



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

ANNE CAROLINE PEREIRA DA MATA

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO DIMESILATO DE  
LISDEXANFETAMINA DURANTE O PERÍODO  
PERIBUBERAL SOBRE A PRÓSTATA DE RATOS PUBERES  
WISTAR**

---

Londrina  
2022

ANNE CAROLINE PEREIRA DA MATA

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO DIMESILATO DE  
LISDEXANFETAMINA DURANTE O PERÍODO  
PERIBUBERAL SOBRE A PRÓSTATA DE RATOS PUBERES  
WISTAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual de Londrina – UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre.

Orientadora: Profa Dra Glaura Scantamburlo Alves Fernandes.

Londrina  
2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

M425e Mata, Anne Caroline Pereira da.  
Efeitos da exposição ao de dimesilato de lisdexanfetamina durante o período peribuberal sobre a próstata de ratos puberes wistar / Anne Caroline Pereira da Mata. - Londrina, 2022.  
51 f. : il.

Orientador: Glaura Scantamburlo Alves Fernandes.  
Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, 2022.  
Inclui bibliografia.

1. TDAH - Tese. 2. LDX - Tese. 3. próstata - Tese. 4. peripuberdade - Tese. I. Fernandes, Glaura Scantamburlo Alves . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. III. Título.

CDU 612

ANNE CAROLINE PEREIRA DA MATA

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO DIMESILATO DE  
LISDEXANFETAMINA DURANTE O PERÍODO  
PERIBUBERAL SOBRE A PRÓSTATA DE RATOS PUBERES  
WISTAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual de Londrina – UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Profa. Dra Glaura Scantamburlo Alves  
Fernandes.  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Profa. Dra. Daniela Cristina Ceccato Gerardin  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Luís Antônio Justulin Jr  
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita  
Filho- UNESP

Londrina, 12 de agosto de 2022.

Dedico este trabalho à Deus, que me presenteia todos os dias com a alegria da vida, que me dá forças e coragem para alcançar todos os meus objetivos.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, pela vida e saúde e por toda fé e coragem de ir atrás dos meus sonhos e por sempre se fazer presente em minha vida.

À minha orientadora profa. Dra. Glaura Scantamburlo Alves Fernandes, por ter aceito me orientar em meio a uma pandemia, onde não havia muitas certezas e mesmo assim se mostrou sempre presente, agradeço pela confiança e pela disponibilidade em me orientar no que fosse preciso, além de ser um grande exemplo de mulher e pesquisadora.

À minha avó Conceição Vasconcelos, que mesmo sendo graduada apenas em escrever seu nome e ler pequenas palavras, sempre me incentivou e viveu todos os momentos da busca por conhecimento junto comigo, meu muito obrigado.

Minha mãe Rosangela, que sempre me ofertou e me incentivou a busca por conhecimento e me ensinou a ser uma mulher forte e a não desistir em meio as adversidades.

Ao meu companheiro de vida Fabiano Parron, que esteve sempre ao meu lado me acalmando nos momentos difíceis e que nunca deixou de acreditar em mim, quando até eu mesma duvidava da minha capacidade.

Aos meus irmãos Thaumaturgo e Bruna, por sempre vibrarem com as minhas conquistas e por sempre estarem presentes em todos os momentos de minha vida.

Aos meus sobrinhos Davi, Vicente e Théo, por me ensinarem o amor sem medidas, sem vocês nada faria sentido, afinal é tudo por vocês!

Aos meus primos que são verdadeiros irmãos, Jaiales, Jean, Lucas, Roberto Jr e Thalita, saiba que o apoio de vocês foram fundamentais para eu chegar até aqui.

Aos meus tios e tias, Carlos Alberto, Roberto Marcos, Sebastiana e Rosemar, agradeço por todo o amor de vocês e por sempre serem minha primeira torcida.

A todos os integrantes do Laboratório de Toxicologia e Distúrbios Metabólicos da Reprodução Ana Camila, Ana Paula, Dayane, Débora, Ivana, João Vinicius, Karen, Rafaela e Giovanna, sem ajuda de vocês nada seria possível.

Ao amigo que o mestrado me deu Lucas, por dividir comigo todos os anseios e alegrias que existem em uma pós-graduação.

À minha amiga e personal Giovanna Moselli que sempre me ofertou palavras de ânimo e coragem.

À toda minha equipe de trabalho da UBS Atílio Brancalhão que vibram com as minhas conquistas e souberam entender os meus motivos de ausência, com carinho especial agradeço a Andressa, Cristiane, Elizangela, Fernanda, Grazielle, Haline, Josiane, Laísa e Márcia, por acreditarem tanto em mim e estarem presentes nesta jornada.

À Universidade Estadual de Londrina- UEL por ter me proporcionado essa experiência impar em minha vida e por ser essa instituição tão envolvida em pesquisas e que incentiva aos seus a busca pela ciência.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, por todo o conhecimento compartilhado.

Agradeço aos professores membros da banca por contribuírem com suas colocações para o crescimento do meu trabalho, meu muito obrigado!

Muito obrigado a todos os colaboradores da UEL, em especial aos funcionários da limpeza, técnicos de laboratório, biotério e segurança, que muitas vezes são esquecidos, mas sem eles nada seria possível.

Por fim, agradeço a todos que conviveram comigo ao longo destes dois anos e que participaram da construção deste trabalho de forma direta ou indireta e que por ventura não tenha sido mencionado neste agradecimento.

“Os que se encantam com a prática sem a ciência são como os timoneiros que entram no navio sem timão nem bússola, nunca tendo certeza do seu destino”.

Leonardo da Vinci



Da Mata, Anne Caroline Pereira. **Efeitos da exposição ao dimesilato de lisdexanfetamina durante o período peribuberal sobre a próstata de ratos puberes wistar.** 2022. 51 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

## RESUMO

O transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) é um transtorno neurocomportamental comumente diagnosticado entre crianças. O tratamento para o TDAH consiste com o uso de fármacos psicoestimulantes, como o dimesilato de lisdexanfetamina (LDX) para o controle dos sintomas que incluem desatenção, hiperatividade e impulsividade. Os sintomas do TDAH podem perdurar até a vida adulta acarretando diversos prejuízos aos indivíduos. Os períodos juvenil e peribuberal compreendem uma fase complexa para o desenvolvimento prostático, sendo uma fase crítica para obtenção da capacidade reprodutiva. O principal objetivo deste estudo foi avaliar se a exposição ao LDX durante o período peripuberal é capaz de causar danos na próstata de ratos púberes *Wistar*. Para tal, foram utilizados 40 ratos *Wistar* organizados em dois grupos experimentais: grupo LDX que foi tratado com LDX 11,3mg/kg, *via gavage*, diluído em água e o grupo Controle que recebeu apenas o veículo pela mesma via. Os animais foram tratados diariamente do dia pós-natal (DPN) 25 ao (DPN) 65. No DPN 66 os animais foram anestesiados e submetidos a eutanásia por punção cardíaca. As próstatas foram retiradas, pesadas e utilizadas para a avaliação do perfil oxidativo e inflamatório bem como avaliações histopatológicas e estereológicas. Os pesos das próstatas foram semelhantes em ambos os grupos experimentais. Contudo, os animais expostos ao LDX apresentaram um remodelamento nos compartimentos prostáticos, observado através das análises estereológicas. A avaliação histopatológica evidenciou que houve uma adaptação do tecido prostático, nos animais expostos ao fármaco. A exposição ao LDX não causou alterações nos biomarcadores de estresse oxidativo (MDA, GSH, GST e catalase). Em relação ao perfil inflamatório o grupo exposto ao LDX apresentou aumento da atividade de MPO e aumento no número de mastócitos degranulados no tecido prostático. De acordo com os resultados obtidos, conclui-se que o LDX afeta o desenvolvimento prostático de ratos *Wistar*.

**Palavras- chave:** TDAH; LDX; próstata; peripuberdade.

Da Mata, Anne Caroline Pereira. **Effects lisdexamfetamine dimesylate exposure during the peripubertal period onto the prostate of pubertal Wistar rats.** 2022. 51 p. Dissertation (Master's Degree in Physiological Sciences) - State University of Londrina, Londrina, 2022.

## ABSTRACT

Attention deficit/hyperactivity disorder (ADHD) is a neurodevelopment disorder commonly diagnosed amongst children. Treatment for ADHD consists in the use of psychostimulant drugs, such as lisdexamfetamine dimesylate (LDX), for symptom control. Common symptoms are inattention, hyperactivity, and impulsivity, which can also persist into adulthood, causing several impairments to individuals living with this disorder. The juvenile and peripubertal periods are a critical phase for prostate development and obtainment of an individual's reproductive capacity. In the light of this, the aim of this research project is to verify the possible damages to the prostates of pubertal *Wistar* rats after exposure to LDX during the peripubertal period. For that, 40 male *Wistar* rats were equally distributed into two groups: a group treated with LDX 11.3mg/kg and a control group. The control group received only vehicle (water) during the treatment period. Animals were treated daily from postnatal day (DPN) 25 to 65 *via gavage*. At PND 66, animals were anaesthetized and euthanized. Their prostates were harvested, weighed, and destined to histological analysis, evaluation of the oxidative profile, evaluation of the inflammatory profile through the activity of MPO and NAG, as well as mast cell count. Prostate weights were similar in both experimental groups. Exposure to LDX caused no change into the prostatic oxidative profile. Also, animals exposed to LDX showed prostatic remodeling, observed through histopathological and stereological analyses. Regarding the inflammatory profile, the group exposed to LDX showed an increase in MPO activity and in degranulated mast cells in the prostate tissue. Based on these results, we can infer that LDX impairs the prostatic development of *Wistar* rats.

**Key words:** ADHD, LDX, prostate, peripuberty.

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1** - Representação da estrutura química do Dimesilato de Lisdexanfetamina (LDX) e sua hidrólise..... 15

### MANUSCRITO

- Figura 1** - Pesos das próstatas ..... 38
- Figura 2** - Análise histopatológica ..... 39
- Figura 3** - Perfil inflamatório. **(A)** Atividade da Mieloperoxidase (MPO). **(B)** Atividade da N-acetilglicosaminidase (NAG) ..... 40
- Figura 4** - Biomarcadores de estresse oxidativo. **(A)** Lipoperoxidação lipídica. **(B)** Atividade da enzima GSH. **(C)** Atividade da enzima Catalase. **(D)** Atividade da enzima GST. .... 41

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 -</b>	Análise estereológica .....	42
<b>Tabela 2 -</b>	Contagem do número de mastócitos totais, intactos e desgranulados .....	43

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADRA2C	Gene Adrenoceptor Alfa 2C
AR	Receptores de Andrógenos
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
DAT1	Gene Transportador de Dopamina
DHT	Diidrotestosterona
DOHaD	Origem do Desenvolvimento da Saúde e da Doença
DPN	Dia Pós- natal
DRD4	Gene Receptor de Dopamina 4
DRD5	Gene Receptor de Dopamina 5
DSM-V	Manual Diagnóstico e estatístico de Transtornos Mentais
D-ANF	Dextroanfetamina
ER	Receptores de estrógenos
GSH	Glutathiona Reduzida
GST	Glutathiona S Transferase
MAO	Enzima Monoamina Oxidase
MPO	Mieloperoxidase
NAG	N-acetilglicosaminidase
NET	Transportador de noradrenalina
TBARS	Ácido tiobarbitúrico
TDAH	Transtorno do Déficit de Atenção e Hiperatividade
TGI	Trato Gastrointestinal
LDX	Dimesilato de Lisdexanfetamina
SNAP-25	Dopamina b- hidroxilase e a proteína-25

SNC

Sistema Nervoso Central

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	13
1.1	TRANSTORNO DO DÉFICIT DE ATENÇÃO E HIPERATIVIDADE – TDAH .....	13
1.2	DIMESILATO DE LISDEXANFETAMINA.....	14
1.3	PRÓSTATA .....	16
1.4	PERÍODO JUVENIL E PERIPUBERAL .....	18
1.5	ORIGEM DO DESENVOLVIMENTO DA SAÚDE E DA DOENÇA (DOHAD) E O DESENVOLVIMENTO DA PRÓSTATA .....	18
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	20
2.1	OBJETIVO GERAL .....	20
2.2	OBJETIVO ESPECIFICO .....	20
<b>3</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	21
	MANUSCRITO: “EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO DIMESILATO DE LISDEXANFETAMINA DURANTE O PERÍODO PERIBUBERAL SOBRE A PRÓSTATA DE RATOS PUBERES WISTAR” .....	21
	<b>REFERÊNCIAS REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	44
	<b>ANEXOS</b> .....	49
	ANEXO I- Certificado de aprovação dos procedimentos experimentais pela Comissão de Ética no Uso de Animais .....	49

## 1 REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1 TRANSTORNO DO DÉFICIT DE ATENÇÃO E HIPERATIVIDADE - TDAH

O transtorno do déficit de atenção e hiperatividade (TDAH), como conhecido pelo Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-V), é o transtorno neurocomportamental mais comumente diagnosticado em crianças. O TDAH é pertencente ao grupo de transtornos do neurodesenvolvimento, sendo caracterizado pela tríade sintomatológica de desatenção, desorganização / hiperatividade/ impulsividade (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013). Este transtorno é capaz de produzir prejuízos a vida pessoal, social, acadêmica e ocupacionais ao indivíduo (WILENS et al., 2018; TOURJMAN et al., 2018).

Segundo a American Psychiatric Association (2013), o TDAH é visto como um problema de saúde pública, com consequências que consistem nas atividades motoras excessivas, dificuldade em manter a atenção por determinado tempo e sobre o controle de impulsos, fatores estes que influenciam diretamente na vida do indivíduo. O TDAH, apresenta uma taxa de prevalência mundial de 5% em crianças e 2,5% em adultos, correspondendo que 50% dos indivíduos diagnosticados na infância permaneceram com os sintomas durante a vida adulta (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013; LOOBY, 2008).

Os problemas comportamentais encontrados no TDAH afetam diferentes áreas da vida do indivíduo, tanto na infância, adolescência e vida adulta podendo provocar problemas de auto estima, conflitos familiares e na vida amorosa (BIEDERMAN ET AL., 2012; VAQUERIZO-MADRID, 2005). Além disso, indivíduos com TDAH expressam chances maiores de apresentarem comportamentos de risco, como envolvimento com substâncias ilícitas, comportamentos sexuais de risco, maiores chances de se envolverem em acidentes automobilístico, além de apresentarem comportamentos antissociais (BARKLEY & COX, 2007; FROEHLICH et al., 2007; RANBY et al., 2012).

Mesmo com diversos estudos em busca de desvendar a etiologia e fisiopatologia deste transtorno, não há evidências claras de como ocorra seu desenvolvimento. A literatura científica aponta que se trata de um transtorno com origem multifatorial, com participação de fatores neurobiológicos, ambientais, genéticos e diversos genes associados (BIEDERMAN, 2005; MCGOUGH & MCCracken, 2006; POLANCZYK et al., 2014; RANBY et al., 2012; TRIPP E WICKENS, 2009;). Estudos apontam anormalidades no sistema nervoso central (SNC), apoiando a base neurobiológica envolvida no TDAH, além do mais, indivíduos acometidos com



o TDAH apresentam acometimento nas funções executivas, isto é, comprometimento nos processos de controle mental que permitem o auto controle (PENNINGTON E OZONOFF, 1996; GEURTS et al., 2004).

Exames de imagem como, ressonância magnética sugerem redução da atividade neuronal na região frontal (BUSH et al., 1999). O comprometimento da função executiva ocorre pela redução volumétrica do lobo frontal e hipoativação do lobo frontal direito, além de evidenciadas disfunções nos circuitos fronto-estriatais do cérebro (RUBIA et al., 2001). Esse sistema se liga a diversas regiões do lobo frontal aos gânglios da base que em conjunto com outras áreas cerebrais, promovem o controle cognitivo, comportamental e os movimentos (NOORDERMEER et al., 2017). Outros fatores envolvidos na etiologia do TDAH são os fatores genéticos, possivelmente pela participação de diversos genes identificados através de investigações genéticas e moleculares os quais evidenciam redução na atividade dos sistemas dopaminérgico e noradrenérgico (COUTO; MELO-JUNIOR; GOMES, 2010). Estes sistemas desempenham papel crucial no desenvolvimento do transtorno (COUTO; MELO-JUNIOR; GOMES, 2010; BUDZISZEWSKA et al., 2010). Neste contexto, os genes mais estudados são o gene transportador de dopamina 1 (DAT1), os genes receptores de dopamina 4 e 5 (DRD4 e DRD5), o gene adrenoceptor alfa 2C (ADRA2C), dopamina b-hidroxilase e a proteína-25 (SNAP-25) e o transportador de noradrenalina (NET).

Estudos demonstram que alterações nos fenótipos dos genes relacionados a dopamina, como o DAT1 estão relacionados a comportamentos impulsivos, compulsivos e aditivos, enquanto alterações nos genes relacionados a noradrenalina estão implicados com o mal funcionamento do lobo frontal que resulta em maior distração, falta de atenção, hiperatividade, baixa tolerância à frustração e ansiedade (COMINGS et al., 2000; LI et al., 2006; PURPER-OUAKIL et al., 2011).

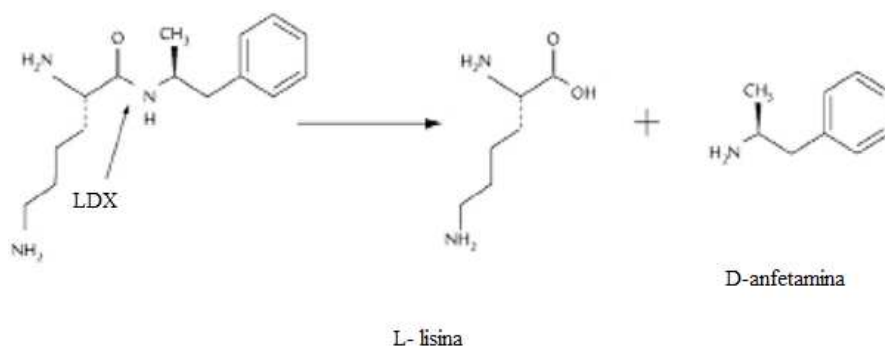
## 1.2 DIMESILATO DE LISDEXANFETAMINA

Os fármacos mais utilizados na atualidade para tratamento do TDAH são os fármacos conhecidos por estimulantes do SNC. Estes fármacos atuam sobre as vias da noradrenalina e dopamina favorecendo o estímulo das funções executivas e apresentam efetividade sobre a redução dos sintomas apresentados no TDAH tanto em crianças como em adolescentes (FRAMPTON, 2018; ADESMAN, 2001).

Dentre os fármacos psicoestimulantes disponíveis pela indústria farmacêutica, temos o Dimesilato de Lisdexanfetamina (LDX), fármaco aprovado para uso no Brasil em 2011, sendo

comercializado como Venvanse® (INGELSRUD, 2016). Este fármaco apresenta administração única diária, com doses de 30, 50 ou 70mg e vem sendo amplamente prescrito para pacientes pediátricos acima de 6 anos que não obtiveram sucesso com o uso do metilfenidato (HUTSON; PENNICK; SECKER, 2014). Segundo estudos, os efeitos terapêuticos da LDX são prolongados, apresentando ação por um período de até 13 horas em crianças e 14 horas em adultos após a sua administração (WIGAL, et al., 2009; WIGAL, et al., 2010). Devido a ação duradoura, este fármaco contribui para melhor eficácia e adesão ao tratamento (BOELLNER et al., 2010), por apresentar formulação de dose única diária que facilita a adesão e reduz a chance de abandono ou descontinuidade ao tratamento.

O LDX é um pró fármaco que apresenta como estrutura química (2S)-2,6- diamino-N-[(1S)-1-metil-2-fenil-etil] hexamina dimetanosulfonato (**Figura 1**) (MATTINGLY, 2010), sua forma ativa é a D-anfetamina (D-anf). Após a ingestão por via oral, é absorvido de forma intacta no trato gastrointestinal (TGI), atingindo a circulação sanguínea, onde passará por um processo de hidrólise, pelo qual a molécula de LDX é ligada covalentemente ao aminoácido L-lisina que após a biotransformação se separam em L-lisina e D-anfetamina (porção ativa) (OKAMURA, 2019). A metabolização da LDX em D-anfetamina ocorre no sangue total e não no plasma, no homem e no roedor. Também foi observado metabolização do LDX em homogenatos de fígado no rato e no humano e no rim humano, devido sangue residual presente nestes órgãos. Após análise in vitro, não foi observado metabolização do LDX por fluido gastrointestinal simulado e tripsina, favorecendo a hipótese de que in vivo a metabolização no TGI, seja mínima (PENNICK, 2010).



**Figura 1.** Estrutura química e hidrólise do pró-fármaco dimesilato de lisdexanfetamina para seu composto ativo de D-anfetamina (Adaptado de Mattos, 2014).

O mecanismo de ação do LDX ocorre como as demais drogas derivadas das anfetaminas liberação e a inibição da recaptação de catecolaminas. Desta forma, a dextroanfetamina atua sobre a liberação de dopamina e norepinefrina na fenda sináptica, além da inibição dos transportadores de norepinefrina (NET) e inibição da enzima monoamina oxidase (MAO), promovendo assim em aumento da ação estimulante do SNC (OKAMURA, 2019).

Apesar de ser um fármaco bem tolerado entre a maioria dos indivíduos, Neta et al (2020), traz como os principais efeitos adversos do uso do LDX a falta de apetite, irritabilidade e distúrbios do sono, sendo estes os efeitos adversos mais frequente e menos tolerados por algumas pessoas.

### 1.3 PRÓSTATA

A próstata é uma glândula sexual anexa presente no sistema genital masculino dos mamíferos. No humano, encontra-se localizada na cavidade pélvica, posterior a sínfise púbica, anterior ao reto e situada logo abaixo da bexiga (AUMÜLLER; ADLER, 1979; HAYASHI et al., 1991; LEE; AKIN-OLUGBADE; KIRSCHENBAUM, 2011). Pesa cerca de 20g no adulto e mede cerca de 3 a 4 cm de largura, 4 a 6 cm de comprimento e 2 a 3 cm de espessura, possuindo uma organização fibromuscular de 30 a 50% e glandular de 50 a 70% (TANAGHO, et al., 1994; COTRAN, et al., 1996).

No homem, a próstata é dividida em três zonas de acordo com a sua anatomia e histologia, sendo elas: zona central, zona de transição e zona periférica (MCNEAL, 1988; KUMAR & MAJUMDER, 1995; LACZKO *et al.*, 2005). A zona periférica em conjunto com a zona central, corresponde a 95% de toda a glândula, enquanto os 5% restante corresponde a zona de transição (TANAGHO, et al., 1994).

Em roedores, a glândula prostática apresenta sua divisão em lobos, sendo constituída por quatro pares de lobos, ou o complexo prostático, denominados como próstata ventral (VP), próstata dorsal (DP), próstata lateral (LP) e próstata anterior (AP) ou glândula de coagulação (HAYASHI et al., 1991; LEE; AKIN-OLUGBADE; KIRSCHENBAUM, 2011). O lobo anterior do roedor apresenta semelhança com a zona central da próstata humana, sendo a região prostática que apresenta maior susceptibilidade ao desenvolvimento de hiperplasia benigna da próstata (HBP). Os lobos laterais e dorsais possuem semelhança a zona periférica da próstata do homem, e esta estrutura corresponde a região com maior incidência de desenvolvimento de câncer prostático (POLLARD, 1973; DANIELPOUR *et al.*, 1994). Dentre toda a estrutura prostática, o lobo ventral do roedor não apresenta semelhança com a próstata de humanos. No entanto, este lobo demonstra ser sensível as alterações hormonais (BURNSTEIN, 2005; ROY-

BURMAN et al., 2004). Ressalta-se que o lobo ventral é o mais utilizado entre os pesquisadores, por apresentar funcionalidade semelhante a próstata humana (SHAPPELL et al., 2004) além de ser de fácil manuseio devido a sua localização.

De acordo com Hayward e Cunha (2000), a principal função da próstata é secretar proteínas e íons responsáveis pela produção do líquido seminal, o que gera condições favoráveis para a sobrevivência dos espermatozoides e sua viabilização pós ejaculação, ou seja, manter os gametas fora do sistema reprodutor masculino, e assim favorecer a fecundação (PRICE, 1963; KUMAR & MAJUMDER, 1995). Além disso, a próstata apresenta uma vasta inervação que pertence ao sistema nervoso autônomo. No roedor, a próstata recebe inervações do sistema simpático, através do nervo hipogástrico, assim como inervação parassimpática, por intermédio do nervo pélvico (RODRIGUES; MACHADO; WROCLAWSKI, 2002; VAALASTI; HERVONEN, 1979).

Tanto no homem quanto no roedor a próstata é um órgão hormônio-dependente, ou seja, seu funcionamento e desenvolvimento dependente da ação hormonal de andrógenos e estrógenos os quais são essenciais para estes processos, sendo ambos produzidos pelos testículos, em maior concentração, e pelo córtex da glândula adrenal, (MAGGIOLINI *et al.*, 1999; EL-ALFY *et al.*, 2000).

A testosterona, o principal andrógeno masculino, é responsável pelo crescimento e desenvolvimento da próstata desde o período embrionário, fetal, púbere a vida adulta. No entanto, sua ação ocorre após a conversão da testosterona em seu metabolito ativo, a diidrotestosterona (DHT), obtido através da metabolização da testosterona a partir da enzima 5 $\alpha$ -reductase tipo I ou tipo II (WRIGHT *et al.*, 1999; GROSSMANN *et al.*, 2001; BIANCO *et al.*, 2002). Esta enzima é encontrada nas células epiteliais basais e no estroma em fibroblastos (LEE et al., 2019). Entretanto, para que ocorra atividade hormonal é necessário a presença de receptores específicos, sendo eles os receptores de andrógenos (AR) e os receptores de estrógenos (ER), tanto  $\alpha$  e  $\beta$  (YANG et al., 2007).

Os AR são encontrados no estroma e no epitélio prostático, sendo local de ligação da testosterona e DHT, sendo a DHT o andrógeno de maior afinidade com os AR (NIETO; RIDER; CRAMER, 2014; ROEHRBORN, 2008; THOMSON; CUNHA; MARKER, 2008). Os AR são os mediadores da ação androgênica não apenas no tecido prostático, mas sim em todos os tecidos que apresentem ação andrógenos-dependentes. Esses receptores são capazes de inibir ou estimular a proliferação celular de acordo com o ambiente e os níveis hormonais circulantes (NIETO; RIDER; CRAMER, 2014). Diante disso, a função secretora do epitélio prostático é

exercida através da mediação dos AR encontrados no estroma da glândula, que atuam no desenvolvimento e manutenção da próstata (CUNHA et al., 1985; CUNHA; CHUNG, 1981; DONJACOUR; CUNHA, 1993; NEMETH; LEE, 1996).

Os estrógenos, são provenientes da conversão da testosterona em estradiol, pela atividade da enzima aromatase, sendo o  $17\beta$ -estradiol o estrógeno mais comumente encontrado nos homens (HO; HABIB, 2011; NICHOLSON; RICKE, 2011; WILSON, 2011). Estes hormônios apresentem importante participação na regulação do crescimento prostático em diferentes estágios da vida do homem (ELLEM; RISBRIDGER, 2009).

#### 1.4 PERÍODO JUVENIL E PERIPUBERAL

Após o nascimento, o desenvolvimento dos roedores classificados em quatro fases, sendo elas: neonatal (DPN 1 a 7); infantil (DPN 8 ao 21); juvenil (DPN 22 ao 35) e peripuberal (DPN 36 ao 55 ou 65). Roedores são considerados adultos, após atingirem a maturidade sexual (OJEDA et al., 1980). Todas as fases do desenvolvimento ocorrem estímulos hormonais e mecanismos genético dos indivíduos (DAMGAARD et al., 2002). Durante as fases juvenil e peripuberal ocorrem diversos eventos importantes, principalmente no eixo-hipotálamo-hipófise que podem impactar sobre o desenvolvimento e atividade da glândula prostática.

Na fase juvenil se inicia a espermatogênese e o desenvolvimento dos espermátócitos, é também nesta fase que ocorre a diferenciação das células das linhagens germinativas dos túbulos seminíferos e o início da espermiogênese. Desta forma, temos a maturação das células de Leydig, proporcionando o aumento da produção de testosterona (PICUT et al., 2015).

A peripuberdade é um período que compreende a transição entre a fase juvenil e a vida adulta, durante este período ocorre diversas alterações em todo o organismo. Durante este período no sistema reprodutor masculino temos o aumento repentino e constante da testosterona, assim como, aumento dos túbulos seminíferos e o fim da maturação das células germinativas e a formação dos espermatozoides (PICUT et al., 2015).

#### 1.5 - ORIGEM DO DESENVOLVIMENTO DA SAÚDE E DA DOENÇA (DOHAD) E O DESENVOLVIMENTO DA PRÓSTATA

O conceito da Origem Desenvolvimentista da Saúde e da Doença (DOHAD) refere-se a teoria de que a exposição a fatores ambientais em fases iniciais do desenvolvimento pode prejudicar a saúde na vida adulta causando diferentes doenças devido a efeitos genéticos e epigenéticos (SILVEIRA et al., 2007).

Ao longo das últimas duas décadas, estudos epidemiológicos em todo o mundo relacionaram a influência da exposição a determinados fatores ambientais no início da vida com as alterações na expressão gênica do indivíduo. Além disso, estudos clínicos e pré-clínicos comprovam esses achados e sugerem uma grande associação entre fatores ambientais ocorridos na vida intrauterina ou nas fases iniciais da vida extra-uterina e o aparecimento de doenças crônicas ao longo da vida. (Silveira et al., 2007)

Na Segunda Guerra Mundial, Ravelli et al. (1978) estudaram uma população de 300.000 homens, filhos de mulheres expostas a um período de escassez alimentar conhecido como “fome holandesa” durante o cerco da Holanda pela Alemanha e evidenciaram que na vida adulta, esses indivíduos apresentaram padrões diferenciados de composição corporal dependendo da idade em que tinham sido expostos à desnutrição materna durante a vida intra-uterina. Caso a mãe houvesse sofrido desnutrição durante o último trimestre da gestação, esse grupo apresentava uma baixa incidência de obesidade. No entanto, se a desnutrição ocorresse no primeiro semestre da gestação, a incidência de obesidade aumentava significativamente na prole.

Seguindo essas evidências, Barker et al., (1989) criaram a presente hipótese e que foi confirmada: condições adversas intra-uterinas e durante a infância aumentavam o risco de doenças cardiovasculares. Assim, a teoria DOHaD é responsável pelo surgimento de diversos estudos nas áreas da biologia molecular, bioquímica, morfofuncionais e epidemiológicos que buscam investigar a relação entre a exposição a fatores ambientais durante estágios precoces da vida com consequências para a vida adulta (GONÇALVES, 2019). Assim, avaliar os efeitos de medicamentos utilizados nessas fases trazem informações importantes sobre a origem de alterações morfológicas, fisiológicas ou comportamentais ao longo da vida.

No homem e em roedores, o desenvolvimento da glândula prostática tem seu início a partir de cordões epiteliais sólidos oriundos do seio urogenital e para que ocorra este processo de desenvolvimento prostático é essencial que haja estímulos de andrógenos produzidos pelas gônadas fetal o qual ocorre de forma semelhante (ASSIS, 2018). Após o nascimento a próstata de roedores não está desenvolvida, ocorrendo seu desenvolvimento nos primeiros quinze dias de vida pós-natal (DPN) e estendendo-se até que atinja a maturidade sexual (MARKER et al, 2003).

Portanto, desenvolver estudos sobre a influência de diferentes fatores durante os períodos de desenvolvimento prostático se mostram essenciais para o entendimento de eventos que possam ocorrer ao longo da vida do homem.

## **2. OBJETIVOS**

### 2.1 Objetivo Geral

O objetivo deste estudo é avaliar se a exposição ao LDX durante o período peripuberal causa danos na próstata de ratos púberes Wistar.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Analisar se a exposição ao LDX provoca inflamação na glândula prostática.
- Verificar se o LDX altera o perfil oxidativo da próstata.
- Avaliar os efeitos da dose utilizada do LDX sobre o desenvolvimento da próstata de ratos púberes.

## **A EXPOSIÇÃO AO DIMESILATO DE LISDEXANFETAMINA DURANTE O PERÍODO PERIPUBERAL PROVOCA INFLAMAÇÃO E ALTERA O DESENVOLVIMENTO PROSTÁTICO DE RATOS PÚBERES WISTAR**

Anne Caroline Pereira da Mata<sup>1,2</sup>, Rafaela Pires Erthal<sup>1,3</sup>, João Vinícius Honório da Silva<sup>1,3</sup>, Giovanna Fachetti Frigoli<sup>1</sup>, Dayane Priscila dos Santos<sup>1,3</sup>, Mariana Marques Bertozzi<sup>3</sup>, Waldiceu Aparecido Verri Jr<sup>3</sup>, Wellerson Rodrigo Scarano<sup>4</sup>, Glaura Scantamburlo Alves Fernandes<sup>1\*</sup>

1 – Departamento de Biologia Geral, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina- UEL, Londrina, Paraná, Brasil, Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445, CEP: 86.057-970.

2 – Departamento de Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina- UEL, Londrina, Paraná, Brasil, Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445, CEP: 86.057-970.

3 – Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina- UEL, Londrina, Paraná, Brasil, Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445, CEP: 86.057-970.

4 - Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho- UNESP, Botucatu, São Paulo, Brasil, Rua Prof. Dr. Antonio Celso Wagner Zanin, 250, Rubião Júnior, CEP: 18.618-970.\***Autor correspondente**

Glaura Scantamburlo Alves Fernandes

**Tel.:** +55 43 33714417

**E-mail:** glaura@uel.br (G.S. A. Fernandes).



## RESUMO

O transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH), é o transtorno comportamental mais diagnosticado entre crianças, é caracterizado por desatenção, desorganização e hiperatividade/ impulsividade, causando prejuízos na vida pessoal, profissional, social e acadêmica. O tratamento para o TDAH é feito com fármacos estimulantes do SNC, como o dimesilato de lisdexanfetamina (LDX), um pró-farmaco utilizado por crianças e adolescentes para o controle dos sintomas do TDAH. Sendo no período peripuberal que ocorre diversas transformações no sistema reprodutor até se atingir a maturação sexual. O objetivo deste trabalho foi analisar os danos causados na próstata de ratos púberes wistar após a administração do dimesilato de lisdexanfetamina no período peripuberal. Para isso, 20 ratos Wistar (DPN 25), foram organizados em dois grupos e tratados por 40 dias. Os animais receberam LDX na dose de 1,13mg/kg, enquanto o grupo controle foi tratado pelo mesmo período com solução salina 0,9% via gavagem. No DPN 66 os animais anestesiados e submetidos a eutanásia, tendo a próstata retirada, pesadas e destinadas para análises histopatológicas e estereológicas ou armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  para avaliação do perfil inflamatório e níveis de estresse oxidativo. Os resultados deste estudo mostraram que a LDX provocou remodelamento estrutural da próstata dos animais tratados, assim como aumento da atividade de MPO e número de mastócitos totais e desgranulados na próstata. Por outro lado, a dose utilizada não foi capaz de provocar alteração nos níveis de NAG e não provocou aumento das enzimas antioxidantes. O uso da LDX durante o período peripuberal causa inflamação prostática e altera o desenvolvimento pós-natal da próstata de ratos púberes. O nosso objetivo é aumentar a atenção sobre o uso deste fármaco entre crianças e adolescentes.

Palavras- chaves: Transtorno do Déficit de atenção e Hiperatividade (TDAH); Dimesilato de Lisdexanfetamina; Próstata; Peripuberal; Inflamação.

## ABSTRACT

Attention deficit hyperactivity disorder (ADHD), is the most diagnosed behavioral disorder among children, is characterized by inattention, disorganization and hyperactivity/impulsivity, causing damage in personal, professional, social and academic life. Treatment for ADHD is with CNS stimulant drugs such as lisdexamfetamine dimesylate (LDX), a prodrug used by children and adolescents to control the symptoms of ADHD. Being in the peripubertal period that occurs several transformations in the reproductive system until reaching sexual maturation. The objective of this work was to analyze the damage caused to the prostate of pubertal Wistar rats after the administration of lisdexamfetamine dimesylate in the peripubertal period. For this, 20 Wistar rats (DPN 25) were organized into two groups and treated for 40 days. The animals received LDX at a dose of 1.13mg/kg, while the control group was treated for the same period with 0.9% saline solution via gavage. At DPN 66, the animals were anesthetized and euthanized, with the prostate removed, weighed and destined for histopathological and stereological analysis or assessment of oxidative stress levels and inflammation profile. The results of this study showed that LDX caused structural remodeling of the prostate, as well as an increase in MPO activity and the number of total and degranulated mast cells in the prostate. On the other hand, the dose used was not able to cause changes in NAG levels or biomarkers of oxidative stress. In conclusion, the use of LDX during the peripubertal period causes prostatic inflammation and alters the postnatal development of the prostate of pubertal rats.

**Keywords:** Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD); Lisdexamfetamine Dimesylate; Prostate; peripubertal; Inflammation.

## 1.Introdução

O transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH), é o transtorno neurocomportamental mais diagnosticado em crianças em todo o mundo. Apresenta como principais sintomas a desatenção, desorganização e hiperatividade/ impulsividade (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013). Diante seus sintomas, o TDAH pode impactar negativamente a vida pessoal, social, acadêmica e profissional dos indivíduos acometidos por este transtorno (TOURJMAN et al., 2019; WILENS et al., 2018).

Segundo a American Psychiatric Association (2013), o TDAH é um problema de saúde pública que causa consequências no dia a dia. Indivíduos com este transtorno apresentam atividades motoras excessivas, dificuldade em se manter atento por determinado período, além da dificuldade sobre o controle dos impulsos, sendo fatores que impactam diretamente a vida das pessoas. Além do mais, este transtorno apresenta uma taxa de prevalência mundial de 5% em crianças e 2,5% em adultos, sendo que 50% dos indivíduos diagnosticados na infância permaneceram com os sintomas durante a vida adulta (AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS, 2011; LOOBY, 2008). Diante disso, entende-se que os problemas causados pelo TDAH se estendem para a adolescência e vida adulta.

O tratamento para controle dos sintomas do TDAH envolve combinações entre terapia comportamental e ações farmacológicas, onde o uso de fármacos estimulantes do SNC é rotineiro. Atualmente disponível no mercado encontra-se o dimesilato de lisdexanfetamina (LDX), o qual apresenta doses únicas diárias (30, 50 ou 70mg), e é prescrito para controle dos sintomas do TDAH em pacientes com idade superior a 6 anos, nos quais o tratamento com o uso de metilfenidato não foi eficaz (HUTSON; PENNICK; SECKER, 2014). O LDX apresenta ação prolongada, em geral, por um período de até 13 horas em crianças e 14 horas em adultos (WIGAL et al., 2009, 2010). Esta característica vem sendo apontada como importante para o sucesso terapêutico.

O LDX é um pró-fármaco, ao qual necessita passar por um processo de biotransformação para que ocorra conversão para sua forma ativa: a D-anfetamina (D-anf) (QUEIROZ, 2012). Esse mecanismo de conversão ainda é incerto, no entanto, tem se sugerido que sua metabolização ocorra no sangue total, mas não no plasma, tanto de roedores como no ser humano, sugerindo a participação das hemácias nessa etapa (PENNICK, 2010). Após o processo de hidrólise o composto ativo rapidamente atinge a circulação sistêmica e

posteriormente atravessa a barreira hematoencefálica, chegando ao SNC, onde iniciará seu mecanismo de ação. A ação farmacológica do LDX ocorre como as demais drogas derivadas das ANF que promovem a liberação de catecolaminas e a inibição da recaptação das mesmas. Desta forma, a dextroanfetamina atua sobre a liberação de dopamina e norepinefrina na fenda sináptica, além da inibição dos transportadores de norepinefrina (NET) e inibição da enzima monoamina oxidase (MAO), o que promove um aumento da ação estimulante no SNC (OKAMURA, 2019).

No período peripuberal ocorre a transição entre a infância e adolescência, e sendo assim, é nesta fase que ocorrem eventos relacionados ao desenvolvimento pós-natal do sistema reprodutor masculino bem como a sua maturação (GOLUB et al., 2008). Em ratos, o período peripuberal se inicia no dia pós-natal (DPN) 36 e se estende aos DPN55 ou DPN 65 (OJEDA et al., 1980). Nessa fase ocorre a maturação do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, evento essencial para o início reprodutivo da espécie (OJEDA; URBNSKI, 1994). Como a esteroidogênese ainda não está totalmente estabelecida durante esse período, esta pode ser uma fase crítica do desenvolvimento reprodutivo (JOHNSON; WELSH; WILKER, 1997).

Em relação ao desenvolvimento da próstata, após o nascimento a próstata de roedores não se encontra totalmente desenvolvida, ocorrendo seu desenvolvimento em torno de 15 dias vida pós-natal (DPN) e estendendo-se até atingir a maturidade sexual. Durante a puberdade ocorre aumento dos níveis de testosterona promovendo a diferenciação funcional próstata (MARKER et al., 2003). A próstata humana recebe inervação do sistema simpático autônomo através de fibras pós-ganglionares que se estendem de corpos celulares nervosos presentes na extremidade periférica do nervo hipogástrico. As fibras adrenérgicas estimulam a contração das células musculares lisas, auxiliando o processo de secreção do conteúdo glandular para a uretra prostática. (SETCHELL; BREED, 2006; WANG et al., 1991).

Até o momento, não se sabe sobre os efeitos do LDX sobre o desenvolvimento pós-natal (juvenil e peripuberal) do indivíduo, principalmente sobre o desenvolvimento do sistema reprodutor masculino como a próstata. Portanto, devido à escassez de informações sobre o assunto e a relevante importância clínica que a próstata desempenha sobre o sistema reprodutor masculino, também, por ser alvo de alterações benignas e malignas, o objetivo deste estudo foi avaliar se a administração do LDX durante os períodos juvenil e peripuberal é capaz de provocar danos na morfofisiologia prostática de ratos Wistar.

## 2. Material e método

### 2.1 Animais

Foram utilizados 40 ratos da linhagem Wistar com idade inicial de 22 dias pós-natal (DPN), provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina- UEL. Todo o delineamento experimental está em conformidade com o código de ética brasileiro do uso de animais de laboratório e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina- CEUA/UEL (OF. CIRC. CEUA Nº 82/2019).

Os animais foram aclimatados ao Biotério do Laboratório de Toxicologia e Distúrbios Metabólicos da Reprodução durante três dias que antecederam o início do período experimental. Em seguida, foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos experimentais (n=20): grupo controle = receberam apenas água potável e grupo LDX = receberam o LDX na dose de 11,3 mg/kg/dia diluído em água, *via gavage*, durante quarenta dias consecutivos. A dose escolhida corresponde a uma capsula de 70mg do fármaco administrada a uma criança de aproximadamente 6 anos de idade, e equivale a 1,13% da DL50 oral para ratos (DL50 oral para ratos > 1000 mg/kg) (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2005; KRISHNAN; MONTCRIF, 2007). Para o cálculo da dose ideal para roedores foi realizado o seguinte cálculo: divisão da quantidade de mg do fármaco pelo valor de conversão da espécie (70/6.2), segundo a Food and drug administration (2005).

Período experimental ocorreu do 25 ao 65 DPN, que corresponde ao período juvenil e ao período peripuberal, (Ojeda et al.,1980). Ao término do período experimental (DPN 66), os animais foram pesados, anestesiados com injeção intraperitoneal com a combinação de ketamina 75mg/kg (Sedomin® 10%, Avellaneda, Argentina) e xilazina 10mg/kg corpóreo (Anasedan ®, Paulínia, Brazil), submetidos a eutanásia por punção cardíaca e as próstatas ventral foram retiradas, pesadas e destinadas para análises estereológicas ou armazenadas a – 80°C para avaliação do perfil inflamatório e níveis de estresse oxidativo.

### 2.2 Processo histológico

As próstatas foram fixadas em solução de metacarn (10% acético ácido, 60% metanol e 30% clorofórmio) por um período de 4 a 8 horas a 30°C. Após o período de fixação foram embebidos em Paraplast® e seccionados a 5µm. Os cortes de próstata foram corados com hematoxilina e eosina (HE) e azul de toluidina. Após a coloração, as lâminas foram observadas

sob microscopia de luz e fotodocumentadas para a análise estereológica e para determinação da presença de mastócitos intactos ou degranulados.

### **2.3 Análise estereológica e histopatológica**

A análise estereológica ocorreu segundo método de Weibel (1963), na qual se utiliza um sistema teste de linhas e pontos em um graticulado com 168 pontos e 60 linhas. Assim, obtém-se a proporção do corte ocupada pelo lúmen, epitélio e interstício prostático. A análise histopatológica ocorreu de modo qualificativo, analisado o aspecto do epitélio e interstício.

### **2.4 Perfil inflamatório**

#### **2.4.1 Atividade da mieloperoxidase (MPO)**

A análise ocorreu conforme Casagrande et al (2006) com algumas modificações, as amostras foram homogeneizadas e centrifugadas (16.1 rcf, 4°C, por 2 minutos). Resumidamente, 15 µl de amostra do sobrenadante foram misturadas com 200 µl de solução tampão de fosfato 50 mM em pH 6,0, contendo 0,167 mg/ml de dihidroclorato de O-dianisidina e 0,015% de peróxido de hidrogênio. A leitura ocorreu em espectrofotômetro (Multiskan GO Microplate, Thermo Fischer Scientific, Vantaa, Finlândia) em comprimento de onda de 450 nm e a atividade da MPO foi comparada a uma curva padrão.

#### **2.4.2 Atividade de N-acetilglicosaminidase (NAG)**

Para o ensaio de NAG, 10 µl do sobrenadante foi misturado com 80 µl de tampão K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> sem HTAB e 100 µl de substrato para NAG (p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glicosaminida). A reação foi incubada por 30 minutos à temperatura ambiente. Após a incubação, foram adicionados 100 µl de glicina 0,2 M em cada poço, e a leitura feita em espectrofotômetro (Multiskan GO Microplate, Thermo Fischer Scientific, Vantaa, Finlândia) com comprimento de onda de 400 nm. Os resultados foram apresentados como número de macrófagos x 10<sup>4</sup> /mg de tecido (CASAGRANDE et al., 2006), com modificações.

### **2.5 Determinação da presença e tipos de mastócitos**

A avaliação da presença de mastócitos ocorreu conforme descrito por Mendes et al. (2011). Esta análise foi feita para avaliar e quantificar os mastócitos intactos e degranulados no tecido da próstata. Para tanto, os mastócitos foram classificados em granulados e degranulados em dez fotomicrografias obtidas em microscópio de luz (400X).

## **2.6 Biomarcadores de estresse oxidativo**

### **2.6.1 Determinação dos níveis de peroxidação lipídica**

Os níveis de substâncias reativas ao ácido Tiobarbitúrico (TBARS) foram avaliados de acordo com o descrito por Federici e colaboradores (2007). A concentração de MDA, um produto intermediário da peroxidação lipídica, foi determinada a partir da diferença das absorbâncias lidas em 535 e 572 nm (Multiskan GO; Thermo Scientific, Vantaa, Finland). Os resultados foram expressos em nmol/mg de proteína.

### **2.6.2 Determinação dos antioxidantes endógenos**

#### **2.6.2.1 Glutathione S-transferase (GST)**

A atividade da Glutathione-S-transferase foi avaliada por espectrofotometria com CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno) de acordo com os métodos descritos por Keen; Habig; Jakoby (1976), com base na respectiva conjugação com a glutathione e os resultados expressos em micromol/mg de proteína.

#### **2.6.2.2 Glutathione reduzida (GSH)**

Os níveis de glutathione reduzida (GSH) foram avaliados de acordo com método descrito por Sedlak e Lindsay (1968), com adaptações de Siervo et al (2015). Os níveis de GSH foram determinados com DITIOBIS-5,5-(2-NITRO-ACIDO BENZOICO) em sobrenadante de homogenato e evidenciados pela formação de coloração amarela e os níveis de GSH foram avaliados em 412 nm, apresentando seus resultados expressos em micromol/mg de proteína.

#### **2.6.2.3 Catalase**

A atividade enzimática da CAT foi expressa através da degradação do peróxido de hidrogênio em oxigênio e água. Após a determinação da concentração de proteínas (normalizadas 1,0 mg/ml em PBS), 297 µl de meio de reação foi colocado em microplaca de UV4 (em triplicata) a 240nm por 60segundos (AEBI, 1984). Os resultados obtidos foram expressos em micromol/mg de proteína.

## **2.8 Análise estatística**

Para a análise dos dados numéricos obtidos foram utilizados o teste estatístico paramétrico T- student ou o teste não paramétrico Mann- Whitney de acordo com o resultado do teste para analisar a normalidade das amostras. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$ . Os dados são apresentados em média  $\pm$  S.E.M., quando paramétricos ou mediana [Q1 e Q3], quando não paramétricos. As análises estatísticas foram realizadas no programa GraphPad Prism for Windows (versão 8.01 – GraphPad Software, La Jolla, Califórnia, EUA).

## **3. Resultados**

### **3.1 Peso da próstata e análises estereológica e histopatológica**

A terapia medicamentosa com LDX durante a fase juvenil e peripuberal não alterou significativamente o peso da próstata de ratos Wistar quando comparada ao grupo controle (Figura 1). Apesar disso, uma remodelação tecidual foi revelada pela análise estereológica na qual as próstatas dos animais expostos ao LDX apresentaram um aumento na porcentagem do compartimento epitelial bem como uma redução na porcentagem do compartimento luminal em comparação ao grupo controle (Tabela 1).

Além disso, através da análise histopatológica foi possível observar que os ácinos prostáticos apresentam-se constituídos predominantemente por um epitélio cilíndrico simples (Figura 2A e B), que ora apresenta-se pseudoestratificado (Figura 2D). Os ácinos estão envoltos por um estroma fibromuscular bem delicado que dão sustentação e nutrem o tecido (Figura. 2A e 2C). Após o período de exposição ao LDX, observou-se um grande número de ácinos com característica hiperplásica, com hiper celularidade epitelial e formação de pregas, o que pode a princípio, significar alguma adaptação do tecido ao tratamento.

### **3.2 Perfil inflamatório: avaliação dos níveis de MPO e NAG e contagem de mastócitos**

A avaliação dos níveis de atividade da mieloperoxidase (MPO) evidenciou que a exposição dos ratos ao LDX durante a fase juvenil e peripuberal induz a um aumento do recrutamento e migração de neutrófilos para a próstata, refletindo em uma maior atividade enzimática nas amostras desse grupo (Figura 3.A). No entanto, a atividade da N-



acetilglicosaminidase (NAG) foi estatisticamente semelhante entre os grupos experimentais, indicando que, ao contrário dos neutrófilos, não há aumento do recrutamento de macrófagos para a próstata entre os grupos LDX e controle (Figura 3.B).

A terapia medicamentosa com LDX ainda ocasionou o aumento significativo influxo de mastócitos para a próstata, assim como, no número de mastócitos degranulados no estroma prostático em comparação com o grupo controle (Tabela 2).

### 3.3 Biomarcadores de estresse oxidativo

A análise de concentração de malonaldeído (MDA) permitiu evidenciar que a exposição dos ratos ao LDX não causou danos às membranas celulares uma vez que não houve aumento da peroxidação lipídica na próstata (**Figura 4**). Do mesmo modo, o sistema antioxidante se manteve inalterado após o uso de LDX como evidenciado pelas análises do nível de GSH, a atividade da catalase e GST (**Figura 4**).

## 4. Discussão

Nosso estudo fornece informações inéditas sobre os efeitos da terapia medicamentosa com LDX sobre o desenvolvimento pós-natal da próstata de roedores. O principal achado do presente estudo foi que o uso deste medicamento durante a fase juvenil e peripuberal, fases essenciais para o processo de maturação pós-natal dos órgãos reprodutores masculinos, promove alterações morfométricas e histopatológicas acompanhadas por um evidente quadro inflamatório na próstata de ratos púberes Wistar.

Apesar do peso da próstata não ter sido alterado após o uso de LDX, foi possível observar que esta dose foi responsável pela reorganização da microarquitetura da próstata, como observado pelos resultados da avaliação estereológica e histopatológica. Deste modo, o grande número de ácinos com característica hiperplásica e com hiper celularidade seguido do aumento do compartimento epitelial, mas com a redução do compartimento luminal nas próstatas de animais expostos ao LDX foram capazes de impedir a alteração do peso prostático. Além disso, uma vez que o sistema reprodutor masculino é inervado por fibras adrenérgicas através do sistema nervoso simpático (BAUMGARTEN et al., 1968), é possível inferir que, embora não existam estudos prévios para uma melhor interpretação desses resultados, este remodelamento tecidual prostático tenha ocorrido através de estimulação do SNC afim de

promover a contração desta região para a produção de maior conteúdo prostático para o processo ejaculatório. O estudo de caso relatado por Lyons, Lentz e Coward (2017), demonstrou que o uso do LDX (60mg/ dia) foi eficaz em reverter a anejaculação neurogênica em um jovem de 22 anos de idade o qual apresentava histórico de neuroblastoma pélvico na infância o que corrobora com a hipótese dos resultados evidenciados neste estudo sobre o remodelamento morfológico da próstata.

Nosso estudo demonstrou ainda que, a exposição ao LDX por 40 dias consecutivos foi capaz de provocar um aumento no recrutamento de neutrófilos e mastócitos para a próstata. De acordo com Koch et al., (2021), a MPO se mostra importante para a recuperação de processos patológicos, assim como, apresenta capacidade em potencializar o processo inflamatório, causando lesão tecidual, através de dano provocado ao DNA celular. Além disso, MPO tem sido considerada como biomarcador de algumas patologias inflamatórias crônica, como artrite reumatoide, asma, tuberculose, colite ulcerativa, ulcera peptídica, assim como em outras condições como nas doenças cardiovasculares (KHAN; ALSAHLI; RAHMANI, 2018).

Um estudo realizado por Roumeguere e colegas (2012), evidenciou a presença de tecido inflamatório agudo ou crônico em amostras de próstatas humanas com hiperplasia benigna de próstata (HBP) ou câncer de próstata (CaP). Estes autores identificaram a presença de MPO nas células epiteliais da glândula prostática, sugerindo que a MPO está diretamente ligada ao desenvolvimento do processo inflamatório em processos patológicos da próstata. Além do mais, quando a MPO é endocitada pelas células epiteliais, ela é capaz de ativar vias de sinalização que levam a angiogênese. Fato este, que favorece o ambiente inflamatório e a liberação de fatores de crescimento, como o fator de crescimento transformador beta (TGF-  $\beta$ ) contribuindo para a proliferação epitelial (KHALIL et al., 2018). Deste modo, a partir dos resultados encontrados em nosso estudo é possível inferir que o microambiente inflamatório gerado pelo uso do LDX pode favorecer a proliferação epitelial. No entanto, há a necessidade de novos estudos, a fim de investigar esta hipótese.

Ainda em relação a análises do perfil inflamatório, o presente estudo também analisou a atividade da N-acetilglicosaminidase (NAG), a qual indica de modo indireto, o número de macrófagos ativados (recrutados) para desempenhar sua função no respectivo tecido. Uma vez que os níveis desse marcador inflamatório não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos experimentais, é possível concluir que não houve a participação de macrófagos no processo de remodelação do tecido prostático. Os macrófagos são células do sistema imune presente nos tecidos que compõem a próstata mas principalmente localizados no componente

estromal (FOX et al., 2019). Um estudo realizado por Bianchi-Frias e colegas (2010), evidenciou um aumento da quantidade de macrófagos na próstata de camundongos durante o processo de envelhecimento. No entanto, não foi encontrado estudos que evidenciassem o aumento de macrófagos na próstata de ratos púberes e tampouco que associassem o aumento ou a redução de células imunes após a exposição a drogas psicoestimulantes.

Apesar das alterações inflamatórias da próstata de animais que receberam a LDX, não houve aumento nos níveis de estresse oxidativo uma vez que os níveis de peroxidação lipídica e elementos antioxidantes endógenos não foram alterados. No entanto, o estudo realizado por Ingelsrud (2016), mostrou aumento da peroxidação lipídica no córtex pré-frontal, hipocampo e núcleos da base bem como uma redução da enzima GSH após a administração de 5mg/kg de dimesilato de lisdexanfetamina por um período de dez dias em ratos Wistar com idade final do tratamento de 30 DPN. Até o presente momento, não foram encontrados estudos que relacionem o uso do dimesilato de lisdexanfetamina com danos oxidativos sobre os órgãos do sistema reprodutor masculino, fato que sugere que o nosso estudo possa ser o primeiro sobre a temática abordada.

Nessas condições experimentais, nota-se que o LDX causou remodelamento estrutural da próstata, assim como causou aumento na atividade da MPO e número de mastócitos totais e degranulados na próstata. Porém a dose utilizada não promoveu alterações nos níveis de NAG ou provocou aumentos de estresse oxidativo. Estudos que avaliem diferentes doses e períodos de exposição deste fármaco sobre a próstata são importantes afim de promover o nível de segurança deste fármaco, visto que sua prescrição tem sido cada vez mais frequente para crianças e adolescentes em todo mundo para o controle dos sintomas do TDAH.

## **5. Conclusão**

Em conclusão, o presente estudo evidenciou que a exposição ao LDX por 40 dias consecutivos, durante o período crucial para o desenvolvimento do sistema reprodutor masculino, apresentou impactos sobre a próstata de roedores. Fato que foi observado através de alterações estereológicas e histopatológicas, assim como, alterações no perfil inflamatório de animais. Os resultados podem ser atribuídos a uma remodelação do tecido prostático em resposta a estímulo provocados pela exposição ao LDX.

**Declaração de conflito de interesse**

Os autores declaram que não há nenhum tipo de conflito de interesse de ordem pessoal ou financeira que possa interferir sobre este trabalho.

**Agradecimentos**

Os autores agradecem ao Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual de Londrina- UEL.

**Suporte financeiro**

Este estudo foi parcialmente financiado pela CAPES/ PROAP (Coordenação do Aperfeiçoamento da Pós-graduação do Ensino Superior) para o seu desenvolvimento.

## 1. Referências

AEBI, H. [13] Catalase in vitro. In: [s.l: s.n.]. p. 121–126.

AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS. ADHD: Clinical Practice Guideline for the Diagnosis, Evaluation, and Treatment of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder in Children and Adolescents. *Pediatrics*, v. 128, n. 5, p. 1007–1022, 1 nov. 2011.

AVIRAM, M.; EIAS, K. Dietary olive oil reduces low-density lipoprotein uptake by macrophages and decreases the susceptibility of the lipoprotein to undergo lipid peroxidation. *Annals of Nutrition & Metabolism*, v.37(2), p.75-84, 1993.

BAUMGARTEN, H. G. et al. Adrenergic innervation of the human testis, epididymis, ductus deferens and prostate: a fluorescence microscopic and fluorimetric study. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*, v. 90, n. 1, p. 81–95, 1968.

BIANCHI-FRIAS, D. et al. The Effects of Aging on the Molecular and Cellular Composition of the Prostate Microenvironment. *PLoS ONE*, v. 5, n. 9, p. e12501, 1 set. 2010.

CASAGRANDE, R. et al. Protective effect of topical formulations containing quercetin against UVB-induced oxidative stress in hairless mice. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 84, n. 1, p. 21–27, jul. 2006.

FOX, J. J. et al. Mass cytometry reveals species-specific differences and a new level of complexity for immune cells in the prostate. *American journal of clinical and experimental urology*, v. 7, n. 4, p. 281–296, 2019.

FREITAS, M. et al. Isolation and activation of human neutrophils in vitro. The importance of the anticoagulant used during blood collection. *Clinical Biochemistry*, v. 41, n. 7–8, p. 570–575, maio 2008.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Guidance for Industry: Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers. Rockville, EUA, Food and Drug Administration, 2005.

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

GOLUB, M. S. et al. Public Health Implications of Altered Puberty Timing. *Pediatrics*, v. 121, n. Supplement\_3, p. S218–S230, 1 fev. 2008.

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

INGELSRUD, S. S. M. Efeito do tratamento com lisdexanfetamina no neurodesenvolvimento de ratos e sua repercussão na fase adulta. Orientador: Gerardo Cristino Filho. 2016. 75 f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Biotecnologia. Universidade Federal do Ceará. Sobral, Ceará. 2016. Disponível em: <https://repositorio.ufc.br/handle/riufc/37274>. Acesso em: 01. Feb. 2022.

JIANG, Z.-Y.; WOOLLARD, A. C. S.; WOLFF, S. P. Lipid hydroperoxide measurement by

oxidation of Fe<sup>2+</sup> in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids*, v. 26, n. 10, p. 853–856, out. 1991.

JOHNSON, L. et al. Anatomy and Physiology of the Male Reproductive System and Potential Targets of Toxicants. In: *Comprehensive Toxicology*. [s.l.] Elsevier, 2010. p. 5–59.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. *Histologia básica*. 12<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

KANWAR, S.; KUBES, P. Mast cells contribute to ischemia-reperfusion-induced granulocyte infiltration and intestinal dysfunction. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, v. 267, n. 2, p. G316–G321, 1 ago. 1994.

KEEN, J. H.; HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Mechanism for the several activities of the glutathione S-transferases. *The Journal of biological chemistry*, v. 251, n. 20, p. 6183–8, 25 out. 1976.

KHALIL, A. et al. Myeloperoxidase promotes tube formation, triggers ERK1/2 and Akt pathways and is expressed endogenously in endothelial cells. ***Archives of Biochemistry and Biophysics***, v. 654, p. 55–69, set. 2018.

KHAN, A.; ALSAHLI, M.; RAHMANI, A. Myeloperoxidase as an Active Disease Biomarker: Recent Biochemical and Pathological Perspectives. *Medical Sciences*, v. 6, n. 2, p. 33, 18 abr. 2018.

KOCH, M. S. et al. Aspectos gerais da mieloperoxidase e seu envolvimento em doenças: uma breve revisão / general aspects of myeloperoxidase and its involvement in diseases: a brief review. *Brazilian Journal of Development*, v. 7, n. 3, p. 28677–28691, 2021.

KRISHNAN, S.; MONTCRIEF, S. Toxicity Profile of Lisdexamfetamine Dimesylate in Three Independent Rat Toxicology Studies. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, v. 101, n. 4, p. 231–240, out. 2007.

LOOBY, A. Childhood attention deficit hyperactivity disorder and the development of substance use disorders: Valid concern or exaggeration? *Addictive Behaviors*, v. 33, n. 3, p. 451–463, mar. 2008.

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

MATTINGLY, G. Lisdexamfetamine dimesylate: A prodrug stimulant for the treatment of ADHD in children and adults. *CNS Spectrums*, v. 15, n. 5, p. 315–325, 2010.

MENDES, L. O. et al. Mast cells and ethanol consumption: Interactions in the prostate, epididymis and testis of UChB rats. *American Journal of Reproductive Immunology*, v. 66, n. 3, p. 170–178, 2011.

OJEDA, S. R. et al. Recent Advances in the Endocrinology of Puberty. *Endocrine Reviews*, v. 1, n. 3, p. 228–257, jul. 1980.

OJEDA, S. R.; URBANSKI, H. F. Puberty in the rat. In: *The physiology of reproduction*. [s.l.: s.n.]. p. 365–409.

OKAMURA, A. M. N. C. Análise comportamental e neuroquímica de ratos tratados com doses repetidas de lisdexanfetamina na infância e periadolescência. Orientadora: Danielle Macêdo

Gaspar. 2019. 109 f. Tese (doutorado). Programa de Pós-graduação em Farmacologia. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, Ceará. 2019. Disponível em: [https://repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/41471/1/2019\\_tese\\_amncokamura.pdf](https://repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/41471/1/2019_tese_amncokamura.pdf). Acesso em: 01. Feb. 2022.

PARFITT, V. J. et al. Effects of high monounsaturated and polyunsaturated fat diets on plasma lipoproteins and lipid peroxidation in type 2 diabetes mellitus. *Diabetic Medicine: a journal of the British Diabetic Association*, v.11 (1), p. 85-91, 1994.

PENNEFATHER, J. N. et al. The autonomic and sensory innervation of the smooth muscle of the prostate gland: a review of pharmacological and histological studies. *Journal of Autonomic Pharmacology*, v. 20, n. 4, p. 193–206, ago. 2000.

QUEIROZ. A. I. G. Efeitos do Dimesilato de Lisdexamfetamina em ratos: relevância como modelo animal do episódio de mania. Orientador: Dra. Danielle Silveira Macêdo. 82 f. Dissertação (Mestrado). Programa de pós-graduação em Farmacologia. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012. Disponível em: <https://repositorio.ufc.br/handle/riufc/5609>. Acesso em: 03/03/2022.

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 oubain: Evidence of oxidative stress in submitochondrial particles of the rat brain. *Neurochem Int.* 55: 491-495, 2009.

RISBRIDGER, G. P.; ALMAHBOBI, G. A.; TAYLOR, R. A. Early prostate development and its association with late-life prostate disease. *Cell and Tissue Research*, v. 322, n. 1, p. 173–181, 18 out. 2005.

ROUMEGUÈRE, T. et al. Intriguing location of myeloperoxidase in the prostate: A preliminary immunohistochemical study. **The Prostate**, v. 72, n. 5, p. 507–513, abr. 2012.

ROWLEY, H. L. et al. Lisdexamfetamine and immediate release d-amfetamine - Differences in pharmacokinetic/pharmacodynamic relationships revealed by striatal microdialysis in freely-moving rats with simultaneous determination of plasma drug concentrations and locomotor activit. *Neuropharmacology*, v. 63, n. 6, p. 1064–1074, 2012.

SCHAUER, I. G.; ROWLEY, D. R. The functional role of reactive stroma in benign prostatic hyperplasia. *Differentiation; research in biological diversity*, v. 82, n. 4–5, p. 200–10, [s.d.].

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Analytical Biochemistry*, v. 25, p. 192–205, 1968.

SETCHELL, B.; BREED, W. Anatomy, Vasculature, and Innervation of the Male Reproductive Tract. In: Knobil and Neill's *Physiology of Reproduction*. [s.l.] Elsevier, 2006. p. 771–825.

SIERVO, G. E. M. L. et al. Spermatic and testicular damages in rats exposed to ethanol: Influence of lipid peroxidation but not testosterone. *Toxicology*, v. 330, p. 1–8, abr. 2015.

TORTORA, G. J.; NIELSEN, M. T. *Princípios de anatomia humana*. 12.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

TOURJMAN, S. V. et al. Rapid screening for cognitive deficits in attention deficit and hyperactivity disorders with the screen for cognitive impairment in psychiatry. *ADHD Attention Deficit and Hyperactivity Disorders*, v. 11, n. 2, p. 139–147, 17 jun. 2019.

TRIPP, G.; WICKENS, J. R. Neurobiology of ADHD. *Neuropharmacology*, v. 57, n. 7–8, p. 579–589, dez. 2009.

WANG, J.-M. et al. Requirement of Innervation for Maintenance of Structural and Functional Integrity in the Rat Prostate<sup>1</sup>. *Biology of Reproduction*, v. 44, n. 6, p. 1171–1176, 1 jun. 1991.

WEIBEL, E. R. Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, v. 12, p. 131–55, fev. 1963.

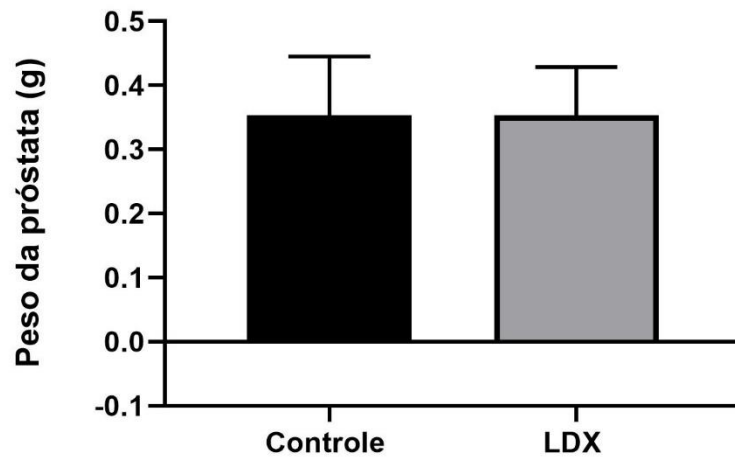
WIGAL, S. B. et al. A 13-hour laboratory school study of lisdexamfetamine dimesylate in school-aged children with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Child and Adolescent Psychiatry and Mental Health*, v. 3, n. 1, p. 17, 9 dez. 2009.

WIGAL, T. et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover study of the efficacy and safety of lisdexamfetamine dimesylate in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder: novel findings using a simulated adult workplace environment design. *Behavioral and Brain Functions*, v. 6, n. 1, p. 34, 2010.

WILENS, T. E. et al. Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder and Transitional Aged Youth. *Current Psychiatry Reports*, v. 20, n. 11, p. 100, 17 nov. 2018.

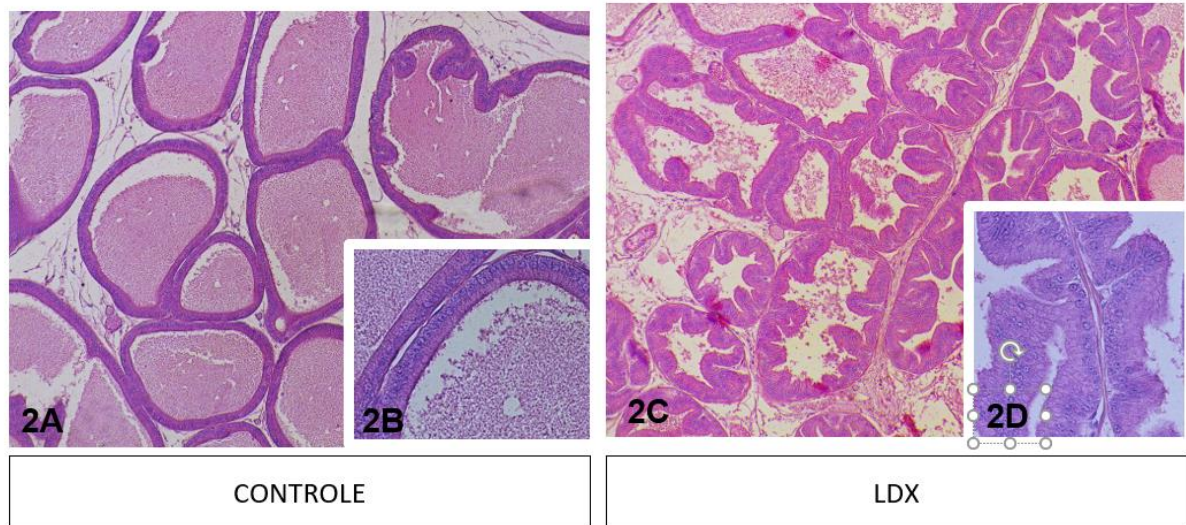


**Figura 1.** Peso das próstatas.



Dados expressos como média  $\pm$  E.P.M., Teste T- student.  $p > 0,05$ ;  $n = 20$  animais / grupo.

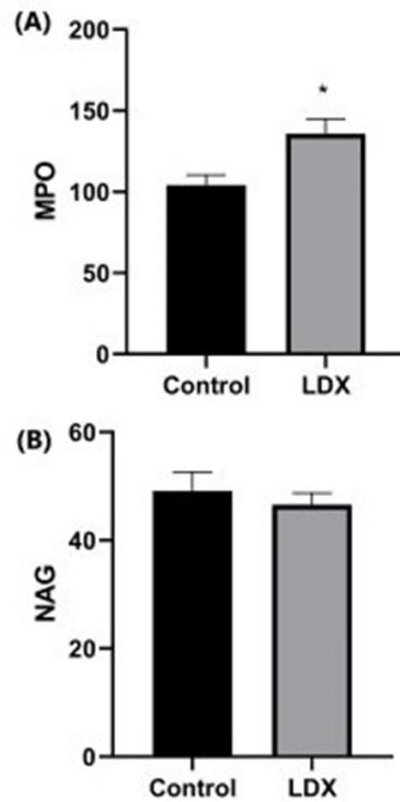
**Figura 2.** Análise histopatológica



Análise histopatológica da próstata de ratos pertencentes aos Grupos Controle (2A e 2B) e LDX (2C e 2D). Observa-se ácinos prostáticos constituídos predominantemente por um epitélio cilíndrico simples (2A e 2B) e epitélio pseudoestratificado após exposição ao LDX (2C). Os ácinos estão envolvidos por um estroma fibromuscular (2A e 2C). Em 2D observa-se característica hiperplásica e formação de pregas.

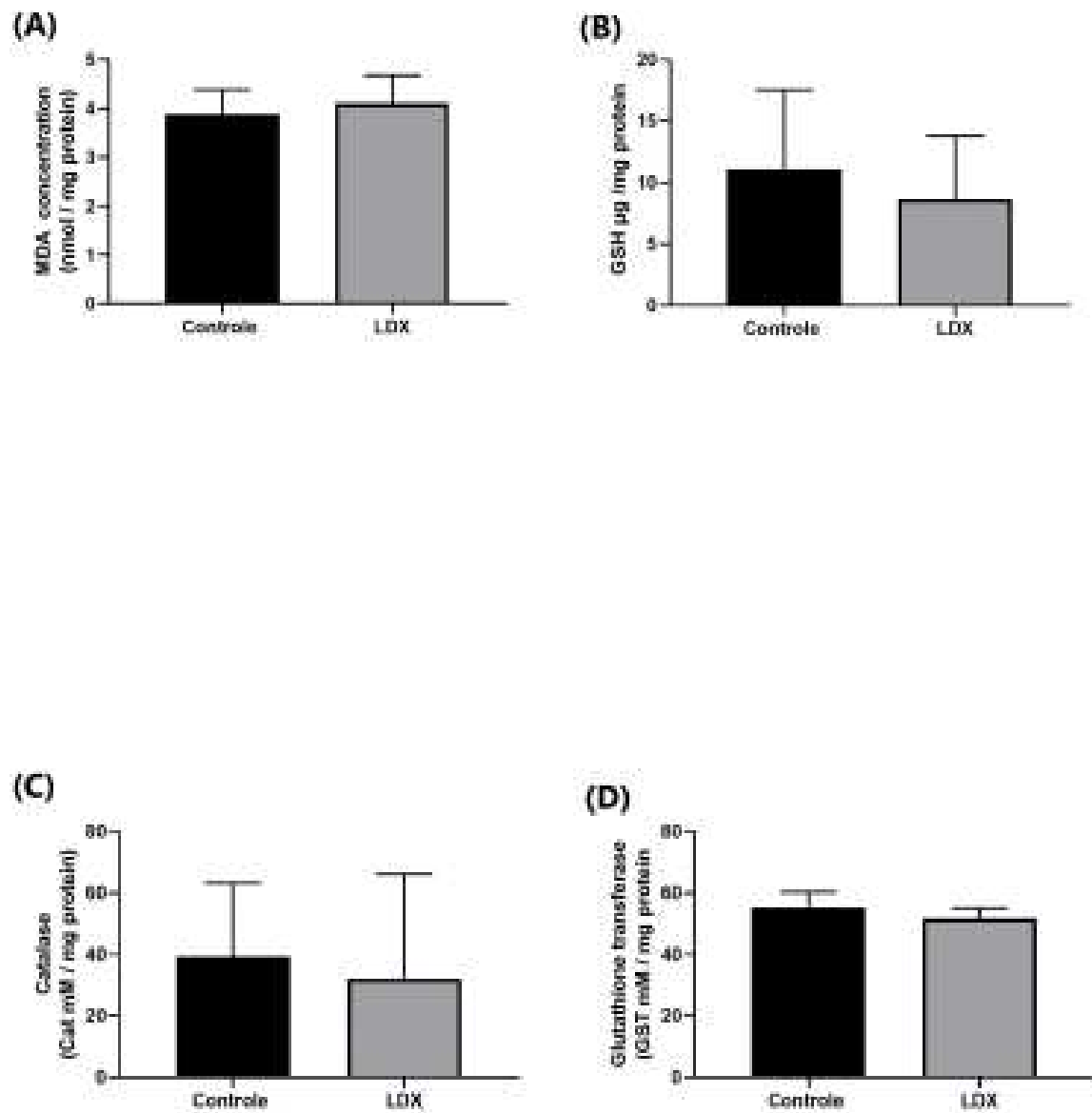
Coloração de Hematoxilina e Eosina - (2A e 2C: aumento de 10X; 2B e 2D aumento de 40X).

**Figura 3.** Perfil inflamatório.



**(A)** Atividade da Mieloperoxidase (MPO). **(B)** Atividade da N-acetilglicosaminidase (NAG). Dados expressos como média  $\pm$  E.P.M., Teste T- student. \* $p \leq 0,05$ .  $n=10$  animais/grupo.

Figura 4. Biomarcadores de estresse oxidativo.



(A) Concentração de malonaldeído. (B) Atividade da enzima GSH. (C) Atividade da enzima Catalase. (D) Atividade da enzima GST. Dados expressos como média  $\pm$  E.P.M., Teste T-student.  $p > 0,05$ .  $n = 10$  animais / grupo.

**Tabela 1.** Análise estereológica

<b>Compartimentos (%)</b>	<b>Grupos Experimentais</b>	
	<b>Controle (n=5)</b>	<b>LDX (n=5)</b>
<b>Luminal</b>	55.95 [41.52- 66.22]	39.29 [24.55-53.13]***
<b>Epitelial</b>	24.70 [19.05- 36.90]	39.29 [29.17- 48.96]****
<b>Estromal</b>	17.56 [12.35-25.00]	21.43 [15.18-26.79]

Dados expressos em mediana [Q1-Q3]. Teste Mann- Whitney. \*\*\*p < 0,01, \*\*\*\*p<0,001.

**Tabela 2.** Porcentagem de mastócitos totais, intactos e degranulados

<b>Mastócitos/campo</b>	<b>Grupos Experimentais</b>	
	<b>Controle (n=5)</b>	<b>LDX (n=5)</b>
<b>Totais (n°)</b>	2,00 [1,00 – 3,00]	2,00 [1,00 – 4,00]*
<b>Intactos (%)</b>	100,00 [65,00 – 100,00]	66,67 [40,18 – 100,00]*
<b>Degranulados (%)</b>	00,00 [0,00 – 35,00]	33,33 [0,00 – 59,82]*

Dados expressos em mediana [Q1-Q3]. Teste de Mann-Whitney. \*p <0,05.

## REFERÊNCIAS REVISÃO DE LITERATURA

ADESMAN, A. R. The Diagnosis And Management Of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder In Pediatric Patients. *Prim Care Companion J Clin Psychiatry*, v. 3(2), p. 66–77, 2001.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. 5ª edição. Arlington, VA, American Psychiatric Association, 2013.

ASSIS, W.A. Mapeamento de cofatores SRC1, NCoR e REA nos testículos, ductos eferentes e próstata de ratos. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Minas Gerais- Instituto de Ciências Biológicas. Belo Horizonte, Minas Gerais. p. 127. 2018. Disponível em: <https://repositorio.ufmg.br/handle/1843/31775>. Acesso em: 16 mar. 2022.

AUMÜLLER, G.; ADLER, G. Experimental studies of apocrine secretion in the dorsal prostate epithelium of the rat. *Cell and Tissue Research*, v. 198, n. 1, abr. 1979.

BARKER, D. J. P. The origins of the developmental origins theory. *Journal of Internal Medicine*, v. 261, n. 5, p. 412–417, maio 2007.

BARKLEY, R. A.; COX, D. A review of driving risks and impairments associated with attention-deficit/hyperactivity disorder and the effects of stimulant medication on driving performance. *Journal of Safety Research*, v. 38, n. 1, p. 113–128, 2007.

BIANCO, J. J. et al. Direct response of the murine prostate gland and seminal vesicles to estradiol. *Endocrinology*, v. 143, n. 12, p. 4922–33, dez. 2002.

BIEDERMAN, J. Attention-deficit/hyperactivity disorder: A selective overview. *Biological Psychiatry*, v. 57, n. 11, p. 1215–1220, 2005.

BIEDERMAN, J. et al. Deficient emotional self-regulation and pediatric attention deficit hyperactivity disorder: A family risk analysis. *Psychological Medicine*, v. 42, n. 3, p. 639–646, 2012.

BOELLNER, S. W. et al. Pharmacokinetics of lisdexamfetamine dimesylate and its active metabolite, d-amphetamine, with increasing oral doses of lisdexamfetamine dimesylate in children with attention-deficit/hyperactivity disorder: A single-dose, randomized, open-label, crossover. *Clinical Therapeutics*, v. 32, n. 2, p. 252–264, fev. 2010.

BUDZISZEWSKA, B. et al. Immunological and endocrinological pattern in ADHD etiopathogenesis. *Przegl Lek*, v. 67(11), p. 1200-1204, 2010.

COMINGS, D. E. et al. Comparison of the role of dopamine, serotonin, and noradrenaline genes in ADHD, ODD and conduct disorder: multivariate regression analysis of 20 genes. *Clinical Genetics*, v. 57, p. 178-196, 2000.

COUTO, T. S.; MELO-JUNIOR, M. R.; GOMES, C. R. A. Aspectos neurobiológicos do transtorno do déficit de atenção e hiperatividade (TDAH): uma revisão. *Ciências & Cognição*, v. 15(1), p. 241-251, 2010.

COTRAN, R. S., et al. *Patologia estrutural e funcional*. 5a edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996, p. 920-928.

- CUNHA, G. R.; CHUNG, L. W. K. Stromal-epithelial interactions—I. Induction of prostatic phenotype in urothelium of testicular feminized (Tfm/y) mice. **Journal of Steroid Biochemistry**, v. 14, n. 12, p. 1317–1324, dez. 1981.
- DANIELPOUR, D. et al. Development and characterization of nontumorigenic and tumorigenic epithelial cell lines from rat dorsal-lateral prostate. *Cancer research*, v. 54, n. 13, p. 3413–21, 1 jul. 1994.
- DONJACOUR, A. A.; CUNHA, G. R. Assessment of prostatic protein secretion in tissue recombinants made of urogenital sinus mesenchyme and urothelium from normal or androgen-insensitive mice. **Endocrinology**, v. 132, n. 6, p. 2342–2350, jun. 1993.
- ELLEM, S. J.; RISBRIDGER, G. P. The Dual, Opposing Roles of Estrogen in the Prostate. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1155, n. 1, p. 174–186, fev. 2009.
- EL-ALFY, M. et al. Unique features of the basal cells of human prostate epithelium. *Microscopy Research and Technique*, v. 51, n. 5, p. 436–446, 1 dez. 2000.
- FROEHLICH, T. E. et al. Prevalence, Recognition, and Treatment of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder in a National Sample of US Children. *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine*, v. 161, n. 9, p. 857, 1 set. 2007.
- GEURTS, H. M. et al. How specific are executive functioning deficits in attention deficit hyperactivity disorder and autism? *Journal of Child Psychology and Psychiatry*, v. 45(4), p. 836–854, 2004.
- GONÇALVES, A.L. Programando uma vida reprodutiva saudável: ensino médio e o conceito das responsabilidades parentais antes da concepção. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Minas Gerais- Instituto de Ciências Biológicas. Belo Horizonte, Minas Gerais. p. 109. 2019. Disponível em: <https://repositorio.ufmg.br/handle/1843/31824>. Acesso em: 15 de mar. 2022.
- GROSSMANN, M. E.; HUANG, H.; TINDALL, D. J. Androgen Receptor Signaling in Androgen-Refractory Prostate Cancer. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, v. 93, n. 22, p. 1687–1697, 21 nov. 2001.
- HAYASHI, N. et al. Morphological and Functional Heterogeneity in the Rat Prostatic Gland1. *Biology of Reproduction*, v. 45, n. 2, p. 308–321, 1 ago. 1991.
- HAYWARD, S. W.; CUNHA, G. R. The prostate: development and physiology. *Radiologic clinics of North America*, v. 38, n. 1, p. 1–14, jan. 2000.
- HERNANDEZ, M. E. et al. A study of the prostate, androgens and sexual activity of male rats. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v. 5, n. 1, p. 11, 16 dez. 2007.
- HO, C. K. M.; HABIB, F. K. Estrogen and androgen signaling in the pathogenesis of BPH. **Nature Reviews Urology**, v. 8, n. 1, p. 29–41, 13 jan. 2011.
- HUTSON P. H.; PENNICK, M.; SECKER, R. Preclinical pharmacokinetics, pharmacology and toxicology of lisdexamfetamine: a novel d-amphetamine pro-drug. *Neuropharmacology*. Dec;87:41-50, 2014.



INGELSRUD, Salma Suellen de Melo. Efeito do tratamento com lisdexanfetamina no neurodesenvolvimento de ratos e sua repercussão na fase adulta. Orientador: Gerardo Cristino Filho. 2016. 75 f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Biotecnologia. Universidade Federal do Ceará. Sobral, Ceará. 2016. Disponível em: <https://repositorio.ufc.br/handle/riufc/37274>. Acesso em: 01. Feb. 2022.

KUMAR, V. L.; MAJUMDER, P. K. Prostate gland: Structure, functions and regulation. *International Urology and Nephrology*, v. 27, n. 3, p. 231–243, maio 1995.

LACZKÓ, I. et al. Comparison of the zones of the human prostate with the seminal vesicle: Morphology, immunohistochemistry, and cell kinetics. *The Prostate*, v. 62, n. 3, p. 260–266, 15 fev. 2005.

LEE, C. H.; AKIN-OLUGBADE, O.; KIRSCHENBAUM, A. Overview of Prostate Anatomy, Histology, and Pathology. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, v. 40, n. 3, p. 565–575, set. 2011.

LEE, G. T. et al. Dihydrotestosterone Increases Cytotoxic Activity of Macrophages on Prostate Cancer Cells via TRAIL. *Endocrinology*, v. 160, n. 9, p. 2049–2060, 2019.

LI, D. et al. Meta-analysis shows significant association between dopamine system genes and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). *Human Molecular Genetics*, v. 15(14), p. 2276–2284, 2006.

LOOBY, A. Childhood attention deficit hyperactivity disorder and the development of substance use disorders: Valid concern or exaggeration? *Addictive Behaviors*, v. 33, p. 451–463, 2008.

MAGGIOLINI, M. et al. Adrenal androgens stimulate the proliferation of breast cancer cells as direct activators of estrogen receptor alpha. *Cancer research*, v. 59, n. 19, p. 4864–9, 1 out. 1999.

MARKER, P. C. et al. Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. *Developmental Biology*, v. 253, n. 2, p. 165–174, jan. 2003.

MCGOUGH, J. J.; MCCRACKEN, J. T. Adult attention deficit hyperactivity disorder: Moving beyond DSM-IV. *American Journal of Psychiatry*, v. 163, n. 10, p. 1673–1675, 2006.

MCNEAL, J. E. Normal Histology of the Prostate. *The American Journal of Surgical Pathology*, v. 12, n. 8, p. 619–633, ago. 1988.

NEMETH, J. A.; LEE, C. Prostatic ductal system in rats: Regional variation in stromal organization. *The Prostate*, v. 28, n. 2, p. 124–128, fev. 1996.

NETA, B. R. B; NEVES, L. L. A; FIGUEREDO, M. L. R. D. S. A. S. Histórico de desenvolvimento e indicação terapêutica do Venvanse. *FacUnicamps*, [S.l.], p. 1- 18, ago./2020. Disponível em: [https://facunicamps.edu.br/cms/upload/repositorio\\_documentos/185\\_HIST%C3%93RICO%20DE%20DESENVOLVIMENTO%20E%20INDICA%C3%87%C3%83O%20TERAP%C3%8AUTICA%20DO%20VENVA%20NSE%20AE.pdf](https://facunicamps.edu.br/cms/upload/repositorio_documentos/185_HIST%C3%93RICO%20DE%20DESENVOLVIMENTO%20E%20INDICA%C3%87%C3%83O%20TERAP%C3%8AUTICA%20DO%20VENVA%20NSE%20AE.pdf). Acesso em: 14 de mar. de 2022 às 14:29.

NICHOLSON, T. M.; RICKE, W. A. Androgens and estrogens in benign prostatic hyperplasia: Past, present and future. *Differentiation*, v. 82, n. 4–5, p. 184–199, nov. 2011.

NIU, Y.-N.; XIA, S.-J. Stroma–epithelium crosstalk in prostate cancer. **Asian Journal of Andrology**, v. 11, n. 1, p. 28–35, 22 jan. 2009.

NOORDERMEER, S. D. S. et al. Structural Brain Abnormalities of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder with Oppositional Defiant Disorder. **Biological Psychiatry**, v. 82(9), p. 642-650, 2017.

NORGIL DAMGAARD, I. et al. Impact of exposure to endocrine disruptors in utero and in childhood on adult reproduction. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 16, n. 2, p. 289–309, jun. 2002.

OJEDA, S. R. et al. Recent Advances in the Endocrinology of Puberty. **Endocrine Reviews**, v. 1, n. 3, p. 228–257, jul. 1980.

OKAMURA, A. M. N. C. Análise comportamental e neuroquímica de ratos tratados com doses repetidas de lisdexanfetamina na infância e periadolescência. Orientadora: Danielle Macêdo Gaspar. 2019. 109 f. Tese (doutorado). Programa de Pós-graduação em Farmacologia. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, Ceará. 2019. Disponível em: [https://repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/41471/1/2019\\_tese\\_amncokamura.pdf](https://repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/41471/1/2019_tese_amncokamura.pdf). Acesso em: 01. Feb. 2022 às 00:13.

PENNINGTON, B. F.; OZONOFF, S. Executive Functions and Developmental Psychopathology. *Journal of Child Psychology and Psychiatry*, v. 37(1), p. 51-87, 1996.

PICUT, C. A. et al. Postnatal Development of the Testis in the Rat. **Toxicologic Pathology**, v. 43, n. 3, p. 326–342, 11 abr. 2015.

POLLARD, M. Spontaneous Prostate Adenocarcinomas in Aged Germfree Wistar Rats<sup>2</sup>. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, v. 51, n. 4, p. 1235–1241, out. 1973.

PURPER-OUAKIL, D. et al. Neurobiology of Attention Deficit/Hyperactivity Disorder. *Pediatric Research*, v. 69(5), p. 69-76, 2011.

PRICE, D. COMPARATIVE ASPECTS OF DEVELOPMENT AND STRUCTURE IN THE PROSTATE. *National Cancer Institute monograph*, v. 12, p. 1–27, out. 1963.

RANBY, K. W. et al. Understanding the Phenotypic Structure of Adult Retrospective ADHD Symptoms During Childhood in the United States. *Journal of Clinical Child and Adolescent Psychology*, v. 41, n. 3, p. 261–274, 2012.

RAVELLI, G.-P.; STEIN, Z. A.; SUSSER, M. W. Obesity in Young Men after Famine Exposure in Utero and Early Infancy. *New England Journal of Medicine*, v. 295, n. 7, p. 349–353, 12 ago. 1976.

RODRIGUES, A. O.; MACHADO, M. T.; WROCLAWSKI, E. R. Prostate innervation and local anesthesia in prostate procedures. **Revista do Hospital das Clínicas**, v. 57, n. 6, p. 287–292, 2002.

ROEHRBORN, C. G. Pathology of benign prostatic hyperplasia. **International Journal of Impotence Research**, v. 20, n. S3, p. S11–S18, 10 dez. 2008.

ROY-BURMAN, P. et al. Genetically defined mouse models that mimic natural aspects of

- human prostate cancer development. **Endocrine-related cancer**, v. 11, n. 2, p. 225–254, jun. 2004.
- RUBIA, K. et al. Neuropsychological analyses of impulsiveness in childhood hyperactivity. *British Journal of Psychiatry*, v. 179, p. 138-143, 2001.
- SILVEIRA, P. P. et al. Developmental origins of health and disease (DOHaD). *Jornal de Pediatria*, v. 83, n. 6, p. 494–504, 30 nov. 2007.
- SHAPPELL, S. B. et al. Prostate Pathology of Genetically Engineered Mice: Definitions and Classification. The Consensus Report from the Bar Harbor Meeting of the Mouse Models of Human Cancer Consortium Prostate Pathology Committee. **Cancer Research**, v. 64, n. 6, p. 2270–2305, 15 mar. 2004.
- THOMSON, A. A.; CUNHA, G. R.; MARKER, P. C. Prostate development and pathogenesis. **Differentiation**, v. 76, n. 6, p. 559–564, jul. 2008.
- TRIPP, G.; WICKENS, J. R. Neurobiology of ADHD. *Neuropharmacology*, v. 57(7-8), p. 579-589, 2009.
- TOURJMAN, S. V. et al. Rapid screening for cognitive deficits in attention deficit and hyperactivity disorders with the screen for cognitive impairment in psychiatry. *ADHD Attention Deficit and Hyperactivity Disorders*, Springer Nature, 2018.
- VAALASTI, A.; HERVONEN, A. Innervation of the ventral prostate of the rat. **American Journal of Anatomy**, v. 154, n. 2, p. 231–243, fev. 1979.
- VAQUERIZO MADRID, J. Hiperactividad en el niño preescolar: descripción clínica. *Revista de Neurología*, v. 40, n. S01, p. S025, 2005.
- WILLENS, T. E. et al. Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder and Transitional Aged Youth. *Current Psychiatry Reports*, v. 20:100, Springer Nature, 2018.
- WILSON, J. D. The Critical Role of Androgens in Prostate Development. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 40, n. 3, p. 577–590, set. 2011.
- WRIGHT, A. S. et al. Androgen-induced regrowth in the castrated rat ventral prostate: role of 5alpha-reductase. *Endocrinology*, v. 140, n. 10, p. 4509–15, out. 1999.

## ANEXO I -



## COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 82/2019

Londrina, 24 de junho de 2019.

Prezado (a) professor (a)

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado: "Efeitos do uso de dimesilato de lisdexanfetamina sobre o desenvolvimento pós natal do sistema genital masculino de ratos" protocolo CEUA nº 9633.2019.65 sob a responsabilidade de Glaura Scantamburlo Alves Fernandes, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/Uel), em reunião de 18/06/2019.

Este projeto tem por objetivo analisar a morfologia, funcionalidade, perfil inflamatório e estresse oxidativo do testículo, epidídimo e próstata; avaliar a morfologia e funcionalidade do ducto deferente; qualidade espermática; função hepática e renal; determinar a concentração plasmática de hormônios e investigar o comportamento sexual de ratos *Wistar* submetidos a gavagem com dimesilato de lisdexanfetamina em dois momentos distintos: na peripuberdade (DPN 66), imediatamente após o término do período de administração do fármaco, e na vida adulta (DPN 131), após um período de 65 dias de recuperação do tratamento. Grau de invasividade: I.

Finalidade	( ) Ensino ( x ) Pesquisa científica
Vigência da autorização	01/09/2019 a 01/08/2023
Espécie/ linhagem/ raça	Rato heterogênico: Wistar
Nº de animais	80 machos de 22 dias e 40 fêmeas de 60 dias
Peso/ Idade	-/ 22 dias -/ 60 dias
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	Biotério Central do CCB
Amostras a serem coletadas	Sangue, testículos, epidídimos, próstatas, ducto deferentes, fígado, rins.

Cumprindo orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/Uel anteriormente à execução das modificações.

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessários. Sem mais para o momento, subscrevo-me, cordialmente.

*Maria Fernanda R. Graciano*  
 Profa. Dra. Maria Fernanda Rodrigues Graciano  
 Coordenadora da CEUA/Uel

Profª Drª Maria Fernanda  
 Rodrigues Graciano  
 Coordenadora da Comissão de  
 Ética no Uso de Animais  
 Universidade Estadual de Londrina  
 ceua@uel.br / (43) 3371-8484

Ilmo.(a) Sr.(a)  
 Prof. (a) Dr (a). Glaura Scantamburlo Alves Fernandes  
 Responsável pelo projeto  
 Departamento de Biologia Geral/CCB  
 C/C para a Chefia do Depto. de Biologia Geral/CCB  
 C/C para a Direção de Centro do CCB  
 C/C Biotério Central do CCB