrações de serotonina e seu metabólito (5-HIAA) no corpo estriado

No tratamento agudo, BEN nas três doses administradas conseguiu reduzir os níveis de serotonina presentes no corpo estriado quando comparados ao grupo controle [Controle: $1,40 \times 10^{-9} \pm 1,48 \times 10^{-10}$; 50mg/kg: $6,15 \times 10^{-10} \pm 9,50 \times 10^{-11}$; 100mg/kg: $3,67 \times 10^{-10} \pm 1,54 \times 10^{-10}$; 200mg/kg: $5,28 \times 10^{-10} \pm 1,62 \times 10^{-10}$]. Os níveis de 5-HIAA também foram reduzidos após o tratamento com BEN nas três doses quando comparados ao grupo controle [Controle: $3,74 \times 10^{-9} \pm 2,31 \times 10^{-10}$; 50mg/kg: $6,24 \times 10^{-10} \pm 6,13 \times 10^{-11}$; 100mg/kg: $8,05 \times 10^{-10} \pm 8,78 \times 10^{-11}$; 200mg/kg: $1,36 \times 10^{-9} \pm 3,66 \times 10^{-10}$] (FIGURA 26).

A taxa de renovação no tratamento agudo diminuiu na dose de 50 mg/kg e não alterou nas doses de 100 e 200 mg/kg quando comparados ao grupo controle [5-HIAA/5-HT: Controle: $2,54 \pm 0,32$; 50mg/kg: $1,01 \pm 0,06$; 100mg/kg: $2,03 \pm 0,56$; 200mg/kg: $2,41 \pm 0,34$] (FIGURA 27).

Já no tratamento de 7 dias, BEN nas doses de 100 e 200 mg/kg conseguiu aumentar os níveis de serotonina quando comparadas ao grupo controle [Controle: $1,95 \times 10^{-9} \pm 3,54 \times 10^{-10}$; 100mg/kg: $4,36 \times 10^{-9} \pm 3,15 \times 10^{-10}$; 200mg/kg: $5,89 \times 10^{-9} \pm 7,26 \times 10^{-10}$]. A dose de 50 mg/kg, pelo contrário, não apresentou mudança significativa nos níveis de serotonina [$2,26 \times 10^{-9} \pm 2,35 \times 10^{-10}$]. Os níveis de 5-HIAA foram aumentados após o tratamento com as três doses de BEN quando comparados ao grupo controle [Controle: $3,52 \times 10^{-10} \pm 1,10 \times 10^{-10}$; 50mg/kg: $2,03 \times 10^{-9} \pm 3,18 \times 10^{-10}$; 100mg/kg: $2,20 \times 10^{-9} \pm 2,42 \times 10^{-10}$; 200mg/kg: $2,32 \times 10^{-9} \pm 2,42 \times 10^{-10}$] (FIGURA 28).

A taxa de renovação no tratamento de dose repetida diminuiu na dose de 50 mg/kg e não alterou nas doses de 100 e 200 mg/kg quando comparados ao grupo controle [5-HIAA/5-HT: Controle: $3,18 \pm 0,27$; 50mg/kg: $0,88 \pm 0,13$; 100mg/kg: $2,45 \pm 0,60$; 200mg/kg: $2,13 \pm 0,40$] (FIGURA 29).

TRATAMENTO AGUDO

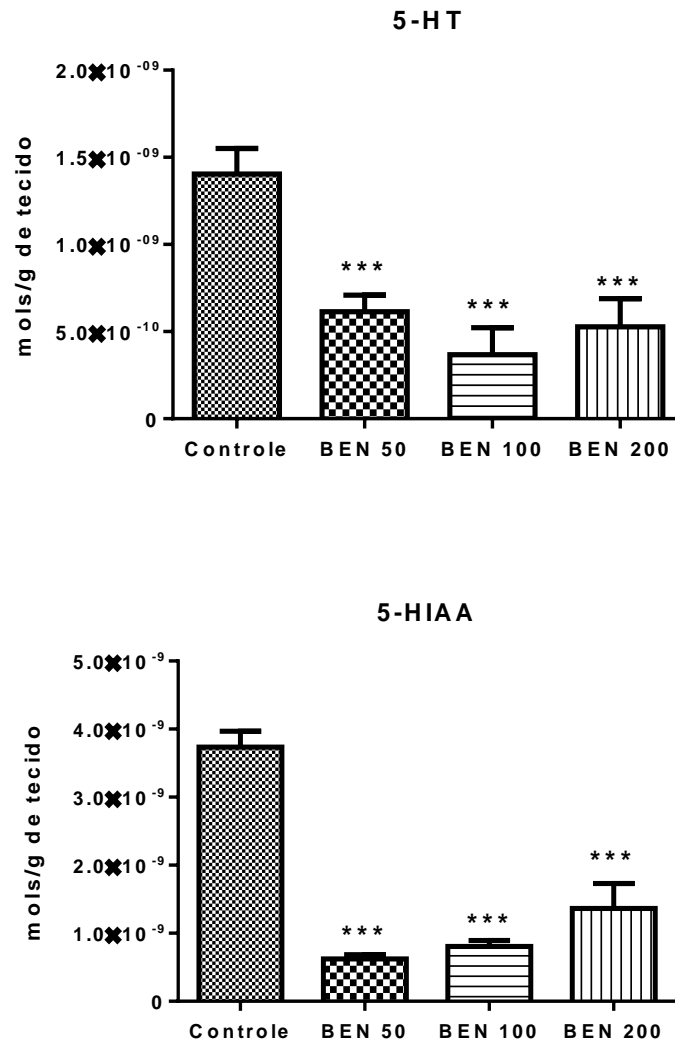


Figura 26– Efeito do tratamento agudo com BEN nas doses de 50, 100 e 200mg/kg sobre as concentrações estriatais de serotonina (5-HT) e de ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA). Controle (água destilada) e Benzidamina (BEN: 50, 100 ou 200 mg/kg) foram administrados por via oral 1 hora antes da retirada dos corpos estriados para análise em HPLC. Os valores da figura representam a média ± EPM. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls.***p<0,001 quando comparado ao grupo controle.

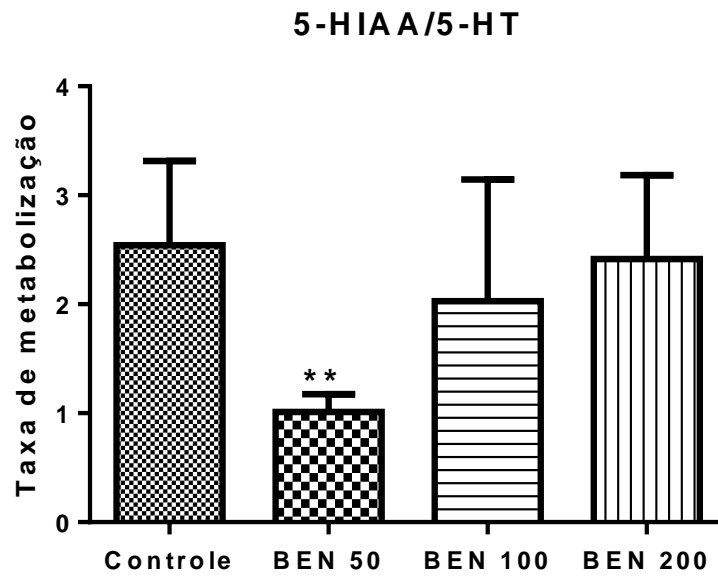


Figura 27– Efeito do tratamento agudo com BEN nas doses de 50, 100 e 200mg/kg sobre a taxa de renovação de 5-HT. Controle (água destilada) e Benzidamina (BEN: 50, 100 ou 200 mg/kg) foram administrados por via oral 1 hora antes da retirada dos corpos estriados para análise em HPLC. Os valores da figura representam a média ± EPM. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Dunnet. *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo controle.

TRATAMENTO 7 DIAS

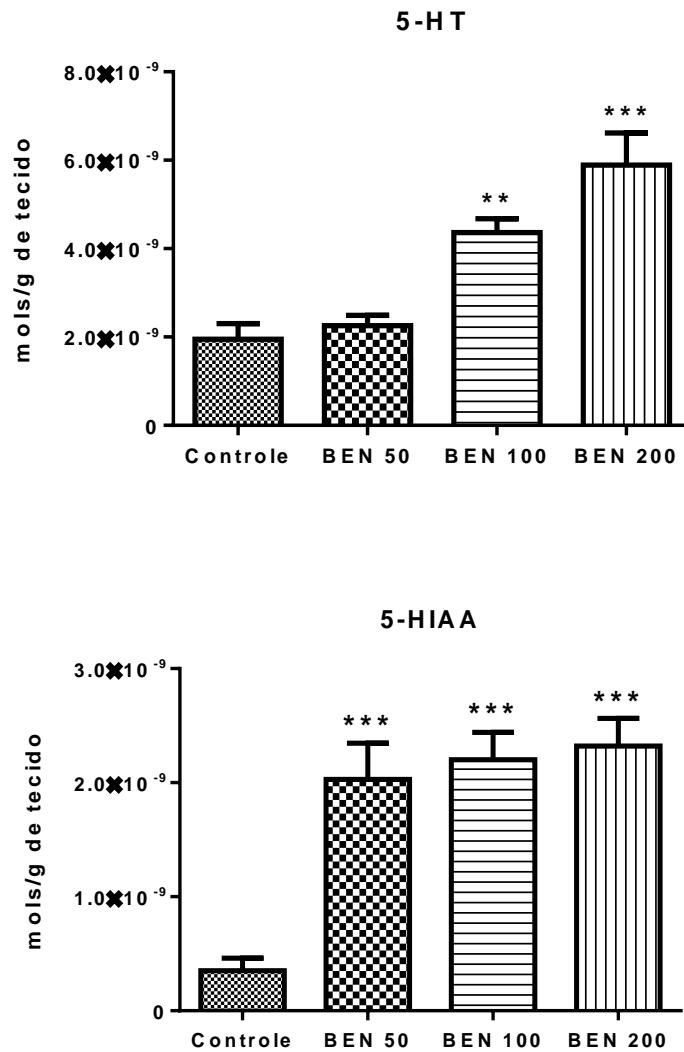


Figura 28– Efeito do tratamento de dose repetida de sete dias com BEN nas doses de 50, 100 e 200mg/kg sobre as concentrações estriatais de serotonina (5-HT) e de 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA). Controle (água destilada) e Benzidamina (BEN: 50, 100 ou 200 mg/kg) foram administrados por via oral durante 7 dias e os corpos estriados foram retirados 1 hora depois da administração do último dia para análise em HPLC. Os valores da figura representam a média ± EPM. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ quando comparados ao grupo controle.

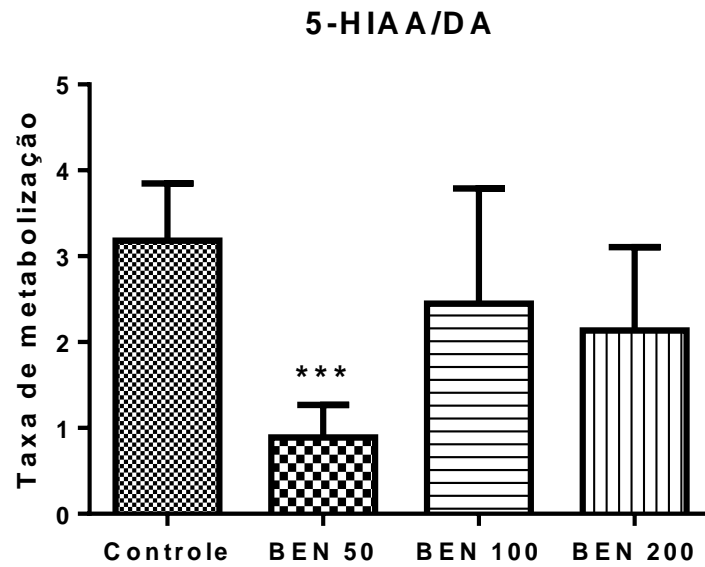


Figura 29– Efeito do tratamento de dose repetida de sete dias com BEN nas doses de 50, 100 e 200mg/kg sobre a taxa de renovação de 5-HT. Controle (água destilada) e Benzidamina (BEN: 50, 100 ou 200 mg/kg) foram administrados por via oral durante 7 dias e os corpos estriados foram retirados 1 hora depois da administração do último dia para análise em HPLC. Os valores da figura representam a média ± EPM. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Dunnet. *** $p < 0,001$ quando comparados ao grupo controle.

5.2.3 Determinação das concentrações do Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF) em corpo estriado e hipocampo após tratamento de dose repetida com BEN

As concentrações de BDNF no Corpo estriado apresentaram-se reduzidas após tratamento de 7 dias com BEN nas doses 100 e 200 mg/kg quando comparadas ao grupo controle [Controle: $757,3 \pm 33,13$; 100mg/kg: $513,6 \pm 37,49$; 200mg/kg: $460,0 \pm 36,55$]. A dose de 50 mg/kg não apresentou diferença significativa [$682,5 \pm 25,49$] (FIGURA 30A).

As concentrações de BDNF no hipocampo apresentaram-se reduzidas após tratamento de 7 dias com BEN em todas as doses quando comparadas ao grupo controle [Controle: $2157 \pm 104,5$; 50mg/kg: $1887 \pm 105,5$; 100mg/kg: $1613 \pm 69,80$; 200mg/kg: $1283 \pm 67,64$] (FIGURA 30B).

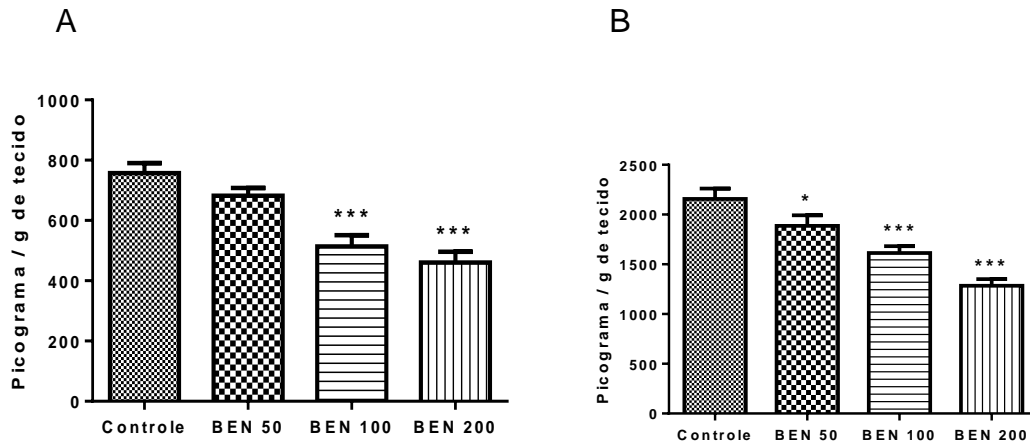


Figura 30– Efeito do tratamento de dose repetida de sete dias com BEN nas doses de 50, 100 e 200mg/kg sobre as concentrações do Fator Neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) no corpo estriado (A) e no hipocampo (B). Controle (água destilada) e Benzidamina (BEN: 50, 100 ou 200 mg/kg) foram administrados por via oral durante 7 dias e os corpos estriados foram retirados 1 hora depois da administração do último dia para análise das concentrações de BDNF. Os valores da figura representam a média \pm EPM. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls. * $p < 0,05$ *** $p < 0,001$ quando comparados ao grupo controle.

5.3 PROTOCOLO 3: Ensaio *in vitro* de Viabilidade celular

5.3.1 Avaliação do efeito citotóxico do BEN através do ensaio com MTT

Com o intuito de estudar o efeito de BEN sobre astrócitos, a substância foi incubada em diferentes concentrações com as células por um período de 12 ou 24 horas. Em seguida foi realizado o ensaio de redução do MTT, que determina indiretamente a capacidade oxirredutora das células.

Após 12 horas de incubação, todas as concentrações de BEN conseguiram diminuir significativamente a viabilidade celular em relação ao grupo controle, indicando um possível papel citotóxico. Um resultado semelhante foi encontrado após a incubação com BEN por 24 horas, diferindo apenas nas menores doses (3,1 e 6,2 µg/ml), onde houve uma diferença significativa maior em relação ao grupo controle no tratamento de 24 horas em relação ao tratamento de 12 horas. A IC50 do tratamento de 12 horas foi de 20,73 µg/mL. Já a IC50 do tratamento de 24 horas foi de 26,13 µg/mL (FIGURA 31).

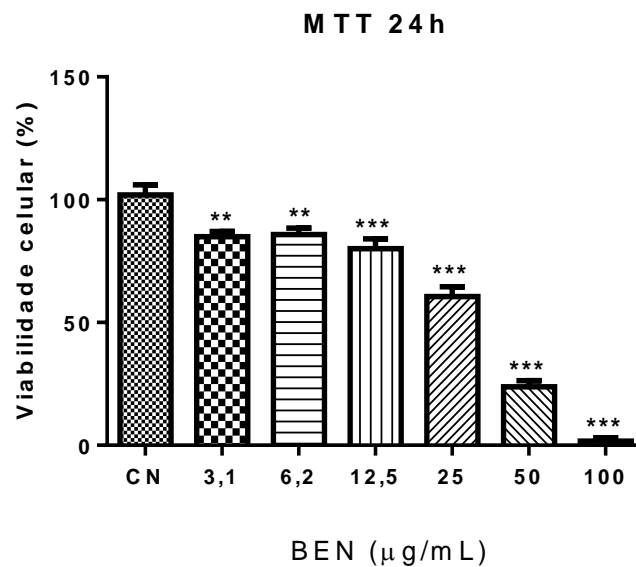
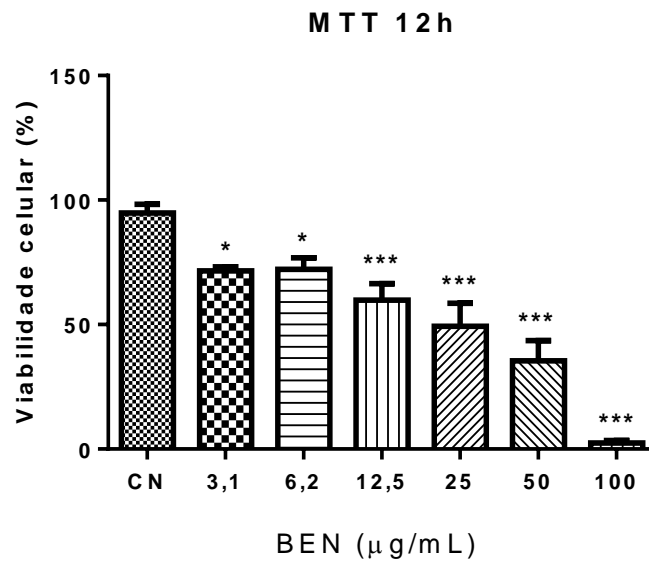


Figura 31- Efeito de BEN sobre a viabilidade de astrócitos pelo método do MTT após 12 horas ou 24 horas de incubação. Os experimentos foram realizados em triplicata e os dados foram expressos média \pm EPM. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido de Dunnet. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ em relação ao grupo controle.

5.3.2 Avaliação do mecanismo de morte celular envolvido no efeito citotóxico do BEN por citometria de fluxo

Com o objetivo de identificar alterações celulares indicativas de necrose e/ou apoptose induzidas por BEN, as células tratadas por 24 horas com a IC_{50} (26,13 $\mu\text{g/mL}$), $2 \times IC_{50}$ (52,26 $\mu\text{g/mL}$), $IC_{50}/2$ (13,06 $\mu\text{g/mL}$) de BEN e, logo após o tratamento, foram submetidas ao protocolo de marcação por 7-AAD e anexina V-PE. No ensaio realizado com BEN, os resultados encontrados mostram a ativação principalmente da via apoptótica (maior marcação com anexina V-PE) de morte celular. Houve a presença de eventos necróticos (células marcadas com 7-AAD), porém em menor intensidade. (FIGURAS 32 e 33).

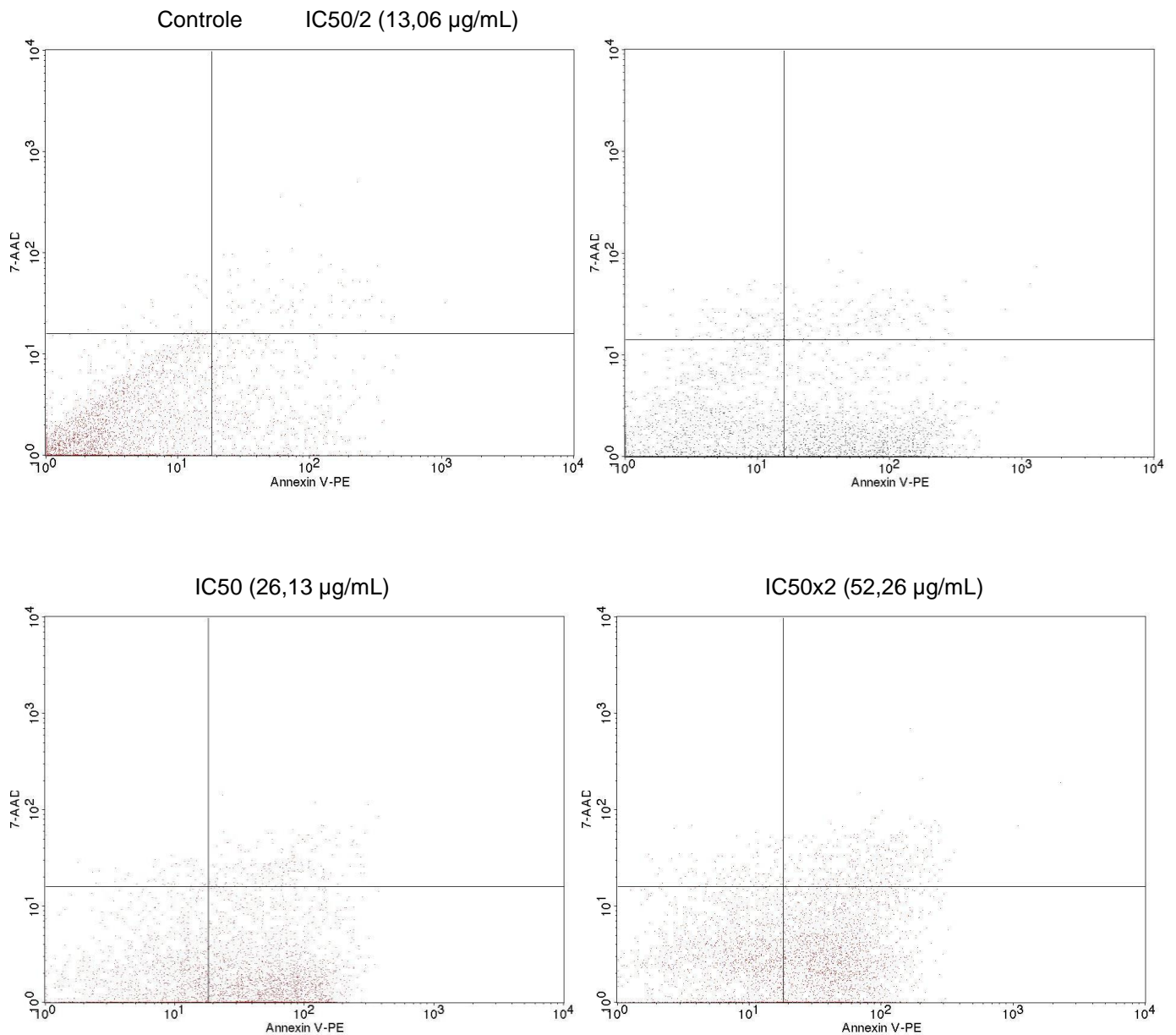


Figura 32- Citometria de Fluxo para a avaliação do tipo de morte celular envolvido na citotoxicidade de BEN após 24 horas de incubação com as doses IC₅₀/2 (13,06 $\mu\text{g/mL}$), IC₅₀ (26,13 $\mu\text{g/mL}$) e IC₅₀X2 (52,26 $\mu\text{g/mL}$). Representação da marcação simultânea de Anexina V-PE e 7-AAD. Quadrante inferior esquerdo: células viáveis (não-marcadas); quadrante inferior direito: células marcadas apenas com Anexina V (apoptose); quadrante superior esquerdo: células marcadas apenas com 7-AAD (necrose); quadrante superior direito: células marcadas duplamente com 7-AAD e Anexina V-PE.

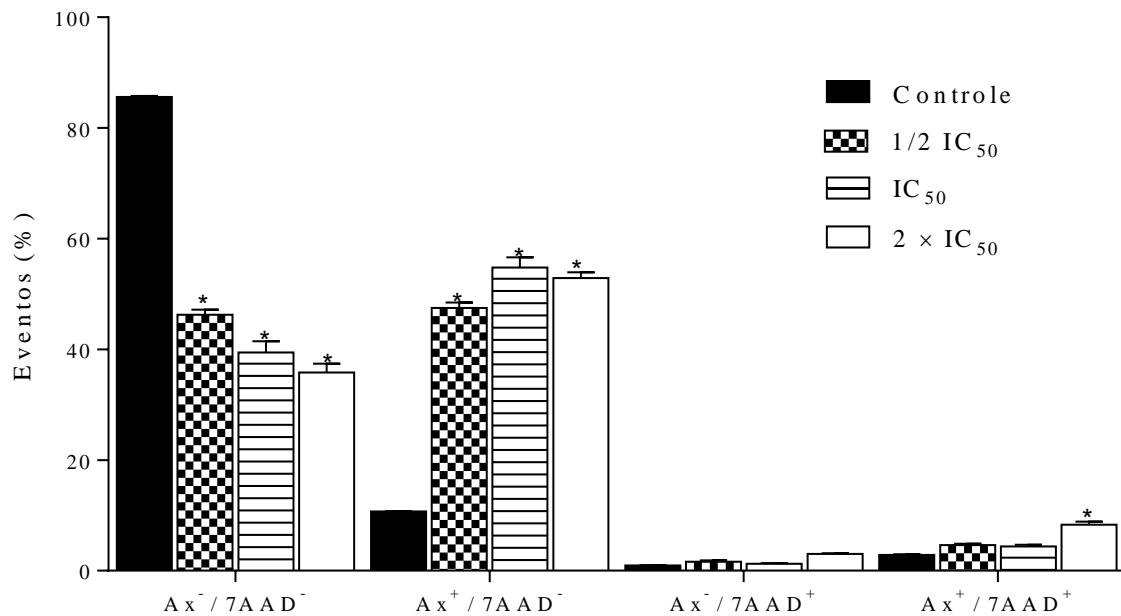


Figura 33 - Quantificação do tipo de morte envolvido na citotoxicidade de BEN após 24 horas de incubação com as doses IC₅₀/2 (13,06 µg/mL), IC₅₀ (26,13 µg/mL) e IC₅₀X2 (52,26 µg/mL) através do experimento da Citometria de Fluxo. Os experimentos foram realizados em triplicata e os dados expressos como porcentagem de eventos ± EPM. Para análise estatística, foi utilizado ANOVA seguido de Dunnet *p<0,05 em relação ao grupo controle. Ax⁻: ausência de marcação para Anexina V-PE; Ax⁺: presença de marcação para Anexina V-PE; 7AAD⁻: ausência de marcação para 7-amino-actino-micina; 7AAD⁺: presença de marcação para 7-amino-actino-micina.

5.3.3 Avaliação da via apoptótica envolvida com o efeito citotóxico do BEN através de imunofluorescência para caspase 8, caspase 9 e NFkB

Os resultados da imunofluorescência mostraram que houve um aumento expressivo na intensidade de imunofluorescência da enzima caspase 8 [$14,13 \pm 0,77$] em relação ao grupo controle [$3,51 \pm 0,13$] (FIGURAS 34 e 35). Não houve diferença significativa na intensidade de imunofluorescência para caspase 9 [$7,08 \pm 0,48$] em relação ao grupo controle [$6,32 \pm 0,33$] (FIGURAS 36 e 37).

NFkB, um fator de transcrição ativado principalmente pela via extrínseca da apoptose, mostrou um aumento expressivo na intensidade de imunofluorescência [$26,27 \pm 2,26$] em relação ao grupo controle [$4,45 \pm 0,47$] (FIGURAS 38 e 39).

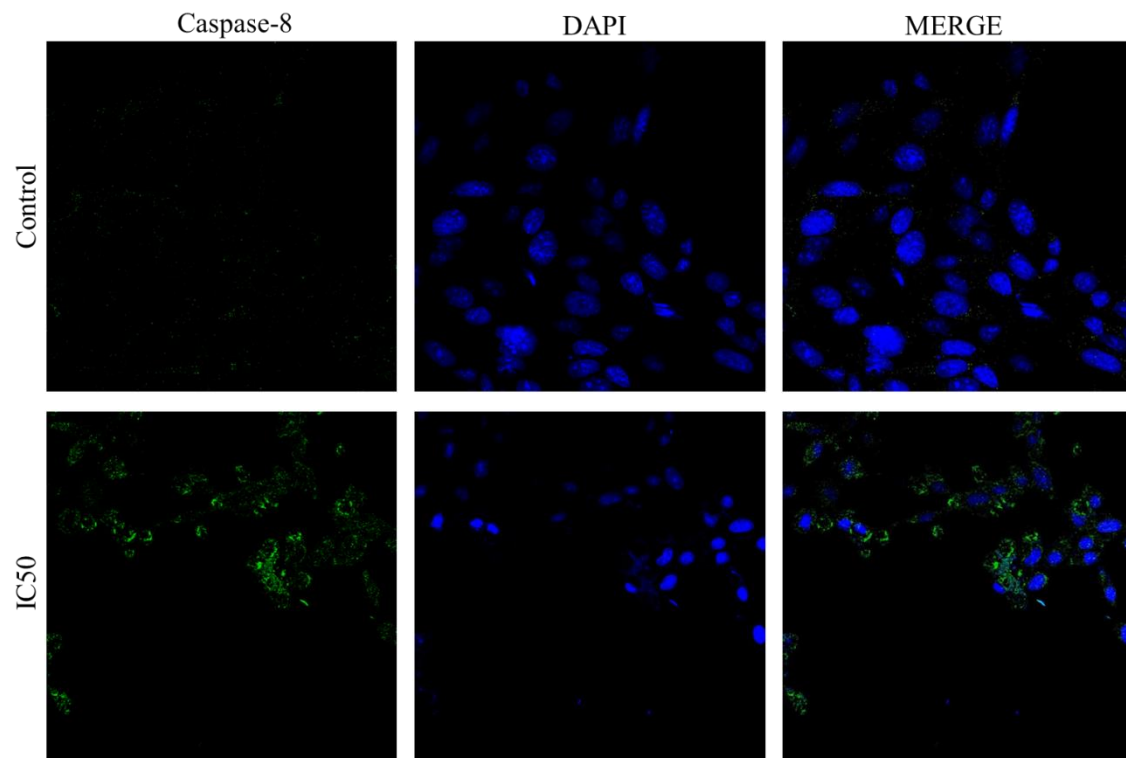


Figure 34 - Dupla coloração por imunofluorescência de culturas de astrócitos corticais para caspase-8 e DAPI após tratamento de 24h com BEN. Imagens representativas mostrando dupla marcação para caspase-8 (verde) e DAPI (azul) em células astrocíticas corticais com nenhum tratamento (controle) ou após tratamento com a IC_{50} de 24h de BEN. A cultura representando o grupo controle mostrou reatividade apenas para DAPI e escassa reatividade para caspase-8. Em contraste, a cultura tratada com a IC_{50} de 24h de BEN mostrou acentuada expressão para caspase-8.

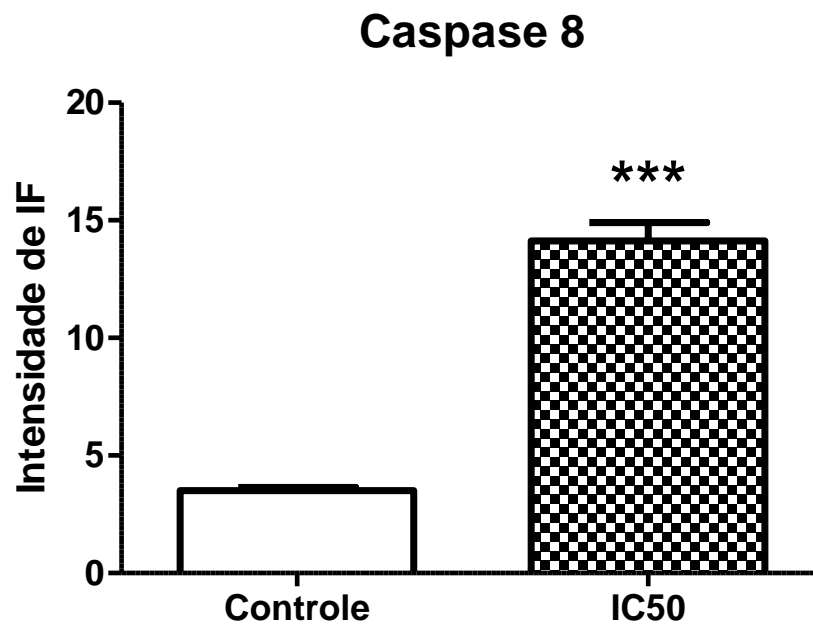


Figure 35. Quantificação da intensidade de imunofluorescência (IF) para caspase-8 em culturas de astrócitos corticais após tratamento de 24h com **BEN**. Os experimentos foram realizados em triplicate e os dados expressos como intensidade de IF \pm EPM. Análise estatística foi feita utilizando Student's *t*-test. *** $p < 0.001$ comparado ao grupo controle.

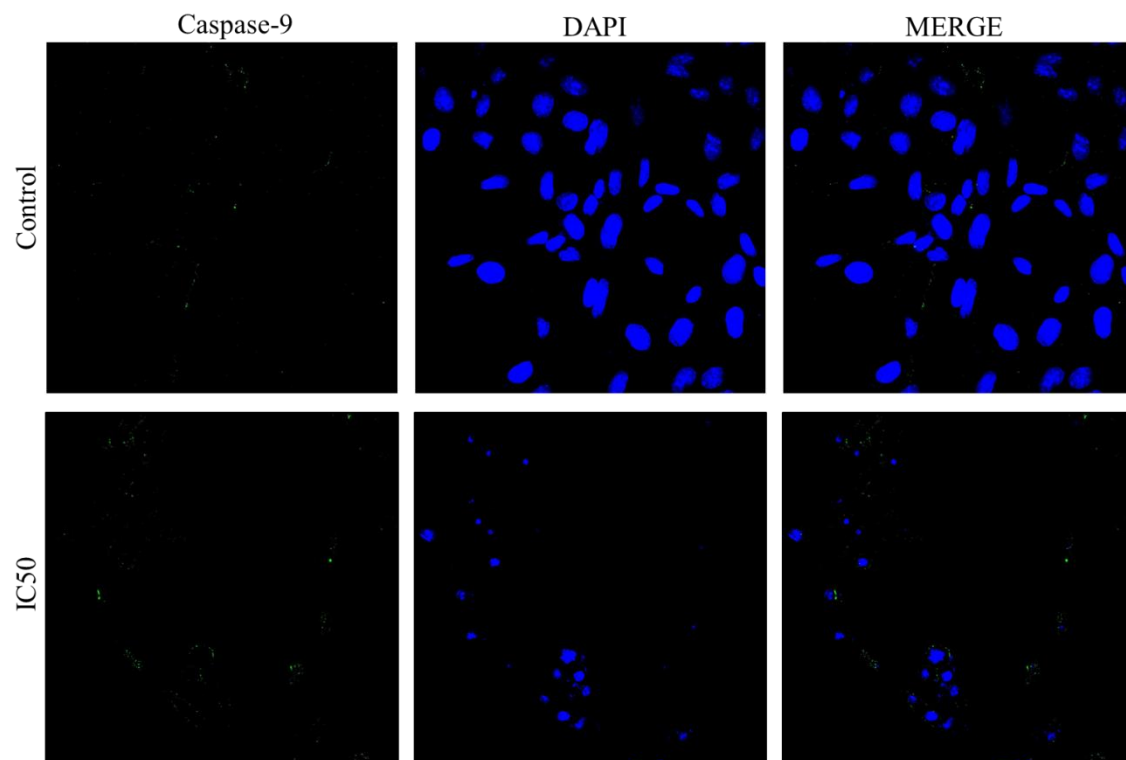


Figure 36. Dupla coloração por imunofluorescência de culturas de astrócitos corticais para caspase-9 e DAPI após tratamento de 24h com BEN. Imagens representativas mostrando dupla marcação para caspase-9 (verde) e DAPI (azul) em células astrocíticas corticais com nenhum tratamento (controle) ou após tratamento com a IC_{50} de 24h de BEN. Os dois grupos de culturas (controle e IC_{50}) mostraram reatividade apenas para DAPI e escassa reatividade para caspase-9.

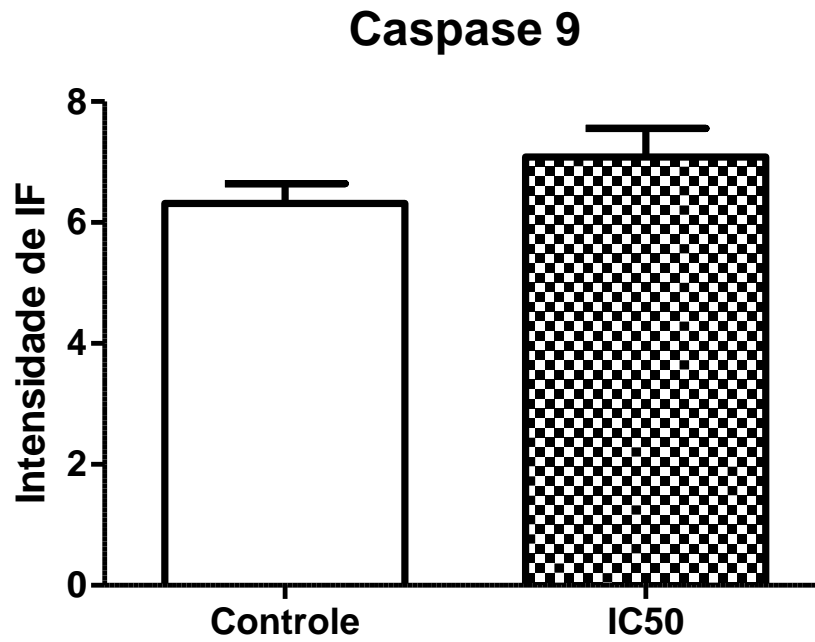


Figure 37. Quantificação da intensidade de imunofluorescência (IF) para caspase-9 em culturas de astrócitos corticais após tratamento de 24h com **BEN**. Os experimentos foram realizados em triplicate e os dados expressos como intensidade de IF \pm EPM. Análise estatística foi feita utilizando Student's *t*-test.

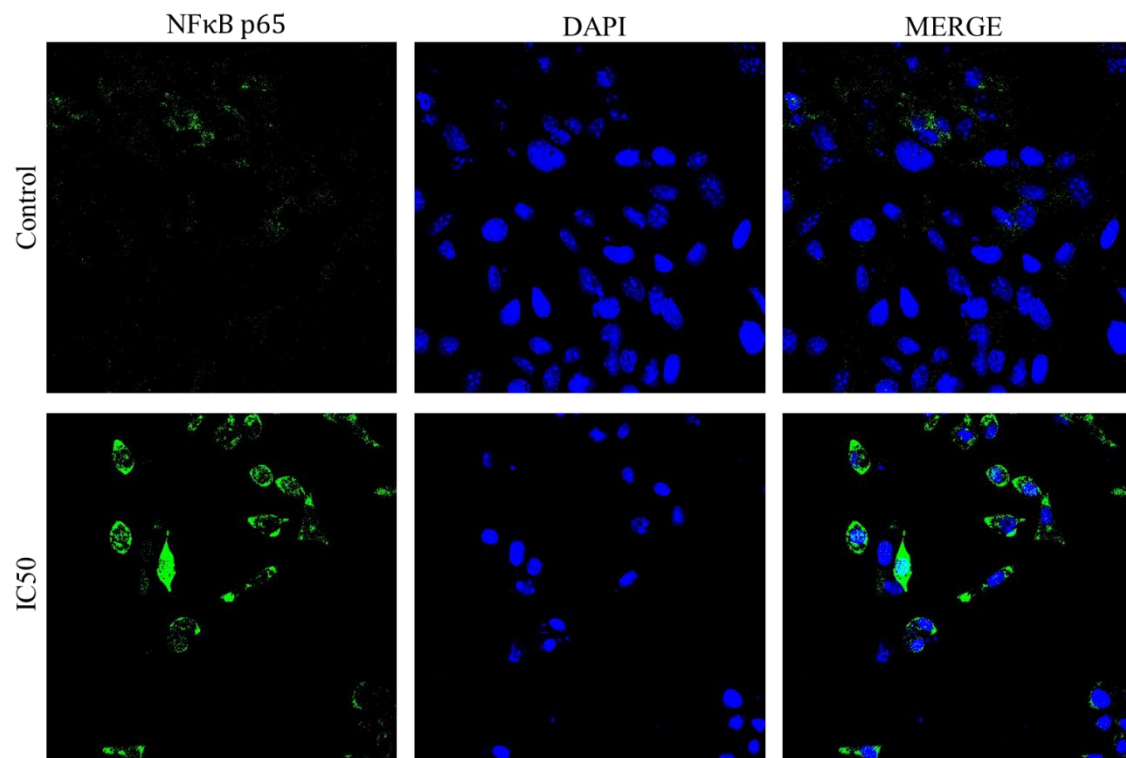


Figure 38. Dupla coloração por imunofluorescência de culturas de astrócitos corticais para NFκB p65 e DAPI após tratamento de 24h com BEN. Imagens representativas mostrando dupla marcação para NFκB p65 (verde) e DAPI (azul) em células astrocíticas corticais com nenhum tratamento (controle) ou após tratamento com a IC₅₀ de 24h de BEN. A cultura representando o grupo controle mostrou reatividade apenas para DAPI e escassa reatividade para NFκB p65. Em contraste, a cultura tratada com a IC₅₀ de 24h de BEN mostrou acentuada expressão para NFκB p65.

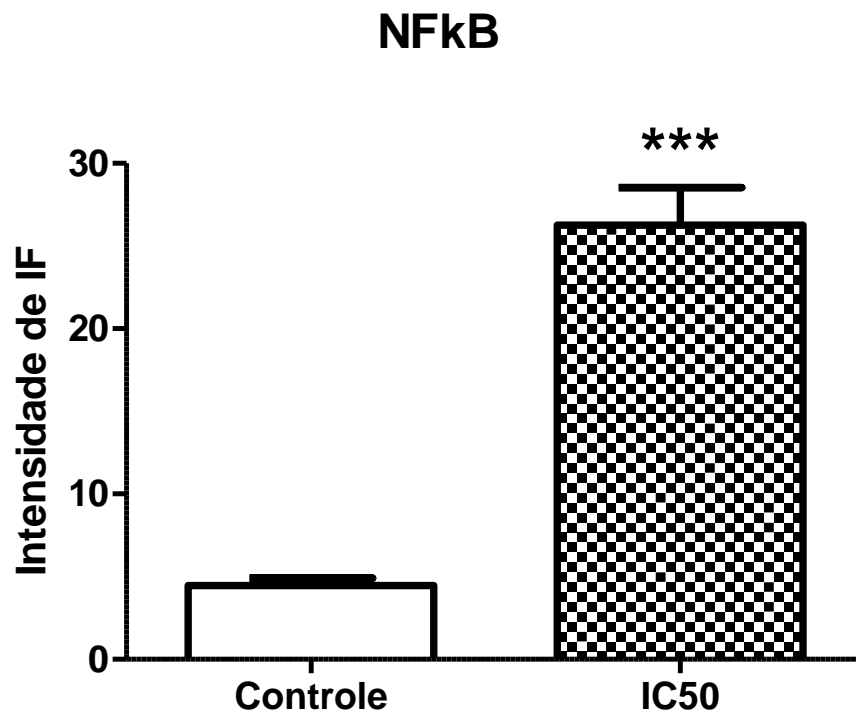


Figure 39. Quantificação da intensidade de imunofluorescência (IF) para NFκB p65 em culturas de astrócitos corticais após tratamento de 24h com BEN. Os experimentos foram realizados em triplicate e os dados expressos como intensidade de IF \pm EPM. Análise estatística foi feita utilizando Student's *t*-test. *** $p < 0.001$ comparado ao grupo controle.

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Benzidamina, um antiinflamatório inicialmente de venda livre, passou a ser utilizado pelos jovens por seus efeitos não terapêuticos como de causar alucinações e psicoses, tornaram esta droga, por este motivo, posteriormente, de venda controlada pela ANVISA. Esses relatos despertaram o interesse do presente trabalho na investigação dos efeitos centrais de BEN e seu potencial citotóxico em células neurais.

Considerando o relato por jovens de seus efeitos psicoestimulantes, foi utilizado inicialmente o teste do campo aberto em camundongos, com o intuito de investigar o potencial efeito psicoestimulante induzido pela droga. Este teste é amplamente utilizado para quantificar movimentos locomotores e de exploração dos animais. Os movimentos locomotores são os deslocamentos entre um ponto a outro da arena (ALE). Os movimentos de exploração ou não locomotores são aqueles que o animal pode realizar sem a necessidade de deslocamento, como por exemplo, elevação vertical (*rearing*). Em experimentos com roedores, estes comportamentos são essenciais para compreender o efeito de diferentes drogas psicoestimulantes e ansiolíticas (MACIEL; LIMA; SOUSA, 2015).

O aumento da ALE após administração aguda de BEN, em todas as doses, sugere um efeito similar causado por outras drogas de abuso, já bem conhecidas como psicoestimulantes, tais como cocaína, anfetamina, entre outras. De fato, pesquisadores mostraram, por exemplo, que anfetamina, em baixas doses, aumenta a ALE, efeito este associado com comportamentos exploratórios (ELLINWOOD, 1980; IVERSEN, 1975) e cujo aumento é considerado ser mediado, principalmente, pelo sistema dopaminérgico mesolímbico. Estudos posteriores mostraram que diferenças individuais na resposta locomotora induzidas pela administração de outra droga de abuso, como a cocaína, parecem estar diretamente relacionadas à diferenças na taxa de metabolização da dopamina (MITTLEMAN, 2005).

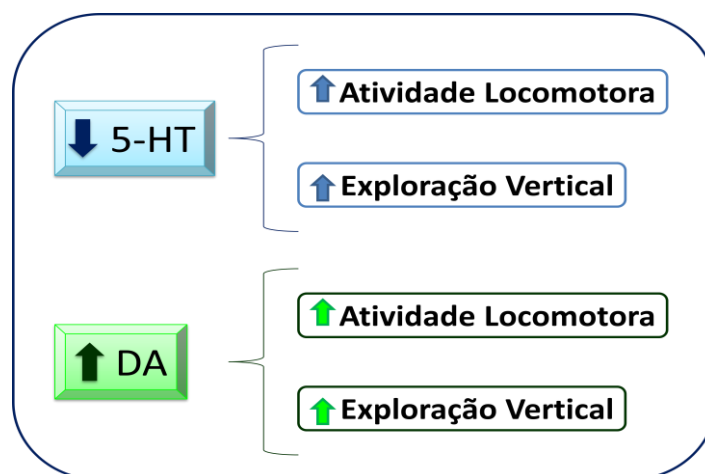
Entretanto, não é somente o sistema dopaminérgico que está relacionado à atividade locomotora. Alguns estudos mostraram que o sistema serotoninérgico desempenha um papel de modulação inibitória no efeito da anfetamina sobre a atividade locomotora, visto que lesões nos núcleos das rafe no mesencéfalo,

aumentaram a estimulação dessa atividade causada por essa droga (COSTALL; NAYLOR, 1974; NEILL; GRANT; GROSSMAN, 1972; TAYLOR, 1975).

É bem estabelecido que dopamina (DA) e serotonina (5-HT) exibem interações complexas e extensas, especialmente dentro do gânglio basal (ALEX; PEHEK, 2007). A atividade do estriado, que é uma região de integração sensorio-motor-límbico do gânglio basal que controla a atividade locomotora e de exploração vertical em roedores, é modulada por diversos fatores, em particular as projeções dopaminérgicas e serotoninérgicas decorrentes do mesencéfalo central e do tronco cerebral (GEYER, 1996).

O mesencéfalo central, onde os corpos celulares dopaminérgicos estão localizados, recebe as maiores inervações serotoninérgicas do cérebro (HERVÉ et al., 1987) e os receptores de 5-HT regulam a atividade da DA e do GABA nessa região (O'DELL; PARSONS, 2004; PESSIA et al., 1994). Também existe uma forte projeção serotoninérgica para o estriado, o que fornece uma regulação pré-sináptica desse neurotransmissor na liberação de DA (ALEX; PEHEK, 2007).

Vários estudos provaram que, excetuando a ativação dos receptores 5-HT_{2A} e 5-HT₃, o sistema serotoninérgico exerce, de forma geral, um efeito de modulação inibitória sobre a ALE e exploração vertical (BROOKSHIRE; JONES, 2009). De forma inversa, a ativação do sistema dopaminérgico exerce um aumento na ALE e na exploração vertical (CHOLERIS et al., 2011; FLORIN et al., 1996). O quadro 1 mostra um esquema resumindo, de forma geral (excetuando ativação dos receptores 5-HT_{2A} e 5-HT₃), os efeitos dos neurotransmissores DA e 5-HT em alguns dos parâmetros avaliados pelo campo aberto.



QUADRO 1. Esquema geral dos efeitos da transmissão dopaminérgica (DA) e serotoninérgica (5-HT) nos parâmetros avaliados no teste do campo aberto em estriado.

O aumento na atividade locomotora em todas as doses causado por BEN durante a administração aguda pode provavelmente ser consequência da depleção dos níveis de 5-HT e aumento da taxa de renovação da DA observados no presente estudo. De fato, outros pesquisadores observaram que um aumento da taxa de renovação da DA estriatal pode provocar aumento de atividade motora em geral (LE MOAL; SIMON, 1991).

O fato de BEN nas doses de 50 e 100mg/kg não ter alterado a atividade locomotora pode ser devido a um provável equilíbrio entre os efeitos antagônicos ocasionados pelo aumento da taxa de renovação da DA e aumento dos níveis de 5-HT. Entretanto, o aumento da ALE observado na maior dose (200mg/kg), sem a detecção de alteração dos níveis de dopamina, mas com aumento de serotonina sugere investigações posteriores.

Com relação ao parâmetro de exploração vertical (*rearing*), no tratamento agudo, os achados comportamentais encontrados corroboram com os achados neuroquímicos dos níveis das monoaminas. No tratamento agudo, o aumento de *rearing* nas menores doses (50 e 100mg/kg), assim como ocorreu com a ALE, indica que houve um somatório dos efeitos causados pela diminuição de 5-HT e aumento da taxa de renovação da DA. Entretanto, a não alteração do *rearing* na dose de 200mg/kg necessita de posterior investigação.

A diminuição do *rearing* após o tratamento de dose repetida sugere que esse efeito provavelmente foi condicionado pelo aumento da transmissão serotoninérgica provocado pelo uso contínuo de BEN (BROOKSHIRE; JONES, 2009).

Com base nos relatos de efeitos psicóticos causados por BEN, em seguida foi realizado o teste de Inibição pré-pulso. A literatura descreve bem que a inibição do sobressalto por estímulos fracos (Inibição pré-pulso - IPP) é um fenótipo quantitativo hereditário (GREENWOOD et al., 2007) que está deficiente em muitas desordens psiquiátricas (BRAFF et al., 1978; SWERDLOW et al., 2008b). A resposta de IPP ao sobressalto representa um índice operacional do filtro sensório-motor e é demonstrado com confiabilidade tanto em humanos (GRAHAM, 1975) como em animais (HOFFMAN; ISON, 1980a).

O filtro sensório-motor age como um protetor do processamento de informações, limitando a entrada de informações sensoriais e evitando a sobrecarga no processamento cortical e as conseqüentes alterações na percepção dos

estímulos (NORRIS; BLUMENTHAL, 1996). Alexander e colaboradores sugeriram quatro circuitos cortico-estriado-talâmico (CCET) que parecem atuar como filtros sensório-motores (ALEXANDER; DELONG; STRICK, 1986): motor, oculomotor, cognitivo e límbico. Tais circuitos atuam como o substrato neural que regula a transmissão de informações sensoriais, a interpretação do meio em tempo real e a seleção do comportamento mais adequado (NUSBAUM; CONTRERAS, 2004). Problemas no circuito CCET límbico estão relacionados a distúrbios associativos e alucinações (DREVETS et al., 1997; GRAYBIEL, 1997). Assim como nas psicopatologias, manipulações farmacológicas, em especial nas sinapses cortico-estriatais, também afetam o filtro sensório-motor (WAN; SWERDLOW, 1996).

Agentes farmacológicos com propriedades psicóticas e antipsicóticas em humanos também podem perturbar e potencializar a IPP em animais. Em ratos, a alteração da IPP por agonistas dopaminérgicos é revertida por antipsicóticos típicos e atípicos. Entretanto, somente os antipsicóticos atípicos são capazes de antagonizar a alteração da IPP causada por antagonistas NMDA e de serotonina (SWERDLOW; GEYER, 1998).

A redução causada por BEN na maior dose, dos níveis de IPP nas três intensidades de pré-pulso estudadas (70, 75 e 80 dB), em ambos os tratamentos, agudo e de dose repetida, pode estar relacionada ao aumento da taxa de renovação da DA. Altos níveis da taxa de renovação da DA indicam maior requisição do mesmo e conseqüente maior metabolização.

Dessa forma, BEN na dose de 200 mg/kg agiu semelhante a agentes psicoestimulantes como a anfetamina, que reduzem a IPP em roedores (GEYER et al., 2001). Um estudo mais recente realizado por Manduca e colaboradores também demonstrou a ocorrência de uma diminuição de IPP em ratos jovens tratados com anfetamina (MANDUCA et al., 2014). Outras drogas perturbadoras do SNC - sejam agonistas canabinóides, dopaminérgicos, serotoninérgicos (5-HT_{2A/C}), bem como antagonistas glutamatérgicos de NMDA – também apresentam a capacidade de reduzir a IPP (BROSDA et al., 2011).

Considerando que muitas drogas de abuso, causam alterações importantes na cognição e memória no presente trabalho, realizou-se os testes do Labirinto em Y e do Reconhecimento de Objetos após o tratamento com BEN nos animais, testes estes, que avaliam a cognição, especificamente a memória.

A memória pode ser definida como um processo de formação, conversão, evocação e apanhamento de diferentes informações. Alguns processos como: aquisição, consolidação, armazenamento, evocação e extinção compõem o ato de memorizar (CAMMAROTA et al., 2005).

O teste do Labirinto em Y avalia o tipo de memória chamada de “operacional” ou de “trabalho”. Essa memória é um subtipo de memória declarativa onde ocorre um armazenamento temporário da informação utilizada para planejar uma ação futura. Trata-se de uma memória imediata que dura de frações a poucos segundos e não deixa “traços” ou não forma “arquivos”. Essa memória operacional envolve muitas partes diferentes do córtex cerebral (BADDELEY, 1992; SQUIRE; ZOLA, 1996).

Já o teste do Reconhecimento de objetos avalia a memória de curto prazo. Essa memória engloba o tempo durante o qual a memória está sendo consolidada e convertida à memória remota, de longo prazo. Durante este tempo, a memória a curto prazo é vulnerável e sujeita a desaparecer (SQUIRE; ZOLA, 1996).

O déficit cognitivo provocado por BEN em todas as doses e em ambos os períodos de tratamento no presente estudo, corrobora com outros estudos que mostram que o abuso de drogas está, em grande parte, associado com déficit cognitivo devido a mecanismos tóxicos ou por adaptação compensatória, sendo esse déficit, em algumas vezes, não permanente. Rogers e Robbins, por exemplo, revisaram os déficits neurocognitivos associados com muitas drogas de abuso, detalhando os níveis surpreendentes de comprometimento da memória ou da função fronto-executiva que pode ser encontrada nos dependentes (ROGERS; ROBBINS, 2003).

Outro estudo usando uma nova tarefa de tomada de decisão deixou claro que os abusadores da anfetamina exibiram alguns defeitos que eram qualitativamente semelhantes aos apresentados por pacientes com danos orbitofrontal, como teria sido previsto a partir de achados neuropatológicos e de neuroimagem para abusadores de metanfetamina (ARON; PAULUS, 2007; OSCAR-BERMAN; MARINKOVIC, 2003; ROGERS; ROBBINS, 2003; ROGERS et al., 1999; WILSON et al., 1996).

No presente trabalho BEN, em todas as doses e nos dois períodos de tratamento, causou um déficit cognitivo em ambos Labirinto em Y e Reconhecimento de Objetos. Tais déficits também têm sido simulados pelo

tratamento crônico com cocaína em macacos (JENTSCH; TAYLOR, 1999). Posteriormente, Kantak e colaboradores mostraram que ratos que se auto-administravam cronicamente com cocaína apresentavam déficits cognitivos de memória (KANTAK et al., 2005).

No entanto, estudos posteriores sobre populações semelhantes de usuários de drogas usando o Teste neuropsicológico de Cambridge (Cantab) encontraram uma ampla gama de deficiências no planejamento visuo-espacial, memória de trabalho espacial, memória de reconhecimento visual, e aprendizagem (ERSCHE et al., 2006; ORNSTEIN et al., 2000). Esses déficits indicam que os comprometimentos são susceptíveis para envolver outros sistemas além do córtex orbitofrontal (ERSCHE et al., 2006; ORNSTEIN et al., 2000).

A redução nos níveis de BDNF no hipocampo observada no presente trabalho pode explicar os efeitos de déficit cognitivo causados por BEN. O hipocampo, que é necessário para muitas formas de memória em humanos e animais, é um importante local de ação do BDNF e, de fato, dados da literatura mostram que há uma indução rápida e seletiva da expressão de BDNF no hipocampo durante a aprendizagem contextual (HALL; THOMAS; EVERITT, 2000).

Nos seres humanos, a dependência de substâncias é acompanhada por prejuízos sociais. Isso afeta negativamente as relações pessoais e, se o indivíduo está em tratamento, afeta também relação com o psicoterapeuta, comprometendo assim a adesão ao tratamento (KLAUS GRAWE RUTH DONATI FRIEDERIKE BERNAUER, 1994; LEICHSENDRING; RABUNG; LEIBING, 2004). Com base nestas considerações, foram investigadas as alterações causadas por BEN no experimento de Interação social.

O teste de interação social foi desenvolvido 25 anos atrás como o primeiro teste animal para ansiedade que se esforçou para utilizar fontes etologicamente relevantes de ansiedade e usar uma forma natural de comportamento como a medida dependente (FILE; HYDE, 1978a). Esse teste mede uma variedade de comportamentos exibidos por um sujeito (normalmente ratos) quando exposto a um sujeito estranho, avaliando as respostas sociais do sujeito para com o estranho. A resposta é quantificada de forma diferente dependendo do grupo de pesquisa (NEILL et al., 2010).

Os níveis de interação social em roedores têm sido usados para avaliar efeitos farmacológicos na ansiedade. Um aumento na interação social é indicativo

de efeito ansiolítico, ao passo que uma diminuição é induzida por drogas ansiogênicas (FILE; HYDE, 1978a; FILE; SETH, 2003). Atualmente, esse teste tem sido usado para estudar aspectos sociais da esquizofrenia em diversos modelos animais, e deficiências de desempenho social neste teste têm sido sugeridas modelar os sintomas negativos da doença (O'TUATHAIGH et al., 2010; SAMS-DODD; LIPSKA; WEINBERGER, 1997; SAMS-DODD, 1995, 1998a, 1998b, 1998c).

Entretanto, há uma razão para o uso extensivo desse teste para imitar os sintomas negativos do abuso de drogas em animais. Em primeiro lugar, a mensuração de interação social em animais é relativamente simples em comparação com outros sintomas negativos, como embotamento afetivo ou apatia. Esses sintomas são difíceis de mimetizar e até mesmo de identificar em animais, já que a falta de resposta à emoção evocada por estímulos em animais pode ser completamente independente da falta de emoção. Em segundo lugar, diferente de muitas tentativas frustradas de modelar os aspectos dos sintomas negativos, vários grupos foram capazes de mostrar com sucesso a inibição da interação social, induzida por antagonistas do receptor NMDA em animais (BECKER; GRECKSCH, 2004; BRUINS SLOT; KLEVEN; NEWMAN-TANCREDI, 2005; ELLENBROEK; COOLS, 2000; SAMS-DODD, 1999; SNIGDHA; NEILL, 2008a, 2008b).

BEN, no tratamento agudo, nas duas maiores doses (100 e 200 mg/kg) reduziu os níveis de interação social, efeito semelhante ao ocorrido com outras drogas de abuso. A observação de manutenção da redução da interação com a maior dose no tratamento repetido, sem este efeito na dose de 100 mg/kg pode ser justificado possivelmente por uma neuroadaptação.

Corroborando ainda com os resultados do presente trabalho, dados na literatura mostram que drogas psicoestimulantes no teste de interação social, usualmente desencadeiam efeitos ansiogênicos na forma de diminuição da interação social (CLEMENS et al., 2004; FILE; HYDE, 1978b; MICZEK; TIDEY, 1989; TREZZA; BAARENDSE; VANDERSCHUREN, 2014). Trabalho recente demonstrou que a administração aguda de metanfetamina provocou uma diminuição no comportamento social no teste de interação social (SLAMBEROVÁ et al., 2015)

O último teste comportamental do presente estudo foi *rota rod*. Esse teste, entre vários outros que avaliam o desempenho motor, é um ensaio adequado para avaliação dos déficits cerebelares em roedores (CASTON; JONES; STELZ, 1995; LALONDE; BENSOUOLA; FILALI, 1995). O desempenho motor no *rota Rod* pode ser

influenciado por vários fatores, tais como coordenação motora, aprendizado e resistência cardiopulmonar. Portanto este teste foi utilizado para descartar qualquer possível alteração motora que interferisse em experimentos comportamentais nos animais tratados com BEN. A ausência de efeito da droga em estudo no *rota rod* indica que BEN não causou qualquer interferência motora em todas as doses e em ambos os tratamentos, que pudesse afetar os demais comportamentos avaliados.

A análise de dopamina e serotonina e seus metabólitos foi realizada após os experimentos comportamentais na tentativa de elucidar parte dos efeitos causados por BEN. A dopamina é o neurotransmissor que foi classicamente associada com os efeitos de reforço de drogas de abuso. Esta noção reflete o fato de que a maioria das drogas de abuso aumenta a concentração de DA extracelular nas regiões límbicas, incluindo o núcleo accumbens (DI CHIARA; IMPERATO, 1988; KOOB; BLOOM, 1988).

O papel no reforço postulado para a dopamina presente no estriado ventral foi fortalecido principalmente por estudos que demonstram que as qualidades de reforço de drogas psicomotoras estimulantes (como cocaína e anfetamina) e opiáceos são mediados pela suas capacidades de aumentar a neurotransmissão da dopamina no sistema mesolímbico (DI CHIARA; IMPERATO, 1988; KOOB; LE MOAL, 1997; ROBERTS et al., 1980; TAYLOR; ROBBINS, 1984).

O fato de BEN ter aumentado a taxa de renovação da dopamina ajudou a esclarecer parte dos ensaios comportamentais anteriormente descritos. Essa taxa mostrou que houve uma maior requisição de dopamina pelo organismo devido à administração de BEN e, em seguida, um conseqüente aumento da metabolização. Drogas como a anfetamina também exibem a capacidade de aumentar a taxa de renovação da dopamina (MITTLEMAN, 2005).

Apesar da dopamina ser, hoje, o principal neurotransmissor envolvido com abuso de drogas, muitos outros neurotransmissores possuem modulação no reforço causado pelas mesmas, sendo a serotonina considerada de relevância significativa. O uso recreativo do derivado da anfetamina, metilenodioximetanfetamina (MDMA; "Ecstasy"), tornou-se um problema de saúde pelo fato de estudos em animais terem sugerido que o seu mecanismo da ação comportamental agudo em casos de abuso estar provavelmente relacionado com a sua capacidade em causar uma liberação maciça e rápida no cérebro do

neurotransmissor serotonina, enquanto que a síndrome disfórica após a retirada da droga pode ser explicado por uma depleção de serotonina (WHITE et al., 1996).

De forma contrária aos níveis de serotonina encontrados após o uso de MDMA, BEN causou, de forma aguda, depleção dos níveis de serotonina, sendo esse resultado capaz de corroborar com os testes comportamentais, visto que pesquisadores mostraram que a serotonina exerce, de forma geral (excetuando ativação dos receptores 5-HT_{2A} e 5-HT₃), um efeito de modulação inibitória sobre a ALE e exploração vertical (BROOKSHIRE; JONES, 2009).

Como descrito anteriormente, o uso repetido de BEN causou déficit cognitivo. Isto, levou-nos, no presente trabalho, a avaliação dos efeitos do BEN nos níveis de BDNF em corpo estriado e hipocampo de ratos.

Pertencente à família das neurotrofinas, BDNF está diretamente envolvido no crescimento neuronal e sináptico. É vital para o desempenho cognitivo a curto prazo e para as adaptações na morfologia do cérebro (por exemplo, plasticidade) a longo prazo (CIRULLI et al., 2004; HORCH et al., 1999; MU et al., 1999). Dessa forma, pode-se sugerir que os baixos níveis dessa neurotrofina no hipocampo e estriado de ratos após a administração de dose repetida de BEN podem estar envolvidos no déficit cognitivo causado pelo uso repetido da droga.

Em prol de investigar algum possível efeito deletério de BEN no SNC, realizou-se testes de toxicidade *in vitro* em astrócitos. A escolha de estudar essa célula glial vem do fato da mesma participar de uma variedade de mecanismos moleculares (exocitose, transportadores de membrana ou difusão através de canais) através da secreção de numerosos neurotransmissores, neurohormônios e fatores tróficos (MALARKEY; PARPURA, 2008; PARPURA; GRUBIŠIĆ; VERKHRATSKY, 2011) que regulam a formação e manutenção das transmissões sinápticas, sincronização das redes neuronais e de sinais para outras células (micróglia, oligodentrócitos, células endoteliais, entre outras) (MAGISTRETTI, 2006; RANSOM, 2012; VERKHRATSKIĬ; BUTT, 2013).

O estudo da toxicidade *in vitro* iniciou-se com o teste do MTT. Nesse teste, células viáveis com metabolismo ativo convertem o MTT em um produto de cor púrpura chamado formazan. Quando as células encontram-se em processo de morte, elas perdem a habilidade de converter o MTT em formazan, sendo, então, a formação de cor um marcador útil e conveniente somente para as células viáveis. O mecanismo celular exato da redução do MTT em formazan não é bem conhecido,

mas provavelmente envolve uma reação com NADH ou moléculas redutoras similares que transferem elétrons para MTT (RISS et al., 2013).

Com o objetivo de mensurar a IC₅₀ foram utilizadas no experimento várias doses de BEN que partiam de concentrações muito baixas até concentrações muito altas. Os resultados após o tratamento das células com BEN foram semelhantes durante a incubação com 12h e com 24h e apresentaram ICs₅₀ bem próximas. BEN reduziu significativamente a viabilidade celular dos astrócitos em todas as doses estudadas. Baseados nestas informações o próximo passo foi procurar esclarecer o mecanismo citotóxico de BEN, através da citometria de fluxo com marcadores para necrose e apoptose para, assim, elucidar o tipo de morte celular ativada pela droga em estudo.

A citometria de fluxo é uma tecnologia baseada em laser e é usada para medir as características de partículas biológicas. A tecnologia é usada para realizar medições em células inteiras, bem como em preparado de constituintes celulares, tais como núcleos e organelas. O princípio subjacente à citometria de fluxo é que a luz é dispersada e fluorescências são emitidas como luz a partir da fonte de excitação que atinge as partículas que se deslocam. A dispersão de luz e de fluorescência é medida para cada partícula individual que passe pela fonte de excitação. Esta tecnologia única e poderosa é uma ferramenta importante para muitas disciplinas científicas, porque permite a caracterização de células ou partículas dentro de uma amostra. Citometria de fluxo é particularmente importante para as investigações biológicas, pois permite o exame qualitativo e quantitativo de células inteiras e constituintes celulares que tenham sido marcados com uma grande variedade de reagentes disponíveis comercialmente, tais como corantes e anticorpos monoclonais (JAROSZESKI; RADCLIFF, 1999).

Nesse teste, foi utilizado a IC₅₀, a IC_{50/2} e a IC_{50x2} do período de incubação de 24h para investigar se a morte celular astrocitária induzida por BEN era causada por apoptose ou necrose. BEN induziu morte celular, e esta ocorreu predominantemente pela via apoptótica. A via necrótica também foi ativada, porém de forma secundária como conseqüência da apoptose.

Os resultados obtidos com BEN causando morte celular predominantemente pela via apoptótica, corrobora com dados da literatura que descrevem que apoptose é conhecidamente ativada por drogas de abuso como parte de seus mecanismos citotóxicos. Por exemplo, pode-se citar a neurotoxicidade

da cocaína que tem sido associada com indução de apoptose, assim como ativação de caspases (CUNHA-OLIVEIRA et al., 2006; DEY; SNOW, 2007; IMAM et al., 2005; MITCHELL; SNYDER-KELLER, 2003; OLIVEIRA et al., 2003), perda do potencial mitocondrial e liberação do citocromo c no citosol (CUNHA-OLIVEIRA et al., 2006; IMAM et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2003), dentre outros.

Já se sabe também que o abuso de álcool ativa a via apoptótica, sendo essa via ligada às suas propriedades antagonistas de receptores NMDA glutamatérgicos e agonistas GABA_A. Outras drogas de abuso, como fenciclidina, quetamina, benzodiazepínicos e barbitúricos, também ativam a apoptose (OLNEY, 2014).

Após esses experimentos que confirmaram a citotoxicidade de BEN principalmente pela ativação da apoptose, resolveu-se investigar qual a principal via desse mecanismo de morte é ativada pela droga em estudo.

Existem duas principais vias de sinalização apoptóticas. A via dos receptores de morte (extrínseca) e a via mediada por mitocôndria (intrínseca). A via extrínseca é iniciada por receptores de morte expressos na superfície celular pertencentes à superfamília do fator de necrose tumoral. Uma das vias centrais dessas via de apoptose é iniciada por citocinas como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), Fas ligante (FasL) e o ligante indutor de apoptose relacionado ao tumor de necrose tumoral- α (TRAIL). Uma vez que o receptor é ativado, ele se oligomeriza, recruta proteínas adaptadoras intracelulares e forma complexos, enquanto FADD (proteína contendo o domínio de morte) é recrutado por sinalização de Fas.

Os complexos recrutam um ou mais membros da família de protease de morte celular chamadas caspases, classicamente a caspase-8. A caspase-8 ativada cliva as caspases efetoras, principalmente a caspase-3. A caspase-3, em seguida, se une a um grande número de substratos intracelulares que culminará com as alterações morfológicas da apoptose (ELUMALAI et al., 2012; JENDROSSEK et al., 2013; OUYANG et al., 2012).

A via intrínseca pode ser iniciada por fármacos anti-cancerígenos, retirada do fator de crescimento, hipóxia ou através da indução de oncogenes. Estes estímulos induzem a permeabilização da membrana mitocondrial externa e ativa a via mitocondrial. A via mitocondrial está envolvida pela liberação de fatores apoptogênicos como citocromo c do espaço intermembranar mitocondrial para o citosol. Essa liberação de citocromo c para o citosol desencadeia a ativação da

caspase-3 através da formação do complexo apoptossomo contendo citocromo c/Apaf-1/caspase-9 (ELUMALAI et al., 2012; JENDROSSEK et al., 2013; OUYANG et al., 2012).

Dessa forma, no presente trabalho, realizou-se marcações por imunofluorescência para caspase-8 e para caspase-9 na cultura de células astrocíticas após a incubação com BEN para investigar as vias extrínseca e intrínseca, respectivamente. Os resultados mostraram que a via pela qual BEN ativa a apoptose é a extrínseca.

Muitas drogas de abuso são conhecidas por induzirem a morte celular programada. Chen e colaboradores verificaram que a metanfetamina, em cultura de neurônios PC12, ativa a via intrínseca da apoptose e aumenta os níveis do fator de transcrição p53, fator essa ativado principalmente em consequência a danos ao DNA (CHEN et al., 2016). Outras pesquisas mostram que a cocaína induz apoptose em cultura primária de neurônios estriatais e do mesencéfalo (LEPSCH; PLANETA; SCAVONE, 2015) e em cultura de neurônios PC12, possivelmente pela via extrínseca (LEPSCH et al., 2009), assim com BEN. Bai e colaboradores verificaram que a cetamina ativa a via intrínseca da apoptose em cultura de células embrionárias humanas (BAI et al., 2013).

Em seguida, foi realizada a imunofluorescência para NFκB porção p65. NFκB é um fator de transcrição composto por cinco membros (p50, p52, p65/RelA, c-Rel e Rel B) que pode se combinar de diversas formas e formar dímeros transcripcionais ativos, sendo o dímero p50-p65 o mais comum dentre as diversas combinações possíveis (KUO et al., 2012). Esse fator de transcrição é ativado em resposta ao estresse celular (estímulos pró-inflamatórios) que está envolvido na regulação da apoptose.

Dependendo do tipo celular e do agente apoptótico, NFκB pode mediar ou prevenir a apoptose (HOFFMANN; BALTIMORE, 2006; MATTSON; MEFFERT, 2006; MUNHOZ et al., 2006). Esse fator de transcrição pode ser encontrado em uma grande variedade de tipos celulares, incluindo neurônios e microglia (KALTSCHMIDT et al., 1994). NFκB, membro comprometido da família de proteínas Rel/NFκB, forma homo ou heterodímeros através da combinação das subunidades p65 (ou RelA), p50, p52, cRel ou RelB. É constitutivamente expresso no citoplasma, onde é ligado ao IκB, uma proteína que mascara o sinal de localização nuclear de NFκB retendo-o no citoplasma (GHOSH; MAY; KOPP, 1998).

Indutores de NF κ B agem através de cascatas de sinalização intracelular que ativam as cinases I κ B (IKKs), as quais fosforilam duas serinas N-terminais específicas de I κ B α resultando na poliubiquitinação de I κ B α e degradação no proteossoma 26S (GHOSH et al., 2002). Quando I κ B α é degradado, NF κ B (principalmente a porção p65) migra para o núcleo e modula a transcrição de genes alvo envolvidos na morte celular. A fosforilação da serina na posição 536 da porção p65 de NF κ B torna essa mesma porção ativa e responsável pela transcrição gênica.

Uma das principais formas de ativar NF κ B é pela ativação da enzima caspase-8 (CHAUDHARY et al., 2000; LEMMERS et al., 2007; SHIKAMA; YAMADA; MIYASHITA, 2003). Por causa disso, para confirmar a ativação da via extrínseca da apoptose por BEN, realizou-se a marcação das células astrocitárias por imunofluorescência para NF κ B p65 fosforilado, ou seja, ativado.

O presente trabalho mostrou que a incubação das células com BEN aumentou a expressão de NF κ B p65 fosforilado, reforçando a hipótese de que esta droga causa citotoxicidade por meio da ativação da via extrínseca da apoptose. Dados da literatura mostram que a administração crônica de cocaína também induziu a ativação de NF κ B no núcleo acumbens de camundongos (ANG et al., 2001), em células endoteliais de cérebro humano (LEE et al., 2001) e em células PC12 (IMAM et al., 2005).

Desta forma os resultados confirmam efeitos centrais nos testes comportamentais do anti-inflamatório benzidamina e potencial efeito citotóxico estes comuns em drogas de abuso, já descritos na literatura.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em resumo, esse trabalho avaliou os efeitos centrais da Benzidamina através de experimentos comportamentais e dosagem de monoaminas e BDNF. Além disso, verificou-se seu potencial citotóxico em cultura de astrócitos corticais. Os achados foram:

➤ Testes comportamentais:

1. Aumentou a atividade locomotora em ambos os períodos de tratamento;
2. Aumentou *rearing* no tratamento agudo e diminuiu no tratamento de dose repetida;
3. Diminuiu a inibição pré-pulso em ambos os períodos de tratamento;
4. Causou déficit cognitivo no labirinto em Y e reconhecimento de objetos em ambos os períodos de tratamento;
5. Causou isolamento social no teste de interação social em ambos os períodos de tratamento;
6. Não alterou a atividade motora no teste do *rota rod* em ambos os períodos de tratamento;

➤ Testes neuroquímicos:

1. Dopamina:

1.1 Agudo:

- Diminuiu os níveis de dopamina;
- Não alterou os níveis de DOPAC;
- Aumentou os níveis de HVA;
- Aumentou a taxa de renovação nas doses de 100 e 200mg/kg.

1.2 Dose repetida:

- Não alterou os níveis de dopamina;
- Aumentou os níveis de DOPAC;
- Aumentou os níveis de HVA;
- Aumentou a taxa de renovação nas doses de 50 e 100 mg/kg.

2. Serotonina:

2.1 Agudo:

- Diminuiu os níveis de serotonina;
- Diminuiu os níveis de 5-HIAA;
- Não alterou a taxa de renovação.

2.2 Dose repetida:

- Aumentou os níveis de serotonina;
- Aumentou os níveis de 5-HIAA;
- Não alterou a taxa de renovação.

3. BDNF:

- Diminuiu os níveis de BDNF tanto em corpo estriado como em hipocampo.

➤ Testes *in vitro*:

1. MTT

- Houve uma redução da viabilidade celular;

2. Citometria de fluxo

- A citometria mostrou que a citotoxicidade de BEN é causada devido à ativação da via apoptótica;

3. Imunofluorescencia

- Houve um aumento na expressão de caspase-8 e NFκB p65, mostrando ativação da via extrínseca da apoptose;
- Não houve alteração na expressão de caspase-9.

CONCLUSÃO

8 CONCLUSÃO

O cloridrato de Benzidamina (BEN), anti-inflamatório, usado abusivamente por seus efeitos estimulantes, assim como outras drogas de abuso, apresenta efeitos deletérios no Sistema Nervoso Central (SNC) vistos através dos testes comportamentais e estes efeitos estão relacionados a alterações nos níveis de monoaminas e BDNF. BEN apresenta potencial efeito citotóxico relacionado à ativação da via extrínseca da apoptose.

REFERENCIAS

REFERENCIAS

- ABEL, E. L. Marihuana: The First Twelve Thousand Years. **Journal of Psychoactive Drugs**, v. 13, n. 4, p. 397–398, jul. 1981.
- ACAR, Y. A. et al. Case Report Acute Psychotic Symptoms due to Benzydamine Hydrochloride Abuse with Alcohol. **Case Reports in Psychiatry**, v. 2014, p. 2–4, 2014.
- AHMED, S. H. Validation crisis in animal models of drug addiction: Beyond non-disordered drug use toward drug addiction. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 35, n. 2, p. 172–184, 2010.
- ALEX, K. D.; PEHEK, E. A. Pharmacologic mechanisms of serotonergic regulation of dopamine neurotransmission. **Pharmacology & therapeutics**, v. 113, n. 2, p. 296–320, fev. 2007.
- ALEXANDER, G. E.; DELONG, M. R.; STRICK, P. L. Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex. **Annual review of neuroscience**, v. 9, p. 357–81, 1986.
- ANDEN, N. E. et al. DEMONSTRATION AND MAPPING OUT OF NIGRO-NEOSTRIATAL DOPAMINE NEURONS. **Life sciences**, v. 3, p. 523–30, jun. 1964.
- ANG, E. et al. Induction of nuclear factor-kappaB in nucleus accumbens by chronic cocaine administration. **Journal of neurochemistry**, v. 79, n. 1, p. 221–4, out. 2001.
- APERIA, A. C. Intrarenal dopamine: a key signal in the interactive regulation of sodium metabolism. **Annual review of physiology**, v. 62, p. 621–47, 2000.
- ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Anim Behav**, v. 21, n. 2, p. 205–235, 1973.
- ARMSTRONG, V. et al. **Repeated amphetamine treatment causes a persistent elevation of glial fibrillary acidic protein in the caudate–putamen** *European Journal of Pharmacology*. [s.l.: s.n.].
- ARON, J. L.; PAULUS, M. P. Location, location: using functional magnetic resonance imaging to pinpoint brain differences relevant to stimulant use. **Addiction**, v. 102, n. s1, p. 33–43, abr. 2007.
- BADDELEY, A. Working Memory. **Science**, v. 255, p. 556–559, 1992.
- BAI, X. et al. Ketamine Enhances Human Neural Stem Cell Proliferation and Induces Neuronal Apoptosis Via Reactive Oxygen Species- Mediated Mitochondrial Pathway. **Anesthesia & Analgesia**, v. 116, n. 4, p. 869–880, 2013.
- BALABAN, O. et al. Benzydamine Abuse As a Hallucinogen: Case Report. **Bulletin of Clinical Psychopharmacology**, v. 23, n. 3, p. 276–9, 2013.
- BALLESTEROS, S.; RAMÓN, M. F.; MARTÍNEZ-ARRIETA, R. Ingestions of benzydamine-containing vaginal preparations. **Clinical toxicology (Philadelphia, Pa.)**, v. 47, n. 2, p. 145–9, fev. 2009.
- BARRETT, S. P. et al. The hedonic response to cigarette smoking is proportional to dopamine release in the human striatum as measured by positron emission tomography and [11C]raclopride. **Synapse (New York, N.Y.)**, v. 54, n. 2, p. 65–71, nov. 2004.
- BECKER, A.; GRECKSCH, G. Ketamine-induced changes in rat behaviour: a possible animal model of schizophrenia. Test of predictive validity. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, v. 28, n. 8, p. 1267–77, dez. 2004.
- BERT, B. et al. Learning and memory in 5-HT(1A)-receptor mutant mice. **Behavioural brain research**, v. 195, n. 1, p. 78–85, 16 dez. 2008.
- BOILEAU, I. et al. Alcohol promotes dopamine release in the human nucleus accumbens. **Synapse (New York, N.Y.)**, v. 49, n. 4, p. 226–31, 15 set. 2003.

- BOSSONG, M. G. et al. Delta 9-tetrahydrocannabinol induces dopamine release in the human striatum. **Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 34, n. 3, p. 759–66, fev. 2009.
- BOWERS, M. S.; KALIVAS, P. W. Forebrain astroglial plasticity is induced following withdrawal from repeated cocaine administration. **European Journal of Neuroscience**, v. 17, n. 6, p. 1273–1278, mar. 2003.
- BRAFF, D. et al. Prestimulus Effects on Human Startle Reflex in Normals and Schizophrenics. **Psychophysiology**, v. 15, n. 4, p. 339–343, jul. 1978.
- BROOKSHIRE, B. R.; JONES, S. R. Direct and Indirect 5-HT receptor agonists produce gender- specific effects on locomotor and vertical activity in C57 BL/6J mice. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 94, n. 1, p. 194–203, 2009.
- BROSDA, J. et al. Pharmacological and parametrical investigation of prepulse inhibition of startle and prepulse elicited reactions in Wistar rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 99, n. 1, p. 22–28, 2011.
- BRUINS SLOT, L. A.; KLEVEN, M. S.; NEWMAN-TANCREDI, A. Effects of novel antipsychotics with mixed D(2) antagonist/5-HT(1A) agonist properties on PCP-induced social interaction deficits in the rat. **Neuropharmacology**, v. 49, n. 7, p. 996–1006, dez. 2005.
- BURDA, J. E.; SOFRONIEW, M. V. Reactive Gliosis and the Multicellular Response to CNS Damage and Disease. **Neuron**, v. 81, n. 2, p. 229–248, 2014.
- BUTT, A. M.; KALSI, A. Inwardly rectifying potassium channels (Kir) in central nervous system glia: a special role for Kir4.1 in glial functions. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 10, n. 1, p. 33–44, 2006.
- BÜTTNER, A.; WEIS, S. Neuropathological Alterations in Drug Abusers: The Involvement of Neurons, Glial, and Vascular Systems. **Forensic Science, Medicine and Pathology**, v. 2, n. 2, p. 115–126, 2006.
- CAMMAROTA, M. et al. Relationship between short- and long-term memory and short- and long-term extinction. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 84, n. 1, p. 25–32, 2005.
- CARLSSON, A. et al. Interactions between monoamines, glutamate, and GABA in schizophrenia: new evidence. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 41, p. 237–60, 2001.
- CARLSSON, A.; LINDQVIST, M.; MAGNUSSON, T. 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-Hydroxytryptophan as Reserpine Antagonists. **Nature**, v. 180, n. 4596, p. 1200–1200, 30 nov. 1957.
- CASSIMIRO, R. M. A. **A IMPORTÂNCIA DA PREVENÇÃO NA LUTA CONTRA AS DROGAS**. [s.l.] ACADEMIA NACIONAL DE POLÍCIA, 2009.
- CASTON, J.; JONES, N.; STELZ, T. Role of Preoperative and Postoperative Sensorimotor Training on Restoration of the Equilibrium Behavior in Adult Mice Following Cerebellectomy. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 64, n. 3, p. 195–202, 1995.
- CENTER FOR BEHAVIORAL HEALTH STATISTICS, S. **Results from the 2010 National Survey on Drug Use and Health: Summary of National Findings**. Rockville: 2010
- CHAKRAVARTHY, B.; SHAH, S.; LOTFIPOUR, S. Adolescent drug abuse - awareness & prevention. **The Indian journal of medical research**, v. 137, n. 6, p. 1021–3, jun. 2013.
- CHAUDHARY, P. M. et al. Activation of the NF-kappaB pathway by caspase 8 and its homologs. **Oncogene**, v. 19, n. 39, p. 4451–60, 14 set. 2000.
- CHEN, C. et al. Role of PUMA in methamphetamine-induced neuronal apoptosis. **Toxicology Letters**, v. 240, n. 1, p. 149–160, 2016.
- CHEN, C.-Y.; ANTHONY, J. C. Epidemiological estimates of risk in the process of becoming dependent upon cocaine: cocaine hydrochloride powder versus crack cocaine. **Psychopharmacology**, v. 172, n.

1, p. 78–86, fev. 2004.

CHOLERIS, E. et al. Differential Effects of Dopamine Receptor D1-Type and D2-Type Antagonists and Phase of the Estrous Cycle on Social Learning of Food Preferences, Feeding, and Social Interactions in Mice. **Neuropsychopharmacology**, v. 3650, n. 10, p. 1689–1702, 2011.

CHOW, T. W.; POLLOCK, B. G.; MILGRAM, N. W. Potential cognitive enhancing and disease modification effects of SSRIs for Alzheimer's disease. **Neuropsychiatric disease and treatment**, v. 3, n. 5, p. 627–36, 2007.

CIRULLI, F. et al. Intrahippocampal administration of BDNF in adult rats affects short-term behavioral plasticity in the Morris water maze and performance in the elevated plus-maze. **Hippocampus**, v. 14, n. 7, p. 802–7, 2004.

CLEMENS, K. J. et al. MDMA ("ecstasy"), methamphetamine and their combination: long-term changes in social interaction and neurochemistry in the rat. **Psychopharmacology**, v. 173, n. 3–4, p. 318–25, maio 2004.

COSTALL, B.; NAYLOR, R. J. Extrapyrmidal and mesolimbic involvement with the stereotypic activity of D- and L-amphetamine. **European Journal of Pharmacology**, v. 25, n. 2, p. 121–129, fev. 1974.

CRUZ, A. S. et al. Culturas celulares na detecção da toxicidade de materiais médico-hospitalares e outros que entram em contato com o ser humano. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 47, n. 1/2, p. 51–7, 1987.

CULLEN, K. M.; HALLIDAY, G. M. Chronic alcoholics have substantial glial pathology in the forebrain and diencephalon. **Alcohol and alcoholism (Oxford, Oxfordshire). Supplement**, v. 2, p. 253–7, 1994.

CUNHA-OLIVEIRA, T. et al. Mitochondrial dysfunction and caspase activation in rat cortical neurons treated with cocaine or amphetamine. **Brain Research**, v. 1089, n. 1, p. 44–54, 2006.

DAHLSTROEM, A.; FUXE, K. EVIDENCE FOR THE EXISTENCE OF MONOAMINE-CONTAINING NEURONS IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM. I. DEMONSTRATION OF MONOAMINES IN THE CELL BODIES OF BRAIN STEM NEURONS. **Acta physiologica Scandinavica. Supplementum**, p. SUPPL 232:1–55, 1964.

DALL'IGNA, O. P. et al. Caffeine and adenosine A(2a) receptor antagonists prevent beta-amyloid (25–35)-induced cognitive deficits in mice. **Experimental neurology**, v. 203, n. 1, p. 241–5, jan. 2007.

DAYAN, P.; HUYS, Q. J. M. Serotonin in affective control. **Annual review of neuroscience**, v. 32, p. 95–126, 2009.

DEGENHARDT, L. et al. Extent of illicit drug use and dependence, and their contribution to the global burden of disease. **Lancet (London, England)**, v. 379, n. 9810, p. 55–70, 7 jan. 2012.

DEGTEREV, A.; YUAN, J. Expansion and evolution of cell death programmes. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 9, n. 5, p. 378–90, maio 2008.

DEY, S.; SNOW, D. M. Cocaine exposure in vitro induces apoptosis in fetal locus coeruleus neurons through TNF-alpha-mediated induction of Bax and phosphorylated c-Jun NH(2)-terminal kinase. **Journal of neurochemistry**, v. 103, n. 2, p. 542–56, out. 2007.

DI CHIARA, G.; BASSAREO, V. Reward system and addiction: what dopamine does and doesn't do. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 7, n. 1, p. 69–76, 2007.

DI CHIARA, G.; IMPERATO, A. Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 85, n. 14, p. 5274–8, jul. 1988.

DO, M. et al. A case of benzydamine HCL intoxication. **Eastern Journal of Medicine**, v. 11, n. 1–2, p. 26–28, 2006.

DOKSAT, M. K. Reversible Worsening of Psychosis Due to Benzydamine in a Schizoaffective Young Girl Who is Already under Treatment with Antipsychotics. **Bulletin of Clinical Psychopharmacology**, v. 19, n. 3, p. 279–284, 2009.

- DREVETS, W. C. et al. Subgenual prefrontal cortex abnormalities in mood disorders. **Nature**, v. 386, n. 6627, p. 824–7, 24 abr. 1997.
- DREVETS, W. C. et al. Amphetamine-induced dopamine release in human ventral striatum correlates with euphoria. **Biological Psychiatry**, v. 49, n. 2, p. 81–96, jan. 2001.
- DUNHAM, N. W.; MIYA, T. S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. **Journal of the American Pharmaceutical Association. American Pharmaceutical Association**, v. 46, n. 3, p. 208–9, mar. 1957.
- DUPREZ, L. et al. Major cell death pathways at a glance. **Microbes and Infection**, v. 11, n. 13, p. 1050–1062, 2009.
- EAGLE, D. M.; BARI, A.; ROBBINS, T. W. The neuropsychopharmacology of action inhibition: cross-species translation of the stop-signal and go/no-go tasks. **Psychopharmacology**, v. 199, n. 3, p. 439–56, ago. 2008.
- EISENBERG, T. et al. Necrosis in yeast. **Apoptosis : an international journal on programmed cell death**, v. 15, n. 3, p. 257–68, mar. 2010.
- ELLENBROEK, B. A.; COOLS, A. R. Animal models for the negative symptoms of schizophrenia. **Behavioural pharmacology**, v. 11, n. 3-4, p. 223–33, jun. 2000.
- ELLINWOOD, E. H. Neuropharmacology of amphetamines and related stimulants. In: **Amphetamines and related stimulants: chemical, biological, clinical and sociological aspects**. [s.l.] CRC Press, 1980. p. 69–84.
- ELUMALAI, P. et al. Induction of apoptosis in human breast cancer cells by nimbolide through extrinsic and intrinsic pathway. **Toxicology Letters**, v. 215, n. 2, p. 131–142, 2012.
- EMCDDA, E. M. C. FOR D. AND D. A. **ANNUAL REPORT 2012: THE STATE OF THE DRUGS PROBLEM IN EUROPE**. Luxemburgo: 2012
- ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. **Behavioural brain research**, v. 31, n. 1, p. 47–59, 1 nov. 1988.
- ERSCHE, K. D. et al. Profile of executive and memory function associated with amphetamine and opiate dependence. **Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 31, n. 5, p. 1036–47, maio 2006.
- ETTENBERG, A. The runway model of drug self-administration. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 91, n. 3, p. 271–7, jan. 2009.
- FATTORE, L. et al. **Astroglial in vivo response to cocaine in mouse dentate gyrus: a quantitative and qualitative analysis by confocal microscopy** *Neuroscience*. [s.l.: s.n.].
- FERTIG, A.; DE SOUZA, L. M.; SCHNEIDER, J. F. O COTIDIANO DE FAMILIARES DE USUÁRIOS DE CRACK: UMA ANÁLISE REFLEXIVA. **Revista de Enfermagem**, v. 7, p. 5726–32, 2013.
- FILE, S. E.; HYDE, J. R. Can social interaction be used to measure anxiety? **British journal of pharmacology**, v. 62, n. 1, p. 19–24, jan. 1978a.
- FILE, S. E.; HYDE, J. R. Can social interaction be used to measure anxiety? **British journal of pharmacology**, v. 62, n. 1, p. 19–24, jan. 1978b.
- FILE, S. E.; SETH, P. A review of 25 years of the social interaction test. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, n. 1, p. 35–53, 2003.
- FILOSA, J. A. et al. Beyond neurovascular coupling, role of astrocytes in the regulation of vascular tone. **Neuroscience**, v. 323, p. 96–109, 2016.
- FINK, K. B.; GÖTHERT, M. 5-HT receptor regulation of neurotransmitter release. **Pharmacological reviews**, v. 59, n. 4, p. 360–417, dez. 2007.

- FLORIN, S. et al. Nociceptin stimulates locomotion and exploratory behaviour in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 317, n. 1, p. 9–13, dez. 1996.
- FRANKE, H. Influence of chronic alcohol treatment on the GFAP-immunoreactivity in astrocytes of the hippocampus in rats. **Acta histochemica**, v. 97, n. 3, p. 263–71, jul. 1995.
- FRESHNEY, R. I. **Culture of animal cells : a manual of basic technique**. [s.l.] Wiley, 2000.
- FRIEND, D. M.; KEEFE, K. A. Glial reactivity in resistance to methamphetamine-induced neurotoxicity. **Journal of Neurochemistry**, v. 125, n. 4, p. 566–574, maio 2013.
- FRIES, G. R. et al. **Early apoptosis in peripheral blood mononuclear cells from patients with bipolar disorder** **Journal of Affective Disorders**. [s.l.: s.n.].
- FUENTES-PRIOR, P.; SALVESEN, G. S. The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. **The Biochemical journal**, v. 384, n. Pt 2, p. 201–32, 1 dez. 2004.
- FULDA, S. et al. Cellular stress responses: cell survival and cell death. **International journal of cell biology**, v. 2010, p. 214074, 2010.
- GANGADHAR, N. M.; STOCKWELL, B. R. Chemical genetic approaches to probing cell death. **Current opinion in chemical biology**, v. 11, n. 1, p. 83–7, fev. 2007.
- GEYER, M. A. Serotonergic functions in arousal and motor activity. **Behavioural brain research**, v. 73, n. 1-2, p. 31–5, 1996.
- GEYER, M. A. et al. Pharmacological studies of prepulse inhibition models of sensorimotor gating deficits in schizophrenia: a decade in review. **Psychopharmacology**, v. 156, n. 2-3, p. 117–54, jul. 2001.
- GEYER, M. A.; VOLLENWEIDER, F. X. Serotonin research: contributions to understanding psychoses. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 29, n. 9, p. 445–453, 2008.
- GHOSH, S. et al. Missing Pieces in the NF- κ B Puzzle. **Cell**, v. 109, n. 2, p. S81–S96, abr. 2002.
- GHOSH, S.; MAY, M. J.; KOPP, E. B. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. **Annual review of immunology**, v. 16, p. 225–60, 1998.
- GÓMEZ-LÓPEZ, L. et al. Acute overdose due to benzydamine. **Human & experimental toxicology**, v. 18, n. 7, p. 471–3, jul. 1999.
- GONZÁLEZ-MAESO, J. et al. Psychedelics and schizophrenia. **Trends in neurosciences**, v. 32, n. 4, p. 225–32, abr. 2009.
- GRAHAM, F. K. Presidential Address, 1974. The more or less startling effects of weak prestimulation. **Psychophysiology**, v. 12, n. 3, p. 238–48, maio 1975.
- GRAYBIEL, A. M. The basal ganglia and cognitive pattern generators. **Schizophrenia bulletin**, v. 23, n. 3, p. 459–69, 1997.
- GREENWOOD, T. A. et al. Initial Heritability Analyses of Endophenotypic Measures for Schizophrenia. **Archives of General Psychiatry**, v. 64, n. 11, p. 1242, 1 nov. 2007.
- GUESS, W. L. et al. Agar Diffusion Method for Toxicity Screening of Plastics on Cultured Cell Monolayers. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 54, n. 10, p. 1545–1547, out. 1965.
- GUILARTE, T. . et al. Methamphetamine-induced deficits of brain monoaminergic neuronal markers: distal axotomy or neuronal plasticity. **Neuroscience**, v. 122, n. 2, p. 499–513, 2003.
- GÜRÜ, M. et al. Psychotic Disorder Related to Benzydamine Hydrochloride Abuse : A Case Report. **Bulletin of Clinical Psychopharmacology**, v. 22, n. 1, p. 51, 2012.
- HAGEN, E. H. et al. Ecology and neurobiology of toxin avoidance and the paradox of drug reward. **Neuroscience**, v. 160, p. 69–84, 2009.

- HALL, J.; THOMAS, K. L.; EVERITT, B. J. Rapid and selective induction of BDNF expression in the hippocampus during contextual learning. **Nature neuroscience**, v. 3, n. 6, p. 533–5, jun. 2000.
- HALLMAN, H.; JONSSON, G. Monoamine neurotransmitter metabolism in microencephalic rat brain after prenatal methylazoxymethanol treatment. **Brain research bulletin**, v. 13, n. 3, p. 383–9, set. 1984.
- HANNON, J.; HOYER, D. Molecular biology of 5-HT receptors. **Behavioural Brain Research**, v. 195, n. 1, p. 198–213, 2008.
- HAZELL, A. S. Astrocytes are a major target in thiamine deficiency and Wernicke's encephalopathy. **Neurochemistry International**, v. 55, n. 1, p. 129–135, 2009.
- HENRIQUEZ, M. et al. Cell death by necrosis, a regulated way to go. **Current molecular medicine**, v. 8, n. 3, p. 187–206, maio 2008.
- HERVÉ, D. et al. Serotonin axon terminals in the ventral tegmental area of the rat: fine structure and synaptic input to dopaminergic neurons. **Brain research**, v. 435, n. 1-2, p. 71–83, 1 dez. 1987.
- HITOMI, J. et al. Identification of a molecular signaling network that regulates a cellular necrotic cell death pathway. **Cell**, v. 135, n. 7, p. 1311–23, 26 dez. 2008.
- HOFFMAN, H. S.; ISON, J. R. Reflex modification in the domain of startle: I. Some empirical findings and their implications for how the nervous system processes sensory input. **Psychological Review**, v. 87, n. 2, p. 175–189, 1980a.
- HOFFMAN, H. S.; ISON, J. R. Reflex modification in the domain of startle: I. Some empirical findings and their implications for how the nervous system processes sensory input. **Psychological review**, v. 87, n. 2, p. 175–89, mar. 1980b.
- HOFFMANN, A.; BALTIMORE, D. Circuitry of nuclear factor kappaB signaling. **Immunological reviews**, v. 210, p. 171–86, abr. 2006.
- HORCH, H. W. et al. Destabilization of cortical dendrites and spines by BDNF. **Neuron**, v. 23, n. 2, p. 353–64, jun. 1999.
- HOTCHKISS, R. S. et al. Cell death. **The New England journal of medicine**, v. 361, n. 16, p. 1570–83, 15 out. 2009.
- HYMAN, S. E.; MALENKA, R. C.; NESTLER, E. J. Neural mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory. **Annual review of neuroscience**, v. 29, p. 565–98, 2006.
- IMAM, S. Z. et al. Cocaine induces a differential dose-dependent alteration in the expression profile of immediate early genes, transcription factors, and caspases in PC12 cells: a possible mechanism of neurotoxic damage in cocaine addiction. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1053, p. 482–90, ago. 2005.
- IVERSEN, S. D. Neural substrates mediating amphetamine responses. In: ELLINWOOD, E. H.; KILBEY, M. (Eds.). **Cocaine and other stimulants**. New York: Plenum Press, 1975. p. 31–45.
- IVERSEN, S. D. et al. Dopamine: 50 years in perspective. **Trends in neurosciences**, v. 30, n. 5, p. 188–93, maio 2007.
- JACOBS, B. L.; AZMITIA, E. C. Structure and function of the brain serotonin system. **Physiological reviews**, v. 72, n. 1, p. 165–229, jan. 1992.
- JANG, H.-S.; KIM, J.-Y. Comparative Analysis of Acute Toxic Poisoning in 2003 and 2011: Analysis of 3 Academic Hospitals Sung-Hyuk Choi, Young-Hoon Yoon, Sung-Woo Moon, Yun-Sik Hong, and Sung-Woo Lee. **@BULLET J Korean Med Sci**, v. 28, p. 1424–1430, 2013.
- JAROSZESKI, M. J.; RADCLIFF, G. Fundamentals of flow cytometry. **Molecular biotechnology**, v. 11, n. 1, p. 37–53, fev. 1999.
- JENDROSSEK, V. et al. Targeting apoptosis pathways by Celecoxib in cancer. **Cancer letters**, v. 332, n.

2, p. 313–24, 28 maio 2013.

JENTSCH, J. D.; TAYLOR, J. R. Impulsivity resulting from frontostriatal dysfunction in drug abuse: implications for the control of behavior by reward-related stimuli. **Psychopharmacology**, v. 146, n. 4, p. 373–90, out. 1999.

KALTSCHMIDT, C. et al. Constitutive NF-kappa B activity in neurons. **Molecular and cellular biology**, v. 14, n. 6, p. 3981–92, jun. 1994.

KALUEFF, A. V. et al. Conserved role for the serotonin transporter gene in rat and mouse neurobehavioral endophenotypes. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 34, n. 3, p. 373–386, 2010.

KANTAK, K. M. et al. Influence of cocaine self-administration on learning related to prefrontal cortex or hippocampus functioning in rats. **Psychopharmacology**, v. 181, n. 2, p. 227–36, set. 2005.

KIRBY, L. G.; ZEEB, F. D.; WINSTANLEY, C. A. Contributions of serotonin in addiction vulnerability. **Neuropharmacology**, v. 61, n. 3, p. 421–432, 2011.

KLAUS GRAWE RUTH DONATI FRIEDERIKE BERNAUER, VON. **Psychotherapie im Wandel Von der Konfession zur Profession**. Seattle: [s.n.].

KOOB, G. F.; VOLKOW, N. D. Neurocircuitry of addiction. **Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 35, n. 1, p. 217–38, jan. 2010.

KÖPPEL, C.; TENCZER, J. Metabolism of benzydamine. **Arzneimittel-Forschung**, v. 35, n. 3, p. 634–5, jan. 1985.

KUO, D.-Y. et al. NF-κB knockdown can modulate amphetamine-mediated feeding response. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 4, p. 1684–1694, 2012.

LABBÉ, K.; SALEH, M. Cell death in the host response to infection. **Cell death and differentiation**, v. 15, n. 9, p. 1339–49, set. 2008.

LACASSE, E. C. et al. IAP-targeted therapies for cancer. **Oncogene**, v. 27, n. 48, p. 6252–75, 20 out. 2008.

LALONDE, R.; BENSOUA, A. N.; FILALI, M. **Rotorod sensorimotor learning in cerebellar mutant mice** **Neuroscience Research**. [s.l: s.n.].

LARUELLE, M. et al. SPECT imaging of striatal dopamine release after amphetamine challenge. **Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine**, v. 36, n. 7, p. 1182–90, jul. 1995.

LE MOAL, M.; SIMON, H. Mesocorticolimbic dopaminergic network: functional and regulatory roles. **Physiological reviews**, v. 71, n. 1, p. 155–234, jan. 1991.

LEE, Y. W. et al. Methamphetamine induces AP-1 and NF-kappaB binding and transactivation in human brain endothelial cells. **Journal of neuroscience research**, v. 66, n. 4, p. 583–91, 15 nov. 2001.

LEICHSENRING, F.; RABUNG, S.; LEIBING, E. The efficacy of short-term psychodynamic psychotherapy in specific psychiatric disorders: a meta-analysis. **Archives of general psychiatry**, v. 61, n. 12, p. 1208–16, dez. 2004.

LEMMERS, B. et al. Essential role for caspase-8 in Toll-like receptors and NFkappaB signaling. **The Journal of biological chemistry**, v. 282, n. 10, p. 7416–23, 9 mar. 2007.

LEPSCH, L. B. et al. Cocaine induces cell death and activates the transcription nuclear factor kappa-b in pc12 cells. **Molecular Brain**, v. 2, n. 3, 2009.

LEPSCH, L. B.; PLANETA, C. S.; SCAVONE, C. Cocaine Causes Apoptotic Death in Rat Mesencephalon and Striatum Primary Cultures. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–7, 2015.

LERA, G. et al. Insight among psychotic patients with auditory hallucinations. **Journal of Clinical**

Psychology, v. 67, n. 7, p. 701–708, jul. 2011.

LEVIN, R. et al. Spontaneously Hypertensive Rats (SHR) present deficits in prepulse inhibition of startle specifically reverted by clozapine. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, v. 35, n. 7, p. 1748–52, ago. 2011.

LIU, X.; CHEN, H.; PATEL, D. J. Solution structure of actinomycin-DNA complexes: Drug intercalation at isolated G-C sites. **Journal of Biomolecular NMR**, v. 1, n. 4, p. 323–347, nov. 1991.

LU, Y.; CHRISTIAN, K.; LU, B. BDNF: a key regulator for protein synthesis-dependent LTP and long-term memory? **Neurobiology of learning and memory**, v. 89, n. 3, p. 312–23, mar. 2008.

LYGRE, H. et al. Biologic testing of leachable aromatic compounds from denture base materials. **Acta odontologica Scandinavica**, v. 53, n. 6, p. 397–401, dez. 1995.

MACHADO, A.; HAERTEL, L. M. Formação Reticular: Sistemas Modulatórios de Projeção Difusa. In: **Neuroanatomia Funcional**. 3 ed ed. São Paulo: Atheneu, 2014. p. 198–203.

MACIEL, C. F.; LIMA, M. H. A.; SOUSA, J. A. ESTUDO COMPARATIVO ENTRE OS ANSIOLÍTICOS DIAZEPAM E BUSPIRONA EM *Mus musculus*/ COMPARATIVE STUDY BETWEEN ANXIOLYTICS DIAZEPAM AND BUSPIRONA IN *Mus musculus*. **Saúde em Foco**, v. 2, n. 2, p. 49–61, 2015.

MACVICAR, B. A.; NEWMAN, E. A. Astrocyte Regulation of Blood Flow in the Brain. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 7, n. 5, p. a020388, maio 2015.

MAGISTRETTI, P. J. Neuron-glia metabolic coupling and plasticity. **The Journal of experimental biology**, v. 209, n. Pt 12, p. 2304–11, jun. 2006.

MALARKEY, E. B.; PARPURA, V. Mechanisms of glutamate release from astrocytes. **Neurochemistry international**, v. 52, n. 1-2, p. 142–54, jan. 2008.

MANDUCA, A. et al. Social play behavior, ultrasonic vocalizations and their modulation by morphine and amphetamine in Wistar and Sprague-Dawley rats. **Psychopharmacology**, v. 231, n. 8, p. 1661–73, abr. 2014.

MARÍN-LEÓN, L. et al. Percepção dos problemas da comunidade: influência de fatores sócio-demográficos e de saúde mental. v. 23, n. 5, p. 1089–1097, 2007.

MARTÍN, R. et al. Circuit-specific signaling in astrocyte-neuron networks in basal ganglia pathways. **Science (New York, N.Y.)**, v. 349, n. 6249, p. 730–4, 14 ago. 2015.

MATTSON, M. P.; MEFFERT, M. K. Roles for NF-kappaB in nerve cell survival, plasticity, and disease. **Cell death and differentiation**, v. 13, n. 5, p. 852–60, maio 2006.

MENDELSON, D.; RIEDEL, W. J.; SAMBETH, A. Effects of acute tryptophan depletion on memory, attention and executive functions: A systematic review. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 33, n. 6, p. 926–952, 2009.

MENESES, A. 5-HT system and cognition. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 23, n. 8, p. 1111–1125, 1999.

MICZEK, K. A.; TIDEY, J. W. Amphetamines: aggressive and social behavior. **NIDA research monograph**, v. 94, p. 68–100, 1989.

MIGUEL-HIDALGO, J. J. Lower Packing Density of Glial Fibrillary Acidic Protein???Immunoreactive Astrocytes in the Prelimbic Cortex of Alcohol-Naive and Alcohol-Drinking Alcohol-Preferring Rats as Compared With Alcohol-Nonpreferring and Wistar Rats. **Alcoholism: Clinical & Experimental Research**, v. 29, n. 5, p. 766–772, maio 2005.

MIGUEL-HIDALGO, J.; SHOYAMA, Y.; WANZO, V. Infusion of gliotoxins or a gap junction blocker in the prefrontal cortex increases alcohol preference in Wistar rats. **Journal of psychopharmacology (Oxford, England)**, v. 23, n. 5, p. 550–7, jul. 2009.

MISSALE, C. et al. Dopamine receptors: from structure to function. **Physiological reviews**, v. 78, n. 1,

p. 189–225, jan. 1998.

MITCHELL, E. S.; SNYDER-KELLER, A. Blockade of D1 dopaminergic transmission alleviates c-fos induction and cleaved caspase-3 expression in the brains of rat pups exposed to prenatal cocaine or perinatal asphyxia. **Experimental Neurology**, v. 182, n. 1, p. 64–74, 2003.

MITTLEMAN, G. Individual differences. In: **The Behavior of the Laboratory Rat: A Handbook with Tests**. New York: Oxford, 2005. p. 37–46.

MONLEÓN, S. et al. Antidepressant drugs and memory: insights from animal studies. **European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology**, v. 18, n. 4, p. 235–48, abr. 2008.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55–63, 16 dez. 1983.

MOTA, D. M. et al. Uso abusivo de benzidamina no Brasil: uma abordagem em farmacovigilância. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 15, n. 3, p. 717–724, maio 2010.

MU, J. S. et al. Deprivation of endogenous brain-derived neurotrophic factor results in impairment of spatial learning and memory in adult rats. **Brain research**, v. 835, n. 2, p. 259–65, 24 jul. 1999.

MÜLLER, C. P.; SCHUMANN, G. To use or not to use: Expanding the view on non-addictive psychoactive drug consumption and its implications. **The Behavioral and brain sciences**, v. 34, n. 6, p. 328–47, dez. 2011a.

MÜLLER, C. P.; SCHUMANN, G. Drugs as instruments: a new framework for non-addictive psychoactive drug use. **The Behavioral and brain sciences**, v. 34, n. 6, p. 293–310, dez. 2011b.

MUNHOZ, C. D. et al. Chronic unpredictable stress exacerbates lipopolysaccharide-induced activation of nuclear factor-kappaB in the frontal cortex and hippocampus via glucocorticoid secretion. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 26, n. 14, p. 3813–20, 5 abr. 2006.

MURPHY, D. L. et al. How the serotonin story is being rewritten by new gene-based discoveries principally related to SLC6A4, the serotonin transporter gene, which functions to influence all cellular serotonin systems. **Neuropharmacology**, v. 55, n. 6, p. 932–960, 2008.

NAGELHUS, E. A.; MATHIISEN, T. M.; OTTERSEN, O. P. Aquaporin-4 in the central nervous system: Cellular and subcellular distribution and coexpression with KIR4.1. **Neuroscience**, v. 129, n. 4, p. 905–913, 2004.

NEILL, D. B.; GRANT, L. D.; GROSSMAN, S. P. **Selective potentiation of locomotor effects of amphetamine by midbrain raphe lesions** *Physiology & Behavior*. [s.l.: s.n.].

NEILL, J. C. et al. Animal models of cognitive dysfunction and negative symptoms of schizophrenia: Focus on NMDA receptor antagonism. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 128, n. 3, p. 419–432, 2010.

NEUSCH, C. et al. Kir4.1 potassium channel subunit is crucial for oligodendrocyte development and in vivo myelination. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 21, n. 15, p. 5429–38, 1 ago. 2001.

NEUSCH, C. et al. Lack of the Kir4.1 channel subunit abolishes K⁺ buffering properties of astrocytes in the ventral respiratory group: impact on extracellular K⁺ regulation. **Journal of neurophysiology**, v. 95, n. 3, p. 1843–52, mar. 2006.

NIWA, M.; YAN, Y.; NABESHIMA, T. Genes and molecules that can potentiate or attenuate psychostimulant dependence: relevance of data from animal models to human addiction. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1141, p. 76–95, out. 2008.

NORRIS, C. M.; BLUMENTHAL, T. D. A relationship between inhibition of the acoustic startle response and the protection of prepulse processing. **Psychobiology**, v. 24, n. 2, p. 160–168, 1996.

- NUSBAUM, M. P.; CONTRERAS, D. Sensorimotor Gating: Startle Submits to Presynaptic Inhibition. **Current Biology**, v. 14, n. 6, p. R247–R249, 2004.
- O'DELL, L. E.; PARSONS, L. H. Serotonin1B receptors in the ventral tegmental area modulate cocaine-induced increases in nucleus accumbens dopamine levels. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 311, n. 2, p. 711–9, nov. 2004.
- O'TUATHAIGH, C. M. P. et al. Schizophrenia-related endophenotypes in heterozygous neuregulin-1 “knockout” mice. **The European journal of neuroscience**, v. 31, n. 2, p. 349–58, jan. 2010.
- ÖGREN, S. O. et al. The role of 5-HT1A receptors in learning and memory. **Behavioural Brain Research**, v. 195, n. 1, p. 54–77, 2008.
- OLIVEIRA, M. T. et al. Drugs of abuse induce apoptotic features in PC12 cells. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1010, p. 667–70, dez. 2003.
- OLNEY, J. W. Focus on apoptosis to decipher how alcohol and many other drugs disrupt brain development. **Frontiers in pediatrics**, v. 2, p. 81, 2014.
- OPALEYE, E. S. et al. Recreational use of benzydamine as a hallucinogen among street youth in Brazil. **Revista brasileira de psiquiatria (São Paulo, Brazil : 1999)**, v. 31, n. 3, p. 208–13, set. 2009.
- ORNSTEIN, T. J. et al. Profiles of cognitive dysfunction in chronic amphetamine and heroin abusers. **Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 23, n. 2, p. 113–26, ago. 2000.
- OSCAR-BERMAN, M.; MARINKOVIC, K. Alcoholism and the brain: an overview. **Alcohol research & health : the journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism**, v. 27, n. 2, p. 125–33, 2003.
- OUYANG, L. et al. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. **Cell proliferation**, v. 45, n. 6, p. 487–98, dez. 2012.
- PARPURA, V.; GRUBIŠIĆ, V.; VERKHRATSKY, A. Ca²⁺ sources for the exocytotic release of glutamate from astrocytes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1813, n. 5, p. 984–991, 2011.
- PEKNY, M.; WILHELMSSON, U.; PEKNA, M. The dual role of astrocyte activation and reactive gliosis. **Neuroscience Letters**, v. 565, p. 30–38, 2014.
- PESSIA, M. et al. **Actions of 5-hydroxytryptamine on ventral tegmental area neurons of the rat in vitro** Brain Research. [s.l.: s.n.].
- PETER, M. E.; KRAMMER, P. H. The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. **Cell death and differentiation**, v. 10, n. 1, p. 26–35, jan. 2003.
- PILLAI, A. Brain-Derived Neurotrophic Factor/TrkB Signaling in the Pathogenesis and Novel Pharmacotherapy of Schizophrenia. **Neurosignals**, v. 16, n. 2-3, p. 183–193, 5 fev. 2008.
- POO, M. M. Neurotrophins as synaptic modulators. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 2, n. 1, p. 24–32, jan. 2001.
- QUANE, P. A.; GRAHAM, G. G.; ZIEGLER, J. B. Pharmacology of benzydamine. **Inflammopharmacology**, v. 6, n. 2, p. 95–107, jan. 1998.
- RADYUSHKIN, K. et al. Neuroligin-3-deficient mice: model of a monogenic heritable form of autism with an olfactory deficit. **Genes, Brain and Behavior**, v. 8, n. 4, p. 416–425, jun. 2009.
- RAJKOWSKA, G.; STOCKMEIER, C. A. Astrocyte pathology in major depressive disorder: insights from human postmortem brain tissue. **Current drug targets**, v. 14, n. 11, p. 1225–36, out. 2013.
- RANSOM, B. R. **Neuroglia**. [s.l.] Oxford University Press, 2012.
- RIEDL, S. J.; SALVESEN, G. S. The apoptosome: signalling platform of cell death. **Nature reviews.**

Molecular cell biology, v. 8, n. 5, p. 405–13, maio 2007.

RINTALA, J. et al. Dose-dependent decrease in glial fibrillary acidic protein-immunoreactivity in rat cerebellum after lifelong ethanol consumption. **Alcohol**, v. 23, n. 1, p. 1–8, 2001.

RISS, T. L. et al. **Cell Viability Assays**. [s.l.] Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2013.

ROBINSON, T. E.; BERRIDGE, K. C. The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. **Brain research. Brain research reviews**, v. 18, n. 3, p. 247–91, 1993.

ROGERO, S. . et al. Cytotoxicity due to corrosion of ear piercing studs. **Toxicology in Vitro**, v. 14, n. 6, p. 497–504, 2000a.

ROGERO, S. O. et al. Citotoxicidade in vitro das membranas de hidrogel reticuladas por radiação ionizante. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 59, n. 1/2, p. 1–5, 2000b.

ROGERS, R. D. et al. Dissociable deficits in the decision-making cognition of chronic amphetamine abusers, opiate abusers, patients with focal damage to prefrontal cortex, and tryptophan-depleted normal volunteers: evidence for monoaminergic mechanisms. **Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 20, n. 4, p. 322–39, abr. 1999.

ROGERS, R. D.; ROBBINS, T. W. The neuropsychology of drug abuse. In: RON, M. A.; ROBBINS, T. W. (Eds.). . **Disorders of Brain and Mind**. Cambridge: Cambridge University Press, 2003. p. 447–467.

ROSSI, D. et al. Focal degeneration of astrocytes in amyotrophic lateral sclerosis. **Cell death and differentiation**, v. 15, n. 11, p. 1691–700, nov. 2008.

SALDANHA, V. B.; PLEIN, F. A. DOS S.; JORNADA, L. K. Non-medical use of benzidamina: case study. **J Bras Psiquiatr**, v. 42, n. 9, p. 503–5, 1993.

SAMS-DODD, F. Distinct effects of d-amphetamine and phencyclidine on the social behaviour of rats. **Behavioural pharmacology**, v. 6, n. 1, p. 55–65, jan. 1995.

SAMS-DODD, F. Effects of dopamine agonists and antagonists on PCP-induced stereotyped behaviour and social isolation in the rat social interaction test. **Psychopharmacology**, v. 135, n. 2, p. 182–93, jan. 1998a.

SAMS-DODD, F. A test of the predictive validity of animal models of schizophrenia based on phencyclidine and D-amphetamine. **Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 18, n. 4, p. 293–304, abr. 1998b.

SAMS-DODD, F. Effects of continuous D-amphetamine and phencyclidine administration on social behaviour, stereotyped behaviour, and locomotor activity in rats. **Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 19, n. 1, p. 18–25, jul. 1998c.

SAMS-DODD, F. Phencyclidine in the social interaction test: an animal model of schizophrenia with face and predictive validity. **Reviews in the neurosciences**, v. 10, n. 1, p. 59–90, jan. 1999.

SAMS-DODD, F.; LIPSKA, B. K.; WEINBERGER, D. R. Neonatal lesions of the rat ventral hippocampus result in hyperlocomotion and deficits in social behaviour in adulthood. **Psychopharmacology**, v. 132, n. 3, p. 303–10, ago. 1997.

SARVEIYA, V.; TEMPLETON, J. F.; BENSON, H. A. E. Effect of lipophilic counter-ions on membrane diffusion of benzydamine. **European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences**, v. 26, n. 1, p. 39–46, set. 2005.

SAVASKAN, E. et al. Antidepressive therapy with escitalopram improves mood, cognitive symptoms, and identity memory for angry faces in elderly depressed patients. **The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (CINP)**, v. 11, n. 3, p. 381–8, maio 2008.

- SCHIFANO, F. et al. Analysis of online reports on the potential misuse of benzidamine. **Rivista di psichiatria**, v. 48, n. 3, p. 182–6, 2013.
- SCHVARTSMAN C, S. S. Intoxicação por Benzidamina Conseqüente à Ingestão de Colutório Antiinflamatório. **Pediat. (S. Paulo)**, v. 8, p. 107–9, 1986.
- SELEGHIM, M. R.; GALERA, S. A. F.; OLIVEIRA, M. L. F. DE. Pesquisa com usuários de crack e seus familiares: análise de uma vivência. **Saúde & Transformação Social / Health & Social Change**, v. 5, n. 1, p. 36–41, 2014.
- SHIKAMA, Y.; YAMADA, M.; MIYASHITA, T. Caspase-8 and caspase-10 activate NF-kappaB through RIP, NIK and IKKalpha kinases. **European journal of immunology**, v. 33, n. 7, p. 1998–2006, jul. 2003.
- SILVESTRINI, B. et al. Toxicology of benzydamine. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 10, n. 1, p. 148–59, jan. 1967.
- SLAMBEROVÁ, R. et al. Do the effects of prenatal exposure and acute treatment of methamphetamine on anxiety vary depending on the animal model used? **Behavioural Brain Research**, v. 292, p. 361–369, 2015.
- SNIGDHA, S.; NEILL, J. C. Efficacy of antipsychotics to reverse phencyclidine-induced social interaction deficits in female rats--a preliminary investigation. **Behavioural brain research**, v. 187, n. 2, p. 489–94, mar. 2008a.
- SNIGDHA, S.; NEILL, J. C. Improvement of phencyclidine-induced social behaviour deficits in rats: involvement of 5-HT1A receptors. **Behavioural brain research**, v. 191, n. 1, p. 26–31, ago. 2008b.
- SOFRONIEW, M. V. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. **Trends in Neurosciences**, v. 32, n. 12, p. 638–647, 2009.
- SONG, P.; ZHAO, Z.-Q. The involvement of glial cells in the development of morphine tolerance. **Neuroscience Research**, v. 39, n. 3, p. 281–286, 2001.
- SPRICK, M. R.; WALCZAK, H. The interplay between the Bcl-2 family and death receptor-mediated apoptosis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1644, n. 2, p. 125–132, 2004.
- SQUIRE, L. R.; ZOLA, S. M. Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 24, p. 13515–22, 26 nov. 1996.
- STUDERUS, E. et al. Acute, subacute and long-term subjective effects of psilocybin in healthy humans: a pooled analysis of experimental studies. **Journal of psychopharmacology (Oxford, England)**, v. 25, n. 11, p. 1434–52, nov. 2011.
- SWERDLOW, N. R. et al. Realistic expectations of prepulse inhibition in translational models for schizophrenia research. **Psychopharmacology**, v. 199, n. 3, p. 331–88, ago. 2008a.
- SWERDLOW, N. R. et al. Realistic expectations of prepulse inhibition in translational models for schizophrenia research. **Psychopharmacology**, v. 199, n. 3, p. 331–88, ago. 2008b.
- SWERDLOW, N. R.; GEYER, M. A. Using an Animal Model of Deficient Sensorimotor Gating to Study the Pathophysiology and New Treatments of Schizophrenia. **Schizophrenia Bulletin**, v. 24, n. 2, p. 285–301, jan. 1998.
- TAYLOR, K. M. Is there a catecholamine-serotonin interaction in the control of locomotor activity? **Neuropharmacology**, v. 14, n. 7, p. 501–6, jul. 1975.
- TIRADO OTÁLVARO, A. F. et al. Calidad de vida de pacientes con dependencia a heroína de un centro de atención de drogodependencias de Medellín (Colombia). **Investigación y educación en enfermería, ISSN 0120-5307, Vol. 30, N° 1, 2012, págs. 35-43**, v. 30, n. 1, p. 35–43, 2012.
- TREZZA, V.; BAARENDSE, P. J. J.; VANDERSCHUREN, L. J. M. J. On the interaction between drugs of

- abuse and adolescent social behavior. **Psychopharmacology**, v. 231, n. 8, p. 1715–29, abr. 2014.
- TURNBULL, R. S. Benzydamine Hydrochloride (Tantum) in the management of oral inflammatory conditions. **Journal (Canadian Dental Association)**, v. 61, n. 2, p. 127–34, fev. 1995.
- ULLIAN, E. M. et al. Control of synapse number by glia. **Science (New York, N.Y.)**, v. 291, n. 5504, p. 657–61, 26 jan. 2001.
- URBAN, N. B. L. et al. Sex Differences in Striatal Dopamine Release in Young Adults After Oral Alcohol Challenge: A Positron Emission Tomography Imaging Study With [11C]Raclopride. **Biological Psychiatry**, v. 68, n. 8, p. 689–696, out. 2010.
- VEENHOVEN, R. Hedonism and Happiness. **Journal of Happiness Studies**, v. 4, n. 4, p. 437–457, 2003.
- VERKHRATSKÍĚ, A. N. (ALEKSEĚ N.; BUTT, A. **Glial physiology and pathophysiology**. [s.l.] John Wiley & Sons, 2013.
- VERKHRATSKY, A. et al. Glial Asthenia and Functional Paralysis: A New Perspective on Neurodegeneration and Alzheimer's Disease. **The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry**, 14 ago. 2014.
- VERKHRATSKY, A. et al. Translational potential of astrocytes in brain disorders. **Progress in Neurobiology**, 2015.
- VERKHRATSKY, A.; RODRÍGUEZ, J. J.; STEARDO, L. Astrogliopathology: a central element of neuropsychiatric diseases? **The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry**, v. 20, n. 6, p. 576–88, dez. 2014.
- VETULANI, J. Drug addiction. Part I. Psychoactive substances in the past and presence. **Polish journal of pharmacology**, v. 53, n. 3, p. 201–14, 2001.
- VICENCIO, J. M. et al. Senescence, apoptosis or autophagy? When a damaged cell must decide its path--a mini-review. **Gerontology**, v. 54, n. 2, p. 92–9, 2008.
- VOLKOW, N. D. et al. Imaging endogenous dopamine competition with [11C]raclopride in the human brain. **Synapse (New York, N.Y.)**, v. 16, n. 4, p. 255–62, abr. 1994.
- VOLKOW, N. D. et al. Reinforcing effects of psychostimulants in humans are associated with increases in brain dopamine and occupancy of D(2) receptors. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 291, n. 1, p. 409–15, out. 1999.
- VOLLENWEIDER, F. X. et al. Effects of (S)-ketamine on striatal dopamine: a [11C]raclopride PET study of a model psychosis in humans. **Journal of Psychiatric Research**, v. 34, n. 1, p. 35–43, jan. 2000.
- VOLLENWEIDER, F. X.; KOMETER, M. The neurobiology of psychedelic drugs: implications for the treatment of mood disorders. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 11, n. 9, p. 642–51, set. 2010.
- WAGNER, F. A.; ANTHONY, J. C. From first drug use to drug dependence; developmental periods of risk for dependence upon marijuana, cocaine, and alcohol. **Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 26, n. 4, p. 479–88, abr. 2002.
- WALDORF, D.; REINARMAN, C.; MURPHY, S. **Cocaine Changes: The Experience of Using and Quitting**. Philadelphia: Temple University Press, 1992.
- WALKER, N. I. et al. Patterns of cell death. **Methods and achievements in experimental pathology**, v. 13, p. 18–54, 1988.
- WAN, F.-J.; SWERDLOW, N. R. Sensorimotor gating in rats is regulated by different dopamine-glutamate interactions in the nucleus accumbens core and shell subregions. **Brain Research**, v. 722, n. 1, p. 168–176, 1996.
- WANG, H.-W. et al. Benzydamine oral spray inhibiting parasympathetic function of tracheal smooth muscle. **Clinical and experimental otorhinolaryngology**, v. 8, n. 1, p. 65–8, mar. 2015.

- WATERHOUSE, E. G.; XU, B. New insights into the role of brain-derived neurotrophic factor in synaptic plasticity. **Molecular and cellular neurosciences**, v. 42, n. 2, p. 81–9, out. 2009.
- WEBER, M. et al. Quantitative analysis of astrogliosis in drug-dependent humans. **Brain Research**, v. 1500, p. 72–87, 2013.
- WHELAN, R. S.; KAPLINSKIY, V.; KITSIS, R. N. Cell death in the pathogenesis of heart disease: mechanisms and significance. **Annual review of physiology**, v. 72, p. 19–44, 2010.
- WIENS, F. et al. Chronic intake of fermented floral nectar by wild treeshrews. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 30, p. 10426–10431, 29 jul. 2008.
- WILSON, J. M. et al. Striatal dopamine nerve terminal markers in human, chronic methamphetamine users. **Nature medicine**, v. 2, n. 6, p. 699–703, jun. 1996.
- WILSON, N. S.; DIXIT, V.; ASHKENAZI, A. Death receptor signal transducers: nodes of coordination in immune signaling networks. **Nature immunology**, v. 10, n. 4, p. 348–55, abr. 2009.
- WINTER, J. C. Hallucinogens as discriminative stimuli in animals: LSD, phenethylamines, and tryptamines. **Psychopharmacology**, v. 203, p. 251–263, 2009.
- WISE, R. A.; BOZARTH, M. A. A psychomotor stimulant theory of addiction. **Psychological review**, v. 94, n. 4, p. 469–92, out. 1987.
- WYLLIE, A. H. "Where, O death, is thy sting?" A brief review of apoptosis biology. **Molecular neurobiology**, v. 42, n. 1, p. 4–9, ago. 2010.
- YAMADA, K. et al. The role of nitric oxide in dizocilpine-induced impairment of spontaneous alternation behavior in mice. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 276, n. 2, p. 460–6, fev. 1996.
- YOULE, R. J.; STRASSER, A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 9, n. 1, p. 47–59, jan. 2008.
- ZOLA-MORGAN, S.; SQUIRE, L. R. Neuroanatomy of memory. **Annual review of neuroscience**, v. 16, p. 547–63, 1993.
- ZONG, W.-X.; THOMPSON, C. B. Necrotic death as a cell fate. **Genes & development**, v. 20, n. 1, p. 1–15, 1 jan. 2006.