



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA
DOUTORADO EM FARMACOLOGIA**

ADRIANA MARY NUNES COSTA OKAMURA

**ANÁLISE COMPORTAMENTAL E NEUROQUÍMICA DE RATOS TRATADOS COM
DOSES REPETIDAS DE LISDEXANFETAMINA NA INFÂNCIA E
PERIADOLESCÊNCIA**

ORIENTADORA: DANIELLE MACÊDO GASPAR

**FORTALEZA
2019**

ADRIANA MARY NUNES COSTA OKAMURA

**ANÁLISE COMPORTAMENTAL E NEUROQUÍMICA DE RATOS TRATADOS COM
DOSES REPETIDAS DE LISDEXANFETAMINA NA INFÂNCIA E
PERIADOLESCÊNCIA**

Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós-graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como pré-requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Farmacologia.

**Orientador: Profa. Dra. Danielle
Macêdo Gaspar**

**FORTALEZA
2019**

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)

- O36a Okamura, Adriana Mary Nunes Costa.
ANÁLISE COMPORTAMENTAL E NEUROQUÍMICA DE RATOS TRATADOS COM
DOSES REPETIDAS DE LISDEXANFETAMINA NA INFÂNCIA E PERIADOLESCÊNCIA /
Adriana Mary Nunes Costa Okamura. – 2019.
107 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa
de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2019.
Orientação: Profa. Dra. Danielle Macêdo Gaspar.
1. Lisdexanfetamina, transtorno de déficit de atenção e hiperatividade, comportamento,
neuroquímica.. I. Título.

CDD 615.1

ADRIANA MARY NUNES COSTA OKAMURA

**ANÁLISE COMPORTAMENTAL E NEUROQUÍMICA DE RATOS TRATADOS COM
DOSES REPETIDAS DE LISDEXANFETAMINA NA INFÂNCIA E
PERIADOLESCÊNCIA**

Aprovada em: ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA

**Profa. Danielle Macedo Gaspar
Universidade Federal do Ceara – UFC**

**Profa. Dra. Adriane Ribeiro Rosa
Universidade Federal do Rio Grande do Sul**

**Prof. Dr. Alexandre Menezes Sampaio
Universidade de Fortaleza**

**Profa. Dra. Adriane Ribeiro Rosa
Universidade Estadual do Ceará**

**Profa. Dra. Ismênia Carvalho Brasileiro
Universidade Estácio**

AGRADECIMENTOS

Sobretudo a Deus que tem me ajudado com força e foco a traçar meu caminho.

A minha orientadora e professora Danielle, pela confiança no meu trabalho, pela disponibilidade em me ajudar no que fosse preciso e pelo seu exemplo de mulher forte e determinada que consegue conciliar com maestria os papéis de mãe, esposa e pesquisadora.

Ao meu esposo Alexandre e meu pequeno Arthur, pelo apoio e pela compreensão nos momentos em que abriram mão da minha companhia para que eu pudesse me dedicar aos estudos.

Aos meus pais, que sempre me ensinaram a ser honesta e que me mostraram que o conhecimento é um “bem” que quando adquirido jamais pode ser usurpado.

Aos meus irmãos, que mesmo traçando caminhos diferentes dos meus, sempre estiveram por perto.

Aos queridos amigos Camila e Eliclécio, por todo apoio e cumplicidade ao longo destes quatro anos de curso. Serei eternamente grata a vocês!

Aos amigos Germana e Manuel, por todo apoio e sensibilidade ofertados no momento da minha gestação.

As minhas amigas conquistadas no laboratório ainda no período de mestrado e mantidas no doutorado: Gersilene, Fernanda e Patrícia, muito obrigada pela parceria mesmo quando já não mais faziam parte, diretamente, do corpo de pesquisa.

Obrigada aos colegas Tatiane, Giovana, Greyce e Isabelle, por fazerem com que as conversas descomprometidas no laboratório ou horários de almoço deixassem os dias longos mais leves.

Aos ICs Paulo Henrique e Débora que me ajudaram cotidianamente sendo meu braço direito em períodos de tratamento e testes experimentais.

Às técnicas Vila e Lena pelo acolhimento de sempre.

À veterinária Gabriela, por sua doçura e maternal compreensão.

À FUNCAP pelo apoio ao desenvolvimento científico e tecnológico pelo incentivo ao desenvolvimento da ciência em nosso estado/país que tanto precisa deste investimento

Muito obrigada a todos que trabalham por “de trás das cortinas” do laboratório: aos funcionários da limpeza, da portaria (que sempre estavam trabalhando nos finais de semana e feriados e que nos permitiram realizar tratamentos nestes dias), do serviço do RU e do suporte do biotério.

Por fim, agradeço a todos com quem convivi e que participaram de forma direta e indireta na concretização deste trabalho e que por ventura não mencionei neste agradecimento.

“A vitória está reservada para aqueles que estão dispostos a pagar o preço.”

SUN TZU

RESUMO

ANÁLISE COMPORTAMENTAL E NEUROQUÍMICA DE RATOS TRATADOS COM DOSES REPETIDAS DE LISDEXANFETAMINA NA INFÂNCIA E PERIADOLESCÊNCIA

O crescimento notório do número de casos de transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) nas últimas décadas tem despertado a atenção de especialistas para possíveis diagnósticos precoces e/ou equivocados deste transtorno. As medicações para tratamento do TDAH, por exemplo, ritalina e mais recentemente a lisdexanfetamina (LDX - venvanse®) têm como mecanismo de ação a potencialização da neurotransmissão dopaminérgica em áreas cerebrais como o córtex pré-frontal. Especificamente a LDX, aprovada pelo FDA em 2007 para o tratamento de crianças (a partir de 6 anos) e adolescentes e, mais recentemente aprovada para uso em adultos, é um pró-fármaco da D-anfetamina. O aumento do consumo destes psicoestimulantes, também ocorreu entre jovens e adultos com a finalidade de aumentar a capacidade cognitiva. Embora a prescrição de tais fármacos tenha como objetivo o tratamento do TDAH, narcolepsia e do transtorno alimentar compulsivo, os mesmos têm sido amplamente utilizados por indivíduos saudáveis. Diante deste cenário, o objetivo do presente trabalho foi investigar alterações comportamentais e neuroquímicas induzidas pela administração repetida de LDX em ratos em idades relacionadas à infância e adolescência de humanos. Para tanto, os animais foram randomicamente separados em três grupos. O primeiro composto por animais tratados por uma semana com LDX a uma concentração de 10mg/kg; o grupo 2 de animais tratados por duas semanas com LDX, sendo 10mg/kg na primeira semana e 13 mg/kg na segunda semana; e por fim o grupo 3 composto por ratos tratados por três semanas com LDX (respeitando a concentração de 10 mg/kg na primeira semana, 13 na segunda semana e 18 na terceira semana). Outros três grupos foram tratados com salina pelo mesmo intervalo de tempo. Foram realizados testes de comportamento com o intuito de avaliar a atividade exploratória e locomotora, níveis de ansiedade e cognição, além de alterações neuro-oxidativas e neuroinflamatórias. Os resultados para testes de comportamento mostraram que a administração da LDX não trouxe alterações da memória operacional (no teste de Y Maze), porém promoveu diminuição da memória declarativa de curto prazo (no teste de NOR) e um comportamento tipo-ansioso (no teste do campo aberto) nos animais de forma progressiva ao longo do tratamento. As análises bioquímicas mostraram que as regiões do hipocampo e corpo estriado dos ratos tratados com LDX por 3 semanas apresentaram desequilíbrio oxidativo com diminuição dos níveis de GSH e aumento dos níveis de TBARS. Pôde-se observar ainda um sugestivo mecanismo compensatório de IL-6, além de um aumento da expressão de receptor AT1 no hipocampo dos animais tratados por três semanas com LDX. Por fim, podemos concluir com os achados deste estudo que a administração da LDX por animais saudáveis, pode trazer danos cognitivos e bioquímicos, principalmente se for realizada por longos períodos e com altas doses.

Palavras chave: Lisdexanfetamina, transtorno de déficit de atenção e hiperatividade, comportamento, neuroquímica.

ABSTRACT

BEHAVIORAL AND NEUROCHEMICAL ANALYSIS OF RATS TREATED WITH REPEATED DOSES OF LISDEXANFETAMINE IN CHILDREN AND PERIODOLESCENCE

The notable increase in the number of attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) cases in recent decades has attracted the attention of specialists for possible early and / or misdiagnosis of this disorder. Medications for the treatment of ADHD, for example, ritalin and, more recently, lisdexamphetamine (LDX-venvance®) have as a mechanism of action potentiate of dopaminergic neurotransmission in brain areas such as the prefrontal cortex. Specifically LDX, approved by the FDA in 2007 for the treatment of children (from 6 years and adolescents and most recently approved for use in adults), is a prodrug of D-amphetamine. The increase in the consumption of these psycho-stimulants also occurred among youngsters and adults in order to increase cognitive capacity. Although the prescription of such drugs is aimed at the treatment of ADHD, narcolepsy and compulsive eating disorder, they have been widely used by healthy individuals. In view of this scenario the objective of the present work was to investigate behavioral and neurochemical changes induced by the repeated administration of LDX in rats at ages related to the childhood and adolescence of humans. For this, the animals were randomly separated into the following groups: group 1) animals treated for one week with LDX (10mg / kg); group 2) treated animals for two weeks LDX 10mg (in the first week) and 13 mg / kg (in the second week); group 3) rats treated for three weeks with LDX 10 (first week), 13 (second week) and 18 mg / kg (third week). Three other groups were treated with saline for the same time interval. Behavioral tests were performed to evaluate the exploratory and locomotor activity, anxiety and cognition levels, as well as neuro-oxidative and neuroinflammatory alterations. The results for behavioral tests showed that LDX administration did not bring about changes in operational memory (in the Y Maze test), however, it promoted short-term memory loss (in the NOR test) and an anxious-type behavior in the animals progressively throughout the treatment. Biochemical analyzes showed that the hippocampus and striatum regions of LDX treated mice for 3 weeks showed oxidative imbalance with decreased GSH levels and increased TBARS levels. It was also possible to observe a suggestive compensatory mechanism of IL-6, in addition to an increase in AT1 receptor expression in the hippocampus of the animals treated for three weeks with LDX. Finally, we can conclude from the findings of this study that the administration of the psychostimulant in question in healthy animals can cause cognitive and biochemical damage, especially if it is performed for long periods and at high doses.

Key words: Lisdexamphetamine, attention deficit hyperactivity disorder, behavior, neurochemistry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Gráfico comparativo da dispensação de psicoativos em uma unidade de farmácia do Rio de Janeiro nos dois primeiros bimestres dos anos de 2016 e 2017

Figura 2: Estrutura química da anfetamina e seus derivados a partir do radical amina.

Figura 3: Estrutura química e hidrólise da LDX.

Figura 4: Representação ilustrativa da síntese e liberação de dopamina na fenda sináptica.

Figura 5: Representação do córtex ligado ao corpo estriado através de circuitos

Figura 6: Representação da cascata de reações que ocorrem a partir da ativação do receptor AT1.

Figura 7: Fórmula da relação entre dose clínica em humanos e dose pré-clínica em animais.

Figura 8: representação esquemática dos grupos dos animais formados para realização do estudo

Figura 9: representação da captura de tela do campo aberto

Figura 10: Aparato Y Maze

Figura 11: Fórmula utilizada para calcular a porcentagem de acertos no teste Y-Maze.

Figura 12: Representação esquemática das 3 fases que abrangem o teste de reconhecimento do objeto novo.

Figura 13: Fórmula utilizada para calcular o índice de reconhecimento do objeto novo

Figura 14: Gráfico da atividade exploratória realizada pelos animais tratados com doses progressivas de lisdexanfetamina por 1, 2 ou 3 semanas.

Figura 15: Mapa do trajeto percorrido pelos animais no campo aberto

Figura 16: Gráfico do comportamento de rearings realizados pelos animais tratados com doses progressivas de lisdexanfetamina por 1, 2 ou 3 semanas.

Figura 17: Gráfico do comportamento animal pela preferência pelo centro do aparato

Figura 18: Gráfico do comportamento da realização de movimento de *grooming*

Figura 19: Gráfico da porcentagem de acertos no Y-Maze

Figura 20: Gráfico do índice de reconhecimento do objeto novo

Figura 21: Gráfico dos resultados dos níveis de GSH no CPF dos grupos de animais tratados com doses progressivas de lisdexanfetamina por 1, 2 ou 3 semanas.

Figura 22: Gráfico dos resultados dos níveis de GSH no HC dos grupos de animais tratados com doses progressivas de lisdexanfetamina por 1, 2 ou 3 semanas.

Figura 23: Gráfico dos resultados dos níveis de GSH no CE dos grupos de animais tratados com doses progressivas de lisdexanfetamina por 1, 2 ou 3 semanas.

Figura 24: Gráfico dos resultados dos níveis de peroxidação lipídica no CPF dos animais tratados com doses progressivas de lisdexanfetamina por 1, 2 ou 3 semanas.

Figura 25: Gráfico dos resultados dos níveis de peroxidação lipídica no HC dos animais tratados com doses progressivas de lisdexanfetamina por 1, 2 ou 3 semanas.

Figura 26: Gráfico dos resultados dos níveis de peroxidação lipídica no CE dos animais tratados com doses progressivas de lisdexanfetamina por 1, 2 ou 3 semanas.

Figura 27: Gráfico dos resultados dos níveis IL1 β no hipocampo dos animais tratados com doses progressivas de lisdexanfetamina por 2 ou 3 semanas.

Figura 28: Gráfico dos resultados dos níveis IL-4 no hipocampo dos animais tratados com doses progressivas de lisdexanfetamina por 2 ou 3 semanas.

Figura 29: Gráfico dos resultados da expressão do receptor AT1 no HC dos animais tratados com doses progressivas de lisdexanfetamina por 1 e 3 semanas

Figura 30: Gráfico dos resultados da expressão de IBA, marcador de ativação microglial no HC de animais tratados com doses progressivas de lisdexanfetamina por 1 e 3 semanas.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Relação do uso de psicoativos com melhora cognitiva e motivacional.

Tabela 2: Relação idade animal e idade humana com especificação de principais acontecimentos no desenvolvimento anatômico e comportamental.

Tabela 3: Correspondência entre idade dos ratos e do ser humano e relação do tempo de tratamento dentro do período de faixas etárias correspondentes

Tabela 4: Tampões utilizados no protocolo Western Blotting e suas respectivas composições.

Tabela 5: Síntese dos resultados comportamentais e neuroquímicos dos animais submetidos ao tratamento com LDX quando comparados aos tratados com salina

Tabela 6: Tabela síntese das correlações entre parâmetros comportamentais e neuroquímicos nas semanas 1, 2 e 3 de tratamento.

LISTA DE ABREVIATURAS

± EPM	Expressas Como Média
AMPH	Anfetamina
Ang I	Angiotensina I
Ang II	Angiotensina II
ANVISA	Agência Nacional De Vigilância Sanitária
ARB	Bloqueador De Receptor De Angiotensina
AT1R	Receptores AT1
BSA	Albumina Sérica Bovina
CE	Corpo Estriado
CEPA	Comitê De Ética E Pesquisa Animal
CGI-I	Impressão Clínica Global De Melhora
Cm	Centímetros
CPF	Córtex Pré-Frontal
D4	Receptores Dopaminérgicos Tipo-4
DA	Dopamina
D-ANF	Dextroanfetamina Ativa
DAT	Transportador De Dopamina.
DL50	Dose Letal
DTNB	Reagente De Ellman
ECA	Enzima Conversora De Angiotensina
EO	Estresse Oxidativo
EROS	Espécies Livre De Oxigênio Reativo
FDA	Food And Drugs Administration
Fig	Figura
G	Gramas
GSH	Glutathiona Reduzida
H ₂ SO ₄	Ácido Sulfúrico
HC	Hipocampo
HED	Dose Equivalente Para Humanos
IL1-B	Interleucina 1- Beta
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8

Kg	Quilograma
LDX	Lisdexanfetamina
LPS	Lipopolissacarídeos
M	Molar
MADRS	Montgomery-Åsberg
MAO	Monoamina Oxigenase
MCG	Microgramas
MDA	Malondialdeído
MDA	3,4-Metilenodioxianfetamina
MDC	Memória De Curta Duração
MDMA	Metilenodioximetanfetamina
Mg	Miligramas
Mm	Micromolar
NET	Norepinefrina
Nm	Nanômetros
NOR	Teste Reconhecimento Do Objeto Novo
p	Coeficiente De Significância
P	Coeficiente De Correlação De Pearson
PANSS	Escala para Avaliação da Síndrome Positiva e Negativa
PEPT1	Transportador De Peptídeo
Pg	Picograma
PMA	P-Metoxianfetamina
PMMA	P-Metoxi- Metanfetamina
PN	Pós-Natal
PVDF	Fluoreto De Polivinilideno
RPM	Rotações Por Minuto
SDS-PAGE	Poliacrilamida-SDS
SHR	Espontaneamente Hipertensos
SMART	Video Tracking Versão 3.0.03 Da Panlab Harvard Apparatus
SNC	Sistema Nervoso Central
SNGPC	Sistema Nacional De Produtos Controlados
SOD	Superóxido Dismutase
SRA	Sistema Renina-Angiotensina
STAT3	Fator De Transcrição Ativado Por Tirosina Quinase

TBARS	Substância Reativas Ao Tiobarbitúrico
TBST	Soro Fisiológico Tamponado Com Tris E Polisorbato 20
TDAH	Transtorno De Déficit De Atenção E Hiperatividade
TGI	Trato Gastrointestinal
TNF-A	Fator De Necrose Tumoral- Alfa
UFC	Universidade Federal Do Ceará
V	Volts
VMAT	Antiportador De Prótons Não Seletivos De Monoaminas
µl	Microlitros

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 Terapia com psicoestimulantes: estado da arte	16
1.2 Drogas psicoestimulantes: consumo e atividade terapêutica	18
1.3 Anfetaminas: breve histórico	18
1.4 Lisdexanfetamina	20
1.5 Breve revisão literária da LDX	21
1.6 Farmacocinética da LDX	23
1.7 Ação da LDX nas áreas cerebrais	25
1.7.1 Córtex pré-frontal	26
1.7.2 Hipocampo	26
1.7.3 Corpo estriado.....	27
1.8 Psicoativos como potencializadores da cognição em indivíduos saudáveis	28
1.9 Mecanismos Neuroinflamatórios e sistema renina-angiotensina cerebral	30
1.10 Correlação idade do roedor X idade humana	32
1.11 Justificativa e relevância	34
2 OBJETIVOS	36
2.1 Objetivo Geral	36
2.2 Objetivos Específicos	36
3 MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1 Animais	37
3.2 Drogas, doses e vias de administração	38
3.3 Desenho experimental	39
3.4 Testes realizados	41
3.4.1 Testes de comportamento.....	41
3.4.2 Testes neuroquímicos	47
3.4.3 Expressão de proteínas microgliais e receptor AT1	50
3.5 Análise estatística	53
4 RESULTADOS	54
4.1 Testes de comportamento	54
4.1.1 Campo Aberto (Open field).....	54
4.2 Testes de cognição	62

4.2.1 Y Maze	62
4.2.2 Reconhecimento do objeto novo	64
4.3 Resultados bioquímicos	66
4.3.1 Glutaciona reduzida	66
4.4 Determinação de Peroxidação lipídica	71
4.4.1 Níveis de TBARS no córtex pré-frontal.....	71
4.4.2 Níveis de TBARS no hipocampo	71
4.4.3 Níveis de TBARS no CE.....	72
4.4 Determinação dos níveis cerebrais da citocina anti-inflamatória IL-1β e da citocina anti-inflamatória IL-4.....	76
4.4.1 Interleucina 1 β (IL-1 β)	76
4.4.2 Interleucina 4 (IL-4)	78
4.5 Avaliação da expressão do receptor AT1 no hipocampo	80
4.5.1 Avaliação da expressão hipocampal de IBA, marcador de ativação microglial	83
4.6 Correlações de Pearson: comportamentos x variáveis neuroquímicas.....	86
5 DISCUSSÃO	91
6 CONCLUSÃO	100
REFERÊNCIAS	

1. INTRODUÇÃO

1.1 Terapia com psicoestimulantes: estado da arte

A banalização do uso de psicoestimulantes tem feito com que esses fármacos tenham sido cada vez mais conhecidos e consumidos no Brasil. De forma indiscriminada e em alguns casos de forma ilícita, tais medicações têm sido divulgadas com a proposta de proporcionar ao usuário uma maior capacidade de concentração, foco, disposição, melhora da capacidade neurocognitiva e ainda capacidade anorexígena (LAGE et al., 2015).

Desde 2007, ano em que foi criado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o Sistema Nacional de Produtos Controlados (SNGPC), tem registrado aumento do consumo de fármacos psicoestimulantes em todas as regiões do país. O metilfenidato, psicoestimulante mais popular entre os brasileiros, teve aumento de 180% nas suas vendas entre os anos de 2009 e 2013.

Estudo recente mostrou que a dispensação dos fármacos conhecidas como “potencializadores cognitivos” (Metilfenidato, lisdexanfetamina e modifilina) em uma pequena unidade de farmácia do interior do Rio de Janeiro, teve um aumento de 98,50% entre os dois primeiros bimestres dos anos de 2016 e 2017 (OLIVEIRA ET AL, 2017) (Figura 1).

A Organização Mundial de Saúde (OMS), através de estudos da utilização de medicamentos, define que o consumo, comercialização, distribuição e prescrição de um determinado fármaco está diretamente relacionado a questões sócio-antropológicas, comportamentais e econômicos (GAMA, 2007; WHO, 1977). Assim, pode-se entender de uma forma mais clara e ampla um dos motivos do aumento do uso indiscriminado de psicoestimulantes por diversas faixas etárias da população brasileira atual (AFFONSO ET AL, 2016; ARAUJO ET AL, 2017; FINGER, 2013; LAGE et al., 2015).

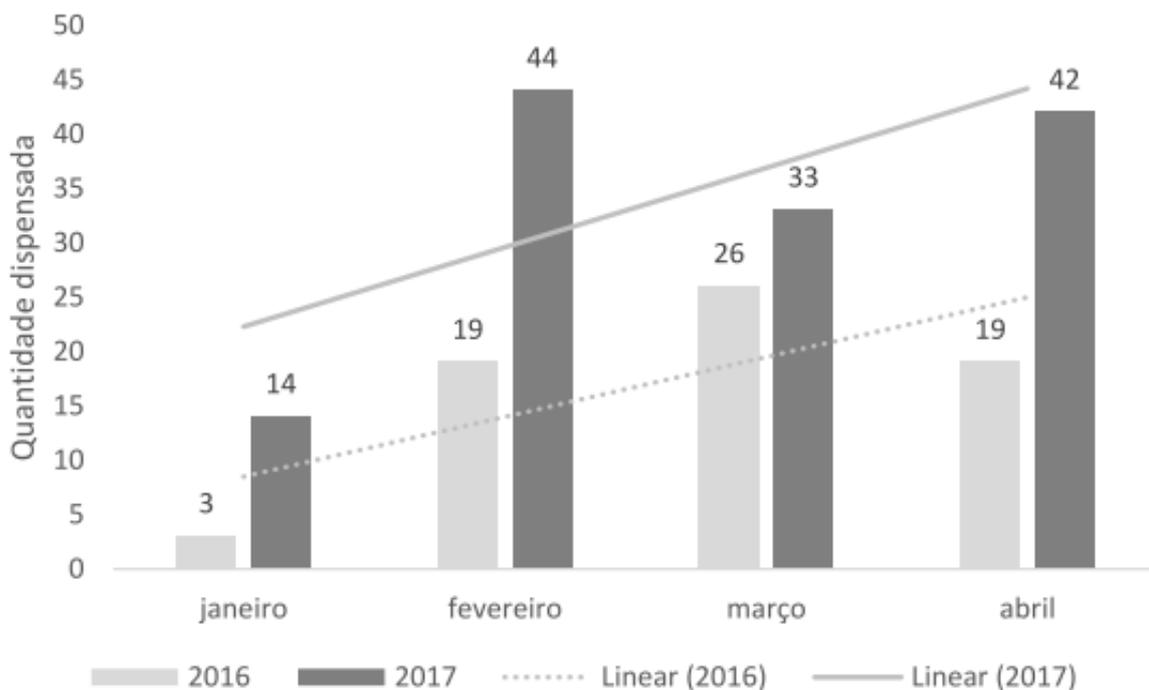
Nas últimas décadas o mercado de trabalho brasileiro tem sofrido transformações. O aumento do desemprego e a valorização da ocupação de cargos públicos tem feito com que milhares de jovens busquem estes empregos como sinônimo de estabilidade financeira e profissional, em decorrência disto as vagas tornam-se escassas. Desta maneira, as propriedades dos fármacos psicoativos tem feito com que muitos jovens adultos tenham recorrido a estes fármacos de forma ilícita, seja com intuito de obter melhores resultados em seus cursos de graduação,

ou seja com intuito de obter êxito em concursos públicos (ANJOS, 2015; BATISTELA et al., 2016).

Porém, dentro do assustador crescimento do consumo destas drogas, é ingênuo acreditar que a busca por melhora cognitiva seja a exclusiva causa para tal fenômeno.

Outra explicação para a elevação do consumo de tais drogas é o aumento do número de casos de transtorno de déficit de atenção e Hiperatividade (TDAH). Este transtorno é de fato uma das indicações para o real uso das medicações citadas.

Figura 1: Dados comparativos da dispensação dos medicamentos (Metilfenidato, lisdexanfetamina e modifilina) em uma unidade de farmácia do Rio de Janeiro nos dois primeiros bimestres dos anos de 2016 e 2017.



Fonte: (OLIVEIRA ET AL, 2017)

1.2 Drogas psicoestimulantes: consumo e atividade terapêutica

Drogas psicoestimulantes, assim denominadas pela sua capacidade de estimular o sistema nervoso central, causando euforia, aumento da emotividade, energia e estado de alerta, fazem parte do grupo de substâncias chamadas psicotrópicas. Destas drogas, podem-se destacar as metilxantinas, nicotina, vareniclina, cocaína, metilfenidato e anfetamina (CEBRID, 2001).

Metilxantinas são amplamente conhecidos e consumidos no mundo, podem estar presentes no chá (teofilina), cacau (teobromina) e no café (cafeína). Como todas as substâncias psicoativas, podem causar dependência se consumidas em quantidade exacerbada. Tem como propriedade farmacêutica, a capacidade de promover o relaxamento de bronquíolos (CLARK, 2013).

A nicotina é uma das drogas psicoestimulantes mais conhecidas e consumidas no Brasil e possui grande capacidade de promover dependência. Terapeuticamente é utilizada somente com a finalidade de tratar síndromes de abstinência relacionadas ao seu uso. Assim, como tal composto, a vareniclina é utilizada de forma terapêutica também com este fim (CLARK, 2013).

Cocaína, metilfenidato e anfetamina tem como mecanismo de ação a inibição da recaptção de catecolaminas. A cocaína é uma droga de abuso popularmente conhecida e com grande capacidade de desenvolver dependência, podendo ser usada ocasionalmente com finalidade terapêutica como anestésica. Metilfenidato e anfetamina podem ser utilizados para tratamento de crianças com TDAH (RANG; DALE, 2016).

1.3 Anfetaminas: breve histórico

Milênios antes do seu desenvolvimento sintético, fitoterápicos análogos da anfetamina (*catha edulis* e *ephedra*) já eram utilizados como inibidores de apetite e descongestionantes nasal (GROVES et al., 2015; HEAL et al., 2013; SALLAM et al., 2016).

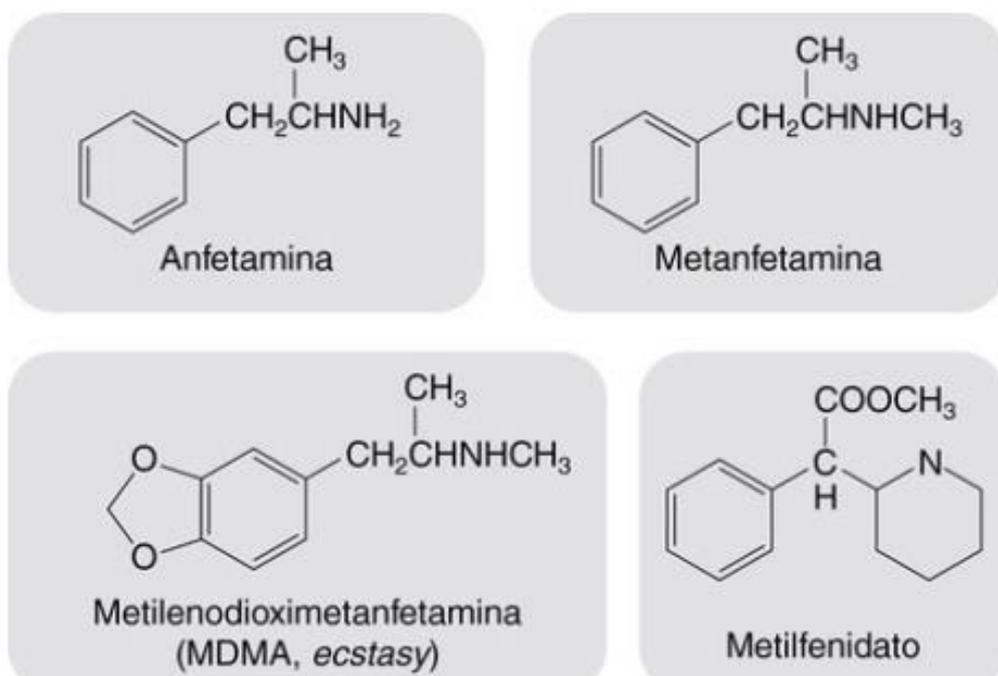
Acredita-se que o primeiro composto anfetamínico tenha sido desenvolvido de forma sintética na Alemanha no ano de 1887, o 1-metil-2-feniletilamina, que originou todas as outras anfetaminas pertencentes a este grupo. Essas drogas têm a variação de composto pela substituição do radical amina da estrutura química do composto original. A metanfetamina e a 3-4 metilendioxi metanfetamina (MDMA,

também conhecida como ecstasy) são exemplos de anfetaminas derivadas da estrutura primária (Figura 2) (ELLIOTT, 2005). Acredita-se que a metanfetamina tenha sido desenvolvida em 1919 no Japão.

A reduzida disponibilidade da anfetamina efedrina desencadeou o desenvolvimento de seus derivados. Em 1935, a forma rancêmica α -metilanfetamina foi posta no mercado com o nome de “Benzedrine®” e tinha como intuito tratar a narcolepsia. Em 1937 foi lançado o “Dexedrine®” que era composto não mais pela mistura rancêmica, mas somente pelo dextroisômero da anfetamina (d-anfetamina), o mais potente dos dois enantiômeros (BETT, 1946; HEAL et al., 2013) .

Com o decorrer do uso dos derivados da anfetamina, percebeu-se o efeito de melhora cognitiva, estado de vigília e concentração que o consumo da droga proporcionava. Acredita-se que estes tenham sido alguns dos motivos para que as drogas derivadas da anfetamina tenham sido amplamente utilizadas durante a segunda guerra mundial. O uso abusivo das drogas permitidas para livre consumo trouxe à tona não somente os benefícios, mas também seus efeitos colaterais como problemas cardíacos e dependência. Assim, em 1970 nos Estados Unidos da América, veio a proibição de consumo, tornando, assim, o composto ilícito (GERMAN, 2014; HEAL et al., 2013)

Figura 2: Estrutura química da anfetamina e seus derivados a partir do radical amina



Fonte: (RANG; DALE, 2016)

Em 1980, as chamadas “*designer drugs*”, formas sintéticas como a metilenodioximetanfetamina (MDMA-Ecstasy), MDA (3,4-metilenodioxianfetamina), p-metoxianfetamina (PMA) e p-metoxi- metanfetamina (PMMA), foram criadas com intuito de produzir efeitos semelhantes aos das anfetaminas e burlar a legislação quanto ao consumo legal destes compostos. Porém, só na década de 90 é que estas drogas ganharam conhecimento popular, foram amplamente difundidas entre os jovens e consumidas em festas popularmente conhecidas como “*raves*” (FREYE E, 2009; GERMAN, 2014).

Atualmente, muitas destes compostos são consideradas ilícitas ou possuem consumo restrito para uso terapêutico de patologias como TDAH e narcolepsia. Porém, o abuso destas substâncias é recorrente e não se faz somente entre pessoas pertencentes ao grupo de dependentes químicos, ele atinge também o público que tem como necessidade a potencialização de atenção e foco (estudantes, caminhoneiros e frequentadores de *raves*), inibição do apetite somada a um aumento metabólico (desejo por emagrecer em curto prazo) (ALVES, 2013)

1.4 Lisdexanfetamina

Classificada no grupo das anfetaminas, a lisdexanfetamina (LDX) ((2S)-2,6-diamino-N-[(1S)-1-metil-2-fenil-etil] hexanamida dimetanosulfonato) é um pró-fármaco que possui em sua estrutura aminas simpatomiméticas não-catecolaminas (Figura 3). A LDX é o composto presente no fármaco *Venvanse®* que foi desenvolvido e aprovado pelo “*Food and drugs Administration*” (FDA) em 2007 com a finalidade de tratar crianças, adolescentes e adultos que sofrem com TDAH. A LDX tem como característica de sua formulação uma metabolização mais lenta e consequente apresenta maior estabilidade quando comparada aos demais compostos derivados da anfetamina (HEAL et al., 2013; PENNICK, 2010; RANG; DALE, 2016).

Um das pesquisas que validou o fármaco para uso no tratamento do TDAH, foi um estudo duplo cego randomizado que comparou por oito semanas a administração contínua de *Venvanse®* e de um placebo em 336 indivíduos com faixa etária de seis a dezessete anos, diagnosticados com o transtorno. Na pesquisa, os pacientes recebiam via oral, uma dose única e matinal de LDX (30, 60

ou 90 mg) ou placebo. Os resultados que foram obtidos através da escala CGI-I (Impressão Clínica Global de Melhora), revelaram que os pacientes expressaram de acordo com a escala, melhora significativa ou muito significativa (COGHILL et al., 2013).

Embora o fármaco tenha sido desenvolvido para uso entre as faixas etárias de seis a dezessete anos e adultos entre dezoito e cinquenta e cinco anos, um estudo recente realizado por Coghill e colaboradores (2018), mostrou que o consumo do fármaco por crianças com idade inferior a dois anos diagnosticadas com TDAH não gerou prejuízo cognitivo (COGHILL et al., 2018; FARMAC; LTDA, 2015)

1.5 Estado da arte sobre o uso da LDX

Dentre os fármacos prescritos para o tratamento do TDAH, a LDX embora seja um fármaco relativamente novo, tem sido a escolha de alguns psiquiatras. Tal medicamento é classificado no grupo das anfetaminas e por este motivo é apontado como um possível “amplificador cognitivo”(OLIVEIRA ET AL, 2017). Assim, os efeitos da LDX têm sido pesquisados em protocolos pré-clínicos e clínicos para diversos fins.

Neste contexto, nosso grupo de pesquisa observou que o uso repetido de LDX em ratos adultos era capaz de induzir sintomas mania-símile. Este modelo tem sido replicado por outros grupos de pesquisa (BRISTOT, 2014). O modelo de mania induzido por LDX envolve o desenvolvimento de um comportamento de hiperlocomoção, com aumento dos níveis de peroxidação lipídica e diminuição da concentração de glutathione redutase em áreas específicas do cérebro dos animais (MACÊDO et al., 2013)

Outro estudo utilizando a LDX como modelo de mania, verificou através da vocalização ultrassônica de ratos, que quando submetidos ao modelo de mania induzido por LDX os animais apresentavam uma frequência vocal semelhante aquela emitida nos modelos induzidos por anfetamina. Além disto, os animais apresentavam hiperlocomoção e tiveram reversão dos padrões maníacos com o uso de lítio (HUTSON, 2015).

Em decorrência do seu efeito de longo prazo e suposta redução dos riscos de dependência, além da administração na forma de dose única diária, a LDX tem

ultrapassado as barreiras que a limitavam para o tratamento de TDAH e narcolepsia e tem sido pesquisada como potencial medicamento para o tratamento de outras patologias. É possível encontrar na literatura, por exemplo, a sua utilização em distúrbios relacionados a ejaculação (LYONS; LENTZ; COWARD, 2017), tratamento para dependência de metilfenidato (EZARD et al., 2018). Além disto, em 2015 a LDX foi adicionada ao grupo de fármacos utilizados no tratamento de transtorno compulsivo alimentar (TAC) (KESSLER et al., 2016; WARD; CITROME; WARD, 2018)

Richards e colaboradores (2016) mostraram em estudo clínico recente que, de forma inesperada, a LDX mesmo sendo um mecanismo de ação estimulante, não apresentou redução de sintomas de transtorno depressivo maior em pacientes que já faziam uso de monoterapia, porém sem boas respostas ao tratamento.

Um estudo de análise de coorte em pacientes norte americanos que utilizando um banco de dados constataram que embora o uso de psicoativos destinados ao tratamento de TDAH seja contraindicado para pacientes que apresentem risco cardiovascular, o uso da droga ocorreu entre 3,6% entre adultos de 45 e 54 anos e 7,2% entre aqueles de faixa etária de 55 a 64 anos, sendo que dentre os adultos tratados com estimulantes 11,3 a 18,5% apresentavam dependência ou abuso do uso dos mesmos (FAIRMAN et al., 2018) .

Um estudo envolvendo pacientes com depressão maior comprovada e com idades entre 18 e 65 anos, com o intuito de avaliar os efeitos da LDX como terapia combinada por 8 semanas em pacientes onde a monoterapia não apresentava total eficiência, verificou que os pacientes que receberam LDX não apresentaram redução da pontuação da escala quando comparados aos que receberam placebo como terapia combinada conforme verificado pela Escala de avaliação de depressão de Montgomery-Åsberg (MADRS) mostraram que (RICHARDS et al., 2016).

De forma semelhante ao estudo de depressão maior, foi avaliado também o efeito de terapia combinada da LDX no tratamento de transtorno bipolar na fase depressiva. No estudo em questão, também não houveram melhoras na MADRS quando comparados aos pacientes que receberam o placebo, porém houve relato de melhora dos pacientes quando feita uma auto avaliação para parâmetros como sono diurno excessivo, fadiga e compulsão alimentar (MCELROY et al., 2013).

Diferente dos estudos envolvendo depressão, o uso da LDX como medicamento adjuvante no tratamento dos sintomas negativos da esquizofrenia,

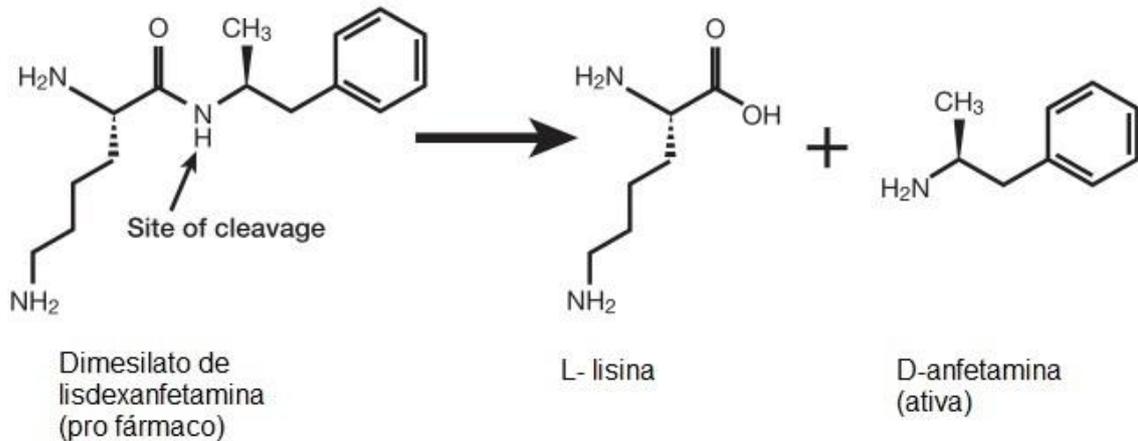
mostrou através de estudo *open label* melhora na escala para avaliação dos sintomas positivos e negativos (PANSS) e ainda não mostrou uma piora destes sintomas quando realizada a descontinuidade de forma abrupta do tratamento (LASSER et al., 2013)

Assim, de acordo com a literatura acima citada, pode-se notar que a LDX tem ganhado destaque no meio clínico, não somente para o tratamento do TDAH como também tem sido cotada como medicamento adjuvante ou potencial para o tratamento de outras patologias. Somada essas informações ao aumento dos casos de TDAH e ao possível uso de tal fármaco com fins de potencialização cognitiva tem-se o provável aumento do consumo de tal substância. Desta maneira, cabe a investigação de como tal medicamento pode se portar no organismo saudável, uma vez que o mesmo tem sido cada vez mais consumido.

1.6 Farmacocinética da LDX

A respeito das características farmacocinéticas da LDX no rato, pode-se pontuar que após sua administração realizada por via oral, a absorção ocorre de forma rápida pelo trato gastrointestinal (TGI), sendo mediada pelo transportador de peptídeo (PEPT1). Nos hepatócitos, por metabolismo de primeira passagem, o pró-fármaco sofre hidrólise à L-lisina inativa e dextroanfetamina ativa (D-ANF), composto este que tem a ação estimulante do sistema nervoso central (Figura 3). Sua concentração máxima plasmática ocorre em média, uma a duas horas e meia após sua administração. A alta capacidade de conversão enzimática, absorção e a estabilidade a variações como pH presentes tanto no organismo humano como no animal, sugere que os estudos com LDX em animais tenham uma boa aceitabilidade para humanos (PENNICK, 2010).

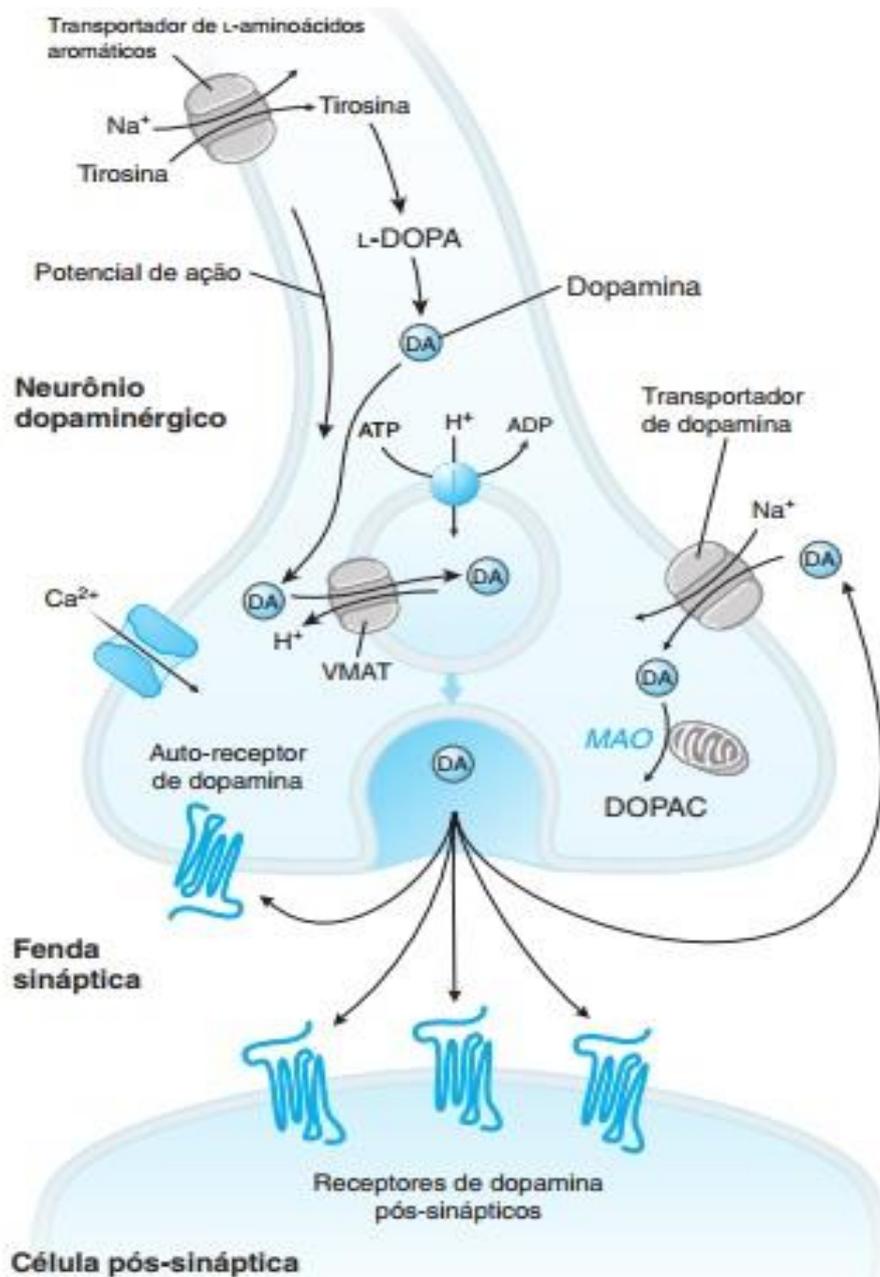
Figura 3: Estrutura química e hidrólise da LDX.



Fonte: (EGER; FERREIRA; BATISTA, 2010)

Assim como as demais drogas derivadas da anfetamina, a LDX tem basicamente como mecanismo de ação, a liberação de catecolaminas e a inibição da captura das mesmas. Desta maneira, acredita-se que após sua administração e hidrólise, a d-anfetamina liberada pela LDX, atue na liberação de norepinefrina e dopamina, na inibição da monoamina oxigenase (MAO), dos transportadores de norepinefrina (NET), resultando assim numa ação estimulante do Sistema nervoso central (SNC) (Figura 4) (PENNICK, 2010; RANG; DALE, 2016; STANDAERT, 2009).

Figura 4: Representação ilustrativa da síntese e liberação de dopamina na fenda sináptica.



Fonte:

(GUYTON; HALL, 2011) DA: dopamina, VMAT: antiportador de prótons não seletivos de monoaminas; MAO: monoamina oxidase; DAT: transportador de dopamina.

1.7 Ação da LDX nas áreas cerebrais

Conforme mencionado anteriormente, ao longo da história, fármacos psicoativos vem sendo utilizados como uma alternativa para proporcionar aumento das capacidades cognitivas. As áreas mais relacionadas a estes potenciais aumentos de atividade são o córtex, o hipocampo e os núcleos da base.

1.7.1 Córtex pré-frontal

O Córtex pré-frontal (CPF) é a área cerebral responsável pela memória de trabalho ou também chamada de operacional, uma memória de curto prazo que necessita reverberação e concentração para receber a informação inicial e promover a consolidação. (FUENTE D., MALLOY-DINNIZ L.F, CAMARGO C.H.P, 2014).

Além da capacidade de desenvolver a memória operacional, o córtex tem uma importante função de coordenar a interação entre as zonas sensoriais e límbicas, relacionando assim o meio externo com as emoções. A comunicação com as zonas subcorticais dar-se através de uma rede de conexões monoaminérgica moduladores que podem ser originadas do locus ceruleos (noradrenalina), área tegmentar ventral (dopamina) e dos núcleos da rafe (serotonina) (FUENTE D., MALLOY-DINNIZ L.F, CAMARGO C.H.P, 2014).

Essa gama de funções relacionadas a memória operacional, emoções e ainda a existência da via monoaminérgica, fazem com que o CPF tenha cada vez mais visibilidade em estudos que envolvem várias psicopatologias humanas que tem sido relacionadas ao TDAH, como esquizofrenia e transtorno bipolar

Estudos pré-clínico mostram que ratos adultos que receberam a LDX de forma isolada tiveram aumento dos níveis de dopamina e de acetilcolina no córtex pré-frontal de forma significativa quando comparados a animais que receberam apenas salina. Ademais dos níveis de neurotransmissores aumentados, a LDX também aumenta os níveis de superóxido dismutase (SOD) e níveis de peroxidação lipídica, além de diminuir os níveis de glutathiona reduzida (GSH) no CPF dos ratos adultos (CASARE, 2015; DE GÓIS QUEIROZ et al., 2013; IND; SANDOZ, 2015).

1.7.2 Hipocampo

O hipocampo (HC) é a região cerebral responsável por desempenhar funções cognitivas de aprendizado. É responsável também por desenvolver a memória, principalmente aquela ligada a deslocamento, a locomoção (NARDI, A. E.; QUEVEDO, J.; SILVA, 2015).

Quanto a relação da administração de LDX (10mg) e o desequilíbrio oxidativo, estudos pré-clínicos mostram que a administração desta droga em ratos adultos resulta em aumento dos níveis de SOD, diminuição de GSH e um significativo

aumento dos níveis de malondialdeído (MDA), sugerindo um processo considerável de degradação lipídica da região cerebral em questão (QUEIROZ, 2014).

Estudos mostram ainda que os primeiros 240 minutos pós a administração da LDX, aumentam de forma significativa os níveis de histamina no hipocampo de ratos, sugerindo que esta droga pode estar relacionada a ativação de mastócitos e desta maneira, possivelmente a processos inflamatórios (HUTSON, 2015).

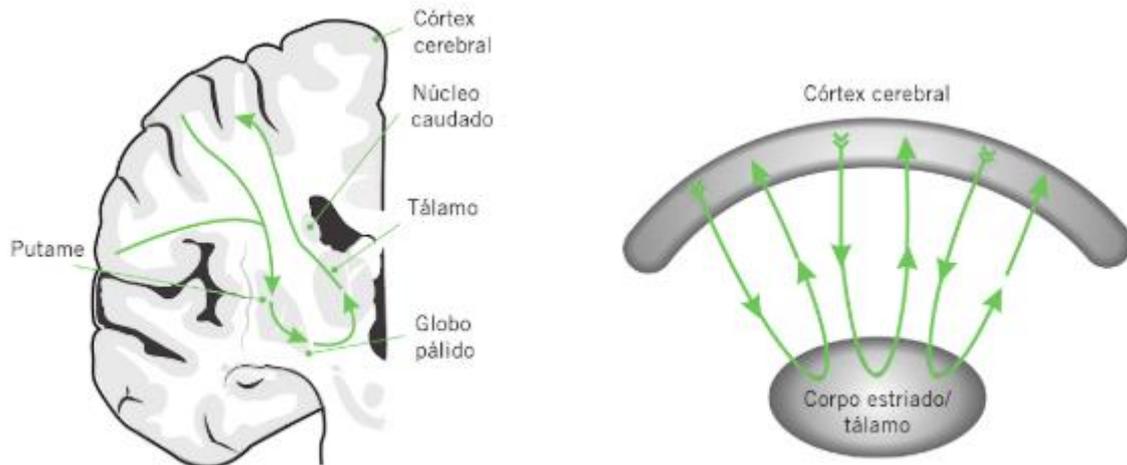
1.7.3 Corpo estriado

Embora ocorra a tendência de se limitar as funções cerebrais para as determinadas áreas existentes do cérebro humano, sabe-se que todo o órgão funciona em conjunto e se interliga através circuitos neuronais. Desta forma, pode-se destacar a função em conjunto do corpo estriado (CE) com o CPF para o desenvolvimento do processo cognitivo (CATANI; DELL'ACQUA; THIEBAUT DE SCHOTTEN, 2013; CONSENZA, 2014)

Algumas redes trabalham com vias em paralelo que se originam e retornam ao CPF. Este é o tipo de circuito que ocorre ente o CPF e o corpo estriado (Figura 5). Desta maneira, estes circuitos podem inibir os estimular a atividade cortical. É através deste circuito, por exemplo, que o CE recebe informações externas e as envia para que ocorra a tomada de decisões no córtex (CONSENZA, 2014).

Estudo feito por Queiroz (2014), mostrou que a administração de LDX (10mg) reduz os de GSH e aumenta os níveis de MDA no corpo estriado de ratos adultos, mostrando que o uso da droga pode estar relacionado a desencadeamento de um desequilíbrio oxidativo.

Figura 5: Representação do córtex ligado ao corpo estriado através de circuitos.



Fonte: (CONSENZA, 2014).

1.8 Psicoestimulantes como potencializadores da cognição em indivíduos saudáveis

É possível encontrar hoje na literatura artigos e até livros que abordem o uso de psicoativos como forma de “tecnologia cognitiva” ou “Human enhancement”. A maior acessibilidade financeira ao metilfenidato que também tem como finalidade real o tratamento de TDAH, faz com que o mesmo tenha maior popularidade e desta maneira, a maciça maioria de estudos que abordam esta otimização da cognição está vinculada a tal medicamento. Porém hoje a LDX e outros psicoestimulantes como modafilina vem ganhando visibilidade por ter como uso esta finalidade (BATISTELA et al., 2016; LAGE et al., 2015; MAGALHÃES, 2014).

Muitos jovens estudantes de nível médio, superior e ainda os chamados concurreiros tem utilizado os psicoestimulantes com a finalidade de melhora cognitiva e aumento do estado de vigília. Vale ressaltar que hoje no Brasil, somente os compostos metilfenidato (ritalina) e a LDX (venvanse) são comercializadas de forma legal para tratamento de TDAH(CARDOSO et al., 2017).

A LDX é comercializada em três doses LDX: 30, 50 e 70 mg. Por se tratar de um psicoestimulante anfetamínico, em tratamentos prolongados normalmente, a dose inicial deve ser a menor, uma vez que a acomodação do fármaco pode exigir um aumento progressivo das doses do medicamento. Como nos casos de auto

administração não há a participação do psiquiatra para recomendação da dose necessária supõe-se que os riscos decorrentes do uso indiscriminado (FARMAC; LTDA, 2015).

Uma pesquisa envolvendo quarenta estudantes universitários que declararam não ser diagnosticados com TDAH e que já tinham utilizado psicotrópicos com intuito de melhora cognitiva, responderam a seguinte pergunta: “Quantas vezes você utilizou algum medicamento para TDAH com intuito de ter melhor desempenho escolar ou laboral, sem prescrição médica?” Posteriormente os mesmos indivíduos responderam um questionário que relacionava funções cognitivas e motivacionais ao uso do fármaco em questão. Dentre os pontos avaliados, os participantes relataram melhora da atenção, presteza, energia e motivação (FARAH; ROSTRON; OPEN, 2013) (Tabela1)

Tabela 1: Resultados da pesquisa que relaciona o uso de psicoativos com melhora cognitiva e motivacional.

Funções relacionadas à cognição	n	média
Capacidade de multitarefa	40	4,47
Pensamento abstrato	40	4,75
Atenção	40	6,3
Criatividade	40	4,45
Inteligência	40	4,98
Memória	40	5,15
Velocidade de raciocínio	40	5,78

Funções relacionadas à motivação	n	média
Presteza	40	6,15
Alívio de ansiedade	40	4,13
Energia	40	6,18
Humor	40	4,78
Motivação	40	6,15
Autoconfiança	40	5,13
Divertimento da tarefa	40	5,4

Valor numérico para percepção	Percepção
1	Extremamente prejudicial
2	Muito prejudicial
3	Um pouco prejudicial
4	Sem efeito
5	Um pouco útil
6	Muito útil
7	Extremamente útil

Fonte: (FARAH; ROSTRON; OPEN, 2013)

1.9 Neuroinflamação e transtornos psiquiátricos

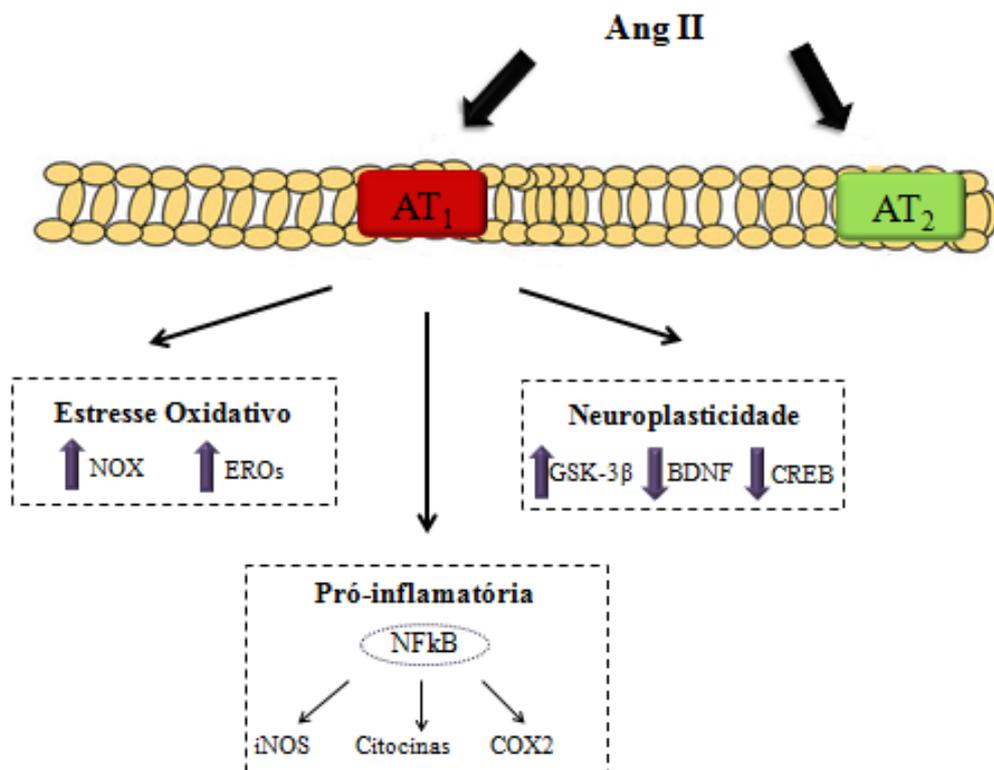
Devido à existência da barreira hematoencefálica, o cérebro, por muitos anos, foi tido como um órgão não acometido por processos inflamatórios (GOSSELIN & RIVEST, 2007). Porém, estudos tem identificado que o SNC pode gerar respostas imunes e ainda sofrer influências das mesmas (SCHIEPERS et al., 2005; MARQUES et al., 2007). Uma série de evidências têm apontado para o papel de mediadores inflamatórios em transtornos neuropsiquiátricos como a esquizofrenia (NA et al., 2012), depressão (KRISHNADAS & CAVANAGH, 2012) e doença de Alzheimer (OBULESU & JHANSILAKSHMI, 2013).

O nosso sistema imune desempenha a importante função de coordenação da resposta imune inata ou adaptativa. Assim, quando estimuladas de forma nociva, as células deste sistema de defesa, emitem mensagens de respostas que estão relacionadas a funções infamatórias. Além disto, este sistema de defesa também está relacionado ao processo de proliferação, sobrevivência e maturação celular (BRIETZKE & KAPCZINSKI, 2008).

As citocinas são proteínas sinalizadoras ativadas através da conexão com receptores de membrana, elas atuam de maneira fisiológica e estão relacionadas ao bom funcionamento do sistema imune, porém se secretadas de forma exacerbada ou prolongada, podem levar a diminuição de suporte neurotrófico, redução da neurogênese, aumento da ativação glutamatérgica, do estresse oxidativo e indução de apoptose em tipos celulares importantes como, astrócitos e oligodendrócitos (TILLEUX & HERMANS, 2007; KOO & DUMAN, 2008).

Outra via relacionada a ativação de respostas inflamatórias e oxidativas é o sistema renina-angiotensina (SRA) (Figura 6). Essa sensibilização ocorre através da cascata que ativa os receptores AT1 (AT1R). Esse sistema promove ainda a vasoconstrição e ativação simpática. (GUYTON; HALL, 2011).

Figura 6: Representação da cascata de reações que ocorrem a partir da ativação do receptor AT1.



Fonte: Goodman e Gilman, 2012. AngII: angiotensina II; AT: receptores de angiotensina; EROs: espécies reativas de oxigênio livre; GSK-3B: glicogênio sintase quinase 3 beta; BDNF: fator neurotrófico derivado do cérebro; NFκB: fator nuclear de kappa B; iNOS: isoformall .

A barreira hemato-encefálica impede ainda a comunicação entre o SRA periférico e o SNC, os órgãos circunventriculares promovem a comunicação dos

mesmos através de receptores AT1 do exterior da barreira hematoencefálica (NGUYEN DINH CAT; TOUYZ, 2011). No entanto, em determinadas regiões do cérebro, como órgão subfornical, núcleo paraventricular, núcleo do trato solitário, eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e amígdala, há um SRA interno que provavelmente, promove mais ação do que o circulante. Estas regiões estão envolvidas com o comportamento e controle de resposta do organismo ao estresse (LIU et al., 2012).

Assim, ativação dos AT1R no cérebro promove a regulação fisiológica de diversas funções, dentre elas o controle da circulação cerebral, integridade da barreira hematoencefálica, resposta do organismo ao estresse, regulação da resposta imune inata cerebral, além de ter papel importante na regulação do comportamento e cognição (SAAVEDRA et al., 2013). Em contrapartida, a ação exacerbada desses receptores está associada a maior suscetibilidade a isquemia e neuroinflamação, o que pode levar à lesão neuronal (SAAVEDRA et al., 2011).

1.10 Correlação idade do roedor X idade humana

Muitos estudos que relacionam animais e humanos mostram que o desenvolvimento fisiológico dos mesmos ocorre em tempos bem distintos. Assim, a correlação entre as faixas etárias entre esses mamíferos consiste em uma conversão que auxilia na identificação destas transformações etárias.

Um estudo monitorou a relação do peso dos cérebros de ratos e de humanos a fim de traçar um paralelo entre as faixas etárias entre as duas espécies. Os resultados mostraram que o peso do cérebro no humano de 2 a 3 anos de idade atinge 90% do valor estimado no cérebro do adulto, enquanto os roedores atingem essa porcentagem no 20º dia pós-natal (PN). É neste período também que ocorre um aumento da socialização e da memória de trabalho (BLAKEMORE, 2008; DEKABAN; SADOWSKY, 1978).

O final da infância e início da adolescência entre as faixas etárias de 4 a 11 anos, o cérebro humano passa pelo processo de maturidade estrutural. Esta fase é caracterizada pela especialização das redes neurais do CPF, além disto o encéfalo atinge o volume máximo da massa cinzenta. A correlação deste mesmo período de maturação cerebral do rato ocorre em média entre PN 25-35. Além do desenvolvimento anatômico, a análise do comportamento revela um aprimoramento

da memória de trabalho e ainda um controle inibitório (ANIMALS; EFFECTS, 2005; TSUJIMOTO, 2008).

As mudanças cerebrais durante as idades de 12 a 18 anos, marcam a adolescência. As mesmas são destacadas pelo aumento da substância branca e pela diminuição da densidade e estabilização das sinapses a nível de ocorrência no cérebro dos adultos. Nos ratos, o mesmo ocorre no período entre os PN 35-39. Esse período também é marcado pelo típico comportamento de socialização e de risco (HUTTENLOCHER, 1979; STURMAN; MOGHADDAM, 2011) .

Por fim, o início da fase adulta (20 anos de idade+) do desenvolvimento cerebral é marcada pelo alcance e estabilização dos níveis de neurotransmissores e sinapses dos adultos. Para os animais, a idade correspondente ao cérebro adulto humano, ocorre no PN 60+. Nesta fase os comportamentos de risco assumidos na adolescência são reduzidos, além da diminuição da impulsividade e tendências a manifestação de comportamentos relacionados a formação familiar (DOBBING; SANDS, 1979; LAVIOLA et al., 2003; LEBEL et al., 2012). (Tabela 2)

Tabela 2: relação idade animal e idade humana com especificação de principais acontecimentos no desenvolvimento anatômico e comportamental.

Idade humana (anos)	Idade animal (dias)	Marco neuroanatômico/ fisiológico	Marco comportamental
2 a 3 anos	20-25	Aumento do peso cerebral	Aumento da socialização e da memória de trabalho
4 a 11 anos	25-35	Especialização das redes neurais do córtex	Aprimoramento da memória de trabalho
12 a 20 anos	35-49	Aumento da substância branca	Comportamento de socialização e de risco
20 anos +	60+	Estabilização dos níveis de neurotransmissores	Diminuição da impulsividade

Fonte: Tabela modificada. Fonte: (SEMPLE et al., 2013)

1.11 Justificativa e relevância

O diagnóstico e tratamento do TDAH tem ganhado um destaque polêmico na literatura atual. A abordagem deste transtorno traz dois pontos que merecem destaque na literatura: o primeiro relata a falta de identificação e tratamento adequado para crianças com este transtorno. Já o segundo, de forma antagônica, retrata os números excessivos e errôneos de diagnósticos do TDAH.

Estudos indicam que o primeiro ponto mencionado parece caminhar para um problema de saúde pública, uma vez que tem onerado em cerca de 1,8 bilhão de reais por ano os cofres públicos, decorrentes de investimentos na repetência escolar e assistências médicas ocasionadas pela desatenção dos pacientes com o transtorno (MAIA et al., 2015).

Já o segundo ponto abordado pela literatura retrata o aumento excessivo de casos do transtorno. Somente nos Estados Unidos, entre os anos de 2000 e 2010, o número de casos aumentou em 66%. Esse fato pode estar relacionado ao fator social, uma vez que o mercado competitivo tem estimulado a busca por melhor desempenho de forma cada vez mais precoce, atingindo a idade escolar (STEPHEN P. HINSHAW AND RICHARD M. SCHEFFLER, 2014).

Uma vez que a indústria farmacêutica já possui medicamentos comprovadamente eficazes para o tratamento do transtorno em questão, o primeiro ponto parece ser mais facilmente solucionado (FARMAC; LTDA, 2015). Para tanto faz-se necessário maior investimento em programas de saúde que visem a diagnosticar e tratar as crianças e adolescentes de forma precisa.

Diferente do primeiro ponto, a medicalização excessiva e/ou errônea traz um desafio sem claras definições das suas consequências, uma vez que o uso de psicoestimulantes pode trazer dependência e ainda danos neuropsicológicos ainda não estabelecidos na literatura.

Estudos realizados por nosso grupo de pesquisa mostraram que a administração de LDX em ratos adultos saudáveis pode desencadear sintomas comportamentais semelhantes aos da mania, além de provocar alterações bioquímicas relacionadas ao desequilíbrio oxidativo, culminado em respostas oxidativas (MACÊDO et al., 2013).

Vale destacar ainda, a popularização destes fármacos como potencializadores cognitivos. Tal fato pode estar relacionado ao aumento de 180%

da comercialização e provável utilização de fármacos psicoestimulantes entre os anos de 2009 e 2011 (ANVISA, 2012).

A infância e a adolescência são períodos de desenvolvimento neuroanatômico e cognitivo. Somado ao aumento do consumo de psicoestimulantes, este fato traz um importante alerta que justifica a investigação dos possíveis danos decorrentes do uso de psicoestimulantes por indivíduos saudáveis.

Desta maneira fica clara a necessidade de estudos que abordem de forma mais aprofundada as consequências do uso indiscriminado destas drogas. Assim, este estudo tem como principal intuito colaborar com o meio científico a fim de que se possa de forma translacional, entender melhor as consequências do uso deste medicamento por indivíduos saudáveis.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar as alterações comportamentais e neuroquímicas, em áreas cerebrais relevantes para a cognição, de ratos tratados com doses repetidas de lisdexanfetamina na infância e/ou periadolescência, com o intuito de colaborar com a literatura vigente quanto ao conhecimento das consequências comportamentais e neurobiológicas decorrentes do uso indiscriminado de fármacos psicoativos.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o comportamento de animais tratados com LDX pelo período de uma a três semanas, iniciando na infância e se estendendo até a periadolescência;
- Avaliar os níveis de marcadores de estresse oxidativo em animais saudáveis submetidos ao uso de LDX por um período contínuo de uma, duas e três semanas;
- Avaliar os níveis de marcadores referentes a neuroinflamação em animais saudáveis submetidos ao uso de LDX por um período contínuo de uma, duas e três semanas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos com peso inicial de aproximadamente 60g. Os animais foram provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (UFC). Durante todo o período de experimentação, os animais foram submetidos a um ciclo claro/escuro de 12 h e ambientados em grupos de 6 animais por caixa com livre acesso a comida e água. A temperatura ambiente média foi de 24°C, podendo a mesma ter variação de mais ou menos 2°. Diariamente, 60 minutos antes do início da administração das drogas, o peso dos animais foi verificado a fim de atestar a saúde e responsividade dos mesmos. Todas as administrações necessárias para a execução do projeto foram realizadas entre o período de 8 e 10 da manhã. O projeto foi aprovado pelo Comitê de ética e pesquisa animal (CEPA) da UFC sob o número 03/2015. 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.

Idade dos animais

Os animais utilizados apresentavam idade inicial de 25 dias e idade final de até 45 dias e peso médio de 65g no início do tratamento. A faixa etária mencionada foi selecionada para dar início ao estudo por compreender a infância e o período peripuberal do animal (Tabela 3). De maneira comparativa ao ser humano tal limite de tempo, corresponde ao início da puberdade, idade onde existe grande susceptibilidade ao desenvolvimento de psicopatologias em indivíduos vulneráveis, uma vez que se trata de um período de grandes transições físicas e emocionais, estresse e sensibilidade a estímulos emocionais (FERREIRA, 2002)(SEMPLE et al., 2013). Além disto, a janela etária dos animais utilizada na pesquisa em questão está relacionada também a idade humana onde pode ser iniciado o uso da LDX.

Tabela 3: Correspondência entre idade dos ratos e do ser humano e relação do tempo de tratamento dentro do período de faixas etárias correspondentes

Período médio de vida dos animais	Idade aproximada de vida humana	Tempo de tratamento nos animais	Equivalência de tempo de tratamento entre animais e humanos neste protocolo experimental*
25-31 dias	4 a 9 anos	1 semana	2 anos
32-38 dias	9 a 13 anos	2 semanas	2 anos
39- 45 dias	13 a 16 anos	3 semanas	7 meses

.Fonte: Adaptado de (SEMPLE et al., 2013)

* De acordo com (SENGUPTA, 2013)

3.2 Drogas, doses e vias de administração

No presente estudo foram utilizados o Dimesilato de Lisdexanfetamina (LDX; Vyvanse ®, Shire, EUA) e solução salina.

Dismesilato de lisdexanfetamina

O dismesilato de lisdexanfetamina foi utilizado em animais sham. A escolha da concentração de LDX utilizada como dose teste para os animais submetidos ao tratamento foi obtida através dos parâmetros que respeitavam a toxicidade da droga para o animal. Em tratamentos agudos de apenas um dia, a dose letal (DL50) apresenta concentração de 1000mg/Kg /dia. Já para tratamentos que perduram por 7 dias a DL50 passa a ser de 300mg/Kg/dia. Por fim, para tratamentos crônicos que se estendem por 28 dias, a DL50 obtida foi de 80 mg/Kg/dia (KRISHNAN; MONTCRIEF, 2007)ⁱ. Vale ressaltar que todos os valores mencionados são referentes a DL50 em ratos.

Além disto, a fim de que o estudo animal obtivesse maior relação translacional, foi realizado o cálculo da dose equivalente em humanos onde foi considerado o valor da concentração máxima recomendada na posologia do fármaco que é de 70 mg/dia (FARMAC; LTDA, 2015).

Para os cálculos, foi considerado o K_m (coeficiente utilizado pelo autor) de 25 para humanos e 6 para o rato, de acordo com a literatura fonte (REAGAN-SHAW; NIHAL; AHMAD, 2016) e como mencionado anteriormente foi utilizado o valor de dose equivalente para humanos (HED) de 70 (FARMAC; LTDA, 2015).

Assim, a fórmula descrita abaixo (Figura 7) foi utilizada para se obter o valor da concentração inicial do tratamento.

Figura 7: Fórmula da relação entre dose clínica em humanos e dose pré-clínica em animais.

$$\text{HED (mg/kg)} = \text{Animal dose (mg/kg)} \text{ multiplied by } \frac{\text{Animal Km}}{\text{Human Km}}$$

Fonte: (REAGAN-SHAW; NIHAL; AHMAD, 2016) HED=dose equivalente em humanos

Desta maneira foi iniciada a primeira semana de administração da droga com a concentração de 10 mg/Kg/dia (dose que está abaixo da concentração equivalente humano). Por tratar-se de uma anfetamina, foi realizada uma progressão semanal das doses administradas a fim de se evitar o desenvolvimento de tolerância à droga em questão (RANG et al., 2011). Assim, foi realizado um aumento progressivo da mesma, sendo a concentração na segunda semana de tratamento de 13 mg/Kg e na terceira 18mg/Kg. A droga foi diluída diariamente e sua administração foi realizada via gavagem.

Solução salina

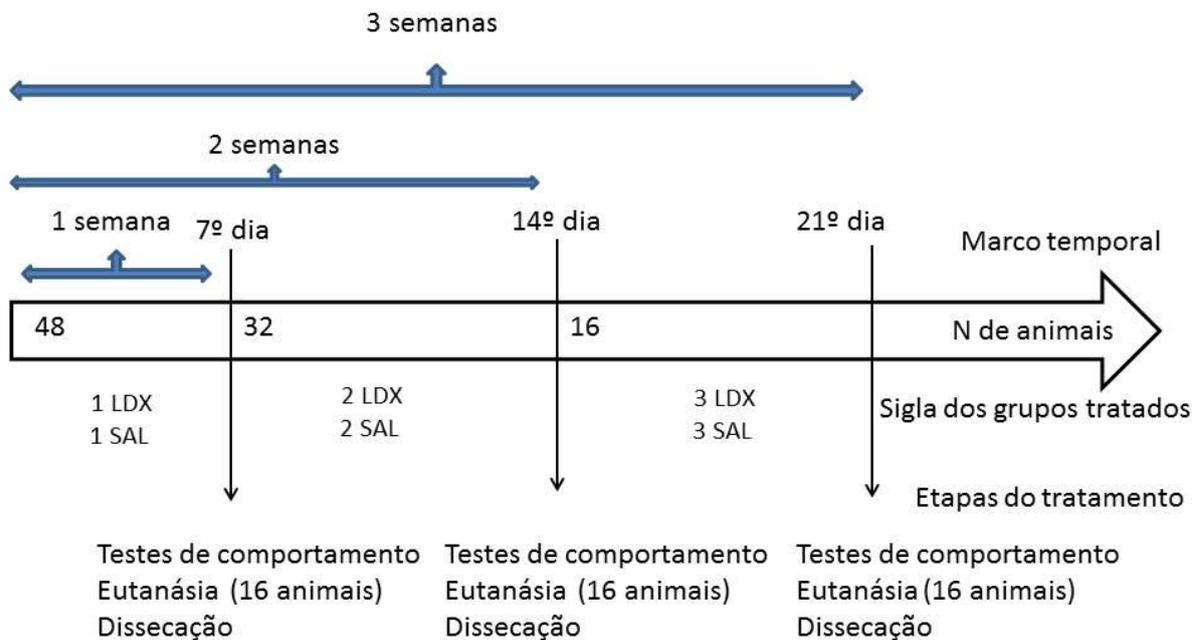
Animais que compuseram o grupo controle receberam apenas a solução salina, mantendo assim o estresse decorrente da administração sofrida pelos animais dos demais grupos e ainda experimentação das condições ambientais vividas pelos animais em teste, porém sem interferência de fármacos.

3.3 Desenho experimental

Como mencionado anteriormente, os animais foram provenientes do biotério central da UFC, desta maneira, logo que recebidos os mesmos eram pesados a fim de se estabelecer uma idade aproximada do animal a partir do seu peso, assim esperava-se que o peso médio fosse de 65g. Após a constatação do peso/idade adequada dos animais, os mesmos foram divididos em 2 grupos: LDX e Sal. Posteriormente os animais de cada grupo foram subdivididos em três subgrupos que representavam o tratamento por 1, 2 ou 3 semanas contínuas. A identificação dos grupos era feita por uma sigla que era composta inicialmente pelo número de

semanas de tratamento, seguido pela sigla do grupo pertencente, por exemplo: Grupo LDX tratados por uma semana era representado como 1 LDX (Figura 8).

Figura 8: representação esquemática dos grupos dos animais formados para realização do estudo.



Fonte: Próprio autor

Após estarem devidamente pesados e identificados, os animais eram levados a sala de experimentação, onde eram condicionados em número de 6 animais por gaiolas com dimensões de 50X60X22cm.

De acordo com o grupo ao qual pertencia, o animal foi tratado por uma, duas ou três semanas. Todos receberam as drogas mencionadas anteriormente, via gavagem. De acordo com qual grupo pertencia, ao final de cada período de tratamento, os animais eram submetidos a testes de comportamento e por fim eram

eutanasiados por decaptação e dissecados com o intuito de coletar as áreas cerebrais de interesse para a pesquisa. De acordo com a relevância dos resultados obtidos, foram posteriormente, realizadas investigações mais específicas e aprofundadas como: níveis de citocinas pró e anti-inflamatórias, receptor AT1 e atividade microglial, para regiões cerebrais e grupos tratados mais específicos.

3.4 Testes realizados

Um dia antes da realização dos testes, os animais foram conduzidos e armazenados na sala de comportamento, a fim de que ocorresse a aclimatação dos mesmos. Os testes ocorreram ao final de cada período de tratamento de acordo com o grupo ao qual o animal estava vinculado, se de uma, duas ou três semanas de tratamento. Todos os testes foram realizados no último dia de tratamento dos animais, pelo menos 2 horas depois da última administração de LDX ou salina. O período de ciclo claro dos animais foi respeitado e os testes ocorreram entre 8 e 14 horas.

Em todas as transferências entre gaiola e aparatos bem como durante as administrações, os animais foram manipulados de forma firme e gentil, sendo segurados pelo meio do corpo, por baixo de suas patas dianteiras. Em nenhum momento os animais foram manipulados pela cauda.

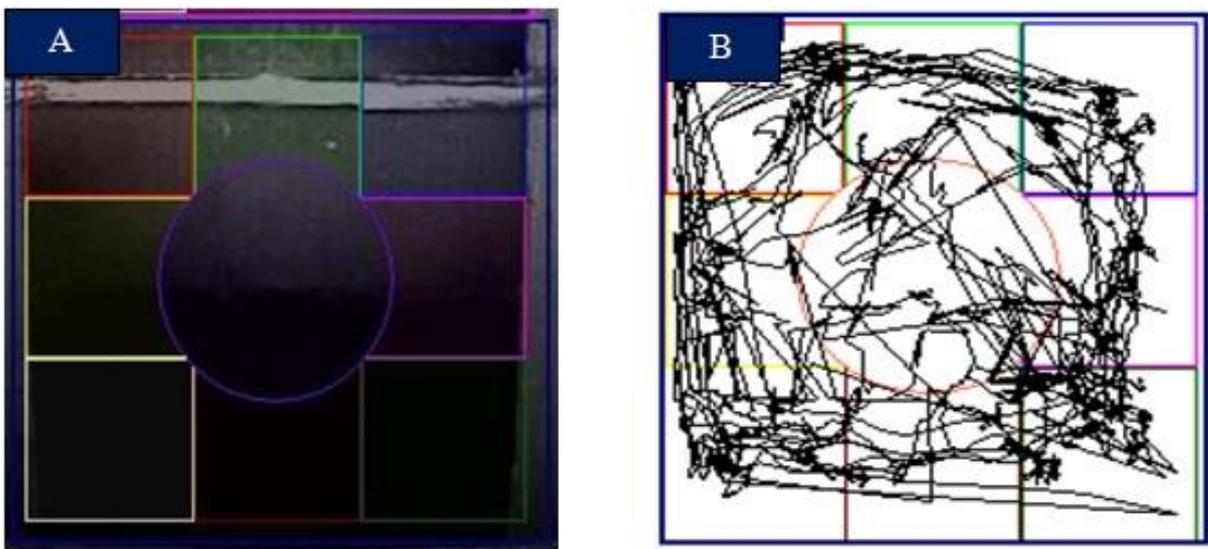
3.4.1 Testes de comportamento

3.4.1.1 Teste campo aberto (*Open field*)

Há décadas o teste de campo aberto tem sido realizado para analisar a atividade exploratória e locomotora do animal. Por sua simplicidade o teste é amplamente utilizado com o intuito de avaliar comportamentos ansiosos e depressivos (ARCHER, 1973; STANFORD, 2007; WALSH; CUMMINS, 1976). Para realização do teste foi utilizada uma arena quadrangular com área 500 x 500 mm, composta por quatro paredes de acrílico, sem tampo e com a base apoiada ao solo

na cor preta (Figura 9 A). Frequentemente, para realização deste teste, as caixas de acrílico tem o fundo dividido em 5 arenas a fim de que se possa contabilizar o número de quadrantes explorado pelo animal, no presente trabalho, no entanto, foi utilizado o software *video tracking* versão 3.0.03 da Panlab Harvard Apparatus® (SMART) que além de fazer essa divisão de quadrantes de forma digital, contabiliza de forma automática a atividade exploratória do animal, fazendo com que, desta maneira, o estudo tenha mais confiabilidade e menos viés (Figura 9 B).

Figura 9: Representação do aparato campo aberto



Fonte adaptada de (LIMA, 2016). Figura A representa a captura de tela do aparato utilizado para realização do teste. Figura B representa o desenho do deslocamento de um animal, a partir do software. Fonte do próprio autor.

O teste registrou a atividade exploratória do animal pelo período de 10 minutos e ao fim deste tempo, era exibido o mapa da trajetória realizada, além de monitoração de outros parâmetros possíveis de serem analisados somente com este suporte. Desta maneira, além de analisada a atividade exploratória do animal, foi avaliada a atividade global do animal, o tempo de permanência no quadrante central e a porcentagem de permanência no quadrante central. O número de vezes em que o animal elevou-se nas patas traseiras (*rearing*) e que realizou o movimento de autolimpeza (*grooming*), também foi analisado, porém de forma observacional.

Como se pode observar na figura 9 A, o desenho realizado pelo programa a fim de realizar a divisão das arenas, possui uma arena em formato circular. Há mais

de 40 anos atrás já Royce 1977, já mostrava que a permanência de um rato na zona central do aparato open field, podia ser indicativo de comportamento ansioso, uma vez que os animais saudáveis tendem a permanecerem próximos a periferia explorando a arena de forma mais “segura”(MOOSBRUGGER; FISCHBACH; SCHERMELLEH-ENGEL, 1977).

Por fim, o teste foi realizado entre 8 e 11 da manhã. O ambiente foi mantido com baixa luminosidade e ausente de ruídos. Os animais foram introduzidos no open field pelo quadrante superior direito e permaneciam cerca de um minuto, para que ocorresse uma pequena adaptação ao novo ambiente.

Após o teste, os animais eram devolvidos às suas caixas-moradia. Ao fim do uso da arena por cada animal, foi feita a assepsia do aparato com álcool etílico a 15% para evitar viés decorrente do odor do rato testado anteriormente.

3.4.1.2 Teste do labirinto em Y (Y-Maze)

O labirinto em Y consiste em um aparato formado por três braços de cor branca opaca que distam uma do outro cerca de 120°, formando assim, um triângulo em seu centro (Figura 10A). Cada braço do aparato possui 75,5 cm de comprimento, 34,5 cm de altura e 11,7 cm de largura, sendo esta suficiente para um perfeito deslocamento do animal.

O teste foi criado com o intuito de analisar o comportamento do animal quanto à exploração de novos ambientes. O instinto do rato é explorar novos espaços, desta maneira esperasse que diante de três braços, ainda que idênticos, o animal tenha preferência a adentrar um espaço diferente ao visitado anteriormente, para tanto o animal utiliza dentre outras regiões cerebrais, o córtex pré-frontal que esta relacionado a cognição e o hipocampo relacionado a memória de trabalho (CONRAD et al., 2003; MELLO-CARPES; IZQUIERDO, 2013)

O teste era iniciado com a inserção do animal no centro do aparato, voltado para dois dos braços. A partir de então era cronometrado um tempo de oito minutos para que o mesmo realizasse a exploração ambiental do equipamento. O movimento do animal foi registrado de forma manual pelo próprio executor do teste, de maneira que fosse anotada a sequência de entrada do animal nos braços do aparato, que estavam enumerados de 1 a 3 no sentido horário (Figura 10B). Ao fim do tempo

mencionado, era encontrada a sequência de entradas do animal nos braços do aparelho.

Figura 10: Representação do aparato Y-Maze

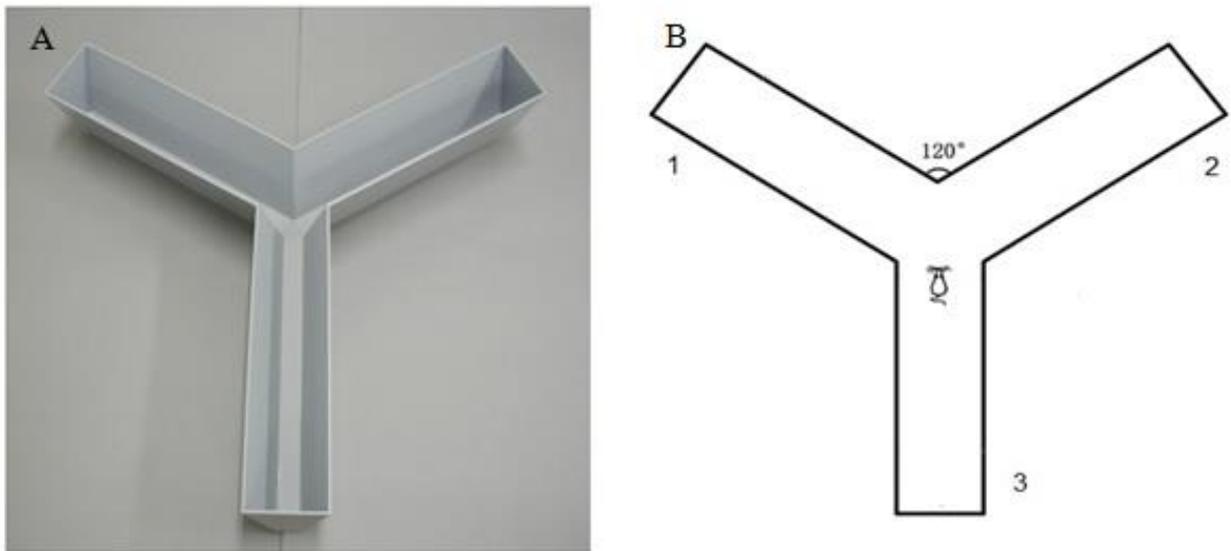


Figura A: Fonte: RIKEN, 2011. Figura B: Fonte: Próprio autor.

De posse dos dados coletados, era analisada a quantidade de alternâncias realizadas pelo animal observado, onde três entradas em braços diferentes caracterizava uma alternância correta, ao passo que um retorno ao braço anteriormente visitado, configurava um erro.

Em seguida foi realizado o cálculo da porcentagem de alternância, de acordo com a fórmula representada na figura abaixo (Figura 11). Por fim, vale ressaltar que ao término de cada teste, era realizada a assepsia do aparelho com álcool 15%, antes da introdução do novo animal a ser testado

Figura 11: Fórmula utilizada para calcular a porcentagem de acertos no teste Y-Maze.

$$\% \text{ Alternância espontânea} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de alternâncias}}{\text{N}^\circ \text{ de entradas totais} - 2} \times 100$$

3.4.1.3 Teste reconhecimento do objeto novo (*The novel object recognition_NOR*)

O teste de reconhecimento do objeto (NOR) novo foi desenvolvido em 1980 e teve como principal objetivo analisar o comportamento animal relacionado à amnésia. Desde sua criação o teste tem passado por adaptações no seu protocolo e sua aplicação vem sendo utilizada com diversos objetivos, tais como analisar comportamentos ansiosos, memória de trabalho, atenção e memória de curto prazo nos animais. (ENNACEUR; MELIANI, 1988; GOULART et al., 2010)

Estudos mostram que em casos de lesão do hipocampo e/ ou do córtex cerebral, ocorre a diminuição do interesse do animal pelo objeto novo, outras investigações mostraram a relação da transmissão noradrenérgica hipocampal com a atividade de memória de curta duração (BUCKMASTER, 2004; NEVES et al., 2013). O presente estudo investigou a memória de curta duração (MCD). Para tanto o teste do reconhecimento do objeto novo quando realizado foi composto por três fases, discriminadas abaixo (figura Z) (TAGLIALATELA et al., 2010):

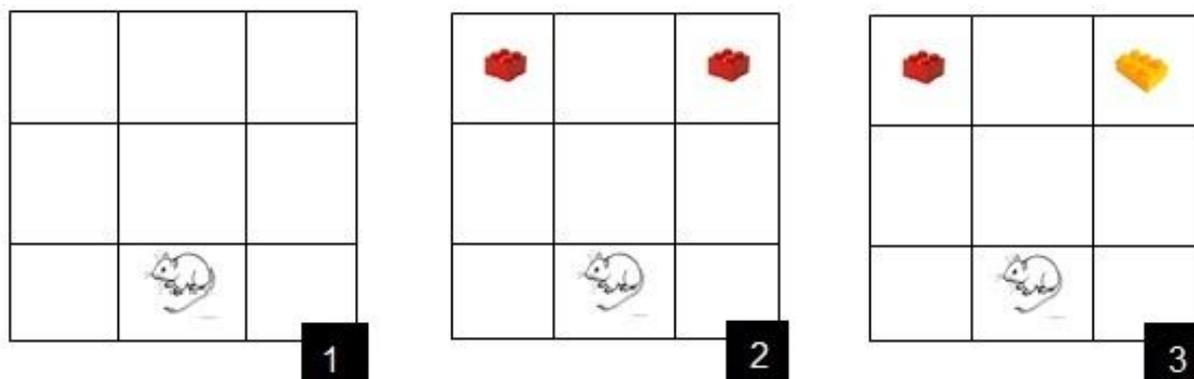
1- Habituação - Os animais eram introduzidos individualmente numa arena semelhante à utilizada no teste campo aberto, já descrita anteriormente (item 3.4.1.1). Para realização desta primeira etapa, o equipamento estava previamente limpo e vazio de objetos. Neste ambiente o animal permanecia por 10 minutos. Após o final deste tempo, o animal voltava para sua caixa moradia e permanecia na mesma por um período de 24 horas (Figura 12A).

2- Familiarização - Após o período de 24 horas após a fase de habituação, os animais eram introduzidos novamente no equipamento do campo aberto que já se encontrava higienizado com álcool 70-75%. Neste momento os animais previamente

adaptados, não sentiam necessidade de explorar o ambiente. Dentro do equipamento encontravam-se dois objetos dispostos de forma simétrica e distando 10 cm das paredes da caixa. Tratava-se de dois brinquedos Lego, iguais em tamanho, peso e forma que assim como a caixa, também se encontravam limpos com álcool (figura 12B). Foi observada a aproximação dos animais e foi considerada uma exploração dos mesmos pelos objetos, quando estes fizessem contato com os objetos por 20 segundos. O contato em questão se tratava de aproximação de pelo menos 2 cm entre o animal e o brinquedo, toque com a pata e focinho, também foram considerados como maneira de conhecimento deste objeto (ENNACEUR; MELIANI, 1988). Ao final deste período, os animais voltavam para sua caixa moradia e ali permaneciam por dois minutos antes de iniciar a última fase de protocolo do teste.

3- Teste de exploração do objeto novo - Por fim, o teste de exploração do objeto novo iniciava-se com a introdução do animal novamente no campo aberto, porém nessa última fase o rato era exposto a dois objetos, onde um era aquele já conhecido pelo animal na fase 2 acima descrita, ao passo que o outro, correspondia a um objeto diferente do apresentado previamente ao animal. Todo o material utilizado foi higienizado com álcool 70-75%. O teste propriamente dito iniciava-se a partir do instante no qual o animal adentrava o campo aberto. Assim, por um tempo de 10 minutos, o animal tinha liberdade para aproximar-se ou do objeto novo ou do familiar. O tempo no qual o animal dedicava a explorar cada objeto era registrado em paralelo ao tempo total de realização do teste (Figura 12 C).

Figura 12: Representação esquemática do teste de reconhecimento do objeto novo



Fonte: Próprio autor. Figura A- fase de habituação, figura B- Fase de familiarização e figura C- fase de teste.

Ao final dos dez minutos era obtido, assim, o tempo de exploração de cada objeto e de posse destes dados era possível realizar o cálculo do índice de reconhecimento do objeto novo (NOR) que é dado pela diferença entre o tempo de exploração do objeto novo (T2) e o tempo de exploração do objeto familiar (T1), dividido pelo somatório dos tempos de exploração dos objetos (T1+T2), representado pela fórmula abaixo (Figura 13):

Figura 13: Representação da formula para cálculo do índice de reconhecimento do objeto novo

$$\text{NOR} = \frac{T2-T1}{T2+T1}$$

3.4.2 Testes neuroquímicos

Após a realização dos testes de comportamento acima descritos, os animais foram eutanasiados pelo método de decapitação. Tal método foi o escolhido por promover preservação do tecido encefálico o qual foi extraído e analisado e ainda por evitar um possível viés no estudo por contaminação de fármacos sedativos não

participantes da pesquisa (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2002). Desta maneira, imediatamente após a eutanásia, os animais tiveram os encéfalos extraídos e dissecados afim de que se obtivessem as áreas do córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado. Durante o processo de extração os tecidos obtidos foram manipulados sob uma placa de Petri revestida por papel alumínio e contendo gelo. Concluída a dissecação as áreas retiradas foram devidamente pesadas e armazenadas a -70°C .

3.4.2.1 Avaliação de estresse oxidativo

Para avaliação dos níveis de radicais livres as áreas cerebrais coletadas foram homogeneizadas com uma solução de tampão fosfato de potássio de pH 7,4 e 0,1M. Os homogenatos foram centrifugados a uma velocidade de 10.000 rotações por minuto (rpm) durante 15 minutos.

3.4.2.1.1 Determinação da concentração de Glutathiona Reduzida (GSH).

Como mencionado anteriormente, a alteração na concentração de GSH pode ser considerada como indicativo de desequilíbrio oxidativo. Desta maneira, a investigação das concentrações desta enzima foi realizada com a finalidade de estabelecer uma relação entre o uso de LDX e a ocorrência de estresse oxidativo.

Para quantificar os níveis de GSH nas três áreas cerebrais extraídas, coletados 400 μL do sobrenadante foram retirados e adicionados a 320 μL de água destilada e mais 80 μL de ácido tricloroacético a 50%. A solução obtida foi agitada e centrifugada a 3000 rpm por 15 minutos. Depois de centrifugada, foi retirado 400 μL do sobrenadante e adicionados 800 μL de tampão Tris-HCl 0,4M, pH 8,9 mais 20 μL de Reagente de Ellman (DTNB) 0,01M. Finalmente, foi feita a leitura da placa sob um comprimento de onda de 412nm através no espectrofotômetro. A concentração de glutathiona reduzida foi expressa em nanogramas de GSH/g de tecido, tendo por base uma curva padrão (SEDLÁK; HANUS, 1982).

3.4.2.1.2 Determinação dos níveis de peroxidação lipídica

Dentre as macromoléculas susceptíveis aos danos do estresse oxidativo, os lipídeos, principalmente os fosfolipídios e os ácidos graxos se destacam. Assim,

existe uma relação direta entre este desequilíbrio oxidativo e o nível de peroxidação lipídica. Quando oxidados os fosfolípidos que compõem a parede celular são catabolizados e originam o MDA como produto secundário. Desta maneira, o método para determinação dos níveis de peroxidação lipídica, envolve a quantificação dos níveis de MDA (CATALA, 2011; SCOLARO et al., 2012).

Para realização desta quantificação 125 µl de cada homogenato foi adicionado a 225 µL de tampão fosfato de potássio monobásico 50 mM, pH 7,4 e a 125 µL de um sistema catalisador contendo sulfato ferroso e ácido ascórbico em um tubo de ensaio. Esta mistura foi incubada a 37 °C por 30 min.

A reação obtida foi interrompida pela adição de 250 µl de ácido tricloroacético 10 %, seguida da centrifugação desta mistura a 3000 rpm por 15 min. Após centrifugação o sobrenadante foi separado e acrescido a este 250 µL de ácido tiobarbitúrico 0,8 %. A solução foi agitada e mantida em Banho Maria com água fervente (100 °C) por 15 min e logo em seguida foi retirada do Banho Maria e colocada em um banho de gelo para o retorno da reação à temperatura ambiente.

A leitura foi feita em leitor de placas com comprimento de onda ajustado para 532 nm pelo espectrofotômetro. Como padrão, foram utilizadas várias concentrações de MDA (0,627 a 16,77 µmol). Os resultados foram expressos como µmol/mg de proteína (BEVINS, R. A.; BESHEER, 1979).

3.4.2.2 Dosagem de interleucinas IL 1 β e IL-4

As interleucinas pertencem a uma das subdivisões do extenso grupo de citocinas. Essas proteínas participam de cascata de reações que podem sinalizar processos pró e anti-inflamatório (CLARK, 2013).

Nesse estudo foram investigadas as interleucinas 1 β que tem um expressão pró-inflamatória, e interleucina 4 que tem expressão anti-inflamatória, com a finalidade de traçar uma relação do uso de LDX com um possível desencadeamento de processo neuroinflamatório.

Para realizar esta quantificação foi utilizada a técnica de ELISA, por meio de ensaio imunoenzimático. Inicialmente, o hipocampo dissecado dos animais foi homogeneizado a 8 volumes de tampão Phosphate-buffered saline (PBS) com pH de 7,4.

De posse da placa de ELISA contendo 96 poços, foram introduzidos 100µL do anticorpo de captura para a interleucina avaliada, no caso IL1β ou IL-4. Essa incubação ocorreu em temperatura ambiente, por um período de 18 horas. Após esse período, as placas foram lavadas 3 vezes com 200µL de tampão de lavagem e por 1 hora permaneceram com 200µL de albumina sérica bovina (BSA) 1% para garantir que não ocorressem ligações não-específicas de proteínas aos tubos de ensaio e membranas.

Após o tempo de bloqueio, foram introduzidos 100µL da amostra ou da curva padrão aos poços e iniciou-se uma nova incubação que durou 2 horas em temperatura ambiente. Em mais uma etapa do processo, a placa foi lavada (200µL de tampão lavagem) e incubada com anticorpo de detecção para a interleucina analisada pelo período de 2 horas. Posteriormente a placa foi lavada 3 vezes com tampão de lavagem e em seguida incubada com estreptavidina (100µL) por 20 minutos. Por fim, a placa foi lavada 3 vezes com tampão lavagem e acrescido 100µL da solução do substrato de revelação em cada poço. A reação ocorreu por 20 minutos em temperatura ambiente e foi protegida da claridade por se tratar de uma reação fotossensível, quando foi então interrompida com a introdução de 50µL da solução de parada (H₂SO₄). A leitura da placa foi realizada sob um comprimento de onda de 450nm com resultados expressos em pg/mL (THERMO SCIENTIFIC, 2010).

3.4.3 Expressão de proteínas microgliais e receptor AT1 (compactar NOR e BLOT)

A técnica denominada *immunoblot*, mas mais conhecida como Western Bolt, foi desenvolvida em 1979 e teve como finalidade realizar a quantificação de proteínas em amostras teciduais ou fragmentos celulares. Trata-se de uma técnica complexa que pode ser resumidamente descrita em três fases (MAHMOOD; YANG, 2012): Extração das proteínas, Dosagem das proteínas; e Técnica de Western Blotting.

No presente estudo realizou-se a extração proteica de micróglia e de receptor AT1 proveniente do hipocampo dos animais. Para tanto se seguiu as etapas mencionadas acima e descritas a seguir.

a. Extração das proteínas

Para extração, os hipocampos foram macerados com uso do cadinho e pistilo de nitrogênio líquido. O resultado foi colocado em um microtubo acrescido a 100µL

de tampão RIPA (Tabela 4) e inibidor de protease (1 μ L de inibidor de protease: 100 μ L de RIPA), sendo a mistura agitada em vortex 3 vezes por 30 segundos em intervalos de 10 minutos entre elas. Posteriormente as amostras foram centrifugadas por 17 minutos, a 4°C e com velocidade de 13000 rpm. Após a centrifugação o sobrenadante (onde estão inseridas as proteínas) obtido foi coletado e armazenado em um novo microtubo.

b. Dosagem das proteínas

Para realizar a dosagem de proteínas, foi utilizado o método de ensaio de Bradford que se embasa na mudança de cor do corante Coomassie Blue G-250 que em solução ácida permanece em cor vermelha (absorbância de 465nm) e revela em cor azulada na presença de proteínas (absorbância de 595nm). Assim, foram unidos 160 μ L de amostra a 40 μ L de solução de Bradford nas placas. Para quantificar a concentração de proteínas na amostra foi feita uma curva de calibração com BSA de 0,2 a 1,0 mg/mL. A curva tem o objetivo de partir encontrar a equação de ajuste linear na qual é possível substituir os valores médios de absorbâncias das amostras, obtendo-se assim os valores da concentração das proteínas. Diante disto e da calibração previamente realizada a leitura foi feita por espectrofotômetro (595 nm).

c. Técnica de Western Blotting

A técnica é formada por várias subfases. Desta maneira, para que o protocolo ficasse mais didático e de fácil execução, o mesmo foi definido em pontos sequenciais, enumerados abaixo:

- 1- Preparou-se a mistura de 50 μ L da proteína de cada amostra adicionada ao tampão da amostra (Tabela 4) e β mercaptoetanol foi misturada em vortex por 10 s, aquecida em banho maria por 5 min em uma temperatura de 95°C e centrifugada em velocidade de 10000 rpm em temperatura de 4°C por 30s.
- 2- Realizada a eletroforese vertical das proteínas em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) em dois momentos: 60 Volts (V) nos primeiros 15 min para deposição das amostras no fundo do poço e 120 V para o restante da corrida, onde foi utilizado gel a 10% e tampão de corrida (Tabela 4).

- 3- Transferência das proteínas realizada em tampão de transferência (Tabela 4) do gel para a membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) num período de duas horas a 100V.
- 4- Bloqueio das membranas com intuito de promover a redução de ligações inespecíficas. Procedimento ocorreu sob constante agitação e foi realizado com BSA a 5% em tampão salina Tris HCl suplementado com Tween 20 (TBST).
- 5- Lavagem das membranas com TBST (3 com duração de 10 minutos cada)(Tabela 4), seguida de incubação das membranas com anticorpos rat anti- Dopamine DRD2 IgG primary antibody (1:1000) e rat anti- α - tubulin IgG primary antibody (1:4000), diluídos em 1% BSA em TBST, pelo período *overnight* em temperatura de 4°C e sob constante agitação. Repetidas as três lavagens iniciais deste passo. (IBA)
- 6- Incubação das membranas com anticorpo secundário HRP-goat anti-rabbit IgG (1:1000) ou HRP- goat anti-mouse IgG (1:1000) em temperatura ambiente por um período de 2 horas.
- 7- Por fim, as membranas foram lavadas com TBST mais 4 vezes por um período de 10 minutos cada. Após este período foi adicionado o reagente da quimiluminescência por 5 minutos e posteriormente foi feita a captura das imagens pelo sistema ImageQuant 300 Imager e a densidade das bandas por um software de imagem.

Tabela 4: Tampões utilizados no protocolo Western Blotting e suas respectivas composições.

Tampões utilizados	Composição
RIPA	25 mM Tris-HCl pH 7,6; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA; 1% NP-40; 1% triton-X- 100; 1% deoxicolato de sódio; 0,1% SDS
Tampão da amostra	(BioRad, EUA 65,8 mM Tris-HCl, pH 6,8; 26,3% glicerol; 2,1% SDS; 0,01% azul de bromofenol)
Tampão corrida	25 mM Tris; 192 mM glicina; 1% SDS
Tampão de transferência	25 mM Tris; 192 mM glicina; 20% metanol)
TBST	(TBST- 20 mM Tris pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,1% Tween 20

3.5 Análise estatística

A análise dos dados foi realizada através do software GraphPad Prism versão 6.0 para Windows, GraphPad Software Inc., San Diego Califórnia EUA Copyright © 1992 – 2012. Os resultados foram analisados pelo teste Two way ANOVA seguido do teste de Bonferroni's como teste post hoc para comparações múltiplas e expressas como média (\pm EPM). Para a análise estatística dos fatores “tempo de tratamento” e “grupos tratados” foram considerados o nível crítico para rejeição da hipótese de nulidade menor que 0,05 ($P < 0,05$). A correlação entre os resultados comportamentais e neuroquímicos foi feita por análise de correlação bivariada de Pearson.

4 RESULTADOS

4.1 Testes de comportamento

4.1.1 Campo Aberto (*Open field*)

Na avaliação do parâmetro atividade locomotora animal (Figura 14), ANOVA de duas vias revelou que houve interação significativa entre os dois fatores avaliados: “semanas de tratamento” e “grupos tratados” [F (4, 63) = 3,386, P= 0,0143].

O teste post hoc revelou um aumento na atividade exploratória global dos animais tratados com LDX na segunda semana de tratamento em relação aos animais que receberam salina (P< 0,001), não havendo alteração significativa na distância total percorrida (Figuras 14 e 15).

A avaliação do parâmetro *Rearing* mostrou interação significativa entre os fatores “semanas de tratamento e “grupos tratados” [F (2, 39) = 4,135;P = 0,0235]. Pode-se observar ainda um aumento significativo desta atividade motora nos animais submetidos ao uso de LDX na primeira semana de tratamento quando comparados aos que receberam apenas salina (P< 0,01) (Figura 16)

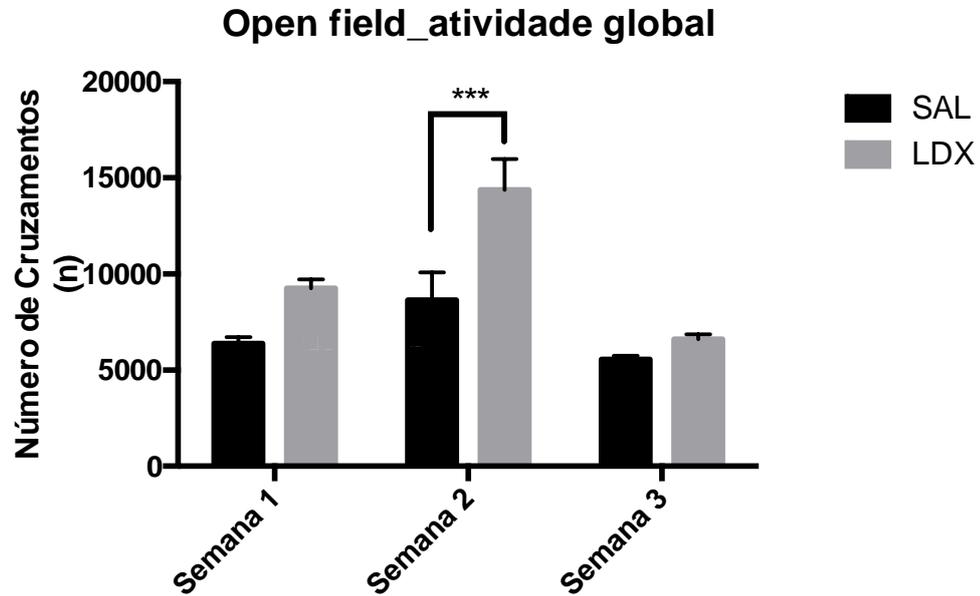
A avaliação estatística da ANOVA duas-vias para o parâmetro tempo de permanência no quadrante central revelou que houve interação significativa entre os fatores “semanas de tratamento” e “grupos tratados” [F (4, 56) = 3,748, P = 0,0090] (Figura 17).

De acordo com os resultados obtidos nos testes post hoc, pode-se observar um aumento significativo da permanência no centro do aparato pelos animais tratados com LDX por três semanas quando comparados aos tratados também com LDX por uma (p< 0,001) e por duas semanas (p< 0,001). O post hoc revelou ainda que os grupos LDX vs. Salina tratados por três semanas apresentaram uma diferença significativa entre eles, sendo essa um aumento da permanência no quadrante central do *open field* pelos animais que receberam LDX (p< 0,0001).

Na avaliação da frequência com a qual ocorriam os movimentos de autolimpeza do animal ou também chamado *grooming* (Figura 18), os resultados mostraram que houve uma interação significativa entre os fatores “semanas de tratamento” e “grupos tratados” [F (4, 60) = 5,875 P = 0,0005]. O teste post hoc revelou que não ocorreram variação significativas para o fator grupos tratados,

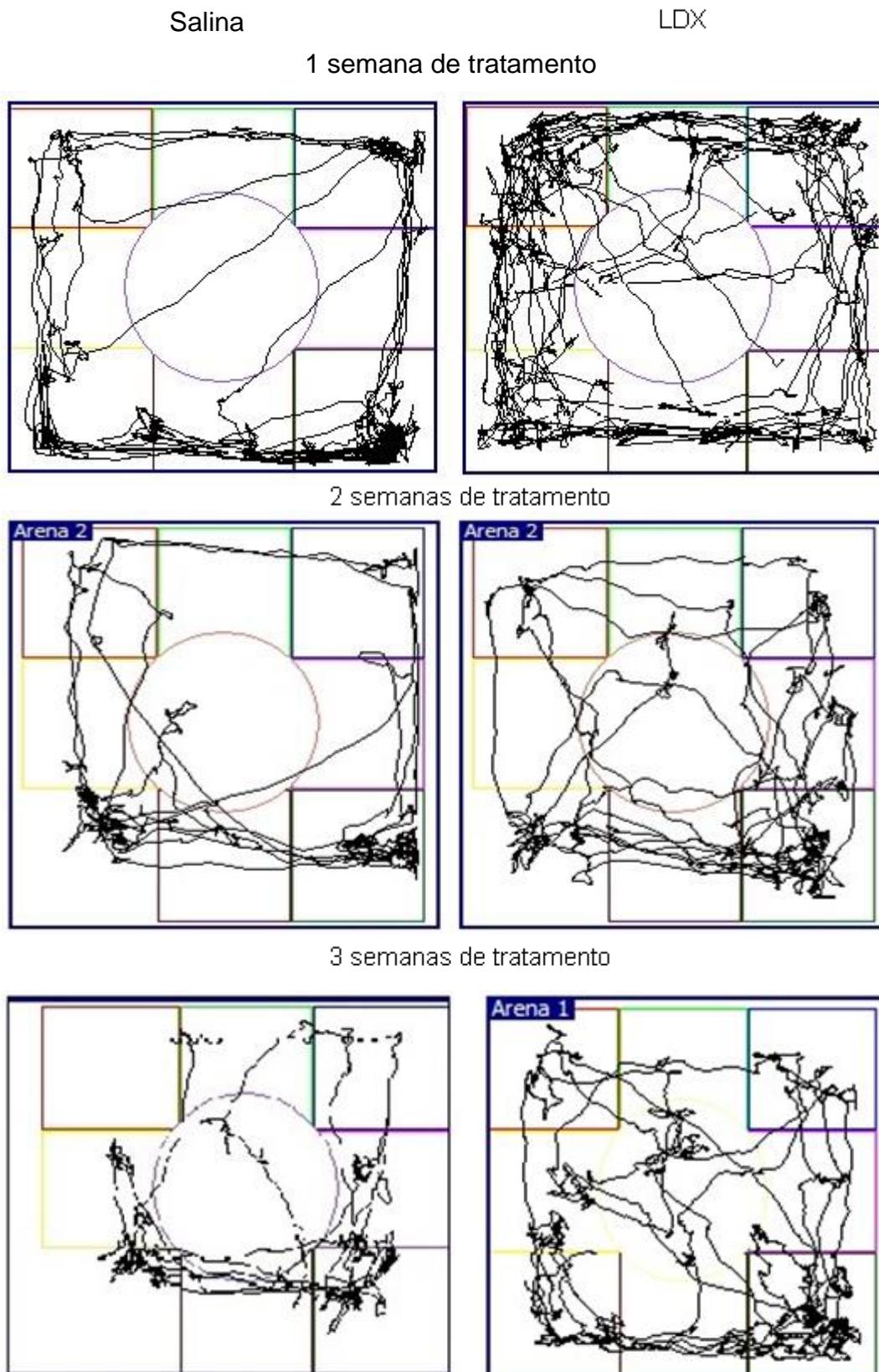
porém ao ser observado o fator tempo de tratamento, revelou-se uma redução significativa deste comportamento entre os grupos salina tratados na primeira e segunda ($p < 0,001$); primeira e terceira ($p < 0,001$) e segunda e terceira semanas de tratamento ($p < 0,001$), e ainda entre os grupos LDX tratados entre a primeira e segunda ($p < 0,05$); primeira e terceira semanas de tratamento ($p < 0,001$).

Figura 14: Atividade locomotora desempenhada pelos animais tratados com doses progressivas de lisdexanfetamina por 1, 2 ou 3 semanas.



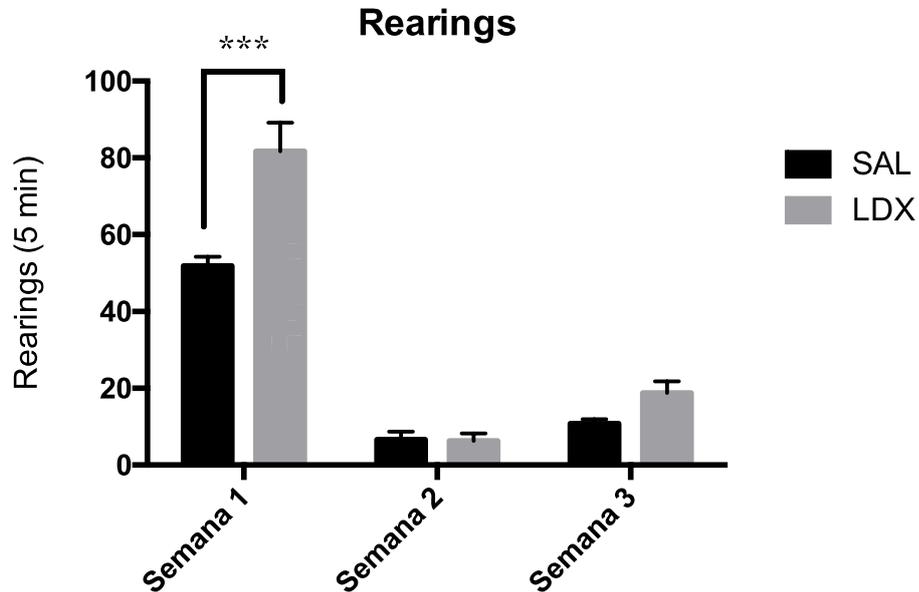
Os ratos foram tratados com Salina ou Lisdexanfetamina pelo período de 1 semana (LDX 10 mg/Kg), 2 semanas (LDX 13mg/Kg) e 3 semanas (LDX 18mg/Kg). Os animais foram submetidos ao teste do campo aberto ao fim de cada período de tratamento. As barras representam a média \pm E.P.M do deslocamento realizado pelos animais dentro do aparato por 5 minutos. A análise dos resultados foi feita através de two-way ANOVA, post- hoc Bonferroni. Os símbolos representam a relação de comparação tendo como parâmetro base o grupo salina (*) e LDX (β). Valores de significância *p, β p, < 0.05; **p, $\beta\beta$ p < 0.01, ***p, $\beta\beta\beta$ p, < 0.001. Abreviações: Lisdexanfetamina (LDX), Lisdexanfetamina

Figura 15: Mapa do trajeto percorrido pelos animais no campo aberto



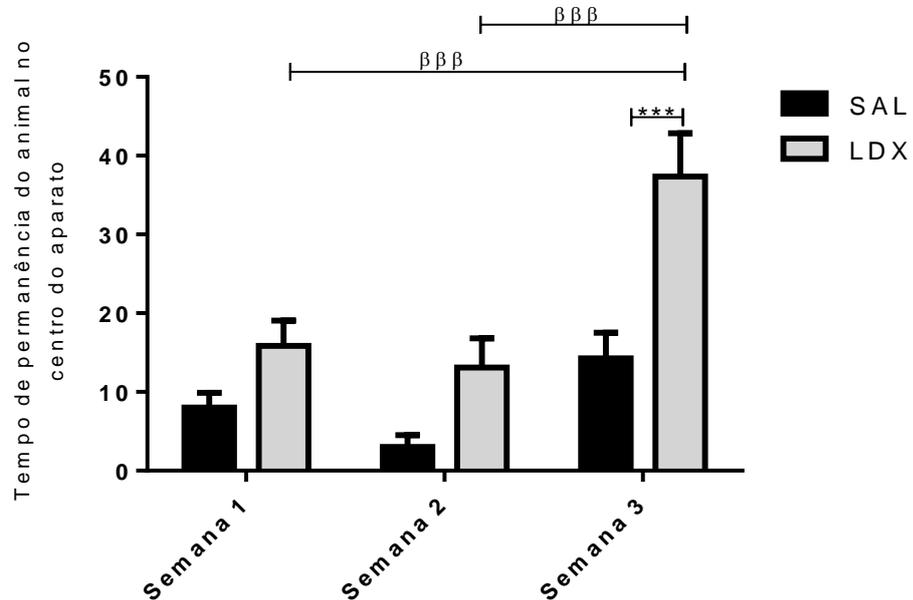
Fonte: Próprio autor. Captura do software que retrata o mapa individual do deslocamento de cada animal no período de tratamento realizado com seu respectivo fármaco.

Figura 16: Número de rearings realizados pelos animais tratados com doses progressivas de lisdexanfetamina por 1, 2 ou 3 semanas.



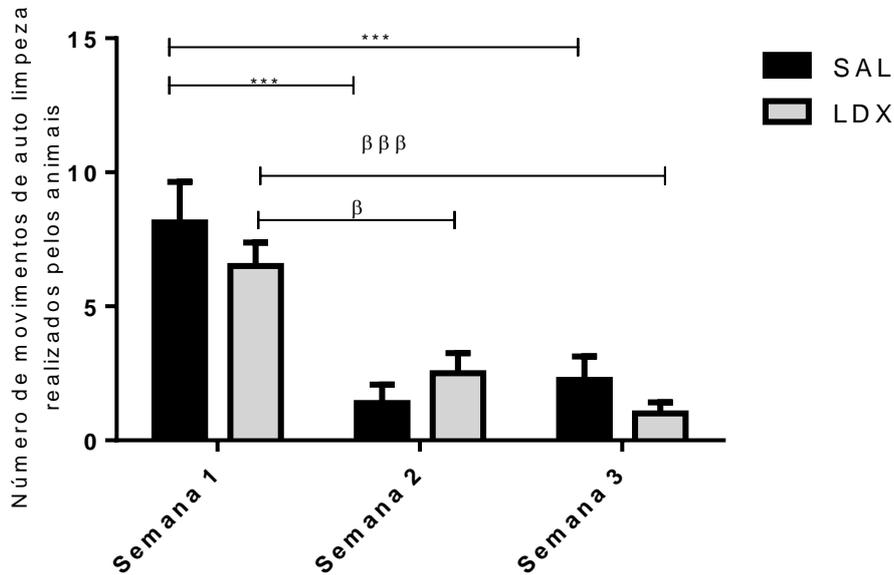
Os ratos foram tratados com Salina ou Lisdexanfetamina pelo período de 1 semana (LDX 10 mg/Kg), 2 semanas (LDX 13mg/Kg) e 3 semanas (LDX 18mg/Kg). Os animais foram submetidos ao teste do campo aberto ao fim de cada período de tratamento. As barras representam a média \pm E.P.M do movimento de rearings realizados pelos animais dentro do aparato por 5 minutos. A análise dos resultados foi feita através de two-way ANOVA, post- hoc Bonferroni. Os símbolos representam a relação de comparação tendo como parâmetro base o grupo salina (*) e LDX (β). Valores de significância *p, β p, < 0.05; **p, $\beta\beta$ p < 0.01, ***p, $\beta\beta\beta$ p, < 0.001. Abreviações: Lisdexanfetamina (LDX), Lisdexanfetamina

Figura 17: Tempo de permanência no quadrante central dos animais tratados com doses progressivas de lisdexanfetamina por 1, 2 ou 3 semanas.



Animais tratados com Salina ou Lisdexanfetamina pelo período de 1 semana (LDX 10 mg/Kg), 2 semanas (LDX 13mg/Kg) ou 3 semanas (LDX 18mg/Kg). Os animais foram submetidos ao teste do campo aberto ao fim de cada período de tratamento. As barras representam a média \pm E.P.M do deslocamento realizado pelos animais dentro do aparato por 5 minutos. A análise dos resultados foi feita através de two-way ANOVA, post- hoc Bonferroni. Os símbolos representam a relação de comparação tendo como parâmetro base o grupo salina (*) e LDX (β) Valores de significância *p, β p, < 0.05; **p, $\beta\beta$ p, <0.01, ***p, $\beta\beta\beta$ p, < 0.001, ****p, $\beta\beta\beta\beta$ p, < 0.0001). Abreviações: Lisdexanfetamina.

Figura 18: Frequência de realização do movimento de auto-limpeza (*grooming*) dos animais tratados com doses progressivas de lisdexanfetamina por 1, 2 ou 3 semanas.



Animais tratados com Salina e Lisdexanfetamina pelo período de 1 semana (LDX 10 mg/Kg), 2 semanas (LDX 13mg/Kg) e 3 semanas (LDX 18mg/Kg). Os animais foram submetidos ao teste do campo aberto ao fim de cada período de tratamento. Neste teste foi contabilizado o número de movimentos de autolimpeza realizados pelo animal. As barras representam a média \pm E.P.M do deslocamento realizado pelos animais dentro do aparato por 5 minutos. A análise dos resultados foi feita através de two-way ANOVA, post-hoc Bonferroni. Os símbolos representam a relação de comparação tendo como parâmetro base o grupo salina (*), LDX (β). Valores de significância *p, β p, < 0.05; **p, $\beta\beta$ p, < 0.01, ***p, $\beta\beta\beta$ p, < 0.001, ****p, < 0.0001). Abreviações: Lisdexanfetamina (LDX).

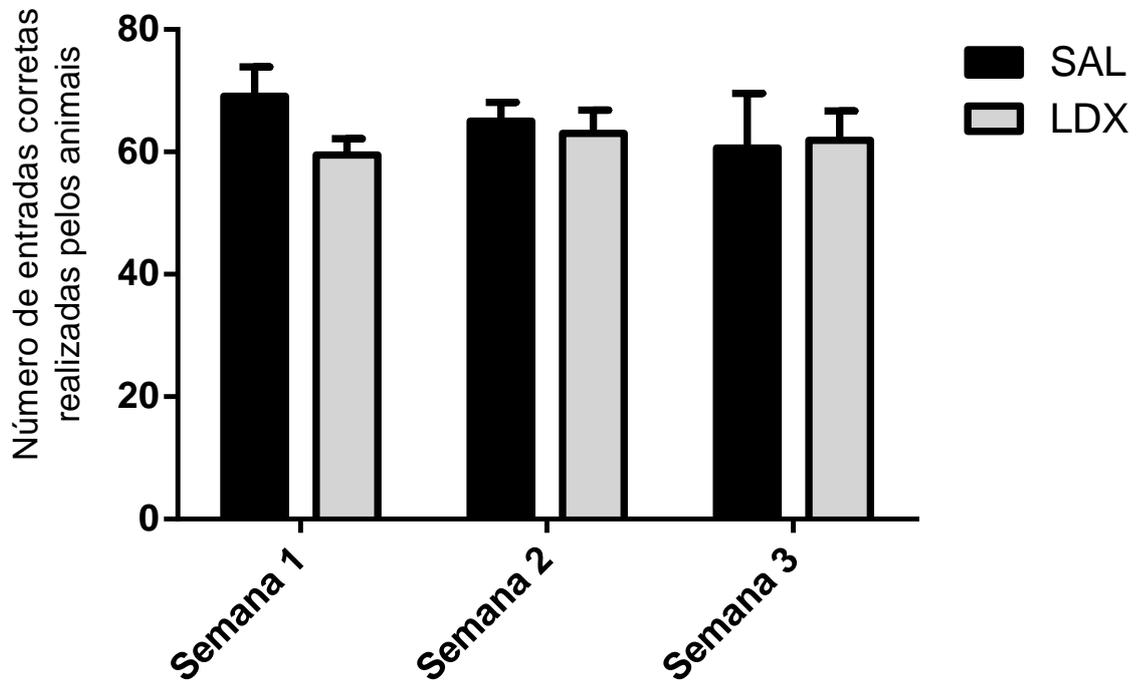
4.2 Testes de cognição

4.2.1 Y Maze

A análise estatística do teste Y Maze foi feita através do ANOVA duas vias. Os resultados mostraram que não houveram interações significativas entre os fatores “grupos tratados” e “semanas de tratamento”.

Desta maneira a análise revelou ausência de variações significativas tanto para o fator “grupos tratados” como para o fator “semanas de tratamento” (Figura 19)

Figura 19: Número de entradas corretas nos braços do aparato pelos animais tratados com doses progressivas de lisdexanfetamina por 1, 2 ou 3 semanas.



Animais tratados com Salina e Lisdexanfetamina pelo período de 1 semana (LDX 10 mg/Kg), 2 semanas (LDX 13mg/Kg) e 3 semanas (LDX 18mg/Kg). Os animais foram submetidos ao teste Ymaze ao fim de cada período de tratamento. Neste teste foram registradas as entradas dos animais nos braços do aparato e calculado o índice de acertos. As barras representam a média \pm E.P.M do deslocamento realizado pelos animais dentro do aparato por 5 minutos. A análise dos resultados foi feita através de two-way ANOVA, post- hoc Bonferroni.

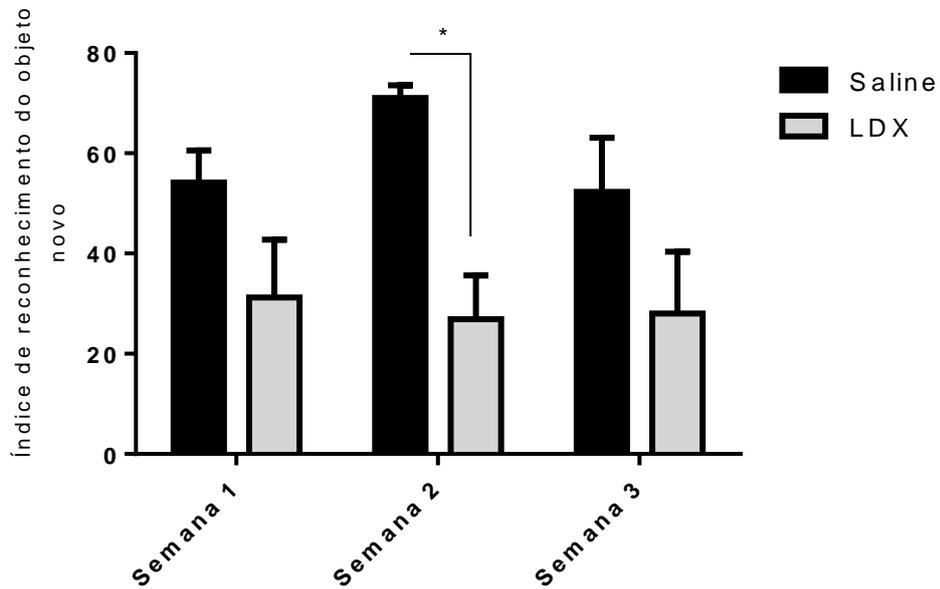
4.2.2 Reconhecimento do objeto novo

A análise estatística realizada através do teste ANOVA duas vias revelou que não ocorreu uma interação significativa entre os fatores “semanas de tratamento” e “grupos tratados”, porém houve efeito significativo do fator “grupos tratados” [$F(2, 57) = 9,529$; $p = 0.0003$], para avaliação do teste de reconhecimento do objeto novo.

Na análise grupo a grupo pelo teste de Bonferroni pode-se concluir com relação ao fator “grupos tratados”, que embora tenha ocorrido uma importante diminuição do índice de NOR nos animais do grupo LDX nos períodos da primeira, segunda e terceira semanas de tratamento quando comparados ao grupo salina, a variação somente foi significativa entre os grupos LDX e salina na segunda semana de tratamento ($P < 0,05$).

Com relação ao fator “semanas de tratamento” o post hoc revelou que o grupo LDX manteve o índice de reconhecimento do objeto novo constante nos três semanas de tratamento e o grupo salina apresentou uma pequena oscilação, embora não tenha sido significativa entre as três semanas (Figura 20).

Figura 20: Índice de reconhecimento do objeto novo dos grupos de animais tratados com doses progressivas de lisdexanfetamina por 1, 2 ou 3 semanas.



Animais tratados com Salina ou Lisdexanfetamina pelo período de 1 semana (LDX 10 mg/Kg), 2 semanas (LDX 13mg/Kg) e 3 semanas (LDX 18mg/Kg). Os animais foram submetidos ao teste de reconhecimento do objeto novo ao fim de cada período de tratamento. Neste teste foram registrados os tempos de exploração dos objetos pelos animais com posterior cálculo do índice de reconhecimento. As barras representam a média \pm E.P.M do índice de reconhecimento. A análise dos resultados foi feita através de two-way ANOVA, post- hoc Bonferroni. Os símbolos representam a relação de comparação tendo como parâmetro base o grupo salina (*), LDX (β). Valores de significância $*p$, βp , < 0.05 . Abreviações: Lisdexanfetamina (LDX).

4.3 Resultados bioquímicos

Para os testes bioquímicos que envolvem o estresse oxidativo, foram analisadas as amostras cerebrais das áreas CPF, HC e CE. Dois parâmetros foram analisados: GSH e peroxidação lipídica.

4.3.1 *Glutathiona reduzida*

4.3.1.1 Níveis de GSH no córtex pré-frontal

No córtex pré-frontal ocorreu uma interação significativa entre os fatores “grupo de tratamento” e “semanas de tratamento” [F (4, 57) = 8,022; P < 0,0001].

O post hoc mostrou que na primeira semana de tratamento, houve um aumento embora não significativo dos níveis de GSH no CPF dos animais que receberam LDX quando comparados aos que receberam apenas salina. Na segunda semana de tratamento não se pode observar diferenças entre os grupos. Por fim, na terceira semana de tratamento, houve um aumento significativo nos níveis GSH no CPF dos animais do grupo LDX, quando comparados ao grupo salina (P < 0,0001) (Figura 21)

Quando comparados os “grupos tratados” ao longo dos períodos de tratamento, pode-se observar que o grupo salina manteve-se constante ao longo do tempo, enquanto o grupo LDX apresentou um aumento significativo dos níveis de GSH entre o segundo e terceiro períodos de tratamento (P < 0,001).

4.3.1.1 Níveis de GSH no hipocampo

Na região do hipocampo, os resultados revelaram que houve interação entre as variáveis “grupos tratados” e “tempo de tratamento” [F (4, 60) = 20,27; P < 0,0001] (Figura 22).

Quando analisados os resultados do post hoc, pode-se observar que na primeira semana não ocorreu diferença significativa entre os grupos salina e LDX. Na segunda semana, houve redução dos níveis de GSH no grupo LDX quando comparado ao grupo salina (P < 0,0001). Na última semana de tratamento ocorreu

redução significativa dos níveis de GSH no grupo LDX quando comparados ao grupo salina ($P < 0,00001$).

O post hoc mostrou ainda que ocorreu uma oscilação dos níveis de GSH dentro do grupo LDX. Os níveis de GSH foram significativamente maiores na segunda semana de tratamento que na primeira ($P < 0,0001$). Pode-se observar ainda que na terceira semana de tratamento com LDX ocorreu uma redução considerável deste parâmetro no hipocampo dos animais tratados com LDX ($P < 0,0001$). Os grupos tratados com salina não apresentaram variação significativa ao longo do tempo.

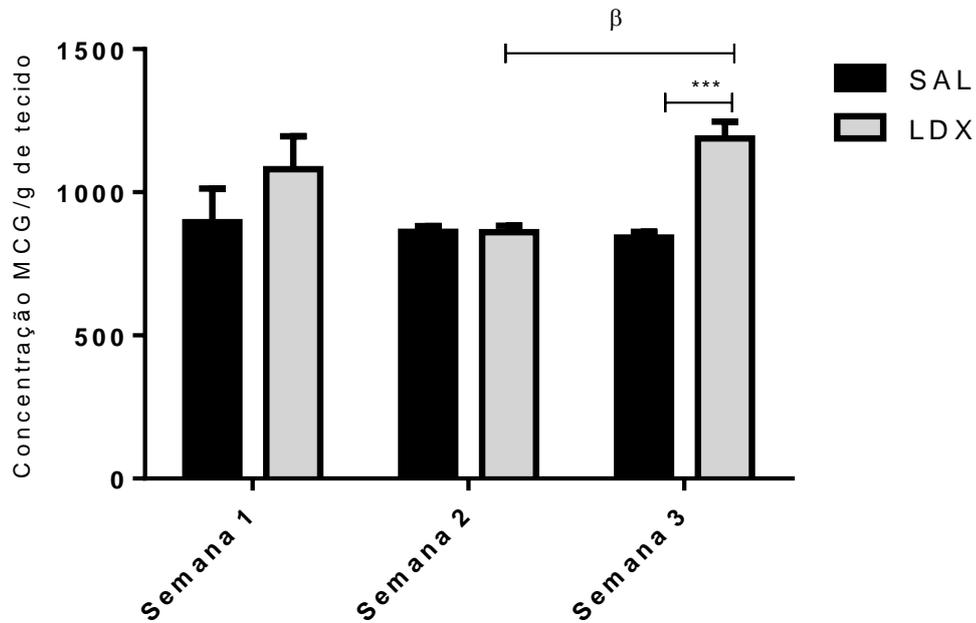
4.3.1.2 Níveis de GSH no corpo estriado

A avaliação da interação “grupos tratados” e “semanas de tratamento”, mostrou uma resposta significativa [$F(4, 55) = 264,7; P < 0,0001$] sobre os níveis de GSH na região do corpo estriado (Figura 23).

Levando-se em consideração os resultados do teste post hoc, pode-se notar que houve uma discreta redução dos níveis de GSH na primeira semana de tratamento entre grupos LDX e controle. Na segunda semana, houve um aumento significativo da GSH no corpo estriado dos animais tratados com LDX ($P < 0,0001$). Já na terceira semana de tratamento, ocorreu uma diminuição significativa ($P < 0,00001$), deste antioxidante no corpo estriado dos animais tratados com LDX, quando comparados ao grupo salina tratados pelo mesmo período.

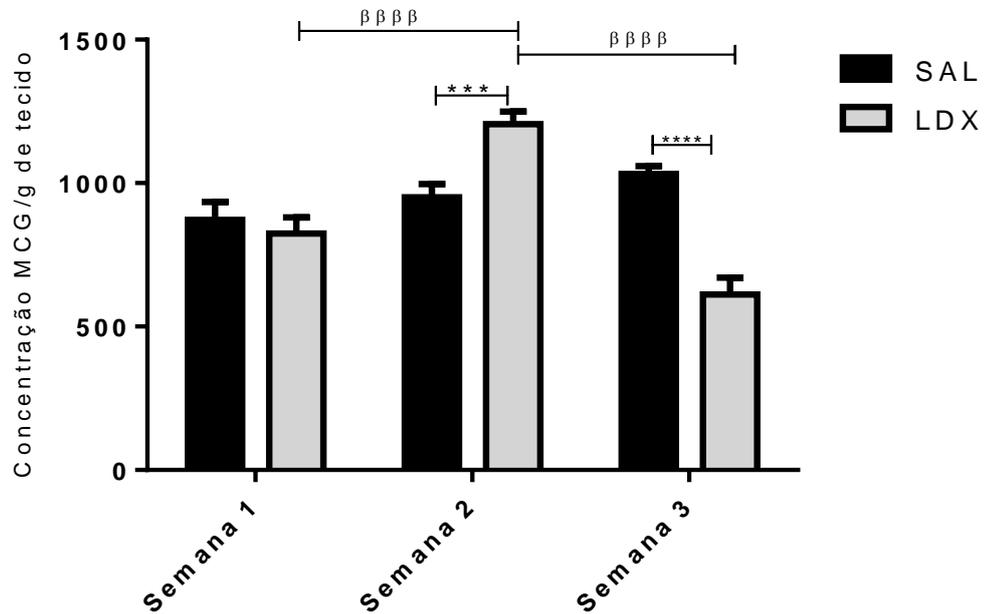
A análise realizada ao longo do tempo de tratamento mostrou que o grupo salina apresentou aumento significativo entre a primeira e segunda ($P < 0,001$), e entre a primeira e terceira semanas ($P < 0,0001$), de tratamento. Os resultados revelaram ainda, uma oscilação dos níveis de GSH dentro do grupo LDX, sendo significativamente maiores na segunda semana de tratamento que na primeira ($P < 0,0001$) e na terceira ($P < 0,0001$).

Figura 21: Níveis de GSH no córtex pré-frontal dos grupos de animais tratados com doses progressivas de lisdexanfetamina por 1, 2 ou 3 semanas.



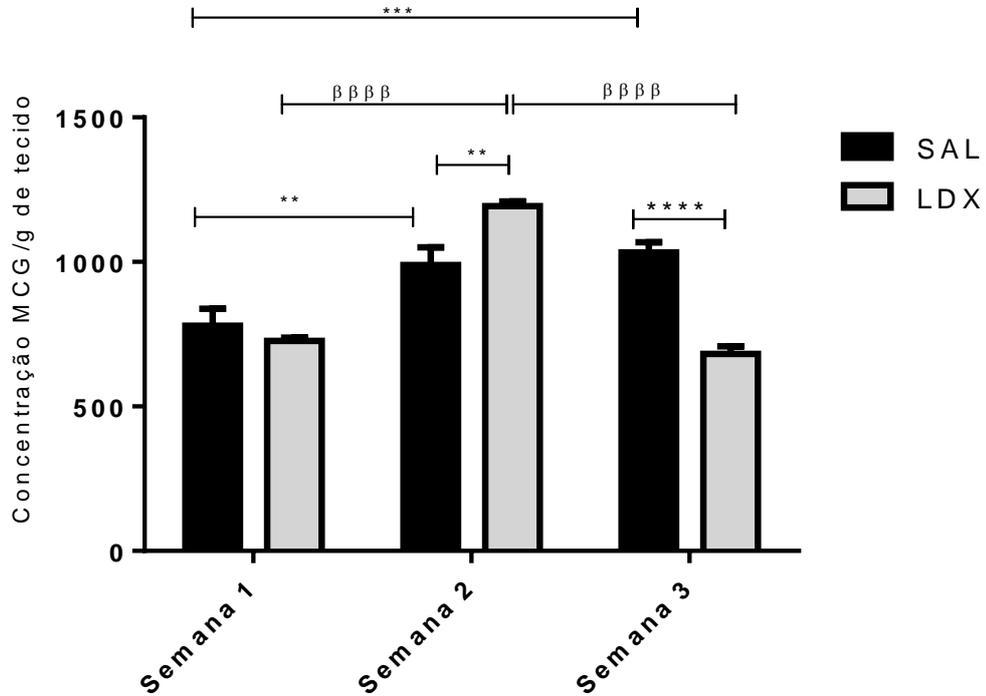
Animais tratados com Salina ou Lisdexanfetamina pelo período de 1 semana (LDX 10 mg/Kg), 2 semanas (LDX 13mg/Kg) e 3 semanas (LDX 18mg/Kg). O córtex pré-frontal dos animais foram retirados e foi realizada a análise dos níveis de GSH. As barras representam a média \pm E.P.M dos níveis de GSH no córtex pré-frontal. A análise dos resultados foi feita através de two-way ANOVA, post-hoc Bonferroni. Os símbolos representam a relação de comparação tendo como parâmetro base o grupo salina (*), Valores de significância * $p < 0.05$. Abreviações: Lisdexanfetamina (LDX).

Figura 22: Níveis de GSH no hipocampo dos grupos de animais tratados com doses progressivas de lisdexanfetamina por 1, 2 ou 3 semanas.



Animais tratados com Salina ou Lisdexanfetamina pelo período de 1 semana (LDX 10 mg/Kg), 2 semanas (LDX 13mg/Kg) e 3 semanas (LDX 18mg/Kg). O hipocampo dos animais foram retirados e foi realizada a análise dos níveis de GSH. As barras representam a média \pm E.P.M dos níveis de GSH no hipocampo. A análise dos resultados foi feita através de two-way ANOVA, post- hoc Bonferroni. Os símbolos representam a relação de comparação tendo como parâmetro base o grupo salina (*), Valores de significância * $p < 0.05$. Abreviações: Lisdexanfetamina (LDX)

Figura 23: Níveis de GSH no corpo estriado dos grupos de animais tratados com doses progressivas de lisdexanfetamina por 1, 2 ou 3 semanas.



Animais tratados com Salina ou Lisdexanfetamina pelo período de 1 semana (LDX 10 mg/Kg), 2 semanas (LDX 13mg/Kg) e 3 semanas (LDX 18mg/Kg). O corpo estriado dos animais foi dissecado e foi realizada a análise dos níveis de GSH. As barras representam a média \pm E.P.M dos níveis de GSH no corpo estriado. A análise dos resultados foi feita através de two-way ANOVA, post-hoc Bonferroni. Os símbolos representam a relação de comparação tendo como parâmetro base o grupo salina (*), Valores de significância $*p < 0.05$. Abreviações: Lisdexanfetamina (LDX).

4.4 Determinação de Peroxidação lipídica

4.4.1 Níveis de TBARS no córtex pré-frontal

ANOVA de duas vias revelou interação significativa entre os fatores “grupos tratados” e “semanas de tratamento” [F (4, 59) = 42,03; P < 0,0001] .

O teste post hoc, permitiu observar que nas três semanas de administração da LDX houve uma discreta diminuição dos níveis de TBARS, quando comparados ao grupo salina, porém nenhuma dessas diferenças foi significativa.

Quando analisados os resultados referentes a variável “semanas de tratamento”, pode-se observar diminuição significativa dos níveis de peroxidação lipídica do grupo salina da primeira para a terceira semana de tratamento (P< 0,0001). O grupo LDX apresentou uma redução progressiva e significativa entre a primeira e segunda semana (P< 0,005), entre a segunda e terceira (P< 0,001), e entre a primeira e terceira (P<0,0001) semanas de tratamento (Figura 24).

4.4.2 Níveis de TBARS no hipocampo

O teste ANOVA duas vias, revelou uma interação significativa entre o fator “semanas de tratamento” e “grupos tratados” [F (4, 53) = 55,27, P < 0,0001] ao avaliar os níveis de TBARS no hipocampo dos animais submetidos aos tratamentos.

O teste post hoc mostrou que na primeira semana na qual os animais foram tratados, houve uma diminuição significativa (P< 0,0001) dos níveis de TBARS do grupo LDX quando comparados ao grupo salina. Na segunda semana não ocorreram variações significativas entre os grupos. Na terceira semana, entretanto, ocorreu aumento relevante (P< 0,0001) dos níveis de peroxidação lipídica no hipocampo dos animais do grupo LDX comparados aos hipocampos dos animais que receberam apenas salina.

Ao longo do tempo de tratamento, pode-se observar que ocorreu uma redução significativa dos níveis de peroxidação lipídica do grupo salina entre a primeira e terceira semana de tratamento (P< 0,001). Pode-se perceber ainda, um aumento progressivo de peroxidação lipídica no hipocampo dos animais submetidos ao tratamento com LDX. O aumento deu-se de forma significativa entre a primeira e terceira semana (P< 0,0001) e entre a segunda e terceira (P< 0,005) (Figura 25).

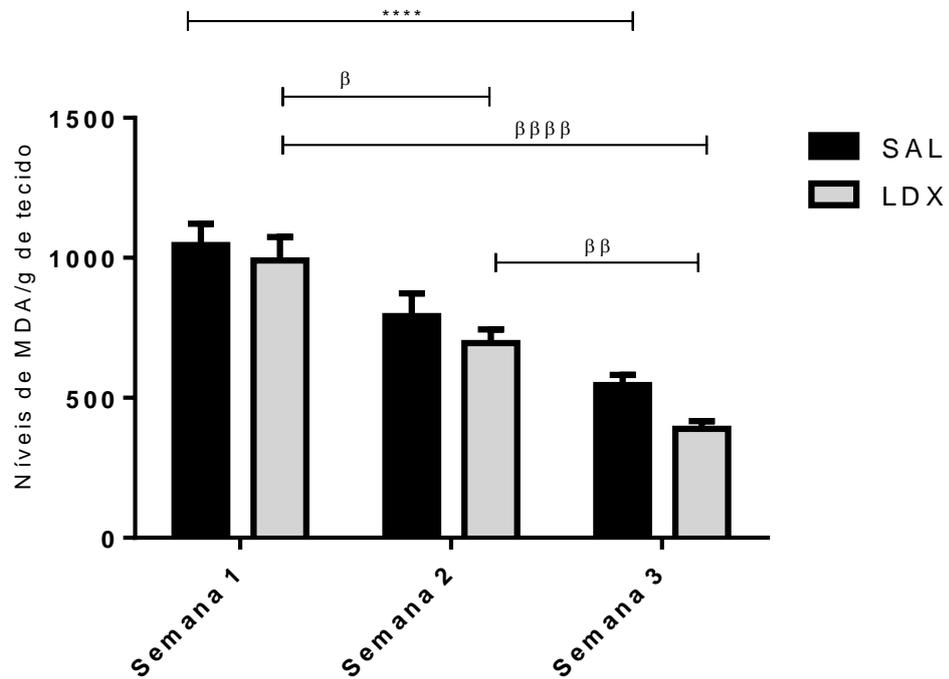
4.4.3 Níveis de TBARS no CE

A avaliação dos resultados revelou que ocorreu uma interação entre os fatores “semanas de tratamento” e “grupos tratados” [$F(4, 55) = 264,7$, $P < 0,0001$] para os níveis de TBARS no corpo estriado.

Os resultados da análise grupo a grupo pelo teste de Bonferroni revelou que não houve diferença significativa nos níveis de peroxidação lipídica no corpo estriado dos animais tratados por uma e por duas semanas. Porém, na terceira semana de tratamento, houve um aumento relevante dos níveis de TBARS no CE dos animais tratados com LDX comparados ao grupo salina ($P < 0,0001$).

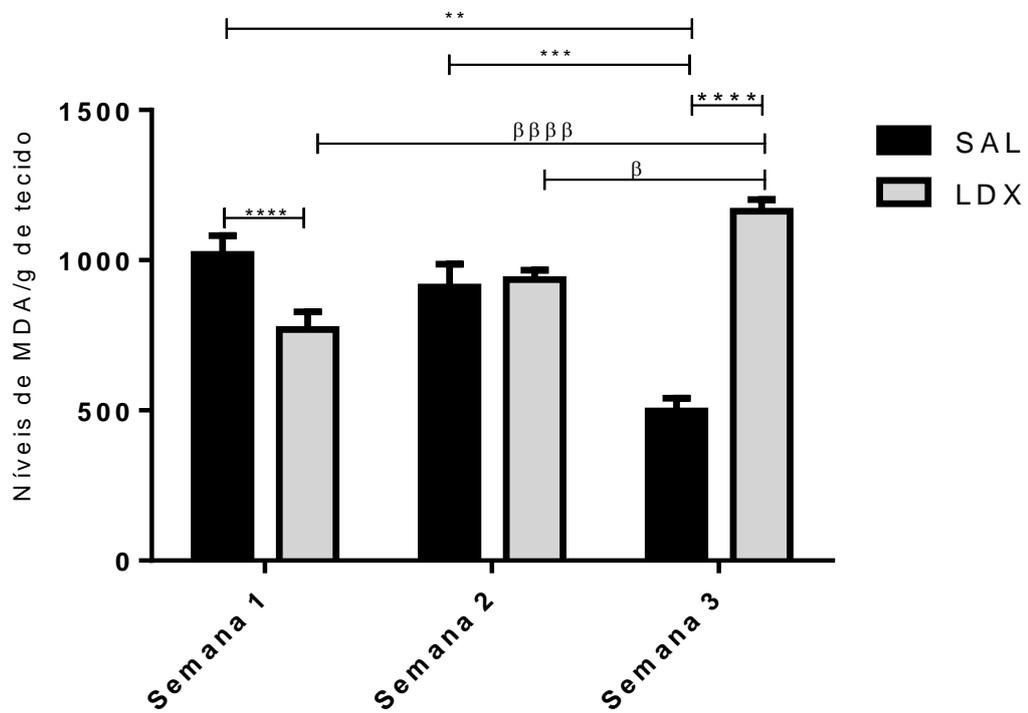
O fator “semanas de tratamento” revelou que ao longo das três semanas, os animais tratados com salina, apresentaram uma redução dos níveis de TBARS da primeira para a terceira semana ($P < 0,001$). O grupo LDX manteve-se constante entre a primeira e segunda semana de tratamento, porém os resultados apontaram um aumento da peroxidação lipídica quando comparadas a primeira ($P < 0,0001$) e a segunda ($P < 0,0001$) semana de tratamento com a terceira (Figura 26).

Figura 24: Níveis de peroxidação lipídica no córtex pré-frontal dos animais tratados com doses progressivas de lisdexanfetamina por 1, 2 ou 3 semanas.



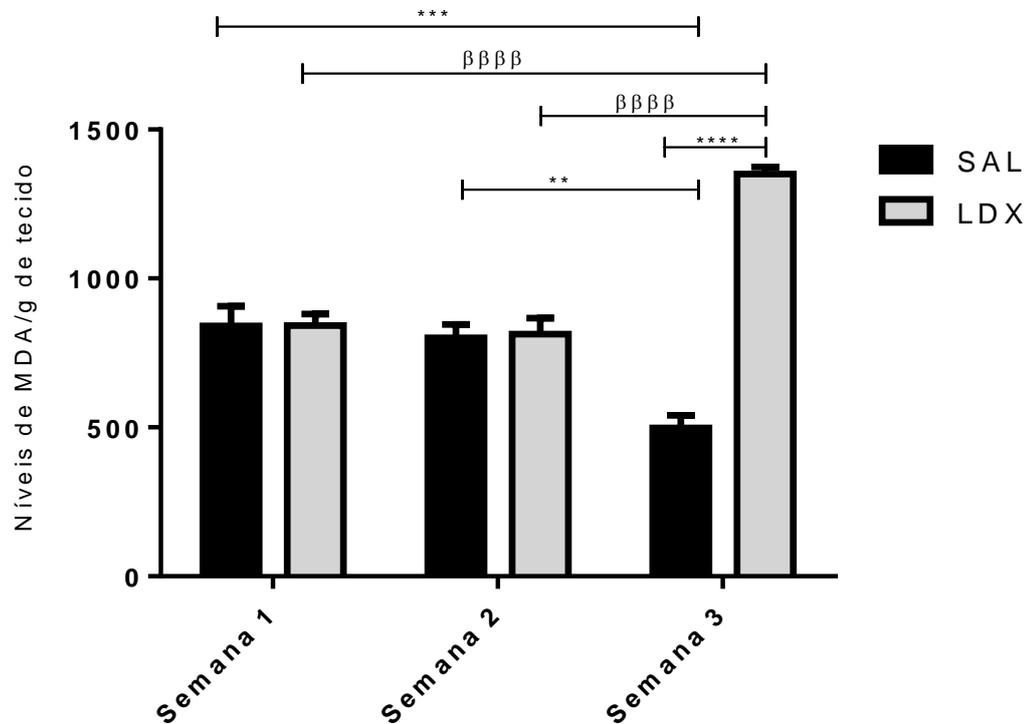
Animais tratados com Salina ou Lisdexanfetamina pelo período de 1 semana (LDX 10 mg/Kg), 2 semanas (LDX 13mg/Kg) e 3 semanas (LDX 18mg/Kg). Os animais foram eutanasiados e tiveram a região do córtex pré-frontal dissecada, para posterior análise bioquímica. As barras representam a média \pm E.P.M dos níveis de malonilaldeído no córtex pré-frontal. A análise dos resultados foi feita através de two-way ANOVA, post-hoc Bonferroni. Os símbolos representam a relação de comparação tendo como parâmetro base o grupo salina (*), LDX (β). Valores de significância *p, β p, < 0.05; **p, $\beta\beta$ p, < 0.01, ***p, $\beta\beta\beta$ p, $\beta\beta\beta\beta$ p < 0.001, ****p, $\beta\beta\beta\beta\beta$ p, < 0.0001). Abreviações: Lisdexanfetamina (LDX).

Figura 25: Níveis de peroxidação lipídica no hipocampo dos animais tratados com doses progressivas de lisdexanfetamina por 1, 2 ou 3 semanas.



Animais tratados com Salina ou Lisdexanfetamina período de 1 semana (LDX 10 mg/Kg), 2 semanas (LDX 13mg/Kg) e 3 semanas (LDX 18mg/Kg). Os animais foram eutanasiados e tiveram a região do hipocampo dissecada, para posterior análise bioquímica. As barras representam a média \pm E.P.M dos níveis de malonilaldeído no hipocampo. A análise dos resultados foi feita através de two-way ANOVA, post- hoc Bonferroni. Os símbolos representam a relação de comparação tendo como parâmetro base o grupo salina (*) ou LDX (β). Valores de significância *p, β p, < 0.05; **p, $\beta\beta$ p < 0.01, ***p, $\beta\beta\beta$ p < 0.001, ****p, $\beta\beta\beta\beta$ p < 0.0001). Abreviações: Lisdexanfetamina (LDX)

Figura 26: Níveis de TBARS no corpo estriado dos animais tratados com doses progressivas de lisdexanfetamina por 1, 2 ou 3 semanas.



Animais tratados com Salina ou Lisdexanfetamina pelo período de 1 semana (LDX 10 mg/Kg), 2 semanas (LDX 13mg/Kg) e 3 semanas (LDX 18mg/Kg). Os animais foram eutanasiados e tiveram a região do corpo estriado dissecada, para posterior análise bioquímica. As barras representam a média \pm E.P.M dos níveis de malonilaldeído no corpo estriado. A análise dos resultados foi feita através de two-way ANOVA, post- hoc Bonferroni. Os símbolos representam a relação de comparação tendo como parâmetro base o grupo salina (*), LDX (β). Valores de significância *p, β p < 0.05; **p, $\beta\beta$ p, <0.01, ***p, $\beta\beta\beta$ p, < 0.001, ****p, $\beta\beta\beta\beta$ p, < 0.0001). Abreviações: Lisdexanfetamina (LDX)

4.4 Determinação dos níveis cerebrais da citocina pró-inflamatória IL-1 β e da citocina anti-inflamatória IL-4

Para avaliar possíveis mecanismos inflamatórios desencadeados pelo tratamento com doses progressivas de LDX, foi realizada a avaliação dos níveis de duas citocinas na região do hipocampo dos animais tratados por duas e por três semanas.

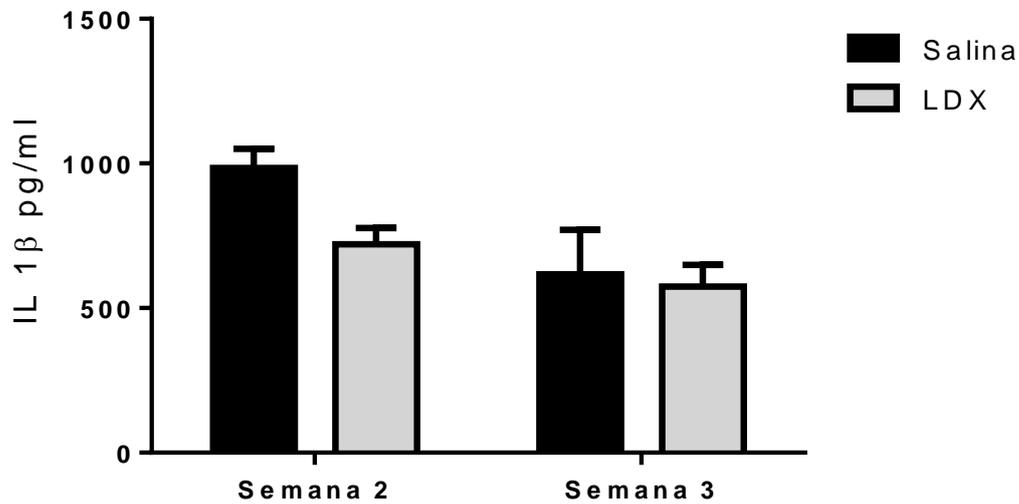
4.4.1 Interleucina 1 β (IL-1 β)

O teste ANOVA de duas vias revelou uma interação significativa entre os parâmetros “semanas de tratamento” [F (2, 36) = 11,48; P = 0,0001] e “grupos tratados” [F (1, 36) = 8,727; P = 0,0055] na análise dos níveis de IL-1 β no hipocampo dos animais dos grupos submetidos a duas e três semanas de tratamento.

De acordo com os resultados obtidos através do post hoc, pode-se observar que os animais tratados com LDX pelo período de duas semanas, apresentaram uma redução (26%) não significativa dos níveis de IL-1 β . De forma semelhante nos grupos tratados por três semanas, ocorreu uma redução (20%) dos níveis de IL-1 β avaliada nos grupos LDX, porém a mesma não foi significativa (Figura. 27)

A avaliação ao longo do tempo não apresentou resultados significativos quando comparados os resultados em períodos diferentes.

Figura 27: Níveis de IL1 β no hipocampo dos animais tratados com doses progressivas de lisdexanfetamina por 2 ou 3 semanas.



Animais tratados com Salina ou Lisdexanfetamina pelo período de 2 semanas (LDX 13mg/Kg) e 3 semanas (LDX 18mg/Kg). Os animais foram eutanasiados e tiveram a região do hipocampo dissecada, para posterior análise de citocinas. As barras representam a média \pm E.P.M dos níveis de interleucina 1 β no hipocampo. A análise dos resultados foi feita através de two-way ANOVA, post-hoc Bonferroni. Os símbolos representam a relação de comparação tendo como parâmetro base o grupo salina (*), LDX (β). Valores de significância, **** $p < 0.0001$). Abreviações: Lisdexanfetamina (LDX).

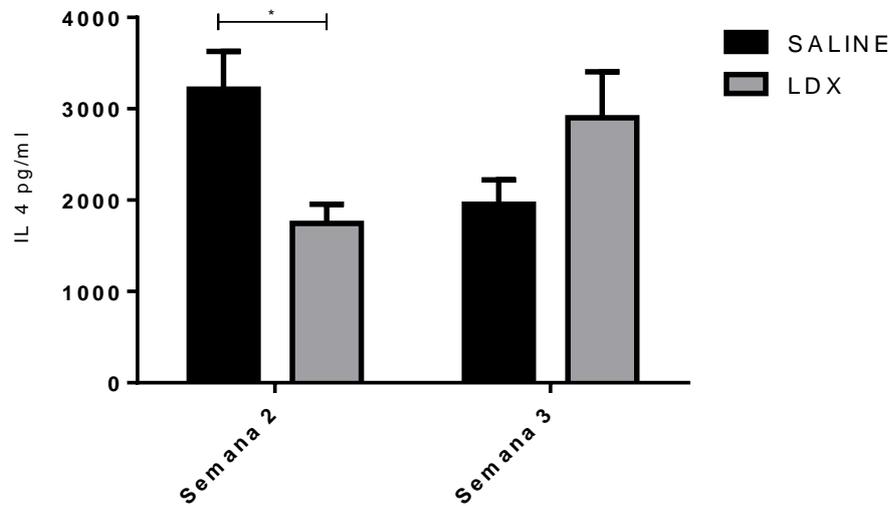
4.4.2 Interleucina 4 (IL-4)

Através do teste de duas vias da ANOVA, pode-se observar que ocorreu interação significativa entre os fatores “grupos tratados” e “semanas de tratamento” [$F(2, 34) = 7,766, P = 0,0017$] na avaliação da expressão de IL-4 no hipocampo dos animais submetidos ao tratamento por duas e três semanas.

Considerando-se os resultados encontrados no teste post hoc, pode-se observar que nos grupos dos animais que foram tratados por duas semanas houve uma redução significativa dos níveis de IL-4 tanto no grupo exposto a LDX ($P < 0,005$) quando comparados ao grupo salina (Figura 28).

Feita a análise do fator “semanas de tratamento”, pode-se observar que embora tenha ocorrido um aumento da expressão da interleucina ao longo do tempo para os animais que receberam LDX, a mesma não foi significativa.

Figura 28: Níveis de IL-4 no hipocampo dos animais tratados com doses progressivas de lisdexanfetamina por 2 ou 3 semanas.



Animais tratados com Salina ou Lisdexanfetamina pelo período de 1 semanas (LDX 10mg/Kg) e 3 semanas (LDX 18mg/Kg). Os animais foram eutanasiados e tiveram a região do hipocampo dissecada, para posterior análise de citocinas. As barras representam a média \pm E.P.M dos níveis de interleucina 4 no hipocampo. A análise dos resultados foi feita através de two-way ANOVA, post- hoc Bonferroni. Os símbolos representam a relação de comparação tendo como parâmetro base o grupo salina (*), LDX (β) Valores de significância, ****p < 0.0001). Abreviações: Lisdexanfetamina (LDX).

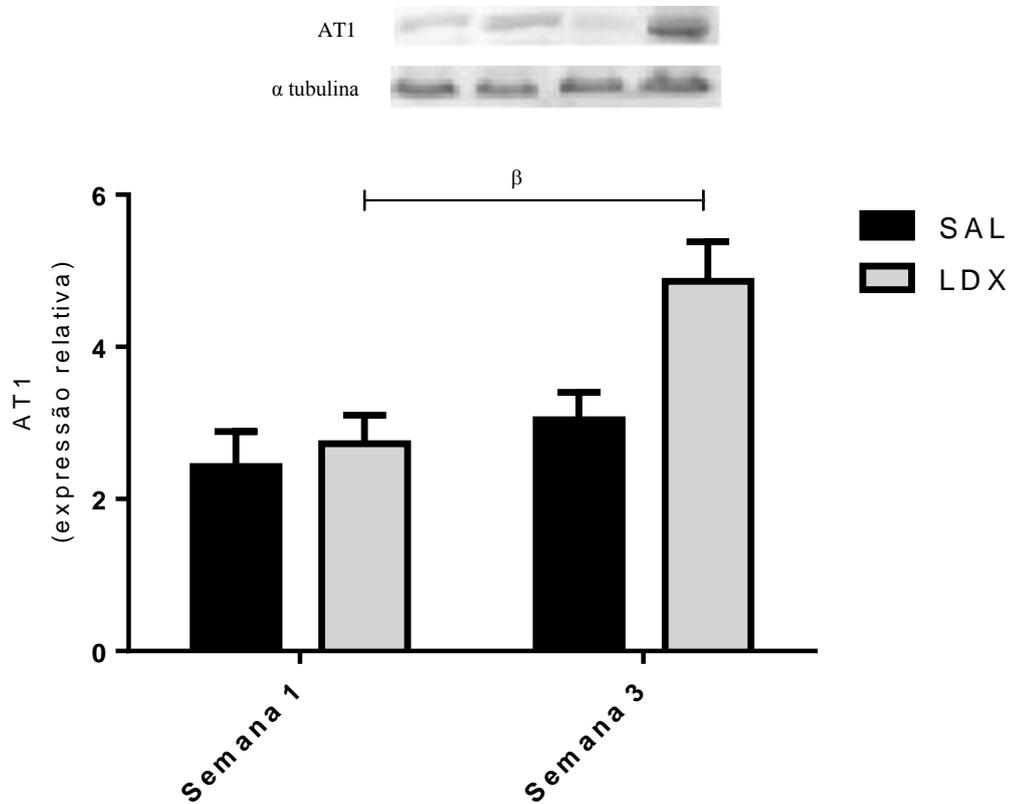
4.5 Avaliação da expressão do receptor AT1 no hipocampo

De acordo com a análise dos resultados obtidos através do teste ANOVA duas vias pode-se observar houve efeito significativo dos fatores “grupos tratados” [$F(1, 23) = 6,627, P = 0,0170$] e “semanas de tratamento” [$F(2, 23) = 7,661, P = 0,0028$], embora não tenha ocorrido uma interação significativa entre os dois fatores.

Analisando os resultados obtidos no post hoc conclui-se que ocorreu variação significativa entre os grupos tratados com LDX por uma e por três semanas ($P < 0,005$).

Considerando a análise entre os “grupos tratados”, pode-se observar, um discreto aumento da expressão de receptores AT1 nos grupos tratados com LDX na primeira semana de tratamento e ainda um aumento considerável, embora não significativo deste receptor do grupo LDX quando comparado ao salina do mesmo período (Figura 29).

Figura 29: Expressão do receptor AT1 no hipocampo dos animais tratados com doses progressivas de lisdexanfetamina por 1 e 3 semanas.



Animais tratados com Salina ou Lisdexanfetamina pelo período de 1 semanas (LDX 10mg/Kg) e 3 semanas (LDX 18mg/Kg). Os animais foram eutanasiados e tiveram a região do hipocampo dissecada, para posterior análise de receptor. As barras representam a média \pm E.P.M dos níveis de atividade no hipocampo. A análise dos resultados foi feita através de two-way ANOVA, post-hoc Bonferroni. Os símbolos representam a relação de comparação tendo como parâmetro base o grupo salina (*), LDX (β). Valores de significância, *** $p < 0.0001$). Abreviações: Lisdexanfetamina (LDX)

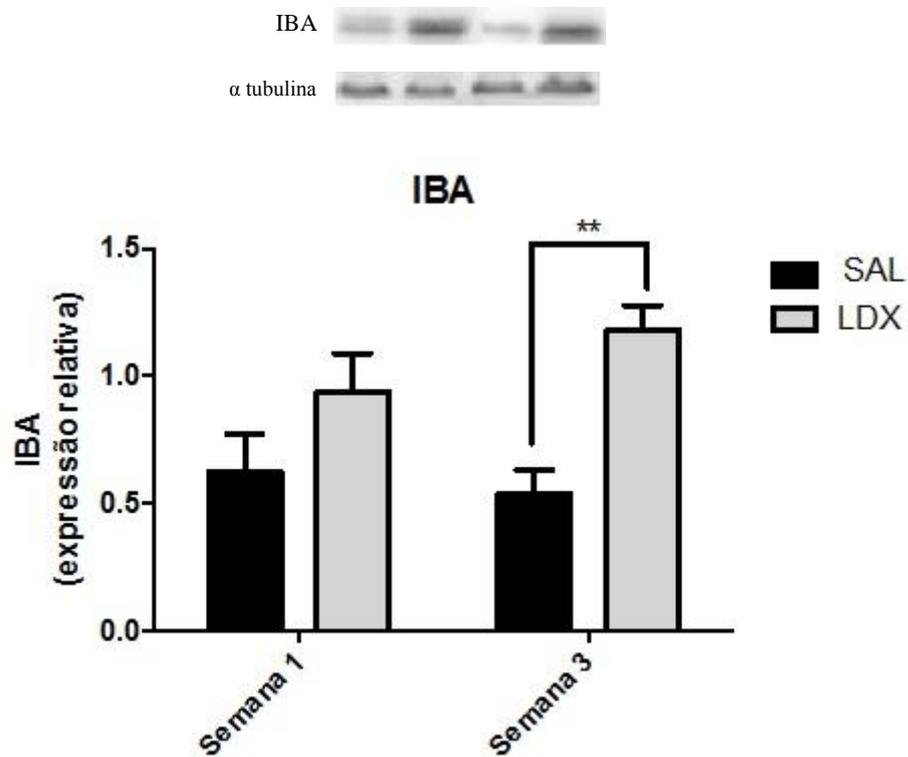
4.5.1 Avaliação da expressão hipocampal de IBA, marcador microglial

A análise por ANOVA de duas vias nos permitiu concluir que embora não tenha ocorrido interação significativa entre os fatores avaliados, ocorreu um efeito significativo do fator “semanas de tratamento” [F (1, 13) = 13,04, P = 0,0032].

Através do post hoc pode-se observar que na primeira semana de tratamento, não houve alteração na expressão de IBA1. Na terceira semana de tratamento, entretanto, pode-se observar que ocorreu um aumento significativo ($p < 0,001$) da expressão de IBA1 no grupo LDX quando comparado ao grupo salina do mesmo período (Figura 30).

Não houve uma variação significativa entre as drogas administradas ao longo do tempo.

Figura 30: Expressão de IBA, marcador microglial, no hipocampo de animais tratados com doses progressivas de lisdexanfetamina por 1 e 3 semanas.



Animais tratados com Salina ou Lisdexanfetamina pelo período de 1 semanas (LDX 13mg/Kg) e 3 semanas (LDX 18mg/Kg). Os animais foram eutanasiados e tiveram a região do hipocampo dissecada, para posterior análise da atividade microglial. As barras representam a média \pm E.P.M dos níveis de atividade no hipocampo. A análise dos resultados foi feita através de two-way ANOVA, post- hoc Bonferroni. Abreviações: Lisdexanfetamina (LDX)

Tabela 5: Síntese dos resultados comportamentais e neuroquímicos dos animais submetidos ao tratamento com LDX quando comparados aos tratados com salina

Parâmetros Avaliados	LDX (semanas de tratamento)		
	1 semana	2 semanas	3 semanas
Cruzamentos	Aumentado (NS)	Aumentado ($p < 0,001$)	Aumentado (NS)
<i>Rearing</i>	Aumentado ($p < 0,001$)	Sem alteração	Aumentado (NS)
Tempo no centro	Aumentado (NS)	Aumentado (NS)	Aumentado ($p < 0,001$)
<i>Grooming</i>	Diminuído (NS)	Aumentado (NS)	Diminuído (NS)
Memória de Trabalho	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração
NOR	Diminuído (NS)	Diminuído ($p < 0,01$)	Diminuído (NS)
GSH (PFC)	Aumentado (NS)	Sem alteração	Aumentado ($p < 0,001$)
GSH (HC)	Sem alteração	Aumentado ($p < 0,001$)	Diminuído ($p < 0,0001$)
GSH (CE)	Sem alteração	Aumentado ($p < 0,001$)	Diminuído ($p < 0,0001$)
TBARS (PFC)	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração
TBARS (HC)	Diminuído (NS)	Sem alteração	Aumentado ($p < 0,001$)
TBARS (CE)	Sem alteração	Sem alteração	Aumentado ($p < 0,001$)

4.6 Correlações de Pearson: comportamentos x variáveis neuroquímicas

Traçando uma correlação de Pearson entre os testes comportamentais e as variáveis neuroquímicas, pôde-se verificar que as mesmas foram significativamente progressivas nas semanas 1, 2 e 3 de administração de LDX.

Na primeira semana de tratamento houve uma significativa correlação positiva entre os níveis de GSH do CPF e a preferência pelo centro do aparato ($P=0,6$; $p=0,005$) pelos animais, entre os níveis de TBARS do CE e o teste de NOR ($P=0,6$; $p=0,05$) e ainda entre a expressão dos receptores AT1 e *rearings* ($P=0,7$; $p=0,05$) (Tabela 6- semana 1).

Na segunda semana de tratamento pode-se observar correlação significativa negativa dos níveis de GSH do HC com a preferência do animal pelo centro do aparato ($P=-0,58$; $p=0,029$). Além desta interação, pode-se observar ainda correlações inversas entre os níveis de GSH do HC ($P=-0,58$; $p=0,029$) e do CE ($P=-0,584$; $p=0,028$) e direta dos níveis de TBARS do CPF ($P=0,635$; $p=0,048$) e IL-1 β ($P=0,6$; $p=0,05$) com o NOR (Tabela 6- semana2).

Na terceira semana de tratamento houve correlação significativa direta entre o número de cruzamentos com os níveis de GSH no CPF ($P=0,678$; $p=0,005$), de TBARS do HC ($P=0,6623$; $p=0,014$), do CE ($P=0,655$; $p=0,015$) e ainda de IL-4 ($P=0,6603$; $p=0,038$).

Quando a correlação foi realizada com referência no número de *rearing*, obteve-se uma relação significativa inversa com os níveis de GSH do HC ($P=-0,586$; $p=0,017$) e direta com os níveis de TBARS do HC ($P=0,555$; $p=0,039$), do CE ($P=0,557$; $p=0,039$) e IL-4 ($P=0,6375$; $p=0,034$). Ainda relacionado a terceira semana de tratamento e tendo como base o parâmetro preferência do animal pelo centro do aparato, pode-se notar que houve uma correlação significativa direta entre o mesmo com o GSH do CPF ($P=0,599$; $p=0,014$) e com o TBARS do CE ($P=0,548$; $p=0,04$) e inversa com o GSH do HC ($P=-0,664$; $p=0,005$) e do CE ($P=-0,558$; $p=0,025$) e ainda com o IBA-1 ($P=-0,80$; $p=0,03$). Com relação ao comportamento de *grooming*, houve apenas uma correlação inversa com os níveis de TBARS do HC ($P=-0,542$; $p=0,05$).

Por fim, o teste do NOR mostrou uma correlação positiva com os níveis de GSH com CE ($P=0,603$; $p=0,0291$) e negativa com os níveis de TBARS do CE ($P=-0,6$; $p=0,05$) e com a expressão de AT1 ($P=-0,798$; $p=0,05$) (Tabela 6- semana 3).

Diante de todos os resultados expressos neste trabalho e ainda de posse das correlações acima citadas, pode-se sugerir que há um efeito neurotóxico progressivo com uso repetido e em altas doses de LDX, uma vez que o número de correlações foi crescente nos grupos de 1, 2 e 3 semanas de tratamento. Assim, o presente trabalho chama a atenção para possíveis efeitos deletérios decorrentes do uso deste medicamento em altas doses em um cérebro saudável.

Tabela 6: Tabela síntese das correlações entre parâmetros comportamentais e neuroquímicos nas semanas 1, 2 e 3 de tratamento.

SEMANA 1					
	Cruzamentos	Rearings	Centro do campo	Grooming	NOR
GSH - CPF	Correlação Pearson: 0,384 Sig.: 0,308	Correlação Pearson: 0,242 Sig.: 0,5	Correlação Pearson: 0,6 Sig.: 0,05	Correlação Pearson: 0,40 Sig.: 0,195	Correlação Pearson: 0,13 Sig.: 0,719
GSH - HC	Correlação Pearson: - 0,295 Sig.: 0,379	Correlação Pearson: -0,525 Sig.: 0,079	Correlação Pearson: -0,084 Sig.: 0,78	Correlação Pearson: -0,44 Sig.: 0,167	Correlação Pearson: 0,048 Sig.: 0,888
GSH - CE	Correlação Pearson: - 0,318 Sig.: 0,314	Correlação Pearson: -0,086 Sig.: 0,771	Correlação Pearson: -0,055 Sig.: 0,844	Correlação Pearson: 0,19 Sig.: 0,53	Correlação Pearson: 0,312 Sig.: 0,299
TBARS - CPF	Correlação Pearson: -0,15 Sig.: 0,961	Correlação Pearson: -0,264 Sig.: 0,362	Correlação Pearson: -0,069 Sig.: 0,805	Correlação Pearson: 0,37 Sig.: 0,182	Correlação Pearson: 0,337 Sig.: 0,259
TBARS - HC	Correlação Pearson: -0,476 Sig.: 0,164	Correlação Pearson: -0,31 Sig.: 0,31	Correlação Pearson: 0,127 Sig.: 0,679	Correlação Pearson: 0,40 Sig.: 0,22	Correlação Pearson: 0,465 Sig.: 0,149
TBARS - CE	Correlação Pearson: 0,209 Sig.: 0,563	Correlação Pearson: 0,05 Sig.: 0,88	Correlação Pearson: 0,146 Sig.: 0,649	Correlação Pearson: -0,32 Sig.: 0,283	Correlação Pearson: 0,6 Sig.: 0,05
AT1	Correlação Pearson: -0,18 Sig.: 0,973	Correlação Pearson: 0,7 Sig.: 0,05	Correlação Pearson: 0,292 Sig.: 0,482	Correlação Pearson: 0,11 Sig.: 0,78	Correlação Pearson: -0,679 Sig.: 0,093
IBA	Correlação Pearson: -0,60 Sig.: 0,898	Correlação Pearson: 0,18 Sig.: 0,638	Correlação Pearson: -0,363 Sig.: 0,337	Correlação Pearson: -0,43 Sig.: 0,28	Correlação Pearson: -0,231 Sig.: 0,581

SEMANA 2					
	Cruzamentos	Rearings	Centro do campo	<i>Grooming</i>	NOR
GSH - CPF	Correlação Pearson: 0,156 Sig.: 0,66	Correlação Pearson: 0,114 Sig.: 0,723	Correlação Pearson: 0,30 Sig.: 0,318	Correlação Pearson: 0,42 Sig.: 0,199	Correlação Pearson: -0,218 Sig.: 0,519
GSH – HC	Correlação Pearson: 0,50 Sig.: 0,081	Correlação Pearson: -0,197 Sig.: 0,539	Correlação Pearson: 0,582 Sig.: 0,018	Correlação Pearson: -0,188 Sig.: 0,58	Correlação Pearson: -0,58 Sig.: 0,029
GSH – CE	Correlação Pearson: 0,51 Sig.: 0,071	Correlação Pearson: 0,223 Sig.: 0,486	Correlação Pearson: 0,463 Sig.: 0,071	Correlação Pearson: -0,007 Sig.: 0,98	Correlação Pearson: -0,584 Sig.: 0,028
TBARS – CPF	Correlação Pearson: -0,23 Sig.: 0,55	Correlação Pearson: 0,115 Sig.: 0,707	Correlação Pearson: -0,44 Sig.: 0,153	Correlação Pearson: 0,100 Sig.: 0,769	Correlação Pearson: 0,635 Sig.: 0,048
TBARS – HC	Correlação Pearson: -0,261 Sig.: 0,53	Correlação Pearson: -0,121 Sig.: 0,737	Correlação Pearson: -0,066 Sig.: 0,86	Correlação Pearson: -0,237 Sig.: 0,482	Correlação Pearson: -0,319 Sig.: 0,403
TBARS – CE	Correlação Pearson: 0,276 Sig.: 0,471	Correlação Pearson: -0,18 Sig.: 0,542	Correlação Pearson: -0,008 Sig.: 0,979	Correlação Pearson: -0,429 Sig.: 0,188	Correlação Pearson: 0,088 Sig.: 0,81
IL-4	Correlação Pearson: -0,223 Sig.: 0,485	Correlação Pearson: 0,401 Sig.: 0,221	Correlação Pearson: -0,482 Sig.: 0,069	Correlação Pearson: 0,342 Sig.: 0,333	Correlação Pearson: 0,526 Sig.: 0,065
IL-1beta	Correlação Pearson: -0,074 Sig.: 0,818	Correlação Pearson: 0,389 Sig.: 0,236	Correlação Pearson: -0,375 Sig.: 0,168	Correlação Pearson: 0,271 Sig.: 0,448	Correlação Pearson: 0,6 Sig.: 0,05

SEMANA 3					
	Cruzamentos	Rearings	Centro do campo	Grooming	NOR
GSH - CPF	Correlação Pearson: 0,678 Sig.: 0,005	Correlação Pearson: 0,347 Sig.: 0,188	Correlação Pearson: 0,599 Sig.: 0,014	Correlação Pearson: -0,164 Sig.: 0,57	Correlação Pearson: -0,474 Sig.: 0,101
GSH – HC	Correlação Pearson: -0,391 Sig.: 0,149276	Correlação Pearson: -0,586 Sig.: 0,017	Correlação Pearson: -0,664 Sig.: 0,005	Correlação Pearson: 0,30 Sig.: 0,29	Correlação Pearson: 0,367 Sig.: 0,217
GSH – CE	Correlação Pearson: -0,524 Sig.: 0,044	Correlação Pearson: -0,35 Sig.: 0,183	Correlação Pearson: -0,558 Sig.: 0,025	Correlação Pearson: 0,408 Sig.: 0,147	Correlação Pearson: 0,603 Sig.: 0,0291
TBARS – CPF	Correlação Pearson: -0,311 Sig.: 0,258	Correlação Pearson: -0,337 Sig.: 0,201	Correlação Pearson: -0,536 Sig.: 0,032	Correlação Pearson: 0,089 Sig.: 0,764	Correlação Pearson: 0,491 Sig.: 0,08
TBARS – HC	Correlação Pearson: 0,6623 Sig.: 0,014	Correlação Pearson: 0,555 Sig.: 0,039	Correlação Pearson: 0,463 Sig.: 0,095	Correlação Pearson: -0,542 Sig.: 0,05	Correlação Pearson: -0,447 Sig.: 0,144
TBARS – CE	Correlação Pearson: 0,655 Sig.: 0,015	Correlação Pearson: 0,557 Sig.: 0,039	Correlação Pearson: 0,548 Sig.: 0,04	Correlação Pearson: -0,470 Sig.: 0,123	Correlação Pearson: -0,6 Sig.: 0,05
IL-4	Correlação Pearson: 0,6603 Sig.: 0,038	Correlação Pearson: 0,6375 Sig.: 0,034	Correlação Pearson: 0,2159 Sig.: 0,524	Correlação Pearson: -0,48 Sig.: 0,152	Correlação Pearson: -0,428 Sig.: 0,217
IL-1beta	Correlação Pearson: -0,268 Sig.: 0,425	Correlação Pearson: 0,274 Sig.: 0,389	Correlação Pearson: 0,173 Sig.: 0,59	Correlação Pearson: 0,097 Sig.: 0,79	Correlação Pearson: 0,243 Sig.: 0,498
IBA-1	Correlação Pearson: 0,495 Sig.: 0,318	Correlação Pearson: 0,056 Sig.: 0,904	Correlação Pearson: - 0,80 Sig.: 0,03	Correlação Pearson: -0,49 Sig.: 0,26	Correlação Pearson: -0,125 Sig.: 0,841
AT-1	Correlação Pearson: 0,562 Sig.: 0,146	Correlação Pearson: -0,114 Sig.: 0,76	Correlação Pearson: - 0,07 Sig.: 0,84	Correlação Pearson: -0,36 Sig.: 0,34	Correlação Pearson: -0,798 Sig.: 0,05

Tabelas com os resultados da relação de Pearson entre os parâmetros avaliados neste trabalho. As correlações significativas, apresentam-se em destaque.

5 DISCUSSÃO

Os resultados deste trabalho mostram que a administração repetida de LDX causa alterações comportamentais observadas no campo aberto, como aumento do comportamento exploratório dos animais, na semana 1 de tratamento, aumento da atividade locomotora na semana 2 e aumento da exploração do quadrante central na semana 3, sem afetar a memória de trabalho no teste de Y maze, mas causando comprometimento da memória declarativa, avaliada pelo NOR, na semana 2. No tocante às alterações oxidativas, podemos observar que as áreas cerebrais hipocampo e corpo estriado apresentaram alterações pró-oxidativas pelo tratamento com LDX, enquanto que essa anfetamina causou efeito antioxidante no córtex pré-frontal dos animais. Face ao dano oxidativo mais pronunciado no hipocampo, decidimos por avaliar possíveis mecanismos inflamatórios desencadeados pelo uso da LDX nesta área cerebral. Não observamos alterações importantes na citocina IL-1beta, mas detectamos uma redução na IL-4 que ocorreu na terceira semana de tratamento. Evidenciamos uma maior expressão de receptores AT1 e IBA1, um marcador de ativação microglial. Vale destacar que as alterações neuroquímicas foram prioritariamente observadas nos animais tratados por 3 semanas, portanto com dose mais alta de LDX. Desta forma, nossos resultados mostram que a dose de LDX é um fator determinante para a manifestação de alterações comportamentais e dano oxidativo, bem como para o surgimento de mecanismos neuroinflamatórios no cérebro dos animais.

Dentre os testes que envolvem comportamento animal, o campo aberto é amplamente utilizado por pesquisadores que investigam transtornos psiquiátricos. O instinto do animal quando exposto a um ambiente diferente é manter-se cauteloso diante do local ainda não explorado. Observando este comportamento, Hall, 1941 desenvolveu o teste do campo aberto. Desde então o teste vem sendo utilizado com o intuito de avaliar a atividade locomotora e exploratória dos animais relacionando-as com patologias como TDAH, mania, depressão, dentre demais transtornos e com a investigação de uso de ansiolíticos (COSTALL; NAYLOR, 1974).

No teste do campo aberto também pode ser analisada a atividade de *rearing* (atividade vertical) e *grooming* (movimento de auto-limpeza) do animal (WALSH; CUMMINS, 1976). Um comportamento exploratório está relacionado ao aumento de execuções do movimento de *rearing* (LIMA, 2016), já a agressividade está

relacionada tanto aos movimentos de *rearing* como os de *grooming* (SLUYTER et al., 1996), sendo assim estes parâmetros estão relacionados a emoção (SADILE, 1996).

Os resultados deste estudo mostram que os animais tratados com LDX por uma semana apresentaram um aumento significativo do movimento de *rearing* quando comparados ao do grupo salina. De forma curiosa nas segunda e terceira semanas de tratamento este comportamento manteve-se sem diferenças significativas quando comparados aos grupos salina.

Somado a este resultado tem-se que os animais que receberam LDX por duas semanas apresentaram uma atividade global aumentada e os que receberam por três semanas apresentaram preferência pelo centro do aparato.

Estes dados chamam atenção para os achados pré-clínicos que revelam que animais submetidos aos modelos animal de mania (DE SOUZA, 2018), TDAH (TOSTA, 2015) e esquizofrenia (NEILL et al., 2010), apresentam aumento da execução do movimento de *rearing*. De maneira translacional, os achados deste estudo sugere uma relação com o fenótipo encontrado em indivíduos que manifestam TDAH do tipo hiperativo impulsivo (VITÓRIA; SIQUEIRA; SUGITA, 2018).

Assim como ocorre nos comportamentos citados anteriormente, o aumento de *grooming* também está relacionado a modelo animal de esquizofrenia (CORRÊA, 2009; NEILL et al., 2010). Assim estas informações agregadas aos achados neste estudo sugerem, um efeito ansiolítico ou comportamento dos animais submetidos ao tratamento com LDX.

Além de avaliar o deslocamento animal, número de *groomings* e *rearing*, o teste do campo, pode avaliar o grau de ansiedade do animal. Neste contexto, quando o animal se posiciona na periferia do aparato e longe da zona central, sugere-se que o mesmo apresente um comportamento ansioso (CRAWLEY; PAYLOR, 1997; CRUZ; LANDEIRA-FERNANDEZ, 2012). Enquanto animais depressivos e com padrão genético baixo exploratório apresentam uma hipolocomoção diante do ambiente novo, animais ansiosos, maníacos ou ainda animais com padrão genético alto exploratório mostram-se dispostos a explorar ao máximo o aparato do campo aberto (EGER; FERREIRA; BATISTA, 2010; LIMA, 2016)

Os resultados obtidos sugerem que animais expostos somente ao uso repetido de LDX apresentam um perfil ansiolítico, ou que também pode ser interpretado como comportamento de risco.

Pode-se observar também que esse interesse pela área central do campo aumentou com o decorrer do tempo de administração da droga, sendo maior na última semana de tratamento. Estes dados nos permitem sugerir um comportamento mais destemido por parte do animal tratado com LDX e sugerem ainda que essa alteração do comportamento do animal torna-se maior a medida que o tratamento é realizado em doses mais altas. Desta maneira, podemos sugerir que a administração de LDX em animais saudáveis pode estar relacionada a um aumento da impulsividade e ainda que o tratamento prolongado com este fármaco potencializa este comportamento, em animais sham.

A relação entre fármacos psicoativos e memória é abordada de forma contraditória na literatura. Enquanto alguns autores defendem o uso destas medicações como “estimulantes da inteligência” com aumento considerável da memória, outros relatam não existir ganho cognitivo algum decorrente do uso desses compostos (MAGALHÃES, 2014; OLIVEIRA ET AL, 2017).

Uma pesquisa clínica com 36 jovens universitários saudáveis que utilizaram placebo ou metilfenidato de forma aguda e posteriormente realizaram testes cognitivos de atenção e memórias operacional e episódica, não apresentaram alterações de déficit. (BATISTELA et al., 2016).

Estes dados corroboram com aqueles encontrados no presente trabalho, uma vez que nossos resultados nos permitem concluir que a administração de LDX não alterou a memória e exploração de novos espaços. Por outro lado, houve uma diminuição, significativa na segunda semana de tratamento com LDX, do interesse do animal em explorar o novo objeto apresentado no NOR, pelos animais que receberam apenas LDX, sugerindo assim um prejuízo relacionado a memória de curto prazo.

A memória é basicamente formada no HC, nesta estrutura ocorre a captação e seleção de novas informações (IZQUIERDO, 1988). Contudo, estudos mostram que em casos de lesão hipocampal não ocorre perda de memórias já adquiridas, mas um bloqueio da formação de novas memórias. Tal fato evidencia que embora seja no hipocampo que o processo de memorização seja iniciado não é nesta região que a mesma é armazenada. Embora não armazene a memória, o HC através das

suas redes de conexão com o CPF, participa da consolidação da mesma. É no córtex que a memória é armazenada (IZQUIERDO, 2007).

O CPF estabelece ainda redes de conexão excitatórias e inibitórias com o corpo estriado. A harmonia de ações entre estas vias esta relacionada a manifestação de comportamentos automáticos. Vale ressaltar ainda, que o CE tem uma ligação com o sistema límbico que é responsável pela regulação do comportamento emocional e que assim, esta fortemente associado a transtornos psiquiátricos (MACHADO, 2014).

Diante disto e dos resultados comportamentais encontrados no presente estudo, julgamos que uma investigação neuroquímica das regiões do CPF, HC e CE que estão envolvidas no processo de formação da memória , locomoção e comportamento emocional deveria ser realizada.

Mecanismos oxidativos têm ganhado destaque na literatura como subjacentes ao surgimento de transtornos mentais, bem como relacionados a neuroprogressão destes. Tal desequilíbrio resulta em desgaste e dano celular, bem como também a literatura mostra-se cada vez mais fundamentada na relação de transtornos como esquizofrenia, TDAH e mania à processos inflamatórios (CHAVES; ZUARDI; HALLAK, ; DOS SANTOS et al., 2014; GOMES, 2014).

Diversos estudos mostram que a diminuição dos níveis de GSH, aumento dos níveis de peroxidação lipídica e dos níveis de nitrito em áreas cerebrais como CPF, HC e CE são frequentes em modelos de esquizofrenia, seja induzido por cetamina (BORELLA, 2013; DE ARAÚJO et al., 2011), por modelo neurodesenvolvimental através da administração de poly I:C (RIBEIRO et al., 2013)

O desequilíbrio dos mecanismos oxidativos, também está relacionado a doenças como TAB. Estudos pré-clínicos mostram que animais submetidos ao modelo de mania por administração de anfetamina (GOMES, 2014) ou ainda por administração de LDX, apresentam aumento dos níveis de peroxidação lipídica, além de promover o aumento da expressão da enzima superóxido dismutase (QUEIROZ, 2014).

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que a administração de LDX quando realizada a longo prazo em animais controle causa um desequilíbrio oxidativo. As evidências desta afirmativa estão baseadas em alguns pontos: o primeiro ponto é relativo a diminuição dos níveis de GSH na terceira semana de tratamento dos animais nas áreas do hipocampo e corpo estriado. O segundo ponto

refere-se ao significativo aumento dos níveis de peroxidação lipídica no mesmo período e intervalo temporal nos quais ocorreram alteração de GSH. Interessantemente, foi visto algo contrário no CPF.

Corroborando com estes achados, estudo realizado por Queiroz (2012), constatou que a administração de LDX por sete dias em ratos machos adultos controle provocou uma diminuição dos níveis de GSH, além do aumento dos níveis de peroxidação lipídica.

Ademais destes resultados, a relação direta entre aumento dos níveis do neurotransmissor dopamina e dos parâmetros oxidativos nos remete a provável dano no tecido cerebral decorrente da administração de LDX em doses mais altas, uma vez que a sua farmacodinâmica está relacionada a aumento dos níveis deste neurotransmissor. Vale destacar que o metabolismo da dopamina leva a síntese de radicais livres, principalmente em áreas cerebrais ricas em ferro, como é o caso do corpo estriado (JINSMAA et al., 2009; QUEIROZ et al., 2015).

Além do EO, tem se especulado na literatura a relação entre transtornos psiquiátricos/ danos cerebrais e processos inflamatórios. Para evidenciar esta possível correspondência, optamos por fazer a quantificação de citocinas, uma delas pró- e outra anti-inflamatória.

Comprovadamente, existe uma importante relação entre sistema imunológico e doenças psiquiátricas (DOWLATI et al., 2010). Citocinas pró-inflamatórias como TNF- α estão aumentadas em doenças como TAB

Os resultados obtidos no presente estudo nos permitem sugerir que a administração de LDX a médio prazo pode estar relacionada a um aumento da susceptibilidade a processo inflamatório, pela diminuição de IL-4 hipocampal. Além disto, de forma curiosa, ocorreu um aumento desta mesma citocina na administração a longo prazo da LDX, o que nos sugere que a exposição a este fármaco por um período mais prolongado, pode levar a um mecanismo compensatório.

Tais dados despertam a atenção para os efeitos deste fármaco em animais controle, que na nossa situação experimental representam humanos saudáveis, uma vez que estudos clínicos supõem que em estágios crônicos do TAB (KAUER-SANT'ANNA et al., 2009) e da esquizofrenia (KUNZ et al., 2011) ocorre um aumento de citocinas anti-inflamatórias, o que supostamente é efeito decorrente de mecanismos compensatórios desencadeados pelo estadiamento das respectivas patologias.

Observando-se de forma complementar os gráficos da expressão de receptores AT1 e IBA (marcação da atividade microglial) dos animais que receberam LDX por três semanas, pode-se concluir que ambos parâmetros estão aumentados no grupo tratado o que sugere um aumento da atividade inflamatória.

A sensibilização do receptor AT1 desencadeia respostas inflamatórias, além de participar na geração de EROS (BAYNES, 2015). Desta maneira o aumento da atividade destes receptores chama a atenção para possíveis efeitos deletérios. Assim, seu possível envolvimento com a fisiopatologia de transtornos mentais vem ganhando força e tal fato tem mobilizado pesquisas que envolvem a utilização dos bloqueador de receptor de angiotensina (BRAs) como potencial tratamento para transtornos psiquiátricos (DE GÓIS QUEIROZ et al., 2013; GOMES, 2014).

Bath (2016) mostrou em estudo feito em vivo e em vitro que a inibição dos receptores AT1 é capaz de inibir a ativação do fator de transcrição ativado por tirosina quinase (STAT3) e a liberação de TNF- α , além de reduzir a atividade microglial e astrogial, decorrentes da neuroinflamação induzida pelo uso de lipopolissacarídeo (LPS).

Em estudo pré-clínico, no qual foi utilizado o modelo animal de mania induzido por anfetamina, Gomes 2014, evidenciou que a candesartana que é um BRAs, foi capaz de reduzir os efeitos deletérios da AMPH, além de produzir importantes efeitos cognitivos positivos neste modelo animal e de promover uma redução da neurotoxicidade causada pela administração deste estimulante.

A relação do processo inflamatório decorrente da sensibilização do receptor AT1, também foi evidenciada em um estudo que induz o estado epiléptico em modelo animal por pilocarpina. Na referida pesquisa, o autor concluiu que houve neuroinflamação decorrente do aumentado a atividade microglial e de receptores AT1. O trabalho evidenciou ainda, uma atenuação destes mediadores inflamatórios e redução de perda neuronal com a administração de losartan, a qual foi capaz de melhorar o prejuízo cognitivo, dos ratos, decorrentes deste modelo animal (SUN et al., 2015)

Essa crescente de estudos que envolvem o possível uso de fármacos BRAs é decorrente da associação de fisiopatologias de transtornos neuropsiquiátricos à processos oxidativos, inflamatório com aumento da expressão de micróglia resultados da sensibilização de receptores AT1.

Relacionada ao mecanismo de modulação das citocinas inflamatória, a micróglia tem sido amplamente estudada devido a sua relação com a fisiopatologia do processo inflamatório e assim, estar possivelmente atrelada à fisiopatologia de transtornos mentais.

Os resultados do presente estudo revelam que, embora não significativo, houve um aumento da expressão da proteína marcadora de micróglia no hipocampo dos animais que receberam LDX por um longo período. Desta maneira, esta elevação da atividade microglial, embora não expressiva, nos sugere uma relação da administração de LDX com uma possível atividade inflamatória.

Em estudo que investigou a atividade das micróglia na região cerebral da substância negra de ratos submetidos a um tratamento com metilfenidato, Sadavisan e colaboradores (2012), mostraram que a atividade microglial desta região encontra-se aumentada com o uso deste fármaco. Esta região do cérebro esta intimamente relacionada a degeneração de neurônios pigmentados que ocorre na doença de Parkinson, além de ser uma região associada a estímulos de dependência e recompensa. Tais dados sugerem que embora a literatura aborde que os efeitos da LDX sejam mais brandos que o do metilfenidato e outras anfetaminas (OLIVEIRA ET AL, 2017), o uso da LDX por indivíduos saudáveis também pode estar relacionado a danos cerebrais decorrentes do desencadeamento de processos inflamatórios que por sua vez estão amplamente associados à diversas fisiopatologias de transtornos mentais.

Além destas evidências, é inevitável relacionar o uso indiscriminado da LDX à possíveis alterações metabólicas decorrentes de alterações do sono, uma vez que um dos principais objetivos do uso indiscriminado de LDX é a manutenção do estado de vigília. O sono tem relação direta com o ciclo circadiano e este com o perfeito funcionamento hormonal e imunológico (MCCLUNG, 2007).

A privação do sono é utilizada de forma frequente como um fator estressor para indução de modelo animal de mania (DE SOUZA, 2018) e de esquizofrenia. Estudos mostram que fatores estressores, dentre eles a privação a privação do sono, são capazes de ativar a micróglia de forma crônica, com consequente aumento do nível de citocinas (STACI D. BILBO, 2013). Além disto, acredita-se que a exposição na infância ou adolescência à eventos que desencadeiem processos inflamatórios, pode trazer mais vulnerabilidade ao sistema imune na vida adulta e

e elevar níveis de biomarcadores inflamatórios neste período da vida (JEE et al., 2018).

Este prejuízo de forma potencializada na fase adolescente pode ser decorrente à ao fato da extensa transição que ocorre neste período de vida. Acredita-se que a adolescência seja anatômica e fisiologicamente marcada pela diminuição do volume hipocampal e redução da plasticidade neuronal, mudanças estas que estão diretamente relacionadas as alterações comportamentais comuns a esta fase da vida. Ademais, acredita-se que a ocorrência de fatores estressores meio a tanta transição, culmina na interrupção de resposta comportamental de hormônios que estão relacionados a cognição e emoção (HOLDER; BLAUSTEIN, 2014)

A relação entre prejuízo cognitivo decorrente da alteração do sono fica clara no estudo pré-clínico que concluiu que animais adolescentes que apresentam um perfil com alta tendência comportamental à exploração, quando expostos ao modelo de privação do sono paradoxal, apresentam comprometimento comportamental, como hiperlocomoção associado a padrão ansiolítico de risco, além de comprometimento da memória de trabalho. Vale ressaltar que estes achados remetem um comportamento animal de mania (LIMA, 2016) e assim que desta maneira pode-se estreitar uma relação translacional de prejuízo cognitivo humano em decorrência da privação do sono.

Diante dos resultados do presente estudo no tocante a atividade micróglia do hipocampo de animais submetidos ao uso indiscriminado de LDX, pode-se afirmar que houve um aumento desta variável. Tal dado chama atenção para a relação de aumento do estado de vigília e potencial desencadeamento de processos inflamatórios, nesta vulnerável fase da consolidação e desenvolvimento cerebral que é a infância e adolescência.

Tais dados corroboram com o alerta do presente trabalho e da possível relação do uso indiscriminado desta droga com prováveis danos cognitivos, uma vez que a administração de LDX nos animais saudáveis desencadeou um aumento da expressão dos receptores AT1 do hipocampo dos ratos.

6 CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou que a administração repetida e em doses crescentes de LDX por 3 semanas em ratos causa alterações comportamentais e neuroquímicas tempo- e área cerebral-dependente. Observou-se que no período de 1 semana houve aumento da atividade locomotora vertical, na segunda semana aumento da atividade global no campo aberto e na terceira semana um aumento na exploração do quadrante central do campo, este último parâmetro refletindo um comportamento de risco. Houve comprometimento na memória declarativa detectada pelo NOR na semana 2, embora nenhuma alteração na memória de trabalho tenha sido observada. No tocante a alterações oxidativas estas foram evidentes na terceira semana de tratamento no hipocampo e corpo estriado. Também vimos um aumento na expressão de IBA1 (marcador de micróglia) na terceira semana com tendência a aumento do receptor AT1 da angiotensina II e queda dos níveis da citocina anti-inflamatória IL-4. Embora esta pesquisa tenha sido realizada a nível pré-clínico, a mesma desperta a atenção de forma translacional para o potencial risco do uso de altas doses de LDX em um cérebro saudável. Assim, o presente estudo chama atenção para um alerta do uso indiscriminado de fármacos psicoestimulantes por indivíduos saudáveis.

REFERÊNCIAS

- AFFONSO ET AL, 2016. O Uso Indiscriminado Do Cloridrato De Metilfenidato Como Estimulante Por Estudantes Da Área Da Saúde Da Faculdade Anhanguera De Brasília (Fab). **Infarma - Ciências Farmacêuticas**, v. 28, n. 3, p. 166–172, 2016.
- ALVES, B. E. P. **Drogas psicoestimulantes : uma abordagem toxicológica sobre cocaína e metanfetamina Psychostimulant drugs : a pharmacological approach to cocaine and methamphetamine A Secretaria Nacional Anti-Drogas – SENAD e o Centro Brasileiro de Informações sobre**. [s.l: s.n.].
- ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. DE. **Animais de laboratório**. [s.l: s.n.].
- ANIMALS, S.; EFFECTS, L. Scoring of Social Interactions and Play in. p. 1–11, 2005.
- ANJOS, F. B. **Estudo De Caso Com Concurseiros the Psychodynamics of Non-Working . Public Servants Competitors Case Study**. [s.l: s.n.].
- ANVISA. Prescrição e consumo de Metilfenidato no Brasil: identificando riscos para o monitoramento e controle sanitário. **SNGPC: Boletim de Farmacoepidemiologia**, v. 2, n. 2, p. 1–14, 2012.
- ARAUJO ET AL, 2017. **A FREQUÊNCIA DO USO DE RITALINA ENTRE CRIANÇAS DA PRÉ-ESCOLA 1 INTRODUÇÃO Desde o início das atividades da indústria farmacêutica no começo do século XIX e o surgimento dos primeiros psicofármacos em torno da década de 1950 , esses medicamentos vêm ganhan**. [s.l: s.n.].
- ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: A review. **Animal Behaviour**, v. 21, n. 2, p. 205–235, 1973.
- BATISTELA, S. et al. Metilfenidato como ampliador cognitivo em jovens saudáveis. **Dementia e Neuropsychologia**, v. 10, n. 2, p. 134–142, 2016.
- BAYNES, J. W. **Bioquímica Médica**. [s.l.] Saunders Elsevier, 2015.
- BETT, W. R. Benzadrine Sulphate in Clinical Medicine. **Postgraduate Medical Journal**, v. 22, n. 250, p. 205–218, ago. 1946.
- BEVINS, R. A.; BESHEER, J. Assay for Lipid Peroxides in Animal Tissues Thiobarbituric Acid Reaction. v. 358, p. 1306–1311, 1979.
- BLAKEMORE, S.-J. The social brain in adolescence. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 9, p. 267, 1 abr. 2008.
- BORELLA, V. C. M. **Modelo neurodesenvolvimental de esquizofrenia induzida pela administração neonatal de Cetamina em ratos: avaliação da influencia do sexo e efeito antipsicótico**. [s.l: s.n.].
- BRISTOT, G. **Identificação de Padrões Gliais no Estriado em um Modelo Animal de Mania : Um Estudo Piloto Identificação de Padrões Gliais no Estriado em um Modelo Animal de Mania : Um Estudo Piloto**. [s.l: s.n.].
- BUCKMASTER, C. A. Entorhinal Cortex Lesions Disrupt the Relational Organization of Memory in Monkeys. **Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 44, p. 9811–9825, 2004.

- CARDOSO, H. et al. O Uso Abusivo de Anfetaminas por Estudantes Universitários . 2017.
- CASARE, F. A. . **Efeito da interação de angiotensina II e o receptor AT1 ou endotelina 3 e os receptores ET.** [s.l: s.n.].
- CATALA, A. Lipid peroxidation of membrane phospholipids in the vertebrate retina. **Frontiers in bioscience scholar edition**, v. 3, n. June, p. 52–60, 2011.
- CATANI, M.; DELL'ACQUA, F.; THIEBAUT DE SCHOTTEN, M. A revised limbic system model for memory, emotion and behaviour. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 37, n. 8, p. 1724–1737, 2013.
- CEBRID. **Livreto informativo sobre**, 2001. (Nota técnica).
- CHAVES, C.; ZUARDI, A. W.; HALLAK, J. E. C. The role of inflammation in schizophrenia: an overview. **Trends in psychiatry and psychotherapy**, v. 37, n. 2, p. 104–5, jan. .
- CLARK, M. A. F. R. ET AL. **Farmacologia ilustrada.** [s.l: s.n.].
- COGHILL, D. et al. European , randomized , phase 3 study of lisdexamfetamine dimesylate in children and adolescents with attention-deficit / hyperactivity disorder. **European Neuropsychopharmacology**, v. 23, n. 10, p. 1208–1218, 2013.
- COGHILL, D. R. et al. Cognitive Function of Children and Adolescents with Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder in a 2-Year Open-Label Study of Lisdexamfetamine Dimesylate. **CNS Drugs**, v. 32, n. 1, p. 85–95, 2018.
- CONRAD, C. D. et al. Sex differences in spatial and non-spatial Y-maze performance after chronic stress. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 79, n. 1, p. 32–40, 2003.
- CONSENZA, R. . Neuroanatomia funcional básica para o psicólogo. In: **Neuropsicologia - 2ed: Teoria e Prática.** [s.l: s.n.]. p. 29–46.
- CORRÊA, P. D. T. F. Avaliação comportamental em modelo animal de esquizofrenia induzido por cetamina. 2009.
- COSTALL, B.; NAYLOR, R. J. On catalepsy and catatonia and the predictability of the catalepsy test for neuroleptic activity. **Psychopharmacologia**, v. 34, n. 3, p. 233–241, 1974.
- CRAWLEY, J. N.; PAYLOR, R. A Proposed Test Battery and Constellations of Specific Behavioral Paradigms to Investigate the Behavioral Phenotypes of Transgenic and Knockout Mice. v. 211, p. 197–211, 1997.
- CRUZ, A. P. D. M.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Modelos animais de ansiedade e o estudo experimental de drogas serotoninérgicas. In: **Métodos em Neurociência.** [s.l: s.n.]. p. 26.
- DE ARAÚJO, F. Y. R. et al. Inhibition of ketamine-induced hyperlocomotion in mice by the essential oil of *Alpinia zerumbet*: Possible involvement of an antioxidant effect. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 63, n. 8, p. 1103–1110, 2011.
- DE GÓIS QUEIROZ, A. I. et al. Angiotensin receptor blockers for bipolar disorder. **Medical Hypotheses**, v. 80, n. 3, p. 259–263, 2013.
- DE SOUZA, C. P. **AVALIAÇÃO DA DIFERENÇA SEXUAL EM MODELO DE MANIA INDUZIDA POR.** [s.l: s.n.].

- DEKABAN, A. S.; SADOWSKY, D. Changes in Brain Weights During the Span of Human Life : Relation of Brain Weights to Body Heights and Body Weights. 1978.
- DOBBING, J.; SANDS, J. Comparative aspects of the brain growth spurt. **Early Human Development**, v. 3, n. 1, p. 79–83, 1979.
- DOS SANTOS, M. G. et al. Estudo da inflamação no transtorno afetivo bipolar: Avaliação de citocinas inflamatórias. **Revista Neurociencias**, v. 22, n. 1, p. 134–143, 2014.
- DOWLATI, Y. et al. A meta-analysis of cytokines in major depression. **Biological psychiatry**, v. 67, n. 5, p. 446–457, mar. 2010.
- EGER, G. A.; FERREIRA, V. V; BATISTA, C. R. Antioxidant effect of simvastatin through oxidative imbalance caused by lisdexamfetamine dimesylate. v. 88, p. 335–348, 2010.
- ELLIOTT, J. M. Psychostimulants and monoamine transporters : upsetting the balance. p. 94–100, 2005.
- ENNACEUR, A.; MELIANI, K. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. III. Spatial vs. non-spatial working memory. **Behavioural Brain Research**, v. 51, n. 1, p. 83–92, 1988.
- EZARD, N. et al. LiMA: a study protocol for a randomised, double-blind, placebo controlled trial of lisdexamfetamine for the treatment of methamphetamine dependence. **BMJ Open**, v. 8, n. 7, 1 jul. 2018.
- FAIRMAN, K. A. et al. Diagnoses of Cardiovascular Disease or Substance Addiction / Abuse in US Adults Treated for ADHD with Stimulants or Atomoxetine : Is Use Consistent with Product Labeling ? **Drugs - Real World Outcomes**, v. 5, n. 1, p. 69–79, 2018.
- FARAH, M. J.; ROSTRON, C. L.; OPEN, T. Enhancement stimulants : perceived motivational and cognitive advantages. v. 7, n. October, p. 1–6, 2013.
- FARMAC, S.; LTDA, B. (dimesilato de lisdexanfetamina). 2015.
- FERREIRA, B. Criação e Manejo de Ratos. **Animais de Laboratório: criação e experimentação [online]**., p. 388 p., 2002.
- FINGER, G. ET AL. Use of methylphenidate among medical students: A systematic review. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 59, n. 3, p. 285–289, 2013.
- FREYE E. **History of Designer Drugs. In: Pharmacology and Abuse of Cocaine, Amphetamines, Ecstasy and Related Designer Drugs.** [s.l: s.n.].
- FUENTE D., MALLOY-DINNIZ L.F, CAMARGO C.H.P, C. R. . **Neuropsicologia teoria e prática.** [s.l: s.n.].
- GAMA, H. Drug Utilization Studies Focus on Questionnaire Design. p. 1–62, 2007.
- GERMAN, C. L. Bath salts and synthetic cathinones: An emerging designer drug phenomenon. **Life Sciences**, v. 97, n. 1, p. 2–8, 27 fev. 2014.
- GOMES, JA. Evidências pré-clínicas do efeito antimaníaco d eum antagonista do receptor da angiotensina. p. 94, 2014.
- GOULART, B. K. et al. Ketamine impairs recognition memory consolidation and prevents learning-induced increase in hippocampal brain-derived neurotrophic factor

levels. **Neuroscience**, v. 167, n. 4, p. 969–973, jun. 2010.

GROVES, R. A. et al. Transcriptome Profiling of Khat (*Catha edulis*) and Ephedra sinica Reveals Gene Candidates Potentially Involved in Amphetamine-Type Alkaloid Biosynthesis. **PLOS ONE**, v. 10, n. 3, p. e0119701, 25 mar. 2015.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Fisiología Médica de GUYTON Y HALL**. [s.l: s.n.]. v. 53

HEAL, D. J. et al. Amphetamine, past and present - A pharmacological and clinical perspective. **Journal of Psychopharmacology**, v. 27, n. 6, p. 479–496, 2013.

HOLDER, M. K.; BLAUSTEIN, J. D. Puberty and adolescence as a time of vulnerability to stressors that alter neurobehavioral processes. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 35, n. 1, p. 89–110, 2014.

HUTSON, P. Effects of lisdexamfetamine alone and in combination with s-citalopram on acetylcholine and histamine efflux in the rat pre-frontal cortex and ventral hippocampus. **Journal of Neurochemistry**, v. 134, n. 4, p. 693–703, 2015.

HUTTENLOCHER, P. R. Synaptic density in human frontal cortex - developmental changes and effects of aging. **Brain research**, v. 163, n. 2, p. 195–205, mar. 1979.

IND, B.; SANDOZ. **Desarcor (Candesartana Cilexetila)**, 2015.

IZQUIERDO, A. M. E. A. Orbitofrontal cortex and amygdala contributions to affect and action in primates. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1121, p. 273–296, dez. 2007.

IZQUIERDO, I. Memórias. **Estudos avançados**, v. 3, 1988.

JEE, L. et al. Cumulative childhood risk is associated with a new measure of chronic inflammation in adulthood. 2018.

JINSMAA, Y. et al. Products of Oxidative Stress Inhibit Aldehyde Oxidation and Reduction Pathways in Dopamine Catabolism Yielding Elevated Levels of a Reactive Intermediate. **Chemical research in toxicology**, v. 22, n. 5, p. 835–841, maio 2009.

KAUER-SANT'ANNA, M. et al. Brain-derived neurotrophic factor and inflammatory markers in patients with early- vs. late-stage bipolar disorder. **The international journal of neuropsychopharmacology**, v. 12, n. 4, p. 447–458, maio 2009.

KESSLER, R. M. et al. The neurobiological basis of binge-eating disorder. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 63, p. 223–238, abr. 2016.

KRISHNAN, S.; MONTCRIEF, S. Toxicity profile of lisdexamfetamine dimesylate in three independent rat toxicology studies. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 101, n. 4, p. 231–240, 2007.

KUNZ, M. et al. Serum levels of IL-6, IL-10 and TNF-alpha in patients with bipolar disorder and schizophrenia: differences in pro- and anti-inflammatory balance. **Revista brasileira de psiquiatria (Sao Paulo, Brazil : 1999)**, v. 33, n. 3, p. 268–274, set. 2011.

LAGE, D. C. et al. Uso De Metilfenidato Pela População Acadêmica: Revisão De Literatura. **Use of Methylphenidate By Academic Population: Literature Review.**, v. 10, n. 3, p. 31–39, 2015.

LASSER, R. A. et al. Adjunctive Lisdexamfetamine Dimesylate Therapy in Adult Outpatients With Predominant Negative Symptoms of Schizophrenia : Open-Label

and Randomized-Withdrawal Phases. **Neuropsychopharmacology**, v. 38, n. 11, p. 2140–2149, 2013.

LAVIOLA, G. et al. Risk-taking behavior in adolescent mice: psychobiological determinants and early epigenetic influence. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 27, n. 1, p. 19–31, 2003.

LEBEL, C. et al. Diffusion tensor imaging of white matter tract evolution over the lifespan. **NeuroImage**, v. 60, n. 1, p. 340–352, 2012.

LIMA, C. N. D. C. Determinação De Alterações Na Expressão Gênica, Fenótipos Comportamentais E Padrões Neurobiológicos Em Ratos Adultos Com Elevada E Baixa Atividade Exploratória Privados De Sono Paradoxal Na Adolescência. 2016.

LYONS, M. D.; LENTZ, A. C.; COWARD, R. M. Lisdexamfetamine Dimesylate (Vyvanse) for the Treatment of Neurogenic Anejaculation. **American Journal of Men's Health**, v. 11, n. 3, p. 618–619, 2017.

MACÊDO, D. S. et al. Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry Effects of lithium on oxidative stress and behavioral alterations induced by lisdexamfetamine dimesylate : Relevance as an animal model of mania. **Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 43, p. 230–237, 2013.

MACHADO, A. **Neuroanatomia funcional**. [s.l.: s.n.].

MAGALHÃES, F. H. G. **Tecnologias Cognitivas: Uma Abordagem Geral**. 2014.

MAHMOOD, T.; YANG, P.-C. Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. **North American Journal of Medical Sciences**, v. 4, n. 9, p. 429–434, set. 2012.

MAIA, C. R. et al. The Brazilian policy of withholding treatment for ADHD is probably increasing health and social costs. p. 67–70, 2015.

MCCLUNG, C. A. Circadian genes, rhythms and the biology of mood disorders. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 114, n. 2, p. 222–232, 2007.

MCELROY, S. L. et al. Adjunctive lisdexamfetamine in bipolar depression : a preliminary randomized , placebo-controlled trial. p. 6–13, 2013.

MELLO-CARPES, P. B.; IZQUIERDO, I. The nucleus of the solitary tract→nucleus paragigantocellularis→locus coeruleus→CA1 region of dorsal hippocampus pathway is important for consolidation of object recognition memory. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 100, p. 56–63, 2013.

MOOSBRUGGER, H.; FISCHBACH, A.; SCHERMELLEH-ENGEL, K. On the construct validity of the EPP-D. v. 147, n. 6, p. 143–147, 1977.

NARDI, A. E.; QUEVEDO, J.; SILVA, A. G. **Esquizofrenia: teoria e clínica**. Porto Alegre: [s.n.].

NEILL, J. C. et al. **Animal models of cognitive dysfunction and negative symptoms of schizophrenia: Focus on NMDA receptor antagonism**. [s.l.] Elsevier Inc., 2010.

NEVES, B. et al. INDUZIDA PELO EXERCÍCIO FÍSICO ENVOLVE ATIVAÇÃO. n. 1, p. 4–5, 2013.

NGUYEN DINH CAT, A.; TOUYZ, R. **Cell Signaling of Angiotensin II on Vascular Tone: Novel Mechanisms**. [s.l.: s.n.]. v. 13

- OLIVEIRA ET AL, 2017. Utilização de metilfenidato, lisdexanfetamina e modafilina como drogas ampliadoras do conhecimento: estudo do perfil de dispensação em uma farmácia comunitária do interior do rio de janeiro. **Acta Biomedica Brasiliensia**, v. 8, p. 152–163, 2017.
- PENNICK. Absorption of lisdexamfetamine dimesylate and its enzymatic conversion to d-amphetamine. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, p. 317, 2010.
- QUEIROZ, A. EFEITOS DO DIMESILATO DE LISDEXANFETAMINA EM RATOS: RELEVÂNCIA COMO MODELO ANIMAL DO EPISÓDIO DE MANIA. **Igarss 2014**, n. 1, p. 1–5, 2014.
- QUEIROZ, A. I. G. et al. GBR 12909 administration as an animal model of bipolar mania: time course of behavioral, brain oxidative alterations and effect of mood stabilizing drugs. **Metabolic brain disease**, v. 30, n. 5, p. 1207–1215, out. 2015.
- RANG, H. P. et al. **Rang & Dale's Pharmacology**. [s.l.] Elsevier Health Sciences UK, 2011.
- RANG, H. P.; DALE, M. M. Mediadores químicos e o sistema nervoso autônomo. **Farmacologia de Rang & Dale**, p. 364–1939, 2016.
- REAGAN-SHAW, S.; NIHAL, M.; AHMAD, N. Dose translation from animal to human studies revisited. v. 22, n. 3, p. 659–661, 2016.
- RECOMMENDATIONS, C. N. Draft Guidance on Lisdexamfetamine Dimesylate. n. i, 2017.
- RIBEIRO, B. M. M. et al. Evidences for a progressive microglial activation and increase in iNOS expression in rats submitted to a neurodevelopmental model of schizophrenia: Reversal by clozapine. **Schizophrenia Research**, v. 151, n. 1, p. 12–19, 1 dez. 2013.
- RICHARDS, C. et al. Lisdexamfetamine dimesylate augmentation for adults with major depressive disorder and inadequate response to antidepressant monotherapy: Results from 2 phase 3, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled studies. **Journal of Affective Disorders**, v. 206, p. 151–160, 2016.
- SADILE, A. G. Long-term habituation of θ -related activity components of albino rats in the Låt-maze. **Motor Activity and Movement Disorders.**, p. 3–55, 1996.
- SALLAM, M. A. et al. The physiological and perceptual effects of plant extracts (*Catha Edulis* Forsk) during sustained exercise. **Substance Abuse Treatment, Prevention, and Policy**, v. 11, n. 1, p. 18, 2016.
- SCOLARO, B. et al. Mate tea prevents oxidative stress in the blood and hippocampus of rats with acute or chronic ethanol administration. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2012, 2012.
- SEDLÁK, J.; HANUS, L. Changes of glutathione and protein bound SH-groups concentration in rat adrenals under acute and repeated stress. **Endocrinologia experimentalis**, v. 16, n. 2, p. 103–109, 1982.
- SEMPLE, B. D. et al. Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. **Progress in Neurobiology**, v. 106–107, p. 1–16, 2013.
- SENGUPTA, P. The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. **International journal of preventive medicine**, v. 4, n. 6, p. 624–630, jun. 2013.

- SLUYTER, F. et al. Behavioral stress response of genetically selected aggressive and nonaggressive wild house mice in the shock-probe/defensive burying test. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 54, n. 1, p. 113–116, maio 1996.
- STACI D. BILBO, J. M. S. The immune system and developmental programming of brain and behavior. **National institutes of health**, v. 33, n. 3, p. 267–286, 2013.
- STANDAERT, D. .; G. J. . Farmacologia da Neurotransmissão Dopaminérgica. In: **Farmacologia da neurptransmissão dopaminérgica**. [s.l: s.n.]. p. 166–185.
- STANFORD, S. C. The Open Field Test: reinventing the wheel. n. 1957, 2007.
- STEPHEN P. HINSHAW AND RICHARD M. SCHEFFLER. **The ADHD Explosion: Myths, Medication, Money, and Today's Push for Performance**. [s.l: s.n.].
- STURMAN, D. A.; MOGHADDAM, B. The neurobiology of adolescence: Changes in brain architecture, functional dynamics, and behavioral tendencies. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 35, n. 8, p. 1704–1712, 2011.
- SUN, H. et al. Angiotensin II and its receptor in activated microglia enhanced neuronal loss and cognitive impairment following pilocarpine-induced status epilepticus. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 65, p. 58–67, 2015.
- TAGLIALATELA, G. et al. NIH Public Access. v. 200, n. 1, p. 95–99, 2010.
- THERMO SCIENTIFIC. ELISA technical guide and protocols. **Thermo Scientific**, v. 65, n. 815, p. 1–14, 2010.
- TOSTA, A. **TDah COMO ALTERNATIVA DE NEUROPROTEÇÃO NA PROLE**
Andréa Tosta. [s.l: s.n.].
- TSUJIMOTO, S. The Prefrontal Cortex: Functional Neural Development During Early Childhood. **The Neuroscientist**, v. 14, n. 4, p. 345–358, 2008.
- VITÓRIA, G. U.; SIQUEIRA, M. P. S.; SUGITA, D. M. **O desafio do diagnóstico de tdah e suas implicações**. 2018
- WALSH, R. N.; CUMMINS, R. A. The open-field test: A critical review. **Psychological Bulletin**, v. 83, n. 3, p. 482–504, 1976.
- WARD, K.; CITROME, L.; WARD, K. Lisdexamfetamine: chemistry, pharmacodynamics, pharmacokinetics, and clinical efficacy, safety, and tolerability in the treatment of binge eating disorder. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 0, n. 0, 2018.
- WHO, 1977. The selection of essential drugs: report of a WHO expert committee. **Technical Report Series no 615**., p. Geneva: World Health Organization, 1977.
-