



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

**ANA ISABELLE DE GOIS QUEIROZ**

**EFEITOS DO DIMESILATO DE LISDEXANFETAMINA EM RATOS:  
RELEVÂNCIA COMO MODELO ANIMAL DO EPISÓDIO DE MANIA**

**FORTALEZA**

**2012**

**ANA ISABELLE DE GOIS QUEIROZ**

**EFEITOS DO DIMESILATO DE LISDEXANFETAMINA EM RATOS:  
RELEVÂNCIA COMO MODELO ANIMAL DO EPISÓDIO DE MANIA**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Dra. Danielle Silveira Macêdo

**FORTALEZA**

**2012**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca de Ciências da Saúde

---

Q42e Queiroz, Ana Isabelle de Gois.

Efeitos do dimesilato de lisdexanfetamina em ratos: relevância como modelo animal do episódio de mania/ Ana Isabelle de Gois Queiroz. – 2012.

82 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2012.

Orientação: Prof. Dra. Danielle Silveira Macêdo.

1. Transtorno Bipolar. 2. Modelos Animais. 3. Lisdexanfetamina. 4. Estresse Oxidativo. I. Título.

CDD 616.895

---

**ANA ISABELLE DE GOIS QUEIROZ**

**EFEITOS DO DIMESILATO DE LISDEXANFETAMINA EM RATOS:  
RELEVÂNCIA COMO MODELO ANIMAL DO EPISÓDIO DE MANIA**

Dissertação apresentada a Coordenação do Programa de Pós-graduação em Farmacologia  
como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Danielle Silveira Macêdo (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará

---

Prof. Dr. David Freitas de Lucena (Co-orientador)  
Faculdade Christus

---

Prof. Dr. Carlos Clayton Torres Aguiar  
Universidade de Fortaleza

---

Profa. Dra. Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar  
Universidade Federal do Ceará – Campus Sobral

*À minha avó Terezinha Costa de Gois, que mesmo tendo se graduado em apenas ler, escrever e nas contas de casa, sempre teve a educação como prioridade para seus filhos e netos.*

## AGRADECIMENTOS

Agradecer uma conquista às pessoas envolvidas é, antes de tudo, reconhecer que sozinha não conseguiria chegar aqui.

Agradeço a Deus pela saúde, boas energias e por ter me colocado neste caminho cercado de tantas pessoas especiais.

A minha família, em especial minha mãe que me ensinou o valor da educação e o quanto seu amor faz bem pra mim. Ao meu pai e seu afeto simbólico. Meu irmão Rodrigo sempre tão preocupado e me estimulando com seu jeito peculiar. A minha tia-madrinha Conceição Gois que desde criança me estimulou o amor pelos livros e por todo seu apoio sempre presente. A minhas tias e tios mais que especiais na minha vida: Fátima, Ihá, Lúcia, Naninha, Neto e Júnior e seus companheiro(as) que também fazem presença no meu coração. Aos meus primos que são como irmãos pra mim. A minha avó Terezinha Costa de Gois, não seria quem sou sem a participação infinita dela em minha vida. Meu avô Rodrigo (*in memorian*) que no seu silêncio me passou tanta sabedoria. A Edna Francalino de Sousa (*in memorian*) que passou a fazer parte da nossa família de coração com seu cuidado com os afazeres da casa e dos habitantes dela, sua atenção, dedicação, presença e ajuda nos momentos de estudo, meu muito obrigada e minha eterna saudade.

A minha orientadora professora Danielle Silveira Macêdo pela oportunidade, orientação e confiança. Sou muito grata por conviver com seu conhecimento, sabedoria, avidez pela pesquisa e sua alegria contagiante. Ao meu co-orientador David Freitas de Lucena pela participação em todas as etapas da pesquisa, seu conhecimento, auxílio e ideias que conseguimos colocar em prática. Aos professores André Ferrer Carvalho e João Quevedo pela colaboração em toda pesquisa.

A CAPES/REUNI, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa no decorrer dos estudos de Mestrado.

A minha amiga Daniela Nikolasvski, que conheci como minha monitora na disciplina de Farmacologia na Graduação e que anos depois já terminando o Doutorado me plantou a semente da mudança, de que seria possível eu parar de trabalhar como farmacêutica e retornar a vida acadêmica.

A todos meus amigos pessoais que sempre me estimularam e que sempre entenderam quando eu não podia estar com eles, pois era preciso estudar.

As minhas colegas de Mestrado Greicy, Júlia, Nathália e Vlândia, vocês sabem em que momento dessa trajetória tiveram seu papel mais que especial. As colegas Rafaela, Camila Medeiros e Patrícia Xavier por me ajudarem quando precisei.

Aos acadêmicos de Medicina Lígia, Maíra e Michel, por tantos momentos juntos no Laboratório, pela parceria, empenho, confiança, troca de conhecimentos e admiração.

Aos meus colegas que ingressaram no Mestrado comigo: Bruna, Cecília, Daniel, Fábio, Iris, Mariana.

A todos os professores, técnicas e colegas do Laboratório de Neurofarmacologia da UFC pelos momentos em que pude contar.

A todos que de alguma forma contribuíram com esse momento, muito obrigada, um grande abraço em todos vocês.

*“Se apenas houvesse uma  
única verdade, não poderiam  
pintar-se cem telas sobre o  
mesmo tema”.*

Pablo Picasso

## RESUMO

O Transtorno Afetivo Bipolar é um transtorno mental severo que acomete cerca de 1,5% da população mundial e se caracteriza pela oscilação de humor entre a depressão e a mania, interferindo no desempenho do indivíduo em termos pessoais e profissionais, bem como sendo responsável por alto número de suicídios. Todos esses fatores o caracterizam como um problema de saúde pública. Seu mecanismo fisiopatológico ainda não é totalmente conhecido e o arsenal terapêutico atual ainda é escasso, necessitando de contínuas pesquisas nesse âmbito. Observando a necessidade de maior disponibilidade de modelos animais de mania para maiores pesquisas é que o estudo objetivou investigar um novo modelo animal de mania. O desenho experimental da pesquisa seguiu os critérios para determinar um modelo animal que são: a validade de face (onde busca-se mimetizar no animal comportamento característico na doença), validade de constructo (a fisiopatologia da doença) e a validade preditiva (se os medicamentos já estabelecidos para determinada doença são capazes de reverter e prevenir os efeitos do fármaco que induz a patologia). Logo, o presente trabalho se propôs a investigar a atividade do Dimesilado de Lisdexanfetamina (LDX), pró-fármaco que ao ser metabolizado a d-anfetamina passa a exercer sua atividade psicoestimulante como possível agente em um modelo animal de mania. O tratamento com D-ANF induz hiperlocomoção e é considerado como um modelo animal de mania bipolar já estabelecido. Por isso, procurou-se determinar as alterações comportamentais e de estresse oxidativo induzidas pela administração via oral sub-crônica de LDX, bem como a reversão e prevenção deste efeito ao tratar os ratos com lítio, medicamento protótipo como estabilizante do humor. Um aumento significativo no comportamento locomotor foi induzido por LDX (10 e 30 mg/Kg). Para determinar os efeitos de Lítio (Li) nas alterações induzidas por LDX nos ratos do grupo reversão, o protocolo seguiu a administração de LDX (10 ou 30 mg / Kg) ou solução salina durante 14 dias. Entre os dias 8<sup>o</sup> e 14<sup>o</sup> os animais receberam Li (47,5 mg / kg, ip) ou solução salina. No protocolo de prevenção, os ratos foram pré-tratados com solução salina ou Li antes da administração de LDX. Os níveis de Glutathiona Reduzida (GSH) e de peroxidação lipídica foram determinados no córtex pré-frontal (PFC), hipocampo (HC) e estriado (ST) de ratos. Constatou-se que o Lítio preveniu a hiperlocomoção induzida por LDX, nas doses de 10 e 30 mg/kg, mas somente reverteu a hiperlocomoção quando utilizada a dose de 10 mg/ kg de LDX. Além disso, ambas as doses de LDX diminuíram o conteúdo de GSH (em ST e PFC), enquanto que Li foi capaz de reverter e prevenir estas alterações, principalmente no PFC. LDX (10 e 30 mg / kg) aumentou a peroxidação lipídica, que foi revertida e prevenida por Li. Diante dos resultados em termos de hiperlocomoção e estresse oxidativo demonstrou-se que o LDX conseguiu induzir tais parâmetros, se mostrando como uma promessa de modelo animal alternativo de mania.

**Palavras-chave:** Transtorno Bipolar. Modelo Animal de Mania. Dimesilato de Lisdexanfetamina. D-Anfetamina. Estresse Oxidativo.



## ABSTRACT

Bipolar disorder is a severe mental disorder that affects approximately 1,5% of the world population and is characterized by mood swings between depression and mania, and that interferes with the individual's performance in personal and professional terms, as well as being responsible for high number of suicides. All these factors characterize it as a public health problem. Its pathophysiologic mechanism is not yet fully known and the current therapeutic arsenal is still scarce, requiring continuous research in this field. Noting the need for increased availability of animal models of mania for further research is that the study aimed to investigate a new animal model of mania. The experimental design of the study followed the criteria for determining an animal model are: face validity (which seeks to mimic the animal behavior characteristic disease), construct validity (the pathophysiology of the disease) and predictive validity (if the medications already established for certain disease are capable of reversing and preventing the effects of drug which induces pathology). Therefore, this study aimed to investigate the activity of Dimesilado Lisdexanfetamina (LDX), prodrug that is metabolized to d-amphetamine is exerting its activity as possible psychostimulant agent in an animal model of mania. Treatment with D-ANF induced hyperlocomotion and is considered an animal model of bipolar mania already established. Therefore, we sought to determine behavioral changes and oxidative stress induced by oral administration of sub-chronic LDX, as well as the prevention and reversal of this effect by treating the rats with lithium, a drug prototype mood stabilizer like. A significant increase in the locomotor behavior was induced by LDX (10 and 30 mg / kg). To determine the effect of lithium (Li) changes induced in the rats of group LDX reversal, the protocol followed by the administration of LDX (10 or 30 mg / kg) or saline for 14 days. Among the 8th and 14th days the animals received Li (47.5 mg / kg, ip) or saline. In the prevention protocol, rats were pretreated with saline or Li prior to administration of LDX. The levels of Glutathione Reduced (GSH) and lipid peroxidation were determined in the prefrontal cortex (PFC), hippocampus (HC) and striatum (ST) from rats. It was found that the lithium prevented hyperlocomotion induced LDX at doses of 10 and 30 mg / kg, but only LDX reversed hyperlocomotion in a dose of 10 mg / kg. Furthermore, both doses of LDX decreased content of GSH (and in ST PFC) whereas Li was able to reverse and prevent these changes, particularly in PFC. LDX (10 and 30 mg / kg) increased lipid peroxidation, which was prevented and reversed by Li considering the results in terms of hyperlocomotion and oxidative stress has been shown that the LDX could induce such parameters, is showing promise as a model alternative animal mania.

**Keywords:** Bipolar Disorder. Mania Animal Model. dimesylate of Lisdexanfetamina. D-Amphetamine. Oxidative Stress.

## ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
CE	Corpo estriado
CEPA	Comitê de Ética em Pesquisa Animal
CONT	Controle
DA	Dopamina
D-ANF	D-anfetamina
EO	Estresse Oxidativo
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
GCLM	glutamate cysteine ligase modulatory gene;
GPx	Glutathione Peroxidase
GR	Glutathione Redutase
GSH	Glutathione Reduzida
HC	Hipocampo
I.P	Intraperitoneal
LDX	Dimesilato de Lisdexanfetamina
MAO	Monoamino Oxidase
MDA	Malondialdeído
NC	Número de Cruzamentos
NR	Número de Rearing
OMS	Organização Mundial de Saúde
PFC	Córtex pré-frontal
RL	Radicais Livres
SEM	standard errors of the mean;
SNC	Sistema Nervoso Central
TAB	Transtorno Afetivo Bipolar
TBARS	Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
TDAH	Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade
VAL	Valproato de Sódio

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** Tipos de Transtorno Bipolar (DSM – IV)

**Figura 2:** Mediadores Alostáticos envolvidos no sistema tóxico da fisiopatologia do Transtorno Bipolar

**Figura 3:** Critérios para Validação de um Modelo Animal de Mania

**Figura 4:** Conversão enzimática de LDX a L-Lisina e D-ANF

**Figura 5:** Protocolo curva dose-resposta grupos tratados com LDX

**Figura 6:** Testes Neuroquímicos realizados

**Figura 7:** Protocolo tratamento prevenção e reversão grupos tratados com LDX, Lítio e Salina

**Figura 8:** Número de cruzamentos e *rearings* dos animais submetidos a quatro diferentes doses (1, 1,5, 10 e 30 mg / kg) de Dimesilato de Lisdexanfetamina (LDX) durante 7 dias.

**Figura 9:** Atividade da enzima Superóxido Dismutase no córtex pré-frontal de animais controle e tratados com LDX nas doses de 10 e 30mg/kg

**Figura 10:** Atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD) no corpo estriado de animais controle e tratados com LDX nas doses de 10 e 30mg/kg

**Figura 11:** Atividade da enzima Superóxido Dismutase no hipocampo de animais controle e tratados com LDX nas doses de 10 e 30 mg/kg

**Figura 12:** Níveis de Glutathiona Reduzida no corpo estriado de animais controle e animais submetidos ao tratamento com LDX nas doses de 10 e 30mg/kg

**Figura 13:** Níveis de Glutathiona Reduzida (GSH) no córtex pré-frontal de animais controle e animais submetidos ao tratamento com LDX nas doses de 10 e 30mg/kg.

**Figura 14:** Níveis de Glutathiona Reduzida no hipocampo de animais controle e animais submetidos ao tratamento com LDX nas doses de 10 e 30mg/kg

**Figura 15:** Níveis de MDA (marcador de peroxidação lipídica) no corpo estriado de animais controle e tratados com dose de 10 e 30mg/kg de LDX.

**Figura 16:** Níveis de MDA (marcador de peroxidação lipídica) no hipocampo de animais controle e tratados com dose de 10 e 30mg/kg de LDX

**Figura 17:** Níveis de MDA (marcador de peroxidação lipídica) no córtex pré frontal de animais controle e tratados com dose de 10 e 30mg/kg de LDX

**Figura 18:** Níveis de BDNF (Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro) no corpo estriado de animais controle e tratados com dose de 10 e 30mg/kg de LDX

**Figura 19:** Níveis de BDNF (Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro) no hipocampo de animais controle e tratados com dose de 10 e 30mg/kg de LDX

**Figura 20:** Níveis de BDNF (Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro) no córtex pré-frontal de animais controle e tratados com dose de 10 e 30mg/kg de LDX

**Figura 21:** Níveis de variação no volume cerebral das áreas CE, HC e PFC de animais controle e tratados com dose de 10 e 30mg/kg de LDX

**Figura 22:** Número de passagens de (A) e levantamentos (B) no tratamento de prevenção. Número de cruzamentos (C) e os levantamentos (D), no tratamento de reversão

**Figura 23:** Níveis de Glutathione Reduzida (GSH) e de ácido tiobarbitúrico-TBARS (MDA, um marcador de peroxidação lipídica), no córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado, após o tratamento de prevenção

**Figura 24:** Níveis de glutathione reduzida (GSH) e de ácido tiobarbitúrico- TBARS (MDA, um marcador de peroxidação lipídica), no córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado após tratamento de reversão

**Figura 25:** Níveis de BDNF (Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro) no corpo estriado após tratamento de prevenção e reversão

**Figura 26:** Níveis de BDNF (Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro) no córtex pré-frontal após tratamento de prevenção e reversão (n = 6 para cada grupo)

**Figura 27:** Níveis de BDNF (Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro) no hipocampo após tratamento de prevenção e reversão

**Figura 28:** Variação do Volume Cerebral das áreas CE, HC, PFC dos animais tratados com LDX, e nos protocolos de prevenção e reversão

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>15</b>
<b>1.1</b>	<b>Transtorno Bipolar</b>	<b>15</b>
<b>1.2</b>	<b>Fisiopatologia do Transtorno Bipolar</b>	<b>17</b>
1.2.1	Estresse Oxidativo	17
1.2.2	Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF) e TAB	18
1.2.3	Alteração Volume Áreas Cerebrais no TAB	19
1.3	Situação atual do tratamento farmacológico para TAB	20
1.4	Modelos Animais	22
1.4.1	Modelo animal de Mania	23
1.4.2	Modelo animal clássico de mania: Indução por D-ANF	23
1.4.3	Limitação comercialização de Anfetaminas no Brasil	24
1.5	Dimesilato de Lisdexanfetamina (LDX) e seu potencial como agente no modelo de mania	24
<b>2.</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	<b>26</b>
<b>3.</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>27</b>
<b>3.1</b>	<b>Objetivo Geral</b>	<b>27</b>
<b>3.2</b>	<b>Objetivos Específicos</b>	<b>27</b>
<b>4.</b>	<b>MATERIAIS E METODOS</b>	<b>28</b>
4.1	Animais	28
4.2	Droga utilizada	28
4.3	Estratégia experimental	28
4.4	Tratamento dos animais e protocolo para avaliação de parâmetros de um modelo animal de mania	29
4.4.1	Protocolo I - Dose-resposta para avaliar alterações comportamentais induzidas por LDX	29
4.4.2	Protocolo II – Determinação das alterações neuroquímicas induzidas por LDX )	30
4.4.3	Protocolo III - Determinação do efeito de Li na prevenção e reversão das alterações comportamentais e neuroquímicas induzidas por LDX	30
4.4.4	Tratamento prevenção	30

4.4.5	Tratamento de reversão	31
4.5	Testes de comportamento e neuroquímicos realizados	33
4.5.1	Teste de campo aberto	33
4.5.2	Testes Neuroquímicos	34
4.5.2.1	Preparação de tecido	34
4.5.2.2	Determinação de Glutathiona Reduzida (GSH)	34
4.5.2.3	Níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	34
4.5.2.4	Níveis de Superóxido Dismutase (SOD)	35
4.5.2.5	Níveis de Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF)	35
4.5.2.6	Avaliação Volume das Áreas Cerebrais Dissecadas ( Grupos Tratados vs Controle)	36
4.6	Níveis séricos de medições de lítio	36
4.7	Análise estatística	36
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>37</b>
5.1	PROTOCOLO I – Critério De Face (Avaliação Da Dose-Resposta Às Alterações Comportamentais Induzidas por LDX)	37
5.2	PROTOCOLO II – Critério de Constructo (Avaliação Das Alterações Neuroquímicas Induzidas por LDX)	39
5.2.1	Determinação da atividade da Superóxido Dismutase (SOD)	39
5.2.2	Determinação dos níveis de Glutathiona Reduzida (GSH)	43
5.2.3	Determinação dos níveis de peroxidação lipídica (TBARs)	47

5.2.4	Determinação do Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF) em animais tratados com LDX	51
5.2.5	Determinação das alterações no volume cerebral das áreas dissecadas (CE, PFC, HC)	55
5.3	PROTOCOLO III – Critério Preditivo (Avaliação das Alterações Comportamentais e Neuroquímicas Induzidas por LDX - Prevenção e Reversão Por Lítio)	56
5.3.1	Tratamento Prevenção	56
5.3.2	Tratamento Reversão	57
5.3.3	Prevenção e Reversão – Níveis de BDNF	61
5.3.4	Prevenção e Reversão – Volume cerebral áreas dissecadas	64
<b>6.</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>65</b>
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>72</b>
<b>8.</b>	<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>73</b>
<b>9.</b>	<b>REFERENCIAS</b>	<b>74</b>

## INTRODUÇÃO

### 1.1 Transtorno Bipolar

O Transtorno afetivo bipolar (TAB) é um transtorno mental crônico e prevalente. É considerado como sendo uma das principais causas de incapacidade entre todas as condições médicas e psiquiátricas e tem sido associado a altos índices de morbidade e mortalidade (JORNADA *et al.*, 2011). A característica clínica típica desta desordem é a alternância entre episódios de depressão (humor deprimido, desesperança, anedonia, distúrbios do sono, dificuldade de concentração, retardo psicomotor e, muitas vezes, ideação suicida) e episódios de mania (humor elevado ou euforia, hiperatividade, insônia, e um otimismo maior, que geralmente se torna tão extremo que o julgamento do paciente é prejudicado) (BELMAKER, 2004; JR CAZ *et al.*, 2005 ).

O TAB atinge igualmente homens e mulheres e a média do início dos sintomas é de 20 anos (APA, 2000). De acordo com dados da Organização Mundial de Saúde o TAB é considerado uma das dez causas de incapacitação no mundo (LOPEZ e MURRAY, 1998). Acomete de 1,5% das pessoas mundialmente (BALLONE, 2005).

Devido a natureza crônica da doença, há necessidade de terapias eficazes, não só para a mania aguda e depressão, mas também para cuidados a longo prazo visando manter a estabilidade do paciente.

Segundo o DSM IV-TR (2003) (Figura 1), o TAB é dividido em dois subtipos principais, tipo I e II. O tipo I é a forma clássica em que o paciente apresenta os episódios de mania alternados com os depressivos. As fases maníacas não precisam necessariamente ser seguidas por fases depressivas, ou as depressivas por maníacas. O tipo II caracteriza-se por não apresentar episódios de mania, mas de hipomania com depressão. A hipomania apresenta as mesmas características da mania, porém não há prejuízo acentuado no funcionamento social ou ocupacional, bem como hospitalização ou psicose (VALVASSORI, 2010).

Apresenta elevadas taxas de reincidência, deflagrando déficits cognitivos e funcionais, o que acarreta em danos ao bem-estar e a qualidade de vida não apenas dos pacientes, mas também dos familiares e cuidadores (MANNING, 1997; TOHEN *et al.*, 2003; FAGIOLINI *et al.*, 2005; REVICKI *et al.*, 2005).

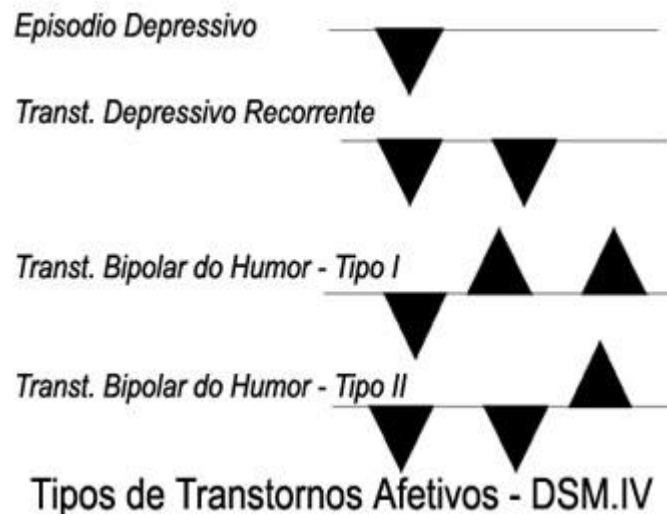
O tratamento farmacológico no TAB tem como objetivo estabilizar as variações de humor e a redução da frequência das passagens entre as crises de mania e os estados depressivos. Todavia, apesar dos esforços e avanços no tratamento da doença, apenas 1/3 dos



pacientes que sofrem de TAB retomam completamente as suas funções sociais e ocupacionais após o início do tratamento (HUXLEY; BALDESSARINI, 2007).

Mesmo com todo avanço alcançado nas pesquisas, o TAB permanece uma doença recorrente. Alguns pacientes apresentam-se estáveis e outros experimentam episódios frequentes, estados mistos e complicações relacionadas a abuso de substâncias e prejuízo cognitivo acentuado. O prejuízo causado pela doença parece estar mais relacionado à recorrência dos episódios do que à gravidade de um dado episódio (POST *et al.*, 2003). O número médio de episódios maníacos em pacientes com TAB sem tratamento ao longo da vida é de oito a nove (GOODWIN e JAMISON, 2007). Comumente, os pacientes apresentam períodos de exacerbação dos sintomas (episódios maníacos, mistos ou depressivos) intercalados por períodos subsindrômicos e períodos de remissão (eutimia). Antes do surgimento dos psicofármacos, os episódios duravam de quatro a 13 meses, os intervalos assintomáticos ficavam mais curtos e os episódios mais longos com a progressão da doença (ANGST e SELLARO, 2000). A persistência de sintomas subsindrômicos está associado a um maior risco de reagudização da doença (PERLIS *et al.*, 2006).

**Figura 1: Tipos de Transtorno Bipolar (DSM – IV)**



## 1.1. Fisiopatologia do Transtorno Bipolar

A complexa fisiopatologia do TAB permanece indefinida levando a várias hipóteses sobre sua origem e evolução (KAPCZINSKI *et al.*, 2008). No entanto, estudos indicam a existência de alterações anatômicas e fisiológicas, bem como danos oxidativos e variação na neuroplasticidade em pacientes bipolares (DREVETS *et al.*, 1997, BEARDEN *et al.*, 2001, RAJKOWSKA *et al.*, 2001). Nos subitens abaixo fatores importantes envolvidos na fisiopatologia do TAB são citados e correlacionados a gênese desta patologia.

Como a compreensão de todo o complexo fisiopatológico do TAB ainda é vago, pesquisas elucidam que várias vias podem estar envolvidas na resposta alostática do organismo às alterações decorrentes da fisiopatologia do TAB (Figura 2) (GRANDE *et al.*, 2012).

### 1.1.1. Estresse Oxidativo

Estresse oxidativo é um estado celular no qual existe um desequilíbrio entre a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a capacidade celular de eliminá-las através de mecanismos antioxidantes. As EROs destroem biomoléculas como o DNA, proteínas e lipídios o que pode levar a morte celular (BIEWENGA *et al.*, 1997). No TAB, pesquisadores constataram um aumento do estresse oxidativo a partir do aumento da peroxidação lipídica e da atividade da Superóxido Dismutase (SOD), bem como no dano ao DNA (KULOGLU *et al.*, 2002; FREY *et al.*, 2007).

Adicionalmente, Kapczinski *et al.* (2008) associam o TAB a uma elevação patológica da carga alostática, termo que se refere à decorrência do esforço do organismo para adaptar seus parâmetros internos à diferentes situações em prol de manter sua função normal. No caso do TAB, os mesmos genes envolvidos no transtorno estão vinculados a uma maior predisposição ao estresse, o que aumenta a carga alostática, causando comprometimento cognitivo e aumento das taxas de co-morbidades físicas e psiquiátricas (KAPCZINSKI *et al.*, 2008b). Estudos *post-mortem* têm demonstrado aumento do estresse oxidativo (Gigante *et al.*, 2011) e diminuição das defesas antioxidantes (GAWRYLUK *et al.*, 2011) no córtex pré-frontal de pacientes com TAB, o que pode acarretar dano neuronal (GIGANTE *et al.*, 2011).

Frey e colaboradores induziram estresse oxidativo com anfetamina em animais e, posteriormente, trataram-nos com lítio e valproato (estabilizadores de humor). Ambos os fármacos reverteram o aumento da peroxidação lipídica no córtex pré-frontal, bem como o preveniram no hipocampo (FREY *et al.*, 2006a). O mesmo grupo de pesquisadores observou

que gêmeas idênticas bipolares antes de serem tratadas apresentavam índices de SOD e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) mais altos. TBARS e SOD foram normalizados após tratamento com estabilizadores do humor, o que sugere que efeitos antioxidantes possam estar envolvidos (FREY *et al.*, 2007).

Uma metanálise recente estudou estresse oxidativo encontrado no TAB. Os resultados obtidos foram que os níveis de TBARS estão significativamente maiores em pacientes bipolares, enquanto os níveis de SOD e Glutathione peroxidase (GPx) não pareciam estar significativamente alterados nesses pacientes (ANDREAZZA *et al.*, 2008).

### **1.1.2. Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF) e TAB**

O Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF) é um membro da família dos fatores de crescimento denominado genericamente de “neurotrofinas”, cujos efeitos resultam da ativação do seu receptor tirosina-quinase B (Trk B) (DUMAN, 2002). O BDNF tem influência marcante na eficácia sináptica, na conectividade neuronal e na neuroplasticidade (POST, 2007). O BDNF está expresso no córtex cerebral e no hipocampo, áreas cerebrais que regulam funções cerebrais complexas, como a memória declarativa e a emoção (GRANDE *et al.*, 2010). A expressão do BDNF é regulada por corticosteróides relacionados ao estresse e tal interação parece influenciar a vulnerabilidade à psicopatologia moderada por estressores ambientais, dentre elas o TAB (MANJI *et al.*, 2003, KAUER-SANT'ANNA *et al.*, 2007). Os níveis de BDNF têm influência sobre o volume hipocampal (GRANDE *et al.*, 2010). Por exemplo, mulheres deprimidas com história de abuso sexual têm um volume hipocampal 18% menor que mulheres que não sofreram abuso sexual (VYTHILINGAM *et al.*, 2002). Dessa forma, o BDNF pode mediar os efeitos do estresse psicossocial no TAB e a disfunção cognitiva comumente relacionada a episódios afetivos repetidos (POST *et al.*, 1997, BERK *et al.*, 2011).

Frey *et al.* (2006), após tratar animais com anfetamina, observou que os níveis de BDNF dos mesmos encontravam-se diminuídos. Entretanto, o tratamento com lítio aumentou os níveis de BDNF no hipocampo dos animais quando administrado antes e depois da anfetamina. Já o valproato elevou os níveis hipocampais de BDNF quando administrado após a anfetamina. Portanto, é possível que o BDNF seja uma molécula relevante para a compreensão dos mecanismos de ação de fármacos com a atividade antimaníaca (FREY *et al.*, 2006a).

De um modo curioso, um estudo sugeriu que na mania há uma correlação negativa entre peroxidação lipídica (TBARS) e níveis séricos de BDNF (KAPCZINSKI *et al.*, 2008a).

Uma metanálise recente sugere que o BDNF possa ser um marcador do TAB (FERNANDES *et al.*, 2011). Os níveis de BDNF encontram-se diminuídos na mania e na depressão. O mesmo estudo revelou que o tratamento farmacológico da mania aguda eleva os níveis do BDNF.

### **1.1.3. Alteração Volume Áreas Cerebrais no TAB**

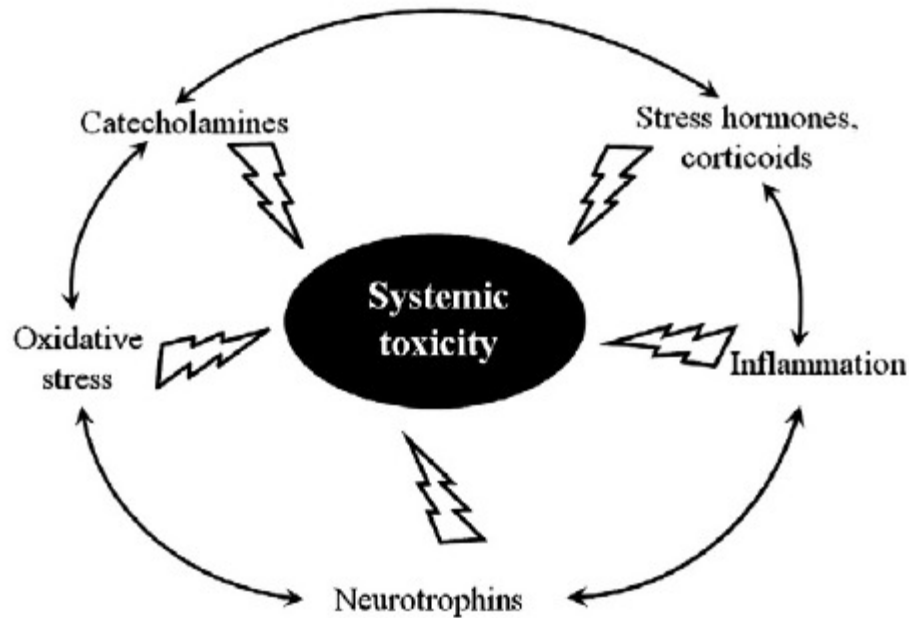
Estudos neuroanatômicos através da análise da imagem por ressonância magnética têm evidenciado alterações do volume de determinadas regiões cerebrais envolvidas na regulação do humor. Esses achados abrangem diminuição no volume do PFC e aumento do CE (HAJEK *et al.*, 2005; STRAKOWSKI *et al.*, 2005). Pesquisas neurofuncionais com ressonância magnética funcional e tomografia por emissão de pósitrons (PET) apontam uma diminuição significativa no metabolismo do PFC durante a depressão e subsequente aumento em algumas regiões do PFC durante a fase maníaca (MALHI *et al.*, 2004; STRAKOWSKI *et al.*, 2005).

Há muitas evidências em estudos de neuroimagem e post-mortem em que o TAB está associado a prejuízos na neuroplasticidade e na capacidade de resiliência celular (ZARATE *et al.*, 2006).

Análises de imagem funcional indicam que o TAB é caracterizado por excesso de atividade nas estruturas subcorticais e límbicas e atividade diminuída no PFC em resposta a estímulos emocionais acentuados (PHILLIPS *et al.*, 2003).

Uma avaliação mais detalhada destas alterações neuropatológicas sugere que estas modificações seguem um padrão de alteração neurodesenvolvimental e de neuroplasticidade, e não um padrão de degeneração cerebral como previamente se pensava (RAJKOWSKA, 2003).

**Figura 2: Mediadores Alostáticos envolvidos no sistema tóxico da fisiopatologia do Transtorno Bipolar (Grande *et al*, 2012)**



### 1.2. Situação atual do tratamento farmacológico para TAB

Com a lacuna sobre a precisa fisiopatologia da doença, pesquisas têm tentado elucidar alvos de fármacos clássicos terapeuticamente relevantes usados para o tratamento de TAB, com a finalidade de desenvolver medicamentos mais efetivos (QUIROZ *et al.*, 2004).

O principal fármaco clássico para tratamento do TAB é o Carbonato de Lítio (Li). É efetivo nos episódios de mania aguda e promove uma razoável proteção contra episódios de alterações de humor recorrentes. (DAVIS *et al.*, 2005).

Desde sua aprovação mundial na terapêutica em 1970, o Lítio, vem sendo usado pelos seus efeitos anti-maníacos, antidepressivos, e anti-suicida, entretanto seu mecanismo de ação a nível celular permanece não totalmente definido. Durante os últimos anos, várias pesquisas demonstram que a estabilização do humor e neuroplasticidade induzidas pelo lítio acontecem devido à inibição da Glicogénio Sintase Quinase- 3 beta (GSK-3beta) a qual ao ser inibida permite a acumulação de beta-catenina, sendo esta um fator de transcrição envolvido na estabilização do humor (GOULD, 2007).

Níveis alterados de GSK-3beta e beta-catenina estão associados com várias doenças neuropsiquiátricas e neurodegenerativas, enquanto que vários fármacos clássicos

neuropsiquiátricos inibem a GSK-3beta e regulam a expressão de beta-catenina (WADA, 2009).

Evidências sugerem que o aumento de GSK-3 estimula processos apoptóticos e esta quando inibida, atenua ou previne a apoptose (GOULD *et al.*, 2006). Logo, estudos indicam que os efeitos neuroprotetores do Li, ao menos em parte, é devido à inibição da GSK-3, que age através da via do fosfatidil-inositol-3-quinase (PI3K)/proteína-quinase-B (Akt) (LI *et al.*, 2002). Portanto, o que se sabe até então é que o mecanismo de ação do Li age na inibição da GSK-3 (enzima pró-apoptótica) e aumento da Bcl-2 (proteína antiapoptótica) (GOULD e MANJI, 2005).

Afora o conhecimento de todo esse processo, o mecanismo de ação do Li ainda não está totalmente elucidado. Em casos de pacientes que não respondem ao seu efeito, as classes de medicamentos que estão em segunda escolha são anticonvulsivantes e antipsicóticos, como valproato, carbamazepina e clozapina.

Logo, devido ao pequeno arsenal terapêutico disponível na clínica bem como a quantidade de pacientes refratários ou que apresentam efeitos colaterais aos medicamentos disponíveis, observa-se a necessidade de pesquisas que avancem nos conhecimentos sobre o mecanismo fisiopatológico do TAB bem como na descoberta de novos fármacos para o transtorno.

### 1.3. Modelos Animais

O conceito de modelo animal é aquele cujos mecanismos patológicos são suficientemente similares àqueles de uma doença humana, servindo a doença animal como modelo. A patologia no animal pode ser tanto induzida, como de ocorrência natural (CALABRESE, 1991).

O uso de modelos de doença animal superam as limitações, principalmente éticas, da investigação em seres humanos e proporciona a busca de uma relação causal de modo mais rápido, menos trabalhoso e menos oneroso (FAGUNDES, 2004). É imprescindível essa ferramenta na pesquisa experimental.

No TAB o desenvolvimento de modelos animais mostra-se como um passo importante para a elucidação das suas bases biológicas e para a investigação de novos alvos terapêuticos em situações pré-clínicas (LIPSKA e WEINBERGER, 2000).

Modelos animais para doenças devem atender a três conjuntos de critérios: validade de face, constructo e preditiva (LIPSKA e WEINBERGER, 2000; NESTLER e HYMAN, DE 2010, DA-ROSA *et al.*, 2012). Os critérios estão descritos na Figura 3. Validade de face refere-se à capacidade do modelo em mimetizar os sintomas humanos do distúrbio relacionado em animais, enquanto validade de constructo é o potencial do modelo para replicar algumas correlações fisiopatológicas encontradas na doença humana. Finalmente, a avaliação se os medicamentos clássicos utilizados para tratar a patologia têm o potencial de prevenir e/ou reverter as alterações comportamentais e neuroquímicas induzidas no animal constituem a validade preditiva (NESTLER e HYMAN, 2010).

**Figura 3: Critérios para Validação de um Modelo Animal de Mania ( Adaptado de Kapczinski e Quevedo, 2009).**

<b>MODELOS ANIMAIS DE MANIA</b>		
<b>Validade</b>		
<b>FACE</b>	<b>CONSTRUCTO</b>	<b>PREDITIVA</b>
<b>Semelhança com os sintomas observados na mania</b>	<b>Reprodução da etiologia e fisiopatologia da mania</b>	<b>Como o modelo responde aos fármacos usados no tratamento da mania</b>

#### **1.4.1. Modelo animal de Mania:**

Até o presente, não existe um modelo animal ideal para o TAB, uma vez que o padrão crônico e oscilatório deste transtorno, com variações comportamentais extremas e clinicamente opostas é um verdadeiro desafio a ser superado (MACHADO-VIEIRA *et al.*, 2004; EINAT e MANJI, 2006). Portanto, a resolução deste problema tem sido o desenvolvimento de modelos animais que reproduzem determinados aspectos do quadro clínico deste transtorno (FREY *et al.*, 2006).

#### **1.4.2. Modelo animal clássico de mania: Indução por D-ANFETAMINA (D-ANF)**

A dopamina (DA) é um neurotransmissor que desempenha um papel chave na regulação do humor, das funções cognitivas e motoras do cérebro (GAINETDINOV BEAULIEU, 2011). As alterações na sinalização da dopamina têm sido implicadas em numerosas desordens psiquiátricas, incluindo TAB (KO e STRAFELLA, 2012). Assim, muitos sinais e sintomas relacionados com a TAB podem ser replicados em modelos animais com estimulantes dopaminérgicos, tais como anfetaminas e cocaína. Por exemplo, a administração de anfetamina em ratos induz a insônia, hiperlocomoção e maior expressão da atividade sexual, que são as alterações de comportamento que se assemelham a manifestações da fase maníaca no TAB humano (FIORINO e PHILLIPS, 1999). Além disso, o tratamento de animais com D-ANF desencadeia a euforia como resultado da liberação de DA no estriado anteroventral (DREVETS *et al.*, 2001). Em conformidade com as evidências apresentadas acima, o modelo farmacológico mais amplamente utilizado para o estudo da mania é a hiperatividade em roedores induzido por D-anfetamina (D-ANF) (EINAT, 2006, FREY *et al.*, 2006a; FREY *et al.*, 2006b). Reforçando este modelo é importante salientar que estabilizadores clássicos de humor, como o lítio (Li) e valproato são capazes de suprimir a hiperlocomoção induzida por D-ANF (FREY *et al.*, 2006c), fornecendo mais evidências para a validade preditiva deste modelo farmacológico (HARRISON-READ, 2009).

É sabido que os transtornos mentais associados com elevação patológica da neurotransmissão de DA, tais como a esquizofrenia e mania, estão associados com um excesso de formação de espécies reativas de oxigênio (EROS) (BERK, 2009, BERK *et al.*, 2011). Deste modo, o dano oxidativo de proteínas e lipídios é um dos possíveis mecanismos que contribuem para a disfunção neuronal e glial em TAB (BERK *et al.*, 2011). Diversas evidências indicam que administrações repetidas de D-ANF induzem a hiperatividade em roedores estão associadas ao aumento do dano oxidativo lipídico e protéico em áreas do



cérebro tais como córtex pré-frontal (PFC), hipocampo (HC) e estriado (CE) (FREY *et al.*, 2006a; FREY *et al.*, 2006b; ANDREAZZA *et al.*, 2008; RIEGEL *et al.*, 2009). O tratamento com estabilizadores de humor pode prevenir e / ou reverter as alterações que abalam o equilíbrio oxidativo destas áreas do cérebro (FREY *et al.*, 2006c).

#### **1.4.3. Limitação da comercialização de Anfetaminas no Brasil**

Apesar do modelo de indução da mania com D-ANF ser estabelecido, reconhecido e confiável nas pesquisas no Brasil, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) determinou através da Resolução – RDC N° 52 de 6 de Outubro de 2011 a proibição da comercialização de anfetaminas com indicação clínica para inibir o apetite bem como seus derivados. Desde então, tal norma implicou também na escassez da matéria prima utilizada na pesquisa científica experimental, impossibilitando desenvolver novas investigações com D-ANF para o tratamento de TAB.

Diante disso, é que o presente estudo visa contribuir como possível modelo animal de mania através das pesquisas realizadas com o (Vyvanse®), medicamento aprovado e utilizado no Brasil desde 2011 para o tratamento de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH).

#### **1.5. Dimesilato de Lisdexanfetamina (LDX) e seu potencial como agente no modelo de mania**

Dimesilato de Lisdexanfetamina (LDX) (Vyvanse®) é um pró-fármaco para o tratamento de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH). Ele tem a designação química de (2S) -2,6-diamino-N-[(1S)-1-metil-2-fenil-etil] hexanamida dimetanosulfonato (Mattingly, 2010). Como um pró-fármaco, ele requer biotransformação para ser convertido a molécula de droga ativa, D-ANF. D-anfetamina, por sua vez, é o estereoisómero da molécula de ANF e é aproximadamente duas vezes mais potente que o metilfenidato, fármaco estruturalmente relacionado às anfetaminas. A molécula LDX está ligada covalentemente ao aminoácido L-lisina e quando biotransformada divide-se em L-lisina e D-ANF (a porção ativa do medicamento) (Figura 4). Tripsina, que é encontrada em abundância no trato gastrointestinal, acredita-se ser a principal enzima que converte LDX a D-ANF após administração oral (ROWLEY *et al.*, 2012). Devido a D-ANF ser conhecida por ter um elevado potencial de abuso, sua aquisição está sob estritas políticas reguladoras em vários países, o que limita a disponibilidade deste composto para uso em pesquisa (KOLAR *et al.*, 2008). As propriedades farmacocinéticas do LDX podem explicar a tendência para o abuso ligeiramente inferior deste

composto, quando comparado com D-ANF (JASINSKI e KRISHNAN, 2009; ROWLEY *et al.*, 2012). É importante notar que as respostas comportamentais induzidas pelo tratamento crônico de ratos com LDX permanecem desconhecidas. Em teoria, este composto pode proporcionar uma ferramenta alternativa para o desenvolvimento de um novo modelo farmacológico de mania.

**Figura 4: Conversão enzimática de LDX a L-Lisina e D-ANF ( Pennick, 2010).**

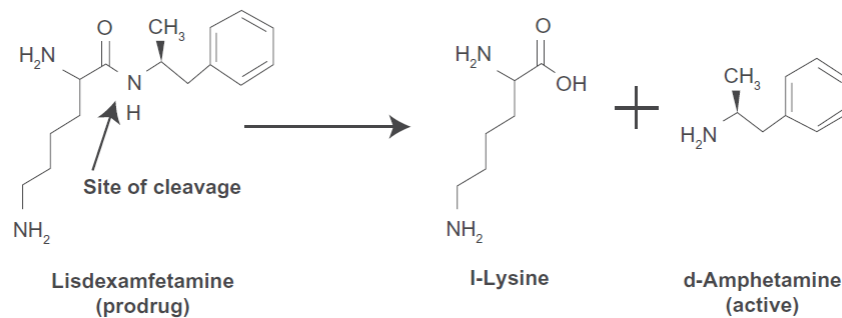


Figure 1 Enzymatic conversion of LDX to active d-amphetamine.  
Abbreviation: LDX, lisdexamfetamine dimesylate.

Assim, o presente estudo foi desenhado para: (1) testar os efeitos dose-resposta da administração sub-crônica de LDX na atividade locomotora de ratos, (2) investigar as alterações induzidas por LDX nos parâmetros de estresse oxidativo, ou seja, de peroxidação lipídica e glutatona reduzida (GSH), níveis de BDNF e alterações no volume cerebral das áreas PFC, HC e CE dos ratos e (3) testar os possíveis efeitos de lítio na prevenção e / ou reversão da hiperlocomoção induzida por LDX associada a alterações no balanço oxidativo e plasticidade.

## 2. JUSTIFICATIVA

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde, o TAB é considerado uma das dez principais causas de incapacidade no mundo (LOPEZ e MURRAY, 1998). Acomete de 1,5% - 4% das pessoas mundialmente (BALLONE, 2005). Tais fatores determinam o TAB como um problema de saúde pública e com necessidade de atenção específica e terapias eficazes.

Todavia, o contexto atual ainda permanece com poucas alternativas de tratamento, sendo o Li o principal medicamento utilizado devido seus efeitos antimaníacos, anti-suicida e levemente antidepressivos, atuando como estabilizante do humor. Tem a limitação da janela terapêutica ser muito pequena, podendo resultar em efeitos tóxicos quando administrado além da dosagem preconizada, sendo importante que o paciente que faz uso de tal medicação faça periódica avaliação da concentração sérica deste fármaco.

Alternativas farmacológicas utilizadas na fase maníaca são os anticonvulsivantes e antipsicóticos. Entretanto, a disponibilidade farmacológica ativa ainda é muito escassa, sendo necessário o avanço de pesquisas na investigação de novos e eficazes fármacos para esse transtorno.

A investigação pré-clínica tem como ferramenta principal os modelos animais, já que estes se apresentam como o meio para avanços em termos farmacológicos e de fisiopatologia de doenças que ainda encontram-se com lacunas quanto a sua gênese.

O modelo animal de TAB ainda se apresenta com limitações inerentes, já que ainda não é possível induzir no animal o processo de alternância entre as fases de mania e depressão que é característico no ser humano. Logo, tais modelos são executados separadamente e o modelo clássico de mania é o modelo induzido pelo fármaco da classe dos psicoestimulantes, d-ANF.

Contudo, devido ao uso irracional e abusivo dos fármacos desta classe, os órgãos de fiscalização e normatização para aquisição e comercialização de fármacos no país vetaram o comércio das anfetaminas no Brasil, inclusive dos derivados utilizados na pesquisa.

Diante disso, e com os insuficientes meios de investigação de novos fármacos para o TAB é que o presente projeto se propôs a estudar os efeitos do LDX como possível modelo alternativo de mania, pois além do fármaco ter a característica de após ser metabolizado se converter a D-ANF, é um medicamento de fácil aquisição em termos financeiros e logísticos.

### 3. OBJETIVOS

#### 3. Objetivo Geral

Investigar o potencial de Dimesilato de Lisdexanfetamina (LDX) como possível modelo animal do episódio de mania do TAB através da avaliação dos critérios de face, constructo e preditivo.

#### 3.1. Objetivos Específicos

- Critérios para validade de face:

- Realizar estudos dose-resposta para a determinação da dose ideal de LDX para validação do modelo animal de mania do TAB;
- Examinar a hiperlocomoção após administração sub-crônica de LDX em ratos machos;

- Critérios para validade de constructo:

- Determinar a presença de estresse oxidativo após a administração de LDX em diferentes áreas cerebrais de ratos através da determinação de defesas antioxidantes como:
  - Níveis de Glutationa Reduzida (GSH);
  - Níveis de Superóxido Dismutase (SOD)
- Verificar as alterações na concentração de Malonaldeído como medida da peroxidação lipídica em áreas cerebrais de animais após tratamento com LDX;
- Analisar os níveis de Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF) em áreas cerebrais de ratos após administração de LDX;
- Avaliar as alterações no volume cerebral das áreas CE, HC e PFC dos animais tratados com LDX em comparação com o grupo controle

- Critérios para validade preditiva

- Averiguar o efeito do estabilizante do humor Lítio na prevenção e reversão dos efeitos comportamentais e neuroquímicos de LDX em ratos machos;

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. Animais**

Foram utilizados ratos Wistar machos 75 dias (adultos) após o nascimento, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (UFC), ambientados em grupos de 6 animais em caixas de propileno  $26 \pm 2$  °C, a um ciclo claro/escuro de 12 h, recebendo ração padrão e água “*ad libitum*”. 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 (OLFERT *et al*, 1993), salientando que todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento dos animais. A presente pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética e Pesquisa Animal (CEPA) da UFC, com protocolo nº 65/2012.

### **4.2. Droga utilizada**

Dimesilato de Lisdexanfetamina (LDX; Vyvanse ®, Shire, EUA), e Carbonato de Lítio (Li; Sigma-Aldrich Corporation, St Louis, EUA) foram os fármacos utilizados.

Para o LDX inicialmente foi realizada uma curva dose-resposta para a determinação da dose de LDX capaz de induzir a hiperlocomoção, nas seguintes concentrações: 1,0 e 1,5 mg/kg. Como os resultados com doses mais baixas não foi significativo, doses maiores foram testadas, sendo as doses escolhidas de 10 e 30 mg/kg escolhidas para avaliar os outros parâmetros. As soluções foram preparadas diariamente e administradas por via oral (1ml/ 100 g de peso corporal) uma vez ao dia.

A dose de carbonato de Lítio foi 47,5mg/kg sendo preparada diariamente e administrada por via intraperitoneal duas vezes ao dia.

### **4.3. Estratégia experimental**

As metodologias seguidas na pesquisa basearam-se na sequência dos critérios para validação de um modelo animal de mania, os quais são denominados de face, constructo e preditivo. O protocolo inicial buscou determinar a validade de face, através da observação de qual dose administrada em ratos mimetizaria o comportamento característico e já estabelecido na pesquisa em que o animal com mania apresenta hiperlocomoção e após isto duas doses que indicaram esse perfil foram escolhidas para avaliação quanto à validade preditiva e de constructo.

Com as duas doses escolhidas foram avaliados parâmetros relacionados à fisiopatologia do TAB como estresse oxidativo (TBARS, SOD, GSH), Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF), sendo estes os parâmetros que valem como critério para validação de constructo.

Quanto à validade preditiva buscou-se avaliar o potencial preventivo e terapêutico do fármaco padrão utilizado para o TAB, o Li, em animais tratados com as doses 10 e 30mg/kg do fármaco LDX. O tratamento de prevenção simula a fase de manutenção da estabilidade do TAB.

#### **4.4. Tratamento dos animais e protocolo para avaliação de parâmetros de um modelo animal de mania**

Inicialmente os animais foram divididos em três grupos com tratamento de sete dias uma vez ao dia: Grupo 01 (tratamento com LDX 10mg/kg via oral); Grupo 02 (tratamento com LDX 30mg/kg via oral); Grupo 03 (Salina via oral). Nesse intervalo foi feito teste de campo aberto para avaliar no primeiro dia antes da primeira administração e no terceiro, quinto e sexto dia 2h após tratamento com o fármaco LDX. O período de avaliação de 2h foi escolhido baseado nos achados de Rowley *et al.*, 2012, nos quais o pico de efeito comportamental da LDX ocorreu em 90 – 120 min após a administração da droga, voltando aos níveis de controle 195 min após a administração. Da mesma forma o modelo animal de mania utilizando d-anfetamina estabelece o período de 120 min para avaliação das alterações comportamentais (FREY *et al.*, 2006). Com isso foi possível avaliar a hiperlocomoção do animal durante esse período e estabelecer uma curva em que se buscava relacionar efeito do fármaco ao comportamento do animal.

Os ratos foram divididos aleatoriamente em 11 grupos experimentais distribuídos em dois protocolos (Fig. 5 e Fig.6).

##### **4.4.1. Protocolo I - Dose-resposta para avaliar alterações comportamentais induzidas por LDX**

Um estudo de dose-resposta foi realizado para determinar a alteração na atividade locomotora induzida por LDX em ratos. Para este efeito, diferentes grupos de animais foram administrados por via oral durante 7 dias LDX (1,0, 1,5, 10 e 30 mg / kg).

Antes da primeira administração do fármaco, bem como 2 h após a administração de LDX no 3<sup>o</sup>, 5<sup>o</sup>, e 7<sup>o</sup> dias do tratamento, os animais tiveram a sua atividade locomotora avaliada usando o teste de campo aberto (descrita na seção 3.5.1), para determinar as alterações comportamentais induzidas por LDX em cada animal ao longo do tempo. Conforme mencionado acima, o intervalo de tempo de 2 horas após a administração LDX usado para determinações de comportamento foi baseado em estudos anteriores sobre D-ANF na indução de mania (FREY *et al.*, 2006a).

#### **4.4.2. Protocolo II – Determinação das alterações neuroquímicas induzidas por LDX )**

Os animais tratados com LDX nas doses de 10 e 30mg/kg foram sacrificados por decapitação e as áreas cerebrais córtex pré-frontal (PFC), hipocampo (HC) e corpo estriado (CE) foram dissecadas e congeladas (armazenadas a -70 ° C) até a determinação dos testes neuroquímicos, os quais foram: Análise de Presença de Estresse Oxidativo (GSH, SOD e TBARS), Dosagem de níveis do Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF) e Avaliação das Alterações do Volume Cerebral das áreas dissecadas, com a finalidade de avaliar parâmetros alterados e presentes na fisiopatologia do TAB. Estes testes estão descritos detalhadamente nas seções 3.5.2.2.; 3.5.2.3; 3.5.2.4; 3.5.2.5; 3.5.2.6.

#### **4.4.3. Protocolo III - Determinação do efeito de Li na prevenção e reversão das alterações comportamentais e neuroquímicas induzidas por LDX**

Com base na avaliação da dose-resposta de LDX foram selecionados as doses de 10 e 30 mg / kg da droga visando observar o efeito de prevenção e reversão dos efeitos do LDX quando tratados com Li.

#### **4.4.4. Tratamento prevenção**

No modelo de prevenção, simulamos a fase de manutenção do tratamento TAB, como proposto por Frey *et al.*, 2006c. Os diferentes grupos de animais foram tratados com Li (47,5 mg / kg ip) duas vezes ao dia ou uma solução salina durante 14 dias. Entre o 8<sup>o</sup> e o 14<sup>o</sup> dia, animais tratados com Li e solução salina receberam adicionalmente uma dose oral diária de LDX (10 ou 30 mg / kg, vo). O intervalo de tempo entre a administração das drogas foi de 1 hora. A atividade locomotora utilizando o teste de campo aberto (descrita na seção 3.5.1) foi avaliada no 1<sup>o</sup>, 7<sup>o</sup> e 14<sup>o</sup> dia 2 horas após a administração da droga (Fig. 1). De acordo com as regras e protocolo da pesquisa, os ratos foram sacrificados por decapitação e as áreas

cerebrais córtex pré-frontal (PFC), hipocampo (HC) e corpo estriado (CE) foram dissecadas e rapidamente congeladas e armazenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  até a determinação dos testes neuroquímicos.

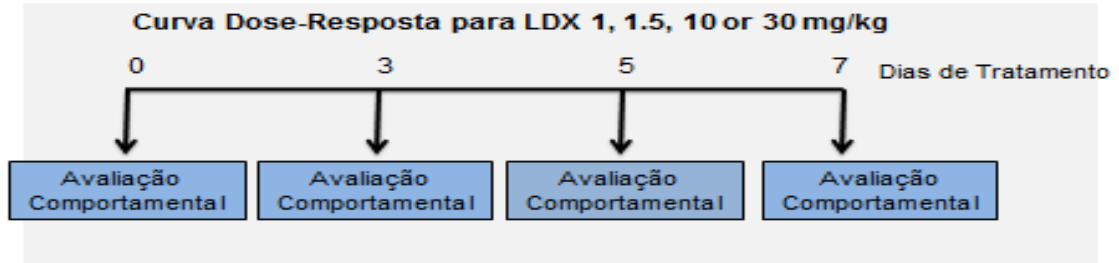
#### **4.4.5. Tratamento de reversão**

No modelo de reversão buscou-se reproduzir o tratamento de episódios maníacos agudos (FREY *et al.*, 2006c). Em resumo, cada um dos grupos de seis animais receberam uma dose oral diária de LDX (10 ou 30 mg / kg) ou solução salina durante 14 dias. No 8<sup>o</sup> dia de tratamento, os animais no grupo de solução salina e LDX receberam adicionalmente a administração intraperitoneal de Li (47,5 mg / kg) duas vezes por dia ou uma solução salina, com um intervalo de 1 hora entre os tratamentos. Atividade locomotora foi medida no 1<sup>o</sup>, 7<sup>o</sup> e 14 do tratamento, 2 horas após a administração da droga. Após as determinações comportamentais, os ratos foram sacrificados por decapitação e o PF, HC e CE dissecados e armazenados a  $-70^{\circ}\text{C}$  até a determinação dos testes neuroquímicos.



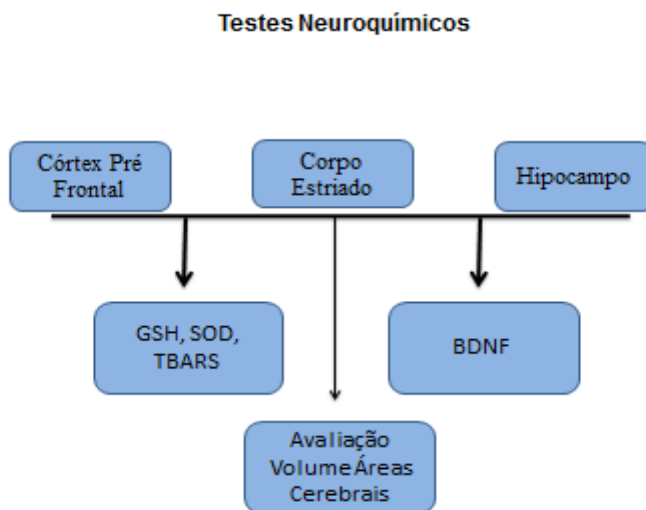
## Protocolo I

Figura 5: Protocolo curva dose-resposta grupos tratados com LDX



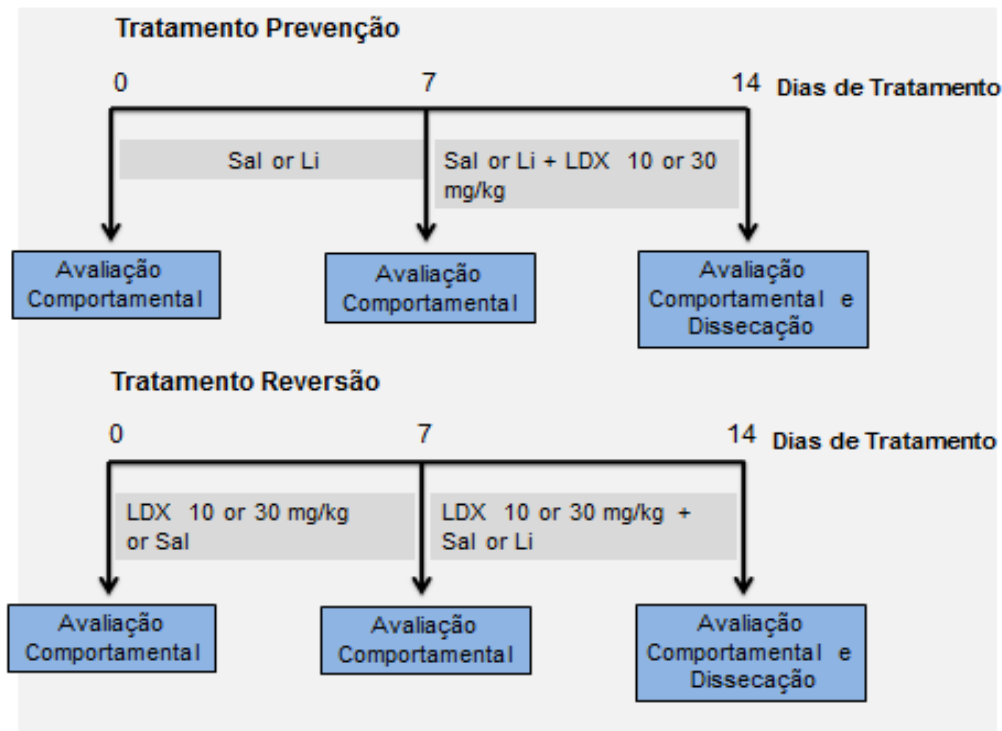
## Protocolo II

Figura 6: Testes Neuroquímicos realizados



### Protocolo III

**Figura 7: Protocolo tratamento prevenção e reversão grupos tratados com LDX, Lítio e Salina**



#### 4.5. Testes de comportamento e neuroquímicos realizados

##### 4.5.1. Teste de campo aberto

A atividade locomotora foi avaliada através do teste de campo aberto (Archer, 1973). Este teste foi realizado em um campo de 50 cm × 50 cm rodeado por paredes de 50 cm de altura feito de acrílico. O chão do campo aberto foi dividido em quatro partes iguais por linhas pretas. O aparelho foi colocado em uma sala com luz vermelha. Os animais foram cuidadosamente colocados no centro do campo e foi permitido que eles explorassem livremente o cenário por 1 min (período de habituação). Cruzamentos das linhas pretas - *crossings* (utilizado para determinar a atividade horizontal) foram quantificados por 5 minutos, bem como *rearings* (utilizado para determinar a atividade vertical).

## **4.5.2. Testes Neuroquímicos**

Conforme citado anteriormente, os testes neuroquímicos realizados foram GSH, TBARS, SOD, BDNF e Avaliação do Volume das Áreas Cerebrais das áreas dissecadas.

### **4.5.2.1 Preparação de tecido**

As amostras de tecido cerebral foram homogeneizadas (10 vezes (w/v) arrefecidas com gelo, com 0,1 M de tampão fosfato (pH 7,4). Os homogenatos foram centrifugados a 10.000 rpm durante 15 minutos, e alíquotas dos sobrenadantes foram separados e usados para a determinação dos parâmetros de estresse oxidativo.

### **4.5.2.2. Determinação de Glutathiona Reduzida (GSH)**

Os níveis de Glutathiona Reduzida foram avaliados para estimar defesas endógenas contra o estresse oxidativo. O método é baseado na reação de reagente de Ellman (DTNB), com grupos tiol livres. As áreas do cérebro foram diluídas em tampão de 0,02 M de EDTA (10% w / v) e adicionadas a uma solução de ácido tricloroacético a 50%. Após centrifugação (3000 rpm/15 min), o sobrenadante do homogeneizado foi recolhido e os níveis de GSH foram determinados (SEDLAK e HANUS, 1982). Resumidamente, as amostras foram misturadas com 0,4 M de tampão tris-HCl, pH 8,9 e 0,01 M de DTNB. Níveis de GSH foram determinados por espectrofotometria a 412 nm, calculada com base numa curva padrão de glutathiona e expressos como ng de GSH / g de tecido úmido.

### **4.5.2.3 Níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)**

O grau de lipoperoxidação nos tecidos foi medido através da determinação dos níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), conforme o método descrito por Huang *et al.* (1998), seguindo o protocolo: As amostras foram homogenizadas com tampão fosfato de potássio monobásico 50 mM pH 7,4, 63µL do homogenato foi misturado a 100 µL de ácido perclórico 35%, sendo estas centrifugadas (7000 rpm/15 min), no qual 150 µL do sobrenadante foram recuperados e misturado com 50 µL de ácido tiobarbitúrico 1,2%, e em seguida, estas amostras foram aquecidas em um banho de água fervente por 30 min. Após o resfriamento, a peroxidação lipídica foi determinada por absorvância a 535 nm e foi expressa como µmol MDA / g tecido.

Para a obtenção da curva-padrão de malonildialdeído (MDA), a partir da solução padrão de MDA, foram preparadas diluições em série (16,77; 9,16; 4,8; 2,463; 1,247 e 0,627

μmol). O branco foi feito com água destilada. A leitura da absorbância foi realizada a 520 e 535 nm, o valor utilizado foi a subtração da leitura em 535 da leitura em 520, para determinação da equação da curva-padrão de MDA

#### **4.5.2.4 Níveis de Superóxido Dismutase (SOD)**

A atividade da SOD foi mensurada de acordo com Sun, Oberley e Li (1988). A quantidade da enzima foi avaliada medindo-se a sua capacidade de inibir a redução fotoquímica do azul de nitro-tetrazólio (NBT). Neste método a riboflavina reduzida fotoquimicamente gera  $O^{2-}$  o qual reduz o NBT produzindo formazan que absorve no comprimento de onda de 560nm. Na presença da SOD a redução do NBT é inibida. Os resultados foram expressos em unidades da enzima por grama de proteína, que é a quantidade da SOD necessária para inibir a taxa de redução do NBT em 50%. O homogenato (10% em tampão fosfato) foi centrifugado (10 minutos, 3600 rpm a 4°C). O sobrenadante foi retirado e centrifugado novamente (20 min, 12000 rpm, 4°C). Para o ensaio utilizou-se o sobrenadante. Numa câmara escura foram misturados 1mL do meio de reação (tampão fosfato 50mM, EDTA 100nM e L-metionina 13mM pH 7,8), 30 μL da amostra, 150μL do NBT 75μM e 300 μL riboflavina 2μM. Os tubos contendo a solução obtida foram expostos a lâmpadas fluorescentes (15W) por 15 minutos. Ao término do tempo, levou-se o material ao espectrofotômetro com absorbância de 560nm. A concentração de proteínas foi medida utilizando o método de Bradford (1976).

#### **4.5.2.5 Níveis de Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF)**

Após homogeneização das áreas cerebrais a 20 volumes de tampão PBS pH 7,4 foi adicionado inibidores de protease (Sigma-Aldrich), o nível de BDNF de cada amostra foi quantificado por ensaio imunoenzimático (ELISA; R&D Systems, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Os resultados foram expressos em picograma de BDNF/ mg de proteína total determinada pelo método de Lowry (1951).

#### **4.5.2.6. Avaliação Volume das Áreas Cerebrais Dissecadas (Grupos Tratados vs Controle)**

Anteriormente a homogeneização das áreas cerebrais (CE, PFC e HC) as mesmas foram pesadas logo após a dissecação. Vale salientar que a dissecação seguiu o mesmo padrão em todos os animais visando manter a mesma espessura em todas as áreas e para que tal procedimento não interferisse em posterior avaliação. Posteriormente, os volumes foram comparados estatisticamente com os do grupo controle. Os resultados foram expressos em mg.

#### **4.6. Níveis séricos de medições de lítio**

Seguindo a decapitação, o soro de cada animal tratado com lítio foi separado por centrifugação. Os ensaios foram realizados com um fotômetro de chama digital (AP LabNova série 1500, São Paulo, Brasil). Animais apresentaram níveis de lítio no intervalo de 0,8-1,1 mEq / l, tal como recomendado para o tratamento de pacientes com TAB (HOPKINS e GELENBERG, 2000).

#### **4.7. Análise estatística**

O software utilizado para análise dos dados foi o GraphPad Prism versão 5.0 para Windows, GraphPad Software (San Diego, CA, EUA).

Os resultados dos estudos comportamentais foram expressos como a média  $\pm$  EPM (erro padrão da média) dos números de cruzamentos e levantamentos no teste de campo aberto. Estes dados foram analisados com Two way ANOVA tendo o tratamento farmacológico e o tempo como parâmetros, seguido pelo teste de Bonferroni.

Os resultados dos estudos neuroquímicos foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) e foram analisados com One-Way ANOVA seguido por um teste de Student-Newman-Keuls. Para todas as análises, o nível de significância foi  $p < 0,05$ .

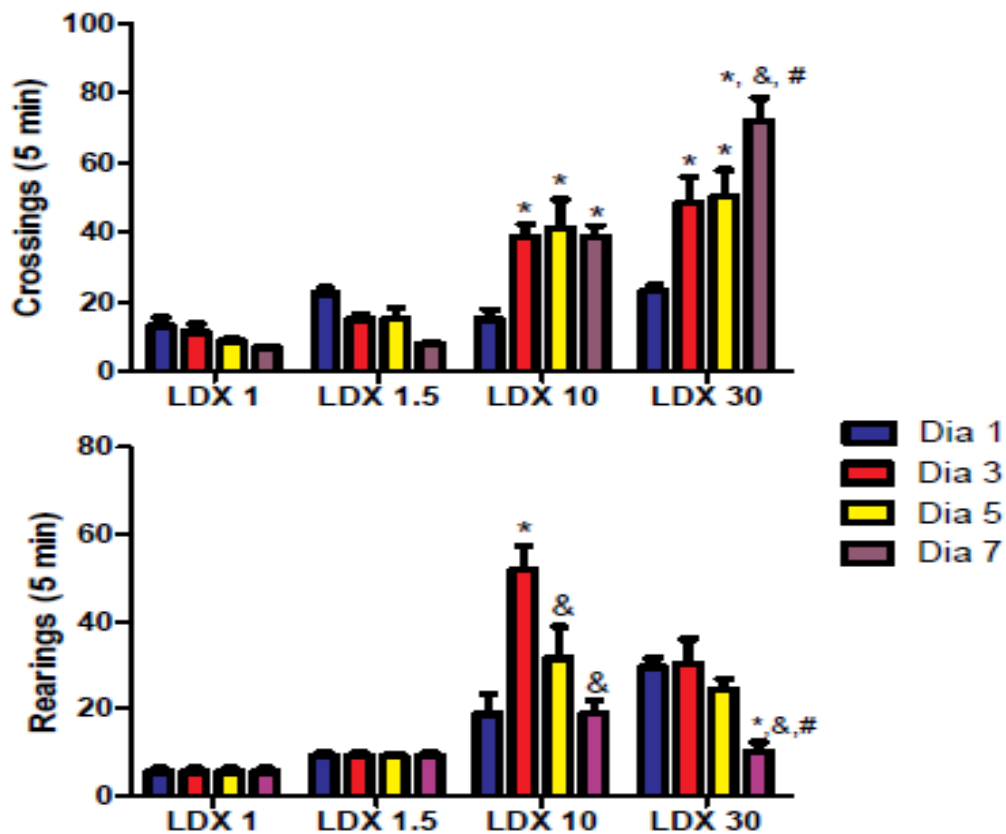
## 5. RESULTADOS

### 5.1. PROTOCOLO I – CRITÉRIO DE FACE (AVALIAÇÃO DA DOSE-RESPOSTA ÀS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS INDUZIDAS POR LDX)

A análise da interação entre o número de cruzamentos dos animais ao longo do tempo no teste de campo aberto (interação tratamento x tempo) usando two-way ANOVA revelou efeitos significativos de tempo ( $F = 8,408$ ,  $df = 3$ ,  $P < 0,0001$ ) e tratamento ( $F = 52,17$ ,  $df = 3$ ,  $P < 0,0001$ ) (Figura 8). Desta forma, a administração diária de LDX na dose de 10mg/kg induziu um aumento significativo na atividade locomotora horizontal nos 3<sup>o</sup>, 5<sup>o</sup> e 7<sup>o</sup> dias de administração da droga, quando comparado com o 1<sup>o</sup> dia de tratamento ( $p < 0,001$ ). Similarmente, LDX na dose de 30mg/kg induziu um aumento progressivo na locomoção com a atividade registrada no 7<sup>o</sup> dia sendo significativa quando comparado ao primeiro, terceiro e quinto dia de tratamento ( $p < 0,001$ ). Alterações significativas no número de cruzamentos foram observados apenas em doses de 10 e 30 mg/kg de LDX; as doses de 1,0 e 1,5 mg / kg de LDX não conseguiram alterar este parâmetro (Figura 8).

A atividade vertical do animal (*rearings*) observada ao longo do tempo (Figura 8) também apresentou resultado significativo quando foi avaliada a interação do tratamento ( $F = 11,15$ ,  $df = 3$ ,  $P < 0,0001$ ) x tempo ( $F = 57,60$ ,  $df = 3$ ,  $P < 0,0001$ ). A LDX na dose de 10mg/kg aumentou significativamente o número de *rearings* no 3<sup>o</sup> dia de administração do medicamento ( $P < 0,001$ ). Por outro lado, foi observado um decréscimo no 5<sup>o</sup> dia ( $P < 0,05$ ) e 7<sup>o</sup> dia ( $P < 0,001$ ) de tratamento, quando comparado com o 3<sup>o</sup> dia de administração da droga, com valores próximos aos registrados no 1<sup>o</sup> dia. Um decréscimo na atividade vertical do animal do grupo de LDX na dose de 30mg/kg também foi observado no 7<sup>o</sup> dia, quando comparado com o primeiro, terceiro e quinto dia de tratamento ( $p < 0,01$ ).

Figura 8: Número de cruzamentos e *rearings* dos animais submetidos a quatro diferentes doses (1, 1,5, 10 e 30 mg / kg) de Dimesilato de Lisdexanfetamina (LDX) durante 7 dias.



As barras representam a média  $\pm$  erro padrão da média do número de travessias (*crossings*) ou *rearings* (n = 6-10 animais por grupo). \*P  $\leq$  0,05 versus dia 1; &P  $\leq$  0,05 versus dias 3 e #P  $\leq$  0,05 versus dia 5 de acordo com Two-way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni post hoc.

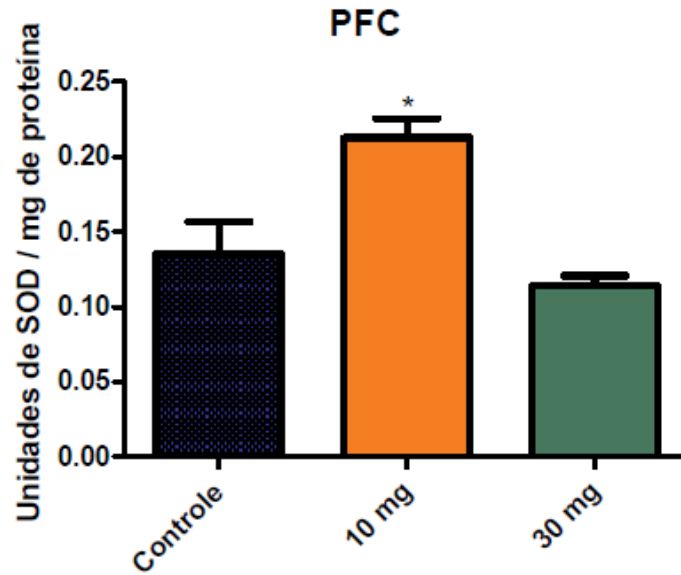
## **5.2. PROTOCOLO II – CRITÉRIO DE CONSTRUCTO (AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES NEUROQUÍMICAS INDUZIDAS POR LDX).**

### **5.2.1. Determinação da atividade da Superóxido Dismutase (SOD)**

Após o tratamento de sete dias com LDX nas doses de 10 e 30 mg/kg os animais foram eutanasiados por decapitação e dissecados com o objetivo de determinar a atividade da enzima SOD. Observou-se que os animais submetidos ao tratamento com LDX na dose de 10 mg/kg apresentaram alteração na atividade enzimática da SOD no córtex pré-frontal (PFC) em relação ao grupo controle (Controle:  $0,1373 \pm 0,02100$ ; LDX 10mg :  $0,2086 \pm 0,01277$ ; LDX 30mg:  $0,1148 \pm 0,006486$  ( Figura 9 ). No corpo estriado não houve alteração estatística significativa, embora tenha havido uma tendência ao aumento da dosagem de SOD nos animais onde foi administrado LDX 10mg (Controle:  $0,1806 \pm 0,008585$ ; LDX 10mg :  $0,2782 \pm 0,08326$ ; LDX 30mg:  $0,1906 \pm 0,01612$ ) (Figura 10 ). No hipocampo também não houve significância estatística na dosagem de SOD, mesmo com o aumento nos níveis da enzima nos animais tratados com LDX 10mg/kg (Controle:  $0,06929 \pm 0,01478$ ; LDX 10mg :  $0,1569 \pm 0,02732$ ; LDX 30mg:  $0,1246 \pm 0,01855$ . (Figura 11).

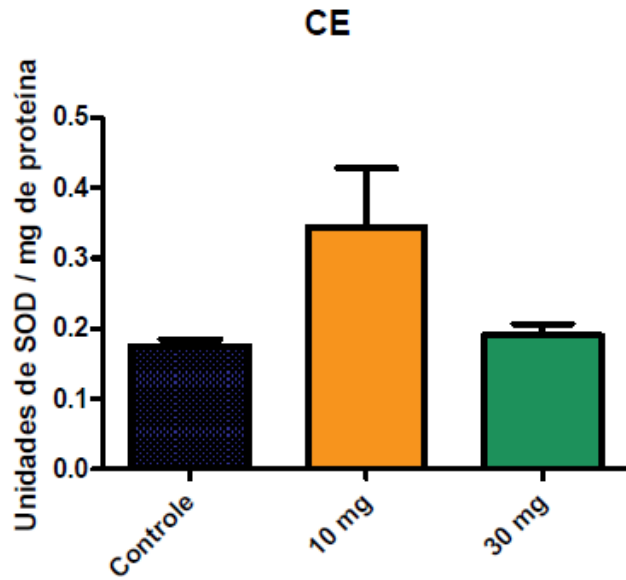


**Figura 9: Atividade da enzima Superóxido Dismutase no córtex pré-frontal de animais controle e tratados com LDX nas doses de 10 e 30mg/kg .**



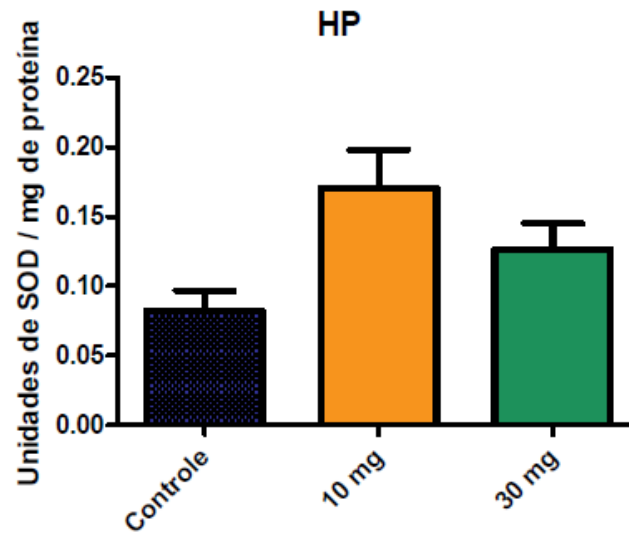
Cada barra representa a média  $\pm$  EPM de 6-10 animais por grupo. \* $p \leq 0,05$  quando comparado com animais controle. ANOVA seguida por Student-Newman Keuls.

**Figura 10: Atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD) no corpo estriado de animais controle e tratados com LDX nas doses de 10 e 30mg/kg .**



Cada barra representa a média  $\pm$  EPM de 6-10 animais por grupo. ANOVA seguida por Student-Newman Keuls.

**Figura 11: Atividade da enzima Superóxido Dismutase no hipocampo de animais controle e tratados com LDX nas doses de 10 e 30 mg/kg**



Cada barra representa a média  $\pm$  EPM de 6-10 animais por grupo. ANOVA seguida por Student-Newman Keuls.

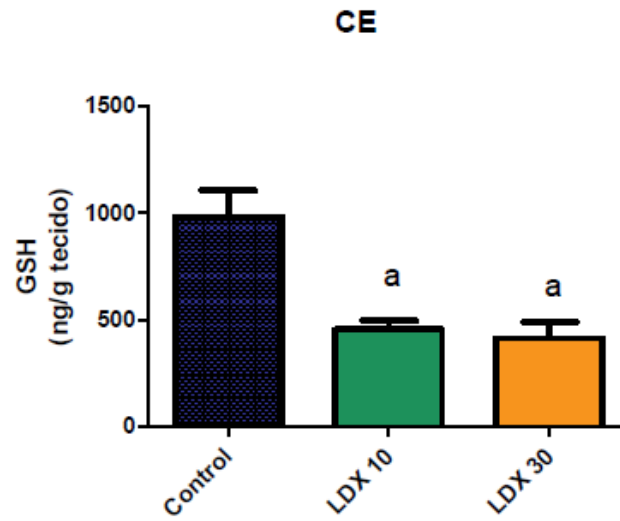
### 5.2.2.Determinação dos níveis de Glutathiona Reduzida (GSH)

No CE observou-se que o conteúdo de GSH diminuiu significativamente nos animais tratados com ambas as doses de LDX quando comparados ao grupo controle (Controle :  $895,2 \pm 121,5$ ; LDX 10mg:  $425,0 \pm 41,57$ ; LDX 30mg:  $327,3 \pm 77,92$ ) ( Figura 12).

No PFC também houve decréscimo nos níveis de GSH nos dois grupos de LDX 10 e 30mg/kg (Controle:  $611,2 \pm 35,99$ ; LDX 10mg:  $234,2 \pm 52,59$ ; LDX 30mg:  $262,1 \pm 39,42$  ( Figura 13).

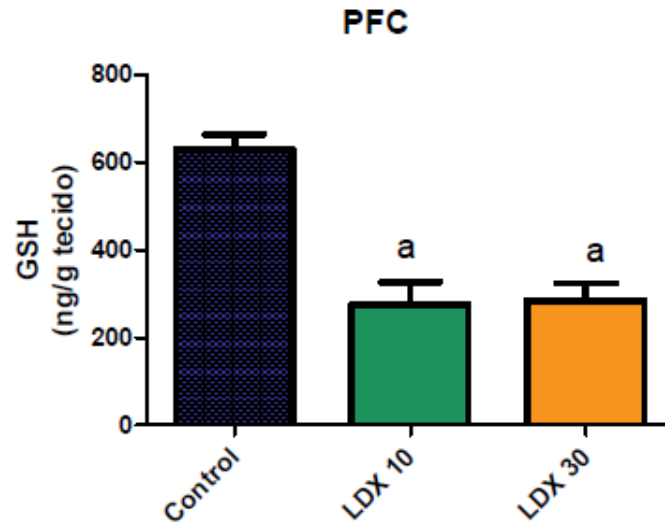
Já no HC os níveis de GSH não apresentaram variação significativa em animais tratados com LDX quando comparados ao controle ( Figura 14).

**Figura 12: Níveis de Glutathiona Reduzida no corpo estriado de animais controle e animais submetidos ao tratamento com LDX nas doses de 10 e 30mg/kg**



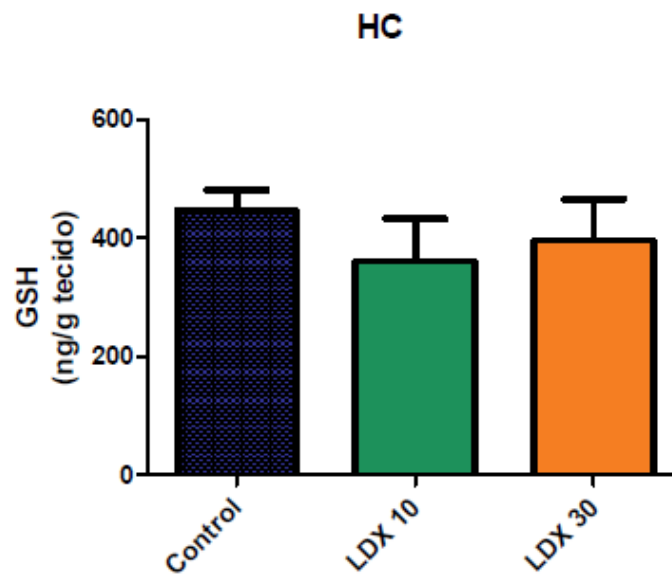
Cada barra representa a média  $\pm$  EPM de 6 animais por grupo. <sup>a</sup> $p \leq 0,05$  quando comparado com animais controle. ANOVA seguida por Student-Newman Keuls.

**Figura 13: Níveis de Glutathiona Reduzida (GSH) no córtex pré-frontal de animais controle e animais submetidos ao tratamento com LDX nas doses de 10 e 30mg/kg.**



Cada barra representa a média  $\pm$  EPM de 6 animais por grupo. <sup>a</sup> $p \leq 0,05$  quando comparado com animais controle. ANOVA seguida por Student-Newman Keuls.

**Figura 14: Níveis de Glutathiona Reduzida no hipocampo de animais controle e animais submetidos ao tratamento com LDX nas doses de 10 e**



**30mg/kg.**

Cada barra representa a média  $\pm$  EPM de 6 animais por grupo. ANOVA seguida por Student-Newman Keuls.

### 5.2.3. Determinação dos níveis de peroxidação lipídica

Para avaliar as alterações na peroxidação lipídica em animais submetidos ao tratamento com LDX nas doses de 10 e 30mg/kg os níveis de MDA, a principal espécie reativa ao ácido tiobarbitúrico, foram determinados. Em todas as áreas avaliadas observou-se aumento nos níveis de MDA.

No CE os níveis de MDA mostraram-se aumentados nos animais tratados com ambas as doses de LDX em comparação aos ratos controle ( Controle:  $116,9 \pm 19,72$ ; LDX 10mg:  $717,3 \pm 65,98$ ; LDX 30:  $239,4 \pm 18,64$  ) (Figura 15).

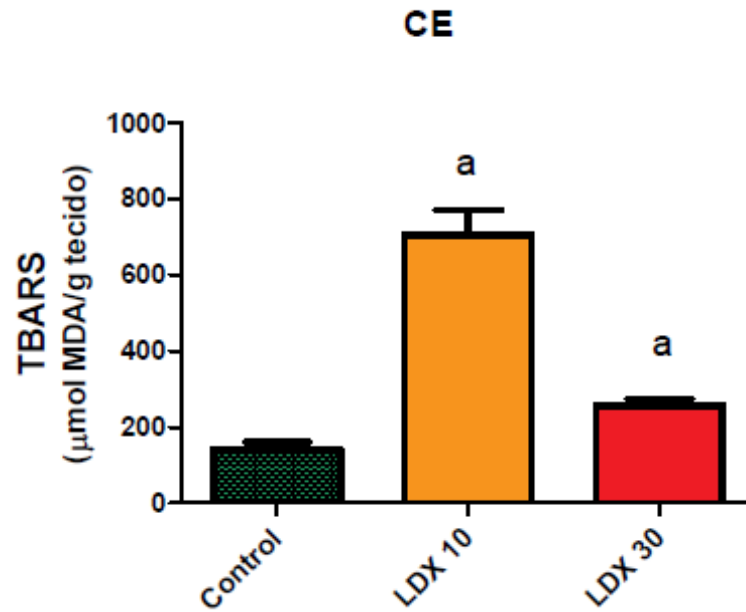
No HC os níveis de MDA também observou-se alteração em ambas as doses quando comparado aos animais controle ( Controle:  $81,76 \pm 9,825$ ; LDX 10mg:  $544,0 \pm 56,60$  ; LDX 30:  $632,2 \pm 32,15$ ) (Figura 16).

No PFC LDX 10 e 30 mg/kg aumentaram os níveis de MDA quando comparado aos animais controle ( Controle:  $89,77 \pm 7,059$  ; LDX 10mg:  $591,2 \pm 36,81$  ; LDX 30:  $328,5 \pm 30,06$ ) (Figura 17).

Nas três áreas cerebrais observou-se o aumento da peroxidação lipídica com a dose de 10 mg/kg, indicando o potencial maior deste em mimetizar a patologia do TAB, aspecto que se caracteriza no valor preditivo de um modelo animal de doença.

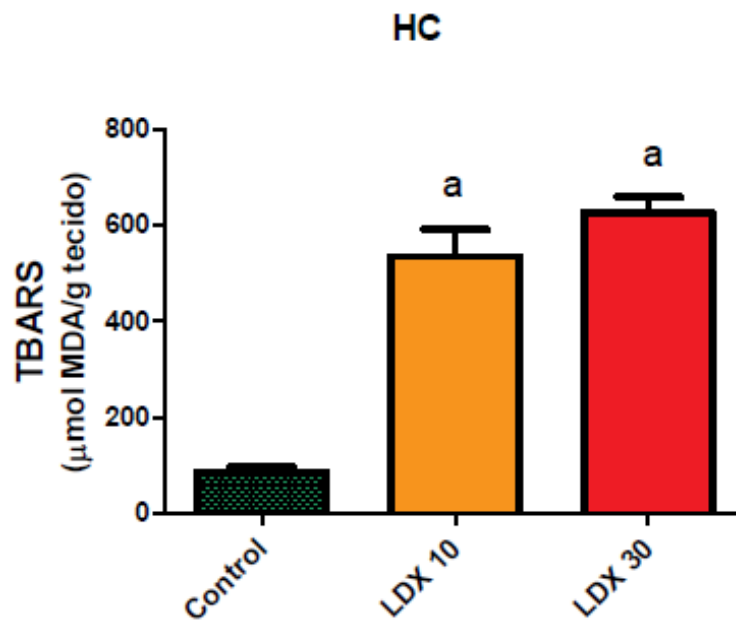


**Figura 15:** Níveis de MDA (marcador de peroxidação lipídica) no corpo estriado de animais controle e tratados com dose de 10 e 30mg/kg de LDX.



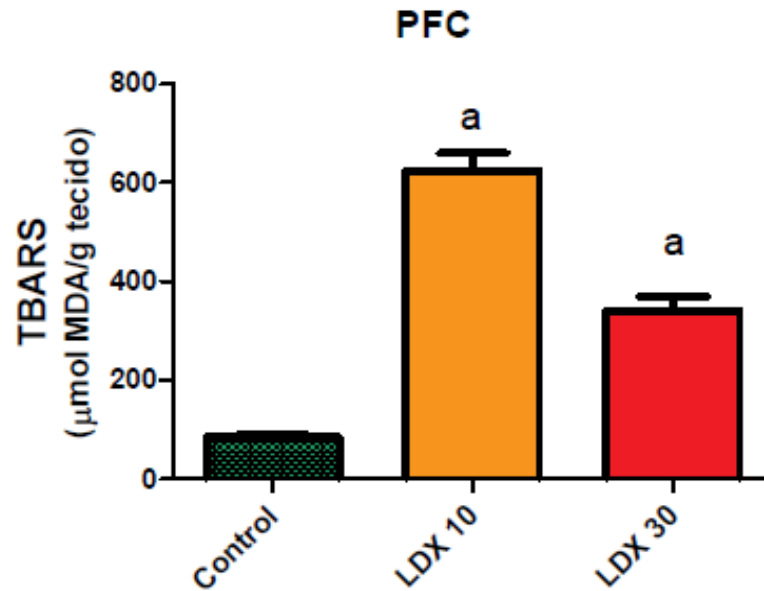
Cada barra representa a média  $\pm$  EPM de 6-10 animais por grupo. <sup>a</sup> $p \leq 0,05$  quando comparado com animais controle. ANOVA seguida por Student-Newman Keuls.

**Figura 16: Níveis de MDA (marcador de peroxidação lipídica) no hipocampo de animais controle e tratados com dose de 10 e 30mg/kg de LDX.**



Cada barra representa a média  $\pm$  EPM de 6-10 animais por grupo. <sup>a</sup> $p \leq 0,05$  quando comparado com animais controle. ANOVA seguida por Student-Newman Keuls.

**Figura 17: Níveis de MDA (marcador de peroxidação lipídica) no córtex pré frontal de animais controle e tratados com dose de 10 e 30mg/kg de LDX**



Cada barra representa a média  $\pm$  EPM de 6-10 animais por grupo. <sup>a</sup> $p \leq 0,05$  quando comparado com animais controle. ANOVA seguida por Student-Newman Keuls.

#### **5.2.4. Determinação do Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF) em animais tratados com LDX**

As neurotrofinas, em especial o BDNF, parecem estar implicadas no mecanismo fisiopatológico de diversos transtornos psiquiátricos, dentre eles, o TAB.

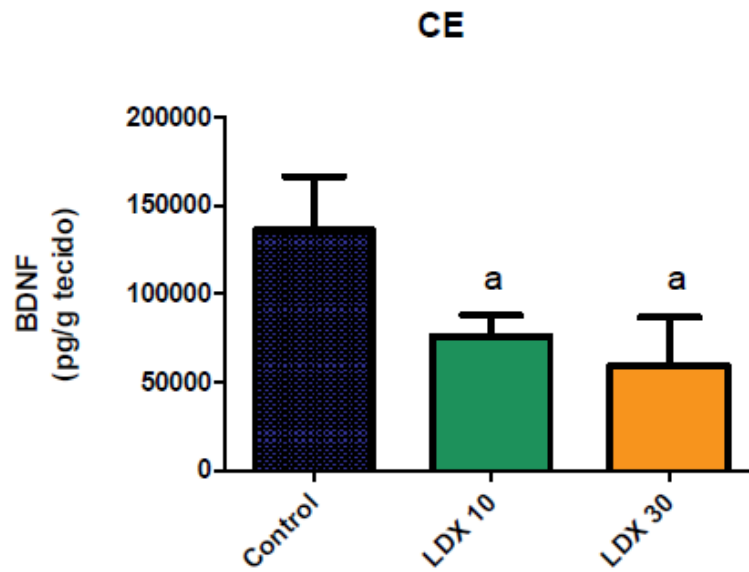
Ao avaliar este parâmetro nos animais tratados com LDX observou-se diminuição nos níveis de BDNF no tratamento com ambas as doses de LDX.

No CE foi observado diminuição dos níveis quando comparado ao controle (Controle:  $91902 \pm 30603$  ; LDX 10mg:  $73723 \pm 11859$  ; LDX 30:  $61257 \pm 27698$ ). (Figura 18)

No HC os níveis de BDNF também diminuíram quando comparados ao controle ( Controle:  $603669 \pm 97311$ ; LDX 10mg:  $437303 \pm 24186$  ; LDX 30:  $346927 \pm 31721$ ) (Figura 19).

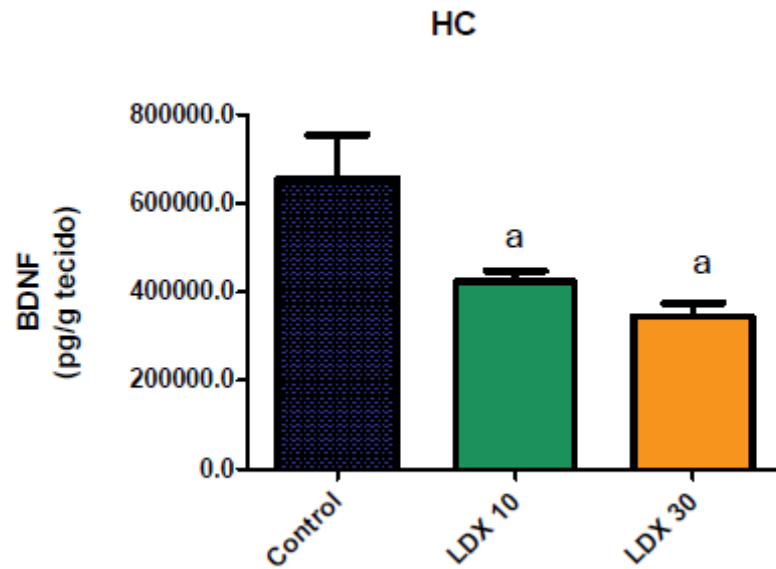
No PFC houve uma diminuição significativa de BDNF quando comparado aos níveis do controle (Controle:  $299142 \pm 51638$  ; LDX 10mg:  $69568 \pm 9961$ ; LDX 30mg:  $36326 \pm 28432$ ) (Figura 20).

**Figura 18:** Níveis de BDNF (Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro) no corpo estriado de animais controle e tratados com dose de 10 e 30mg/kg de LDX.



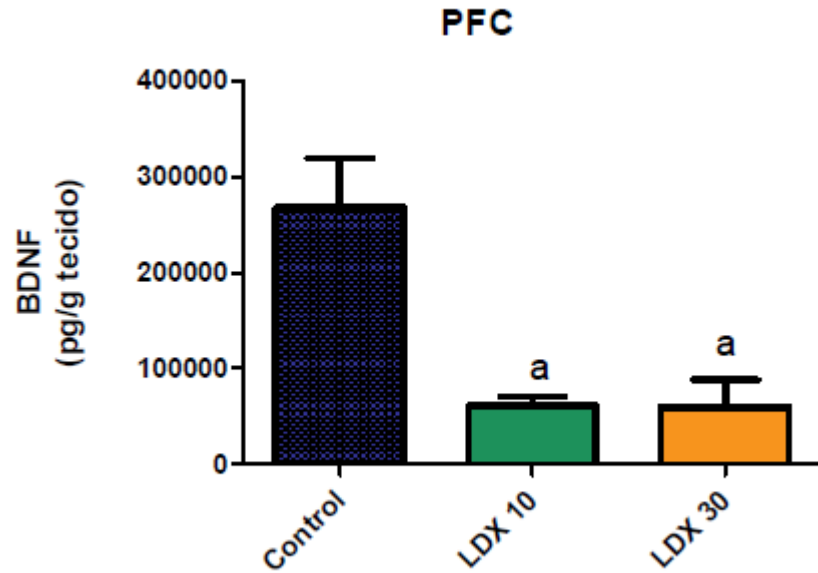
Cada barra representa a média  $\pm$  EPM de 6-10 animais por grupo. <sup>a</sup> $p \leq 0,05$  quando comparado com animais controle. ANOVA seguida por Student-Newman Keuls.

**Figura 19: Níveis de BDNF (Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro) no hipocampo de animais controle e tratados com dose de 10 e 30mg/kg de LDX.**



Cada barra representa a média  $\pm$  EPM de 6-10 animais por grupo. <sup>a</sup> $p \leq 0,05$  quando comparado com animais controle. ANOVA seguida por Student-Newman Keuls.

**Figura 20:** Níveis de BDNF (Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro) no córtex pré-frontal de animais controle e tratados com dose de 10 e 30mg/kg de LDX.

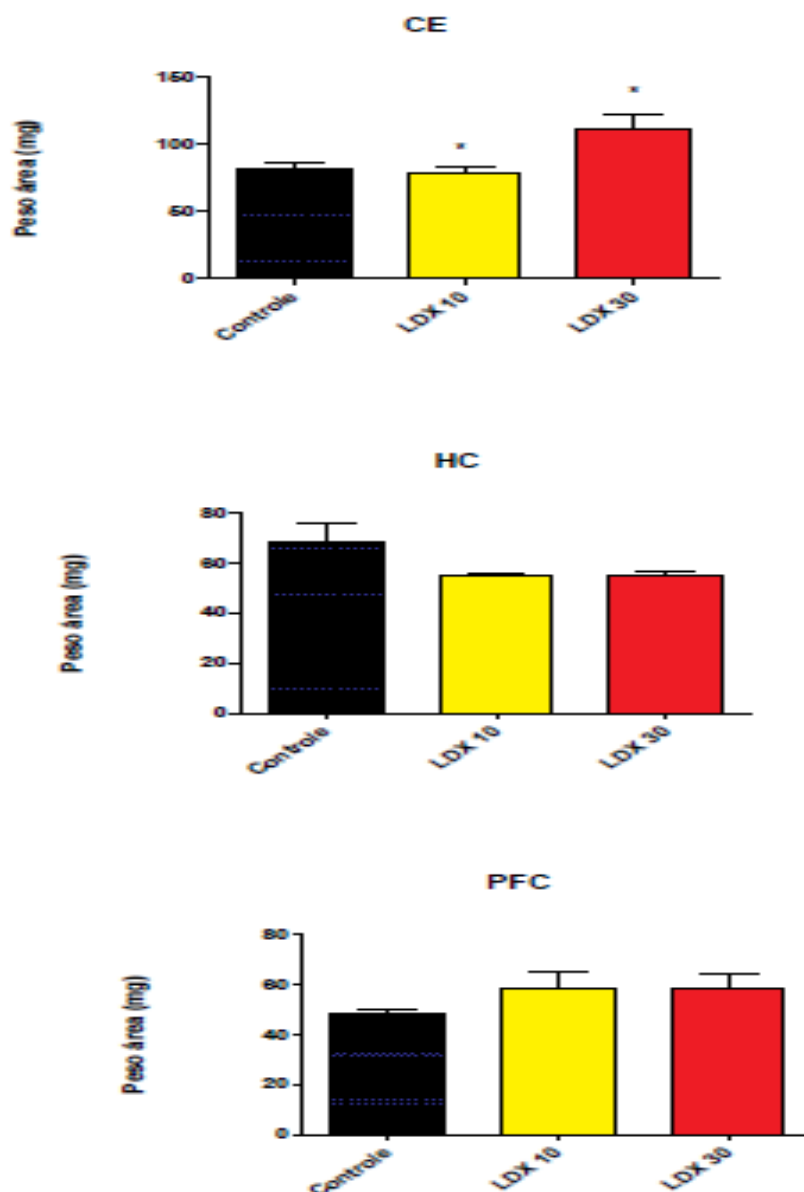


Cada barra representa a média  $\pm$  EPM de 6-10 animais por grupo. <sup>a,b,c,d</sup>  $p \leq 0,05$  quando comparado com animais controle. ANOVA seguida por Student-Newman Keuls.

### 5.2.5. Determinação das alterações do Volume Cerebral das Áreas dissecadas dos animais tratados com LDX

O volume da área PFC dos animais tratados com LDX 10 e 30mg/kg aumentou quando comparado ao grupo controle (PF – LDX 10:  $16,93 \pm 3,96$ ; LDX 30:  $15,59 \pm 4,73$ ) enquanto HC diminuiu (HC- LDX 10:  $14,03 \pm 3,92$ ; LDX 30:  $13,44 \pm 3,76$ ) e no CE somente alterou com aumento na dose de 30mg/kg (CE – LDX 30:  $30,32 \pm 4,76$ ).

**Figura 21: Níveis de variação no volume cerebral das áreas CE, HC e PFC de animais controle e tratados com dose de 10 e 30mg/kg de LDX.**



Cada barra representa a média  $\pm$  EPM de 6-10 animais por grupo. <sup>a,b,c,d</sup>  $p \leq 0,05$  quando comparado com animais controle. ANOVA seguida por Student-Newman Keuls.



### **5.3. PROTOCOLO III – CRITÉRIO PREDITIVO (AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICAS INDUZIDAS POR LDX - PREVENÇÃO E REVERSÃO POR LÍTIU).**

#### **5.3.1. TRATAMENTO DE PREVENÇÃO**

A análise do número de cruzamentos dos animais entre os quadrantes do campo aberto ao longo do tempo nos grupos submetidos ao tratamento de prevenção (Figura 22A) não revelou alteração significativa quando comparado tratamento x tempo. Na verdade, a administração de Li durante 7 dias não resultou em diferenças na atividade locomotora. Da mesma forma, a co-administração de Li e LDX manteve inalterada a atividade locomotora dos animais, em comparação com o 1º e 7º dia, em ambas as doses LDX estudadas. No que diz respeito à atividade vertical do animal no campo aberto (Figura 22B), a administração de Li durante 7 dias diminuiu este parâmetro ( $P < 0,05$ ). A co-administração de Li e LDX 10mg, entre o 8º e 14º dia não preveniu as alterações na atividade vertical do animal (Figura 22C). Por outro lado, os animais tratados com Li e LDX 30mg/kg apresentaram um decréscimo na atividade vertical, que foi significativa em comparação com o 1º e 7º dia de tratamento ( $P < 0,05$ ) (Figura 22D).

A análise dos parâmetros de estresse oxidativo em animais submetidos ao tratamento de prevenção (Figura 23) demonstrou que a administração de LDX nas doses de 10 e 30mg/kg reduziu o teor de GSH no PFC e CE, em comparação com animais controle (PFC -  $F [2,16] = 24,97$ ,  $P < 0,001$ ; ST -  $F [2,16] = 11,24$ ,  $P < 0,01$ ). No PFC, a queda nos níveis de GSH induzida pela administração de LDX nas doses de 10 e 30 mg/kg foi significativamente prevenida por Li ( $F [6,38] = 2,511$ ,  $P < 0,05$ ). O pré-tratamento com Li preveniu queda nos níveis de GSH ( $p < 0,05$ ) no CE de animais tratados com LDX 10 mg / Kg. Entretanto, o Li não conseguiu prevenir a diminuição nos níveis de GSH no CE de animais tratados com LDX na dose de 30mg/kg. Não foram observadas alterações nos níveis de GSH no HC.

A administração de LDX nas doses de 10 e 30mg/kg aumentou significativamente a peroxidação lipídica representada pelo teor de MDA em todas as áreas do cérebro estudados em comparação com os animais controle (Figura 23). No PFC ( $F [6,37] = 52,38$ ,  $P < 0,001$ ), HC ( $F [6,39] = 75,28$ ,  $P < 0,001$ ) e CE ( $F [6,40] = 54,47$ ,  $P < 0,001$ ) o Li impediu acréscimos nos níveis de MDA induzidos por ambas as doses de LDX.

Ambas as doses de LDX induziram diminuição nos níveis de BDNF nos animais tratados. Entretanto, o Li não conseguiu prevenir tal ação do LDX, permanecendo baixos os níveis de BDNF com o co-tratamento de Li e LDX (Figuras 25, 26 e 27).

Na análise da variação do volume cerebral dos grupos de prevenção observou-se que no PFC houve uma diminuição tanto quando comparado ao controle como quando comparado aos grupos tratados somente com LDX 10 e 30mg/kg (Figura 28).

Devido não ter havido significância estatística no critério de constructo quanto a dosagem de SOD tal parâmetro não foi avaliado na fase de prevenção.

### **5.3.2. TRATAMENTO REVERSÃO**

Os resultados das alterações na atividade locomotora no teste do campo aberto dos animais submetidos ao tratamento de reversão analisados através do Two-way ANOVA revelou efeito significativo do tempo x tratamento ( $F = 16,27$ ,  $gl = 2$ ,  $P < 0,0001$ ) (Figura 8 ). A administração de LDX nas doses de 10 e 30mg/kg durante 7 dias provocou um aumento significativo na atividade locomotora horizontal dos animais ( $P < 0,01$ ). A co-administração de LDX 10mg/kg e Li entre o 8º e o 14º dia, diminuiu significativamente a hiperatividade induzida pela LDX 10 mg/kg ( $P < 0,01$ ) quando comparado com o 7º dia. Pelo contrário, a co-administração de LDX 30mg/kg e Li não alterou a hiperlocomoção induzida por LDX 30mg/kg ( $P < 0,01$ ) quando comparado com o 1º dia. Já a co-administração de LDX 10mg/kg com Li, bem como de LDX 30mg/kg com Li diminuiu significativamente a atividade vertical no campo aberto ( $P < 0,05$ ) quando se observa o 7º dia em comparação com o 1º dia, um efeito que persistiu até ao 14º dia ( $P < 0,05$ ).

A avaliação dos níveis de GSH e de peroxidação lipídica (Figura 23) nos animais submetidos ao tratamento de reversão demonstrou uma diminuição no conteúdo de GSH no PFC causada por LDX 10 e 30mg/kg e que a alteração foi significativamente revertida por Li em ambas doses ( $F [6,38] = 2,511$ ,  $P < 0,05$ ). Contudo, o, Li não reverteu a diminuição nos níveis de GSH no CE induzida por ambas as doses de LDX. No HC não foram observadas alterações.

A presença de peroxidação lipídica causada por LDX nas doses de 10 e 30mg/kg quando comparado ao controle foi significativamente revertida por Li em todas as doses e

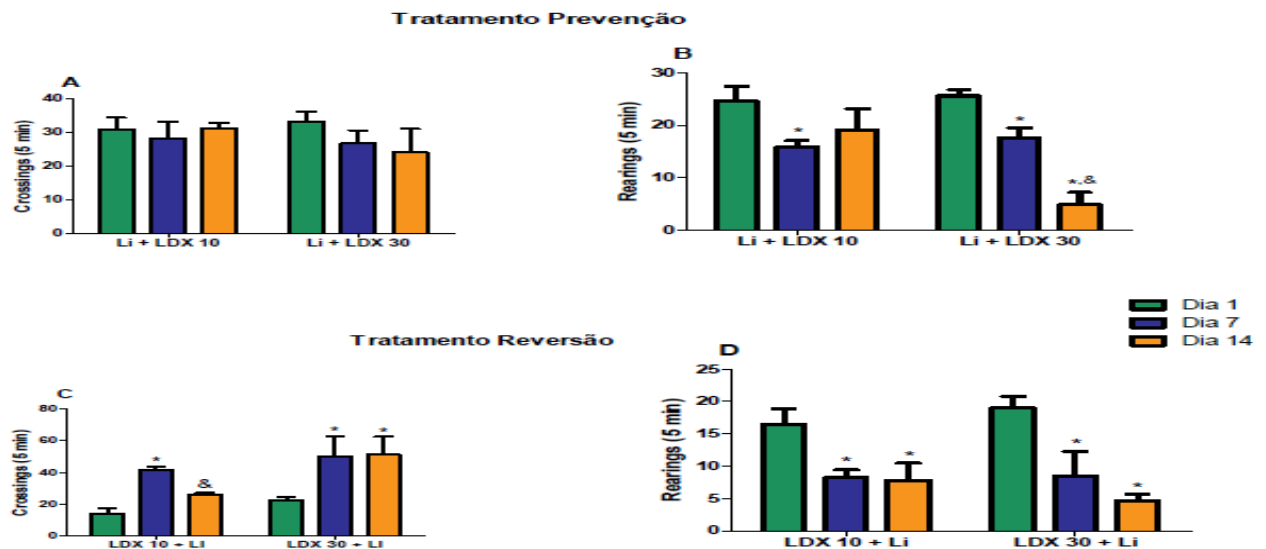
áreas cerebrais estudadas: PFC (F [6,37] = 52,38, P <0,001), HC (F [6,39] = 75,28, P <0,001) e CE (F [6,40] = 54,47, P <0,001) (Figura 24).

Os baixos níveis de BDNF após tratamento com ambas as doses de LDX não foram revertidos com a administração de Li (Figuras 25, 26 e 27).

A avaliação do volume das áreas cerebrais estudadas não apresentou reversão quando comparadas ao peso das áreas do grupo controle: PFC (F [20,00] = 0,8108, P <0,001), HC (F [9,086] = 0,6375, P <0,0001) e CE (F [10,96] = 0,6868, P <0,0001) (Figura 28).

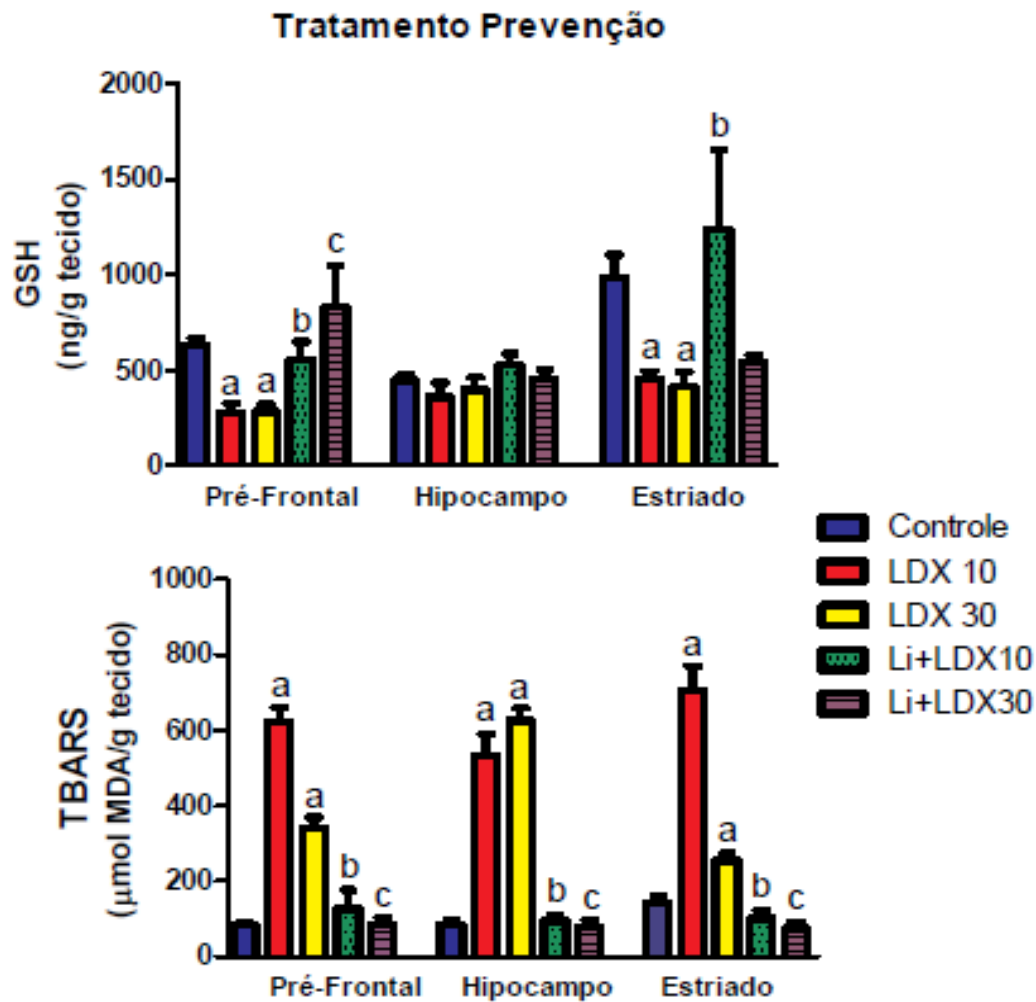
Devido não ter havido significância estatística no critério de constructo quanto à dosagem de SOD tal parâmetro não foi avaliado na fase de prevenção.

**Figura 22: Número de crossings (A) e rearings (B) no tratamento de prevenção. Número de crossings (C) e rearings (D), no tratamento de reversão (n = 6-10 animais por grupo).**



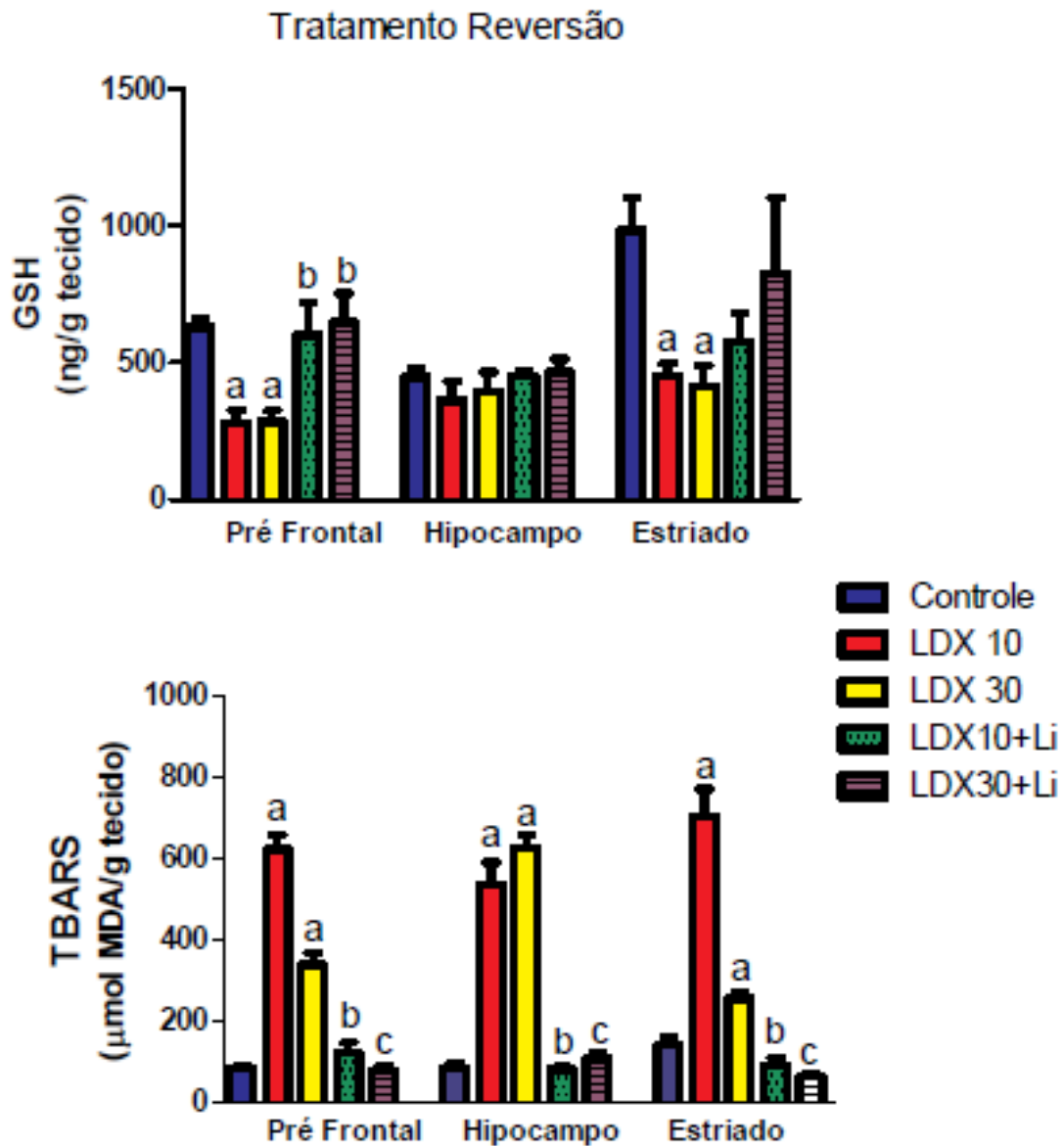
As barras representam média ± erro padrão da média do número de travessias ou levantamentos. LDX 10 = lisdexanfetamina dimesilato 10 mg / kg, po, LDX 30 = lisdexanfetamina dimesilato 30 mg / kg, po, Li = lítio, \*P ≤ 0,05 versus dia 1; &P ≤ 0,05 versus dia 7 de acordo com a Two-way ANOVA seguido por o teste post hoc de Bonferroni.

**Figura 23: Níveis de Glutathiona Reduzida (GSH) e de ácido tiobarbitúrico-TBARS (MDA, um marcador de peroxidação lipídica), no córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado, após o tratamento de prevenção (n = 6-8 para cada grupo).**



As barras representam média  $\pm$  erro padrão da média. LDX 10 = lisdexanfetamina dimesilato 10 mg / kg, po, LDX 30 = lisdexanfetamina dimesilato 30 mg / kg, po, Li = lítio; <sup>a</sup>  $P \leq 0,05$  versus controle; <sup>b</sup>  $P \leq 0,05$  versus grupo LDX 10; <sup>c</sup>  $P \leq 0,05$  versus grupo de acordo LDX 30 a One-way ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls como teste post hoc.

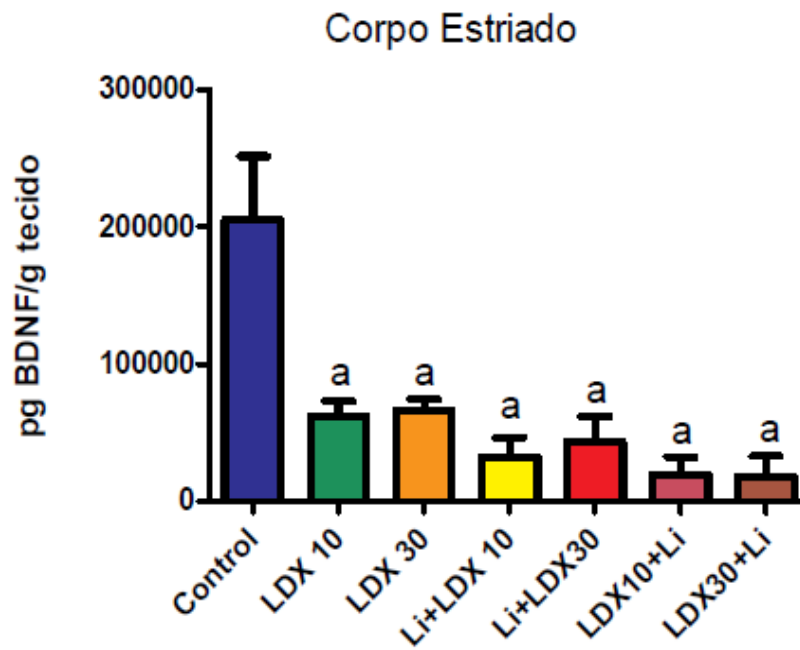
Figura 24: Níveis de glutatona reduzida (GSH) e de ácido tiobarbitúrico- TBARS (MDA, um marcador de peroxidação lipídica), no córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado após tratamento de reversão (n = 6-8 para cada grupo).



As barras representam média  $\pm$  erro padrão da média. LDX 10 = lisdexanfetamina dimesilato 10 mg / kg, po, LDX 30 = lisdexanfetamina dimesilato 30 mg / kg, po, Li = lítio; <sup>a</sup>  $P \leq 0,05$  versus controle; <sup>b</sup>  $P \leq 0,05$  versus grupo LDX 10; <sup>c</sup>  $P \leq 0,05$  versus grupo de acordo LDX 30 a ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls como teste post hoc.

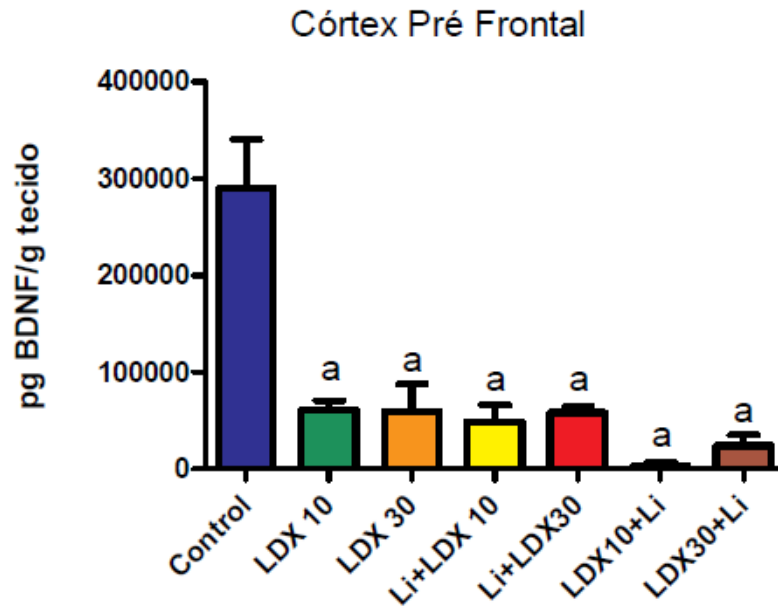
### 5.3.3. PREVENÇÃO E REVERSÃO – NÍVEIS DE BDNF

Figura 25: Níveis de BDNF (Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro) no corpo estriado após tratamento de prevenção e reversão (n = 6-8 para cada grupo).



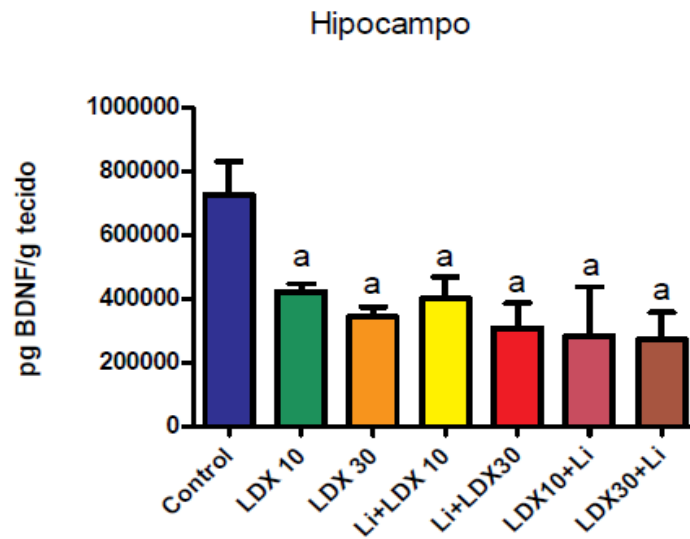
As barras representam média  $\pm$  erro padrão da média. LDX 10 = lisdexanfetamina dimesilato 10 mg / kg, po, LDX 30 = lisdexanfetamina dimesilato 30 mg / kg, po, Li = lítio; <sup>a</sup>  $P \leq 0,05$  versus controle. ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls como teste post hoc.

**Figura 26:** Níveis de BDNF (Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro) no córtex pré-frontal após tratamento de prevenção e reversão (n = 6-8 para cada grupo).



As barras representam média  $\pm$  erro padrão da média. LDX 10 = lisdexanfetamina dimesilato 10 mg / kg, po, LDX 30 = lisdexanfetamina dimesilato 30 mg / kg, po, Li = lítio; <sup>a</sup>  $P \leq 0,05$  versus controle. ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls como teste post hoc.

**Figura 27:** Níveis de BDNF (Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro) no hipocampo após tratamento de prevenção e reversão (n = 6-8 para cada grupo).

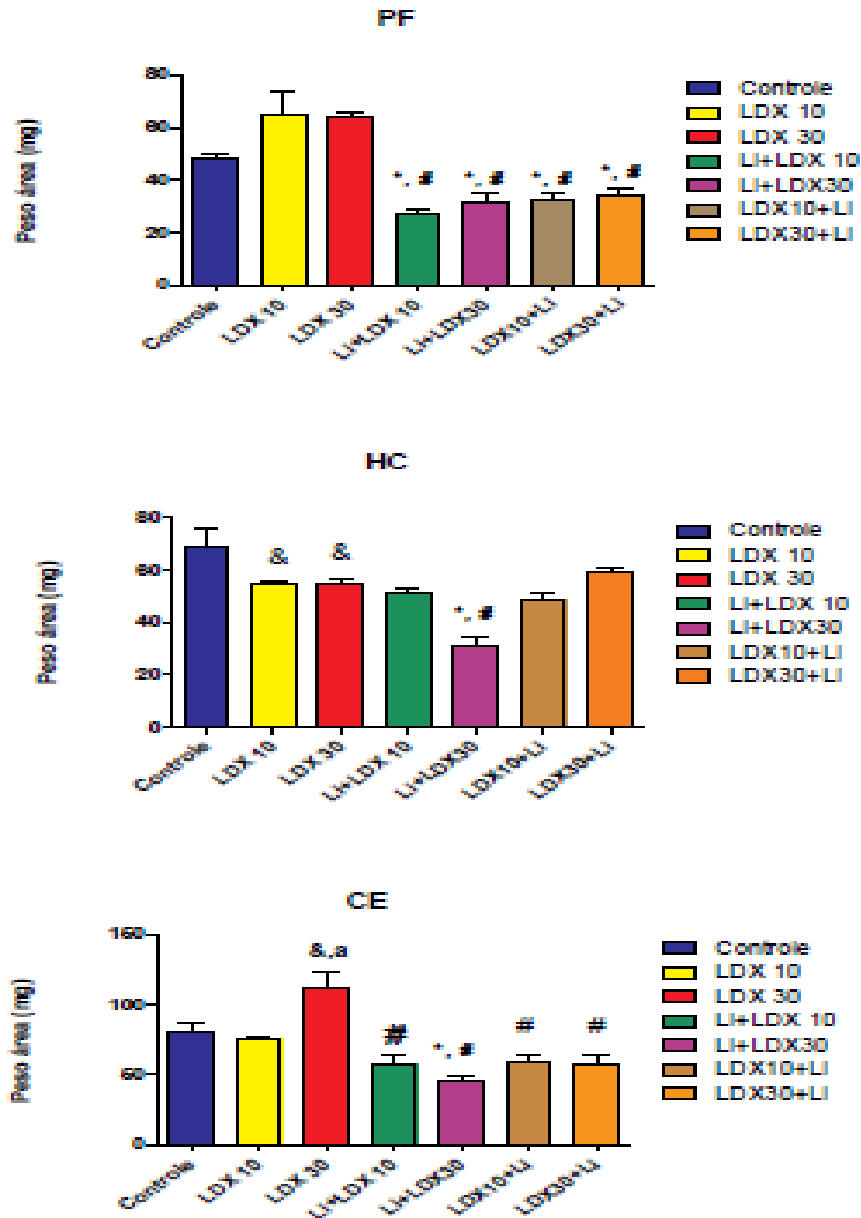


As barras representam média  $\pm$  erro padrão da média. LDX 10 = lisdexanfetamina dimesilato 10 mg / kg, po, LDX 30 = lisdexanfetamina dimesilato 30 mg / kg, po, Li = lítio; <sup>a</sup>  $P \leq 0,05$  versus controle. ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls como teste post hoc.



### 5.3.4. Prevenção e Reversão – Volume cerebral áreas dissecadas

Figura 28: Níveis de variação do volume cerebral das áreas CE, HC, PFC dos animais tratados com LDX, e nos protocolos de prevenção e reversão.



As barras representam média  $\pm$  erro padrão da média. LDX 10 = lisdexanfetamina dimesilato 10 mg / kg, po, LDX 30 = lisdexanfetamina dimesilato 30 mg / kg, po, Li = lítio; <sup>a</sup>  $P \leq 0,05$  versus controle. ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls como teste post hoc.

## 6. DISCUSSÃO

Os resultados do presente trabalho demonstram que o fármaco lisdexanfetamina (LDX), recentemente introduzido no mercado brasileiro para o tratamento do Transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) apresentando d-anfetamina em sua composição, apresenta similaridades em seus efeitos comportamentais e neuroquímicos aos da d-anfetamina, amplamente utilizada como modelo animal de mania, podendo se tornar um modelo animal mais acessível que a d-anfetamina, para o estudo da fisiopatologia bem como para o desenvolvimento de fármacos para o tratamento deste transtorno mental.

O transtorno afetivo bipolar (TAB) é um transtorno mental grave e devastador associado a altas taxas de suicídio e dificuldade de permanência em atividades cotidianas como o trabalho (BELMAKER, 2004; KUPFER, 2005). A principal marca para o diagnóstico clínico do TAB é a presença de sintomas maníacos (American Psychiatric Association, 1994; BELMAKER, 2004).

Há necessidade de maiores pesquisas acerca da precisa fisiopatologia do TAB, o que é essencial para o desenvolvimento de terapias específicas mais efetivas e mais toleráveis do que as terapias existentes (ZARATE *et al.*, 2006).

Há mais de 50 anos, desde a identificação dos efeitos antimaniacos do Lítio, não foi desenvolvido outro fármaco específico para o tratamento de TAB, exigindo novas abordagens terapêuticas (VALVASSORI *et al.*, 2010).

Pesquisas com novos fármacos necessitam de modelos animais já estabelecidos e o desenvolvimento de modelos animais tem sido uma ferramenta importante na investigação intracelular de sistemas que possam estar envolvidos no TAB (EINAT *et al.*, 2003; MANJI e CHEN, 2002) bem como contribuir com novas abordagens farmacológicas (LAMBERTY *et al.*, 2001).

Um modelo animal de TAB tem a hiperlocomoção no teste do campo aberto como o principal parâmetro avaliado, pois assemelhar-se a algumas características de um episódio maníaco, como euforia, irritabilidade, agressividade, insônia hiperatividade, ou desejo sexual aumentado. Pesquisas buscando modelos animais de mania já reconheceram há muito tempo

que a administração de fármacos dopaminérgicos, tais como a d-anfetamina, induzem sintomas maníacos (STRAKOWSKI e SAX, 1998; FREY *et al.*, 2006). Considerando a dificuldade em modelar a natureza altamente complexa da oscilação de humor no TAB, a hiperatividade induzida por psicoestimulantes é o melhor modelo animal estabelecido de mania (EINAT *et al.*, 2000; MACHADO-VIEIRA *et al.*, 2004; FREY *et al.*, 2006a).

Entretanto, as limitações atuais na compra e uso de d-anfetamina em pesquisas no Brasil e no mundo vem limitando os avanços na investigação terapêutica para fase maníaca do TAB.

Ainda não há na literatura dados a respeito deste papel do LDX. E assim com os testes observou-se que a administração oral de LDX em ratos durante 7 dias induz hiperlocomção acompanhada por decréscimos nos níveis de GSH e BDNF e aumentos na peroxidação lipídica, e alterações no volume das áreas do cérebro relacionadas com a fisiopatologia do TAB ( PFC, HC e CE ).

Hiperlocomção juntamente com balanço pró-oxidativo nas regiões cerebrais citadas são alterações descritas como características e que se apresentam, em modelos animais de mania (FREY *et al.*, 2006a; FREY *et al.*, 2006c; ANDREAZZA *et al.*, 2008). A administração do estabilizador de humor Li preveniu e reverteu principalmente, as alterações comportamentais e neuroquímicas causadas por LDX 10mg/kg confirmando nossos achados iniciais. Avaliados em conjunto, estes resultados indicam que LDX pode ser uma ferramenta farmacológica promissora como modelo de mania em roedores.

Recentemente, uma "síndrome de desregulação dopaminérgica" em TAB foi levantada como hipótese na fisiopatologia da doença (BERK *et al.*, 2007). Este modelo propõe uma desregulação de transmissão cíclica quantitativa de Dopamina (DA) em TAB, com a fase maníaca sendo associada com um aumento na transmissão de DA. Dessa forma, a administração de fármacos dopaminérgicos e sua atuação como na neurotransmissão de DA apresenta-se como modelo de mania (FREY *et al.*, 2006b; DA-ROSA *et al.*, 2012). Um dos mais utilizados modelos animais de mania no TAB é o modelo com D-ANF (EINAT, 2006, Frey *et al.*, 2006b; FLAISHER-GRINBERG *et al.*, 2010). Como descrito anteriormente, a administração de D-ANF aumenta a liberação de monoaminas, principalmente DA, por mecanismos moleculares que incluem troca por difusão, transporte reverso, inibição de proteínas de transporte, entre outros (FLECKENSTEIN *et al.*, 2007). De fato, disfunções no

sistema dopaminérgico podem participar dos processos fisiopatológicos de transtornos afetivos, porque esta monoamina está relacionada com a regulação do humor em humanos (BEAUCHAINE *et al.*, 2011) e tais comportamentos são observados em experimentos animais (BREUILLAUD *et al.*, 2012; DENT e NEILL, 2012). Em roedores, a administração de fármacos dopaminérgicos é conhecida por induzir hiperlocomoção (KLEIJN *et al.*, 2012). Em termos bioquímicos, a dopamina, por sua vez, possui duas vias que tem o potencial de causar disfunção celular, estresse oxidativo e apoptose (BERK *et al.*, 2011). Isto acontece através da metabolização por enzimas como monoamino-oxidase (MAO) com a produção de  $H_2O_2$  e ácido dihidroxifenilacético (BERMAN e HASTINGS, 1999) e a submissão da DA à hidroxilação não-enzimática na presença de  $Fe^{2+}$  e  $H_2O_2$ , levando à formação de 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA) (GRAHAM *et al.*, 1978).

Lisdexanfetamina quando metabolizada é convertida em D-ANF. Um estudo recente mostrou que a administração oral de LDX em doses equivalentes a 1,5 mg/ kg de D-ANF, produziu menor porém permanente alteração no efluxo de DA e ativação locomotora mediana (ROWLEY *et al.*, 2012). Este estudo também demonstrou que, sendo este um pró-fármaco, a liberação de DA no CE foi correlacionada com as concentrações plasmáticas de D-ANF, e não somente com o LDX enquanto composto original. Relatos anteriores a respeito da absorção após a administração oral de LDX a ratos sugeriram que esta droga tem uma conversão pré-sistêmica (ou seja, esta acontece no sangue portal, antes da entrada para a circulação sistêmica) a D-ANF. Isto foi observado com base na concentração plasmática máxima ( $C_{max}$ ) de LDX no sangue portal dos animais que era aproximadamente 5 vezes maior do que D-ANF, não obstante as concentrações de LDX e D-ANF após absorção sistêmica foram equivalentes (PENNICK, 2010). Dado o perfil farmacocinético do LDX em ratos (PENNICK, 2010), pode-se estimar que a dose de LDX 10 mg/kg selecionada para a presente pesquisa (com base no protocolo de dose-resposta) pode ser equivalente a 2 mg / kg de D- ANF que é a dose atualmente empregada em modelos animais de mania (FREY *et al.*, 2006a, ANDREAZZA *et al.*, 2008, MACEDO *et al.*, 2012). Estas propriedades farmacocinéticas podem explicar porque o Li teve efeitos positivos principalmente nas alterações induzidas por LDX (10 mg/kg) e não na mesma intensidade em relação ao LDX 30 mg/kg (porque o Li poderia apenas prevenir e não reverter os efeitos de LDX 30 mg/kg). É importante ressaltar que os resultados pré-clínicos não devem ser diretamente relacionados como potencial prejudicial de desestabilizar o humor de pacientes que fazem uso deste medicamento em determinados cenários clínicos. Dados de um ensaio clínico randomizado

com mistura de sais de anfetamina demonstrou tratamento com sucesso em pacientes pediátricos com TDAH em co-morbidade com TAB em uma fase estável (ou seja, em tratamento contínuo com estabilizadores de humor), sem indução de instabilidade de humor e / ou interrupção de mania (SCHEFFER *et al.*, 2005 ). Além disso, um estudo recente indica que o co-tratamento de LDX pode ser um tratamento seguro e eficaz de sintomas de TDAH em adultos em uma amostra de pacientes com TAB clinicamente estáveis (ROGER S. MCINTYRE, 2012).

Anteriormente foi postulado que a evolução negativa (ou neuroprogressão) do TAB pode ser devido a uma falha de mecanismos endógenos de compensação, os quais agem normalmente de forma alostática minimizando o impacto dos insultos endógenos no SNC (POST, 2007). Um desses mecanismos é o sistema antioxidante citoplasmático, o qual pode impedir que EROS danifiquem o DNA, lípidos (organelas celulares e de membrana) e proteínas (receptores, fatores de transcrição e enzimas) (LENAZ *et al.*, 2000). Alterações nas enzimas antioxidantes foram anteriormente relatadas no plasma de pacientes com TAB como evidenciado na alteração da atividade de glutatona-redutase e glutatona-S-transferase em pacientes no estágio final, quando comparados com os pacientes em fase inicial e controles (ANDREAZZA *et al.*, 2009 ). No modelo animal de mania por D-ANF, parâmetros de estresse oxidativo, também são alterados em áreas do cérebro como PFC, HC e CE, que estão relacionados com a regulação do humor (FREY *et al.*, 2006a). Recentemente, para melhor determinar alterações comportamentais associadas com deficiência crônica nos níveis de GSH, foi modulado em ratos knockout (KO) o gene da enzima glutamato cisteína ligase (GCLM), enzima sintetizadora chave de GSH (YANG *et al.*, 2002.), o resultado foi uma diminuição em torno de 70 - 80% dos níveis de GSH no cérebro (STEULLET *et al.*, 2010, NEVES DUARTE *et al.*, 2012). O mesmo marcador GCLM-KO foi utilizado em camundongos e os mesmos apresentaram anomalias fenotípicas que se assemelham a aspectos de esquizofrenia e TAB, incluindo aumento de marcadores de estresse oxidativo (BEHRENS e SEJNOWSKI, 2009).

Os resultados da pesquisa mostram a diminuição dos níveis de GSH em áreas cerebrais escolhidas (PFC, HC e CE) dos grupos tratados com LDX e que o Li em quantidade significativa preveniu e reverteu estas alterações, corroborando um grande conjunto de provas que relacionam este antioxidante natural com a patogênese do TAB.

Também foi avaliada a atividade enzimática da Superóxido Dismutase (SOD), que atua como antioxidante na defesa contra as EROs e é fator preponderante na fisiopatologia do TAB. Ela age catalisando a destruição do ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), convertendo-o em oxigênio e peróxido de hidrogênio. A ação desta enzima permite a eliminação do  $O_2^{\bullet-}$  mesmo em baixas concentrações (BARREIROS, DAVID e DAVID, 2006). Pesquisas apontam aumento nos níveis de SOD no TAB, agindo como mecanismo compensatório ao estado pró-oxidativo existente, o que já é evidenciado em estudos clínicos que indicam alto dano oxidativo sistêmico em pacientes com transtorno bipolar (FREY *et al*, 2006b), acompanhado de aumento nos níveis de atividade da superóxido dismutase em pacientes com TAB nas fases de mania ou depressão (ANDREAZZA, 2007). Os resultados do presente trabalho demonstraram que apenas no PFC houve alteração nos níveis de SOD, com aumento no grupo de LDX 10mg em comparação com o controle. As demais áreas não apresentaram significância estatística na avaliação quando comparadas ao controle.

O BDNF é um parâmetro para avaliação da plasticidade neuronal e amplas evidências apontam seu envolvimento no TAB. É uma neurotrofina que tem papel regulador importante na neurogênese, diferenciação neuronal e resiliência. Recente meta-análise sugere o BDNF como marcador periférico para avaliação de alterações de humor como no caso do TAB, já que evidencia-se diminuição dos níveis séricos durante as fases de mania e depressão. Aponta-se que o aumento do estresse oxidativo explique parcialmente o decréscimo dos níveis de BDNF no soro de pacientes com TAB (MACÊDO *et al*, 2012).

Nos experimentos da presente pesquisa os níveis de BDNF também foram determinados e os resultados indicaram uma diminuição nos níveis de todas as áreas avaliadas (CE, HC, PFC). Entretanto, o Li não conseguiu prevenir nem reverter tais parâmetros nos grupos tratados com LDX. Tal fato pode ser relacionado, como citado anteriormente, com a ação do estresse oxidativo e sua influência nos níveis de BDNF.

Partindo de pesquisas que demonstram através de estudos de neuroimagem que há alteração de volume em determinadas regiões cerebrais envolvidas na regulação do humor resolveu-se avaliar o volume das áreas cerebrais em questão (CE, HC e PFC). Observou-se que houve alteração de volume nas três áreas estudadas, entretanto, o Li não conseguiu reverter nem prevenir tal parâmetro quando comparado tal valor ao evidenciado no grupo controle. Notou-se aumento no volume do PFC, tal fato é referido na literatura indicando como relação de que na fase de mania há um maior metabolismo nessa região (MALHI *et al*.

2004; STRAKOWSKI *et al.* 2005). Já no HC observou-se decréscimo quando comparado ao controle, assim como evidenciado em pesquisas clínicas (ROSOKLIJA *et al.* 2000).

Além disso, a peroxidação dos lipídios que ocorrem como resultado do estresse oxidativo descompensado é uma descoberta importante no TAB, independentemente da fase da doença (ANDREAZZA *et al.*, 2007, MACHADO-VIEIRA *et al.*, 2007). Com base na importância do desequilíbrio oxidativo para neuroprogressão em TAB (BERK, 2009), observou-se valores significativos nos marcadores de peroxidação lipídica com ambas as doses de LDX administradas apoiando assim a validade de construto, onde demonstra LDX como um indutor do que se sabe até então da fisiopatologia do TAB. Bem como a capacidade de Li para prevenir e reverter alterações neste parâmetro (principalmente a dose de LDX 10 mg/kg ), o que demonstra significância no critério preditivo, já que um dos medicamentos clássicos para o transtorno teve efeito de prevenção e reversão nos danos causados pelo LDX. O conjunto de dados demonstrados na pesquisa, no que se refere aos critérios para validação de um modelo animal, indica o LDX como agente em um modelo animal de mania alternativo.

No geral, os resultados do presente estudo indicam que a administração oral de LDX 10 mg/kg provoca alteração no comportamento (hiperlocomoção) e nas dosagens neuroquímicas (isto é, o desequilíbrio oxidativo determinado por decréscimos nos níveis de GSH e incrementos na peroxidação lipídica em áreas do cérebro relacionadas com a fisiopatologia do TAB). Alterações que se assemelham a comportamentos análogos a mania (ou seja, validade de face) e fisiopatologia (ou seja, a validade de construto) em roedores foram atingidas, porém com necessidade de pesquisas.

Afora os níveis de BDNF que não foram prevenidos nem revertidos, as alterações observadas com a dose de 10mg/kg de LDX podem ser evitadas e revertidas pelo estabilizador do humor Li, o que sugere que o tratamento com este clássico estabilizador do humor tem validade preditiva parcial neste modelo animal de mania. E com isto, a importância de teste com novos fármacos que atuem na terapêutica do TAB.

No entanto, mais pesquisas são necessárias para apreciar plenamente os parâmetros de validade deste modelo animal de mania sugerido. Futuros experimentos devem ser projetados para determinar os efeitos do LDX em outros alvos fisiopatológicos relacionados à BD, tais como, a função mitocondrial e parâmetros inflamatórios (BERK *et al.*,

2011). Além disso, os efeitos de outros agentes antimaníacos devem ser investigados neste modelo.



## 7. CONCLUSÃO

Os resultados da pesquisa evidenciaram o potencial do fármaco da classe das anfetaminas e com indicação clínica para o TDAH, Dimesilato de Lisdexanfetamina (LDX) como um modelo animal de mania. As doses de 10 e 30mg/kg foram propostas à partir de alterações comportamentais nos animais, e indicaram de acordo com as particularidades das áreas cerebrais uma validação em critérios de face, constructo e preditivo. Dentre as duas doses a de 10 seria a mais indicada por ser a mais próxima da dose de D-ANF utilizada como modelo animal de mania.

Conclui-se que os dados revelam um estudo inédito e que abre possibilidades para o aprofundamento de novas pesquisas que direcionem o estabelecimento de um novo modelo animal de mania e com isso uma contribuição o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento do TAB.

## 8. PERSPECTIVAS

Nesse contexto, baseado no fato de que a fisiopatologia do TAB ainda não está totalmente esclarecida, há uma clara evidência da necessidade de que mais pesquisas se aprofundem nesta proposta de modelo animal de mania. Dessa forma tal modelo possa vir a contribuir com a investigação farmacológica pré-clínica, a qual acontece através de modelos animais estabelecidos. Isto se evidencia na necessidade de novos modelos animais na psiquiatria, fazendo-se necessário buscar novas opções de modelo animal, como no caso da mania.

Visando aprofundar a pesquisa quanto ao papel de LDX como modelo alternativo de mania é que outro fármaco, Valproato, está em processo de experimento por nosso grupo de pesquisa, visando avaliar sua ação no critério preditivo desse modelo alternativo de mania. Além do critério preditivo o VAL também será avaliado no critério de constructo e de face, pois os testes neuroquímicos já determinados com o LI também serão analisados com o valproato, bem como outras variáveis: função mitocondrial, níveis de catalase, proteínas carboniladas, testes comportamentais de interação social, labirinto em cruz e novamente o campo aberto, utilizando a dose de LDX 10mg/kg, já que esta apresentou melhores parâmetros nos dados avaliados.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMERICAN Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders. 4th ed. Washington, D.C.: American Psychiatric Association; 1994.
- A.P.A. DIAGNOSTIC and Statistical Manual of Mental Disorders. Washington, D.C., 2000.
- ANDREAZZA A.C; CASSINI C; ROSA A. R; LEITE M.C; ALMEIDA L. M; NARDIM P; CUNHA A. B; CERESER K.M; SANTIM A; GOTTFRIED C; SALVADOR M, KAPCZINSKI F; GONÇALVES C. A. Serum S100B e antioxidants enzymes in bipolar patients. *Journal of Psychiatric Research* 41(6): 523-529, 2007.
- ANDREAZZA A.C; CASSINI C; ROSA A.R; LEITE M.C; ALMEIDA L.M; NARDIN P; CUNHA A.B; CERESER K.M, SANTIN A; GOTTFRIED C; SALVADOR M; KAPCZINSKI F; GONÇALVES C.A. Serum S100B and antioxidant enzymes in bipolar patients. *J. Psychiatr Res* 41:523-529, 2008.
- ANDREAZZA A.C; KAPCZINSKI F; KAUER-SANT'ANNA M; BOND D.J; GONÇALVES C.A; YOUNG L.T; YATHAM L.N. 3-Nitrotyrosine and glutathione antioxidant system in patients in the early and late stages of bipolar disorder. *J Psychiatry Neurosci* 34:263-271, 2009.
- ANDREAZZA A. C; KAUER-SANT'ANNA M; FREY B.N; STERTZ L; ZANOTTO C; RIBEIRO L; GIASSON K; VALVASSORI S.S; REUS G.Z, SALVADOR M; QUEVEDO J; GONCALVES C.A; KAPCZINSKI F. Effects of mood stabilizers on DNA damage in an animal model of mania. *J Psychiatry Neurosci* 33:516-524, 2008.
- ANGST F; STASSEN H.H; CLAYTON P.J; ANGST J. Mortality of patients with mood disorders: follow-up over 34-38 years. *J Affect Disord.* ; 68(2-3):167-181, 2002.
- Archer J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. *Anim Behav* 21:205-235, 1973.
- BALLONE G.J. Transtorno Afetivo Bipolar, in. *PsiquWeb*, internet, disponível em [www.psiqweb.med.br](http://www.psiqweb.med.br), 2005.
- BARREIROS A.L.B.S; DAVID J.M; DAVID J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quim Nova*; 29:113-23, 2006.
- BEARDEN C.E; HOFFMAN K.M; CANNON T.D. The neuropsychology and neuroanatomy of bipolar affective disorder: a critical review. *Bipolar Disord* 3:106-150; discussion 151-103, 2001.
- BEAUCHAINE T.P; NEUHAUS E; ZALEWSKI M; CROWELL S.E, POTAPOVA N. The effects of allostatic load on neural systems subserving motivation, mood regulation, and social affiliation. *Dev Psychopathol* 23:975-999, 2011.
- BEAULIEU J.M; GAINETDINOV R.R. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacological reviews* 63:182-217, 2011.
- BEHRENS M.M; SEJNOWSKI T.J; Does schizophrenia arise from oxidative dysregulation of parvalbumin-interneurons in the developing cortex? *Neuropharmacology* 57:193-200, 2009.

- BELMAKER R.H. Bipolar disorder. *The New England Journal of Medicine* 351: 476-486. 2004.
- BERK M. Neuroprogression: pathways to progressive brain changes in bipolar disorder. *Int J Neuropsychopharmacol* 12:441-445, 2009.
- BERK M; DODD S; KAUER-SANT'ANNA M; MALHI G.S; BOURIN M; KAPCZINSKI F; NORMAN T. Dopamine dysregulation syndrome: implications for a dopamine hypothesis of bipolar disorder. *Acta Psychiatr Scand Suppl* 434:41-49, 2007.
- BERK M; KAPCZINSKI F; ANDREAZZA A.C; DEAN O.M; GIORLANDO F; MAES M; YUCEL M; GAMA C.S; DODD S; DEAN B; MAGALHAES P.V; AMMINGER P; MCGORRY P; MALHI G.S. Pathways underlying neuroprogression in bipolar disorder: focus on inflammation, oxidative stress and neurotrophic factors. *Neurosci Biobehav Rev* 35:804-817, 2011.
- BERMAN S.B; HASTINGS T.G. Dopamine oxidation alters mitochondrial respiration and induces permeability transition in brain mitochondria: implications for Parkinson's disease. *J Neurochem* 73:1127-1137, 1999.
- BELMAKER R.H. Bipolar disorder. *N Eng J Med*, 351:476-86, 2004.
- BIEWENGA G;P; HAENEN G.R; BAST A . The pharmacology of the antioxidant lipoic acid. *Gen Pharmacol* 29:315-331, 1997.
- BREUILLAUD L; ROSSETTI C; MEYLAN E.M; MERINAT C; HALFON O; MAGISTRETTI P.J; CARDINAUX J.R. Deletion of CREB-Regulated Transcription Coactivator 1 Induces Pathological Aggression, Depression-Related Behaviors, and Neuroplasticity Genes Dysregulation in Mice. *Biol Psychiatry* 14:14, 2012.
- CALABRESE E.J; Principles of animal extrapolation. Michigan: Ed. Lewis Publishers; 1991.
- DA-ROSA D.D; VALVASSORI S.S; STECKERT A.V; ORNELL F; FERREIRA C.L; LOPES-BORGES J; VARELA R.B; DAL-PIZZOL F; ANDERSEN M.L; QUEVEDO J. Effects of lithium and valproate on oxidative stress and behavioral changes induced by administration of m-AMPH. *Psychiatry Res* 17:17, 2012.
- DAS NEVES D. J.M; KULAK A; GHOLAM-RAZAEI M.M; CUENOD M; GRUETTER R. Do KQ N-acetylcysteine normalizes neurochemical changes in the glutathione-deficient schizophrenia mouse model during development. *Biol Psychiatry* 71:1006-1014, 2012.
- DAVIS L.L; BARTOLUCCI A; PETTY F. Divalproex in the treatment of bipolar depression: a placebo-controlled study. *Journal of Affective Disorders* 85: 259-266. 2005
- DENNEHY E.B; MARANGELL L.B; ALLEN M.H, CHESSICK C; WISNIEWSKI S.R. Thase ME Suicide and suicide attempts in the Systematic Treatment Enhancement Program for Bipolar Disorder (STEP-BD). *Journal of affective disorders* 133:423-427. 2011
- DENT M.F, NEILL D.B Dose-Dependent Effects of Prefrontal Dopamine on Behavioral State in Rats. *Behav Neurosci* 27:27. 2012.

DRAPER H.H, SQUIRES E.J; MAHMOODI H; WU J; AGARWAL S; HADLEY M. A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. *Free Radic Biol Med* 15:353-363.1993

DREVETS W.C; PRICE J.L; SIMPSON J.R; TODD R.D; REICH T; VANNIER, M; RAICHLER, M.E. Subgenual prefrontal cortex abnormalities in mood disorders. *Nature* 386:824-827, 1997.

DREVETS W.C; GAUTIER C; PRICE J.C; KUPFER D.J; KINAHAN P.E; GRACE A.A; PRICE J.L; MATHIS C.A. Amphetamine-induced dopamine release in human ventral striatum correlates with euphoria. *Biol Psychiatry* 49:81-96, 2001.

DSM-IV: Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais. Artmed, 4. ed. Porto Alegre, 345-417. 2003.

DUMAN, R.S. Structural alterations in depression: cellular mechanisms underlying pathology and treatment of mood disorders. *CNS Spectr* 7:140-142, 144-147, 2002.

EINAT H. Modelling facets of mania--new directions related to the notion of endophenotypes. *J Psychopharmacol* 20:714-722, 2006.

EINAT H, KOFMAN O, Belmaker RH. Animal models of bipolar disorder: from a single episode to progressive cycling models. In: Myslobodsky MS, Weiner I, editors. *Contemporary issues in modeling psychopathology*. Boston: Kluwer Academic; p. 165–79, 2000.

EINAT H; YUAN P; GOULD T.D; LI J; DU J; MANJI H.K, et al. The role of the extracellular signal-regulated kinase signaling pathway in mood regulation. *J Neurosci*;23:7311–6, 2003.

FAGIOLINI A; FRANK E; SCOTT JA; TURKIN S; KUPFER DJ. Metabolic syndrome in bipolar disorder: findings from the Bipolar Disorder Center for Pennsylvanians. *Bipolar Disorders* 5: 424-430. 2005.

FAGUNDES DJ; TAHA MO. Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. *Acta Cirúrgica Brasileira* - Vol 19 (1): 59-65, 2004.

FERNANDES B.S; GAMA C.S; MARIA C. K; YATHAM LN; FRIES GR; COLPO G; DE LUCENA D; KUNZ M; GOMES F. KAPCZINSKI F. Brain-derived neurotrophic factor as a state-marker of mood episodes in bipolar disorders: A systematic review and meta-regression analysis. *J Psychiatr Res*.2011.

FIORINO D.F; PHILLIPS A.G. Facilitation of sexual behavior and enhanced dopamine efflux in the nucleus accumbens of male rats after D-amphetamine-induced behavioral sensitization. *J Neurosci* 19:456-463, 1999.

FLAISHER-GRINBERG S; KRONFELD-SCHOR N; EINAT H. Models of mania: from facets to domains and from animal models to model animals: *J Psychopharmacol*. 2010 Mar;24(3):437-8. Epub 2008 Oct 6. 2010.

FLECKENSTEIN A; VOLZ T.J; RIDDLE E.L; GIBB J.W; HANSON G.R. New insights into the mechanism of action of amphetamines. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47:681-698, 2007.

FREY B.N; MARTINS M.R; PETRONILHO F.C; DAL-PIZZOL F; QUEVEDO; KAPCZINSKI F. Increased oxidative stress after repeated amphetamine exposure: possible relevance as a model of mania. *Bipolar Disord* 8:275-280, 2006a.

FREY B.N, VALVASSORI S; REUS G.Z; MARTINS M.R; PETRONILHO F.C; BARDINI K; DAL-PIZZOL F; KAPCZINSKI F; QUEVEDO J. Changes in antioxidant defense enzymes after d-amphetamine exposure: implications as an animal model of mania. *Neurochem Res* 31:699-703, 2006b.

FREY B.N, VALVASSORI S.S; REUS G.Z; MARTINS M.R; PETRONILHO F.C; BARDINI K; DAL-PIZZOL F; KAPCZINSKI F; QUEVEDO J. Effects of lithium and valproate on amphetamine-induced oxidative stress generation in an animal model of mania. *J Psychiatry Neurosci* 31:326-332, 2006c.

FREY B.N, . AC, Cereser KM; MARTINS M.R; VALVASSORI S.R; REUS G.Z; QUEVEDO J; KAPCZINSKI F. (Effects of mood stabilizers on hippocampus BDNF levels in an animal model of mania. *Life Sci* 79:281-286, 2006a).

FREY B.N; ANDREAZZA A.C; KUNZ M; GOMES F.A; QUEVEDO J; SALVADOR M; GONCALVES C.A; KAPCZINSKI F. (Increased oxidative stress and DNA damage in bipolar disorder: a twin-case report. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 31:283-285, 2007).

GAWRYLUK J.W; WANG J; ANDREAZZA A.C; SHAO L; YATHAM L.N; YOUNG L.T. Prefrontal cortex glutathione Stransferase levels in patients with bipolar disorder, major depression and schizophrenia. *International Journal of Neuropsychopharmacology* : 14, 1069–1074, 2011.

GIGANTE A.D; YOUNG L.T; YATHAM L.N; ANDREAZZA A.C; NERY F.G; GRINBERG L.T; HEINSEN H; LAFER B. (Morphometric post-mortem studies in bipolar disorder: possible association with oxidative stress and apoptosis. *Int J Neuropsychopharmacol* 14:1075-1089, 2011).

GRAHAM D.G; TIFFANY S.M; BELL W.R; JR; GUTKNECHT W.F. Autoxidation versus covalent binding of quinones as the mechanism of toxicity of dopamine, 6-hydroxydopamine, and related compounds toward C1300 neuroblastoma cells in vitro. *Mol Pharmacol* 14:644-653, 1978.

GRANDE I, FRIES GR; KUNZ M; KAPCZINSKI F. (The role of BDNF as a mediator of neuroplasticity in bipolar disorder. *Psychiatry Investig* 7:243-250, 2010).

GRANDE I; MAGALHÃES PV; KUNZ M; VIETA E; KAPCZINSKI F. Mediators of allostasis and systemic toxicity in bipolar disorder. *Physiology & Behavior* 106, 46–50, 2012.

GOODWIN F.K; JAMISON K.R. Maniac-depressive illness. New York. University Press, 2007.

GOULD TD; PICCHINI AM; EINAT H; MANJI HK. Targeting glycogen synthase kinase-3 in the CNS: implications for the development of new treatments for mood disorders. *Current Drug Targets* 7: 1399-1409. 2006.

GOULD TD; O'DONNELL KC; PICCHINI AM; MANJI HK. (Strain differences in lithium attenuation of d-amphetamine-induced hyperlocomotion: a mouse model for the genetics of clinical response to lithium. *Neuropsychopharmacology* 32:1321-1333, 2007).

HAJEK T; CARREY N; ALDA M. Neuroanatomical abnormalities as risk factors for bipolar disorder. *Bipolar Disorders*, 7:393-403, 2005.

HARRISON-READ P.E. Models of mania and antimanic drug actions: progressing the endophenotype approach: *J Psychopharmacol.* 2009 May;23(3):334-7. Epub 2008 Jun 26, 2009.

HOPKINS H.S; GELENBERG A.J. Serum lithium levels and the outcome of maintenance therapy of bipolar disorder. *Bipolar Disord* 2:174-179, 2000.

HUANG S.H; LEONARD S; SHI X; GOINS MR; VALLYATHAN V. Antioxidant activity of lazaroid (U-75412E) and its protective effects against crystalline silica-induced cytotoxicity. *Free Radic Biol Med.*, v. 24, p. 529-36, 1998.

HUXLEY N; BALDESSARINI R.J. Disability and its treatment in bipolar disorder patients. *Bipolar Disorder.* 9:183-96, 2007.

JASINSKI D.R; KRISHNAN S. Abuse liability and safety of oral lisdexamfetamine dimesylate in individuals with a history of stimulant abuse. *J Psychopharmacol* 23:419-427, 2009.

JR C.A.Z; SINGH J.B; CARLSON P.J; MANJI H.K. Molecular mechanisms of bipolar disorder. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms.* Volume 2, (4) : 435–445, 2005

JORNADA *et al.* Lithium and valproate modulate antioxidant enzymes and prevent ouabain-induced oxidative damage in an animal model of mania. *Journal of Psychiatric Research* 45: 162-168, 2011.

KAPCZINSKI F; FREY B.N; ANDREAZZA A.C; KAUER-SANT'ANNA M; CUNHA A.B, POST R.M. (Increased oxidative stress as a mechanism for decreased BDNF levels in acute manic episodes. *Rev Bras Psiquiatr* 30:243-245, 2008a).

KAPCZINSKI F; VIETA E; ANDREAZZA A.C; FREY B.N; Gomes F.A, Tramontina J, Kauer-Sant'anna M, Grassi-Oliveira R, Post RM. Allostatic load in bipolar disorder: implications for pathophysiology and treatment. *Neurosci Biobehav Rev* 32:675-692, 2008.

KAPCZINSKI F; QUEVEDO J; ROSA A.R. Transtorno Bipolar: teoria e clínica. Porto Alegre: Artmed, p. 50, 2009.

KAUER-SANT'ANNA M; TRAMONTINA J; ANDREAZZA A.C; CERESER K; COSTA S; SANTIN A; YATHAM L.N; KAPCZINSKI F. (Traumatic life events in bipolar disorder: impact on BDNF levels and psychopathology. *Bipolar Disord* 9 Suppl 1:128-135, 2007).

KUPFER D.J. The increasing medical burden in bipolar disorder. *JAMA*, 293:2528–30, 2005.

KLEIJN J; WISKERKE J; CREMERS T.I; SCHOFFELMEER A.N; WESTERINK B.H; PATTIJ T. Effects of amphetamine on dopamine release in the rat nucleus accumbens shell region depend on cannabinoid CB1 receptor activation. *Neurochem Int* 60:791-798, 2012.

KO J.H; STRAFELLA A.P. Dopaminergic neurotransmission in the human brain: new lessons from perturbation and imaging. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* 18:149-168, 2012.

KOLAR D.A; GOLFINOPOULOS ; CUMYN L; SYER C; HECHTMAN L (2008) Treatment of adults with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Neuropsychiatr Dis Treat* 4:107-121.

KULOGLU M; USTUNDAG B; ATMACA M; CANATAN H; TEZCAN A.E, CINKILINC N. (Lipid peroxidation and antioxidant enzyme levels in patients with schizophrenia and bipolar disorder. *Cell Biochem Funct* 20:171-175.2002).

LAMBERTY Y; MARGINEANU D.G; KLITGAARD H. Effect of the new antiepileptic drug levetiracetam in an animal model of mania. *Epilepsy Behav*; 2:454–9, 2001.

LENAZ G; D'AURELIO M; MERLO PICH M; GENOVA M.L; VENTURA B; BOVINA C; FORMIGGINI G; PARENTI C.G. (2000) Mitochondrial bioenergetics in aging. *Biochim Biophys Acta* 15:2-3.

LI X; BIJUR GN; JOPE RS. Glycogen synthase kinase 3-beta, mood stabilizers, and neuroprotection. *Bipolar Disorder* 4: 137-144. 2002.

LIPSKA B.K; WEINBERGER D.R To model a psychiatric disorder in animals: schizophrenia as a reality test. *Neuropsychopharmacology* 23:223-239.2000.

LOPEZ A.D; MURRAY C.J.L. The global burden of disease. *Nature Medicine*, 4: 1241-1243, 1998.

MACEDO D.S; MEDEIROS C.D; CORDEIRO R.C; SOUSA F.C; SANTOS J.V; MORAIS T.A; HYPHANTIS T.N; MCINTYRE R.S; QUEVEDO J; CARVALHO A.F. Effects of alpha-lipoic acid in an animal model of mania induced by d-amphetamine. *Bipolar Disord*, 2012.

MACHADO-VIEIRA R; KAPCZINSKI F; SOARES J.C. Perspectives for the development of animal models of bipolar disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*;28:209–24, 2004.

MACHADO V. R; ANDREAZZA A.C; VIALE C.I; ZANATTO V; CERESER V.J; DA SILVA V. R; KAPCZINSKI F; PORTELA L.V; SOUZA DO; SALVADOR M; GENTIL V. Oxidative stress parameters in unmedicated and treated bipolar subjects during initial manic episode: a possible role for lithium antioxidant effects. *Neurosci Lett* 421:33-36, 2007.

MANJI H.K, CHEN G. PKC, MAP kinases and the bcl-2 family of proteins as longterm targets for mood stabilizers. *Mol Psychiatry*;7:S46–56, 2002.

MANJI H.K; GOTTESMAN II, GOULD T.D. (Signal transduction and genes-to-behaviors pathways in psychiatric diseases. *Sci STKE*: 49, 2003).

MANNING J.S. All that wheezes is not asthma: bipolar disorder in primary care 1997-2007. *Primary Care Companion to the Journal of Clinical Psychiatry*. 9: 89-90, 2007.



MATTINGLY G. Lisdexamfetamine dimesylate: a prodrug stimulant for the treatment of ADHD in children and adults. *CNS Spectr* 15:315-325, 2010.

MCINTYRE R.S; ROSENBLUTH M; RAMASUBBU R; BOND D.J; TAYLOR V.H; BEAULIEU S; SCHAFFER A (2012) Managing medical and psychiatric comorbidity in individuals with major depressive disorder and bipolar disorder. *Annals of clinical psychiatry : official journal of the American Academy of Clinical Psychiatrists* 24:163-169.2012.

NESTLER E.J; HYMAN S.E Animal models of neuropsychiatric disorders. *Nat Neurosci* 13:1161-1169.2010.

NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals- Institute of Laboratory Animal Res.earch- National Research Council. National Academies Press.1996.

OLFERT E.D *et al.* Guide to the Care and Use of Experimental Animals, volume 1, 2nd edn. Canadian Council on Animal Care: 1993.

PENNICK M Absorption of lisdexamfetamine dimesylate and its enzymatic conversion to d-amphetamine. *Neuropsychiatr Dis Treat* 6:37-327.2010.

PERLIS R.H; OSTACHER M.J; PATEL J.K; MARANGELL L; ZHANG H; WISNIEWSKI S.R; KETTER T.A; MIKLOWITZ D; OTTO M.W; GYULAI L; REILLY-HARRINGTON N.A; SACHS G.S; THASE M.E. Predictors of recurrence in bipolar disorder: primary outcomes from the systematic treatment enhancement program for bipolar disorder (STEP-BD). *American Journal of Psychiatry*, 163:217-224, 2006.

PHILLIPS M.L . Understanding the neurobiology of emotion perception: Implications for psychiatry. *The British journal of psychiatry : the journal of mental science*, 182, 190-192, 2003.

POST R.M. Leverich GS, Denicoff KD, Frye MA, Kimbrell TA, Dunn R. (Alternative approaches to refractory depression in bipolar illness. *Depress Anxiety* 5:175-189.1997).

POST R.M; DENIKOFF K.D; LEVERICH G.S; ALTSHULER L.L; FRYE M.A; SUPPES T.M; RUSH A.J; KECK P.E. J; MCELROY S.L; LUCKENBAUGH D.A; POLLIO C; KUPKA R; NOLEN W.A. Morbidity in 258 bipolar outpatients followed for 1 year with daily prospective ratings on the NIMH life chart method. *Journal of Clinical Psychiatry*, 64:680-690, 2003.

POST R.M. Kindling and sensitization as models for affective episode recurrence, cyclicity, and tolerance phenomena. *Neurosci Biobehav Rev* 31:858-873, 2007.

QUIROZ J.A; SINGH J; GOULD T.D; DENICOFF K.D; ZARATE C.A; MANJI H.K. Emerging experimental therapeutics for bipolar disorder: Clues from the molecular pathophysiology. *Molecular Psychiatry* 9: 756-776. 2004.

RAJKOWSKA G; HALARIS A; SELEMON L.D. (Reductions in neuronal and glial density characterize the dorsolateral prefrontal cortex in bipolar disorder. *Biol Psychiatry* 49:741-752, 2001).

RAJKOWSKA G. Depression: what we can learn from postmortem studies? *Neuroscientist* 9:273-284, 2003.

Resolução da Diretoria Colegiada - RDC N<sup>o</sup> 51 de 06 de Outubro de 2011 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Publicado no Diário Oficial da União, de 7 de outubro de 2011, Seção 1, pág. 61.2011.

REVICKI DA; MATZA L.S; FLOOD E; LLOYD A. Bipolar disorder and healthrelated quality of life: Review of burden of disease and clinical trials. *Pharmacoeconomics* 23: 583–594. 2005.

RIEGEL R.E; VALVASSORI S.S; ELIAS G; REUS G.Z; STECKERT A.V; DE SOUZA B; PETRONILHO F; GAVIOLI E.C; DAL-PIZZOL F; QUEVEDO J. Animal model of mania induced by ouabain: Evidence of oxidative stress in submitochondrial particles of the rat brain. *Neurochem Int* 55:491-495.2009.

ROSOKLIJA G; TOOMAYAN G; ELLIS S.P; KEILP A; MANN J.J; LATOV N; HAYS A.P; DWORK A.J. Structural abnormalities of subiculum dendrites in subjects with schizophrenia and mood disorders: preliminary findings. *Archives of General Psychiatry* 57:349-356, 2000.

ROWLEY H.L; KULKARNI R; GOSDEN J; BRAMMER R; HACKETT D; HEAL D.J. ) Lisdexamfetamine and immediate release d-amphetamine - Differences in pharmacokinetic/pharmacodynamic relationships revealed by striatal microdialysis in freely-moving rats with simultaneous determination of plasma drug concentrations and locomotor activity. *Neuropharmacology* 63:1064-1074.2012,

SCHEFFER R.E; KOWATCH R.A; CARMODY T; RUSH A.J. Randomized, placebo-controlled trial of mixed amphetamine salts for symptoms of comorbid ADHD in pediatric bipolar disorder after mood stabilization with divalproex sodium. *The American journal of psychiatry* 162:58-64.2005

SEDLAK J; HANUS L. Changes of glutathione and protein bound SH-groups concentration in rat adrenals under acute and repeated stress. *Endocrinol Exp* 16:103-109.1982

SORECA I; FAGIOLINI A, FRANK E; HOUCK P.R; THOMPSON W.K; KUPFER D.J Relationship of general medical burden, duration of illness and age in patients with bipolar I disorder. *J Psychiatr Res* 42:956-961.2008.

STRAKOWSKI S.M; SAX K.W. Progressive Behavioral Response to Repeated d-Amphetamine Challenge: Further Evidence for Sensitization in Humans. *Biol Psychiatry*, 44:1171–1177, 1998.

Strakowski SM, DelBello MP, Adler CM. The functional neuroanatomy of bipolar disorder: a review of neuroimaging findings. *Molecular Psychiatry*, 10:105-116, 2005.

TOHEN M; ZARATE C.A. J.R; HENNEN J; KHALSA H.M; STRAKOWSKI S.M; GEBRE-MEDHIN P; SALVATORE P; BALDESSARINI R.J. The McLean-Harvard First-Episode Mania Study: prediction of recovery and first recurrence. *The American Journal Of Psychiatry* 160: 2099-2107. 2003.

STEULLET P; CABUNGCAL J.H; KULAK A; KRAFTSIK R; CHEN Y; DALTON T.P; CUENOD M; Do K.Q. Redox dysregulation affects the ventral but not dorsal hippocampus:

impairment of parvalbumin neurons, gamma oscillations, and related behaviors. *J Neurosci* 30:2547-2558.2010.

VALVASSORI S.S; REZIN G.T; FERREIRA C.L; MORETTI M; GONÇALVES C.L; CARDOSO M.R; STRECK E.L; KAPCZINSKI F; QUEVEDO J. Effects of mood stabilizers on mitochondrial respiratory chain activity in brain of rats treated with D-amphetamine. *Journal of Psychiatric Research*, 44 :903-909, 2010.

VYTHILINGAM M; HEIM C; NEWPORT J; MILLER A.H; ANDERSON E; BRONEN R; BRUMMER M; STAIB L; VERMETTEN E; CHARNEY D.S; NEMEROFF C.B; BREMNER J.D. (Childhood trauma associated with smaller hippocampal volume in women with major depression. *Am J Psychiatry* 159:2072-2080.2002)

WADA A. Lithium and Neuropsychiatric Therapeutics: Neuroplasticity via Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$ ,  $\beta$ -Catenin, and Neurotrophin Cascades. *J Pharmacol Sci* 110, 14 – 28 (2009)

YANG Y; DIETER M.Z; CHEN Y; SHERTZER H.G; NEBERT D.W, DALTON T.P. (2002) Initial characterization of the glutamate-cysteine ligase modifier subunit Gclm(-/-) knockout mouse. Novel model system for a severely compromised oxidative stress response. *J Biol Chem* 277:49446-49452.

ZARATE C.A. J.R; SINGH J; MANJI H.K. Cellular plasticity cascades: targets for the development of novel therapeutics for bipolar disorder. *Biological Psychiatry* 59: 1006-1020. 2006.