

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

Verônica Tironi Dias

**INFLUÊNCIA DA EXPOSIÇÃO AO MODAFINIL SOBRE A
PREFERÊNCIA POR ANFETAMINA EM DIFERENTES PERÍODOS DO
DESENVOLVIMENTO**

Santa Maria, RS
2019

Verônica Tironi Dias

**INFLUÊNCIA DA EXPOSIÇÃO AO MODAFINIL SOBRE A
PREFERÊNCIA POR ANFETAMINA EM DIFERENTES PERÍODOS DO
DESENVOLVIMENTO**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito para obtenção do título de **Doutora em Farmacologia**.

Orientadora: Profa. Dra. Marilise Escobar Bürger

Santa Maria, RS
2019

Dias, Verônica Tironi
INFLUÊNCIA DA EXPOSIÇÃO AO MODAFINIL SOBRE A
PREFERÊNCIA POR ANFETAMINA EM DIFERENTES PERÍODOS DO
DESENVOLVIMENTO / Verônica Tironi Dias.- 2019.
110 p.; 30 cm

Orientadora: Marilise Escobar Bürger
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Farmacologia, RS, 2019

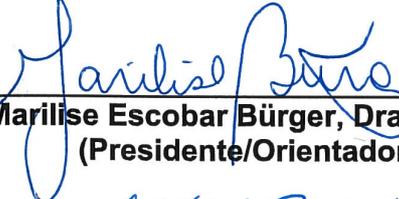
1. Adição 2. Adolescência 3. Anfetamina 4.
Psicoestimulante I. Bürger, Marilise Escobar II. Título.

Verônica Tironi Dias

**INFLUÊNCIA DA EXPOSIÇÃO AO MODAFINIL SOBRE A
PREFERÊNCIA POR ANFETAMINA EM DIFERENTES PERÍODOS DO
DESENVOLVIMENTO**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito para obtenção do título de **Doutora em Farmacologia**.

Aprovado em 22 de novembro de 2019:



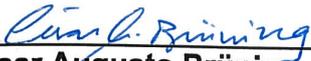
Marilise Escobar Bürger, Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientadora)



Natália Brucker, Dra. (UFSM)



Cristiani Folharini Bortolatto, Dra. (UFPEL)



César Augusto Brüning, Dr. (UFPEL)



Hecson Jesser Segat, Dr. (UFSM)

Santa Maria, RS
2019

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho em especial aos meus pais, os quais sempre me apoiaram e incentivaram para dar seguimento aos meus estudos e a toda minha família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha família, a minha mãe Rosicleia, a meu pai João, a minha irmã Rosana e a minha avó Celia que me acompanharam e apoiaram durante todos os momentos da minha vida acadêmica, sem a ajuda, suporte e atenção de vocês não teria realizado tudo que conquistei durante esse período. Amo vocês!

A minha orientadora, Prof^a. Dra. Marilise, por ter me acolhido na pesquisa desde o segundo semestre da faculdade, pelos ensinamentos e atenção até o final dessa jornada.

Aos meus queridos colegas e amigos que fazem e fizeram parte do FARMATOX. Agradeço pelo companheirismo, amizade e principalmente pelo espírito de trabalho em grupo. Em especial as meninas que se tornaram minhas grandes amigas Lívia, Fabíola, Vinícia, Luciana e Karine.

Aos demais professores da Graduação em Farmácia e da Pós-Graduação em Farmacologia por contribuírem para a minha formação.

Ao CNPq e PROAP-UFSM, pelos recursos financeiros, bem como à CAPES e CNPq pelas bolsas de estudos que me foram concedidas.

Enfim, agradeço a todas as pessoas que me incentivaram e que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

*Embora ninguém possa voltar atrás e
fazer um novo começo, qualquer um
pode começar agora e fazer um novo
fim.*

(Chico Xavier)

RESUMO

INFLUÊNCIA DA EXPOSIÇÃO AO MODAFINIL SOBRE A PREFERÊNCIA POR ANFETAMINA EM DIFERENTES PERÍODOS DO DESENVOLVIMENTO

AUTORA: Verônica Tironi Dias

ORIENTADORA: Profa. Dra. Marilise Escobar Bürger

A adição, a qual é caracterizada pelo desejo e busca pela droga apesar das consequências negativas, é um grave problema de saúde pública causando prejuízos para o indivíduo, sua família e para a sociedade. Dessa forma, o desenvolvimento de estratégias para o entendimento dos mecanismos neurobiológicos relacionados a esse transtorno são de extrema relevância. Estudos revelam que experiências adversas durante a adolescência, podem causar prejuízos aos circuitos neurais do indivíduo, facilitando o desenvolvimento de transtornos neuropsiquiátricos, que podem se manifestar ao longo da vida e até na idade adulta. Em vista disso, o uso inadequado de fármacos psicoestimulantes de uso lícito com prescrição médica durante a adolescência têm se tornado um assunto preocupante na sociedade atual. O presente estudo teve por objetivo avaliar a influência da administração de modafinil (MOD), um psicoestimulante de prescrição, durante a adolescência sobre a preferência de lugar condicionada (PLC) e sobre a recaída por anfetamina (ANF) em ratos. Tal estudo baseia-se na hipótese de que a exposição prolongada ao MOD durante a adolescência poderia modificar a expressão de biomarcadores relacionados à plasticidade sináptica (pro-BDNF, BDNF, Trk-B, GDNF), assim como, alvos da via mesolímbica dopaminérgica (D1R, D2R, DAT, TH, VMAT-2), afetando o *status* oxidativo cerebral em áreas mesocorticolímbicas, relacionadas com a recompensa e adição, resultando em alterações comportamentais. A partir de um estudo piloto (protocolo experimental I), Destinado a avaliar a influência da exposição de ratos adolescentes ao MOD (64mg/kg, *per oral*, p.o.) durante 14 dias, observou-se que o MOD melhorou a memória recente sem alterar parâmetros locomotores ou de ansiedade dos animais. Em relação ao *status* oxidativo, o MOD aumentou a atividade da catalase, e diminuiu marcadores de dano oxidativo no córtex pré-frontal, estriado e área tegmental ventral (ATV), exceto no hipocampo, onde o MOD não exerceu influência significativa sobre os parâmetros avaliados. No protocolo experimental II, animais adolescentes foram expostos ao MOD e, posteriormente, condicionados com ANF no paradigma de PLC na idade adulta, quando observou-se que o MOD reduziu a preferência pela droga, prevenindo alterações locomotoras, sinais de ansiedade e prejuízos de memória recente no período de abstinência da droga. O MOD também mostrou atividade antioxidante e efeitos benéficos sobre os biomarcadores relacionados à memória (pro-BDNF, BDNF, Trk-B) agindo como um modulador do sistema dopaminérgico hipocampal (DAT, D1R e D2R). O protocolo experimental III foi realizado com o objetivo de verificar se as mesmas influências benéficas do MOD seriam observadas quando os animais fossem expostos à ANF ainda na adolescência. Novamente, a exposição ao MOD reduziu a PLC por ANF, reduzindo comportamentos de ansiedade durante a abstinência da droga. Alterações do *status* oxidativo e moleculares no sistema dopaminérgico foram observadas na ATV e estriado desses animais, quando o MOD exerceu uma suprarregulação de alvos estriatais dopaminérgicos (TH, DAT, D1R e D2R) após a exposição à ANF, possivelmente prevenindo a redução nos níveis de dopamina durante a retirada da droga, o que pode ter sido refletido sobre os comportamentos apresentados. No protocolo experimental IV, a exposição ao MOD ocorreu após a PLC por ANF já estar estabelecida, assim o MOD foi proposto como um tratamento à recaída. Tal abordagem mostrou que o MOD preveniu a recaída pela ANF agindo benéficamente sobre a memória. Em nível molecular, o MOD causou alterações benéficas tanto no sistema dopaminérgico como em neurotrofinas relacionadas a manutenção dessa via, no estriado ventral, após a exposição à ANF. Como conclusão desses estudos, é possível inferir que o MOD exerceu efeitos comportamentais benéficos frente à preferência e à recaída por ANF quando administrado durante a adolescência, os quais ocorreram juntamente a respostas positivas sobre o *status* oxidativo e molecular em áreas cerebrais relacionadas à adição. Até o presente momento é possível propor que o MOD poderia estar agindo como um modulador do sistema dopaminérgico frente ao dano causado pela ANF em ratos.

Palavras-chave: Adição. Adolescência. Anfetamina. Psicoestimulante.

ABSTRACT

INFLUENCE OF MODAFINIL EXPOSURE ON AMPHETAMINE PREFERENCE IN DIFFERENT PERIODS OF DEVELOPMENT

AUTHOR: Verônica Tironi Dias
ADVISOR: Marilise Escobar Bürger

Addiction, which is characterized by the desire and the search for the drug, despite negative consequences, is a serious health problem, causing impairments to the individual, your family, and society. Thus, the developing of strategies to better understand neurobiological mechanisms related to this disorder are extremely relevant. Studies revealed that adverse experiences during the adolescence period could lead to neural circuit impairments facilitating neuropsychiatric disorders development, which could be manifested throughout life and even into adulthood. In this perspective, the inadequate use of licit prescribed psychostimulant drugs during adolescence has become a social concern nowadays. The objective of the current study was to evaluate the influence of modafinil (MOD) administration, a prescription drug, during adolescence on the conditioned place preference (CPP) for amphetamine (AMPH) in rats. The study is based on the hypothesis that prolonged MOD exposure during adolescence could modify the expression of molecular biomarkers related to memory (pro-BDNF, BDNF, Trk-B e GDNF) and targets of the mesolimbic dopaminergic pathway (D1R, D2R, DAT, TH e VMAT-2), affecting the cerebral oxidative status leading to behavioral alterations. From the pilot study (experimental protocol I), when we evaluate the MOD (64mg/kg p.o.) exposure influence on adolescent rats for 14 days, MOD improves short-term memory without causes changes in locomotor or anxiety parameters in the animals. Concerning the oxidative status, the MOD increased the catalase (CAT) activity decreasing oxidative damage markers in the prefrontal cortex, striatum and ventral tegmental área (VTA), as one exception the hippocampus, which MOD did not exert significant influence on the parameters evaluated. From the experimental protocol II, adolescent animals were exposed to MOD and consecutively conditioned with AMPH in the CPP paradigm in adulthood, when we observed that MOD reduced the preference for the drug, preventing locomotor alterations, anxiety-like symptoms, and memory impairments during withdrawal. MOD also showed antioxidant activity and beneficial influences on biomarkers related to memory (pro-BDNF, BDNF, and Trk-B), acting as a modulator of the hippocampal dopaminergic system (DAT, D1R, and D2R). The experimental protocol III was aimed to evaluate whether the same MOD beneficial influences would be repeated when these animals were AMPH-exposed still during adolescence. Again, MOD exposure reduced AMPH-CPP reducing the anxiety-like symptoms during withdrawal. Oxidative and molecular alterations in the dopaminergic system were observed in the VTA and striatum of this animals when MOD exerted an upregulation of striatal dopaminergic targets (TH, DAT, D1R, and D2R) after AMPH exposure, possibly preventing the decrease of dopamine levels during withdrawal and this could be reflected in the behaviors presented. From the experimental protocol IV, the MOD exposure occurred after AMPH-CPP was established, it was proposed as a treatment in the relapse. Such approach showed that MOD treatment prevented the AMPH relapse acting beneficially on memory. At the molecular level, the MOD caused beneficial changes in the dopaminergic system as well in neurotrophins related to the maintenance of this pathway upon AMPH exposure in the ventral striatum. In conclusion of these studies, it is possible to infer that MOD exerted beneficial behavioral effects on the preference and relapse for AMPH when administered during adolescence. Those behaviors occurred together with positive responses on oxidative status and molecular in brain areas related to addiction. So far, until this moment it is possible to propose that MOD could be acting as a modulator of the dopaminergic system against the damage caused by AMPH in rats.

Keywords: Addiction. Adolescence. Amphetamine. Psychostimulant.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO DA LITERATURA	
Figura 1 – Vias dopaminérgicas no cérebro	21
Figura 2 – Sinapse dopaminérgica	22
Figura 3 – Estrutura molecular da anfetamina	24
Figura 4 – Via do estresse oxidativo	26
Figura 5 – Estrutura molecular do modafinil	32
METODOLOGIA	
Figura 1 – Desenho experimental do protocolo I	39
Figura 2 – Desenho experimental do protocolo II	40
Figura 3 – Desenho experimental do protocolo III	41
Figura 4 - Desenho experimental do protocolo IV	42
RESULTADOS	
PROTOCOLO EXPERIMENTAL I	
Figure 1 – Influência da administração de doses repetidas de modafinil sobre a atividade locomotora dos animais	52
Figure 2 – Influência da administração de doses repetidas de modafinil sobre sinais de ansiedade dos animais.....	53
Figure 3 – Influência da administração de doses repetidas de modafinil sobre a memória de curto prazo dos animais.....	54
Figure 4 – Influência da administração de doses repetidas de modafinil sobre o <i>status</i> oxidativo da área tegmental ventral	55
Figure 5 – Influência da administração de doses repetidas de modafinil sobre o <i>status</i> oxidativo do estriado	56
Figure 6 – Influência da administração de doses repetidas de modafinil sobre o <i>status</i> oxidativo do córtex pré-frontal	57
Figure 7 – Influência da administração de doses repetidas de modafinil sobre o <i>status</i> oxidativo do hipocampo	58
PROTOCOLO EXPERIMENTAL II	
Figure 1 – Amphetamine-CPP of young adult rats.....	63
Figure 2 – Locomotor activity (A) and anxiety-like symptoms (B, C and D) of young adult rats	63
Figure 3 – Recognition memory of young adult rats	63
Figure 4 – Hippocampal oxidative status of young adult rats	64
Figure 5 – Hippocampal pro-BDNF (A), BDNF (B) and Trk-B (C) immunoreactivity.....	65
Figure 6 – Hippocampal DAT (A), D1R (B) and D2R (C) immunoreactivity.....	65
PROTOCOLO EXPERIMENTAL III	
Figure 1 – Modafinil administration decreased amphetamine (AMPH)-induced conditioned place preference (CPP) in adolescent rats	72
Figure 2 – Modafinil administration prevented anxiety parameters after 48 hours of AMPH withdrawal in adolescent rats.....	73

Figure 3 – Modafinil administration modified the oxidative status in the ventral tegmental area of adolescent rats exposed to AMPH-induced CPP .	73
Figure 4 – Modafinil administration modified the oxidative status in the striatum of adolescent rats exposed to AMPH-induced CPP.....	74
Figure 5 – Modafinil influenced dopaminergic targets in the ventral tegmental area of adolescent rats exposed to AMPH-induced CPP	74
Figure 6 – Modafinil influenced striatal dopaminergic targets of adolescent rats Exposed to AMPH-induced CPP	75

PROTOCOLO EXPERIMENTAL IV

Figure 1 – AMPH-CPP before (A) and after MOD treatment (B)	89
Figure 2 – Influence of MOD treatment upon AMPH-reconditioning during adolescence on short-term memory	90
Figure 3 – Influence of MOD treatment upon AMPH-reconditioning during adolescence on dopaminergic targets	91
Figure 4 – Influence of MOD treatment upon AMPH-reconditioning during adolescence on synaptic plasticity related-neurotrophins	92

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT	5-hidroxitriptamina ou serotonina
AC	Adenilato ciclase
ANF	Anfetamina
ATV	Área tegmental ventral
BDNF	Fator neurotrófico derivado do encéfalo
CAT	Catalase
COMT	Catecol-O-metil transferase
CPF	Córtex pré-frontal
D1R	Receptor dopaminérgico do tipo D1
D2R	Receptor dopaminérgico do tipo D2
D3R	Receptor dopaminérgico do tipo D3
D4R	Receptor dopaminérgico do tipo D4
D5R	Receptor dopaminérgico do tipo D5
DAT	Transportador de dopamina
DA	Dopamina
DCHFA-DA	2',7'-diclorofluoresceína diacetato
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DPN	Dia pós-natal
EO	Estresse oxidativo
ER	Espécies reativas
FDA	Food and Drug Administration
GABA	Ácido gama-aminobutírico
LCE	Labirinto em cruz elevado
MAO-A	Monoamino-oxidase do tipo A
MAO-B	Monoamino-oxidase do tipo B
MDMA	3,4-metilenodioximetanfetamina
MOD	Modafinil
NA	Noradrenalina
NAT	Transportador de noradrenalina
NT	Neurotransmissor
p75NTR	Receptor pan-neurotrófico 75 NTR
PLC	Preferência de lugar condicionada
PKA	Fosfoquinase A
pro-BDNF	Pró-fator neurotrófico derivado do encéfalo
RNA	Ácido ribonucleico
SERT	Transportador de serotonina
SN	Substância negra
SNC	Sistema nervoso central
TDAH	Transtorno do déficit de atenção e hiperatividade
TH	Tirosina hidroxilase
Trk-B	Receptor de tirosina quinase do tipo B
TRON	Teste de reconhecimento do objeto novo
VMAT-2	Transportador vesicular de monoaminas do tipo 2

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 A EPIDEMIOLOGIA DA ADIÇÃO E AS ESTRUTURAS CEREBRAIS ENVOLVIDAS.....	16
2.2 DROGAS PSICOATIVAS ESTIMULANTES	19
2.3 VIA MESOLÍMBICA DOPAMINÉRGICA	21
2.4 EFEITOS DA ANFETAMINA SOBRE O SNC	23
2.5 ESTRESSE OXIDATIVO	26
2.6 PLASTICIDADE SINÁPTICA.....	29
2.7 EFEITOS DO MOD SOBRE O SNC	32
2.8 ESTUDOS EXPERIMENTAIS NEUROFARMACOLÓGICOS EM ROEDORES.....	35
3 JUSTIFICATIVA	36
4 OBJETIVOS	36
4.1 OBJETIVO GERAL.....	36
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
5 METODOLOGIA	38
5.1 ANIMAIS.....	38
5.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	38
5.2.1 Protocolo experimental I.....	38
5.2.2 Protocolo experimental II.....	39
5.2.3 Protocolo experimental III.....	40
5.2.4 Protocolo experimental IV	42
5.3 ANÁLISES COMPORTAMENTAIS	43
5.3.1 Teste do campo aberto (TCA)	43
5.3.2 Teste do labirinto em cruz elevado (LCE)	43
5.3.3 Teste de reconhecimento do objeto novo (TRON).....	44
5.3.4 Preferência de lugar condicionada com anfetamina	45
5.4 ANÁLISES BIOQUÍMICAS	46
5.4.1 Determinação da atividade da catalase (CAT).....	46
5.4.2 Determinação de espécies reativas (ER)	47
5.4.3 Determinação da peroxidação lipídica	47
5.4.4 Determinação de proteína carbonilada	47
5.5 AVALIAÇÕES MOLECULARES POR WESTERN BLOT	47
5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	48
6 RESULTADOS	49
6.1 PROTOCOLO EXPERIMENTAL I	49
6.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL II.....	59
6.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL III.....	69
6.4 PROTOCOLO EXPERIMENTAL IV	78
7 DISCUSSÃO	93
8 CONCLUSÃO	97
REFERÊNCIAS	98

APRESENTAÇÃO

Esta tese está estruturada nas seguintes seções: INTRODUÇÃO, REVISÃO DA LITERATURA, JUSTIFICATIVA, OBJETIVOS, METODOLOGIA, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÃO E REFERÊNCIAS.

O item RESULTADOS está descrito na forma de um estudo piloto, dois artigos científicos publicados e na forma de um resumo expandido, os quais em conjunto, representam a íntegra dessa Tese.

1 INTRODUÇÃO

A adição¹, caracterizada pela alta motivação em obter e usar a droga apesar das consequências negativas e também com tendência a recaídas após interrupção do uso (KATZUNG et al., 2012; STAHL, 2014), é um grave problema de saúde pública e objeto de intensa pesquisa científica. Classificada como uma doença pela Classificação Internacional de Doenças (CID) - 10, sob os códigos F10 - F19 que correspondem a transtornos mentais e comportamentais devido ao uso de substância psicoativa. Além de causar prejuízos fisiológicos e psicológicos aos usuários, a drogadição causa enormes prejuízos econômicos para a sociedade (UHL; GROW, 2004; POTENZA et al., 2011; VOLKOW; BALER; GOLDSTEIN, 2011), tornando de grande importância as pesquisas que buscam elucidar os mecanismos neurobiológicos e que possam carrear medidas preventivas e de tratamento desse distúrbio.

Estudos clínicos revelam que indivíduos que iniciam o uso de substâncias psicotrópicas no início da vida são mais suscetíveis ao desenvolvimento de adição (HINGSON; HEEREN; WINTER, 2006; CHEN; STORR; ANTHONY, 2009; ZIMIC; JUKIC, 2012), possivelmente devido à maturação cerebral incompleta (SOWELL et al., 1999; DEAS et al., 2000; LEVY et al. 2014), o que favorece o desenvolvimento de distúrbios neuropsiquiátricos, incluindo a depressão (HEIM; NEMEROFF, 2001), o transtorno do déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) (WILENS, 2004), o transtorno pós-traumático (YEHUDA; HALLIGAN; GROSSMAN, 2001), a esquizofrenia (HOWES et al., 2004), dentre outros.

Estudos clínicos e pré-clínicos evidenciam a via mesolímbica dopaminérgica como um alvo central de ação de drogas aditivas e via final comum do reforço e da recompensa no cérebro (ROBINSON; BERRIDGE, 2003; VOLKOW; BALER; GOLDSTEIN, 2011; KATZUNG et al., 2012; STAHL, 2014). Essa via tem origem na área tegmental ventral (ATV) projetando-se para o *nucleus accumbens* (estriado ventral), amígdala, hipocampo e córtex pré-frontal (CPF). De uma forma geral, as drogas aditivas agem ativando essa via e, como diferentes circuitos cerebrais estão envolvidos, as consequências neurobiológicas podem ser diferentes nas diversas

¹ Adição: Padrão comportamental de uso abusivo de substância(s), caracterizado por envolvimento extremo com o uso dessa(s) (uso compulsivo) e com a obtenção de seu suprimento, bem como alta tendência à recaída após interrupção do uso (STAHL, 2014).

fases envolvidas incluindo a intoxicação inicial, a recompensa e sua busca (fissura), a dependência e os sintomas de abstinência em situações de privação (GOLDSTEIN; VOLKOW, 2002).

Em vista disso, muitas drogas aditivas, tanto as estimulantes quanto as depressoras do sistema nervoso central (SNC), fazem parte do arsenal terapêutico clínico e são utilizadas no tratamento de transtornos neuropsiquiátricos, mas também possuem potencial de abuso, dependendo do contexto do seu emprego (LILE et al., 2005; WESTOVER; NAKONEZNY; HALEY, 2008; HEAL et al., 2013). Tal situação favorece a importância da compreensão das respostas comportamentais, bioquímicas e moleculares decorrentes da drogadição em busca de prevenção e tratamento.

Os estimulantes são a segunda categoria de drogas mais amplamente utilizadas no mundo, correspondendo a 68 milhões de usuários apenas no de 2018 (WORLD DRUG REPORT, 2019). Em vista disso, desde que os fármacos psicoestimulantes têm sido empregados como tratamento de primeira escolha no tratamento do TDAH em crianças e adolescentes (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013, SWANSON; BALER; VOLKOW, 2011), há uma grande preocupação sobre seus efeitos a longo prazo, dada a constatação de que o uso continuado de psicoestimulantes não prescritos (por exemplo cocaína, anfetamina e metanfetamina) podem produzir efeitos adversos no comportamento, incluindo sensibilização, paranóia, dependência e psicoses (DALLEY et al., 2005; MARCO et al., 2011). Como agravante, muitas vezes o diagnóstico do TDAH é realizado por médicos não especialistas em saúde mental (ANGOLD, 2000; VOLKOW; INSEL, 2003; EVANS; MORRIL; PARENTE, 2010), levando a erros diagnósticos e, conseqüentemente, na inefetividade do tratamento (YANOFSKI, 2011).

Além disso, o uso “*off-label*”, ou seja, o uso não aprovado, que não consta na bula, de fármacos psicoestimulantes tem se tornado popular entre pessoas saudáveis de diferentes idades, os quais utilizam esse tipo de medicação em busca de melhora na capacidade cognitiva para atividades relacionadas ao aprendizado, à vida acadêmica e também para prolongar o estado de vigília (MINZENBERG; CARTER, 2008; REPANTIS et al., 2010; GOZZI et al., 2012).

Nesse sentido, o modafinil (MOD), um agente promotor da vigília, considerado um psicoestimulante com propriedades psicotrópicas distintas dos psicoestimulantes clássicos como as anfetaminas e derivados, não possui mecanismo de ação

totalmente elucidado (DOPHEIDE et al., 2007; ROWLEY et al., 2014), bem como seu potencial de abuso não está totalmente esclarecido (MINZENBERG; CARTER, 2008; GOZZI et al., 2012). Este tem sido proposto como terapia alternativa para tratamento do TDAH em pacientes pediátricos e adolescentes, especialmente quando a medicação de primeira escolha (metilfenidato e/ ou dextroanfetamina) apresenta baixa eficácia clínica (RUGINO, 2007; GERRARD; MALCOM, 2007; GOEZ et al., 2012). Além disso, tem sido utilizado por indivíduos saudáveis em busca de melhora na cognição (KIM, 2012; SUDGEN, 2012).

Neste contexto, é importante considerar a possibilidade de abuso do MOD quando utilizado durante a adolescência, devido ao fato de que nem todas as estruturas cerebrais estão completamente desenvolvidas nesse período, tornando-as mais suscetíveis a diversos tipos de alterações exógenas (MARIN; PLANETA, 2004; LEVY et al. 2014). Como consequência, o MOD poderá estar induzindo modificações e/ ou danos em distintas áreas cerebrais, principalmente na via mesolímbica dopaminérgica que está intimamente envolvida na adição a substâncias.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A EPIDEMIOLOGIA DA ADIÇÃO E AS ESTRUTURAS CEREBRAIS ENVOLVIDAS

A adição é um dos distúrbios psiquiátricos que envolve uma grande quantia em gastos públicos, principalmente porque está relacionado com elevados custos médico-hospitalares, perda da produtividade do indivíduo dependente, além de pesados custos sociais relacionados à criminalidade e marginalização (UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME, 2014; MCLELLAN, 2017). A iniciação ao consumo de substâncias psicoativas até o desenvolvimento da adição envolve diversos fatores de risco que podem ser individuais (genéticos), culturais, biológicos, sociais e ambientais (OMS, 2004).

Segundo o Relatório Mundial sobre Drogas, publicado em 2019, estima-se que 271 milhões de pessoas ou 5,5% da população adulta mundial usou drogas aditivas em 2017, mas o fato mais preocupante é que 35 milhões dessas pessoas que usaram drogas desenvolveram distúrbios relacionados ao seu uso, ou seja, o

uso é tão perigoso ao ponto de que os usuários desenvolvem dependência e necessitam de tratamento (WORLD DRUG REPORT, 2019).

Os estimulantes são a segunda categoria de drogas mais amplamente utilizadas no mundo correspondendo a 68 milhões de usuários no ano passado (WORLD DRUG REPORT, 2019). Estima-se 29 milhões de usuários de anfetaminas e que fazem o uso indevido de estimulantes de prescrição médica e 21 milhões de usuários de “ecstasy” (WORLD DRUG REPORT, 2019). Na América Latina os psicoestimulantes mais usados são cocaína e estimulantes de prescrição sem propósitos médicos (WORLD DRUG REPORT, 2019).

Segundo o III Levantamento Nacional sobre o Uso de Drogas pela População Brasileira publicado em 2017, a classe dos anfetamínicos aparece em terceiro lugar entre as classes de medicamentos mais consumidas de forma não prescrita ou consumidas de forma diferente da prescrita durante a vida. Não houve diferença entre os sexos, a faixa etária que apresenta maior prevalência de consumo é a de 25-34 anos e o nível de escolaridade de maior prevalência foi o de pessoas que possuíam ensino superior completo ou mais (BASTOS et al., 2017).

Assim sendo, se evidencia a relevância dessa problemática para a sociedade e sendo uma doença, o tratamento psicológico e farmacológico da adição é frequentemente seguido de recaídas ou reincidências. Como consequências, também ocorrem prejuízos neuropsiquiátricos que compreendem a instabilidade emocional, depressão, anedonia, impulsividade, agressividade, déficit de atenção, entre outros (MAJEWSKA, 1996; PAU; LEE; CHAN, 2002).

Apesar da intensa pesquisa e dos avanços científicos na área, a adição continua sendo considerada um gravíssimo problema de saúde pública (POTENZA et al., 2011), que afeta não apenas os indivíduos dependentes, mas também a sociedade (VOLKOW; BALER; GOLDSTEIN, 2011). Estudos clínicos revelam que indivíduos que iniciam o uso de substâncias psicoativas antes da idade adulta tendem a desenvolver adição (HINGSON; HEEREN; WINTER, 2006; CHEN; STORR; ANTHONY, 2009) e acreditam que há envolvimento da maturação cerebral incompleta (SOWELL et al., 1999; DEAS et al., 2000).

As substâncias psicoativas que produzem dependência são conhecidas por ativarem a via de recompensa – a via mesolímbica dopaminérgica (RANG et al., 2016) provocando a liberação de dopamina (DA) frequentemente de maneira mais explosiva e mais prazerosa do que a liberação ocorrida naturalmente no estriado

ventral ou *nucleus accumbens*, conhecido como o “centro da recompensa ou centro do prazer hedônico” do cérebro (STAHL, 2014). Sendo assim, o circuito dopaminérgico mesolímbico é considerado a via final comum do reforço e da recompensa por drogas aditivas.

O *nucleus accumbens* está relacionado ao aprendizado e à motivação, atingindo a maturidade somente no período médio da adolescência (ACQUAS et al., 2002; GOGTAY et al., 2004; PETTENUZZO et al., 2008). Como várias estruturas cerebrais e neurotransmissores estão envolvidas na via de recompensa, as consequências geradas pelo abuso de drogas podem ser diferentes nas fases envolvidas: intoxicação, fissura, dependência e abstinência (GOLDSTEIN; VOLKOW, 2002).

A intoxicação é caracterizada pelo uso abusivo, ou seja, autoadministração de qualquer substância que cause consequências adversas. Já a fissura é caracterizada pela compulsão, ações repetitivas de atos habituais (busca pela droga) mesmo diante de consequências adversas e pela impulsividade, ações arriscadas, não planejadas em resposta a estímulos externos, sem considerar as consequências negativas, tanto para o próprio usuário, como para outras pessoas. Quando o quadro de dependência se instala, ocorrem adaptações fisiológicas produzidas pela administração repetida da droga e quando o uso é abruptamente interrompido ocorre a abstinência física e psíquica (STAHL, 2014).

Em relação aos estimulantes, a abstinência física caracteriza-se pela presença de sintomas e sinais físicos de quando o indivíduo pára de fazer o uso da droga como, por exemplo, fadiga crônica, sonolência profunda ou agitação, dificuldade de concentração, fome, letargia, irritabilidade e tremores. Já na abstinência psíquica, os sintomas mais comuns são ansiedade, depressão, sensação de vazio, pensamentos paranóicos e delírios, variando a intensidade de indivíduo para indivíduo, podendo até chegar ao desenvolvimento de síndrome psicótica (KATZUNG et al., 2012).

As áreas cerebrais envolvidas nos circuitos afetados pelas drogas são inervadas por projeções que envolvem diversos sistemas de neurotransmissores e modificações nessas projeções modulam a maiorias das adaptações que ocorrem durante a adição (CRUZ et al., 2004; KATZUNG et al., 2012; STAHL, 2014). Ocorre a projeção dos neurônios dopaminérgicos da ATV para diversas estruturas cerebrais envolvidas nas emoções, pensamentos, memória e planejamento.

O sistema nigro-estriatal está envolvido na ativação motora e comportamento de motivação e é composto por neurônios dopaminérgicos projetados a partir da substância negra até o caudado-putamen (GERFEN, 1984). As estruturas do estriado são totalmente desenvolvidas no final da adolescência, entretanto suas funções são mediadas pelo córtex pré-frontal, o qual coordena funções executoras (SOWELL et al., 1999; ARES-SANTOS, 2012). Outras estruturas cerebrais envolvidas na drogadição que também são inervados pela via dopaminérgica mesolímbica são a amígdala, que desempenha um papel importante nos estados motivacionais que estão diretamente relacionados com a adição, (MEREDITH; CALLEN; SCHEUER, 2002) e o hipocampo, responsável pela memória e aprendizado (VOLKOW; FOWLER; WANG, 2003). De particular importância, o hipocampo é altamente sensível ao abuso de drogas durante períodos do desenvolvimento devido as suas contínuas alterações estruturais e funcionais durante a adolescência e idade adulta, as quais são vitais para a sua maturação e função neuronal (IZENWASSER, 2005).

O desenvolvimento da drogadição é uma contínua progressão do uso recreacional e regular ao uso compulsivo, acompanhado de uma transição comportamental, que se dá do comportamento direcionado a um alvo inicial com uma associação resultado-ação a um comportamento habitual com uma associação resposta-estímulo. Acredita-se que essa transformação comportamental coincide com uma transição funcional do sistema dopaminérgico do estriado ventral para o estriado dorsal (LESSCHER; VANDERSCHUREN, 2012; EVERITT; ROBBINS, 2013).

Em vista disso, estímulos adversos em períodos de desenvolvimento como a adolescência, em que nem todas as estruturas cerebrais encontram-se totalmente desenvolvidas, podem tornar o indivíduo mais suscetível ao desenvolvimento de distúrbios neuropsiquiátricos.

2.2 DROGAS PSICOATIVAS ESTIMULANTES

As drogas psicoativas são aquelas substâncias que chegam ao SNC e causam alterações na função cerebral. Podemos classificá-las em drogas que exercem tanto efeitos estimulantes, quanto efeitos depressores sobre o SNC e ainda

dentro desses grupos podemos classificá-las como substâncias lícitas e ilícitas. (OMS, 2004).

No grupo das drogas psicoestimulantes de uso lícito com prescrição médica se enquadram os anorexígenos anfetamínicos (anfepramona e femproporex), os derivados anfetamínicos empregados no tratamento do TDAH como o metilfenidato, a *d*-anfetamina e a lisdexanfetamina, os agentes promotores da vigília do tipo não anfetamínicos utilizados em casos de narcolepsia como o modafinil e o armodafinil. Além dessas, outras drogas psicoestimulantes como a metanfetamina, a 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA), popularmente conhecido como *écstasy*, a dextroanfetamina, a cocaína e seus congêneres, como o crack, são de uso ilícito e apenas utilizadas com propósito de abuso (TIEGES et al., 2009; HOWARD et al., 2010).

Os psicoestimulantes, em geral, apresentam como efeito principal o aumento da vigília, redução da sensação de fadiga e alguns apresentam melhora na cognição a curto prazo, isso ocorre em administrações agudas e em doses baixas a moderadas. Esses efeitos relacionam-se ao aumento dos níveis de DA extraneuronal nas terminações nervosas dopaminérgicas (PEREIRA et al., 2006). Após doses elevadas ou longos períodos de uso, os psicoestimulantes podem produzir sintomas que incluem desde excitação, euforia, aumento da atividade locomotora, pensamentos desordenados até episódios psicóticos (alucinações e delírios), os quais necessitam de tratamento psiquiátrico (RANG et al., 2016).

Além disso, o uso de psicoestimulantes causa sintomas físicos como tremor, inquietação, comportamento estereotipado e também hipertensão, inibição da motilidade gastrintestinal, taquicardia, hipertermia podendo chegar a insuficiência cardíaca, acidente vascular encefálico e convulsões, em casos mais graves (CARVALHO et al., 2012; STAHL, 2014). Experimentalmente, os psicoestimulantes aumentam a atividade locomotora e são facilmente auto-administrados pelo seu potente efeito aditivo ou de reforço (ROTHMAN; BAUMANN, 2003).

As drogas psicoativas estimulantes constituem uma entidade terapêutica em alguns casos, mas também são passíveis de abuso, dependendo do contexto de seu emprego (LILE et al., 2005; WESTOVER; NAKONEZNY; HALEY, 2008). Nesse sentido, torna-se de grande importância elucidar seus efeitos e mecanismos de ação frente à adição. Assim, o desenvolvimento de novas estratégias para tentar compreender os mecanismos neurobiológicos visando a prevenção e tratamento da

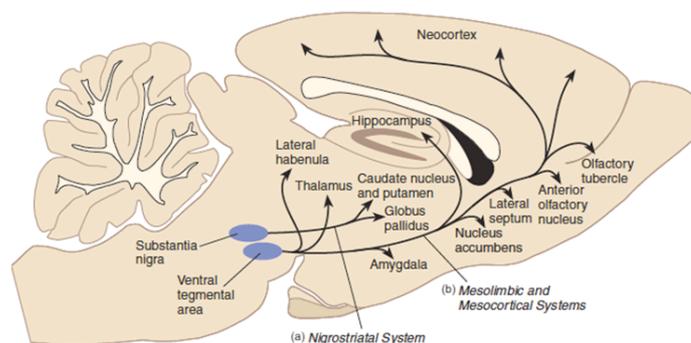
adição podem ser consideradas prioridade, frente aos prejuízos causados às famílias e à sociedade.

2.3 VIA MESOLÍMBICA DOPAMINÉRGICA

Conforme mencionado anteriormente, as substâncias psicoativas que produzem adição são conhecidas por ativarem a via mesolímbica dopaminérgica, ou também conhecida como a via de recompensa, mencionada por alguns autores como “centro da recompensa ou centro do prazer hedônico do cérebro” (STAHL, 2014; HILAL-DANDAN; BRUNTON, 2015; RANG et al., 2016). Logo, o circuito dopaminérgico mesolímbico é considerado a via final comum do reforço e da recompensa por drogas aditivas.

Essa via tem origem na ATV que faz projeções para o *nucleus accumbens* (estriado), amígdala, hipocampo e CPF (Figura 1). De uma forma geral, as drogas aditivas agem ativando essa via e, como diferentes circuitos cerebrais estão envolvidos, as conseqüências neurobiológicas podem ser diferentes nas diversas fases envolvidas como a intoxicação, fissura, dependência e abstinência, pois as alterações que ocorrem nos níveis das monoaminas como a DA, noradrenalina (NA) e serotonina (5-HT) são responsáveis por múltiplos domínios que afetam desde a cognição até o comportamento motor (GOLDSTEIN; VOLKOW, 2002, WISE, 2004).

Figura 1 - Vias dopaminérgicas no cérebro. (a) via nigroestriatal, (b) via mesolímbica e mesocortical.



Fonte: Adaptado de <https://writepass.com/journal/2012/11/the-major-national-health-problems-straining-the-health-care-system/>.

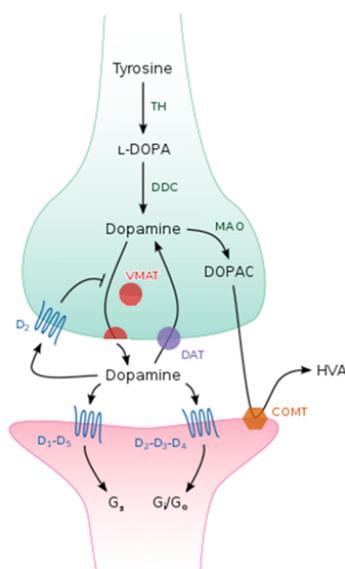
As drogas psicoativas agem provocando a liberação de DA de uma forma mais explosiva e prazerosa do que a liberação ocorrida naturalmente no estriado

ventral ou *nucleus accumbens*, uma parte do sistema límbico do cérebro, a qual acredita-se estar envolvida em muitos comportamentos emocionais, como sensação de prazer, euforia, motivação e recompensa, atingindo a maturidade somente no período médio da adolescência (ACQUAS et al., 2002; GOGTAY et al., 2004; PETTENUZZO et al., 2008; STAHL, 2014). Assim, a via mesolímbica desempenha um papel importante em vários comportamentos relacionados à adição.

Em vista disso, acredita-se que a impulsividade e a tomada de decisões arriscadas, que são características do indivíduo adicto, estão relacionadas a alterações dos impulsos nervosos que partem do estriado e chegam ao CPF, o qual está relacionado as funções executoras, assim como na cognição (SWANN, et al., 2009; FLECK et al., 2012; MASON et al., 2014).

Em vista do importante papel da DA na adição, sua síntese ocorre a partir do aminoácido tirosina (Figura 2), o qual é levado para dentro do terminal dopaminérgico através do transportador de tirosina e convertido a DA através da ação de várias enzimas, sendo a tirosina hidroxilase (TH) a mais importante e a enzima limitante do processo.

Figura 2 - Sinapse dopaminérgica. TH: tirosina hidroxilase; DOC: dopamina descarboxilase; L-DOPA: levodopa; MAO: enzima monoaminoxidase; COMT: enzima catecol-o-metil transferase DAT: transportador de dopamina; VMAT: transportador vesicular de monoaminas; DOPAC: ácido 3,4-dihidroxifenilacético; HVA: ácido homovanílico; D1-5: receptores dopaminérgicos;



Fonte: https://en.wikipedia.org/wiki/Dopamine#/media/File:Dopaminergic_synapse.svg.

Após a síntese da DA, a mesma é transportada para as vesículas sinápticas através do transportador vesicular de monoaminas do tipo 2 (VMAT-2) onde é estocada até a sua liberação na sinapse durante a neurotransmissão. A ação da DA na sinapse é terminada através de múltiplos mecanismos (SIEGEL, 2005; STAHL, 2014).

A DA liberada pode ser transportada para dentro do neurônio pré-sináptico via o transportador de dopamina (DAT) onde poderá ser estocada nas vesículas sinápticas para posterior uso ou ainda dentro do neurônio pré-sináptico, poderá ser destruída pela enzima monoamina-oxidase A ou B (MAO-A ou MAO-B, respectivamente). A ação da DA poderá ser terminada extracelularmente via outra enzima, a catecol-O-metil-transferase (COMT) (STAHL, 2014).

Além disso, os receptores pré-sinápticos dopaminérgicos do tipo D2 (D2R) fazem o *feedback* negativo nos terminais pré-sinápticos. Existem também os receptores pós-sinápticos que regulam a neurotransmissão, esses incluem os receptores dopaminérgicos do tipo D1-D5 (D1R, D2R, D3R, D4R e D5R), cada qual com distintas ações, sendo expressos em diferentes quantidades em diversas áreas cerebrais. Todos esses receptores são transmembrana e acoplados à proteína G, os D1R e D5R ligam-se a Gs e estimulam a adenilato ciclase (AC) e a ativação da proteína quinase A (PKA). Os D2R, D3R e D4R ligam-se através da Gi e ativam os canais de potássio, bem como inibem os canais de cálcio e a AC (SIEGEL, 2005; RANG et al., 2016).

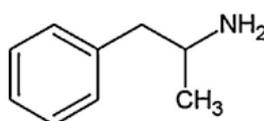
A maioria dos corpos celulares dopaminérgicos tem origem no mesencéfalo, na ATV e na substância negra (SN). A DA é liberada da ATV e SN e alcança seus alvos através de diferentes vias axonais. O nível da atividade funcional dopaminérgica nessas vias vai depender da quantidade de DA que será liberada, das ligações nos terminais pré e pós-sinápticos, dos eventos catabólicos na sinapse, da atividade dos transportadores pré-sinápticos e do número e tipos de receptores pós-sinápticos que estão presentes na região cerebral em especial (STAHL, 2014).

2.4 EFEITOS DA ANFETAMINA SOBRE O SNC

A anfetamina (ANF), pertencente ao grupo das drogas psicoestimulantes, é uma amina simpaticomimética que exerce poderosas ações estimulantes sobre o SNC (HILAL-DANDAN; BRUNTON, 2015). A estrutura química (Figura 3) da

anfetamina apresenta um anel fenólico com uma cadeia lateral de hidrocarbonetos e um grupamento amino possuindo um grupamento alfa-metil. Essa estrutura básica é compartilhada por outros psicoestimulantes do tipo anfetaminícos.

Figura 3 - Estrutura molecular da anfetamina



Fonte: <http://psychotropicon.info/amphetamin/>.

Devido a sua rápida absorção no trato gastrointestinal, a ANF penetra livremente pela barreira hematoencefálica, o que explica os seus efeitos pronunciados sobre o SNC, assim como sua distribuição na maior parte dos tecidos. É excretada de forma inalterada na urina, sendo a excreção aumentada quando a urina está mais ácida. A meia vida plasmática da ANF pode variar de 5 até 30 horas dependendo da quantidade ingerida, do fluxo urinário e do pH (VREE, 1973; RANG et al., 2016), em ratos o tempo de meia vida da ANF é menos de 1 hora (CHO et al., 1973).

Do ponto de vista clínico, a administração oral de doses clinicamente aprovadas de ANF bloqueia os transportadores de noradrenalina (NET), de DA (DAT) e serotonina (SERT). A droga age como um inibidor competitivo e um pseudosubstrato desses transportadores ligando-se ao mesmo sítio das monoaminas e, como consequência, inibe a recaptação das monoaminas como a NA, a DA e a 5-HT (STAHL, 2014; SULZER, 2011; KUCZENSKI, 1995). A ANF possui isômeros, o dextrógiro (*d*) e o levógiro (*l*). O isômero *d* é mais potente que o *l* para ligação ao DAT, enquanto que ambos isômeros exercem potência de ação equivalente sobre o NET. Assim, os sais mistos de *d*, *l*-anfetamina possuem ação relativamente maior sobre o DAT do que sobre o NET (STAHL, 2014).

Entretanto, em indivíduos que fazem uso abusivo, a ANF desencadeia outros efeitos devido as altas doses utilizadas, assim como compete com as monoaminas devido a sua similaridade estrutural, não só atuando como substratos para os transportadores de monoaminas, mas também porque entram no neurônio pré-sináptico (CAO, 2016). Após a inibição competitiva do DAT, a ANF é transportada

para o terminal dopaminérgico pré-sináptico e pode agir como inibidor competitivo do VMAT-2 o que desencadeia um deslocamento de DA das vesículas promovendo um aumento da liberação de DA, assim como inibe a atividade da enzima MAO, reduzindo o metabolismo citosólico da DA (SULZER, 2011).

Essa DA liberada pode acumular-se no citoplasma do neurônio pré-sináptico e sofrer auto-oxidação (HERMIDA-AMEIJEIRAS, 2004), promover a abertura dos canais e também inverter a direção do DAT liberando mais DA na sinapse. Essas ações não estão ligadas a qualquer possível ação terapêutica da ANF, e sim contribuem para o reforço, recompensa, euforia e uso abusivo (TEIXEIRA-GOMES et al., 2015; CAO, 2016).

Estudos experimentais evidenciam que a ANF assim como os seus análogos são capazes de produzir neurotoxicidade, esse fenômeno foi primeiramente descrito por Pletscher *et al.* em 1963. Nesse sentido, os efeitos tóxicos da ANF podem levar à depleção de DA a longo prazo, decréscimo no número de transportadores e degeneração de neurônios e terminais nigroestriatais dopaminérgicos (CADET et al., 2007; CARVALHO et al., 2012; ARES-SANTOS et al., 2012).

A ANF é conhecida por induzir a oxidação de lipídios e proteínas e aumentar a formação de espécies reativas (ER) tanto no cérebro de indivíduos que fazem uso abusivo (FITZMAURICE et al., 2006), assim como em ratos expostos à droga (DAROSA et al., 2012; CUNHA-OLIVEIRA, REGO, OLIVEIRA, 2013; TUNG et al., 2017).

Em um estudo com primatas, a grande produção de ER geradas pela ANF foi correlacionada a uma redução na atividade do DAT no estriado de macacos devido a reação das ER com os grupos sulfidrílicos do transportador (HASHIMOTO, 2004). Da mesma forma, em um estudo em cultura de células, uma única exposição de ANF diminuiu a função do DAT (GERMAN et al., 2012).

A exposição repetida ou altas doses de ANF em roedores causa déficits dopaminérgicos persistentes incluindo redução no conteúdo estriatal da densidade do DAT, na atividade da TH e na função do VMAT-2, o que resulta em déficits persistentes de DA (VOLZ et al., 2007; CRUZ et al., 2010; RAINERI et al., 2012). Além disso, a administração repetida de psicoestimulantes inicia uma transiente dessensibilização dos D2R, resultando em aumento nos disparos e amplificação da liberação de DA e, por fim, em alterações nos mecanismos de transdução de sinais (ANDERSON, PIERCE, 2005). Assim, estudos em animais têm mostrado uma relação entre a diminuída disponibilidade dos D2R e a aumentada motivação pela

recompensa a drogas, refletindo-se em uma vulnerabilidade à adição à ANF (TOURNIER et al., 2013).

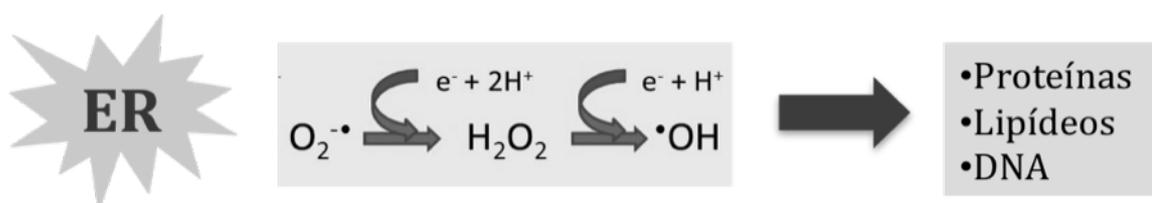
Já os D1R são críticos em processos relacionados à recompensa independente da droga de abuso administrada (MARTINEZ-RIVERA et al., 2015). Foi demonstrado que a inativação do D1R exerceu um efeito protetor frente à neurotoxicidade induzida por metanfetamina prevenindo perda neuronal dopaminérgica e gliose no cérebro de camundongos (ARES-SANTOS et al., 2012). Além disso, agonistas D1R levam à preferência pela droga no modelo animal de preferência de lugar condicionada (PLC), enquanto antagonistas bloqueiam esse comportamento (BENINGER; MILLER, 1998; YOUNG; GEYER, 2010).

Como os neurônios dopaminérgicos são encontrados em diversas áreas cerebrais, as consequências geradas devido ao aumento de monoaminas a curto prazo ou a longo prazo causado pelo uso de ANF são distintas, afetando desde a cognição, até a o sistema de recompensa e o comportamento motor, o que se explica, em parte, devido a possível e irreversível perda de corpos neuronais e terminais axônicos (WISE, 2004; CAO, 2016).

2.5 ESTRESSE OXIDATIVO

Considerando o potencial da DA, uma catecolamina que modula sinalizações sinápticas (SEAMANS; YANG, 2004), em afetar o funcionamento do SNC na adição, o aumento da atividade dopaminérgica gera níveis elevados de DA nas sinapses, os quais são uma fonte para produção de ER no cérebro (REES et al., 2007). As ER são átomos ou moléculas de alta instabilidade e meia-vida curta que rapidamente reagem podendo danificar proteínas, lipídeos e DNA quando em excesso (Figura 4) (YU; ANDERSON, 1997; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Figura 4 - Via do estresse oxidativo. ER: espécies reativas; $O_2^{\cdot-}$: ânion superóxido; H_2O_2 : peróxido de hidrogênio; HO^{\cdot} : radical hidroxil; e^- : elétrons desemparelhados; H^+ : hidrogênio.



Fonte: Autor.

Entretanto, em quantidades fisiológicas, as ER são necessárias durante alguns processos como a destruição de patógenos invasores, também atuam como segundos mensageiros nas células nervosas, estão envolvidas na regulação do cálcio intracelular e na fosforilação de proteínas e ativação de fatores de transcrição (VALKO, 2007).

Mecanicamente, a DA pode ser metabolizada via enzima MAO, ou sofrer auto-oxidação resultando na produção de ER, tais como o ânion superóxido (O_2^-), peroxinitrito ($ONOO^-$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ácido dihidroxifenilacético ou, ainda, pode sofrer uma hidroxilação não enzimática na presença do íon ferro (Fe^{2+}) e H_2O_2 levando à formação de seu metabólito tóxico, a 6-hidroxidopamina (6-OHDA) (CHIUEH et al., 1992; HERMIDA-AMEIJEIRAS, 2004; CAO, 2016). Ambas as vias possuem potencial para causar uma disfunção celular, pela elevada produção de ER e metabólitos tóxicos.

Neste sentido, o organismo humano possui um sistema de defesas antioxidantes que atuam na inativação ou detoxificação desses compostos. Essas defesas antioxidantes podem ser classificadas como enzimáticas e não enzimáticas (HALLIWELL, 2007). Entre as enzimáticas podemos citar a glutathione peroxidase (GPx), a catalase (CAT) e a superóxido dismutase (SOD). A GPx é responsável por transformar o H_2O_2 em água, através da conversão da glutathione reduzida (GSH) em oxidada (GSSG). A SOD promove a conversão do radical O_2^- em H_2O_2 e, por fim, a CAT, a mais importante peroxidase em detoxificar o H_2O_2 em excesso, remove o H_2O_2 através da sua conversão em H_2O , prevenindo a produção do radical hidroxil (MATÉS; SANCHEZ-JIMENEZ, 1999). Dentre as defesas não enzimáticas, podemos citar a GSH, coenzima Q, o ácido ascórbico (vitamina C), os tocoferóis, carotenoides e flavonóides, entre outros, os quais são descritos como agentes redutores não enzimáticos neutralizadores de ER (HALLIWELL, 2007).

O cérebro é altamente vulnerável aos efeitos nocivos das ER devido a sua alta taxa metabólica e à concentração elevada de ácidos graxos poliinsaturados e à presença de metais de transição, além de apresentar baixas concentrações de antioxidantes e capacidade reduzida de regeneração (FLOYD, 1999; REYNOLDS et al., 2007). Tanto as ER quanto os metabólitos tóxicos formados pela degradação da ANF podem depletar essas defesas antioxidantes (CADET, 2007; YAMAMOTO; RAUDENSKY, 2008) levando ao estresse oxidativo (EO) cerebral. O EO é uma

consequência da prevalência da geração de ER em detrimento da sua degradação ou inativação pelas defesas antioxidantes (BERK et al., 2011).

A carbonilação de proteínas é um biomarcador amplamente utilizado para avaliar o dano oxidativo às proteínas. Grupos carbonil são introduzidos nas proteínas por uma variedade de vias oxidativas. ER podem reagir diretamente com as proteínas ou podem reagir com moléculas como açúcares e lipídeos gerando produtos (espécies reativas carboniladas) que, por sua vez, reagem com as proteínas (DALLE-DONNE et al., 2006). Dessa forma o acúmulo de proteínas carboniladas nos tecidos neurais estão associados com uma variedade de doenças neurodegenerativas, assim como com a adição (DIAS et al., 2017; SEGAT et al., 2016; METZ et al., 2019).

A peroxidação de lipídeos é também uma das consequências do dano cerebral induzido por ER. A peroxidação lipídica altera a fluidez e a permeabilidade das membranas celulares, o que consequentemente prejudica a atividade de enzimas presentes nas membranas, a ligação de moléculas aos seus receptores, as interações celulares, o transporte de nutrientes e a função de segundos mensageiros (MEAGHER; FITZGERALD, 2000).

Sendo os efeitos das drogas de abuso sobre o SNC cruciais para o desenvolvimento da drogadição (LESHNER, 1997), muitas evidências dão suporte ao papel do EO na toxicidade induzida pela ANF em diferentes órgãos como cérebro, coração, fígado e rins (CUNHA-OLIVEIRA; REGO; OLIVEIRA, 2013). Foram encontrados níveis aumentados de peroxidação lipídica e oxidação de proteínas no cérebro de usuários dessa droga (FITZMAURICE et al., 2006), e ratos expostos a ANF apresentaram níveis elevados de ER em diferentes áreas cerebrais (CUNHA-OLIVEIRA; REGO; OLIVEIRA, 2013).

A exposição tanto aguda como crônica à ANF aumentou os danos às proteínas e aos lipídeos em diversas áreas cerebrais de ratos, assim como causou alterações na atividade enzimas antioxidantes como a SOD e CAT (CASTRO et al., 2009; FREY et al., 2006a,b). Além disso, essas alterações na via oxidativa estão relacionadas às alterações comportamentais observadas na drogadição (DA-ROSA et al., 2012; CUNHA-OLIVEIRA; REGO; OLIVEIRA, 2013).

Em vista disso, estudos evidenciam o envolvimento do EO na adição à drogas como a ANF (YAMAMOTO; RAUDENSKY, 2008; STEINKELLNER, 2011; SEGAT et

al., 2014, 2016; TUNG et al., 2017; DIAS et al., 2017; METZ et al., 2019), sendo uma das vias que se encontram descompensadas durante a adição.

2.6 PLASTICIDADE SINÁPTICA

As bases biológicas da adição mostram ser um quadro complexo de interação entre cascatas de sinalização intracelular envolvidas na neuroplasticidade e sobrevivência neuronal, bem como a relação destes com fatores ambientais e suas consequências para o organismo (RUSSO et al., 2009; GHITZA et al., 2010; KIRKPATRICK; JOHANSON; DEWIT, 2013; STAHL, 2014). Em vista disso, a literatura dá suporte à ideia que uma das vias que sofre influência na adição é o gene-alvo do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF), uma neurotrofina que modula a atividade neuronal e a plasticidade sináptica (RUSSO et al., 2009; GHITZA et al., 2010; KUHN et al., 2015b).

O BDNF e sua cascata de sinalização constituem um alvo proposto para a adição, como local de possível falha na transdução de sinais pelas monoaminas. Assim, desempenha um papel importante em uma ampla variedade de processos neurais durante o desenvolvimento tanto de animais como de humanos (POST, 2007). Durante o Período do desenvolvimento, o BDNF é importante para os processos de neurogênese, sobrevivência neuronal e maturação normal das vias neurais. Já em adultos, o BDNF é importante para a plasticidade sináptica e crescimento dendrítico. Desta forma, alterações nessa neurotrofina são bem documentadas no curso da adição (GHITZA et al., 2010).

A expressão do gene do BDNF pode ser regulada por mecanismos epigenéticos, ou seja, mecanismos que não envolvam alterações na sequência de nucleotídeos como, por exemplo, a metilação do DNA ou uma modificação na histona. Adicionalmente, a liberação de BDNF pode ser constitutiva ou mais frequente regulada por estímulos (WATERHOUSE; XU, 2009), o que pode ser um importante fator na adição. Em relação a síntese e liberação dessa neurotrofina, em nível nuclear, podem ser produzidas diferentes transcrições do ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) do BDNF que estão prontas para serem transcritas do núcleo para o citoplasma. Já no retículo endoplasmático, essa molécula é traduzida para a forma de pró-BDNF. O pró-BDNF recém-sintetizado se dirige ao complexo de Golgi e pela ação de endoproteases é clivado em BDNF maduro. As vesículas contendo

BDNF fundem-se à membrana, em um processo dependente de cálcio e o BDNF é liberado para o meio intracelular (LU; PANG; WOO, 2005; GRANDE et al., 2011).

A diferenciação dos efeitos das formas de pró-BDNF e BDNF maduro são de grande importância porque essas moléculas possuem ações biológicas distintas por atuarem em diferentes receptores (LU; PANG; WOO, 2005). A ligação do BDNF maduro ao receptor de tirosina quinase tipo B (TrKB) é responsável por efeitos benéficos como, por exemplo, eficiência sináptica, conectividade neuronal e neuroplasticidade, exercendo um papel crucial nas funções cognitivas que incluem a formação e consolidação da memória no hipocampo (MATSUMOTO et al., 2008). Por outro lado, a ligação do pró-BDNF ao receptor pan-neurotrófico (p75NTR) está relacionada a mecanismos de apoptose celular (GRANDE et al., 2011).

O BDNF é amplamente expresso no SNC e sua expressão encontra-se alterada em várias condições patológicas (NAGAHARA, TUSZYNCKI, 2011; LU et al., 2013, FRIES et al., 2015), incluindo a adição (ANGELUCCI et al., 2007; SHEN et al., 2014). Dependendo da área cerebral estudada diferentes são as alterações encontradas nessa neurotrofina. Ratos que receberam repetidas exposições à *d*-ANF apresentaram níveis diminuídos de BDNF hipocampal, fato relacionado com déficits na memória de reconhecimento (DE LIMA et al., 2011). Em um estudo avaliando a exposição de doses repetidas (7 dias) e (35 dias) à ANF e a memória de ratos, foram encontrados prejuízos de memória nos dois grupos expostos, sendo mais pronunciado nos animais do grupo crônico. Além disso, esses prejuízos foram acompanhados de um aumento nos níveis do mRNA do BDNF no CPF e amígdala e de uma diminuição no hipocampo (VALVASSORI et al., 2015). Um outro estudo evidenciou a diminuição dos níveis do BDNF no córtex e hipotálamo de ratos expostos cronicamente à ANF, correlacionando estes achados com a toxicidade induzida pela ANF em neurônios dopaminérgicos (ANGELUCCI et al., 2007).

Entretanto, outros estudos apresentam resultados diferentes frente a parâmetros de adição em relação aos níveis dessa neurotrofina. Um recente estudo mostrou um aumento na expressão do mRNA do BDNF no CPF medial após o restabelecimento da PLC por *d*-ANF (SHEN et al., 2014). Também foi encontrado um aumento da expressão do BDNF após repetidas administrações de ANF na amígdala, córtex e hipotálamo de ratos (MEREDITH; CALLEN; SCHEUER, 2002).

Em 1993, um novo fator neurotrófico de neurônios dopaminérgicos cerebrais foi identificado, o fator neurotrófico derivado da glia (GDNF, do inglês *glial cell-*

derived neurotrophic factor) (LIN et al., 1993). O GDNF é expresso no SNC durante o desenvolvimento. No cérebro adulto ele é expresso em áreas mais restritas, podendo ser encontrado em altos níveis no estriado (dorsal e ventral), tálamo, córtex e hipocampo (CARNICELLA; RON, 2009).

O GDNF e seus diferentes receptores são reconhecidos como uma das principais redes neurotróficas do SNC, importantes para o desenvolvimento, manutenção e função de uma variedade de neurônios e células gliais. O GDNF faz parte do controle de múltiplos processos, desde a sobrevivência neuronal até a orientação axonal e formação da sinapse no SNC em desenvolvimento, além do controle da função sináptica e respostas regenerativas no SNC adulto (LOVE et al, 2005; IBANEZ; ANDRESSOO, 2016). Nesse sentido, exerce influências em diversos distúrbios do SNC, incluindo a adição (CARNICELLA; RON, 2009).

O primeiro estudo relacionando à sinalização do GDNF com a adição reportou que a sua injeção intracranial na ATV suprimiu os efeitos da administração prolongada de cocaína, incluindo várias adaptações bioquímicas e comportamentais relacionadas ao uso da droga (MESSER et al., 2000). Drogas psicoestimulantes como a ANF são conhecidas por modular a expressão do GDNF e sua sinalização, entretanto, os resultados variam de acordo com o regime (agudo ou crônico) de uso da droga (CARNICELLA; RON, 2009).

Um importante papel para o GDNF endógeno na regulação do comportamento aditivo é sugerido por estudos que fazem o uso de anticorpos anti-GDNF e estudos com camundongos mutantes para o gene do GDNF, os quais apresentaram aumentada sensibilização aos efeitos da cocaína e metanfetamina. Além disso, o GDNF endógeno parece ser relevante para controlar a ingestão de etanol no período da abstinência (CARNICELLA; RON, 2009). Dessa forma, o GDNF desempenha um papel regulatório na ação das drogas de abuso e a maioria dos estudos sugere que a ativação da via do GDNF resulta em atenuação de alterações comportamentais e bioquímicas observadas após a exposição de roedores a drogas de abuso (CARNICELLA; RON, 2009).

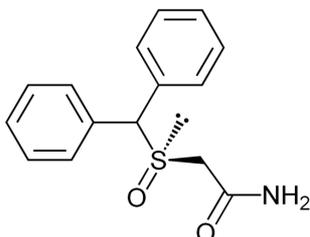
Sendo assim, a principal hipótese que guia a atual pesquisa neurobiológica sobre a drogadição e recaída a drogas de abuso é que a exposição crônica a drogas causa neuroadaptações de longa duração e alterações na plasticidade sináptica que contribuem para a vulnerabilidade à preferência por drogas de abuso assim como à recaída durante períodos de abstinência e são distintas de acordo com a área

cerebral avaliada (NESTLER, 2001). Nesse sentido, o uso de modelos animais para elucidar as alterações que ocorrem nas vias moduladas por fatores neurotróficos são de grande importância para o melhor entendimento de alvos moleculares da adição.

2.7 EFEITOS DO MODAFINIL SOBRE O SNC

O MOD é classificado como um fármaco psicoestimulante do tipo não anfetamínico (Figura 5). Ele é um agente promotor de vigília de ação comprovada, cujo mecanismo de ação molecular exato não é totalmente conhecido (STAHL, 2014). O MOD é o primeiro metabólito do adrafinil, um fármaco que foi introduzido para o tratamento da narcolepsia na década de 1980. Desde 1994 o modafinil está disponível como fármaco (RANG et al., 2016) aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento da sonolência diurna excessiva (hipersonia) e da narcolepsia (BALLON; FEIFEL, 2006).

Figura 5 - Estrutura molecular do modafinil



Fonte: <https://www.gratispng.com/png-5m2u9u/>.

O MOD é rapidamente absorvido após uma única ou múltiplas doses orais alcançando o pico de concentração plasmática 2 a 4 horas após a sua administração (WONG et al., 1999). A presença de alimentos no trato gastrointestinal pode deixar mais lenta a taxa de absorção, mas não afeta a extensão total de sua absorção. É altamente lipofílico e se liga a aproximadamente 60 % das proteínas plasmáticas, primariamente à albumina. Os principais metabólitos circulantes devido a degradação do MOD não parecem exercer nenhuma atividade significativa no cérebro e na periferia (ROBERTSON; HELLRIEGEL, 2003). O tempo de meia vida de eliminação do MOD é de aproximadamente 12 a 15 horas de uma dose clínica

(WONG et al., 1999), além disso pode ser determinado no plasma e urina (TSENG et al., 2005).

Tentativas clínicas têm sido realizadas para seu uso na fadiga, adição à metanfetamina, cocaína e nicotina, TDAH em crianças e adultos, depressão, transtorno bipolar, esquizofrenia e na doença de Alzheimer e Parkinson (GERRARD; MALCOM, 2007, REICHEL; SEE, 2010, SCORIELS; JONES; SAHAKIAN, 2012, SOYKA; MUTSCHLER, 2016). O MOD também é usado na apneia obstrutiva do sono e transtorno do ciclo circadiano (MINZENBERG; CARTER, 2008). Ainda, possui uso *off-label* como “*smart drug*” ou “*pílula da inteligência*”, pela sua possível ação de melhora na cognição com baixo potencial de abuso (MINZENBERG; CARTER, 2008, SCORIELS; JONES; SAHAKIAN, 2012). Entretanto, alguns relatos de caso evidenciam que o MOD quando utilizado em altas dosagens possui efeito de reforço, sendo relatados um caso de psicose, sintomas de retirada, dependência e de abuso (KATE; GROVER; GHORMODE, 2012; KRISHNAN; CHARY, 2015; SOYKA; MUTSCHLER, 2016).

Embora o MOD aumente o controle cognitivo pela clara modificação das funções cerebrais (MOREIN-ZAMIR; TURNER; SAHAKIAN, 2007; SCHMAAL et al., 2013), seu mecanismo de ação não é totalmente elucidado e, por ação em nível celular, seu uso ainda é questionado. Acredita-se que os efeitos do MOD ocorrem devido a fraca inibição do DAT, ou seja, ele inibe a recaptção da DA por se ligar ao DAT, mas com baixa potência (RANG et al., 2016).

Além disso, há estudos evidenciando que o MOD age sobre diversos NT do SNC, ou seja, aumenta a liberação de 5-HT (FERRARO et al., 2000; 2002), diminui o ácido gama-aminobutírico (GABA) no *nucleus accumbens* e aumenta os níveis de glutamato no hipocampo e tálamo (FUXE, 1997; FERRARO et al., 1998, STONE et al., 2002). Também, tem sido sugerido que o MOD ativa neurônios de orexina no hipotálamo lateral (CHEMELLI et al., 1999), levando à liberação de histamina e orexina e indução do estado de vigília (ISHIZUKA; MUROTANI; YAMATODANI, 2010). Entretanto, a ativação do hipotálamo lateral não parece ser necessária para a ação do MOD, visto que ele é capaz de promover a vigília em pacientes com perda de neurônios orexinérgicos hipotalâmicos na narcolepsia. Essa ativação pode ser secundária às ações do MOD sobre os neurônios dopaminérgicos (STAHL, 2014).

Ainda assim, alguns estudos destacam os efeitos neuroprotetores do MOD (AGUIRRE et al., 1999, VAN VLIETA et al., 2008; SANTOS, 2012) envolvendo

alguns processos oxidativos (XIAO et al., 2004) com a hipótese de que ele poderia agir diretamente sobre algum alvo antioxidante que ainda permanece desconhecido e, assim, reduzir os níveis de radicais livres (GERRARD; MALCOLM, 2007).

Em relação aos efeitos do MOD sobre o sistema dopaminérgico, as concentrações de fármaco após administração oral produzem uma substancial ação sobre o DAT e as concentrações plasmáticas são sustentadas por 6 a 8 horas, ocorrendo ocupação completa do DAT. Estas características poderiam ser ideais para a atividade tônica da DA, promovendo a vigília ao invés de intensificar a atividade dopaminérgica fásica a qual é responsável pelo reforço e uso abusivo (STAHL, 2014).

Tal como acontece com diversas drogas aditivas, os efeitos comportamentais do MOD têm sido estudados em modelos animais e em humanos. Estudos pré-clínicos evidenciam que o MOD pode exercer primariamente seus efeitos sobre a excitação neuronal através da interação com o DAT e, subsequentemente, aumentar a neurotransmissão dopaminérgica (MADRAS et al., 2006; KOROTRKOVA et al., 2007; QU et al., 2008; ZOLKOWSKA et al., 2009; FEDERICI et al., 2013) semelhantemente, mas com menor afinidade (MIGNOT et al., 1994), que a cocaína (RITZ et al., 1987). Um estudo com tomografia de emissão de pósitrons revelou que o MOD se liga a mais de 50% dos DAT e 44% dos NET no estriado de macacos (MADRAS et al., 2006). Um estudo com o uso de animais insensíveis à cocaína, demonstrou que o MOD potencializa os sinais dopaminérgicos no cérebro pela inibição do DAT e, dessa forma, poderia atuar no mesmo local de ligação da cocaína (FEDERICCI et al., 2013). Entretanto, Deroche-Gamonet *et al.* (2002) mostraram que sob um regime de diferentes doses (32-256 mg/kg, intraperitoneal, i.p.) o MOD não induziu PLC. Um recente estudo demonstrou que o pós-tratamento com MOD foi neurorestaurativo levando a um aumento da DA em neurônios dopaminérgicos estriatais em camundongos tratados com 1-metil-4fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) (ANDO et al., 2018).

Além disso, um estudo clínico, no qual foram avaliadas uma ampla gama de doses em adultos saudáveis e sem histórico de abuso de drogas, o MOD e a *d*-ANF produziram qualitativamente e quantitativamente efeitos semelhantes (MAKRIS et al., 2007). Já em um relato de caso, um paciente adulto com TDAH e que fazia o abuso de ANF quando passou a ser tratado com MOD apresentou melhora na

inatenção e hiperatividade assim como o paciente cessou o uso de ANF (MANN; BITSIOS, 2009).

Até o momento, os estudos com animais revelam resultados que muitas vezes são contraditórios sobre os efeitos comportamentais e neurobiológicos do MOD. Dessa forma, a pesquisa com roedores torna-se de grande importância na tentativa de elucidar os possíveis mecanismos desse medicamento.

2.8 ESTUDOS EXPERIMENTAIS NEUROFARMACOLÓGICOS EM ROEDORES

São crescentes os estudos que utilizam roedores em diferentes modelos animais para investigação do processo da adição elucidando efeitos comportamentais, neuroquímicos e fisiológicos (ARES-SANTOS et al., 2012; MOREIRA-SILVA et al., 2014), especialmente, os estudos no nosso grupo de pesquisa (ANTONIAZZI et al., 2014; KUHN et al., 2015a, 2015b, SEGAT et al., 2015, 2016; VEY et al. 2015; ROVERSI et al., 2016; MILANESI et al., 2017). Algumas drogas psicoativas utilizadas de forma abusiva devido a sua habilidade de agir como reforçadoras, como conseqüência, padrões comportamentais como a procura e administração da droga ocorrem para garantir o seu consumo. O reforço induzido por drogas é avaliado em animais de laboratório por diferentes métodos.

Nesse sentido, o teste da PLC pela droga, um paradigma clássico baseado no condicionamento estímulo-ambiente, tem sido empregado devido as suas inúmeras possibilidades de avaliações comportamentais e simplicidade de realização (SANCHIS-SEGURA; SPANAGEL, 2006; TZSCHENTKE, 2007). O teste da PLC emprega diferentes contextos ambientais que originalmente são neutros e após eles serem apresentados repetidamente na presença de uma substância com potencial abusivo como, por exemplo, a ANF, o animal passa a adquirir propriedades de reforço através da associação contexto ambiental-droga, estabelecendo a PLC relacionada à droga (EVERITT; ROBBINS, 2005).

Geralmente, o aparato da PLC consiste em uma caixa contendo três compartimentos. O compartimento neutro menor e outros dois compartimentos de tamanhos iguais, porém apresentando contextos ambientais diferentes. Um compartimento é associado com a administração da droga enquanto o outro é associado com a administração do veículo. Após o condicionamento, ou seja, repetidas exposições da droga pareada com o veículo (dose e duração de acordo

com a droga de escolha), o teste (livre de administração de droga ou veículo) é realizado, no qual o animal tem livre acesso aos compartimentos. Dessa forma, o tempo gasto no compartimento associado à droga é considerado como preferência pela droga e o tempo gasto no compartimento associado com o veículo é considerado como aversão pela droga (SANCHIS-SEGURA; SPANAGEL, 2006).

Diversas drogas aditivas apresentam diferente capacidade em produzir PLC. Enquanto os opiáceos e drogas psicoestimulantes produzem intensa PLC sob uma ampla gama de condições experimentais, outras drogas como o etanol, nicotina e canabinóides produzem resultados mais inconsistentes (CUNNINGHAM et al., 2003; TZSCHENTKE, 2007). Em geral, uma clara preferência é atingida quando as drogas são administradas imediatamente antes da exposição ao ambiente de contexto e quando a rota de administração garante rápida e altas concentrações cerebrais da droga (SANCHIS-SEGURA; SPANAGEL, 2006). Dessa forma o aparato da PLC torna-se uma ferramenta útil para a avaliação dos efeitos comportamentais frente à exposição a drogas de abuso.

3 JUSTIFICATIVA

O uso de fármacos psicoestimulantes têm se tornado frequente entre as pessoas saudáveis em busca de melhora da memória e das funções de cognitivas e entre pacientes com diagnósticos errôneos do TDAH, levando à exposição prolongada e desnecessária a esse tipo de fármaco. Sendo o MOD um fármaco psicoestimulante, torna-se importante avaliar a influência de seu uso durante a adolescência e se tal exposição pode predispor o indivíduo ao uso de drogas psicoativas como a ANF em diferentes períodos da vida.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência da exposição de doses repetidas ao MOD durante a adolescência sobre a preferência e recaída por ANF em diferentes períodos do desenvolvimento, além de seus efeitos comportamentais, bioquímicos e moleculares em áreas cerebrais envolvidas na adição em ratos machos.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Protocolo I:

Investigar a influência da administração de doses repetidas de MOD em animais adolescentes frente a parâmetros comportamentais e de estresse oxidativo em áreas cerebrais envolvidas na adição.

Protocolo II:

Avaliar a influência da administração de doses repetidas de MOD em animais adolescentes sobre a preferência por ANF na idade adulta mensurando:

- comportamentos de locomoção, ansiedade e memória após a retirada da droga;
- alterações no *status* oxidativo do hipocampo;
- parâmetros moleculares dopaminérgicos como DAT, D1R e D2R no hipocampo;
- níveis de BDNF, um indicador de sobrevivência e plasticidade neuronal, bem como seu precursor, pró-BDNF, e seu receptor Trk-B, no hipocampo.

Protocolo III:

Avaliar a influência da administração de doses repetidas de MOD sobre a preferência por ANF em animais adolescentes mensurando:

- comportamentos de ansiedade após a retirada da droga;
- alterações no *status* oxidativo na ATV e estriado;
- parâmetros moleculares dopaminérgicos como TH, DAT, D1R, D2R na ATV e estriado.

Protocolo IV:

Avaliar a influência do tratamento de doses repetidas com MOD sobre a recaída por ANF em animais adolescentes através da análise de:

- comportamentos de locomoção e memória;
- parâmetros moleculares dopaminérgicos como VMAT-2, DAT, D1R, D2R no estriado ventral;

- níveis de GDNF e BDNF, parâmetros moleculares indicadores de sobrevivência e plasticidade neuronal, bem como do precursor do BDNF (pró-BDNF) e de seu receptor Trk-B no estriado ventral.

5 METODOLOGIA

5.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos *Wistar* machos jovens, com 21 dias de idade, provenientes do biotério central da UFSM, mantidos em grupos de quatro animais por gaiolas plásticas com livre acesso a água e comida, em uma sala com temperatura controlada (22-23°C) e ciclo de 12h claro/ escuro (luzes acesas às 07:00h a.m.). Os animais foram manuseados de acordo com os princípios éticos de experimentação animal elaborados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O presente projeto foi aprovado pelo comitê de ética e bem-estar animal dessa universidade (UFSM/ CEUA n° 9429030215).

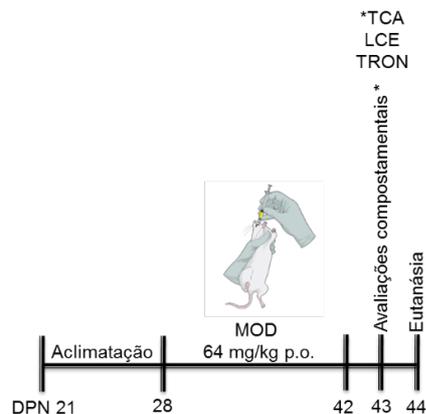
5.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os animais foram designados a diferentes protocolos experimentais conforme detalhamento abaixo.

5.2.1 Protocolo experimental I

Este estudo foi realizado como um piloto para avaliar os efeitos comportamentais e bioquímicos da administração de doses repetidas de MOD durante o período da adolescência (dia pós-natal, DPN 28-42) (TIRELLI; LAVIOLA; ADRIANI, 2003) (Figura 1). De acordo com a literatura, os estudos realizados com o MOD envolvem uma ampla gama de doses (SCORIELS; JONES; SAHAKIAN, 2012), enquanto que a dose utilizada nesse estudo foi escolhida devido ao fato de ser uma dose que foi administrada pela via oral em roedores e também por ser a dose correspondente a máxima dose utilizada em humanos (WONG et al., 1999; WATERS et al., 2005, TSANOV et al., 2010).

Figura 1 - Desenho experimental do Protocolo I. DPN: dia pós-natal; MOD: modafinil; TCA: teste do campo aberto; LCE: labirinto em cruz elevado; TRON: teste do reconhecimento do objeto novo.



Fonte: Autor.

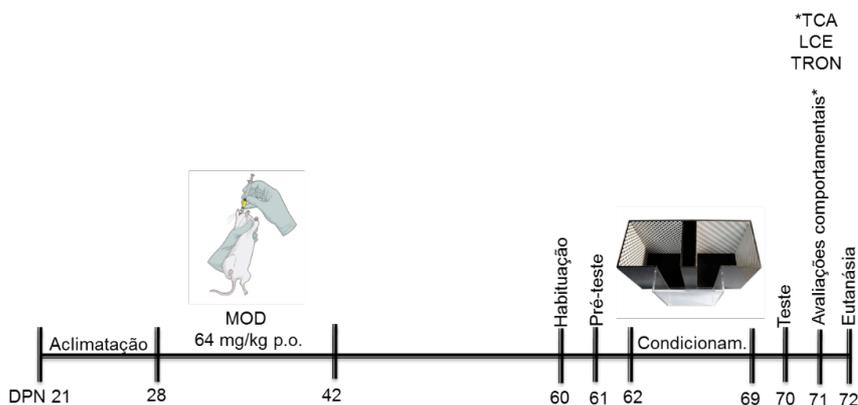
Foram utilizados ratos recém-desmamados (DPN 21, n=14), os quais após aclimação de 7 dias foram divididos em dois grupos: i) CONTROLE (grupo veículo, n=7, volume equivalente a MOD, p.o.) e ii) MOD (grupo modafinil, n=7, 64 mg/kg, 1 ml/kg, p.o.). Estes animais receberam uma dose diária de MOD (64 mg/kg, 1 ml/kg, p.o.) ou veículo por gavagem durante 14 dias consecutivos. No dia seguinte, estes animais foram submetidos a avaliações comportamentais do teste do campo aberto (TCA), labirinto em cruz elevado (LCE) e teste de reconhecimento do objeto novo (TRON) descrito nos itens 5.3.1, 5.3.2, 5.3.3. Vinte e quatro horas após as avaliações comportamentais, os animais foram anestesiados (tiopental, 50 mg/kg, 1 ml/kg, i.p.) e eutanasiados, o encéfalo foi dissecado em CPF, hipocampo, estriado e região da ATV para análises do *status* oxidativo conforme item 5.4.

5.2.2 Protocolo experimental II

Este estudo foi realizado para avaliar os efeitos da administração de doses repetidas de MOD durante a adolescência (DPN 28-42) frente a PLC por ANF na idade adulta (DPN 60) (Figura 2). Foram utilizados ratos recém-desmamados (DPN 21, n=28) que após aclimação de 7 dias foram divididos em dois grandes grupos: i) Controle (grupo veículo, n=14, volume equivalente MOD p.o.) e ii) MOD (grupo modafinil, n=14, 64 mg/kg, 1 ml/kg, p.o.) conforme protocolo de administração oral descrito anteriormente. Ao final do tratamento oral, esses animais não foram

manuseados até a idade adulta (DPN 60), exceto para pesagem semanal e limpeza das caixas.

Figura 2 - Desenho experimental do Protocolo II. DPN: dia pós-natal; MOD: modafinil; TCA: teste do campo aberto; LCE: labirinto em cruz elevado; TRON: teste do reconhecimento do objeto novo.



Fonte: Autor.

Aos 60 dias de idade, cada grande grupo de animais (Controle e MOD) foi subdividido gerando 4 sub-grupos experimentais para realização do protocolo da PLC por ANF conforme item 5.3.4: i) Controle (grupo controle (n=7): recebeu injeção de solução salina 0.9%, i.p., volume equivalente ao de ANF; ii) MOD (grupo modafinil (n=7): recebeu injeção de solução salina 0.9%, i.p., volume equivalente ao de ANF; iii) ANF (grupo anfetamina (n=7): recebeu ANF na dose de 4 mg/kg, 1 ml/kg, i.p. (ANTONIAZZI et al., 2014; KUHN et al., 2015a) e iv) MOD+ANF (grupo modafinil + anfetamina: recebeu ANF na dose de 4 mg/kg, 1 ml/kg, i.p.).

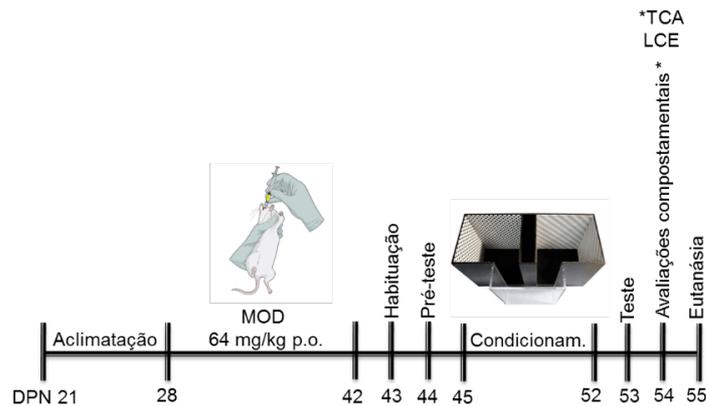
Um dia após o teste da PLC foram realizadas as análises comportamentais do TCA (item 5.3.1), LCE (item 5.3.2) e TRON (item 5.3.3). Vinte e quatro horas após as análises comportamentais, os animais foram anestesiados (tiopental, 50 mg/kg, 1 ml/kg, i.p.) e eutanasiados para a retirada do encéfalo, do qual foi dissecado o hipocampo (PAXINOS; WATSON, 2007) para determinação do *status* oxidativo (item 5.4) e para análises moleculares (item 5.5).

5.2.3 Protocolo experimental III

Para a avaliação dos efeitos da administração doses repetidas de MOD (DPN 28-42) frente a PLC por ANF na adolescência (Figura 3), foram utilizados ratos

recém-desmamados (DPN 21, n=28). Após aclimação de 7 dias, os animais foram divididos em dois grandes grupos: i) CONTROLE (grupo veículo, n=14, volume equivalente MOD, p.o.) e ii) MOD (grupo modafinil, n=14, 64 mg/kg, 1 ml/kg, p.o.) conforme protocolo de administração oral descrito anteriormente.

Figura 3 - Desenho experimental do Protocolo III. DPN: dia pós-natal; MOD: modafinil; TCA: teste do campo aberto; LCE: labirinto em cruz elevado.



Fonte: Autor.

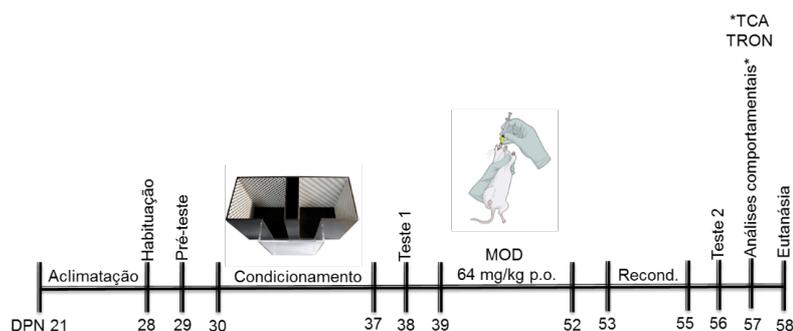
No DPN 43, cada grande grupo de animais (CONTROLE e MOD) foi subdividido gerando 4 sub-grupos experimentais para realização do protocolo da PLC por ANF conforme item 5.3.4.: i) Controle (grupo controle (n=7): recebeu injeção de solução salina 0.9%, i.p., volume equivalente ao de ANF; ii) MOD (grupo modafinil (n=7): recebeu solução salina 0.9%, i.p., volume equivalente ao de ANF; iii) ANF (grupo anfetamina (n=7): recebeu ANF na dose de 4 mg/kg, 1ml/kg, i.p.; iv) MOD+ANF (grupo modafinil + anfetamina: recebeu ANF na dose de 4 mg/kg, 1 ml/kg, i.p.).

Um dia após o teste de PLC, as análises comportamentais do TCA (item 5.3.1) e LCE (item 5.3.2) foram realizadas com os grupos experimentais. Vinte e quatro horas após a última observação comportamental, os animais foram anestesiados (isoflurano inalatório) e eutanasiados para remoção do encéfalo, do qual foram dissecados o estriado e a região da ATV (PAXINOS; WATSON, 2007). As estruturas cerebrais foram utilizadas para determinação do *status* oxidativo (item 5.4), como também para análises moleculares (item 5.5).

5.2.4 Protocolo experimental IV

Para a avaliação dos efeitos do tratamento de doses repetidas de MOD após a PLC por ANF já estabelecida na adolescência (Figura 4), foram utilizados ratos recém-desmamados (DPN 21, n=28). Após aclimação de 7 dias, os animais foram separados em dois grandes grupos, e submetidos ao protocolo de PLC conforme item 5.3.4: i) Controle (grupo controle, n=14, foi administrado solução salina 0.9%, i.p.), volume equivalente ao de ANF) e ii) ANF (grupo anfetamina, n=14, foi administrado solução de ANF na dose de 4 mg/kg, 1ml/kg, i.p.).

Figura 4 - Desenho experimental do Protocolo IV. DPN: dia pós-natal; MOD: modafinil; TCA: teste do campo aberto; TRON: teste do reconhecimento do objeto novo.



Fonte: Autor.

No DPN 39, cada grande grupo de animais (Controle e ANF) foi subdividido em 4 sub-grupos experimentais para o tratamento diário de MOD por gavagem, resultando nos seguintes grupos: i) Controle (grupo controle (n=7), recebeu veículo por gavagem, em volume equivalente ao de MOD; ii) MOD (grupo modafinil (n=7), recebeu solução de MOD na dose de 64 mg/kg, 1ml/kg, p.o.); iii) ANF (grupo anfetamina (n=7), recebeu veículo por gavagem em volume equivalente ao de MOD; e iv) ANF+MOD (grupo anfetamina + modafinil (n=7), recebeu solução de MOD na dose de 64 mg/kg, 1ml/kg, p.o.). O tratamento com MOD consistiu em uma administração diária durante 14 dias. No DPN 53, os animais foram recondicionados com ANF por 3 dias e no quarto dia foi realizado o teste da PLC por ANF (SEGAT et al, 2016).

Um dia após o teste da PLC foram realizadas com todos os 4 grupos experimentais as análises comportamentais do TCA (item 5.3.1) e TRON (item 5.3.3). Vinte e quatro horas após a última análise comportamental, os animais foram

anestesiados (isoflurano inalatório) e eutanasiados para a retirada do encéfalo, do qual foi dissecado o estriado ventral (PAXINOS; WATSON, 2007) para a realização das avaliações moleculares (item 5.5).

5.3 ANÁLISES COMPORTAMENTAIS

5.3.1 Teste do campo aberto (TCA)

O TCA avalia a atividade locomotora e exploratória dos animais. Cada rato foi colocado individualmente, durante 5 minutos, no centro de um aparato de madeira quadrangular de área de campo aberto nas dimensões de 40 x 40 x 30 cm, subdividido em nove quadrantes iguais conforme descrito por Kerr et al. (2005). Foram quantificados durante este período o número de cruzamentos (crossings, quadrados horizontais cruzados com as quatro patas) e o número de levantamentos (rearings, movimentos verticais) que são utilizados como medidas de atividade locomotora e comportamento exploratório, respectivamente. Além dessas avaliações, foi quantificado o número de cruzamentos no quadrante central e o número de *pellets* fecais que são utilizados como medidas adicionais de ansiedade (RAMOS; MORMEDE, 1988). O aparato foi limpo com uma solução de álcool 20% e toalhas de papel antes da introdução de cada animal.

5.3.2 Teste do labirinto em cruz elevado (LCE)

Esse teste se baseia no medo e/ou aversão inata que os roedores apresentam a espaços abertos e elevados avaliando respostas de ansiedade (PELLOW et al., 1985). O aparato de madeira é elevado a 50 cm do chão e consiste em 4 braços, dois braços opostos (50 x 10 cm) são fechados por paredes de 40 cm de altura, enquanto os outros dois braços não têm paredes. Os quatro braços possuem um ponto de intersecção, uma plataforma central (10 x 13,5 cm) que permite o acesso a qualquer um dos quatro braços. No início de cada ensaio, o rato é colocado na plataforma central voltado para um braço aberto para exploração do aparato por 5 minutos (min) (WALF; FRYE, 2007). O aparelho é limpo com uma solução de álcool etílico a 20% e toalhas de papel antes da introdução de cada animal.

Os comportamentos quantificados são o tempo gasto nos braços abertos e fechados; o número de entradas nos braços abertos e fechados; a exploração total (número de entradas em todos os braços do aparato) e, ainda, outra medida etológica avaliada é a frequência de mergulhos de cabeça (do inglês *head-dipping*, movimento exploratório de cabeça sobre os lados dos braços abertos em direção ao chão). A entrada em qualquer braço do aparato é definida quando o animal entra no braço com as quatro patas. A exploração total é calculada como o número de entradas em todos os braços do aparato (WALF; FRYE, 2007).

A partir dessas quantificações é realizado o cálculo do índice de ansiedade que integra as medidas comportamentais conforme segue:

$$\text{Índice de ansiedade} = 1 - [((\text{tempo gasto nos braços abertos} / \text{tempo total no aparato}) + (\text{número de entradas nos braços abertos} / \text{exploração total no aparato})) / 2]$$

Os valores do índice de ansiedade vão de 0 a 1, sendo que valores mais próximos de 1 expressam comportamento de ansiedade aumentado (COHEN et al., 2012).

5.3.3 Teste de reconhecimento do objeto novo (TRON)

Este teste é relacionado a motivação natural dos animais a explorar novidades, sendo considerado um instinto inato que o animal usa para reconhecer o ambiente (HELDT et al., 2007).

O TRON é conduzido no mesmo aparato do TCA e a memória de reconhecimento foi avaliada como previamente descrito por De Lima et al. (2005): o piso do aparato foi coberto com maravalha durante o teste de memória. No primeiro dia, os ratos tiveram uma sessão de treinamento na qual foram expostos a dois objetos idênticos (A1 e A2, brinquedos Lego®), que estavam posicionados em dois cantos adjacentes, 5 cm das paredes, e os ratos tiveram livre acesso para explorar o aparato e os objetos por 10 min (sessão de treinamento).

Uma hora após a sessão de treinamento é realizado o teste que avalia a memória de curto prazo (1h após o treinamento). Durante a sessão de teste, os ratos tiveram 5 min para explorar o aparato na presença de dois objetos: o objeto familiar A e um segundo novo objeto B, que estavam colocados na mesma posição da sessão de treinamento. Todos os objetos apresentavam texturas, cores e

tamanhos similares, mas diferentes formas (cilíndricas ou quadradas). Entre as sessões, os objetos foram limpos com uma solução de álcool 20%.

A exploração é definida como cheirar ou tocar o objeto com o nariz. Um índice de reconhecimento é calculado para cada animal e expressado pela razão $TN/(TF + TN)$ (TF = tempo gasto explorando o objeto familiar; TN = tempo gasto explorando o novo objeto).

5.3.4 Preferência de lugar condicionada com anfetamina

A PLC é um modelo animal usado para avaliar os efeitos hedônicos de drogas que causam dependência. O aparato da PLC consiste em uma caixa dividida em dois compartimentos de (45 x 45 x 50 cm) cada um com diferentes estímulos visuais, e ambos acessíveis a partir de uma área exterior retangular (18 x 36 x 50 cm) com piso e paredes lisas na cor cinza. Os compartimentos são iluminados indiretamente por luz incandescente (60W) e possuem equivalente intensidade de luz. Um compartimento possui piso liso e paredes brancas listradas, enquanto o outro compartimento possui piso listrado e paredes brancas lisas. O aparato foi limpo com álcool etílico 20% usando esponja e toalha de papel antes da inserção de cada animal.

A PLC com ANF foi realizada através das seguintes etapas: habituação, pré-teste, condicionamento e teste. Os animais são colocados por 15 min em cada compartimento para a habituação, totalizando 30 min. O objetivo deste procedimento é excluir o comportamento exploratório que é comum em novos ambientes durante as etapas posteriores (pré-teste e condicionamento) evitando, assim, interpretações equivocadas.

No dia seguinte, o tempo gasto pelos animais em cada compartimento é monitorado durante 15 min, o que é considerado o pré-teste. Esta etapa é realizada para determinar o lado em que o animal receberá a droga. A partir desses resultados, o compartimento em que cada rato passar mais tempo durante o pré-teste será definido como o compartimento preferido inicialmente, enquanto que o compartimento em que passar menos tempo será escolhido para o condicionamento com a droga. Os animais que durante a fase de pré-teste passam mais que 75% do tempo de exploração em um dos compartimentos, são excluídos (VAZQUEZ et al., 2006).

A etapa de condicionamento de preferência de lugar é conduzida por uma injeção diária da droga (ANF) durante 8 dias no compartimento onde cada animal permaneceu menos tempo durante o pré-teste, pareado com uma injeção de veículo (0,9% de NaCl), depois de um intervalo de 4 h (MARTIN; ITZHAK, 2000) no outro compartimento. Grupo controle, tratados com veículo, recebem duas injeções diárias de solução de 0,9% de NaCl em ambos os compartimentos da PLC em turnos alternados. Depois de cada administração da droga (ANF ou veículo), os ratos são imediatamente colocados e mantidos no interior do mesmo compartimento, durante 25 min. Este mesmo procedimento é realizado quatro horas mais tarde, quando todos os ratos recebem uma injeção de veículo, sendo mantido no interior do compartimento oposto por mais 25 min (CARLEZON et al., 2002).

Ao final da etapa de condicionamento, todos os animais são submetidos ao teste de 15 min sem a administração da droga ou veículo. Esta avaliação está relacionada à preferência pela droga (ANF) e é realizada 24 h após a última sessão de condicionamento. Os resultados são expressos como a porcentagem de tempo em que os animais de cada grupo experimental permanecem no compartimento associado com a ANF durante o período de abstinência.

Além da preferência pela ANF, é possível avaliar a recaída pela droga, ou seja, após a preferência pela droga já estar estabelecida, os animais recebem algum tipo de tratamento e é então realizado o re-condicionamento com a droga (ANF) por três dias, e no quarto dia os animais são submetidos ao teste de recaída pela droga (SEGAT et al., 2014).

5.4 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Parte do encéfalo foi dissecado em regiões específicas, as quais foram homogeneizadas com tampão Tris-HCl 10 mM (pH=7,4) na proporção 1:10 para as análises bioquímicas de avaliação do *status* oxidativo.

5.4.1 Determinação da atividade da catalase (CAT)

A atividade da CAT foi determinada de acordo com Aebi (1984), através do monitoramento da degradação do H₂O₂ no tecido estudado, mensurado

espectrofotometricamente em 240 nm. A atividade enzimática é expressa em Unidades (U)/ mg tecido (1 U decompõe 1 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min}$ em pH=7 a 25°C).

5.4.2 Determinação de espécies reativas (ER)

Os níveis de ER foram mensurados usando a 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCHF-DA), um oxidante fluorescente, segundo a metodologia de Hempel et al. (1999), onde a intensidade da fluorescência é diretamente proporcional à quantidade de ER no meio. A oxidação da DCHF-DA a diclorofluoresceína (DCF) fluorescente foi determinada a 488 nm para excitação e 525 nm para emissão. O conteúdo de proteína foi normalizado pela quantificação de acordo com Lowry et al. (1951). Os resultados são expressos em % do grupo controle.

5.4.3 Determinação da peroxidação lipídica

Determina-se a lipoperoxidação baseando-se na dosagem de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA). Segundo a metodologia de Ohkawa, Ohishi e Yagi (1979), esta técnica consiste em aquecer o material biológico com TBA, em meio ácido, e medir a formação de um produto de cor rósea, dosado espectrofotometricamente em 532 nm. Os resultados são expressos em nmol malondialdeído (MDA)/g tecido.

5.4.4 Determinação de proteína carbonilada (PC)

Conforme a metodologia de Yan et al. (1995), esta técnica baseia-se na reação da 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) com os grupos carbonila das proteínas. Como resultado obtém-se um cromógeno de cor amarela que pode ser dosado espectrofotometricamente em 370 nm e os resultados são expressos em nmol carbonila/ g tecido.

5.5 AVALIAÇÕES MOLECULARES POR WESTERN BLOT

Os tecidos foram homogeneizados em tampão de lise contendo 137mM NaCl, 20mM Tris-HCl pH=8,0, 1%NP40, 10%glycerol, 1mM fenilmetilsulfonilofluoreto

(PMSF), $10\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ aprotinina, 0,1mM cloreto de benzetônio e 0,5mM vanadato de sódio. Os homogenatos foram centrifugados a 12000g por 30 min e o sobrenadante utilizado para a dosagem da concentração total de proteínas de acordo com o kit MicroBCA (Pierce, IL, USA), utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

As amostras de proteína foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida de 8%-12%, de acordo com a proteína de interesse, e eletrotransferidas para membrana de PVDF (Millipore, MA, USA). Os locais de ligação não específicos foram bloqueados com solução de Tris tamponado com salina (TBS), $\text{pH}=7,6$, contendo 5% de leite seco sem gordura.

As membranas foram lavadas em tampão (0,05% Tween-20 in TBS) e depois incubadas com anticorpos primários: anti-GDNF (1:1000; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), anti-BDNF (1:500; sc-546, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) e (1:1000; Abcam, Cambridge, UK), anti-pro-BDNF (1:500; sc-546 Santa Cruz Biotechnology, CA, USA e 1:1000; Abcam, Cambridge, UK), anti-TrkB (1:500; sc-12, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) anti-tirosina hidroxilase (TH) (1:1000; sc-7847 Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), anti-VMAT-2 (1:1000; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), anti-DAT (1:500; sc-14002, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) anti-D1R (1:500; sc-14001, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) anti-D2R (1:500, sc-9113 Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) e anti-actina (1:2.000; sc-1616, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA e 1:50.000; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) seguidos pelos correspondentes anticorpos secundários conjugados a peroxidase sc-2020 ou sc-2054 (1:40.000; Santa Cruz Biotechnology).

A actina foi utilizada como controle interno de carregamento dos géis de tal forma que os dados são normalizados pelos seus valores. Após algumas lavagens com tampão, os imunocomplexos foram revelados por quimioluminescência usando ECL kit (GE Healthcare Life Sciences, NJ, USA) e visualizados em fotodocumentador. As bandas foram digitalizadas e quantificadas utilizando o software ImageJ.

5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram tabelados e expressos em média \pm desvio/erro padrão. No estudo piloto os dados foram analisados através de ANOVA de uma via seguido pelo teste *post hoc* de Tukey. Nas outras análises foi aplicado o teste de

Levene para a verificação da distribuição normal dos dados. Dados paramétricos foram analisados por ANOVA de uma ou duas vias seguido pelo teste *post hoc* de Tukey quando apropriado pelo software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versão 10. Valores de $p < 0.05$ são considerados estatisticamente significativos em todas as comparações feitas.

6 RESULTADOS

6.1 PROTOCOLO EXPERIMENTAL I

Influência da administração de doses repetidas de MOD durante a adolescência: estudo piloto

Resultados

Ganho de peso

A administração de doses repetidas de MOD durante o período da adolescência não alterou o ganho de peso semanal dos animais quando comparado com o grupo controle (dados não mostrados).

Atividade locomotora e exploratória

A administração de doses repetidas de MOD no período da adolescência não alterou a atividade locomotora e exploratória dos animais, as quais foram avaliadas no TCA.

Tanto os animais do grupo controle, quanto os do grupo MOD apresentaram locomoção semelhante (número de *crossings*) ($p=0,42$), assim como semelhante atividade locomotora vertical exploratória (número de *rearings*) ($p=0,54$). Além disso, ambos os grupos apresentaram resultados similares para o número de visitas ao centro do aparato ($p=0,73$) e número de *pellets* fecais ($p=0,84$), sendo esses dois parâmetros considerados indicativos de ansiedade (Figura 1).

Sinais de ansiedade

A administração de doses repetidas de MOD no período da adolescência não alterou os sinais de ansiedade avaliados no teste do labirinto em cruz elevada.

Tanto os animais do grupo controle, como os do grupo MOD não apresentaram resultados estatisticamente significativos no tempo de permanência nos braços abertos ($p=0,66$), no número de entradas nos braços abertos ($p=1,00$), no número de entradas totais ($p=0,59$), assim como no índice de ansiedade ($p=0,84$) (Figura 2).

Memória de curto prazo

A administração de doses repetidas de MOD no período da adolescência melhorou a memória recente dos animais, a qual foi avaliada no TRON ($F(1,12)=7,67$, $p=0,01$).

Os animais do grupo MOD apresentaram um maior índice de reconhecimento quando comparados com o grupo controle (Figura 3).

Avaliação do status oxidativo cerebral

A administração de MOD durante 14 dias no período da adolescência causou alterações no *status* oxidativo em diferentes áreas cerebrais dos animais.

Na ATV, o grupo MOD apresentou um aumento na atividade da CAT ($F(1,12)=171,57$, $p=0,00$), nenhuma alteração na geração de ER junto com uma redução da peroxidação lipídica ($F(1,12)=25,56$, $p=0,00$) e aumento na carbonilação de proteínas ($F(1,12)=13,45$, $p=0,00$), (Figura 4A-B).

No estriado, o grupo MOD apresentou atividade da CAT aumentada ($F(1,12)=40,60$, $p=0,00$), maior geração de ER ($F(1,12)=7,43$, $p=0,01$) e menor carbonilação de proteínas ($F(1,12)=19,09$, $p=0,00$), sem alteração dos níveis de peroxidação lipídica (Fig. 5A-B).

No CPF, o grupo MOD apresentou atividade da CAT aumentada ($F(1,12)=84,28$, $p=0,00$), diminuição da geração de ER ($F(1,12)=7,56$, $p=0,01$) e menor carbonilação de proteínas ($F(1,12)=25,70$, $p=0,00$), sem alterar os níveis de peroxidação lipídica (Fig. 6A-B).

No hipocampo, o MOD não exerceu influências significativas quando comparado com os animais do grupo controle nos mesmos parâmetros avaliados (Fig 7A-B).

Discussão

A partir dos resultados preliminares obtidos neste estudo piloto, podemos verificar que a administração de doses repetidas de MOD na dose de 64mg/kg (corresponde a dose máxima utilizada por humanos) (TSANOV et al., 2010) em ratos *Wistar* machos adolescentes, durante 14 dias não alterou o ganho de peso dos animais, a atividade locomotora ou sinais de ansiedade. Entretanto foi capaz de melhorar a memória de curto prazo.

Em relação ao *status* oxidativo cerebral, o MOD apresentou distintas influências, de acordo com a área cerebral avaliada. Entretanto, uma alteração que pôde ser observada em todas as áreas avaliadas, com exceção do hipocampo, foi o aumento na atividade da CAT, uma enzima que atua na defesa antioxidante (BERK et al., 2011). Já nos marcadores de danos oxidativos, no geral, podemos dizer que o MOD reduziu esses marcadores ou não causou alterações significativas, desde que, apenas duas áreas avaliadas não mostraram tal benefício.

Deste modo, este estudo piloto mostrou que o MOD exerceu influência sobre a memória recente dos animais, como também sobre o *status* oxidativo em distintas áreas cerebrais avaliadas. Visto que apenas alguns estudos descrevem os efeitos do MOD sobre a via do estresse oxidativo (XIAO et al., 2004; ORNELL et al., 2014), tais observações apresentam importante aspecto frente à adição.

Referências

BERK, M. et al. Pathways underlying neuroprogression in bipolar disorder: Focus on inflammation, oxidative stress and neurotrophic factors. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**. v. 35, p. 804-817, 2011.

ORNELL, F. et al. Modafinil effects on behavior and oxidative damage parameters in brain of Wistar rats. **Behavioural Neurology** v. 917246, p. 1–7, 2014.

TSANOV, M. et al. The psychostimulant modafinil facilitates water maze performance and augments synaptic potentiation in dentate gyrus. **Neuropharmacology**. v. 59, p. 9-19, 2010.

XIAO, Y. L. et al., Neuroprotective mechanism of modafinil on Parkinson disease induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. **Acta Pharmacologica Sinica**. v. 25, p. 301-305, 2004.

FIGURAS

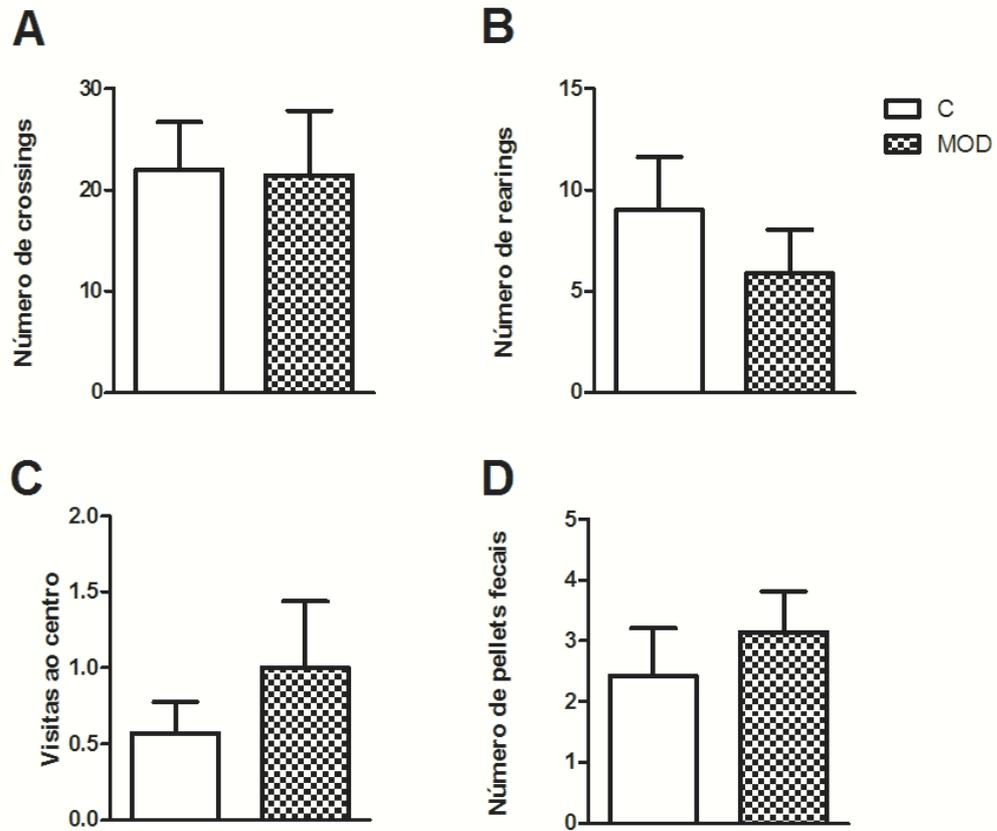


Figura 1. Influência da administração de doses repetidas de modafinil sobre a atividade locomotora dos animais. Número de *crossings* (A), número de *rearings* (B), número de visitas ao quadrante central (C), número de *pellets* fecais (D). Dados são expressos como média \pm media do desvio padrão. $p < 0.05$. C: grupo controle; MOD: grupo modafinil.

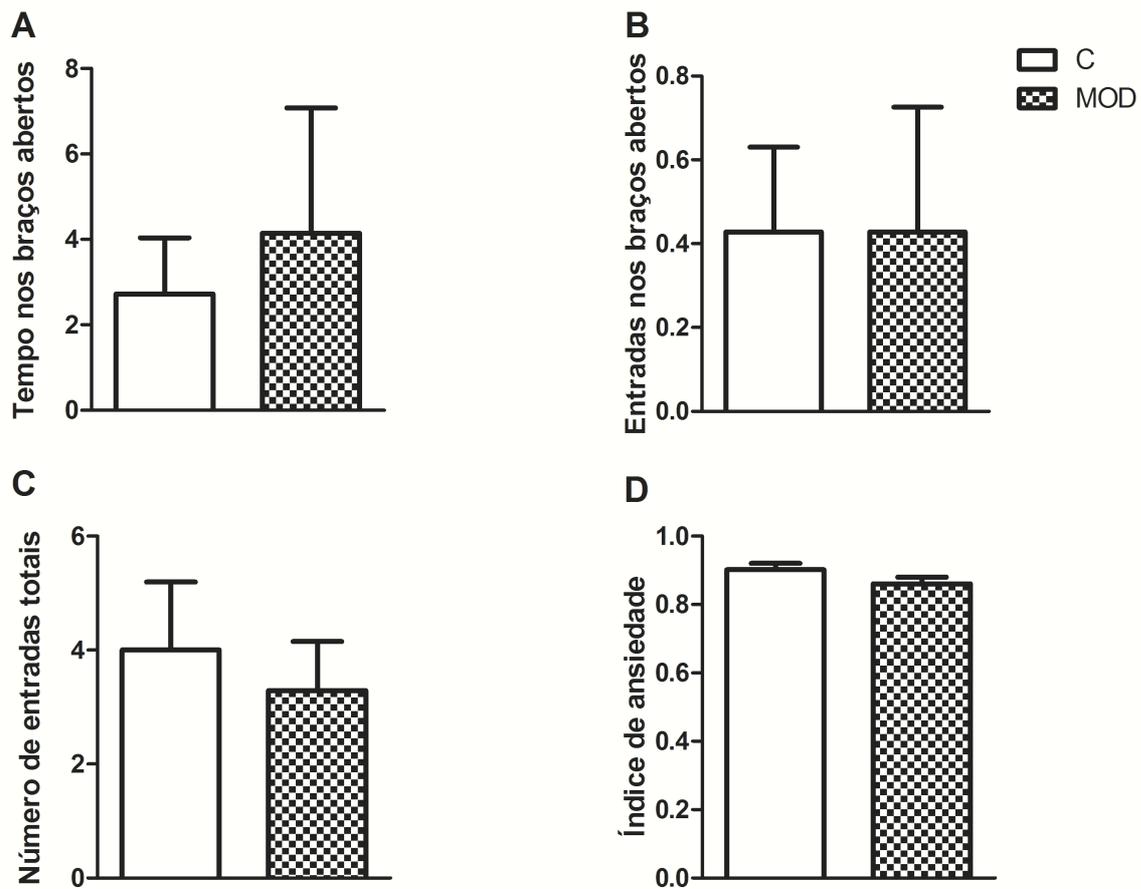


Figura 2. Influência da administração de doses repetidas de modafinil sobre sinais de ansiedade dos animais. Tempo gasto nos braços abertos (segundos) (A), número de entradas nos braços abertos (B), número de entradas totais nos braços abertos e fechados (C), índice de ansiedade (D). Dados são expressos como média \pm media do desvio padrão. $p < 0.05$. C: grupo controle; MOD: grupo modafinil.

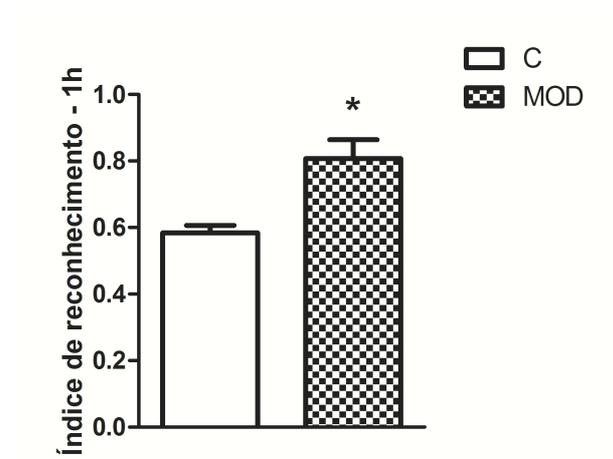


Figura 3. Influência da administração de doses repetidas de modafinil sobre a memória de curto prazo dos animais. Dados são expressos como média \pm media do desvio padrão. $p < 0.05$. C: grupo controle; MOD: grupo modafinil.

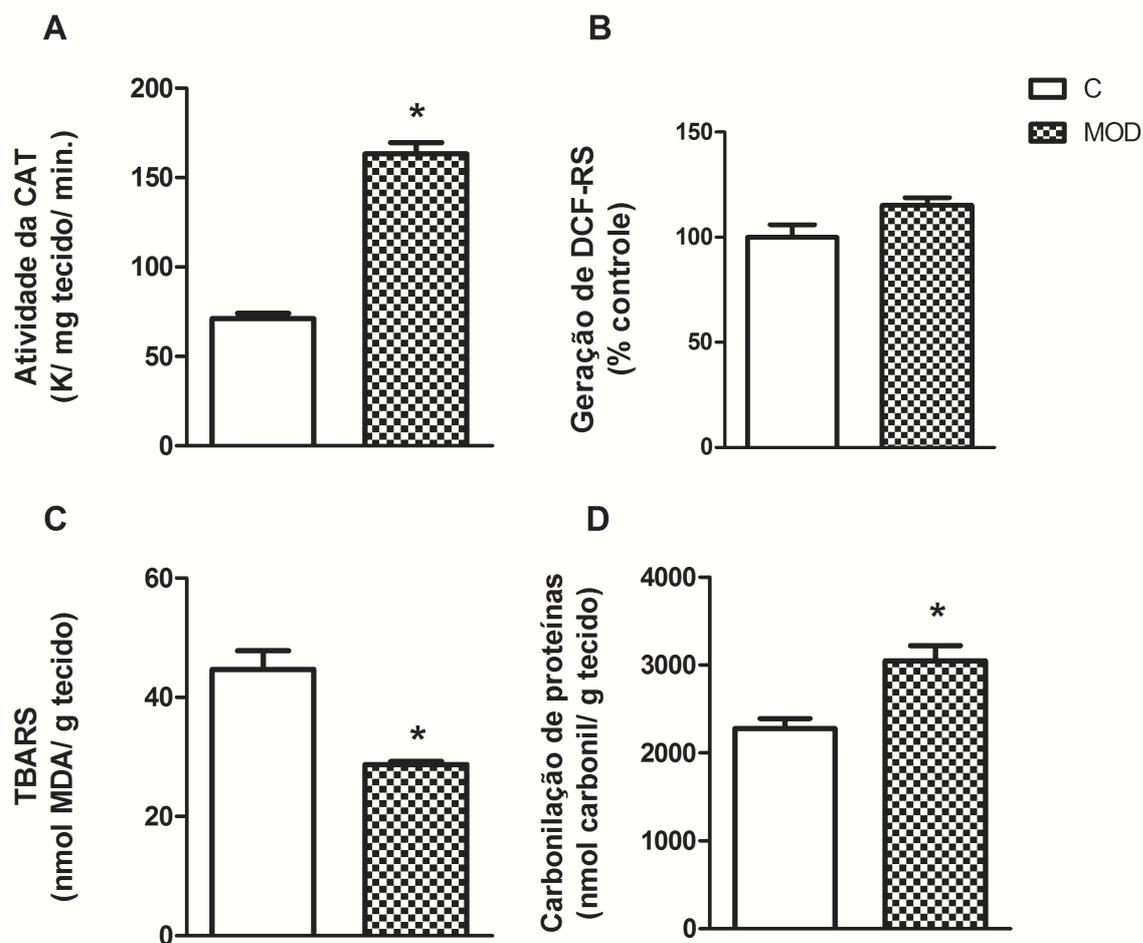


Figura 4. Influência da administração de doses repetidas de modafinil sobre o *status* oxidativo da area tegmental ventral. Atividade da catalase (A), geração de espécies reativas (B), peroxidação lipídica (C), carbonilação de proteínas (D). Dados são expressos como média \pm media do desvio padrão. * Indica diferença significativa do grupo controle. $p < 0.05$. C: grupo controle; MOD: grupo modafinil; CAT: catalase; DCF-RS: 2'7'-diclofluoresceinadiacetato; TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.

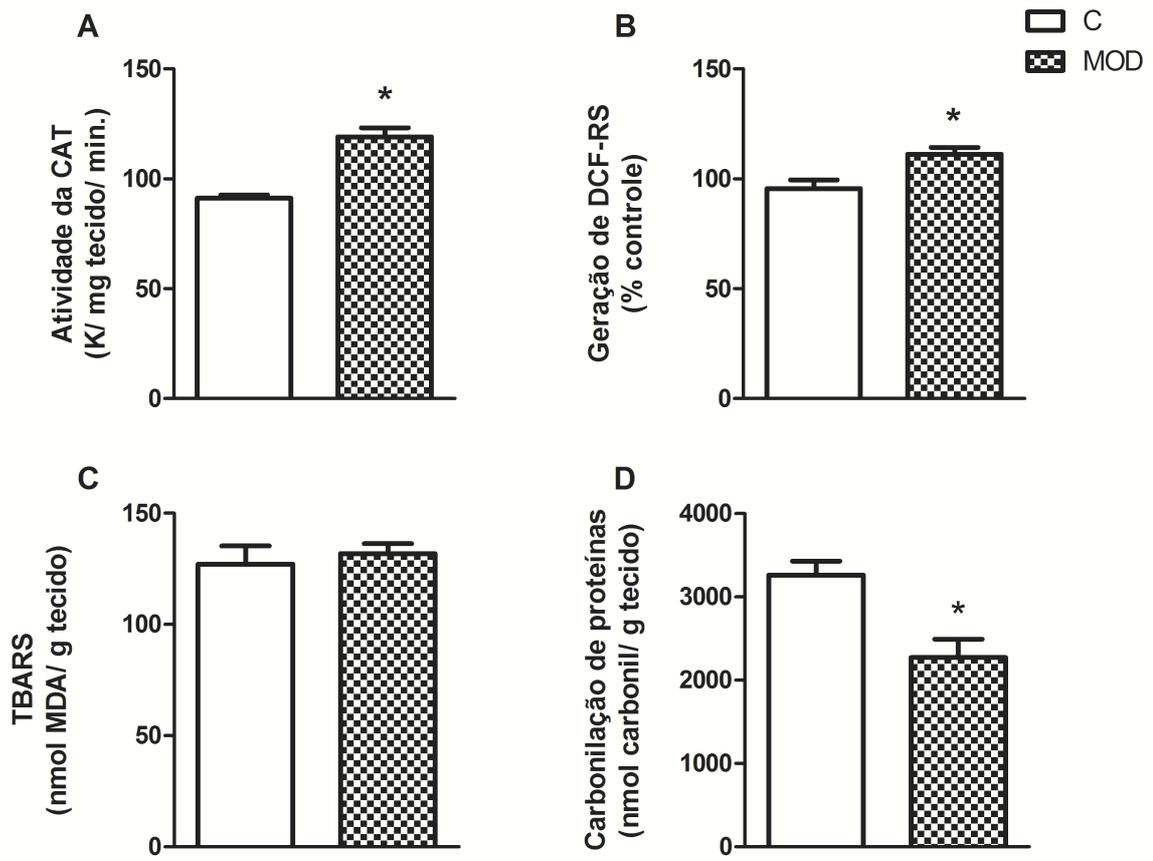


Figura 5. Influência da administração de doses repetidas de modafinil sobre o *status* oxidativo do estriado. Atividade da catalase (A), geração de espécies reativas (B), peroxidação lipídica (C), carbonilação de proteínas (D). Dados são expressos como média \pm media do desvio padrão. * Indica diferença significativa do grupo controle. $p < 0.05$. C: grupo controle; MOD: grupo modafinil; CAT: catalase; DCF-RS: 2'7'-diclofluoresceinadiacetato; TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.

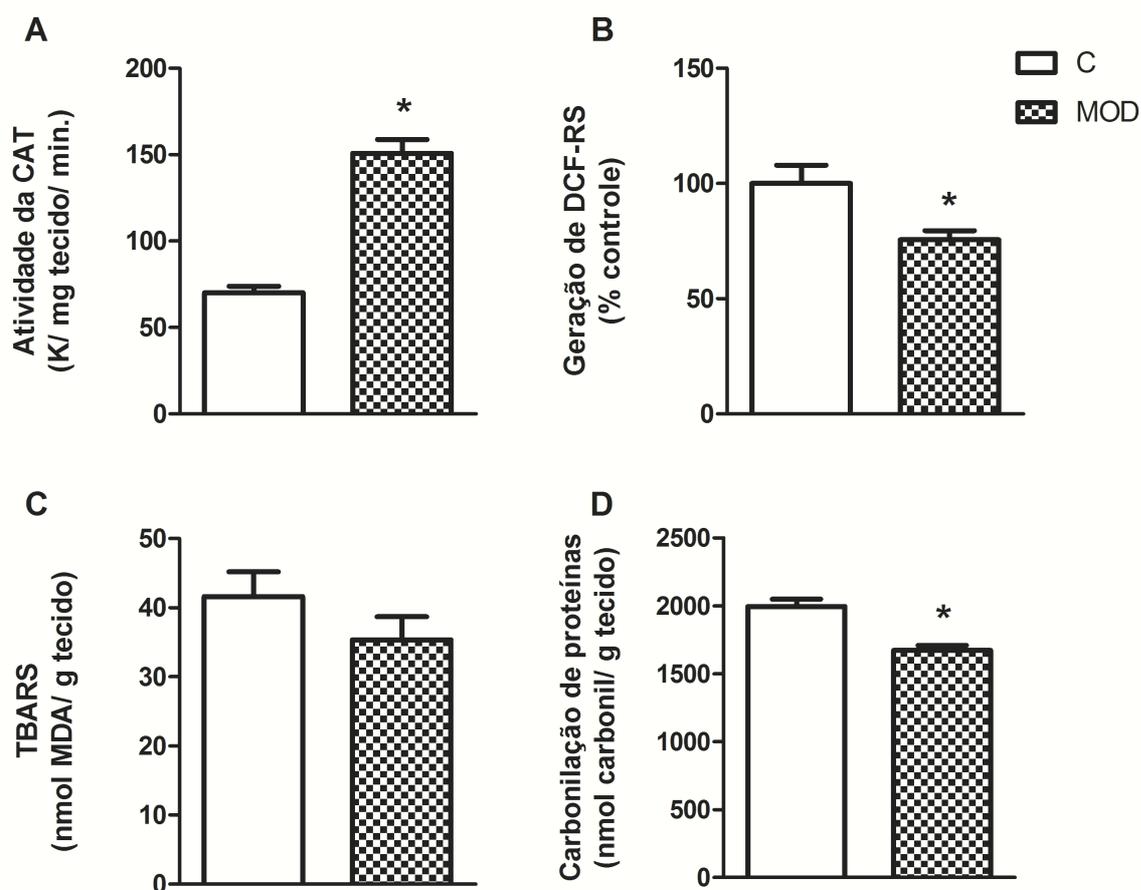


Figura 6. Influência da administração de doses repetidas de modafinil sobre o *status* oxidativo do córtex pré-frontal. Atividade da catalase (A), geração de espécies reativas (B), peroxidação lipídica (C), carbonilação de proteínas (D). Dados são expressos como média \pm media do desvio padrão. * Indica diferença significativa do grupo controle. $p < 0.05$. C: grupo controle; MOD: grupo modafinil; CAT: catalase; DCF-RS: 2'7'-diclofluoresceinadiacetato; TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.

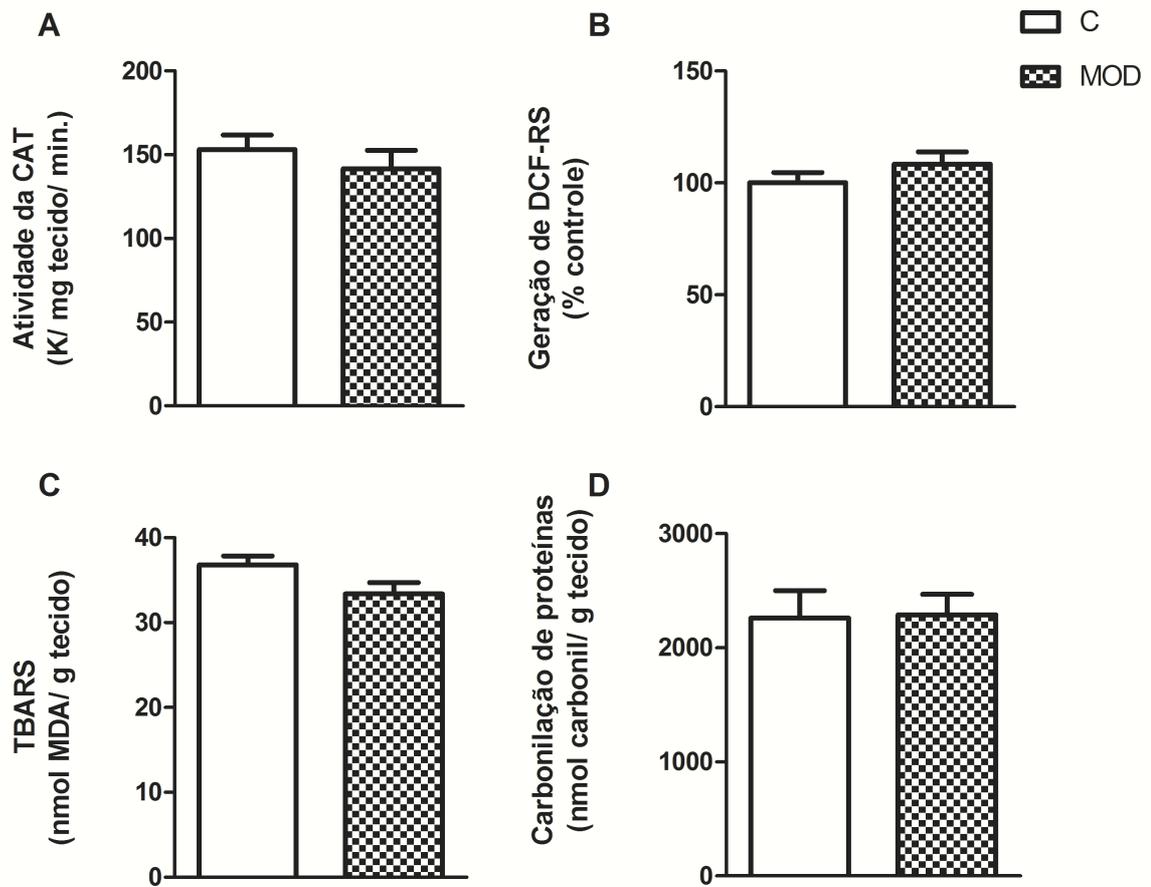


Figura 7. Influência da administração de doses repetidas de modafinil sobre o *status* oxidativo do hipocampo. Atividade da catalase (A), geração de espécies reativas (B), peroxidação lipídica (C), carbonilação de proteínas (D). Dados são expressos como média \pm media do desvio padrão. * Indica diferença significativa do grupo controle. $p < 0.05$. C: grupo controle; MOD: grupo modafinil; CAT: catalase; DCF-RS: 2'7'-diclofluoresceinadiacetato; TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.

6.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL II



RightsLink®

Home

Account
Info

Help



Title: Could Modafinil Prevent Psychostimulant Addiction? An Experimental Study in Rats

Author: Verônica Tironi Dias, Luciana Taschetto Vey, Higor Zuquetto Rosa, Lívia Ferraz D'Avila, Raquel Cristine Silva Barcelos, Marilise Escobar Burger

Publication: Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology

Publisher: John Wiley and Sons

Date: Jul 10, 2017

Logged in as:
Veronica Tironi Dias
Account #:
3000968517

[LOGOUT](#)

© 2017 Nordic Association for the Publication of BCPT
(former Nordic Pharmacological Society)

Order Completed

Thank you for your order.

This Agreement between Veronica Tironi Dias ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

Your confirmation email will contain your order number for future reference.

[printable details](#)

License Number	4234840826483
License date	Nov 23, 2017
Licensed Content Publisher	John Wiley and Sons
Licensed Content Publication	Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology
Licensed Content Title	Could Modafinil Prevent Psychostimulant Addiction? An Experimental Study in Rats
Licensed Content Author	Verônica Tironi Dias, Luciana Taschetto Vey, Higor Zuquetto Rosa, Lívia Ferraz D'Avila, Raquel Cristine Silva Barcelos, Marilise Escobar Burger
Licensed Content Date	Jul 10, 2017
Licensed Content Pages	9
Type of use	Dissertation/Thesis
Requestor type	Author of this Wiley article
Format	Electronic
Portion	Full article
Will you be translating?	No
Title of your thesis / dissertation	INFLUÊNCIA DA EXPOSIÇÃO AO MODAFINIL DURANTE A ADOLESCÊNCIA SOBRE A PREFERÊNCIA POR DROGAS DE ABUSO EM RATOS ADULTOS
Expected completion date	Nov 2019
Expected size (number of pages)	200
Requestor Location	Veronica Tironi Dias Rua Josué Guimarães, 90 Itaara, RS 97185000 Brazil Attn: Veronica Tironi Dias
Publisher Tax ID	EU826007151
Customer VAT ID	BR1094450952
Billing Type	Invoice
Billing address	Veronica Tironi Dias Rua Josué Guimarães, 90 Itaara, Brazil 97185000 Attn: Veronica Tironi Dias
Total	0.00 USD

Could Modafinil Prevent Psychostimulant Addiction? An Experimental Study in Rats

Verónica Tironi Dias¹, Luciana Taschetto Vey², Higor Zuquetto Rosa³, Lívia Ferraz D'ávila¹, Raquel Cristine Silva Barcelos¹ and Marilise Escobar Burger^{1,2,3}

¹Graduate Program of Pharmacology, Federal University of Santa Maria (UFSM) - RS, Santa Maria, Brazil, ²Graduate Program in Biological Sciences: Toxicological Biochemistry, Federal University of Santa Maria (UFSM) - RS, Santa Maria, Brazil and ³Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Santa Maria (UFSM) - RS, Santa Maria, Brazil

(Received 25 April 2017; Accepted 23 May 2017)

Abstract: Addiction is a serious health problem which leads to general social impairment. The period of adolescence plays a significant role in drug abuse liability. Psychostimulants, such as modafinil (MOD), are majorly used by teenagers seeking improvements in cognition, which contributes to its indiscriminate use. This study aimed to investigate the influence of MOD (64 mg/kg by gavage, once a day) treatment during adolescence [post-natal day (PND) 28-42] on amphetamine (AMPH, 4 mg/kg i.p.)-conditioned place preference (CPP) in early adulthood (PND 60). Our findings showed that AMPH increased CPP for the drug and anxiety-like behaviours; on the other hand, AMPH decreased the number of crossings and recognition index. In addition, AMPH decreased catalase activity and increased reactive species, malondialdehyde and carbonyl protein levels in the hippocampus. AMPH also increased pro-brain derived neurotrophic factor (BDNF), tyrosine kinase receptor B, dopamine transporter, D1R and decreased BDNF and D2R immunoreactivity. Contrarily, animals pre-exposed to MOD showed reduced AMPH-CPP, no locomotor impairment, less anxiety-like behaviours and no memory deficits. In addition, MOD showed antioxidant activity by preventing AMPH-induced oxidative damage in the hippocampus. Moreover, molecular analysis showed that MOD was able to modulate the hippocampal dopaminergic system, thus preventing AMPH-induced impairments. Animals that received MOD during adolescence showed reduced AMPH-CPP in early adulthood. These unexpected behavioural effects of MOD on CPP could be due to its hippocampal dopaminergic system modulation, mainly by its action on D1R, which is closely linked to drug addiction. Nevertheless, further studies are necessary.

The use of prescription stimulant drugs has gained popularity worldwide especially among healthy people [1,2]. Brazil emerges as fifth in the annual prevalence of misuse of prescription stimulants, according to the World Drug Report [3]. The high percentage of healthy individuals using stimulant drugs for cognitive enhancement suggests that most people are seeking for memory benefits [4]. Thus, outweighing that in some cases of short or long-term use may trigger or exacerbate mental illnesses such as anxiety, depression, psychosis and even addiction [5-7].

Drug abuse and addiction remain considerable health problems [2,8], and there is substantial evidence that the use of addictive drugs can cause dependence problems more quickly when their use starts before adulthood, mainly with the use of psychostimulant drugs [9]. During adolescence, the brain undergoes continuous changes [10] and studies state behavioural implications of this fact [11,12]. Some behaviours are common during this period, including the urge for new experiences overbalancing risks, what may increase tendencies to experiment drugs [2]. Therefore, when individuals achieve the addictive state, they keep making poor choices despite the negative consequences [13].

Author for correspondence: Marilise Escobar Burger, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil (e-mail marilise.burger@ufsm.br).

Regarding drug abuse reward, dopamine (DA) is a crucial neurotransmitter involved. The reward system is a product of DA pathway, which connects the ventral tegmental area of the midbrain to the limbic system, and involves the nucleus accumbens, the amygdala, the hippocampus and the medial prefrontal cortex [14]. The imbalance between dopaminergic circuits that underlie reward, conditioning and executive functions such as emotional control and decision-making, is thought to contribute to compulsive drug use and loss of control in addiction [15,16].

From this point of view, modafinil (2-[(Diphenylmethyl) sulfinyl] acetamide) (MOD) is a psychostimulant of the non-amphetamine (AMPH) type, approved by the U.S. Food and Drug Administration (FDA) to treat narcolepsy [17]. Also, it has been used 'off-label' as a cognitive enhancer in other neuropsychiatric conditions [18,19] as well as for the treatment of substance disorders [20]. The MOD mechanism of action is poorly understood and appears to involve multiple neurotransmitter systems resulting in a wide range of neurological effects [6,21]. Taken together, current evidence suggests that MOD can act as a weak dopamine transporter (DAT) inhibitor binding to the DAT, increasing extracellular DA levels in synapses [7,22,23]. Also, some studies have shown that MOD exerts antioxidant activity in some brain areas such as the striatum [19,24,25].

This study was designed to investigate whether MOD administration in healthy adolescent rats could lead to AMPH

preference during early adulthood and whether it could have influence on behaviour. Hippocampal oxidative status and molecular targets related to addiction in the dopaminergic system were also assessed.

Materials and Methods

Animals. Young male Wistar rats, weighing approximately 100–150 g, were used in the procedures. They were housed at four per cage with free access to food and water in a room with controlled temperature ($23 \pm 1^\circ\text{C}$), on a 12-hr light/12-hr dark cycle with lights turned on at 7 a.m. throughout the experimental period. The procedures with animals were approved by the Research Ethics Committee of Universidade Federal de Santa Maria (UFSM-9429030215), which is affiliated to the National Council for the Control of Animal Experiments (CONCEA), following international norms of care and animal maintenance.

Experimental design. One week after acclimatization, rats [post-natal day (PND) 28, $n = 28$] were divided into two experimental groups: control group (received vehicle, $n = 14$) and MOD group (received MOD, $n = 14$, at a dose of 64 mg/kg) [26]. The treatment was given by gavage once a day for 14 days (PND 28–42). These animals were not disturbed until early adulthood, except for weekly weighing and cleaning of cages. On PND 60, animals were submitted to the conditioned place preference (CPP) paradigm, when they were subdivided and half of each group was injected with saline (0.9% NaCl solution) or AMPH (4 mg/mL i.p.) [27] resulting in the following groups: control group, MOD group, AMPH group and MOD + AMPH group. One day after the CPP test, locomotor, anxiety-like and memory behaviours were assessed. Twenty-four hours after the behavioural assessments, the rats were anaesthetized followed by exsanguination, and their hippocampus was dissected for biochemical and molecular analysis.

Drugs. MOD (Stavigile; Libbs, São Paulo, Brazil) tablets (200 mg/tablet) were thoroughly pulverized by sonication in distilled water, and DMSO was subsequently added to this suspension to form the administered treatment mixture. This mixture was administered by gavage. The dose of 64 mg/kg [26] reflects concentrations of a high effective dose, for human beings [28].

The D, L-amphetamine dose (Merck, Darmstadt, Germany), 4 mg/mL, i.p. known for inducing CPP, was chosen based on previous studies by our group [27].

Behavioural assessments.

Conditioned place preference. The CPP paradigm is widely used in rodents as a model to assess the hedonic effects of addictive drugs. The CPP apparatus consists of a box with two compartments of equal size ($45 \times 45 \times 50$ cm) and different visual stimuli (one compartment had a smooth white floor and striped walls, while the other had a striped floor and smooth white walls). Both compartments were accessible through a central compartment ($18 \times 36 \times 50$ cm) separated by manual guillotine doors. The AMPH-CPP was performed through the following steps: habituation, pre-test, conditioning and test.

Habituation was conducted at PND 60 when the animals were placed for 15 min. in each compartment, totalling 30 min. The purpose of this procedure was to exclude exploratory behaviour that is common in new environments, thus avoiding misinterpretations.

The pre-test was conducted on the following day (PND 61) when animals were placed in the central CPP compartment with free access to the entire apparatus. The time spent by the animals in each compartment was monitored for 15 min. This step was carried out to

determine initial chamber preference. From these results, the compartment in which each rat spent more time during the pre-test was defined as the initially preferred side, whereas the compartment in which it spent less time was chosen for AMPH conditioning.

The conditioning step (PND 62–69) was carried out by one daily injection of AMPH for 8 days in the compartment where each animal spent less time during the pre-test, paired with vehicle (0.9% NaCl), after a 4-hr interval, in the other compartment. Saline-treated groups received two daily injections of NaCl solution in both compartments of the CPP in alternated turns. After each AMPH/saline injection, rats were immediately placed inside the compartment for 25 min. [29].

On PND 70, all animals were submitted to the test for 15 min., without drug/vehicle administration. Results were expressed as the percentage of time animals of each experimental group remained in the compartment associated with AMPH during the abstinence period.

Open-field test. The open-field (OF) test was used to assess the locomotor activity of rats. Each animal was placed individually in the centre of an arena ($40 \times 40 \times 30$ cm) enclosed by black matte walls and floor divided into squares, as described by Kerr *et al.* [30]. The number of crossings (horizontal squares crossed with four paws) was recorded for 5 min.

Elevated plus maze. The elevated plus maze (EPM) test was used to assess the anxiety-like behaviour. The apparatus consisted of a platform elevated 50 cm from the floor. Forty-centimetre-high (40 cm) walls enclosed two opposite arms (50×10 cm) whereas the other two arms had no walls. All arms had a central intersection (10×10 cm). At the beginning of the test, the rat was placed in the central intersection facing the open arm. The entries number and time spent in the open arms and the total arm entries were evaluated for 5 min. Also, the anxiety index was calculated as

$$\text{Anxiety index} = 1 - \left[\frac{\text{Time spent in open arms}}{\text{Total time in the maze}} + \frac{\text{Number of entries in open arms}}{\text{Total exploration in the maze}} \right] / 2.$$

Anxiety index values range from 0 to 1, where an increase in the index expresses increased anxiety-like behaviour [31].

Novel object recognition task. The Novel object recognition task (NORT) task was used to assess memory [32]. The first step was the training session in which rats were exposed to two identical objects (A1 and A2, double Lego toys) positioned in two adjacent corners, and they were allowed to freely explore the objects for 10 min. The short-term memory test was performed 1 hr after the training session and the animals were allowed to freely explore the arena for 5 min. in the presence of two objects: a familiar object A and a second novel object B, placed at the same locations as in the training session. The objects had similar textures, colours and sizes but distinctive shapes. Every time the rats sniffed at or touched the object with the nose, it was defined as exploration. A recognition index was calculated by the ratio time spent exploring the novel object/time spent exploring the familiar object + time spent exploring the novel object.

Tissue preparation. On PND 72, animals were anaesthetized with thiopental (50 mg/kg i.p.) and killed. Part of the hippocampal tissue was homogenized with 10 mM Tris-HCl buffer (pH = 7.4) for biochemical analysis and the rest was stored at -80°C to perform molecular analysis.

Biochemical analysis.

Catalase activity. The enzyme activity was spectrophotometrically quantified by the method of Aebi [33], which is based on monitoring

the disappearance of hydrogen peroxide (H₂O₂) at 240 nm. The enzymatic activity was expressed in $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{g tissue}$.

Reactive species levels. Reactive species (RS) levels were measured using the 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCHF-DA) [34]. The oxidation of DCHF-DA to fluorescent dichlorofluorescein (DCF) was determined at 488 nm for excitation and 525 nm for emission. An aliquot of 10 μM of DCHF-DA in ethanol was added to the supernatants, and the fluorescence intensity from DCF was measured for 300 s and expressed as a percentage of control group. The RS levels were normalized by protein content [35].

Protein carbonyl quantification. The damage to proteins was quantified by the method of Yan *et al.* [36], with some alterations. Soluble protein was mixed with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH; 10 mM in 2 M HCl) or HCl (2 M) and incubated at room temperature for 1 hr. Denaturing buffer (150 mM sodium phosphate buffer, pH 6.8, with 3% sodium dodecyl sulphate), ethanol (99.8%) and hexane (99.5%) were added, being mixed by shaking and centrifuged. The protein isolated from the interface was washed twice with ethyl acetate/ethanol 1:1 (v/v) and suspended in denaturing buffer. Each DNPH sample was read at 370 nm in a spectrophotometer against the corresponding HCl sample (blank). The results were expressed as nmol carbonyl/g tissue.

Lipid peroxidation estimation. Lipid peroxidation (LP) was assessed by thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) [37]. TBARS assay estimates the LP and was determined through the pink chromogen produced by the reaction of thiobarbituric acid (TBA) with malondialdehyde (MDA) at 100°C, measured spectrophotometrically at 532 nm. Results were expressed as nmol MDA/g tissue.

Molecular assays. Tissue was homogenized in a lysis buffer, and homogenates were then centrifuged [38]; supernatants were collected, and total protein concentration was determined according to the MicroBCA procedure (Pierce, Illinois, USA). Briefly, protein samples were separated by electrophoresis in an 8%, 10% or 12.5% polyacrylamide gel and electrotransferred to a PVDF membrane. Non-specific binding sites were blocked overnight in Tris-buffered saline (TBS) at 4°C, with 2% BSA and 0.1% Tween-20. Membranes were rinsed in buffer (0.05% Tween-20 in TBS) and then incubated with primary antibodies: anti-actin (1:1000; Santa Cruz Biotechnology Cat# sc-1616 also sc-1616-R RRID:AB_630836, Dallas, USA), anti-DAT (1:500; Santa Cruz Biotechnology Cat# sc-14002 RRID:AB_2190287), anti-dopamine receptor D1 (D1R) (1:500; Santa Cruz Biotechnology Cat# sc-14001 RRID:AB_2094835), anti-dopamine receptor D2 (D2R) (1:500; Santa Cruz Biotechnology Cat# sc-9113 RRID:AB_2094973), anti-tyrosine kinase receptor B (Trk-B) (1:500; Santa Cruz Biotechnology Cat# sc-12 RRID:AB_632557), anti-brain derived neurotrophic factor (BDNF) (1:500; Santa Cruz Biotechnology Cat# sc-546 RRID:AB_630940), anti-pro-BDNF (1:500; Santa Cruz Biotechnology Cat# sc-546 RRID:AB_630940) followed by anti-goat or anti-rabbit (1:40,000; Santa Cruz Biotechnology Cat# sc-2020 RRID:AB_631728 and Santa Cruz Biotechnology Cat# sc-2054 RRID:AB_631748) IgG horseradish peroxidase conjugate. Immunocomplexes were visualized by chemiluminescence using ECL kit (GE Healthcare Life Sciences, New Jersey, USA). The film signals were digitally scanned and then quantified using the ImageJ software (Bethesda, Maryland, USA). Actin was used as an internal control, and data were standardized according to its values.

Statistical analysis. Data were expressed as the mean \pm standard error (S.E.M.) and analysed by two-way ANOVA followed by Tukey's *post hoc* test (software package Statistica 10.0 for Windows, São

Caetano do Sul, SP, Brazil). A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant for all comparisons made.

Results

All data obtained from two-way ANOVA are shown in table 1.

Weight gain.

No differences in body-weight gain were observed in experimental groups (data not shown).

Modafinil administration decreases AMPH-CPP.

Tukey's test showed that AMPH conditioning increased time spent in the drug-conditioned place, while MOD pre-treatment prevented this AMPH-CPP (fig. 1).

Modafinil administration prevents alterations in locomotor activity.

Tukey's test showed that during withdrawal (48 hr without the drug), the AMPH group presented decreased crossing number in relation to both control and MOD + AMPH groups (fig. 2A).

Modafinil administration prevents anxiety.

Tukey's test showed that during withdrawal, the MOD group increased time spent and the number of entries in open arms of the EPM compared to control (fig. 2B,C). The

Table 1.

Two-way ANOVA of behavioural, biochemical and molecular parameters evaluated. ANOVA revealed a main effect of MOD, AMPH and MOD \times AMPH interaction.

Main effect $F_{1,24}$	MOD	AMPH	Interaction MOD \times AMPH
AMPH-CPP	16.48**	43.32**	18.48**
Locomotor activity		21.74**	17.82**
Time spent in OA	19.51**	10.19**	10.19**
OA entries	17.48**	12.51**	12.51**
Anxiety index	21.05**	12.11**	12.11**
Short-memory	13.14**	25.91**	8.39**
CAT activity	26.92**	10.95**	24.60**
RS levels	61.19**	32.02**	
PC quantification		5.24*	
LP estimation		22.00**	67.1**
pro-BDNF	7.56*	32.47**	282.05**
BDNF	21.17**	27.24**	111.20**
Trk-B	54.71**	84.24**	83.63**
DAT		105.63**	921.68**
D1DR	29.39**	10.72**	64.83**
D2DR		153.48**	5.25*

AMPH, amphetamine; CPP, conditioned place preference; OA, open arms; CAT, catalase; RS, reactive species; LP, lipid peroxidation; PC, protein carbonyl; BDNF, brain derived neurotrophic factor; Trk-B, tyrosine kinase receptor B; DAT, dopamine transporter; D1DR, dopamine receptor D1; D2DR, dopamine receptor D2; MOD, modafinil.

*Indicates values of $p < 0.05$.

**Indicates values of $p < 0.001$.

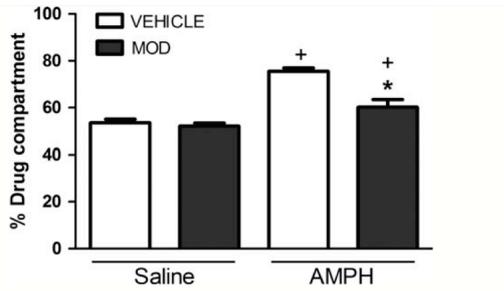


Fig. 1. Amphetamine-CPP of young adult rats. Data are expressed as mean ± S.E.M. *Indicates significant differences of treatment (vehicle/MOD) in the same conditioning (saline/AMPH) ($p < 0.05$). +indicates significant differences of conditioning (saline/AMPH) in the same treatment (vehicle/MOD) ($p < 0.05$). MOD, modafinil; AMPH, amphetamine; CPP, conditioned place preference.

MOD + AMPH group showed increased time spent and number of entries in open arms of the EPM in comparison with AMPH (fig. 2B,C). No differences were found in total arm entries (data not shown). Tukey's test revealed that MOD showed lower anxiety index compared to the control group, whereas MOD + AMPH showed higher anxiety index when compared to the MOD group (fig. 2D).

Modafinil administration prevents memory impairments.

Tukey's test showed that during withdrawal, AMPH decreased the recognition index in relation to both control and AMPH + MOD groups (fig. 3).

Modafinil administration exerts beneficial effects on oxidative damage markers and antioxidant defence.

Tukey's test showed that the AMPH group decreased catalase (CAT) activity in relation to all other experimental groups

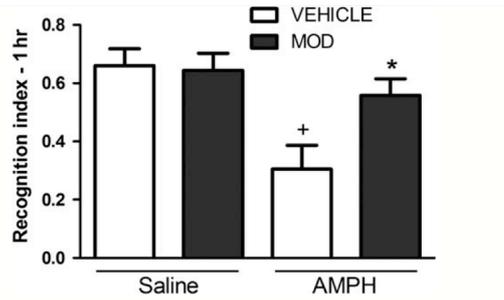


Fig. 3. Recognition memory of young adult rats. Data are expressed as mean ± S.E.M. *Indicates significant differences of treatment (vehicle/MOD) in the same conditioning (saline/AMPH) ($p < 0.05$). +indicates significant differences of conditioning (saline/AMPH) in the same treatment (vehicle/MOD) ($p < 0.05$). MOD, modafinil; AMPH, amphetamine.

whose activity was similar (fig. 4A). Tukey's test showed that MOD treatment decreased RS generation compared to other groups, whereas AMPH increased RS generation in relation to both control and MOD + AMPH groups. The MOD + AMPH group decreased RS generation in relation to AMPH and increased these levels when compared to MOD (fig. 4B). Tukey's test showed that regardless MOD administration, AMPH increased LP levels, whose amounts were similar to both control and MOD groups, respectively (fig. 4C). Tukey's test showed that the AMPH group presented the highest protein carbonyl (PC) levels when compared to other groups, whose values were similar (fig. 4D).

Modafinil administration shows influence on immunoreactivity of dopaminergic targets.

Tukey's test showed that MOD and AMPH groups increased pro-BDNF levels compared to control. However,

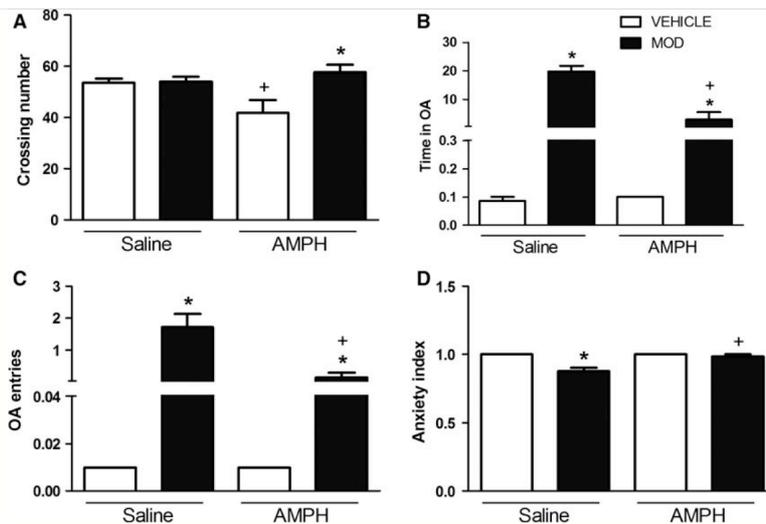


Fig. 2. Locomotor activity (A) and anxiety-like symptoms (B, C, and D) of young adult rats. Data are expressed as mean ± S.E.M. *indicates significant differences of treatment (vehicle/MOD) in the same conditioning (saline/AMPH) ($p < 0.05$). +indicates significant differences of conditioning (saline/AMPH) in the same treatment (vehicle/MOD) ($p < 0.05$). MOD, modafinil; AMPH, amphetamine.

MOD + AMPH decreased pro-BDNF levels in relation to both MOD and AMPH groups (fig. 5A). Tukey's test showed that MOD and AMPH groups decreased BDNF levels compared to control. Nevertheless, the MOD + AMPH group presented increased BDNF levels in relation to both MOD and AMPH groups (fig. 5B). Animals of the AMPH group increased Trk-B levels in relation to control; while MOD and MOD + AMPH groups showed Trk-B levels comparable to the control group (fig. 5C).

Dopamine transporter levels increased in both AMPH and MOD groups when compared to control. However, the MOD + AMPH group decreased DAT levels in relation to both MOD and AMPH groups (fig. 6A).

Tukey's test revealed that the AMPH group increased D1R and decreased D2R levels in relation to control, respectively. Nevertheless, MOD + AMPH decreased D1R and D2R levels when compared to both MOD and AMPH groups (fig. 6B,C).

Discussion

Our current findings demonstrated that animals which received MOD during adolescence and were exposed to AMPH in adulthood showed less AMPH preference, no locomotor impairment, along with less anxiety-like behaviours and no memory deficits. In addition, MOD showed antioxidant activity and modulated the dopaminergic system, thus preventing AMPH-induced impairments in the hippocampus.

Some studies have demonstrated reinforcing properties of MOD in both human beings and animals [39–41], and this hypothesis motivated the development of the current study. Thus, we sought to investigate the impact of MOD treatment during adolescence on mechanisms involved in the seeking of AMPH. In fact, adolescence is a critical period of development during which not all brain areas are fully developed

[42], and few studies investigated the influence of MOD exposure during this period on hippocampal changes [6]. The dopaminergic system can be considered a target for psychostimulant drugs such as MOD and AMPH. Thereby, lasting adaptations in the functions of DA and its receptors in response to drug exposure are suggested to contribute significantly to behavioural consequences [43], as observed in the current study.

Considering the DA potential to affect the dopaminergic neurotransmission, AMPHs exert their effects by modifying the neural DA transport [44]. Indeed, the DAT is responsible for regulating intracellular and extracellular DA concentrations and represents a target during the abuse of AMPH [45,46]. We observed an increase in DAT levels considering that chronic inhibition by antagonists can increase the number of receptors, a process known as sensitization [47]. Seeking for a hypothesis to explain our outcome, we argue that MOD may facilitate sensitization based on the fact that it is a weak DAT inhibitor [22,48]. Thus, MOD could be promoting a tonic DA activity not related to reinforcement and abuse [23], in contrast to AMPH, a psychostimulant that also blocks DAT but could be more addictive due to its greater potency at DAT and noradrenaline transporter (NET) [49,50]. This results in a phasic DA activity, which is directly related to the development of addiction [23]. According to our outcome, when MOD is given prior to AMPH, it can exert a modulating activity on monoamine release, and when a potent drug is administered, MOD counteracts AMPH-induced effects reestablishing DAT immunoreactivity, thus resulting in neuroadaptations of DA. In addition, it has been suggested that DAT inhibitors cause redistribution of VMAT-2, thus promoting cytoplasmic DA sequestration and decreasing AMPH toxicity [44].

Moreover, repeated psychostimulant administration initiates a transient desensitization of D2R, resulting in increased firing

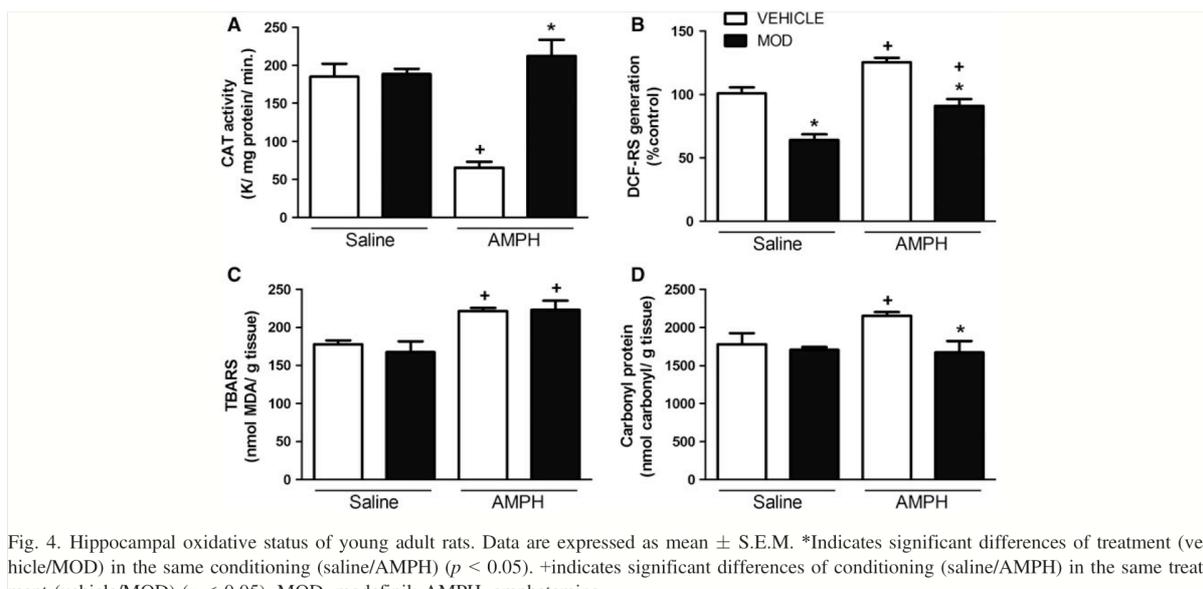


Fig. 4. Hippocampal oxidative status of young adult rats. Data are expressed as mean \pm S.E.M. *Indicates significant differences of treatment (vehicle/MOD) in the same conditioning (saline/AMPH) ($p < 0.05$). +indicates significant differences of conditioning (saline/AMPH) in the same treatment (vehicle/MOD) ($p < 0.05$). MOD, modafinil; AMPH, amphetamine.

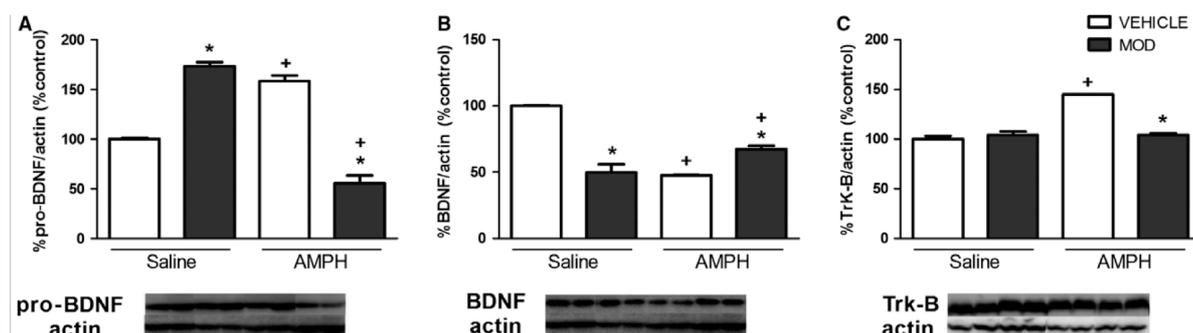


Fig. 5. Hippocampal pro-BDNF (A), BDNF (B) and Trk-B (C) immunoreactivity. Each two bands in the sequence correspond to one bar in the figure. *Indicates significant differences of treatment (vehicle/MOD) in the same conditioning (saline/AMPH) ($p < 0.05$). +Indicates significant differences of conditioning (saline/AMPH) in the same treatment (vehicle/MOD) ($p < 0.05$). MOD, modafinil; AMPH, amphetamine; BDNF, brain derived neurotrophic factor; Trk-B, tyrosine kinase receptor B.

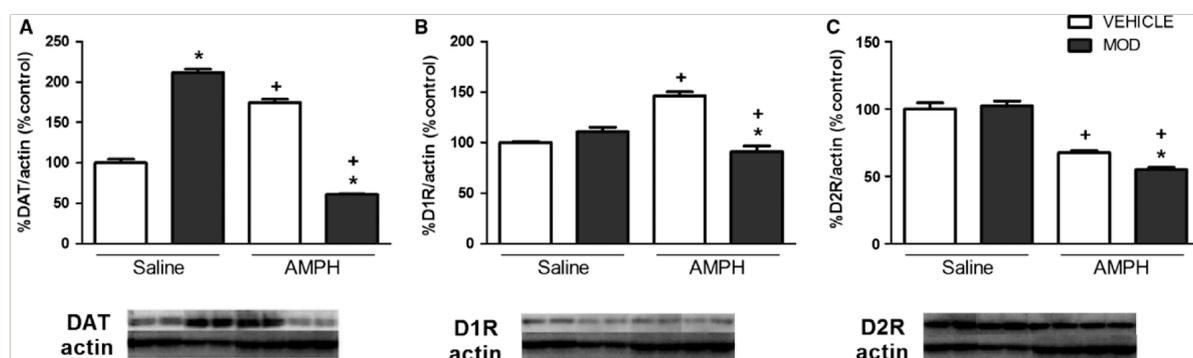


Fig. 6. Hippocampal DAT (A), D1R (B) and D2R (C) immunoreactivity. Data are expressed as mean \pm S.E.M. Each two bands in the sequence corresponds to one bar in the figure. *Indicates significant differences of treatment (vehicle/MOD) in the same conditioning (saline/AMPH) ($p < 0.05$). +Indicates significant differences of conditioning (saline/AMPH) in the same treatment (vehicle/MOD) ($p < 0.05$). MOD, modafinil; AMPH, amphetamine; D1R, antidopamine receptor D1; DAT, dopamine transporter; D2R, antidopamine receptor D2.

rates of DA neurons and amplified DA release reflecting alterations in signal transduction mechanisms [15]. In this perspective, animal studies have shown a relationship between decreased D2R availability and enhanced motivation for drug rewards, thus conferring vulnerability to AMPH addiction [51]. As D2R is closely involved in DA negative feedback, the loss of this inhibitory control leads to excessive dopaminergic signalling, what may augment the motivational properties of addictive drugs [52]. Consistent with these findings, as observed in animals that received AMPH and showed a deficit of D2R signalling, MOD administration does not counteract the effects of AMPH on hippocampal D2R levels.

The mechanism underlying MOD-induced stimulant effects differs from that of AMPH and seems to be partially involved with D1R [53] and not with D2R. Ares-Santos *et al.* [54] revealed a protective effect of D1R inactivation on neurotoxicity induced by methamphetamine. Also, D1R prevents dopaminergic neuronal loss and gliosis, indicating a role for D1R in neurotoxic effects of AMPHs. Martinez-Rivera *et al.* [55] pointed out that D1R is critical for reward-related processes, regardless of the drug administered. Furthermore, MOD exerts its behavioural effects via DAT inhibition and

this goes beyond downstream effects reflecting in D1R mediation as an indirect consequence [53]. In our study, AMPH increased D1R immunoreactivity, while pre-exposure to MOD counteracted the AMPH-induced effects. Agreeing with the literature, while D1R-like agonist produced CPP, D1R-like antagonist blocked CPP [47]. Also, D1R knockout mice lack the operant responding for reward [53] showing the relevance of this receptor in addiction.

We could infer that MOD administration during adolescence causes neural changes in the hippocampal DAT without altering D1R and D2R immunoreactivity. When those animals were exposed to AMPH, there was a modulation on DAT, a desensitization to decrease the effects of DA not allowing AMPH to cause alterations in D1R levels, which is directly related to reward development. Thus, MOD acts restoring the brain dopaminergic tone [56]. Besides, MOD does not cause depletion in the cytosolic pool of DA [55, 57]. Also, it can normalize DA levels in patients addicted to AMPH, because chronic use decreases those levels [16].

Furthermore, a clinical study showed anxiogenic properties MOD [6]. Experimentally, Ormell *et al.* [25] observed an anxiolytic effect of MOD by an increased number of crossings in

the centre of the OF task. In our study, we performed a more suitable test to assess anxiety, the EPM task. MOD *per se* showed anxiolytic properties, even after AMPH conditioning. MOD treatment increased the time spent and entries in open arms, which are indicative of less anxiety. After 48 hr without AMPH, the animals showed locomotor impairments that were demonstrated by decreased number of crossings; however, this behaviour was not observed in MOD-treated animals which were also exposed to AMPH. Based on this, we can infer that MOD prevented anhedonia that could be caused by DA depletion after ceasing AMPH administration.

Amphetamine abuse or dependence is known to cause cognitive deficits [58,59]. Through the current study, we also observed that AMPH-conditioned animals showed deficits in the recognition memory, while pre-exposure to MOD induced long-lasting hippocampal changes. Interestingly, these changes counteracted AMPH-induced memory deficits in adulthood. A well-known neurotrophin responsible for the regulation of synaptic plasticity and synaptic growth is BDNF. It exerts a crucial role in cognitive functions such as the formation and consolidation of hippocampus-dependent memory due to the binding of its receptor, the Trk-B receptor. The mature BDNF and its pro-form, the pro-BDNF, are capable of binding to the low-affinity receptor p75NTR and develop apoptosis in neurons [60,61]. Also, activity-dependent, synaptic secretion of BDNF, rather than its overall concentration, is the key for synaptic plasticity. Similar effects were observed when the levels of Trk-B or its activity were altered [62].

Our study showed that both MOD administration during adolescence and AMPH conditioning in adulthood were related to changes in immunoreactivity of pro-BDNF, BDNF and Trk-B. Thus, pro-BDNF, BDNF and Trk-B levels deregulated by AMPH may alter the signalling, resulting in the inability of the brain to give appropriate adaptive responses, contributing to memory impairments, as observed in this study. In agreement with our results, MOD has a relative acute impact on precursor cell proliferation as well as cell survival, but loses this ability in longer treatments, concerning adult hippocampal neurogenesis [63]. An additional outcome observed in this study was that MOD did not improve cognition *per se* in 'healthy' rats. These data are in accordance with the literature, indicating that MOD does not enhance baseline performance in both human beings and animals, but improves cognition when they present cognitive impairments [56,64–66].

To reinforce the above-mentioned results, AMPH impaired oxidative metabolism in the hippocampus, which is a brain area related to recognition memory [59]. Furthermore, the oxidative stress (OS) pathway is involved in many disorders including addiction [27,67]. Usually, there is a balance between oxidant and antioxidant systems and some RS produced exert a pivotal role in the physiological processes. Otherwise, when this balance is lost, it can lead to the settlement of OS causing damage to proteins, lipids and DNA, which may impair the neurotransmission of different brain areas [68]. Considering that oxidative metabolism is found to be impaired in addiction, and the potential of DA auto-

oxidation [69], along with MOD antioxidant properties [25], we decided to assess some aspects of the oxidative status of our animals.

We observed that MOD exerted antioxidant properties in the hippocampus, which was demonstrated by its action decreasing RS generation *per se*. Contrarily, MOD did not affect other oxidative damage markers such as MDA and PC levels. Likewise, MOD did not cause changes in the CAT activity, an important antioxidant enzyme. As expected, AMPH increased all oxidative damage markers besides decreasing CAT activity, an indicative of OS settlement. When animals were pre-exposed to MOD, it exerted protective effects against AMPH-induced OS, even though MOD did not reduce MDA levels only, a recognized marker of damage to lipids [70].

Considering the potential of DA to affect the dopaminergic system, an exacerbated increase in the dopaminergic activity is a source of OS in the brain [69]. This event was observed in animals that received AMPH, and it was counteracted by MOD administration. An experimental study showed that MOD exerted antioxidant properties, thus decreasing MDA levels and increasing GSH levels [19]. This effect could be attributed to the MOD ability to regulate DA levels and decrease oxidative damage through CAT activity, a cytosolic antioxidant enzyme [71] that diminishes damage caused by excessive DA release in the cytosol.

To the best of our knowledge, this is the first study to demonstrate that MOD administration during adolescence and AMPH-conditioned young adult rats presented changes in behaviour as well as in the hippocampus. We can suggest that MOD promotes a modulation in the hippocampal dopaminergic system, thus controlling the cytosolic DA release by acting as an antioxidant and also by its actions on dopaminergic receptors.

Acknowledgements

The authors are grateful to PRPGP/UFSM for the financial support; as well as CAPES, CNPq and FAPERGS for the fellowships and M.Sc. Karine Roversi for critical reading of the manuscript.

Conflict of Interest

The authors report no conflicts of interests.

References

- 1 Kim D. Practical use and risk of modafinil, a novel waking drug. *Environ Health Toxicol* 2012;**27**:201–7.
- 2 NIH – National Institute on Drug Abuse, NIH Pub No. 14-5605. Revised July 2014.
- 3 UNODC – United Nations Office for Drug Control and Crime Prevention. *World Drug Report*. 2014.
- 4 Urban KR, Gao W-J. Performance enhancement at the cost of potential brain plasticity: neural ramifications of nootropic drugs in the healthy developing brain. *Front Syst Neurosci* 2014;**8**:1–10.
- 5 Hofmann SG, Mundy EA, Curtiss J. Neuroenhancement of exposure therapy in anxiety disorders AIMS. *Neuroscience* 2015;**2**:123–38.
- 6 Scoriels L, Jones PB, Sahakian BJ. Modafinil effects on cognition and emotion in schizophrenia and its neurochemical modulation in the brain. *Neuropharmacology* 2012;**64**:168–84.

- 7 Wood S, Sage JR, Shuman T, Anagnostaras SG. Psychostimulants and cognition: a continuum of behavioral and cognitive activation. *Pharmacol Rev* 2014;**66**:193–221.
- 8 Potenza MN, Sofuoglu M, Carrol M, Rounsaville BJ. Neuroscience of behavioral and pharmacological treatments for addictions. *Neuron* 2011;**69**:695–712.
- 9 Chen CY, Storr CL, Anthony JC. Early-onset drug use and risk for drug dependence problems. *Addict Behav* 2009;**34**:319–22.
- 10 Wetzell BB, Muller MM, Cobuzzi JL, Hurwitz ZE, DeCicco-Skinner K, Riley AL. Effect of age on methylphenidate-induced conditioned taste avoidance and relates BDNF/TrkB signaling in the insular cortex of rat. *Psychopharmacology* 2014;**231**:1493–501.
- 11 Zakharova E, Leoni G, Kichko I, Izenwasser S. Differential effects of methamphetamine and cocaine on conditioned place preference and locomotor activity in adult and adolescent male rats. *Behav Brain Res* 2009;**198**:45–50.
- 12 Wahlstrom D, Collins P, White T, Luciana M. Developmental changes in dopamine neurotransmission in adolescence: behavioral implications and issues in assessment. *Brain Cogn* 2010;**72**:146.
- 13 Volkow ND, Baler RD, Goldstein RZ. Addiction: pulling at the neural threads of social behaviors. *Neuron* 2011;**69**:599–602.
- 14 Ikemoto S. Brain reward circuitry beyond the mesolimbic dopamine system: a neurobiological theory. *Neurosci Biobehav Rev* 2010;**35**:129–50.
- 15 Anderson SM, Pierce RC. Cocaine-induced alterations in dopamine receptor signaling: implications for reinforcement and reinstatement. *Pharmacol Ther* 2005;**106**:389–403.
- 16 Volkow ND, Wang G-J, Fowler JS, Tomasi D, Telang F. Addiction: beyond dopamine reward circuitry. *PNAS* 2011b;**108**:15037–42.
- 17 Ballon JS, Feifel DA. Systematic review of modafinil: potential clinical uses and mechanisms of action. *J Clin Psychiatry* 2006;**67**:554–66.
- 18 Farhoudi M, Sadigh-Eteghad S, Andalib S, Vafae MS, Ziaee M, Mahmoudi J. An analytical review on probable anti-Parkinsonian effect of modafinil. *J Analyt Res Clin Med* 2013;**1**:58–62.
- 19 Xiao YL, Fu JM, Dong Z, Yang JQ, Zeng FX, Zhu LX *et al.* Neuroprotective mechanism of modafinil on Parkinson disease induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Acta Pharmacol Sin* 2004;**25**:301–5.
- 20 Brady KT, Gray KM, Tolliver BK. Cognitive enhancers in the treatment of substance use disorders: clinical evidence. *Pharmacol Biochem Behav* 2011;**99**:285–94.
- 21 Minzenberg MJ, Carter CS. Modafinil: a review of neurochemical actions and effects on cognition. *Neuropsychopharmacology* 2008;**33**:1477–502.
- 22 Madras BK. Modafinil occupies dopamine and norepinephrine transporters in vivo and modulates the transporters and trace amine activity in vitro. *J Pharmacol Exp Ther* 2006;**319**:561–9.
- 23 Stahl SM. *Stahl's Essential Psychopharmacology*, 4th edn. Cambridge University Press, New York, NY, 2013.
- 24 Gerrard P, Malcolm R. Mechanisms of modafinil: a review of current research. *Neuropsychiatr Dis Treat* 2007;**3**:349–64.
- 25 Ornell F, Valvassori SS, Steckert AV, Deroza PF, Resende WR, Varela RB *et al.* Modafinil effects on behavior and oxidative damage parameters in brain of Wistar rats. *Behav Neurol* 2014 **917246**:1–7. <https://doi.org/10.1155/2014/917246>.
- 26 Tsanov M, Lyons DG, Barlow S, González Reyes RE, O'Mara SM. The psychostimulant modafinil facilitates water maze performance and augments synaptic potentiation in dentate gyrus. *Neuropharmacology* 2010;**59**:9–19.
- 27 Kuhn FT, Trevizol F, Dias VT, Barcelos RC, Pase CS, Roversi K *et al.* Toxicological aspects of trans fat consumption over two sequential generations of rats: oxidative damage and preference for amphetamine. *Toxicol Lett* 2015;**232**:58–67.
- 28 Wong YN, Simcoe D, Hartman LN, Laughton WB, King SP, McCormick GC *et al.* A double-blind, placebo-controlled, ascending-dose evaluation of the pharmacokinetics and tolerability of modafinil tablets in healthy male volunteers. *J Clin Pharmacol* 1999;**39**:30–40.
- 29 Carlezon WA Jr, Pliakas AM, Parow AM, Detke MJ, Cohen BM, Renshaw PF. Antidepressant-like effects of cytidine in the forced swim test in rats. *Biol Psychiatry* 2002;**51**:882–9.
- 30 Kerr DS, Bevilacqua LR, Bonini JS, Rossato JI, Koler CA, Medina JH *et al.* Angiotensin II blocks memory consolidation through an AT2 receptor-dependent mechanism. *Psychopharmacology* 2005;**179**:529–35.
- 31 Cohen H, Liu T, Kozlovsky N, Kaplan Z, Zohar J, Mathé AA. The neuropeptide Y (NPY)-ergic system is associated with behavioral resilience to stress exposure in an animal model of post-traumatic stress disorder. *Neuropsychopharmacology* 2012;**37**:350–63.
- 32 De Lima MN, Laranja DC, Caldana F, Bromberg E, Roesler R, Schroder N. Reversal of age-related deficits in object recognition memory in rats with l-deprenyl. *Exp Gerontol* 2005;**40**:506–11.
- 33 Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984;**5**:121–6.
- 34 Hempel SL, Buettner GR, O'Malley YQ, Wessels DA, Flaherty DM. Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 20, 70-dichloro dihydrofluorescein diacetate, 5 (and 6)- carboxy-20, 70-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123. *Free Radical Biol Med* 1999;**27**:146–59.
- 35 Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;**193**:265–75.
- 36 Yan LY, Traber MG, Packer L. Spectrophotometric method for determination of carbonyls in oxidatively modified apolipoprotein B of human low-density lipoproteins. *Anal Biochem* 1995;**228**:349–51.
- 37 Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979;**95**:351–8.
- 38 Pase CS, Roversi K, Roversi K, Vey LT, Dias VT, Veit JC *et al.* Maternal trans fat intake during pregnancy or lactation impairs memory and alters BDNF and TrkB levels in the hippocampus of adult offspring exposed to chronic mild stress. *Physiol Behav* 2017;**169**:114–23.
- 39 Bernardi RE, Broccoli L, Spanagel R, Hansson AC. Sex differences in dopamine binding and modafinil conditioned place preference in mice. *Drug Alcohol Depend* 2015;**1**:37–44.
- 40 Federici M, Latagliata EC, Rizzo FR, Ledonne A, Gu HH, Romigi A *et al.* Electrophysiological and amperometric evidence that modafinil blocks the dopamine uptake transporter to induce behavioral activation. *Neuroscience* 2013;**252**:118–24.
- 41 Makris AP, Rush CR, Frederich RC, Taylor AC, Kelly TH. Behavioral and subjective effects of d-amphetamine and modafinil in healthy adults. *Exp Clin Psychopharmacol* 2007;**15**:123–33.
- 42 Kitamura Y, Hattori S, Yoneda S, Watanabe S, Kanemoto E, Sugimoto M *et al.* Doxorubicin and cyclophosphamide treatment produces anxiety-like behavior and spatial cognition impairment in rats: possible involvement of hippocampal neurogenesis via brain-derived neurotrophic factor and cyclin D1 regulation. *Behav Brain Res* 2015;**292**:184–93.
- 43 Voulalas PJ, Schetz J, Undieh AS. Differential subcellular distribution of rat brain dopamine receptors and subtype-specific redistribution induced by cocaine. *Mol Cell Neurosci* 2011;**46**:645–54.
- 44 Volz TJ, Hanson GR, Fleckenstein AE. The role of the plasmalemmal dopamine and vesicular monoamine transporters in methamphetamine-induced dopaminergic deficits. *J Neurochem* 2007;**101**:883–8.

- 45 Raineri M, Peskin V, Goitia B, Taravini IR, Giorgeri S, Urbano FJ *et al.* Attenuated methamphetamine induced neurotoxicity by modafinil administration in mice. *Synapse* 2011;**65**:1087–98.
- 46 Raineri M, Gonzalez B, Goitia B, Garcia-Rill E, Krasnova IN, Cadet JL *et al.* Modafinil abrogates methamphetamine-induced neuroinflammation and apoptotic effects in the mouse striatum. *PLoS ONE* 2012;**7**:e46599.
- 47 Beninger RJ, Miller R. Dopamine D1-like receptors and reward-related incentive learning. *Neurosci Biobehav Rev* 1998;**22**:335–45.
- 48 Wisor J. Modafinil as a catecholaminergic agent: empirical evidence and unanswered questions. *Front Neurol* 2013;**4**:1–10.
- 49 Simmler L, Buser T, Donzelli M, Schramm Y, Dieu LH, Huwyler J *et al.* Pharmacological characterization of designer cathinones in vitro. *Br J Pharmacol* 2013;**168**:458–70.
- 50 Liechti M. Novel psychoactive substances (designer drugs): overview and pharmacology of modulators of monoamine signaling. *Swiss Med Wkly* 2015;**145**:w14043.
- 51 Tournier BB, Steimer T, Millet P, Moulin-Sallanon M, Vallet P, Ibanez V *et al.* Innately low D2 receptor availability is associated with high novelty-seeking and enhanced behavioural sensitization to amphetamine. *Int J Neuropsychopharmacol* 2013;**16**:1819–34.
- 52 Robinson TE, Berridge KC. The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Res Brain Res Rev* 1993;**18**:247–91.
- 53 Young JW, Geyer MA. Action of modafinil—increased motivation via the dopamine transporter inhibition and D1 receptors? *Biol Psychiatry* 2010;**67**:784–7.
- 54 Ares-Santos S, Granado N, Oliva I, O’Shea E, Martin ED, Colado MI *et al.* Dopamine D1 receptor deletion strongly reduces neurotoxic effects of methamphetamine. *Neurobiol Dis* 2012;**45**:810–20.
- 55 Martínez-Rivera FJ, Natal-Albelo EJ, Martínez NA, Orozco-Vega RA, Muniz-Seda OA, Barreto-Estrada JL. The effect of the anabolic steroid, nandrolone, in conditioned place preference and D1 dopamine receptor expression in adolescent and adult mice. *Behav Processes* 2015;**113**:81–5.
- 56 González B, Raineri M, Cadet JL, García-Rill E, Urbano FJ, Bisagno V. Modafinil improves methamphetamine-induced object recognition deficits and restores prefrontal cortex ERK signaling in mice. *Neuropharmacology* 2014;**87**:188–97.
- 57 Simon P, Hkmet C, Ramassamy C, Costentin J. Non-amphetamine mechanism of stimulant locomotor effect of modafinil in mice. *Eur Neuropsychopharmacol* 1995;**5**:509–14.
- 58 De Lima MN, Presti-Torres J, Vedana G, Alcade LA, Stertz L, Fries GR *et al.* Early life stress decreases hippocampal BDNF content and exacerbates recognition memory deficits induced by repeated d-amphetamine exposure. *Behav Brain Res* 2011;**224**:100–6.
- 59 Broadbent NJ, Gaskin S, Squire LR, Clark RE. Object recognition memory and the rodent hippocampus. *Learn Mem* 2010;**17**:5–11.
- 60 Roux PP, Barker PA. Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Prog Neurobiol* 2002;**67**:203–33.
- 61 Matsumoto T, Rauskolb S, Polack M, Klose J, Kolbeck R, Korte M *et al.* Biosynthesis and processing of endogenous BDNF: CNS neurons store and secrete BDNF, not pro-BDNF. *Nat Neurosci* 2008;**11**:131–3.
- 62 Lu B. Pro-region of neurotrophins: role in synaptic modulation. *Neuron* 2003;**39**:735–8.
- 63 Brandt MD, Ellwardt E, Storch A. Short- and long-term treatment with modafinil differentially affects adult hippocampal neurogenesis. *Neuroscience* 2014;**278**:267–75.
- 64 Wadhwa M, Sahu S, Kumari P, Ray K, Panjwani U. Caffeine and modafinil given during 48 h sleep deprivation modulate object recognition memory and synaptic proteins in the hippocampus of the rat. *Behav Brain Res* 2015;**294**:95–101.
- 65 Randall DC, Viswanath A, Bharania P, Elsabagh SM, Hartley DE, Shneerson JM. Does modafinil enhance cognitive performance in young volunteers who are not sleep-deprived? *J Clin Psychopharmacol* 2005;**25**:175–9.
- 66 Repantis D, Schlattmann P, Laisney O, Heuser I. Modafinil and methylphenidate for neuroenhancement in healthy individuals: a systematic review. *Pharmacol Res* 2010;**62**:187–206.
- 67 Yamamoto BK, Mszczynska A, Gudelsky GA. Amphetamine toxicities classical and emerging mechanisms. *Ann N Y Acad Sci* 2010;**1187**:101–21.
- 68 Rees JN, Florang VR, Anderson DG, Doom JA. Lipid peroxidation products inhibit dopamine catabolism yielding aberrant levels of a reactive intermediate. *Chem Res Toxicol* 2007;**20**:1536–42.
- 69 Afonso-Oramas D, Cruz-Muros I, Alvarez de la Rosa D, Abreu P, Giraldez T, Castro-Hernández J *et al.* Dopamine transporter glycosylation correlates with the vulnerability of midbrain dopaminergic cells in Parkinson’s disease. *Neurobiol Dis* 2009;**36**:494–508.
- 70 Bulut M, Selek S, Bez Y, Cemal Kaya M, Gunes M, Karababa F *et al.* Lipid peroxidation markers in adult attention deficit hyperactivity disorder: new findings for oxidative stress. *Psychiatry Res* 2013;**209**:638–42.
- 71 Berk M, Kapczinski F, Andreazza AC, Dean OM, Giorlando F, Maes M *et al.* Pathways underlying neuroprogression in bipolar disorder: focus on inflammation, oxidative stress and neurotrophic factors. *Neurosci Biobehav Rev* 2011;**35**:804–17.

6.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL III

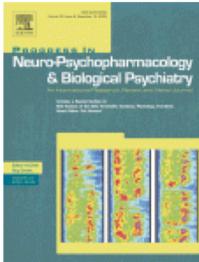


RightsLink®

Home

Create Account

Help



Title: Modafinil reduces amphetamine preference and prevents anxiety-like symptoms during drug withdrawal in young rats: Involvement of dopaminergic targets in VTA and striatum

Author: Verônica Tironi Dias, Higor Zuquetto Rosa, Lívia Ferraz D'avila, Luciana Taschetto Vey, Raquel Cristine Silva Barcelos, Marilise Escobar Burger

Publication: Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry

Publisher: Elsevier

Date: 8 June 2019

© 2019 Elsevier Inc. All rights reserved.

LOGIN

If you're a **copyright.com user**, you can login to RightsLink using your copyright.com credentials. Already a **RightsLink user** or want to [learn more?](#)

Please note that, as the author of this Elsevier article, you retain the right to include it in a thesis or dissertation, provided it is not published commercially. Permission is not required, but please ensure that you reference the journal as the original source. For more information on this and on your other retained rights, please visit: <https://www.elsevier.com/about/our-business/policies/copyright#Author-rights>

BACK

CLOSE WINDOW

Copyright © 2019 [Copyright Clearance Center, Inc.](#) All Rights Reserved. [Privacy statement.](#) [Terms and Conditions.](#) Comments? We would like to hear from you. E-mail us at customercare@copyright.com



Contents lists available at ScienceDirect

Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/pnp

Modafinil reduces amphetamine preference and prevents anxiety-like symptoms during drug withdrawal in young rats: Involvement of dopaminergic targets in VTA and striatum

Verônica Tironi Dias^a, Higor Zuquetto Rosa^a, Lívia Ferraz D'ávila^a, Luciana Taschetto Vey^b, Raquel Cristine Silva Barcelos^a, Marilise Escobar Burger^{a,b,*}

^a Graduate Program of Pharmacology, Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil

^b Graduate Program in Biological Sciences: Toxicological Biochemistry, Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil



ARTICLE INFO

Keywords:

Reward
Tyrosine hydroxylase
Dopamine transporter
D1 receptor
D2 receptor

ABSTRACT

Drug abuse and addiction are overwhelming health problems mainly during adolescence. Based on a previous study of our research group, the rats that received modafinil (MD) during the adolescence showed less preference for amphetamine (AMPH) in adulthood. Our current hypothesis is that MD will show beneficial effects against AMPH preference and abstinence symptoms during adolescence, a critical lifetime period when drug hedonic effects are more pronounced. We investigated the influence of MD pretreatment on AMPH preference in conditioned place preference (CPP) paradigm in adolescent rats and anxiety-like symptoms during drug withdrawal (48 h after the last AMPH dose) in elevated plus maze (EPM) task. Besides that, oxidative and molecular status were evaluated in the ventral tegmental area (VTA) and striatum. Our findings showed, as it was expected, that adolescent animals developed AMPH preference together with anxiety-like symptoms during the drug withdrawal while the MD pretreatment prevented those behaviors. Besides promoting benefits on reward parameters, MD was able to preserve VTA and striatum from oxidative damages. This was observed by the increased catalase activity and reduced generation of reactive species and lipid peroxidation, which were inversely modified by AMPH exposure. At molecular level, MD exerted an interesting modulatory activity on the VTA and induced an up-regulation in striatal dopaminergic targets (TH, DAT, D1R and D2R). So far, during the adolescence, MD presented beneficial behavioral outcomes that could be attributed to its modulatory activity on the striatal dopaminergic system in an attempt to maintain the adequate dopamine levels.

1. Introduction

Addiction is considered a chronic brain disease and it persists over time despite adverse consequences, being recognized as a serious worldwide public health problem (UNODOC, 2018). Key factors that influence and/or contribute to addiction development could be cited as social environmental aspects, genetic factors and psychiatric comorbidities (Volkow et al., 2012). Besides that, impulsivity and anxiety are crucial element traits that represent a risk for the development of addiction (Katzung et al., 2017; Boskera et al., 2017).

Considering this, the amphetamines are highly addictive drugs frequently abused by adolescents. Its use became popular, not only in nightlife and in recreational settings, but aiming cognitive and athletic performance enhancement and to lose weight as well (UNODOC, 2018,

Schelle et al., 2014). Amphetamine acutely increases extracellular concentrations of dopamine (DA) by its reuptake blockade, and the mechanism is mediated by amphetamine inhibitory actions in each of these targets: i) dopamine transporter (DAT); ii) vesicular monoamine transporter 2 (displaces DA from vesicular storage pools); and iii) by the inhibition of monoamine oxidase (MAO) activity, which subsequently reduces cytosolic DA metabolism (Hutson et al., 2014). With prolonged exposure to amphetamine, a compensatory downregulation of the DAT was reported altering the dopaminergic homeostasis (Vaughan and Foster, 2013).

Modafinil (2-[(diphenylmethyl) sulfinyl] acetamide) (MD) is a wake-promoting drug approved by the FDA to narcolepsy treatment. It is pharmacologically distinct from classical stimulants such as amphetamines; it improves wakefulness with few peripheral or central side

* Corresponding author at: Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil.

E-mail address: marilise.burger@ufsm.br (M.E. Burger).

<https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2019.01.007>

Received 30 October 2018; Received in revised form 15 January 2019; Accepted 17 January 2019

Available online 18 January 2019

0278-5846/ © 2019 Elsevier Inc. All rights reserved.

effects (Wood et al., 2013). Besides, MD is also known as a cognitive enhancer showing beneficial effects in different neuropsychiatric conditions including addiction (Morley et al., 2017). The main mechanism of MD effects, among others, is the weak DAT inhibition, which leads to the increase of extracellular DA levels in the synapse (Minzenberg and Carter, 2008). From this point of view, amphetamine and MD share, to a certain degree, some mechanisms of action directly connected to addiction.

The reward-related behaviors depend on complex processes between cortico-striatal-limbic networks (Bisagno et al., 2016). In the reward system, the dopaminergic pathway makes projections from the ventral tegmental area (VTA) to limbic system areas, including the striatum (Ikemoto, 2010). The striatum is a key region implicated in detecting and learning about the novel and rewarding cues in the environment (Delgado, 2007). A recent study showed that the dopamine axons continue to grow from the striatum to the prefrontal cortex during adolescence, and this could predispose or protect against psychopathologies (Reynolds et al., 2018). Regarding these outcomes, other studies have evidenced that MD presented neuroprotective effects in brain areas such as the striatum in different experimental protocols. (Raineri et al., 2012; Gerrard and Malcolm, 2007; Xiao et al., 2004).

Based on a previous study of our research group, MD administration during adolescence was able to reduce the preference for amphetamine in rats during their adulthood. From this point of view, we showed that MD was able to modulate the hippocampal dopaminergic system due to its beneficial influence on the oxidative status and on the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) pathways (Dias et al., 2017).

Nowadays, the majority of studies involving MD are being developed with adult animals, being the adolescence a very neglected period. However, this transitional life period exerts a significant role in drug abuse liability (Chen et al., 2009). Thus, in this life stage, many changes are concomitantly experienced; including physical and psychological maturation and the brain development could be the key to understand the neural basis of such changes. The drive for independence increases in social interaction and the discovery of new social contexts directs the adolescent to an inflection of impulsivity and risky behaviors including experimentation with drugs (Casey and Rebecca, 2010). Moreover, pronounced problems towards psychostimulant addiction are quicker seen when drugs use start before adulthood (SHAMSA, 2014; Chen et al., 2009).

Considering the background, in the present study, we seek to expose the relation of the MD effects against amphetamine preference evaluated in the conditioned place preference (CPP) paradigm and evaluate anxiety-like symptoms in the drug withdrawal during the adolescence. Furthermore, oxidative stress and dopaminergic pathways were investigated in the VTA and striatum, which are the brain areas directly related to addiction.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Twenty-eight young male *Wistar* rats (approximately 100–150 g) were housed in groups of four animals per cage in a room with controlled temperature ($23 \pm 1^\circ\text{C}$), on a 12-h light/dark cycle (lights turned on at 7 a.m.). Animals had free access to food and water *ad libitum*. The experimental procedures followed international norms of care and animal maintenance approved by the Research Ethics Committee of the Federal University of Santa Maria (UFSM-9429030215), which is affiliated to the National Council for the Control of Animal Experiments (CONCEA).

2.2. Experimental design

Rats were designated to two experimental groups in the postnatal day (PND) 28: control group (received vehicle, $n = 14$) and MD group

(received modafinil at a dose of 64 mg/kg, $n = 14$) (Tsanov et al., 2010; Dias et al., 2017). This treatment was given by gavage once a day for 14 days (PND 28–42). On PND 43, animals were submitted to the conditioned place preference (CPP) paradigm and half of each group received saline (0.9% NaCl solution, i.p.) or amphetamine (AMPH) (4 mg/kg i.p.) (Kuhn et al., 2015) resulting in the following groups: control group, MD group, AMPH group and MD + AMPH group. Forty-eight hours after the last AMPH dose anxiety-like behaviors were assessed. On the next day, the rats were anesthetized with isoflurane (inhalation solution), euthanized, and their brains were dissected to extract their VTA and striatum (Paxinos and Charles, 2013) for biochemical and molecular analysis.

2.3. Drugs

Modafinil tablets (Stavigile; Libbs, São Paulo, Brazil) were thoroughly pulverized by sonication in distilled water and the DMSO (0.1% v/v) was subsequently added to form a suspension. The treatment was administered by gavage at the dose of 64 mg/kg, which is the concentration of a highly effective dose for humans (Tsanov et al., 2010).

The D, L-amphetamine (AMPH; Merck, Germany) at the dose of 4 mg/mL, i.p., which is known to induce CPP, was chosen based on previous studies of our research group (Dias et al., 2017; Kuhn et al., 2015).

2.4. Behavioral paradigms

2.4.1. Conditioned place preference

The CPP device consists of a box with two compartments of equal size ($45 \times 45 \times 50$ cm) and different environmental stimuli (one compartment had a smooth white floor and striped walls while the other had a striped floor and smooth white walls). Both compartments were accessible through a central compartment ($18 \times 36 \times 50$ cm) separated by manual guillotine doors.

The AMPH-induced CPP was performed according to the following phases: habituation, pre-test, conditioning and test. On PND 43, habituation was conducted. This phase consisted in leaving the animals for 15 min. in each compartment, reaching the total time of 30 min. The purpose of this procedure was to exclude exploratory behavior that is common in new environments to avoid misinterpretations.

On the following day (PND 44) the pre-test was conducted. This phase consists in placing the animal in the central compartment with free access to the entire apparatus. The time spent in each compartment by the rat was assessed for 15 min. This phase was carried out to determine the innate environmental chamber preference. Based on these results, each rat was conditioned with AMPH in the compartment that it spent less time and with saline in the compartment that it spent more time during the pre-test.

The conditioning phase (PND 45–52) was carried out for 8 days. Each animal received amphetamine (one daily injection) in the less preferred compartment paired with vehicle (0.9% NaCl) injection in the opposite compartment after a 4-h interval. Immediately after each AMPH/saline injection, the rat was confined in the compartment for 25 min. (Carlezon et al., 2002). The saline-treated groups received two daily injections of vehicle solution in both CPP compartments.

The test (without drug/vehicle administration) was conducted on PND 53, and the time spent in each compartment was assessed for 15 min. Results express the percentage of time spent by the animals in the compartment associated with AMPH during the abstinence period.

2.4.2. Elevated plus maze

Forty-eight hours after the last AMPH dose, anxiety-like behaviors were assessed in the elevated plus maze (EPM). The apparatus consists of a platform elevated 50 cm from the floor. Forty-centimeter-high (40 cm) walls enclose two opposite arms ($50 \text{ cm} \times 10 \text{ cm}$) while the other two arms have no walls. All arms have a central intersection

(10 cm × 10 cm).

When the animal was facing an open arm, this was defined as the beginning of the test. The entries number and time spent in the open arms and the total arm entries were evaluated for 5 min. In addition, the anxiety index was calculated as:

$$\text{Anxiety index} = 1 - \left[\frac{\text{Time spent in open arms}}{\text{Total time in the maze}} + \frac{\text{Number of entries in open arms}}{\text{Total exploration in the maze}} \right] / 2$$

Anxiety index values range from 0 to 1, where an increase in the index expresses increased anxiety-like behavior (Cohen et al., 2012).

2.5. Biochemical assays

The oxidative status analysis of these two brain areas were evaluated by the measurement of the catalase (CAT) activity (Aebi, 1984), the level of reactive species (RS) (Hempel et al., 1999) and the level of lipid peroxidation (LP) (Ohkawa et al., 1979).

2.6. Molecular assays

The molecular analyses were performed by western blot as described by Dias et al. (2017). Briefly, the membranes were incubated with the primary antibodies (Santa Cruz Biotechnology): anti-tyrosine hydroxylase (TH) (1:1000, sc-7847), anti-dopamine transporter (DAT) (1:500, sc-14002), anti-dopamine receptor D1 (D1R) (1:500, sc-14001), anti-dopamine receptor D2 (D2R) (1:500, sc-9113) and anti-actin (1:1000, sc-1616) followed by the appropriate secondary antibody (Santa Cruz Biotechnology) IgG horseradish peroxidase conjugate. Actin was used as an internal control and data were standardized according to the values.

2.7. Statistical analysis

All the results from behavioral, biochemical and molecular assays were expressed as the mean ± standard error (S.E.M.) and analyzed by two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's *post hoc* test (software package Statistica 10.0). A value of $p < .05$ was considered statistically significant for all comparisons made.

3. Results

3.1. Body weight gain

No differences in body weight gain were observed among the experimental groups (data not shown) indicating that neither MD treatment nor AMPH exerted influences on body weight gain of adolescent rats.

3.2. Modafinil administration decreased AMPH-induced CPP in adolescent rats

We first characterized the influence of MD on the AMPH reward in the CPP paradigm. Two-way ANOVA of the CPP revealed a significant main effect of MD and AMPH [$F(1,24) = 7.43$ and 64.08 , $p < .05$, respectively] on AMPH preference. Tukey's test showed that AMPH conditioning increased time spent in the drug-conditioned compartment while MD pre-treatment decreased the time spent in the drug-conditioned compartment (Fig. 1). Taken together, these findings evidence that MD was able to decrease the drug preference in adolescent rats.

3.3. Modafinil administration prevented anxiety parameters after 48 h of AMPH withdrawal in adolescent rats

In order to assess the influence of MD on anxiety-like symptoms during AMPH withdrawal, which is a common symptom during

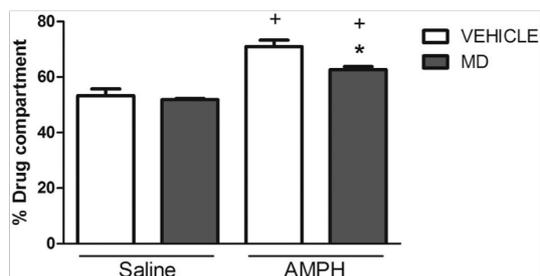


Fig. 1. Modafinil administration decreased amphetamine (AMPH)-induced conditioned place preference (CPP) in adolescent rats. Data are expressed as mean ± S.E.M. *Indicates significant differences of treatment (vehicle/MD) in the same conditioning (saline/AMPH) ($P < .05$). +Indicates significant differences of conditioning (saline/AMPH) in the same treatment (vehicle/MD) ($P < .05$). Abbreviations: MD: modafinil; AMPH: amphetamine.

abstinence (KITANAKA et al., 2008), we performed the elevated plus maze (EPM) test. Two-way ANOVA of the EPM revealed a significant main effect of MD and MD × AMPH interaction [$F(1,24) = 51.07$ and 33.07 , $p < .05$, respectively] on the time spent and [$F(1,24) = 7.69$ and 7.69 , $p < .05$, respectively] on the head dipping in the open arms and [$F(1,24) = 22.30$ and 58.83 , $p < .05$, respectively] on the anxiety index. No differences were observed in the total arms entries (Fig. 2).

Tukey's test showed that during drug withdrawal MD exerted no influences *per se* on anxiety parameters observed in the EPM task, while AMPH conditioning *per se* decreased both time spent and head dippings (exploratory behavior) in the open arms, increasing the anxiety index, which is an expected result from abused drugs, indicative of abstinence (Koob and Le Moal, 2001). Interestingly, MD + AMPH group showed significant increasing in time spent and head dipping in the open arms, together with a decreasing in the anxiety index in relation to MD- and AMPH-treated groups (Fig. 2a–d). These findings evidence that MD was able to prevent anxiety-like symptoms related to AMPH abstinence in adolescent rats.

3.4. Modafinil modified the oxidative status in the ventral tegmental area

The oxidative stress pathway is involved in different disturbances in the CNS including addiction (Yamamoto et al., 2010). In view of that, we evaluated some markers of oxidative damage such as reactive species (RS) and lipid peroxidation (LP) as also an important antioxidant defense in the VTA, the catalase (CAT) activity. Two-way ANOVA revealed a significant main effect of MD and AMPH [$F(1,24) = 108.49$ and 181.18 , $p < .05$, respectively] on the CAT activity, [$F(1,24) = 26.45$ and 22.36 , $p < .05$, respectively] on the RS and [$F(1,24) = 22.07$ and 51.82 , $p < .05$, respectively] on the LP levels in the VTA (Fig. 3).

Tukey's test showed that between the saline administered groups, MD *per se* increased both CAT activity and RS generation, decreasing LP levels. Inversely, AMPH conditioning decreased the CAT activity and increased both RS and LP levels in the VTA. However, when animals were treated with MD and subsequently exposed to AMPH conditioning, RS level was decreased in relation to both AMPH and MD groups, while the CAT activity was totally recovered and LP levels were decreased in comparison to AMPH group (Fig. 3a–c). All together, our current findings evidence that MD *per se* exerted beneficial influence on the oxidative status, being able to counteract oxidative damages AMPH-induced in the VTA of adolescent rats.

3.5. Modafinil modified the striatal oxidative status

Carry on our study we evaluate the same markers of oxidative status of VTA in the striatum. Two-way ANOVA of CAT activity revealed a

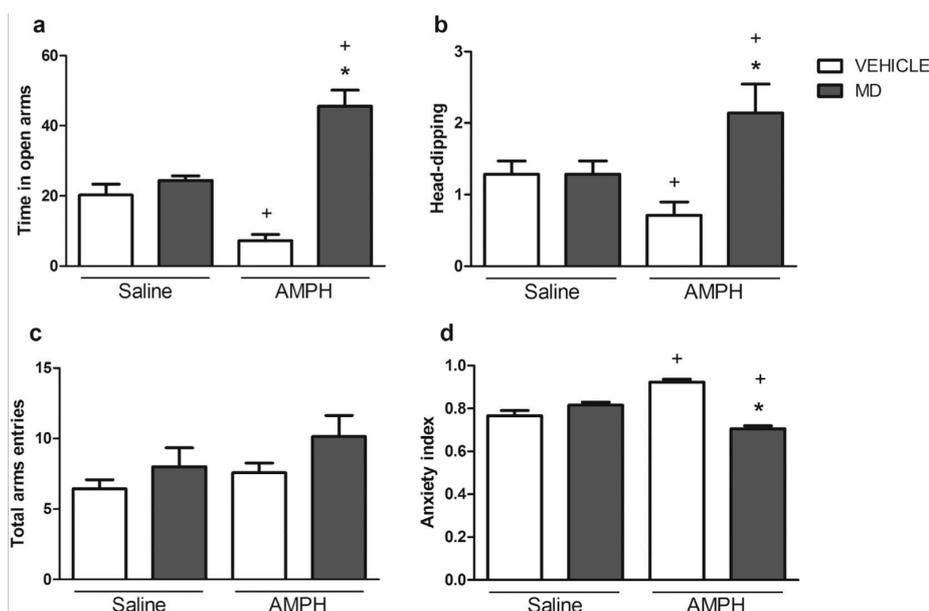


Fig. 2. Modafinil administration prevented anxiety parameters after 48 h of AMPH withdrawal in adolescent rats. (a) Time spent in the open arms. (b) Head-dipping. (c) Total arms entries. (d) Anxiety index. Data are expressed as mean \pm S.E.M. *Indicates significant differences of treatment (vehicle/MD) in the same conditioning (saline/AMPH) ($P < .05$). +Indicates significant differences of conditioning (saline/AMPH) in the same treatment (vehicle/MD) ($P < .05$).

significant main effect of MD, AMPH and MD \times AMPH interaction [$F(1,24) = 179.92, 23.16$ and $128.45, p < .05$, respectively]. Two-way ANOVA of reactive species (RS) levels revealed a significant main effect of MD and AMPH [$F(1,24) = 26.45$ and $22.36, p < .05$, respectively]. Striatal lipid peroxidation (LP) levels showed no differences (Fig. 4).

Tukey's test showed that MD treatment *per se* decreased RS generation, while AMPH conditioning decreased the CAT activity and increased RS generation in the striatum. Animals treated with MD and subsequently conditioned with AMPH showed an increased CAT activity, which was higher than the one observed in MD and AMPH groups. Additionally, MD + AMPH showed partial decreasing of the RS generation, which was significantly minor than AMPH and significantly higher than MD group (Fig. 4a–c). Our current findings demonstrate the beneficial influence of MD on the oxidative status of striatum in AMPH-conditioned adolescent rats.

3.6. Modafinil influence on dopaminergic targets in the ventral tegmental area

In this section, we investigated the neurobiological MD and AMPH

effects in the dopaminergic pathway of VTA of adolescent rats. Two-way ANOVA revealed a significant main effect of MD, AMPH and MD \times AMPH interaction [$F(1,24) = 27.64, 107.07$ and $19.05, p < .05$, respectively] on TH, [$F(1,24) = 72.08, 43.92$ and $154.80, p < .05$, respectively] on the DAT, a significant main effect of MD and MD \times AMPH interaction [$F(1,24) = 283.11$ and $470.13, p < .05$, respectively] on the D1R, and a significant main effect of MD \times AMPH interaction [$F(1,24) = 12.77, p < .05$, respectively] on the D2R immunoreactivity (Fig. 5).

Tukey's test showed that MD increased *per se* DAT, D1R and D2R levels, while AMPH conditioning increased *per se* TH, DAT and D1R immunoreactivity in the ATV. Animals treated with MD and subsequently conditioned with AMPH showed increased TH, decreased DAT and D1R in relation to AMPH group, whose immunoreactivity was also significantly different from the MD group. The MD + AMPH presented decreased D2R levels in comparison to MD treatment alone (Fig. 5a–d). From these findings at molecular level, we can infer that MD exerted an interesting modulatory activity on the VTA of AMPH-conditioned adolescent rats.

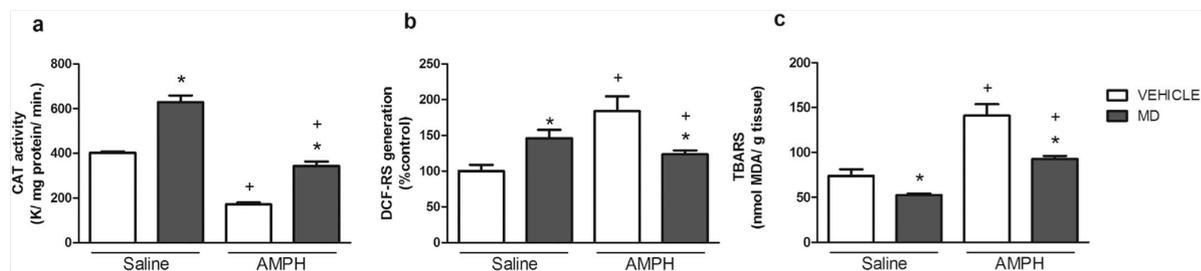


Fig. 3. Modafinil administration modified the oxidative status in the ventral tegmental area of adolescent rats exposed to AMPH-induced CPP. (a) Catalase (CAT) activity. (b) Generation of reactive species. (c) Lipid peroxidation. Data are expressed as mean \pm S.E.M. *Indicates significant differences of treatment (vehicle/MD) in the same conditioning (saline/AMPH) ($P < .05$). +Indicates significant differences of conditioning (saline/AMPH) in the same treatment (vehicle/MD) ($P < .05$).

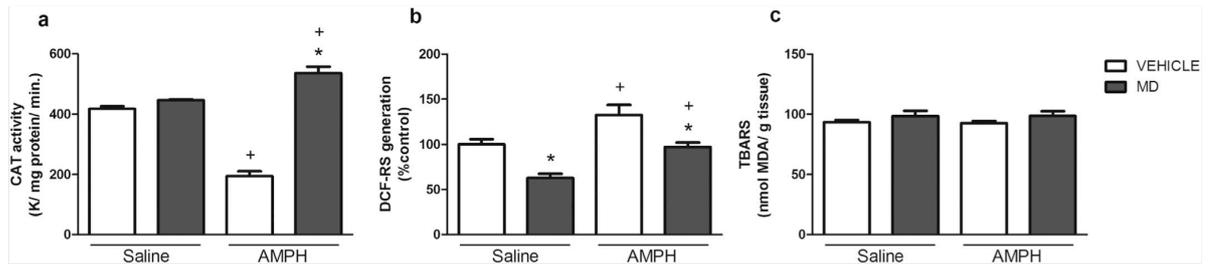


Fig. 4. Modafinil administration modified the oxidative status in the striatum of adolescent rats exposed to AMPH-induced CPP. (a) Catalase (CAT) activity. (b) Generation of reactive species. (c) Lipid peroxidation. Data are expressed as mean \pm S.E.M. *Indicates significant differences of treatment (vehicle/MD) in the same conditioning (saline/AMPH) ($P < .05$). +Indicates significant differences of conditioning (saline/AMPH) in the same treatment (vehicle/MD) ($P < .05$).

3.7. Modafinil influence on striatal dopaminergic targets

Given continuity to our study, neurobiological influences of both MD and AMPH were investigated in the striatal dopaminergic pathway evidencing the same molecular markers of VTA. Two-way ANOVA revealed a significant main effect of MD, AMPH and MD \times AMPH interaction [$F(1,24) = 63.85, 126.78$ and $254.25, p < .05$, respectively] on the TH, [$F(1,24) = 14.90, 4.62$ and $91.28, p < .05$, respectively] on the DAT, [$F(1,24) = 10.67, 36.41$ and $31.54, p < .05$, respectively] on the D1R, and a significant main effect of MD and MD \times AMPH interaction [$F(1,24) = 16.75$ and $8.68, p < .05$, respectively] on the D2R immunoreactivity (Fig. 6).

Tukey's test showed that while both MD treatment and AMPH conditioning *per se* decreased TH and DAT levels in the striatum, the experimental group exposed to MD and subsequently conditioned with AMPH presented increased TH, DAT, D1R and D2R in relation to AMPH and MD groups (Fig. 6a–d). From these outcomes at molecular level, we observed that MD exerted an up-regulation of dopaminergic targets in the striatum of AMPH-conditioned adolescent rats.

4. Discussion

The current study describes that MD-treated animals and subsequently exposed to AMPH during the adolescence showed minor

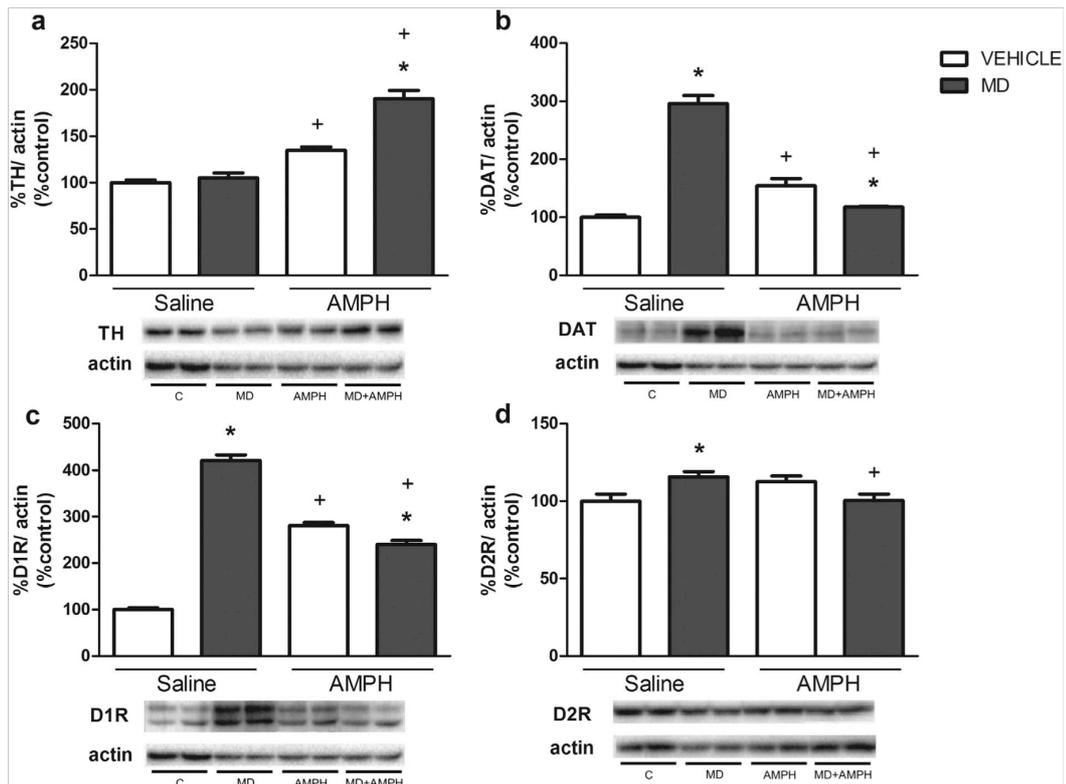


Fig. 5. Modafinil influenced dopaminergic targets in the ventral tegmental area of adolescent rats exposed to AMPH-induced CPP. (a) Tyrosine hydroxylase (TH) levels. (b) Dopamine transporter (DAT) levels. (c) Dopamine receptor type 1 (D1R) levels. (d) Dopamine receptor type 2 (D2R) levels. Data are expressed as mean \pm S.E.M. *Indicates significant differences of treatment (vehicle/MD) in the same conditioning (saline/AMPH) ($P < .05$). +Indicates significant differences of conditioning (saline/AMPH) in the same treatment (vehicle/MD) ($P < .05$). Each two bands, respectively, represents one experimental group.

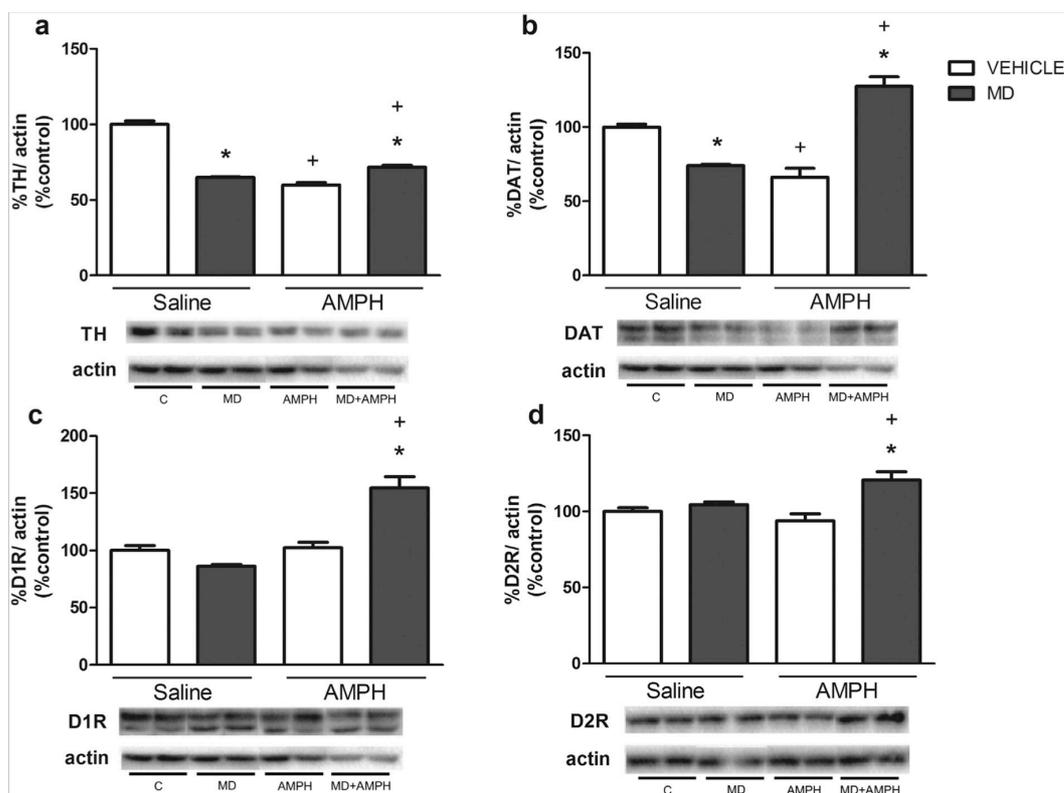


Fig. 6. Modafinil influenced striatal dopaminergic targets of adolescent rats exposed to AMPH-induced CPP. (a) Tyrosine hydroxylase (TH) levels. (b) Dopamine transporter (DAT) levels. (c) Dopamine receptor type 1 (D1R) levels. (d) Dopamine receptor type 2 (D2R) levels. Data are expressed as mean \pm S.E.M. *Indicates significant differences of treatment (vehicle/MD) in the same conditioning (saline/AMPH) ($P < .05$). +Indicates significant differences of conditioning (saline/AMPH) in the same treatment (vehicle/MD) ($P < .05$). Each two bands, respectively, represents one experimental group.

preference for the drug, as well as they did not present anxiety-like symptoms during the withdrawal. In addition to behavioral benefits, MD modulated the oxidative status and molecular markers of dopaminergic pathways of brain areas such as VTA and striatum, which are closely involved in addiction.

Our study shows that MD administration during a critical period as the adolescence decreased the AMPH-induced CPP. Furthermore, very little is known about the MD influences on the brain of adolescent rats (Scoriels et al., 2012). It has been suggested that exogenous factors that disrupt normal adolescent brain development may have negative effects at the moment that the impairment occurs and it persists later in life (Crews et al., 2007). In a previous study of our research group, the initial hypothesis was that MD administration during adolescence would be harmful and the animals would have more preference for psychostimulant drugs such as AMPH in the adulthood. Interestingly, we observed that MD decreased the drug preference without causing locomotor impairment and anxiety-like symptoms in animals after the drug withdrawal (Dias et al., 2017).

As it was already stated, AMPH withdrawal is recognized by the development of different symptoms, including depression, anhedonia, besides anxiety in early drug abstinence (Kitanaka et al., 2008). In addition, anxiety has been considered the main factor that initiates the craving and relapse for the drug (Koob and Le Moal, 2001), worsening the situation. Recent studies have shown anxiolytic properties for MD, as observed through different animal paradigms (Wadhwa et al., 2018, Dias et al., 2017, Ornell et al., 2014). Our findings also showed similar interpretation only when animals were AMPH-conditioned and MD was

able to exert anxiolytic activity. This way, based on our current findings, the MD pretreated animals showed minor anxiety index after AMPH exposure.

As the adolescence is considered a developmental period characterized by increased risk-taking behavior, this period is prone to the initiation of substance use (Casey and Rebecca, 2010; Burke and Miczek, 2014). From this point of view, animal models with rodents have been useful to study the impact of addictive drugs on the behavioral and neurochemical responses during the adolescence. Besides, mechanisms underlying the adolescence developmental differences are not well known, and a proposed explanation is that it is a period of intense synaptic remodeling in the brain (Crews et al., 2007). Thus, in our study the MD-induced plasticity could lead to beneficial behavioral outcomes.

Besides MD ameliorating behavioral parameters, we sought to investigate its actions on the oxidative status, which is closely involved in different disorders of the central nervous system (CNS), including addiction (Yamamoto et al., 2010). Striatum and substantia nigra are the primary brain targets for the damage induced by amphetamines (Moratalla et al., 2017). Thus, mesolimbic and nigrostriatal dopaminergic systems play a pivotal role in the effects of addictive drugs (Everitt and Robbins, 2013).

In fact, the striatum has been identified as a key site for the neuroplastic events that underlie addictive processes, since it is the site with the highest DA concentration in the brain (Luscher and Malenka, 2011). The striatum is subdivided in dorsal and ventral striatum, being the dopamine inputs to these striatal areas originated from separate

populations of midbrain neurons (Di Chiara and Imperato, 1988). The mesolimbic dopaminergic neurons project from the VTA to the ventral striatum, while the nigrostriatal dopamine neurons project from the SN to the dorsal striatum. Dopamine levels in both ventral and dorsal striatum increase following the administration of addictive drugs (Moratalla et al., 2017).

The ventral striatum plays a key role in mediating the reinforcing effects of amphetamines through its dopaminergic innervation (Wise, 2004) and regulates affective components of behavior, including motivational and emotional processes (Meredith et al., 2008), while the dorsal striatum is primarily associated with sensorimotor functions as performance of goal-directed and habitual behaviors (Everitt and Robbins, 2013). Considering this, in our study we chose to evaluate the mesolimbic dopaminergic pathway because the VTA and striatum are closely involved with reinforcement and hedonic processes.

Evaluating VTA and striatum in general, we could infer that MD modulated the oxidative status of both brain areas, preserving the balance between oxidant and antioxidants that were impaired by AMPH exposure. Regarding VTA, one possible explanation is that MD *per se* presented increased CAT activity trying to reestablish the homeostasis because RS levels were elevated. After AMPH exposure, MD could partially restore the CAT activity and decrease RS and LP levels in VTA. Therefore, we can infer that VTA is a more sensitive brain area to changes in the neurochemical environment due to psychostimulant drug use. In the striatum, MD *per se* only had influence decreasing RS generation. After AMPH exposure, the CAT activity was fully preserved by MD. Furthermore, LP alterations were not found, showing less oxidative damages.

It is clear that MD has noteworthy neuroprotective effects upon these brain areas modulating the oxidative status, agreeing with literature data (Xiao et al., 2004, Raineri et al., 2011, Santos, 2012, Ornell, 2014). In summary, the MD neuroprotective effects could happen mainly because of its influence on CAT, an antioxidant defense, rather than directly acting on oxidative damage and these outcomes could be reflected on behavior, as it was shown in our experiment. Furthermore, a pilot study of our research group (data not published) evidenced MD actions increasing CAT activity in distinct brain areas independently of oxidative damages being present.

Moreover, we cannot rule out the fact that MD as the AMPH group presented similar molecular outcomes. From this point of view, amphetamine is an addictive drug that has features that are shared with some extent mechanisms of action with MD. In fact, cognitive enhancers, as well as addictive psychostimulant drugs, are able to alter the DAT functionality and they would ultimately increase DA volume transmission in the synaptic cleft (Bisagno et al., 2016). Furthermore, D1R and D2R are found anatomically abundant in the striatum, mainly in the caudate-putamen and nucleus accumbens (Tarazi and Baldessarini, 2000). These alterations in the dopaminergic activity of this pathway are related to addiction together with other CNS disorders (Sulzer, 2011).

In our study, after AMPH exposure, MD pretreatment exerted a modulatory activity hindering AMPH effects only on DAT and D1R levels in VTA. In the striatum, MD counteracted AMPH effects in relation to TH, DAT, D1R, and D2R levels, leading to an up-regulation of these dopaminergic targets. An important fact that could explain our results is that dopaminergic receptors reach a peak of expression in puberty (PND 28) and then decline to adult levels by PND 35 in healthy adolescent rats (Tarazi and Baldessarini, 2000). One hypothesis to our results could be that MD pretreatment started exactly when those receptors were augmented in the striatum. In view of that, we can propose that the MD-induced DA increase in this brain area was not considered substantial in the adolescence and was not enough to cause behavioral impairments. In this context, MD was able to modify the dopaminergic molecular connections resulting in the maintenance or even optimization of the DA hedonic activity, consequently preventing the preference for the drug (AMPH) as observed by the decrease of the anxiety-like symptoms,

which is a common behavior during drug abstinence (Kitanaka et al., 2008).

Besides that, the dramatic changes in dopamine-rich circuitry during adolescence it is likely to be related to changes in sensitivity to rewards distinct from childhood or adulthood (Rocha et al., 2017; Furuie et al., 2016). So far, MD has shown beneficial effects when impairments occur. Although, when MD was administered to healthy adolescent rats, it could lead to similar molecular alterations in dopaminergic targets according to the different evaluated brain area.

MD could be exerting an up-regulation in the striatal dopaminergic targets after AMPH exposure, possibly to maintain DA levels. Hence, this could be reflected in MD behavioral beneficial effects decreasing AMPH preference and anxiety during the abstinence period. Our findings are in agreement with some literature data, hypothesizing that investigated pharmacotherapies for the addiction management could have different underlying mechanisms. These treatments could act modulating the mesolimbic-dopamine system in a direct or indirect form to alter the reward experience and to recover the dopaminergic homeostasis through DA receptors and/or transporters, thus attenuating negative reinforcing effects of withdrawal (Morley et al., 2017).

5. Conclusions

In this study, to the best of our knowledge, we are showing for the first time that MD administration during the adolescence exerted beneficial influences when these animals were exposed to AMPH-induced CPP paradigm during this transitional life period. These findings allow us to infer that MD is able to modulate the dopaminergic system functionality, consequently preserving VTA and striatum from DA-induced oxidative damages. We believe that MD is counteracting AMPH effects in the different dopaminergic molecular targets attempting to maintain adequate DA levels. As it was evidenced in our previous study, MD treatment exerts different influences according to the evaluated brain area. Nevertheless, further studies are necessary to investigate the MD influence on different brain pathways as a treatment for the withdrawal of addictive drugs during adolescence.

Acknowledgements

The authors are grateful to PRPGP/UFSM for the financial support; as well as CAPES, CNPq and FAPERGS for the fellowships.

Funding

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

References

- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105, 121–126. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3).
- Bisagno, V., González, B., Urbano, F.J., 2016. Cognitive enhancers versus addictive psychostimulants: the good and bad side of dopamine on prefrontal cortical circuits. *Pharmacol. Res.* 109, 108–118. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.01.013>.
- Boskera, W.M., Neunera, I., Shaha, N.J., 2017. The role of impulsivity in psychostimulant- and stress-induced dopamine release: Review of human imaging studies. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 78, 82–90. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.04.008>.
- Burke, A.R., Miczek, K.A., 2014. Stress in adolescence and drugs of abuse in rodent models: role of dopamine, CRF, and HPA axis. *Psychopharmacology* 231 (8), 1557–1580. <https://doi.org/10.1007/s00213-013-3369-1>.
- Carlezon, W.A., et al., 2002. Antidepressant-like effects of cytidine in the forced swim test in rats. *Biol. Psychiatry* 51, 882–889. [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(01\)01344-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(01)01344-0).
- Casey, B.J., Rebecca, M.J., 2010. Neurobiology of the adolescent brain and behavior. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* 49 (12), 1189–1285. <https://doi.org/10.1016/j.jaac.2010.08.017>.
- Chen, C.Y., Storr, C.L., Anthony, J.C., 2009. Early-onset drug use and risk for drug dependence problems. *Addict. Behav.* 34, 319–322. <https://doi.org/10.1016/j.addbeh.2008.10.021>.

- Cohen, H., et al., 2012. The neuropeptide Y (NPY)-ergic system is associated with behavioral resilience to stress exposure in an animal model of post-traumatic stress disorder. *Neuropsychopharmacology* 37, 350–363. <https://doi.org/10.1038/npp.2011.230>.
- Crews, F., He, J., Hodge, C., 2007. Adolescent cortical development: a critical period of vulnerability for addiction. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 86, 189–199. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2006.12.001>.
- Delgado, M.R., 2007. Reward-related responses in the human striatum. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1104, 70–88. <https://doi.org/10.1196/annals.1390.002>.
- Di Chiara, G., Imperato, A., 1988. Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 5274–5278.
- Dias, V.T., et al., 2017. Could modafinil prevent psychostimulant addiction? An experimental study in rats. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 121, 400–408. <https://doi.org/10.1111/bcpt.12821>.
- Everitt, B.J., Robbins, T.W., 2013. From the ventral to the dorsal striatum: devolving views of their roles in drug addiction. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 37, 1946–1954. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2013.02.010>.
- Furuie, H., Yamada, K., Ichitani, Y., 2016. Chronic NMDA receptor blockade in early postnatal period, but not in adulthood, impairs methamphetamine-induced conditioned place preference in rats. *Behav. Brain Res.* 301, 253–257. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.12.044>.
- Gerrard, P., Malcolm, R., 2007. Mechanisms of modafinil: a review of current research. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 3, 349–364 (PMCID: PMC2654794).
- Hempel, S.L., et al., 1999. Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 2', 7'-dichloro dihydrofluorescein diacetate, 5 (and 6)-carboxy-2', 7'-dichloro dihydrofluorescein diacetate, and dihydrohodamine 123. *Free Radic. Biol. Med.* 27, 146–159. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(99\)00061-1](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(99)00061-1).
- Hutson, P.H., Tarazi, F.I., Madhoo, M., Slawewski, C., Patkar, A.A., 2014. Preclinical pharmacology of amphetamine: implications for the treatment of neuropsychiatric disorders. *Pharmacol. Ther.* 143, 253–264. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.03.005>.
- Ikemoto, S., 2010. Brain reward circuitry beyond the mesolimbic dopamine system: a neurobiological theory. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 35, 129–150. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2010.02.001>.
- Katzung, B., Masters, S., Trevor, A., 2017. *Basic and Clinical Pharmacology*, 13th edition. AMGH.
- Kitanaka, J., Kitanaka, N., Takemura, M., 2008. Neurochemical consequences of dysphoric state during amphetamine withdrawal in animal models: a review. *Neurochem. Res.* 33, 204–219. <https://doi.org/10.1007/s11064-007-9409-7>.
- Koob, G.F., Le Moal, M., 2001. Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis. *Neuropsychopharmacology* 24, 97–129. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(00\)00195-0](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(00)00195-0).
- Kuhn, F.T., et al., 2015. Toxicological aspects of *trans* fat consumption over two sequential generations of rats: oxidative damage and preference for amphetamine. *Toxicol. Lett.* 232, 58–67. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.10.001>.
- Luscher, C., Malenka, R.C., 2011. Drug-evoked synaptic plasticity in addiction: from molecular changes to circuit remodeling. *Neuron* 69, 650–663. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.01.017>.
- Meredith, G.E., Baldo, B.A., Andrezewski, M.E., Kelley, A.E., 2008. The structural basis for mapping behavior onto the ventral striatum and its subdivisions. *Brain Struct. Funct.* 213, 17–27. <https://doi.org/10.1007/s00429-008-0175-3>.
- Minzenberg, M.J., Carter, C.S., 2008. Modafinil: a review of neurochemical actions and effects on cognition. *Neuropsychopharmacology* 33, 1477–1502. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301534>.
- Moratalla, R., Khairnar, A., Simola, N., et al., 2017. Amphetamine-related drugs neurotoxicity in humans and in experimental animals: Main mechanisms. *Prog. Neurobiol.* 155, 149–170. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2015.09.011>.
- Morley, K.C., Cornish, J.L., Faingold, A., Wood, K., Haber, P.S., 2017. Pharmacotherapeutic agents in the treatment of methamphetamine dependence. *Expert Opin. Investig. Drugs* 26 (5), 563–578. <https://doi.org/10.1080/13543784.2017.1313229>.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95, 351–358. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3).
- Ornell, F., et al., 2014. Modafinil effects on behavior and oxidative damage parameters in brain of Wistar rats. *Behav. Neurol.* 917246, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2014/917246>.
- Paxinos, G., Charles, W., 2013. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, London.
- Raineri, M., Peskin, M.V., Goitia, B., et al., 2011. Attenuated methamphetamine induced neurotoxicity by modafinil administration in mice. *Synapse* 65 (10), 1087–1098. <https://doi.org/10.1002/syn.20943>.
- Raineri, M., Gonzalez, B., Goitia, B., Garcia-Rill, E., Krasnova, I.N., Cadet, J.L., Urbano, F.J., Bisagno, V., 2012. Modafinil abrogates methamphetamine-induced neuroinflammation and apoptotic effects in the mouse striatum. *PLoS One* 7 (10), e46599. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046599>.
- Reynolds, L.M., Pokinko, M., Torres-Berrio, A., Cuesta, S., Lambert, L.C., Pellitero, E.D.C., Wodzinski, M., Manitt, C., Krimpenfort, P., Kolb, B., Flores, C., 2018. DCC receptors drive prefrontal cortex maturation by determining dopamine axon targeting in adolescence. *Biol. Psychiatry* 83 (2), 181–192. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2017.06.009>.
- Rocha, A., Hart, N., Trujillo, K.A., 2017. Differences between adolescents and adults in the acute effects of PCP and ketamine and in sensitization following intermittent administration. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 157, 24–34. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2017.04.007>.
- Santos, C.M.M., 2012. New agents promote neuroprotection in Parkinson's disease models. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 11 (4), 410–418. <https://doi.org/10.2174/187152712800792820>.
- Schelle, K.J., Faulmüller, N., Caviola, L., Hewstone, M., 2014. Attitudes toward pharmacological cognitive enhancement—a review. *Front. Syst. Neurosci.* 8, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2014.00053>.
- Scoriels, L., Jones, P.B., Sahakian, B.J., 2012. Modafinil effects on cognition and emotion in schizophrenia and its neurochemical modulation in the brain. *Neuropharmacology* 64, 168–184. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.07.011>.
- Sulzer, D., 2011. How addictive drugs disrupt presynaptic dopamine neurotransmission. *Neuron* 69, 628–649. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.02.010>.
- Tarazi, F.I., Baldessarini, R.J., 2000. Comparative postnatal development of dopamine D₁, D₂ and D₄ receptors in rat forebrain. *Int. J. Dev. Neurosci.* 18 (1), 29–37. [https://doi.org/10.1016/S0736-5748\(99\)00108-2](https://doi.org/10.1016/S0736-5748(99)00108-2).
- Tsanov, M., et al., 2010. The psychostimulant modafinil facilitates water maze performance and augments synaptic potentiation in dentate gyrus. *Neuropharmacology* 59, 9–19. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2010.03.010>.
- United States, Substance Abuse and Mental Health Services Administration, Center for Behavioral Health Statistics and Quality, 2014. Age of substance use initiation among treatment admissions aged 18 to 30. In: *The TEDS Report*, (Rockville, Maryland, July 2014).
- UNODC – United Nations Office for Drug Control and Crime Prevention, 2018. *World Drug Report*.
- Vaughan, R.A., Foster, J.D., 2013. Mechanisms of dopamine transporter regulation in normal and disease states. *Trends Pharmacol. Sci.* 34, 489–496. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2013.07.005>.
- Volkow, N.D., et al., 2012. Addiction circuitry in the human brain. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 52, 321–336. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010611-134625>.
- Wadhwa, M., Chauhan, G., Roy, K., Sahu, S., Deep, S., Jain, V., Kishore, K., Ray, K., Thakur, L., Panjwani, U., 2018. Caffeine and modafinil ameliorate the neuroinflammation and anxious behavior in rats during sleep deprivation by inhibiting the microglia activation. *Front. Cell. Neurosci.* 12, 1–16. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00049>.
- Wise, R.A., 2004. Dopamine, learning and motivation. *Nat. Rev. Neurosci.* 483–494. <https://doi.org/10.1038/nrn1406>.
- Wood, S., Sage, J.R., Shuman, T., Anagnostaras, S.G., 2013. Psychostimulants and cognition: a continuum of behavioral and cognitive activation. *Pharmacol. Rev.* 66 (1), 193–221. <https://doi.org/10.1124/pr.112.007054>.
- Xiao, Y.L., Fu, J.M., Dong, Z., Yang, J.Q., Zeng, F.X., Zhu, L.X., et al., 2004. Neuroprotective mechanism of modafinil on Parkinson disease induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Acta Pharmacol. Sin.* 25, 301–305 (PMID: 15000882).
- Yamamoto, B.K., Moszczynska, A., Gudelsky, G.A., 2010. Amphetamine toxicities: Classical and emerging mechanisms. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1187, 101–121. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.05141.x>.

6.4 PROTOCOLO EXPERIMENTAL IV

Manuscrito científico em fase de submissão para periódico internacional

Modafinil recovers BDNF and GDNF levels in the ventral striatum and amphetamine-induced conditioned place preference is not reinstated in young rats

Verônica Tironi Dias¹, Livia Ferraz D'ávila¹, Domenika Rubert Rossato², Laura Hautrive Milanesi¹ and Marilise Escobar Burger^{1,2}

¹ Graduate Program of Pharmacology, Federal University of Santa Maria (UFSM) - RS, Santa Maria, Brazil

² Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Santa Maria (UFSM) – RS, Santa Maria, Brazil

Abstract

Drug abuse and addiction are considered major health problems and social concerns nowadays. Based on previous studies of our research group, the rats that received modafinil (MOD) during adolescence before amphetamine (AMPH) showed less preference for the drug in the adolescence and adulthood periods. The objective of this study is to show if MOD could be useful in the treatment of AMPH relapse in adolescent rats and also verify the MOD influences on the molecular status of the ventral striatum of these animals. Besides that, the behavioral influence of MOD on locomotor activity and short-term memory were evaluated. Our findings showed that adolescent animals developed AMPH preference and relapse without locomotor or memory impairment. Although, the rats treated with MOD do not present relapse for the drug and presented memory enhancement. Regarding the molecular status of the ventral striatum, MOD treatment upon AMPH exposure increased DAT, VMAT-2, D1R and D2R levels which were decreased by AMPH exposure. About the molecular markers involved in the maintenance of dopaminergic neurons, MOD treatment upon AMPH exposure increased TrK-B, pro-BDNF, BDNF and GDNF levels, which were also decreased by AMPH exposure. So far, MOD treatment upon AMPH exposure prevented relapse as it also improved memory of rats during the adolescence. These outcomes were accompanied by an up-regulation of dopaminergic targets and

neurotrophins related to the maintenance of this important system in drug addiction. Thus, evidencing the MOD neuroprotective effects on the ventral striatum of rats.

Keywords: relapse; dopaminergic system; neurotrophins; addiction.

Introduction

Drug abuse continues to be a major health problem worldwide nowadays (UNODC, 2018). Addiction is a chronic disease that causes physiologic and psychological impairments to the individual and as consequence leads to economic burden to society (POTENZA, 2011). The stimulant drugs are the second category of drugs most used in the world corresponding to 68 million of users only in the 2018 year (WORLD DRUG REPORT, 2019). Particularly, the amphetamines are drugs frequently abused by adolescents (SCHELLE et al., 2014, BASTOS et al., 2017) and existing studies have found a high correlation between adolescent abuse and becoming a problem drug user in adulthood (CHEN, STORR, ANTHONY, 2009). During adolescence, the brain is not completely mature and any exogenous factor, such as amphetamine (AMPH), could lead to more prejudicial impairments in the brain in development and the consequences could be presented at the moment that the impairment occurs and/ or persists over life (CREWS et al., 2007).

Regarding drug abuse and AMPH, the neurotransmitter dopamine (DA) is highly involved. AMPH is known to activate the reward pathway causing DA release in a more explosive and pleasurable manner than the release that naturally occurs in the ventral striatum or *nucleus accumbens*. AMPH acutely increases extracellular concentrations of DA mainly by its blockade reuptake involving actions on the DA vesicular transporter (DAT), the vesicular monoamine transporter 2 (VMAT-2) and monoamine oxidase (MAO) (VAUGHAN, FOSTER, 2013).

Based on previous studies of our research group (DIAS et al., 2017, 2019) modafinil (MOD) administration when given before AMPH exposure was able to reduce the preference for AMPH in adolescence and young adulthood periods. MOD (2-[(diphenylmethyl) sulfinyl] acetamide) is a wake-promoting drug distinct from classical stimulants approved by FDA to treat narcolepsy besides its off label uses. It improves wakefulness with few peripheral or central side effects (WOOD et al., 2013) and the main mechanism of action is the weak DAT inhibition (MINZENBERG, CARTER, 2008). From this point of view, the objective of this study was to expose if

MOD, when given as a treatment for AMPH addiction in rats, could present the same positive results observed in previous studies.

Materials and methods

Animals

Twenty-eight young male rats (postnatal day (PND) 21, weighing 100-150g) were housed in groups of four animals per cage in a room with controlled temperature (23 ± 1 °C), on a 12-h light/ dark cycle (lights turned on at 7 a.m.). Animals had free access to food and water *ad libitum* during all phases of the experiment. The experimental procedures followed international norms of care and animal maintenance approved by the Research Ethics Committee of the Federal University of Santa Maria (UFSM-9429030215), which is affiliated to the National Council for the Control of Animal Experiments (CONCEA).

Experimental design

To evaluate the effects of MOD repeated doses after the CPP already established by AMPH in the adolescence of rats, after 7 days of acclimation, rats were designed to two experimental groups (PND 28) and submitted to the CPP protocol: control group (received saline, 0,9% NaCl solution, i.p., n=14) and amphetamine (AMPH) group (received 4mg/ kg i.p. of AMPH, n=14) (KUHN et al., 2015). One day after the CPP test half of each group was subdivided resulting in the following groups: control group, MOD group, AMPH group and, AMPH+MOD group. They received MOD (64 mg/ kg p.o.) or vehicle for 14 days of treatment. On the PND 53, the animals were reconditioned with AMPH for 3 days and on the next day submitted to the relapse test (SEGAT et al. 2016). 48 hours after the last AMPH dose, locomotor activity and short-term memory were assessed. On the next day, the rats were anesthetized with isoflurane, euthanized and their brains were dissected to extract the ventral striatum (PAXINOS; CHARLES, 2013) for western blot analysis.

Drugs

Modafinil tablets (Stavigile; Libbs, São Paulo, Brazil) were pulverized by sonication in distilled water and the DMSO (0.1% v/v) was added to form a suspension. The treatment was administered by gavage at the dose of 64 mg/ kg.

The d, l-amphetamine (AMPH; Merck, Germany) dose chosen was 4 mg/ ml, i.p., which is known to induce CPP (DIAS et al., 2017).

Conditioned place preference (CPP)

The CPP is a box with two compartments of equal size (45 x 45 x 50 cm) and different environmental stimuli (one compartment had a smooth with floor and smooth white walls. Both compartments were accessible through a central compartment (18 x 36 x 50 cm) separated by manual doors.

The AMPH-induced CPP was performed according to the following steps: habituation, pre-test, conditioning and, test. On the PND 28, habituation was conducted. This phase consisted of leaving the animals for 15 minutes in each compartment, reaching the total time of 30 minutes. The purpose of this phase is to exclude exploratory behavior that is common in new environments to avoid misinterpretations. On the following day (PND 29) the pre-test was conducted. This phase consists in placing the animal in the central compartment with free access to the entire apparatus. The time spent in each compartment by the rat was assessed for 15 minutes. This phase was carried out to determine the innate environmental compartment preference. Based on these results, each rat was conditioned with AMPH in the compartment that it spent less time and with saline in the compartment that it spent more time during the pre-test.

The conditioning phase (PND 30-37) was carried out for 8 days. Each animal received AMPH (one daily injection) in the less preferred compartment paired with vehicle in the opposite compartment after a 4-h interval. Immediately after each AMPH/ vehicle injection, the rat was confined in the compartment for 25 minutes (CARLEZON et al., 2002). The vehicle-treated groups received two daily injections of saline in both CPP compartments.

The test, without drug/ vehicle administration, was conducted on PND 38 (preference) and PND 56 (relapse), and the time spent in each compartment was assessed for 15 minutes. Results express the percentage of time spent by the animals in the compartment associated with AMPH during the period of abstinence.

Locomotor activity

The locomotor activity was evaluated in the open-field (OF) test paradigm. Each rat was placed individually in the center of an arena (40 x 40 x 30 cm) enclosed

by black matte walls and floor divided into squares, as described by Kerr *et al.* (2005). The number of crossings (horizontal squares crossed with four paws) was analyzed for 5 min.

Short-term memory

The short-term memory was evaluated in the novel object recognition task (NORT). The analysis consisted first in the training session in which rats were exposed to two identical objects (A1 and A2, double Lego toys) positioned in two adjacent corners, and they were allowed to freely explore the objects for 10 min. The short-term memory test was performed 1 hour after the training session and the rats were allowed to freely explore the arena for 5 min. in the presence of two objects: a familiar object A and a second novel object B, placed at the same locations as in the training session. The objects had similar textures, colors and, sizes but distinctive shapes. Every time the rats sniffed at or touched the object with the nose was defined as exploration. A recognition index was calculated by the ratio time spent exploring the novel object/(time spent exploring the familiar object + time spent exploring the novel object) (DE LIMA *et al.*, 2005).

Statistical analysis

The results from behavioral and molecular assays were expressed as the mean \pm standard error (S.E.M.) and analyzed by Student's t-test or two-way ANOVA followed by Tukey's *post hoc* test (software package Statistica 10.0). A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant for all comparisons made.

Results

Body weight gain

No differences in the body weight gain were observed among the experimental groups (data not shown).

AMPH-CPP and influence of MOD treatment during adolescence

Student's t-test showed that AMPH was able to induce CPP in adolescent rats ($p < 0.05$) (Figure 1A).

Two-way ANOVA of CPP revealed a significant main effect of MOD and AMPH x MOD interaction [$F(1,24)=6,16$ and $F(1,24)=8,08$, $p<0.05$], respectively on AMPH re-conditioning. Tukey's test showed that AMPH re-conditioning increased time spent in the drug-conditioned compartment, while MOD treatment did not induce AMPH-CPP (Figure 1B).

Influence of MOD treatment upon AMPH-reconditioning during adolescence on locomotor activity

No differences were observed in the crossing number among the experimental groups (data not shown).

Influence of MOD treatment upon AMPH-reconditioning during adolescence on short-term memory

Two-way ANOVA of short-term memory revealed a significant main effect of AMPH and MOD [$F(1,24)=5.78$ and $F(1,24)=15.21$, $p<0.05$], respectively. Tukey's test revealed that the MOD group presented an increased recognition index compared to the control group. While the AMPH+MOD group presented an increased recognition index compared to the AMPH group and presented a decreased recognition index compared to the MOD group (Figure 2).

Influence of MOD treatment upon AMPH-reconditioning during adolescence on dopaminergic targets

Two-way ANOVA revealed a significant main effect of MOD and AMPH x MOD interaction [$F(1,24)=37.64$, $F(1,24)=80.93$, $p<0.05$, respectively] on DAT, [$F(1,24)=13.08$, $F(1,24)=4.37$, $p<0.05$, respectively] on D1R, a significant main effect of AMPH and AMPH x MOD interaction [$F(1,24)=21.19$, $F(1,24)=45.07$, $p<0.05$, respectively] on D2R, and a significant main effect of AMPH and MOD [$F(1,24)=6.51$, $F(1,24)=18.41$, $p<0.05$, respectively] on VMAT-2 immunoreactivity (Figure 3).

Tukey's test showed that MOD decreased *per se* only the D2R levels, while AMPH reconditioning decreased DAT and D2R levels in the ventral striatum. AMPH re-conditioned animals and treated with MOD showed increased DAT and VMAT-2 levels compared to both AMPH and MOD groups, as also showed increased D1R and D2R levels compared to AMPH group (Figure 3a-d).

Influence of MOD treatment upon AMPH-reconditioning during adolescence on synaptic plasticity related-neurotrophins

Two-way ANOVA revealed a significant main effect of AMPH and AMPH x MOD interaction [$F(1,24)=5.86$, $F(1,24)=42.71$, $p<0.05$, respectively] on TrK-B, [$F(1,24)=26.15$, $F(1,24)=6.27$, $p<0.05$, respectively] on pro-BDNF, a significant main effect of AMPH, MOD and AMPH x MOD interaction [$F(1,24)=114.49$, $F(1,24)=4.86$ and $F(1,24)=8.29$, $p<0.05$, respectively] on BDNF, and a significant main effect of MOD and AMPH x MOD [$F(1,24)=10.30$, $F(1,24)=11.40$, $p<0.05$, respectively] on GDNF immunoreactivity (Figure 4).

Tukey's test showed that MOD decreased *per se* only the TrK-B levels, while AMPH re-conditioning decreased TrK-B, pro-BDNF, BDNF, and GDNF levels in the ventral striatum. AMPH re-conditioned animals and treated with MOD showed increased TrK-B, pro-BDNF, BDNF, and GDNF levels compared to AMPH group, as also showed increased TrK-B and decreased BDNF levels compared to MOD group (Figure 4a-d).

Discussion

From partial results of the current study, it was possible to observe that the AMPH conditioning (4mg/kg, i.p.) was able to induce conditioned place preference in adolescent rats. After 14 days of MOD treatment (64mg/kg) or vehicle, the AMPH re-conditioning induced CPP only in the AMPH group, while MOD treatment did not induce AMPH-CPP. This finding is agreeing with our previous studies, which showed that pretreatment with MOD reduced AMPH-CPP in both, adolescence and young adulthood periods (DIAS et al., 2017, 2019). This is a very interesting outcome since it indicates that MOD could be a useful tool in the management of AMPH addiction, especially in the drug relapse.

This study is in accordance with other that show beneficial influences of MOD treatment related to increased periods of abstinence in cocaine addicts with comorbid alcohol dependence (ANDERSON et al., 2009), as also with pre-clinical studies, MOD decreased methamphetamine self-administration (HOLTZ et al., 2012), it was effective at reducing cocaine-maintained responding in non-primates (NEWMAN et al., 2010). In a model of relapse, MOD attenuating the reinstatement of methamphetamine seeking behavior following conditioned cues and drug-priming injections (REICHEL; SEE, 2010).

Besides that, the short-term memory of animals was influenced by MOD *per se* and MOD treatment upon AMPH exposure, increasing the recognition index. This outcome is agreeing with other studies that showed MOD beneficial effects on cognition, including enhancement of working memory performance, learning acquisition, spatial memory, improved sustained attention and recognition memory in both rats and humans (MINZENBERG; CARTER, 2008; SASE et al., 2012; GARCIA et al., 2013; SCORIEL, JONES, SAHAKIAN, 2013; GONZÁLEZ et al., 2014). Although, after AMPH-reconditioning during adolescence, it was not observed pronounceable AMPH detrimental effects, since AMPH and control group presented similar effects on short-memory, even though AMPH abuse is known to cause cognitive deficits (BROADBENT et al., 2010).

Additionally, we investigated at the molecular level some targets of the dopaminergic pathway and some neurotrophins related to maintenance and survival of dopaminergic neurons in the ventral striatum of rats, since they are directly affected by psychostimulants such as AMPH (CARNICELLA; RON, 2009). Concerning dopaminergic targets, MOD treatment upon AMPH exposure resulted in increased DAT, VMAT-2, D1R, and D2R levels, which were decreased by AMPH exposure. As we discuss in our previous study, we believe that MOD exerted a modulatory activity in the striatum to reestablish the dopaminergic homeostasis maintaining the adequate dopamine levels and this was reflected in the behavior (DIAS et al., 2019).

To reinforce these results, MOD treatment upon AMPH exposure resulted in increased TrK-B, pro-BDNF, BDNF, and GDNF levels, which were also decreased by AMPH exposure. These results are very interesting and innovative; at the moment, this is the first study to show influences of MOD on GDNF levels upon AMPH exposure and supports previous research that suggests the regulatory role of GDNF in addiction. The activation of the GDNF pathway results in the attenuation of biochemical and behavioral changes caused by abused drugs since it promotes maintenance and survival of dopaminergic neurons (CARNICELLA; RON, 2009). Thus, the up-regulation of GDNF could be a valuable strategy to counteract addiction as stated by other authors, although it is unlikely that GDNF by itself could be used as a therapeutic agent because it is a 24KDa protein that cannot rapidly cross the blood-brain barrier (KASTIN et al., 2003). Likewise, the studies involving BDNF influences in facilitating or inhibiting drug-taking behaviors are dependent on the drug

type, brain area, the addiction phase (initiation, maintenance, or abstinence/relapse) (GHITZA et al., 2010). Given that, drugs such as MOD that exert positive influences on these endogenous neurotrophins could be useful for the treatment of drug abuse.

Taken together, these findings and the outcomes obtained from previous protocols, we can hypothesize that treatment with MOD upon AMPH exposure prevented relapse as also improved memory of adolescent rats. These behavioral outcomes were accompanied by an up-regulation of dopaminergic targets and neurotrophins related to the survival of dopaminergic neurons evidencing the MOD neuroprotective effects on ventral striatum.

References

ANDERSON, A.L. et al. Modafinil for the treatment of cocaine dependence. **Drug Alcohol Dependence**. v. 104, p. 133–139, 2009. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2009.04.015.

BASTOS, F. I. P. M. et al. (Org.). **III Levantamento Nacional sobre o uso de drogas pela população brasileira**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ/ICICT, v. 528, 2017.

BROADBENT, N. J. et al. Object recognition memory and the rodent hippocampus. **Learning & Memory**. v. 17, p. 5-11, 2010. <http://www.learnmem.org/cgi/doi/10.1101/lm.1650110>.

CARLEZON, W. A. et al. Antidepressant-like effects of cytidine in the forced swim test in rats. **Biological Psychiatry**. v. 51, p. 882–9, 2002.

CARNICELLA, S.; RON, D. GDNF - a potential target to treat addiction. **Pharmacology & Therapeutics**. v. 122, p. 9–18, 2009. doi:10.1016/j.pharmthera.2008.12.001.

CHEN, C-Y.; STORR, C. L.; ANTHONY, J. C. Early-onset drug use and risk for drug dependence problems. **Addictive Behaviors**. v. 34, p. 319–322, 2009.

CREWS, F., HE, J., HODGE, C., 2007. Adolescent cortical development: a critical period of vulnerability for addiction. **Pharmacological Biochemistry and Behavior**. v. 86, p. 189-199.

DE LIMA, M. N. Reversal of age-related deficits in object recognition memory in rats with l-deprenyl. **Experimental Gerontology**. v. 40, p. 506-511, 2005.

DIAS, V.T. et al. Could Modafinil Prevent Psychostimulant Addiction? An Experimental Study in Rats. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**. v. 121, n. 5, p. 400-408, 2017.

DIAS, V. T. et al. Modafinil reduces amphetamine preference and prevents anxiety-like symptoms during drug withdrawal in young rats: Involvement of dopaminergic targets in VTA and striatum. **Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry** v. 92, p. 199–206, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2019.01.007>.

GARCIA, V. A. et al. Modafinil ameliorates cognitive deficits induced by maternal separation and sleep deprivation. **Behavioural Brain Research**. v. 253, p. 274-279, 2013.

GHITZA, U. E. et al. Role of BDNF and GDNF in drug reward and relapse: A review. **Neuroscience Biobehavioral Reviews**. v. 32, p.157–171, 2010. doi:10.1016/j.neubiorev.2009.11.009.

GONZÁLEZ, B. et al. Modafinil improves methamphetamine-induced object recognition deficits and restores prefrontal cortex ERK signaling in mice. **Neuropharmacology**. v. 87, p. 188-197, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.02.002>.

HOLTZ, N. A. et al. Reinstatement of methamphetamine seeking in male and female rats treated with modafinil and allopregnanolone. **Drug and Alcohol Dependence**. v. 120, p. 233–237, 2012. doi:10.1016/j.drugalcdep.2011.07.010.

KASTIN, A. J.; AKERSTROM, V.; PAN, W. Glial cell line-derived neurotrophic factor does not enter normal mouse brain. **Neuroscience Letters**. v. 340, p. 239–241, 2003.

KERR, D., S. et al. Angiotensin II blocks memory consolidation through an AT2 receptor-dependent mechanism. **Psychopharmacology**. v. 175, p. 529-535, 2005.

KUHN, F. T. et al. Toxicological aspects of trans fat consumption over two sequential generations of rats: Oxidative damage and preference for amphetamine. **Toxicology Letters**. v. 232, p. 58-67, 2015.

MINZENBERG, M. J.; CARTER, C. S. Modafinil: A review of neurochemical actions and effects on cognition. **Neuropsychopharmacology**. v. 33, p. 1477-1502, 2008.

NEWMAN, J. L. et al. Behavioral evaluation of modafinil and the abuse-related effects of cocaine in rhesus monkeys. **Experimental and Clinical Psychopharmacology**. v. 18, p. 395–408, 2010.

PAXINOS, G.; CHARLES, W. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. Academic Press, 7th edition, London, 2013.

POTENZA, M. N. et al. Neuroscience of behavioral and pharmacological treatments for addictions. **Neuron**. v. 69, p. 695-712, 2011.

REICHEL, C.M.; SEE, R.E. Modafinil effects on reinstatement of methamphetamine seeking in a rat model of relapse. **Psychopharmacology**. v. 210, p. 337–346, 2010.

SASE, S. et al. Modafinil improves performance in the multiple T-Maze and modifies GluR1, GluR2, D2 and NR1 receptor complex levels in the C57BL/6J mouse. **Amino Acids**. v. 43, p. 2285–2292, 2012. DOI 10.1007/s00726-012-1306-y.

SCHELLE, K. J. et al., 2014. Attitudes toward pharmacological cognitive enhancement-a review. **Frontiers in System Neuroscience**. v. 8, p. 1-14, 2014.

SCORIEL, L.; JONES, P. B.; SAHAKIAN, B. J. Modafinil effects on cognition and emotion in schizophrenia and its neurochemical modulation in the brain. **Neuropharmacology**. v. 64, p. 168-184, 2013.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.07.011>.

SEGAT, H.J. et al. m-Trifluoromethyl-diphenyldiselenide as a pharmacological tool to treat preference symptoms related to AMPH-induced dependence in rats. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**. v. 66, p. 1-7, 2016.

United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC). UNODC Annual Report 2018.

VAUGHAN, R. A., FOSTER, J. D. Mechanisms of dopamine transporter regulation in normal and disease states. **Trends in Pharmacological Sciences**. v. 34, p. 489-496, 2013.

WOOD, S. et al., Psychostimulants and cognition: a continuum of behavioral and cognitive activation. **Pharmacological Reviews**. v. 66 (1), p. 193-221, 2013.

World Drug Report 2019 (United Nations publication, Sales No. E.19.XI.8).

FIGURES

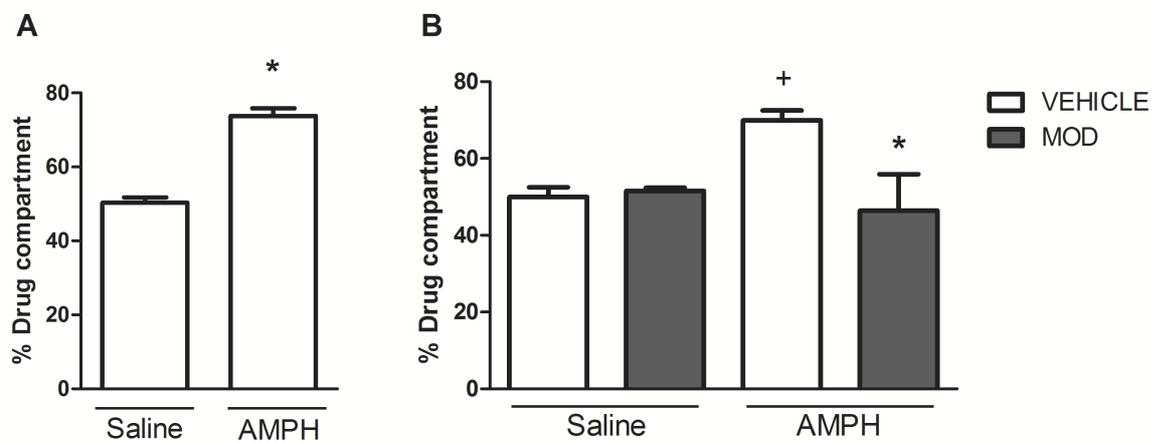


Figure 1. AMPH-CPP before (A) and after MOD treatment (B). Data are expressed as mean \pm S.E.M. *indicates significant differences of treatment (vehicle/ MOD) in the same conditioning (saline/ AMPH) ($P < 0.05$). +indicates significant differences of conditioning (saline/ AMPH) in the same treatment (vehicle/ MOD) ($P < 0.05$). Abbreviations: MOD: modafinil; AMPH: amphetamine.

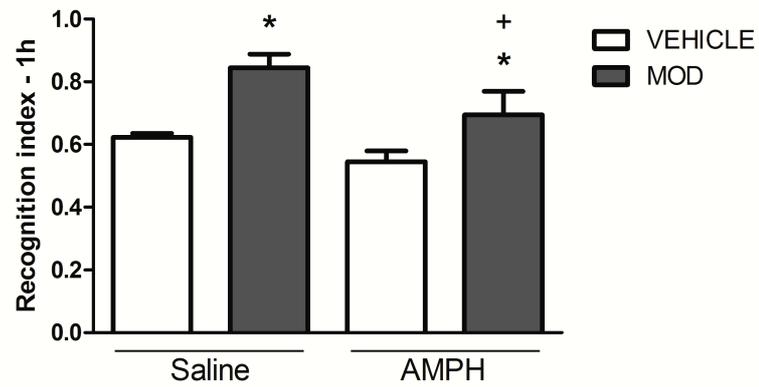


Figure 2. Influence of MOD treatment upon AMPH-reconditioning during adolescence on short-term memory. Data are expressed as mean \pm S.E.M. *indicates significant differences of treatment (vehicle/ MOD) in the same conditioning (saline/ AMPH) ($P < 0.05$). +indicates significant differences of conditioning (saline/ AMPH) in the same treatment (vehicle/ MOD) ($P < 0.05$). Abbreviations: MOD: modafinil; AMPH: amphetamine.

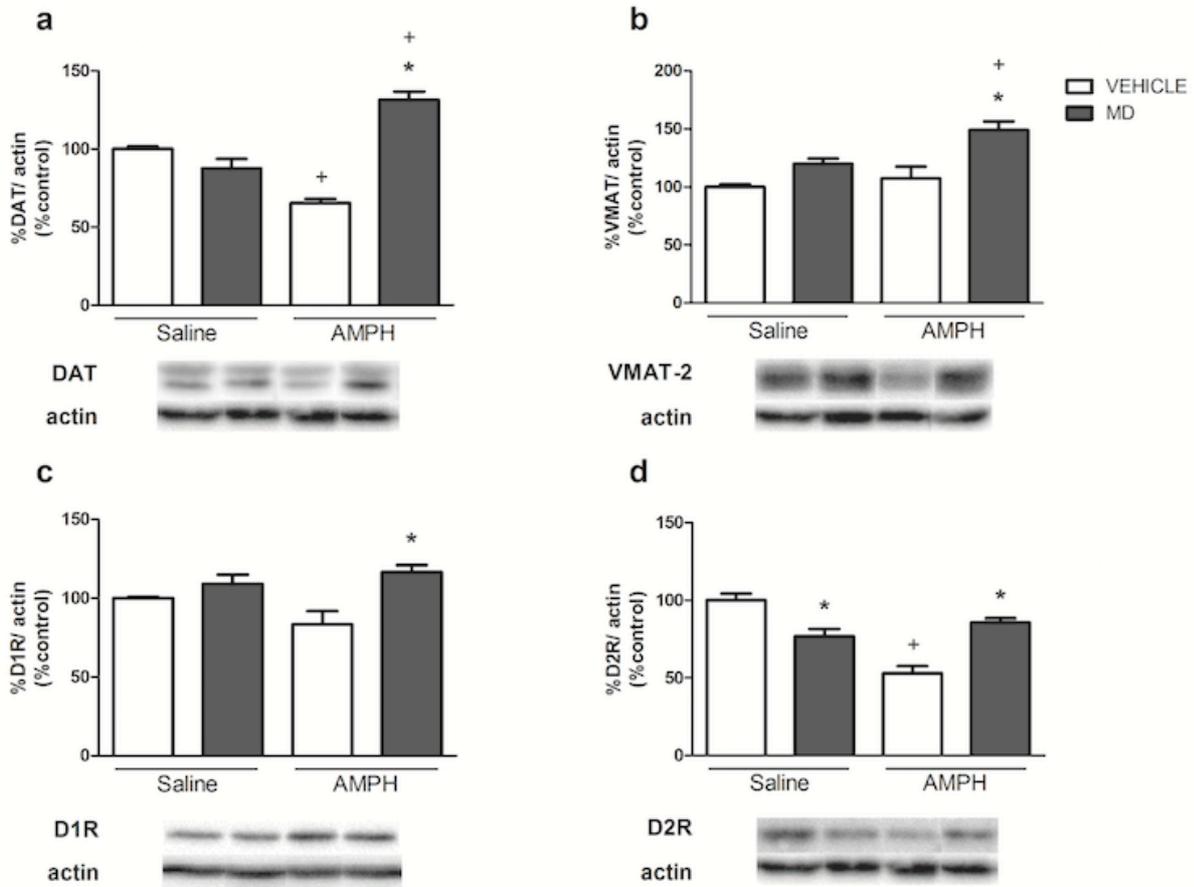


Figure 3. Influence of MOD treatment upon AMPH-reconditioning during adolescence on dopaminergic targets. Data are expressed as mean \pm S.E.M. *indicates significant differences of treatment (vehicle/ MOD) in the same conditioning (saline/ AMPH) ($P < 0.05$). +indicates significant differences of conditioning (saline/ AMPH) in the same treatment (vehicle/ MOD) ($P < 0.05$). Abbreviations: MOD: modafinil; AMPH: amphetamine.

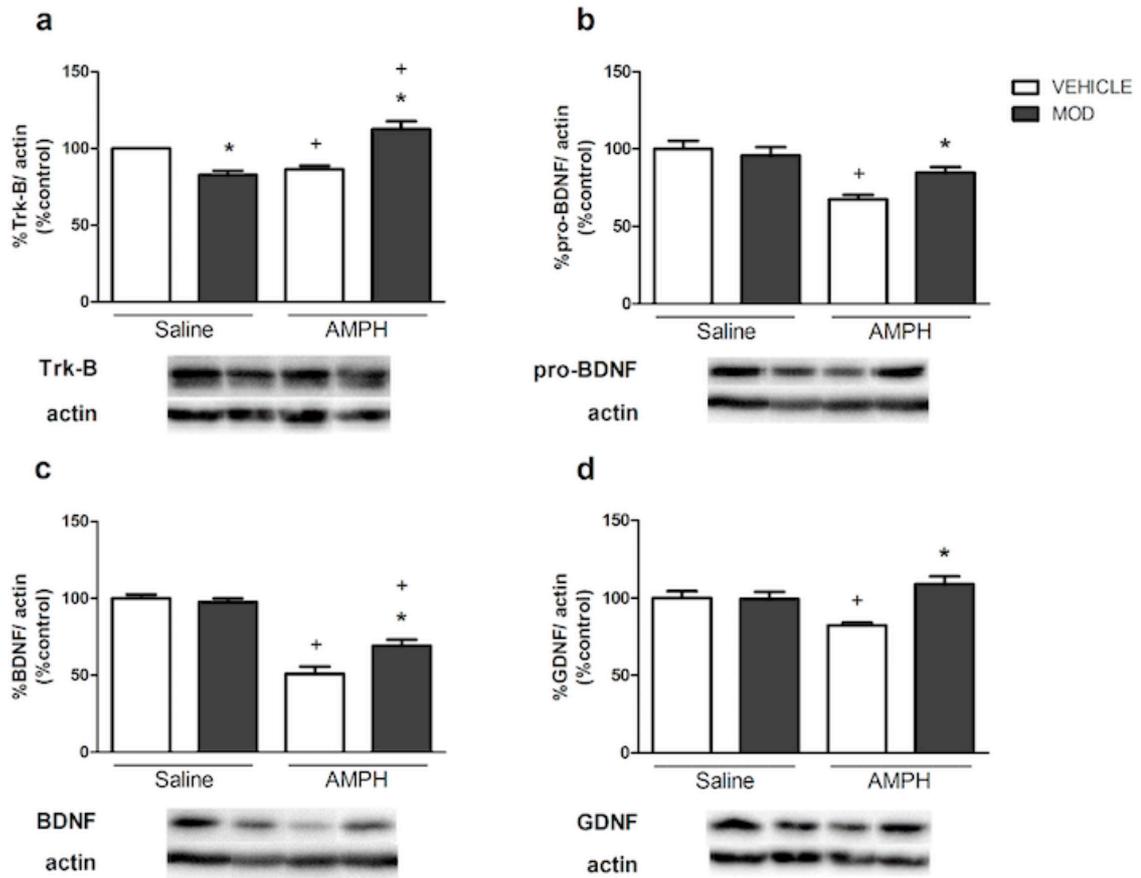


Figure 4. Influence of MOD treatment upon AMPH-reconditioning during adolescence on synaptic plasticity related-neurotrophins. Data are expressed as mean \pm S.E.M. *indicates significant differences of treatment (vehicle/ MOD) in the same conditioning (saline/ AMPH) ($P < 0.05$). + indicates significant differences of conditioning (saline/ AMPH) in the same treatment (vehicle/ MOD) ($P < 0.05$). Abbreviations: MOD: modafinil; AMPH: amphetamine.

7 DISCUSSÃO

Considerando os resultados apresentados na íntegra desta tese, o estudo piloto (protocolo experimental I) que consistiu na exposição subcrônica dos animais adolescentes ao MOD, durante 14 dias, não modificou comportamentos de locomoção ou indicativos de ansiedade, mas contrariando nossas expectativas, mostrou influência benéfica sobre a memória recente desses animais. Entretanto, a maioria dos estudos pré-clínicos com MOD evidenciam seus efeitos benéficos sobre a cognição frente a um dano já instalado (SCORIELS; JONES; SAHAKIAN, 2012; FARHOUDI et al., 2013; GONZÁLEZ et al., 2014; WADHWA et al., 2015), por outro lado, um outro estudo que avaliou a neurogênese hipocampal em animais mostrou que o MOD tem um impacto agudo benéfico sobre a proliferação e sobrevivência de células precursoras no giro denteado do hipocampo, mas que em tratamentos mais longos perde essa habilidade (BRANDT; ELLWARDT; STORCH, 2014).

Como até o momento poucos estudos avaliaram as possíveis influências do MOD sobre a via do estresse oxidativo (XIAO et al., 2004; ORNELL et al., 2011), sendo que seu exato mecanismo de ação não está bem elucidado, decidimos investigar seus efeitos sobre essa via em áreas cerebrais envolvidas na drogadição. Nesse sentido, nossos estudos mostraram que o tratamento subcrônico com MOD durante a adolescência foi capaz de modificar o *status* oxidativo de áreas cerebrais, como a ATV, o estriado e o CPF. Na verdade, foi possível observar um aumento na atividade da enzima antioxidante CAT em todas as áreas cerebrais aqui estudadas, com exceção do hipocampo, independentemente da existência de danos oxidativos. Assim, o MOD poderia estar agindo, diretamente ou indiretamente, aumentando a atividade de enzimas antioxidantes e como consequência atuando na prevenção de danos oxidativos. Esse achado corrobora com o estudo de Xiao et al. (2004) no qual o MOD aumentou os níveis da defesa antioxidante GSH.

A partir desses achados preliminares, no protocolo experimental II decidimos investigar a influência da administração de MOD durante a adolescência frente a PLC por ANF na idade adulta. Nossa hipótese inicial era de que sendo o MOD, uma droga psicoestimulante, quando fosse utilizada no período da adolescência poderia predispor o indivíduo ao uso de drogas aditivas na idade adulta. Entretanto, contrariando nossa hipótese inicial, a pré-exposição de doses repetidas ao MOD durante a adolescência mostrou benefícios frente a PLC por ANF quando avaliada

na idade adulta, já que o grupo exposto ao MOD apresentou menor preferência pela droga. Além disso, após a retirada da ANF, os animais previamente tratados com MOD não apresentaram alterações locomotoras ou comportamentos de ansiedade, apresentando melhor performance de memória recente, indicando que não houve desenvolvimento de sintomas de abstinência, ou ainda, esses foram minimizados pelo MOD.

Em relação ao *status* oxidativo hipocampal dos animais, novamente o MOD mostrou influências benéficas prevenindo os danos causados pela ANF como observado pelo aumento da atividade da CAT, diminuição da geração de ER e da carbonilação de proteínas, com exceção da peroxidação lipídica.

No que diz respeito aos alvos moleculares relacionados à memória e ao sistema dopaminérgico, semelhantemente o MOD foi capaz de prevenir os danos causados pela ANF, agindo como um modulador do sistema dopaminérgico hipocampal. Acreditamos que a administração de MOD numa dose adequada (64 mg/kg, p.o.) durante a adolescência pode ser capaz de promover alterações benéficas a longo prazo, em nível celular e molecular. Dessa forma, o MOD age preparando o hipocampo para uma situação extrema, tal como o aumento excessivo da ativação dopaminérgica, o qual ocorre durante o uso de uma droga com elevado potencial de abuso, como a ANF.

Seguindo na mesma linha de raciocínio, a partir do protocolo experimental III nós decidimos avaliar se os efeitos comportamentais benéficos do MOD se repetiriam se a exposição à ANF ocorresse ainda no período da adolescência. Novamente, o MOD foi benéfico, diminuindo a PLC por ANF e também reduzindo sinais de ansiedade, comumente relacionados à abstinência (KITANAKA; KITANAKA; TAKEMURA, 2008). Nesse experimento resolvemos investigar a influência do MOD na ATV e estriado, as quais constituem importantes áreas da via mesolímbica dopaminérgica diretamente relacionadas com a adição, de especial importância o estriado, onde se encontra o *nucleus accumbens*, reconhecidamente sinalizado por ser o centro hedônico ou de recompensa e por se a área cerebral que apresenta a maior concentração de DA (LUSCHER; MALENKA, 2011; STAHL, 2014).

Em relação ao *status* oxidativo da ATV, o MOD preveniu os danos causados pela ANF, aumentando a atividade da CAT, reduzindo a geração de ER e da peroxidação lipídica, com exceção da carbonilação de proteínas. Já no *status*

oxidativo do estriatal, o MOD aumentou a atividade da CAT e a carbonilação de proteínas, enquanto reduziu a geração de ER e não exerceu influência sobre a peroxidação lipídica.

Na sequência desse estudo, os alvos moleculares dopaminérgicos foram avaliados na ATV, evidenciou-se que o MOD preveniu as alterações causadas pela ANF sobre a TH, DAT, D1R sem modificar os níveis de D2R. Já no estriado, o MOD preveniu as alterações causadas pela ANF sobre a TH e DAT, além disso causou um aumento nos níveis de D1R e D2R, o que não foi observado nos animais expostos à ANF. Nós acreditamos que o MOD atue prevenindo os prejuízos causados pela ANF em diferentes alvos dopaminérgicos moleculares na tentativa de manter em equilíbrio os níveis de DA.

Tomados em conjunto, os achados desse estudo nos permitem propor que o MOD pode estar agindo como um modulador do sistema dopaminérgico e do *status* antioxidante na ATV e no estriado durante o período da adolescência em animais. Tais resultados indicam uma atividade moduladora dopaminérgica do MOD frente à ANF. Essa hipótese baseia-se no fato de que a exposição contínua à ANF provoca um aumento da atividade dopaminérgica, levando a uma depleção dos estoques nesse neurotransmissor durante sua abstinência (STAHL, 2014). Assim, nós acreditamos que o MOD exerceu uma supra-regulação dos alvos dopaminérgicos durante a abstinência à ANF para prevenir a diminuição dos níveis de DA e isso pôde ser refletido sobre os efeitos benéficos comportamentais diminuindo a preferência por ANF e reduzindo sinais de ansiedade durante o período da abstinência.

Levando em consideração os dois protocolos em que o MOD foi administrado durante adolescência e verificada a PLC por ANF tanto na idade adulta como na adolescência, podemos propor que tais achados são inovadores, já que até o momento, nenhum estudo mostrou que a exposição ao MOD durante adolescência pode induzir neuroadaptações de curto e de longo prazo, tornando o indivíduo menos suscetível aos efeitos hedônicos comuns a drogas psicoestimulantes, como a ANF.

Na sequência dos estudos e em vista dos resultados obtidos anteriormente, o quarto protocolo experimental foi realizado para avaliar a influência do MOD como forma de tratamento da recaída à ANF. Com os resultados obtidos a partir das

observações comportamentais no paradigma da PLC, foi possível observar que o tratamento subcrônico com MOD foi capaz de prevenir o comportamento de recaída pela droga. Além disso, o tratamento com MOD exerceu influência benéfica sobre a memória recente desses animais. Nesse sentido, as análises moleculares do estriado ventral nos permitem inferir que o MOD reverteu os prejuízos causados pela ANF, tanto nos alvos dopaminérgicos (DAT, VMAT-2, D1R e D2R) quanto nas neurotrofinas relacionadas a manutenção desse sistema (Trk-B, pro-BDNF, BDNF e GDNF). Assim, acreditamos que as alterações a nível molecular refletem os efeitos benéficos do MOD sobre a recaída por ANF e sobre a memória desses animais evidenciando um efeito neuroprotetor do MOD durante o período da adolescência.

Levando em consideração os achados apresentados nesta tese, os quais foram obtidos a partir de diferentes protocolos experimentais, é possível propor que:

a) a exposição ao MOD durante a adolescência exerceu influências sobre o *status* oxidativo de áreas cerebrais diretamente relacionadas com a drogadição, em especial aumentando a atividade de uma enzima antioxidante, a CAT;

b) quando administrado durante a adolescência, o MOD modulou o sistema dopaminérgico de áreas cerebrais como o hipocampo, ATV e estriado, prevenindo prejuízos comportamentais (preferência pela droga, atividade locomotora e exploratória, sinais de ansiedade e memória) induzidos pela exposição à ANF tanto na idade adulta como durante a adolescência;

c) o tratamento com MOD durante a retirada da ANF modulou o sistema dopaminérgico e as neurotrofinas relacionadas à manutenção do mesmo no estriado ventral prevenindo a recaída à ANF;

c) O MOD foi capaz de prevenir e/ou reverter os prejuízos comportamentais, bioquímicos e moleculares causados pela ANF, os quais são mais pronunciados quando os animais são expostos à droga na vida adulta do que quando comparados com o período da adolescência.

8 CONCLUSÃO

Através dos resultados apresentados nesta tese, podemos propor que a exposição ao MOD durante a adolescência é capaz de exercer efeitos moduladores sobre o *status* oxidativo, sistema dopaminérgico e neurotrofinas relacionadas a plasticidade sináptica especialmente em regiões cerebrais como hipocampo, ATV, estriado e estriado ventral de ratos, frente a exposição à ANF ainda na adolescência bem como na idade adulta.

Além disso, considerando os diferentes períodos em que os animais foram expostos à droga aditiva, ANF, foi possível observar que na idade adulta, as alterações comportamentais locomotoras, de ansiedade e perda de memória são mais intensamente afetadas do que quando tal exposição ocorreu durante a adolescência, indicando diferenças nos mecanismos de neuroadaptação do sistema dopaminérgico de acordo com o período do desenvolvimento.

Nesse sentido, o MOD apresenta influências benéficas quando um prejuízo ocorre no SNC, podendo ser uma ferramenta útil no tratamento à recaída por ANF. Entretanto, o MOD quando administrado em ratos adolescentes saudáveis pode levar a alterações moleculares em distintas áreas cerebrais relacionadas à adição, o que indica que seu uso deve ser feito com muita cautela.

REFERÊNCIAS

ACQUAS, E.; TANDA, G.; DI CHIARA, G. Differential Effects of Caffeine on Dopamine and Acetylcholine Transmission in Brain Areas of Drug-naive and Caffeine-pretreated Rats. **Neuropharmacology**. v. 27, n. 2, p. 182-192, 2002.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology** v. 105, p. 121–6, 1984.

AGUIRRE, J. A. et al. A stereological study on the neuroprotective actions of acute modafinil treatment on 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced nigral lesions of the male black mouse. **Neuroscience Letters**. v. 275, n. 3, p. 215–218, 1999.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Parent's Medication Guide for ADHD in Children and Adolescents**. 2013. This medication guide was approved by the AACAP Executive Committee and AACAP Council on July 29, 2013 and is available on the Internet at www.aacap.org and www.parentsmedguide.org.

ANDO, R. et al. Modafinil alleviates levodopa-induced excessive nighttime sleepiness and restores monoaminergic systems in a nocturnal animal model of Parkinson's disease. **Journal of Pharmacological Sciences**. v.136, p.266-271, 2018.

ANGELUCCI, F. et al. Chronic amphetamine treatment reduces NGF and BDNF in the rat brain. **European Neuropsychopharmacology**. v. 17(12), p. 756–762, 2007.

ANGOLD, A. et al. Stimulant treatment for children: a community perspective. **Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry**. v. 39, p. 975–984, 2000.

ANTONIAZZI, C.T.D. et al. Influence of neonatal tactile stimulation on amphetamine preference in young rats: Parameters of addiction and oxidative stress. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. v. 124, p. 341-349, 2014.

ARES-SANTOS, S. et al. Dopamine D1 receptor deletion strongly reduces neurotoxic effects of methamphetamine. **Neurobiology of Disease**. v. 45, p. 810-820, 2012.

BALLON, J. S.; FEIFEL D. 2006. A systematic review of modafinil: potential clinical uses and mechanisms of action. **Journal of Clinical Psychiatry**. v. 67, p. 554–66, 2006.

BASTOS, F. I. P. M. et al. (Org.). III Levantamento Nacional sobre o uso de drogas pela população brasileira. Rio de Janeiro: FIOCRUZ/ICICT, v. 528, 2017.

BENINGER, R. J.; MILLER, R. Dopamine D1-like receptors and reward-related incentive learning. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**. v. 22, p. 335–45, 1998.

BERK, M. et al. Pathways underlying neuroprogression in bipolar disorder: Focus on inflammation, oxidative stress and neurotrophic factors. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**. v. 35, p. 804-817, 2011.

BRANDT, M. D.; ELLWARDT, E.; STORCH, A. Short- and long-term treatment with modafinil differentially affects adult hippocampal neurogenesis. **Neuroscience**. v. 278, p. 267-275, 2014.

CADET, J.L. et al. Neurotoxicity of substituted amphetamines: molecular and cellular mechanisms. **Neurotoxicity Research**. v. 11, p. 183-202, 2007.

CARLEZON, W. A. et al. Antidepressant-like effects of cytidine in the forced swim test in rats. **Biological Psychiatry**. v. 51, p. 882-9, 2002.

CARVALHO, M. et al. Toxicity of amphetamines: an update. **Archives of Toxicology**. v. 86, p. 1167-1231, 2012.

CASTRO, A. A. et al. Neuropeptide S produces hyperlocomotion and prevents oxidative stress damage in the mouse brain: A comparative study with amphetamine and diazepam. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. v. 91, p. 636-642, 2009.

CHEMELLI, R. M. et al. Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. **Cell**. v. 98, p. 437-451, 1999.

CHEN, C-Y.; STORR, C. L.; ANTHONY, J. C. Early-onset drug use and risk for drug dependence problems. **Addictive Behaviors**. v. 34, p. 319-322, 2009.

CHIUEH, C. C. et al. Intracranial microdialysis of salicylic acid to detect hydroxyl radical generation through dopamine autooxidation in the caudate nucleus. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 13, p.581-583, 1992.

CHO, A. K. et al. Application of quantitative GC-mass spectrometry to study of pharmacokinetics of amphetamine and phentermine. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 62, p. 1491-1494, 1973.

COHEN, H. et al. The Neuropeptide Y (NPY)-ergic System is Associated with Behavioral Resilience to Stress Exposure in an Animal Model of Post-Traumatic Stress Disorder. **Neuropsychopharmacology**. v. 37, p. 350-363, 2012.

CRUZ, H. G. et al. Bi-directional effects of GABA(B) receptor agonists on the mesolimbic dopamine system. **Nature Neuroscience**. v. 7, p. 153, 2004.

CRUZ, F. C. et al. Stress-induced reinstatement of amphetamine-conditioned place preference and changes in tyrosine hydroxylase in the nucleus accumbens in adolescent rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. v. 96, p. 160-165, 2010.

CUNHA-OLIVEIRA, T.; REGO, A. C.; OLIVEIRA, C. R. Oxidative Stress and Drugs of Abuse: An Update. **Mini-Reviews in Organic Chemistry**. v. 10 (4), p. 1-14, 2013.

DA-ROSA, D. D. et al. Differences between dextroamphetamine and methamphetamine: behavioral changes and oxidative damage in brain of Wistar rats. **Journal of Neural Transmission**. v. 119, p. 31-38, 2012.

DALLEY, J. W. et al. Cognitive sequelae of intravenous amphetamine self-administration in rats: Evidence for selective effects on attentional performance. **Neuropsychopharmacology**. v. 30, p. 525-537, 2005.

DEAS, D. et al. Adolescents are not adults: Developmental considerations in alcohol users. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**. v. 24, p. 232-237, 2000.

DIAS, V.T. et al. Could Modafinil Prevent Psychostimulant Addiction? An Experimental Study in Rats. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**. v. 121, n. 5, p. 400-408, 2017.

DE LIMA, M. N. et al. Reversal of age-related deficits in object recognition memory in rats with l-deprenyl. **Experimental Gerontology**. v. 40, p. 506–511, 2005.

DE LIMA, M. N. et al. Early-life stress decreases hippocampal BDNF content and exacerbates recognition memory deficits induced by repeated d-amphetamine exposure. **Behavioural Brain Research**. v. 224, p. 100-106, 2011.

DOPHEIDE, M. M. et al. Modafinil evokes striatal [3H]dopamine release and alters the subjective properties of stimulants. **European Journal of Pharmacology**. v. 568, p. 112–123, 2007.

EVANS, W.N.; MORRIL, M.L.; PARENTE, S.T. Measuring inappropriate medical diagnosis and treatment in survey data: The case of ADHD among school-age children. **Journal of Health Economics**. v. 29, p. 657-673, 2010.

EVERITT, B. J.; ROBBINS, T. W. Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion. **Nature Neuroscience**. v. 8, n. 11, p. 1481-1489, 2005.

EVERITT, B. J.; ROBBINS, T. W. From the ventral to the dorsal striatum: devolving views of their roles in drug addiction. **Neuroscience Behavior**. v. 37, p. 1946-1954, 2013.

FARHOUDI, M. et al. An analytical review on probable anti-Parkinsonian effect of modafinil. **Journal of Analytical Research in Clinical Medicine**. v. 1, p. 58-62, 2013.

FEDERICI M. et al. Electrophysiological and amperometric evidence that modafinil blocks the dopamine uptake transporter to induce behavioral activation. **Neuroscience**. v. 252, p. 118-124, 2013.

FERRARO, L. et al. The effects of modafinil on striatal, pallidal and nigral GABA and glutamate release in the conscious rat: evidence for a preferential inhibition of striatopallidal GABA transmission. **Neuroscience Letters**. v. 253, p.135-138, 1998.

- FERRARO, L. et al. Amplification of cortical serotonin release: a further neurochemical action of the vigilance-promoting drug modafinil. **Neuropharmacology**. v. 39, p. 1974-1983, 2000.
- FERRARO, L. et al. Differential enhancement of dialysate serotonin levels in distinct brain regions of the awake rat by modafinil: possible relevance for wakefulness and depression. **Journal of Neuroscience Research**. v. 68, p. 107-112, 2002.
- FITZMAURICE, P.S. et al. Levels of 4-hydroxynonenal and malondialdehyde are increased in brain of human chronic users of methamphetamine. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 319, p. 703-709, 2006.
- FLOYD, R. A. Antioxidants, oxidative stress, and degenerative neurological disorders. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**. v. 222, p. 236–245, 1999.
- FREY, B. N. et al. Increased oxidative stress after repeated amphetamine exposure: possible relevance as an animal model of mania. **Bipolar Disorders**. v. 8, p. 275–80, 2006a.
- FREY, B. N. et al. Changes in antioxidant defense enzymes after D-amphetamine exposure: implications as an animal model of mania. **Neurochemical Research**. v. 31, p. 699–703, 2006b.
- FRIES, G. R. et al. Memory and brain-derived neurotrophic factor after subchronic or chronic amphetamine treatment in an animal model of mania. **Journal of Psychiatric Research**. v. 68, p. 329–336, 2015.
- FUXE, K. The antinarcotic drug modafinil increases glutamate release in thalamic areas and hippocampus. **NeuroReport**. v. 8, p. 2883-2887, 1997.
- GERMAN, C. L. et al. Amphetamine and Methamphetamine Reduce Striatal Dopamine Transporter Function Without Concurrent Dopamine Transporter Relocalization. **Journal of Neurochemistry**. v. 123(2), p. 288–297, 2012.
- GERRARD, P.; MALCOLM, R. Mechanisms of modafinil: A review of current research. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**. v. 3, p. 349–364, 2007.
- GRANDE, I. et al. The role of BDNF as a mediator of neuroplasticity in bipolar disorder. **Psychiatry Investigation**. v. 7, p. 243–250, 2011.
- GHITZA, U. E.; ZHAI, H.; WU, P.; AIRAVAARA, M.; SHAHAM, Y.; LU, L. Role of BDNF and GDNF in drug reward and relapse: A review. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**. v. 32, p.157–171, 2010.
- GOLDSTEIN, R. Z.; VOLKOW, N. D. Drug addiction and its underlying neurobiological basis: Neuroimaging evidence for the involvement of the frontal cortex. **American Journal of Psychiatry**. v. 159, p. 1642–1652, 2002.

GOEZ H. R. et al. Using the Test of Variables of Attention to Determine the Effectiveness of Modafinil in Children With Attention-Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD): A Prospective Methylphenidate-Controlled Trial. **Journal of Child Neurology**. v. 27, p. 1547-1552, 2012.

GOGTAY, N. et al. Dynamic mapping of human cortical development during childhood through early adulthood. **PNAS**. v. 101, p. 8174-8179, 2004.

GONZÁLEZ, B. et al. Modafinil improves methamphetamine-induced object recognition deficits and restores prefrontal cortex ERK signaling in mice. **Neuropharmacology**. v. 87, p. 188-97, 2014.

GOZZI, A. et al. Modulation of Fronto-Cortical Activity by Modafinil: A Functional Imaging and Fos Study in the Rat. **Neuropsychopharmacology**. v. 37, p. 822–837, 2012.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**, 4th edition, Oxford University Press, New York, 2007.

HALLIWELL, B. **Biochemistry of oxidative stress**. Biochem. Soc. Trans., v. 35, p. 1147-1150, 2007.

HASHIMOTO, K. et al. Protective effects of N-acetyl-L-cysteine on the reduction of dopamine transporters in the striatum of monkeys treated with methamphetamine. **Neuropsychopharmacology**. v. 29, p. 2018-2023, 2004.

HEAL, D. J. et al. Amphetamine, past and present: a pharmacological and clinical perspective, **Journal of Psychopharmacology**, v. 27 (6), p. 479– 496, 2013.

HEIM, C.; NEMEROFF, C. B. The role of childhood trauma in the neurobiology of mood and anxiety disorders: preclinical and clinical studies. **Biological Psychiatry**. v. 49, p. 1023–1039, 2001.

HEMPEL, S.L. et al. Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 20, 70-dichloro dihydrofluorescein diacetate, 5 (and 6)- carboxy-20, 70-dichloro dihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 27, p. 146–159, 1999.

HERMIDA-AMEIJEIRAS, A. et al. Autoxidation and MAO-mediated metabolism of dopamine as a potential cause of oxidative stress: role of ferrous and ferric ions. **Neurochemistry International**. v. 45, p. 103–116, 2015.

HILAL-DANDAN, R.; BRUNTON, L.L. **Manual de Farmacologia e Terapêutica de Goodman & Gilman**, 2ª edição, AMGH, 2015.

HINGSON, R. W.; HEEREN, T.; WINTER, M. R. Age at drinking onset and alcohol dependence: age at onset, duration, and severity. **Archives of Pediatrics and Adolescence Medicine**. v. 160, p. 39–746, 2006.

HOWES, O. D. et al. Pathways to schizophrenia: the impact of environmental factors. **International Journal of Neuropsychopharmacology**. v. 7, p. S7–S13, 2004.

IZENWASSER, S. Differential effects of psychoactive drugs in adolescents and adults. **Critical Reviews in Neurobiology**. 17, 51–67, 2005.

KATE, N.; GROVER, S.; GHORMODE, D. Dependence on supratherapeutic doses of modafinil: a case report. **The Primary Care and Companion CNS Disorders**. v. 14, p.1, 2012.

KATZUNG B. G. et al. **Basic & Clinical Pharmacology**. 12th Edition. - Lange Medical Publications, San Francisco, 2012.

KERR, D.S. et al. Angiotensin II blocks memory consolidation through an AT2 receptor-dependent mechanism. **Psychopharmacology**. v. 179, p. 529–535, 2005.

KIM, D. Practical use and risk of modafinil, a novel waking drug. **Environmental Health and Toxicology**, v. 27, p. 2-7, 2012.

KIRKPATRICK, M. G.; JOHANSON, C. E.; DEWIT, H. Personality and the acute subjective effects of d-amphetamine in humans. **Journal of Psychopharmacology**. v. 27, p. 256–264, 2013.

KITANAKA, J.; KITANAKA, N.; TAKEMURA, M. Neurochemical consequences of dysphoric state during amphetamine withdrawal in animal models: a review. **Neurochemical Research**. v. 33, p. 204-219, 2008.

KRISHNAN, R., CHARY, K.V. A rare case modafinil dependence. **Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics**. v. 6, p. 49–50, 2015.

KUCZENSKI, R. et al. Hippocampus norepinephrine, caudate dopamine and serotonin, and behavioral responses to the stereoisomers of amphetamine and methamphetamine. **Journal of Neuroscience**. v. 15, p. 1308–1317, 1995.

KUHN, F. T. et al. Toxicological aspects of trans fat consumption over two sequential generations of rats: Oxidative damage and preference for amphetamine. **Toxicology Letters**. v. 232, p. 58-67, 2015a.

KUHN, F. T. et al. Cross-Generational trans Fat Consumption Favors Self-Administration of Amphetamine and Changes Molecular Expressions of BDNF, DAT, and D1/D2 Receptors in the Cortex and Hippocampus of Rats. **Neurotoxicity Research**. v. 28(4), p. 319-31, 2015b.

LESHNER, A.I. Addiction is a brain disease, and it matters. **Science**. v. 278 (5335), p. 45-47, 1997.

LEVY, S. et al. Childhood ADHD and Risk for Substance Dependence in Adulthood: A Longitudinal, Population-Based Study. **PLOS ONE**. v. 9, n. 8, p. 1-9, 2014.

- LIN, L.F. et al. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. **Science**. v. 260, p. 1130–1132, 1993.
- LOVE, S., et al. Glial cell line-derived neurotrophic factor induces neuronal sprouting in human brain. **Nature Medicine**. v. 11, p. 703–704, 2005.
- LU, B.; PANG, P. T.; WOO, N. H. The yin and yang of neurotrophin action. **Nature Reviews Neuroscience**. v. 6, p. 603-614, 2005.
- LUSCHER, C.; MALENKA, R. C. Drug-evoked synaptic plasticity in addiction: from molecular changes to circuit remodeling. **Neuron**. v. 69, p. 650-663, 2011.
- MANN, N., BITSIOS, P. Modafinil treatment of amphetamine abuse in adult ADHD. **Journal of Psychopharmacology**. v. 23, n. 4, p. 468–471, 2009.
- MARCO, E.M. et al. Neurobehavioral adaptations to methylphenidate: The issue of early adolescent exposure. **Neuroscience and Behavioral Reviews**. v. 35, p.1722-1739, 2011.
- MARIN, M. T.; PLANETA, C. S. Maternal separation affects the cocaine-induced locomotion and response to novelty in adolescent but not in adult rats. **Brain Res**. v. 1013, p. 83–90, 2004.
- MATÉS, J. M.; SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, F. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. **Frontiers in Bioscience**. v. 4, p. 339-345, 1999.
- MATSUMOTO, T. et al. Biosynthesis and processing of endogenous BDNF: CNS neurons store and secrete BDNF, not pro-BDNF. **Nature Neuroscience**. v. 11, p. 131–3, 2008.
- MCLELLAN, A. T. Substance misuse and substance use disorders: why do they matter in healthcare? **Transactions of the American Clinical and Climatological Association**. v. 128, p. 112-130, 2017.
- MEAGHER, E. A.; FITZGERALD, G. A. Indices of lipid peroxidation in vivo: strengths and limitations. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 28(12), p. 1745–50, 2000.
- MEREDITH, G.E.; CALLEN, S.; SCHEUER, D.A. Brain-derived neurotrophic factor expression is increased in the rat amygdala, piriform cortex and hypothalamus following repeated amphetamine administration. **Brain Res**. v. 949, p. 218-27, 2002.
- MESSER, C.J. et al. Role for GDNF in biochemical and behavioral adaptations to drugs of abuse. **Neuron**. v. 26, p. 247–257, 2000.
- METZ, V. G. et al. Omega-3 decreases D1 and D2 receptors expression in the prefrontal cortex and prevents amphetamine-induced conditioned place preference in rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**. v. 67, p. 182–189, 2019.

MILANESI, L.H. et al., Toxicological aspects of the interesterified-fat from processed foods: Influences on opioid system and its reward effects in rats. **Food and Chemical Toxicology**. v. 110, p. 25–32, 2017.

MINZENBERG, M. J., CARTER, C. S. Modafinil: A review of neurochemical actions and effects on cognition. **Neuropsychopharmacology**. v. 33, p. 1477-1502, 2008.

MORALES, M.; VARLINSKAYA, E. I.; SPEAR, L. P. Evidence for conditioned place preference to a moderate dose of ethanol in adult male Sprague-Dawley rats. **Alcohol**. v. 46, p. 643-648, 2012.

MOREIRA-SILVA, D. Stress abolishes the effect of previous chronic ethanol consumption on drug place preference and on the mesocorticolimbic brain pathway. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**. v. 38, n. 5, p. 1227-1236, 2014.

NAGAHARA, A. H.; TUSZYNSKI, M. H. Potential therapeutic uses of BDNF in neurological and psychiatric disorders. **Nature Reviews | Drug Discovery**. v. 10, p. 209-219, 2011.

NESTLER, E. J. Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. **Nature Reviews Neuroscience**. v. 2, p. 119–128, 2001.

OFFICE OF NATIONAL DRUG CONTROL POLICY, 2009. **The Economic Costs of Drug Abuse in the United States 1992–2002**. 20503: Office of the National Drug Control Policy, Washington, D.C.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**. v. 95, p. 351–8, 1979.

OMS (Organização Mundial da Saúde). **Neurociência de consumo e dependência a substâncias psicoativas: resumo**. 2004. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data ISBN 92 4 859124 8 (Classificação NLM: WM 270).

ORNELL, F. et al. Modafinil effects on behavior and oxidative damage parameters in brain of Wistar rats. **Behavioural Neurology**. v. 917246, p. 1–7, 2014.

PAXINOS, C.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. 6th edition. NE Academic Press, New York, 2007.

PELLOW, S. et al. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**. v. 14, p. 149–167, 1985.

PETTENUZZO, L. F. et al. Effects of chronic administration of caffeine and stress on feeding behavior of rats. **Physiology & Behavior**. v. 95, p. 295–301, 2008.

POST, R. M. Role of BDNF in bipolar and unipolar disorder: clinical and theoretical implications. **Journal of Psychiatry Research**. v. 41, p. 979-990, 2007.

POTENZA, M. N. et al. Neuroscience of behavioral and pharmacological treatments for addictions. **Neuron**. v. 69, p. 695-712, 2011.

RAINERI, M. et al. Modafinil Abrogates Methamphetamine-Induced Neuroinflammation and Apoptotic Effects in the Mouse Striatum. **PLOS ONE**. v. 7, p. e46599, 2012.

RAMOS, A., MORMEDE, P. Stress and Emotionality: a Multidimensional and Genetic Approach. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**. v. 22, n. 1, p. 33–57, 1998.

RANG, H. P. et al. **Rang and Dale's Pharmacology**. 8th edition. - Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

REES, J.N. et al. Lipid peroxidation products inhibit dopamine catabolism yielding aberrant levels of a reactive intermediate. **Chemical Research in Toxicology**. v. 20, p. 1536–1542, 2007.

REICHEL, C.M., SEE, R. E. et al. Modafinil effects on reinstatement of methamphetamine seeking in a rat model of relapse. **Psychopharmacology**. v. 210, p. 337–346, 2010.

REYNOLDS, A. Oxidative stress and the pathogenesis of neurodegenerative disorders. **International Review of Neurobiology**. v. 82, p. 297-325, 2007.

REPANTIS, D. et al. Modafinil and methylphenidate for neuroenhancement in healthy individuals: a systematic review. **Pharmacological Research**. v. 62, p. 187–206, 2010.

ROBERTSON, JR. P.; HELLRIEGEL, E. T. Clinical pharmacokinetic profile of modafinil. **Clinical Pharmacokinetics**. v. 42, p. 123–137, 2003.

ROBINSON, T. E., BERRIDGE, K. C. Addiction. **Annual Review of Psychology**. v. 54 (1), p. 25–53, 2003.

RUGINO, T. A. review of modafinil film-coated tablets for attention deficit/hyperactivity disorder in children and adolescents. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**. v. 3, p. 293-301, 2007.

RUSSO, S. J. et al. Neurotrophic factors and structural plasticity in addiction. **Neuropharmacology**. v. 56, p. 73–82, 2009.

ROVERSI, K. Trans fat intake across gestation and lactation increases morphine preference in females but not in male rats: Behavioral and biochemical parameters. **European Journal of Pharmacology** v. 788, p. 210–217, 2016.

SANCHIS-SEGURA, C.; SPANAGEL, R. Behavioural assessment of drug reinforcement and addictive features in rodents: an overview. **Addiction Biology**. v. 11, p. 2–38, 2006.

SANTOS, C. M. M. New agents promote neuroprotection in Parkinson's disease models. **CNS and Neurological Disorders: Drug Targets**. vol. 11, no. 4, pp. 410–418, 2012.

SASE, S. et al. Modafinil improves performance in the multiple T-Maze and modifies GluR1, GluR2, D2 and NR1 receptor complex levels in the C57BL/6J mouse. **Amino Acids**. v. 43, p. 2285–2292, 2012.

SCORIELS, L.; JONES, P. B.; SAHAKIAN, B. J. Modafinil effects on cognition and emotion in schizophrenia and its neurochemical modulation in the brain. **Neuropharmacology**. v. 64, p. 168-184, 2012.

SEAMANS, J. K.; YANG, C. R. The principal features and mechanisms of dopamine modulation in the prefrontal cortex. **Progress in Neurobiology**. v. 74, p. 1-58, 2004.

SEGAT, H.J. et al., Exercise modifies amphetamine relapse: Behavioral and oxidative markers in rats. **Behavioural Brain Research** v. 262, p. 94–100, 2014.

SEGAT, H.J. et al. m-Trifluoromethyl-diphenyldiselenide as a pharmacological tool to treat preference symptoms related to AMPH-induced dependence in rats. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**. v. 66, p. 1-7, 2016.

SHEN, Y.-L. et al. Elevated BDNF mRNA expression in the medial prefrontal cortex after d-amphetamine reinstated conditioned place preference in rats. **Neuroscience** v. 263, p. 88–95, 2014.

SIEGEL, G., et al. **Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects**. American Society for Neurochemistry. Academic Press., 7 edition, p. 1016, 2005.

SOWELL, E.R. et al. In vivo evidence for post-adolescent brain maturation in frontal and striatal regions. **Nature Neuroscience**. v. 2, p. 859-860, 1999.

SOYKA, M. MUTSCHLER, J. Treatment-refractory substance use disorder: Focus on alcohol, opioids, and cocaine. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**. v. 70, p. 148–161, 2016.

SUDGEN, C. et al. Effect of pharmacological enhancement on the cognitive and clinical psychomotor performance of sleep-deprived doctors: a randomized controlled trial. **Annals of Surgery**. v. 2, p. 222-227, 2012.

SULZER, D. How Addictive Drugs Disrupt Presynaptic Dopamine Neurotransmission. **Neuron**. v. 69, p. 628–649, 2011.

STAHL, S. M. **Psicofarmacologia - Bases Neurocientíficas e Aplicações Práticas**, 4ª edição. Guanabara Koogan, 09/2014.

STEINKELLNER, T. et al. The ugly side of amphetamines: short- and long-term toxicity of 3,4- methylenedioxymethamphetamine (MDMA 'Ecstasy'),

methamphetamine and D-amphetamine. **Biological Chemistry**. v. 392, p. 103–115, 2011.

SWANSON, J.; BALER, R.D.; VOLKOW, N.D. Understanding the effects of stimulant medications on cognition in individual with attention-deficit hyperactivity disorder: A decade of progress. **Neuropsychopharmacol.** v. 36, p. 207–26, 2011.

TEIXEIRA-GOMES, A. et al. The neurotoxicity of amphetamines during the adolescent period. **International Journal of Developmental Neuroscience**. v. 41 p. 44–62, 2015.

TIRELLI, E.; LAVIOLA, G.; ADRIANI, W. Ontogenesis of behavioral sensitization and conditioned place preference induced by psychostimulants in laboratory rodents. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**. v. 27, p. 163–178, 2003.

TOURNIER, B. B. et al. Innately low D2 receptor availability is associated with high novelty-seeking and enhanced behavioural sensitization to amphetamine. **International Journal of Neuropsychopharmacology**. v. 16, p. 1819–34, 2013.

TSANOV, M. et al. The psychostimulant modafinil facilitates water maze performance and augments synaptic potentiation in dentate gyrus. **Neuropharmacology**. v. 59, p. 9–19, 2010.

TSENG, Y. L. et al. Detection of modafinil in human urine by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** 39: 1042–1045, 2005.

TUNG, C-S. et al. The neurotoxic mechanisms of amphetamine: step by step for striatal dopamine depletion. **Neuroscience Letters**. v. 639, p. 185–191, 2017.

TZSCHENTKE, T. M. Measuring reward with the conditioned place preference (CPP) paradigm: update of the last decade. **Addiction Biology**. v. 12, p. 227–462, 2007.

UHL, G. R.; GROW, R.W. The burden of complex genetics in brain disorders. **Archives of General Psychiatry**. v. 61, p. 223–229, 2004.

UNITED NATIONS OFFICE ON DRUG AND CRIME, World Drug Report 2017 (ISBN: 978-92-1-148291-1, eISBN: 978-92-1-060623-3, United Nations publication, Sales No. E.17.XI.6).

VALKO, M., et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. The **International of Journal of Biochemistry & Cell Biology** v. 39, p. 44–84, 2007.

VAN VLIETA, S. A. M. et al. Exploring the neuroprotective effects of modafinil in a marmoset Parkinson model with immunohistochemistry, magnetic resonance imaging and spectroscopy. **Brain Research**. v. 1189, n. 1, p. 219–228, 2008.

VAZQUEZ, V. et al. Brief early handling increases morphine dependence in adult rats. **Behavioural Brain Research**. v. 170, p. 211–8, 2006.

VEY, L. et al. Stress during the gestational period modifies pups' emotionality parameters and favors preference for morphine in adolescent rats. **Behavioural Brain Research**. v. 296, p. 408-417, 2016.

VI Levantamento Nacional sobre o Consumo de Drogas Psicotrópicas entre Estudantes do Ensino Fundamental e Médio das Redes Pública e Privada de Ensino nas 27 Capitais Brasileiras – 2010/ E. A. Carlini (supervisão) [et. al.], -- **São Paulo: CEBRID** - Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas: UNIFESP - Universidade Federal de São Paulo 2010. SENAD - Secretaria Nacional de Políticas sobre Drogas, Brasília – SENAD, 2010. 503 p.

VOLKOW, N. D.; BALER, R. D.; GOLDSTEIN, R. Z. Addiction: pulling at the neural threads of society. **Neuron**. v. 69, n. 4, p. 599–602, 2011.

VOLKOW, N. D.; FOWLER, J. S.; WANG, G. J. The addicted human brain: insights from imaging studies. **Journal of Clinical Investigation**. v. 111, p. 1444-1451, 2003.

VREE, T. B. **"Pharmacokinetics and Metabolism of Amphetamines."** Ph.D. Thesis, Catholic University of Nijmegen, The Netherlands (1973).

WADHWA, M. et al. Caffeine and modafinil given during 48 h sleep deprivation modulate object recognition memory and synaptic proteins in the hippocampus of the rats. **Behavioural Brain Research**. v. 294, p. 95-101, 2015.

WALF, A. A.; FRYE, C. A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. **Nature Protocols**. v. 2, n. 2, p. 322-328, 2007.

WATERS, K. A. et al. Assessment of modafinil on attentional processes in a five-choice serial reaction time test in the rat. **Journal of Psychopharmacology**. v. 19, p. 149-158, 2005.

WATERHOUSE, E. G.; XU, B. New insights into the role of brain-derived neurotrophic factor in synaptic plasticity. **Molecular and Cellular Neuroscience**. v. 42, p. 81-89, 2009.

WILENS, T. E. Attention-deficit/hyperactivity disorder and the substance use disorders: the nature of the relationship, subtypes at risk, and treatment issues. **Psychiatric Clinics of North America**. v.27, p. 283–301, 2004.

WISE, R. A. Dopamine, learning, and motivation. **Nature Reviews Neuroscience**. v. 5, n. 6, p. 483–494, 2004.

WISE, R. A. Drug-activation of brain reward pathways. **Drug and Alcohol Dependence**. v. 51, p. 13–22, 1998.

WONG, Y. N. et al. A double-blind, placebo-controlled, ascending-dose evaluation of the pharmacokinetics and reliability of modafinil tablets in healthy male volunteers. **Journal of Clinical Pharmacology**. v. 39, p. 30-40, 1999.

World Drug Report 2019 (United Nations publication, Sales No. E.19.XI.8).

XIAO, Y.L. et al., Neuroprotective mechanism of modafinil on Parkinson disease induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. **Acta Pharmacologica Sinica**. v. 25, p. 301-305, 2004.

YAMAMOTO, B. K.; RAUDENSKY, J. The role of oxidative stress, metabolic compromise, and inflammation in neuronal injury produced by amphetamine-related drugs of abuse. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**. v. 3, p. 203–217, 2008.

YAN, L. J.; TRABER, M. G.; PACKER, L. Spectrophotometric method for determination of carbonyls in oxidatively modified apolipoprotein B of human low-density lipoproteins. **Analytical Biochemistry**. v. 228, p. 349–51, 1995.

YANOFSKI, J. The Dopamine Dilemma - Part II: Could Stimulants Cause Tolerance, Dependence, and Paradoxical Decompensation? **Innovations in Clinical Neuroscience**. v. 8, n. 1, p. 47–53, 2011.

YEHUDA, R.; HALLIGAN, S.L.; GROSSMAN, R. Childhood trauma and risk for PTSD: relationship to intergenerational effects of trauma parental PTSD, and cortisol excretion. **Development & Psychopathology**. v. 13, p. 733–753, 2001.

YU, T. W., ANDERSON, D. Reactive oxygen species induced DNA damage and its modification: a chemical investigation. **Mutation Research**. v. 379, n. 2, p. 201-210, 1997.

ZIMIC, J. I.; JUKIC, V. Familial Risk Factors Favoring Drug Addiction Onset. **Journal of Psychoactive Drugs**. v. 44, n. 2, p. 173-185, 2012.