



**UMA ABORDAGEM INOVADORA PARA O TDAH: ESTUDO DO PEPTÍDEO AVTX1
ISOLADO DA PEÇONHA DA VESPA *AGELAIA VICINA* EM RATOS
ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS (SHR)**

PROJETO DE PESQUISA

INICIAÇÃO CIENTÍFICA

CANDIDATO: Vinicius Freire Gil

ORIENTADOR: Prof. Dr. Wagner Ferreira dos Santos

CO-ORIENTADOR: Prof Dr. Norberto Cysne Coimbra (FMRP-USP)

COLABORADOR: Beatriz Perez Piccolo (Mestranda, FMRP-USP)

**Ribeirão Preto-SP
2025**

RESUMO: O Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH) é o distúrbio neuropsiquiátrico mais prevalente em crianças e adolescentes, com taxas globais de até 8% e continuidade dos sintomas na vida adulta em cerca de 70% dos casos. No Brasil, estima-se que 5% da população seja afetada, mas a maioria permanece sem tratamento adequado. O TDAH está associado a disfunções nos circuitos dopaminérgicos do cérebro, com destaque para o aumento da densidade de transportadores de dopamina (DAT), levando à redução da disponibilidade sináptica desse neurotransmissor. Os medicamentos disponíveis, majoritariamente psicoestimulantes como o metilfenidato, apresentam eficácia limitada, elevado potencial de efeitos adversos e custo elevado, além de problemas de acessibilidade no sistema público de saúde. Neste cenário, torna-se essencial o estudo da pesquisa básica para a medicina translacional, com a busca por novas terapias mais específicas e seguras. Os produtos naturais, especialmente compostos isolados de peçonhas e venenos animais, tem-se tornado drogas eficazes no tratamento de doenças do tecido nervoso, dentre outras. Investigaremos o potencial terapêutico da AvTx1, purificada da peçonha da vespa social *Agelaia vicina*, em um modelo de roedor para TDAH, o rato espontaneamente hipertenso (SHR), desenvolvido a partir de ratos Wistar-Kyoto (WKY).

PALAVRAS-CHAVE: TDAH; Transportador de Dopamina; AvTx1; rato SHR

ABSTRACT - Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD) is the most prevalent neuropsychiatric disorder in children and adolescents, with global rates of up to 8%, and symptoms persist into adulthood in approximately 70% of cases. In Brazil, it is estimated that 5% of the population is affected, yet the majority remain without adequate treatment. ADHD is associated with dysfunctions in the brain's dopaminergic circuits, notably an increased density of dopamine transporters (DAT), which leads to reduced synaptic availability of this neurotransmitter. Available medications, predominantly psychostimulants such as methylphenidate, have limited efficacy, a high potential for adverse effects, and high costs, compounded by accessibility issues within the public healthcare system. In this context, basic research for translational medicine becomes essential in the search for more specific and safer novel therapies. Natural products, particularly isolated compounds from animal venoms and poisons, have proven to be effective drugs for treating diseases of the nervous tissue, among others. We will investigate the therapeutic potential of AvTx1, a peptide purified from the venom of the social wasp *Agelaia vicina*, in a rodent model of ADHD, the spontaneously hypertensive rat (SHR), which was derived from Wistar-Kyoto (WKY) rats.

KEYWORDS: ADHD; Dopamine Transporter; AvTx1; SHR rat

1. INTRODUÇÃO

O Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH) é o transtorno de neurodesenvolvimento mais comum no mundo, atingindo uma prevalência de 8% em crianças e adolescentes em nível mundial (Ayano et al., 2023). A principal causa são alterações em neurônios de regiões cerebrais moduladas por dopamina (DA) e noradrenalina (NA) (Faraone, 2018). Como resultado, a pessoa afetada costuma ter dificuldades na vida acadêmica, pessoal e profissional, por conta de sintomas como falta de atenção e hiperatividade (Mattos et al., 2024; Pires; Pontes; Pereira, 2024).

O transtorno é dividido em três subtipos, dependendo da presença ou ausência de 18 sintomas, de acordo com o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-5, 2013), sendo estes: predominantemente desatento, predominantemente hiperativo/impulsivo e combinado.

O déficit ocorre devido à alta densidade e hiperatividade funcional de transportadores de dopamina (DAT) e noradrenalina (NAT) nos neurônios de determinadas regiões cerebrais, responsáveis pela recaptação desses neurotransmissores da fenda sináptica, o que leva à redução da sua disponibilidade e, conseqüentemente, ao comprometimento da transmissão dos sinais nervosos (Del Campo et al., 2011).

Geralmente os sintomas começam a ser notados ainda na infância, com maior incidência dos 5 aos 9 anos (Cortese *et al.*, 2023), sendo que em alguns casos os sintomas podem se amenizar e desaparecer com a maturação cerebral. Porém, em 70% dos casos os adultos permanecem sendo afetados pelo transtorno (Lara et al., 2009).

O TDAH é muitas vezes acompanhado de outras comorbidades, como transtornos alimentares, ansiedade, distúrbios do sono e abuso de substâncias. Contudo, o tratamento do TDAH tende a reduzir significativamente estes distúrbios e melhorar a qualidade de vida dos indivíduos (Reale et al., 2017).

1.1. Remédios Atuais

Atualmente existem dois tipos de medicamentos para o tratamento do TDAH, sendo o primeiro o grupo dos estimulantes, com os mais utilizados sendo o metilfenidato e as anfetaminas. O segundo grupo é constituído pelos não estimulantes, representados pela atomoxetina e guanfacina (Posner, et al., 2020). A principal diferença para a escolha do uso destes se dá pelo fato dos estimulantes se classificarem como drogas de abuso, não sendo recomendado para grupos específicos (Wolraich et al., 2019).

Dentre os medicamentos existentes, o metilfenidato é o mais utilizado, tendo sido descoberto em 1944 na Suíça, e a partir de 1950 começou a ser vendido como psicoestimulante (Oliveira, 2021). No Brasil, a prescrição do medicamento é regulamentada desde o lançamento da Lista de

Substâncias sob Controle Especial, que consta na Portaria nº 344, de 12 de maio de 1998 (Secretário de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde).

O Metilfenidato é um psicoestimulante que atua principalmente na via dopaminérgica do cérebro, e gera aumento nos níveis de DA e NA na sinapse, ao bloquear a ação de seus respectivos transportadores (Faraone, 2018). A DA e a NA são neurotransmissores que desempenham um importante papel nas funções executivas orientadas pelo circuito fronto-estriado-cerebelo (Del Campo et al., 2011), como a tomada de decisões, resposta emocional, e mecanismos de reforço e recompensa (Koirala et al., 2024). Porém, o uso deste medicamento vem acompanhado de uma gama de efeitos adversos comuns como falta de apetite, problemas no sono, ansiedade, náusea, dor de cabeça, dependência e problemas cardiovasculares (Wenthur et al., 2016).

Portanto, torna-se importante investigar novos fármacos mais específicos e seguros. Neste cenário, os produtos naturais têm se mostrado, além de modelos para medicamentos mais específicos, promissores no tratamento de diversas doenças.

Um exemplo de muito sucesso e crescente relevância científica é o canabidiol (CBD), que atua sobre o sistema endocanabinóide e em outros alvos neurobiológicos, oferecendo um amplo potencial terapêutico com baixa psicoatividade (da Silva et al., 2015). Precisamente por esse perfil, as investigações sobre o CBD e seus mecanismos de ação têm-se mostrado importantes como alternativas de tratamento tanto para a doença de Parkinson quanto para a discinesia induzida pela L-DOPA (Patrício et al., 2020).

Outros exemplos promissores são os venenos e peçonhas, que contêm moléculas altamente seletivas para estruturas da membrana plasmática celular em vertebrados, desencadeando efeitos direcionados em áreas-alvo específicas. Atualmente, tais compostos já são utilizados para a produção de medicamentos (Yang et al., 2019; Mortari et al., 2023).

1.2. Peçonhas de Himenópteros

As peçonhas de himenópteros são conhecidas por possuírem diversas moléculas neuroativas que interagem de maneira específica com o SNC de vertebrados. Algumas peçonhas possuem compostos neuroprotetores em modelos de doenças experimentais do tecido nervoso. Portanto, são promissoras na terapia de neuropatologias humanas (Silva et al., 2015; Camargo et al., 2018).

Algumas abelhas de mel (*Apis mellifera*) e mamangavas (*Bombus sp*) são comumente conhecidas por suas picadas dolorosas e alergias, porém elas são utilizadas há séculos por povos tradicionais de forma medicinal. Atualmente, moléculas isoladas das peçonhas destes insetos se apresentam com potencial terapêutico para tratamento de doenças neurodegenerativas e controle do câncer de mama (Carpena et al., 2020; Laurindo et al., 2024).

Dentro das formigas, a *Dinoponera quadriceps*, também conhecida como Formiga-Gigante, já era utilizada na medicina popular por efeitos anti-asmáticos e estudos atuais demonstraram que alguns peptídeos isolados possuem potencial anticonvulsivante em modelo animal (Costa Neto et al., 2006; Nôga et al., 2016).

Estudos *in vivo*, a octovespina, um análogo sintético da occidentalina-1202 reverte o comprometimento da memória devido à toxicidade de A β em camundongos submetidos ao labirinto aquático de Morris e Teste de Reconhecimento de Novos Objetos. Estes resultados sugerem que a octovespina é um potencial medicamento para o tratamento da doença de Alzheimer, devido à sua capacidade de evitar a agregação de A β *in vitro* e de prevenir o déficit de memória (Camargo et al., 2022).

Dentre as vespas, a *Polybia occidentalis*, uma espécie social brasileira, em um trabalho do nosso grupo em colaboração com pesquisadores da UnB, teve peptídeos isolados de sua peçonha. Esses peptídeos foram capazes de atravessar a barreira hematoencefálica, foram neuroprotetores e anticonvulsivantes, em um modelo animal e estudos *in silico* (Mortari et al., 2023).

Estudos com a peçonha da vespa *Agelaia vicina* foram iniciados com um mestrado (98/07206-1) e um doutorado (2000/08010-5), ambos financiados com bolsa de estudos pela FAPESP. No doutorado, utilizando expressão funcional de DAT em células MDCK foi verificado que o peptídeo AvTx1, isolada desta vespa, inibe a recaptação de DA de forma específica (Figura 1). Tais efeitos justificam a proposta atual, no contexto do potencial terapêutico dessa molécula no tratamento de TDAH (Pizzo, 2004).

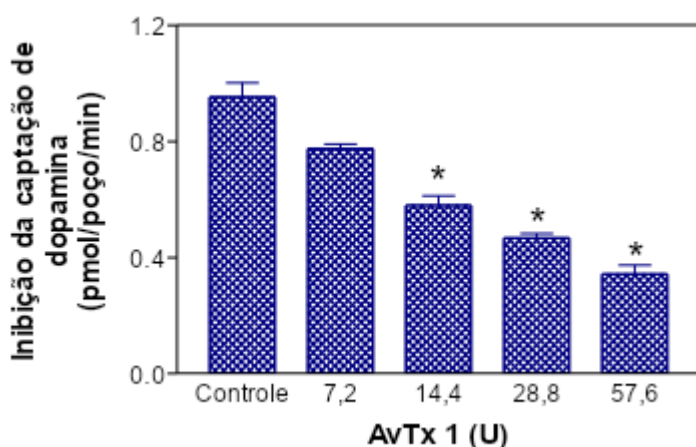


Figura 1: Gráfico representativo dos efeitos das AvTx1 na captação de dopamina em células MDCK expressando o transportador rDAT (transportador de dopamina de *Rattus norvegicus*). Estudo realizado pelas Drs. A. Pizzo e A.C.K. Fontana na Faculdade de Medicina Drexel, PA, EUA.

2. JUSTIFICATIVA

O desenvolvimento de novas terapias para o TDAH é urgente devido às limitações dos tratamentos atuais, como baixa especificidade, efeitos adversos significativos, problemas de aderência e acesso a terapias. Na América Latina, cerca de 5% da população possui TDAH, e dentro daqueles que conseguem receber o diagnóstico, mais de 75% permanecem sem o devido tratamento (Kohn et al., 2018). Além do que, existe pouca aderência dos pacientes aos tratamentos, alcançando uma baixa taxa (22.9%) ao longo de 12 meses (Ferrin et al. 2025). Em parte, ocorrem importantes efeitos colaterais, que são identificados em 29% dos pacientes, os quais tiveram um

ou mais sintomas adversos, sendo os mais comuns problemas no sono e falta de apetite (Storebø et al., 2018).



A investigação da AvTx1 justifica-se por seu potencial único em modular seletivamente os circuitos dopaminérgicos, inibindo a captação da DA e NA. Além disso, o estudo de compostos neuroativos de himenópteros para aplicações terapêuticas representa uma fronteira promissora na neurofarmacologia, com possibilidade de gerar um fármaco inovador a partir da biodiversidade brasileira (Mortari et al., 2023). A nossa pesquisa deve preencher uma lacuna crítica no campo de estudo, oferecendo perspectivas tanto para o avanço científico, quanto para a melhoria da qualidade de vida dos pacientes com TDAH.

3. RELEVÂNCIA

Este projeto apresenta relevância científica e social ao investigar a AvTx1, como potencial tratamento inovador para o TDAH. A pesquisa se justifica pela necessidade urgente de alternativas aos psicoestimulantes atuais (como metilfenidato), que possuem eficácia limitada, alto custo, alto índice de desistência do tratamento, e efeitos adversos significativos. No Brasil, 77% dos pacientes desistem do tratamento após 6 meses de uso do metilfenidato, tendo maior causa o alto custo individual para os pacientes (Maia et al., 2016).

A AvTx1 pode oferecer um mecanismo de ação mais seletivo sobre os circuitos dopaminérgicos, com menor risco de efeitos colaterais e baixo custo. Utilizando o modelo animal SHR (padrão-ouro para estudos de TDAH), buscamos comprovar a sua eficácia, o que poderá resultar em uma terapia mais acessível e segura para a população brasileira. O rato SHR é um modelo genético desenvolvido através de cruzamento seletivo (*selective inbreeding*), da linhagem Kyoto-Wistar. Além de valorizar a biodiversidade nacional como fonte de fármacos inovadores e instigar a proteção da mesma. A pesquisa ainda contribui para o avanço da medicina translacional, conectando descobertas científicas básicas a aplicações clínicas concretas (Fig. 2).

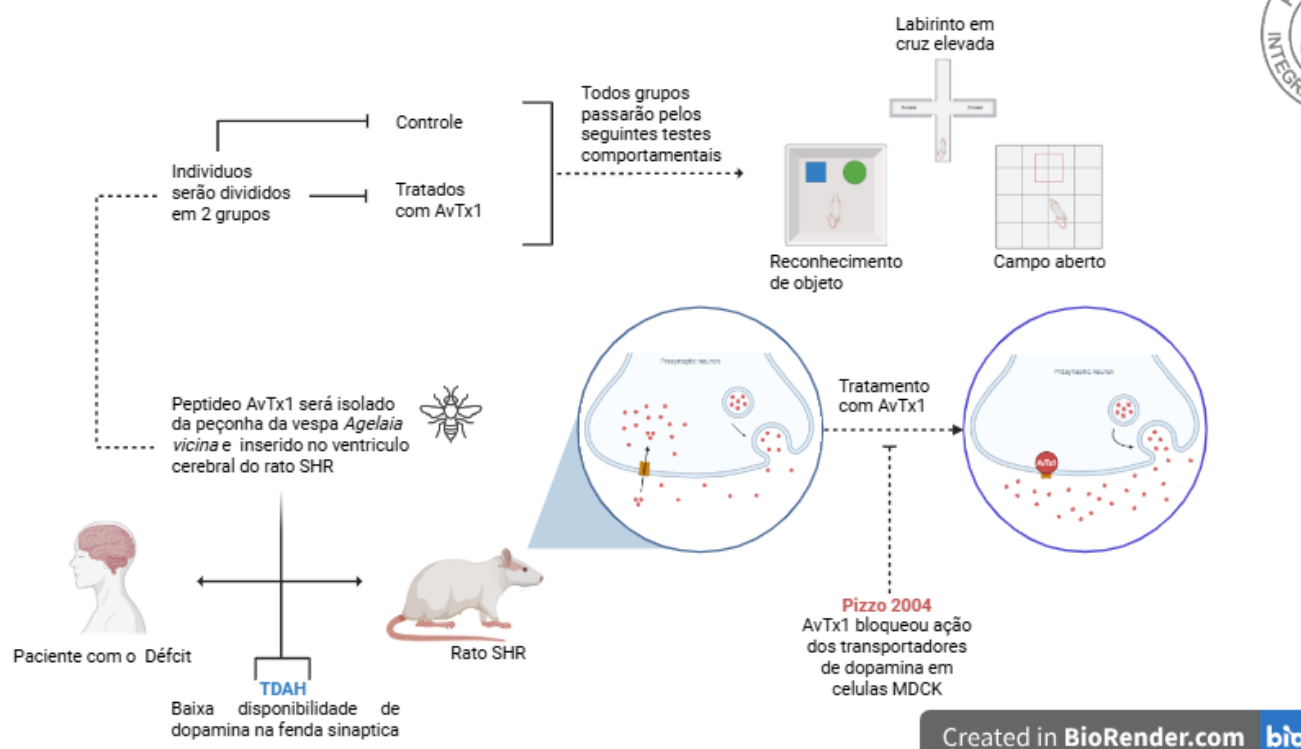


Figura 2: Resumo gráfico do projeto.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

Avaliar a eficácia da AvTx1 isolada da peçonha de *A. vicina* como tratamento para o TDAH em ratos SHR.

4.2 Objetivos Específicos

- 4.2.1. Coleta das vespas será realizada no Parque Estadual Mata dos Godoy, Londrina, PR;
- 4.2.2. Retirada de glândulas e preparação do extrato bruto, com auxílio técnico Ricardo Alarcon;
- 4.2.3. Purificação e verificação do grau de pureza da AvTx1, realizadas pelo Dr. Prof. Wagner Ferreira dos Santos (FFCLRP-USP), orientador, e Dr. Norberto P. Lopes, acompanhado pelo estudante Vinícius Freire Gil;
- 4.2.4. Realizar avaliação in vivo dos efeitos da AvTx1 em modelo SHR
 - 4.2.4.1. Avaliar os efeitos da AvTx1 em testes comportamentais de campo aberto (atividade motora e hiperatividade), labirinto em cruz elevada (ansiedade e impulsividade) e reconhecimento de objetos (aprendizagem, atenção e memória).

Grupos experimentais:

- GRUPO 1- Animais controle TDAH (rato SHR), salina 0,9%.

- GRUPO 2-Ratos SHR tratados com AvTx1 (DOSE 1- 5,0 µg./mL), icv.
- GRUPO 3-Ratos SHR tratados com AvTx1 (DOSE 2- 25,0 µg./mL), icv.
- GRUPO 4-Ratos SHR tratados com AvTx1 (DOSE 3- 50,0 µg./mL), icv.

Todos os grupos irão passar pela cirurgia de implantação da cânula, e os que não forem submetidos à algum tratamento, receberão salina 0,9% pelas devidas vias.

O estudante receberá treinamento para realização do procedimento cirúrgico, fornecido pelo orientador que acompanhará todos os experimentos.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Animais e Protocolo Experimental

No presente trabalho, serão utilizados 56 ratos da linhagem SHR (14 ratos por grupo), sendo estes machos com idade aproximada de 28 dias, provenientes do Biotério ICB-USP. Os animais serão alojados em gaiolas de polipropileno, com medidas de 49 cm por 34 cm por 16 cm, forradas com maravalha esterilizada, com a temperatura mantida à 21 ± 2 °C, com umidade relativa de 50-60%, e períodos de luminosidade e escuridão ciclados a cada 12h, com início da iluminação às 7 da manhã. Os ratos serão pesados diariamente (e antes de todos os procedimentos) para avaliação clínica.

5.2. Drogas e Tratamento

Serão utilizadas:
-AvTx1: A peçonha será purificada, seu grau de pureza confirmado e sua estrutura química apresentada segundo Pizzo (2004). Seguindo o protocolo do estudo já mencionado, a molécula isolada será administrada em três doses diferentes por grupo, tendo volume máximo de 3µL, via intracerebroventricular, para garantir que não será barrada pela barreira hematoencefálica, e assim promovendo biodisponibilidade no sistema nervoso.

5.3. Coleta das Vespas

Aproximadamente 1000 operárias de *A. vicina* serão coletadas manualmente, e serão armazenadas em uma caixa térmica com gelo seco (-20 °C). Em seguida, levados ao laboratório e armazenados em freezer a -80 °C. Com o auxílio de uma lupa, cada indivíduo será analisado individualmente, e sob gelo terão as glândulas de veneno removidas, e colocadas em tubos tipo Eppendorf e armazenadas em um freezer -80 °C.

5.4. Isolamento dos Componentes

As glândulas de veneno serão trituradas com um pistilo de vidro contendo uma solução de acetonitrila e água (ACN/H₂O; 1:1, v/v) e centrifugadas por 3 minutos a 1.000xg. O sobrenadante será coletado, a quantidade de proteína será medida, usando o método de Bradford (1976) e adicionados 10 volumes de ácido trifluoroacético (TFA) a 0,1%. Esta solução será injetada em uma coluna de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) de fase reversa (C18, 2,5 x 25 cm, Jupiter, Phenomenex, EUA) com uma vazão de 7,0 mL min⁻¹ e eluída por um gradiente linear de 5 a 20% de ACN/H₂O 60% (v/v) (contendo 0,1% de TFA) por 45 minutos, seguido por 20–60% por 4 minutos e 60–90% por 90 minutos. O eluato será monitorado a 214 nm, coletado em banho de gelo, liofilizado e armazenado em alíquotas a -80 °C. Esta etapa do projeto será realizada no laboratório do Dr. Norberto P. Lopes (FCFRP-USP); (Pizzo et al., 2004).

5.5. Espectrometria de Massas por Electrospray

A AvTx1 (a fração ativa na inibição dos DAT) será analisada por LC/MS para determinar sua massa molecular relativa. Será utilizado um instrumento Micromass, modelo ZMD, acoplado a um sistema Waters Alliance modelo 2690, usando uma coluna Waters Nova-Pak C18 (2,2 x 150 mm, tamanho de partícula de 3,5 µm, tamanho de poro de 60 Å); solvente A: TFA 0,1%/H₂O e B: CH₃CN 75%/A; gradiente: 5–95% de B por 30 min a 400 µL/min; faixa de λ: 190–300 nm; e faixa de massa: 500–3930 m/z. Esta etapa do projeto será realizada no laboratório do Dr. Norberto P. Lopes (FCFRP-USP); (Pizzo et al., 2004).

5.6. Taxa de Recuperação

5.6.1. Absortividade das Frações

Os valores das absortividades a 215 nm serão determinados para cada fração e para a peçonha desproteïnizada em ACN/água (v/v; 1:1). A partir desses valores será construída uma tabela para estimarmos a taxa de recuperação.

5.6.2. Concentração protéica das frações

A concentração proteica e a pureza das amostras de peçonha serão estimadas por espectrofotometria de microvolume (280 nm). As medições serão realizadas em um espectrofotômetro NanoDrop™ (Thermo Fisher, EUA).

5.7. Cirurgia Estereotáxica

Ratos (SHR e WKY) com idade aproximada de 28 dias, serão anestesiados com isoflurano (5% de isoflurano, 95% de ar, 250 CC/min), usando câmara de indução, e então, após perda de reflexos corneanos e podais, os animais serão posicionados na mesa estereotáxica em posição decúbito ventral mantidos com máscara de ar 2% de isoflurano a um fluxo de 250 CC/min, para que não acordem durante a cirurgia. A anestesia será induzida em uma câmara de isoflurano transparente e vedada, com entrada para a mistura de oxigênio e isoflurano. A saída da câmara estará conectada a um filtro de carvão ativado ou ao sistema de exaustão do prédio, garantindo a captação segura dos gases residuais.

Em seguida serão realizados os seguintes procedimentos em respectiva ordem: tricotomia, injeção de xilocaína subcutânea, incisão (calvaria, 1,0 a 1,5 cm [longitudinal, na linha média do crânio]), retirada de pele, trepanação e por fim fixação da cânula de aço inoxidável (10mm) com cimento odontológico acrílico, seguido pelo selamento da mesma com um fio de aço. A implantação da cânula seguirá as coordenadas A.P.—0,9 mm; M.L.—1,6 mm; D.V.—3,4 mm a partir do bregma, para alcançar o ventrículo lateral direito (Liberato, J. L. et al., 2018). Todos os procedimentos serão realizados tendo os sinais vitais dos ratos monitorados ao longo dos procedimentos (que terão duração de 20-30 minutos).

Durante a cirurgia estereotáxica, será empregada analgesia pré e pós-operatória com Carprofeno (5 mg/kg, SC) ou Meloxicam (1–2 mg/kg, SC). A primeira dose será aplicada 30 minutos antes da incisão, e o tratamento continuará uma vez ao dia por 48 a 72 horas. Esses AINEs serão os analgésicos sistêmicos de escolha. Durante o procedimento, serão monitorados a frequência respiratória, o reflexo pedal e a temperatura corporal (mantida a 37 °C). No pós-operatório, serão observados sinais de dor (postura encolhida, piloereção, automutilação e letargia) e condições gerais (peso, hidratação e integridade do sítio cirúrgico), com acompanhamento intensivo nas primeiras 24–48 horas.

Com as cânulas implantadas, os ratos terão um período de 7 dias para se habituarem ao implante, e serão tratados com Penicilina G Procaína + Benzatina 40.000 -- 60.000 UI/kg Subcutânea, ao longo do período. (Raony et al., 2022).

Para a injeção dos fármacos pela cânula será utilizada uma bomba de microinjeção, na velocidade de 0,5 µL/min (Legato® 130 Syringe Pump, Harvard Bioscience Inc, EUA). Para o procedimento, os ratos serão colocados sob anestesia com máscara de ar 2% de isoflurano a um fluxo de 250 CC/min, para que não acordem.

5.8. Análises Comportamentais

Durante os dias 8, 9, 10, 11 e 12 de experimentação começará o tratamento, com a introdução da salina, e AvTx1, em seus respectivos grupos, seguido pelos testes comportamentais 40 minutos após a introdução das substâncias.

Os ratos ficarão nas instalações do biotério até que os períodos de habituação, cirurgia, e testes sejam finalizados.

A sequência de testes irá progredir de menos estressante para mais estressante, seguindo a seguinte ordem: Campo aberto; Reconhecimento de Objeto; Labirinto em cruz elevada.

5.8.1 Teste de Campo Aberto

Para este teste será utilizado um aparato de madeira, com 50 cm de altura x 60 cm de diâmetro, com base dividida em quatro quadrantes iguais e iluminação de 50-100 lux. Os ratos serão transportados para a área de testes individualmente e colocados ao centro da plataforma, e então serão gravados por 10 minutos. Os ratos terão um período de habituação de 5 minutos, porém o mesmo será gravado e analisado separadamente para evitar perda de dados possivelmente relevantes (Walsh e Cummins 1976).

5.8.2 Teste de Reconhecimento de Objeto

Este teste será realizado seguindo o protocolo descrito por Lueptow (2017), minimamente modificado, sendo realizados ao longo de 3 dias. As sessões de teste terão 10 minutos, com habituação breve apenas ao inserir o animal no campo experimental, sendo o teste 1 um treinamento composto por dois objetos iguais, e o teste 2, que será realizada a troca de um dos objetos.

Após definir a área ao redor dos objetos, para identificar comportamentos de reconhecimento/exploração do animal, os experimentos serão gravados por 10 minutos, e então analisados manualmente. Caso os ratos não atinjam uma interação de no mínimo 20 segundos para ambos os objetos no teste 1 e 2, durante o período de gravação definido, os dados não serão considerados, pois não é possível determinar se eles passaram tempo suficiente reconhecendo para aprender.

5.8.3 Teste de Labirinto em Cruz Elevado

O teste possibilita avaliar sintomas de ansiedade e impulsividade em roedores (Pellow et al.,

1985).

Para avaliar o comportamento, os ratos serão inseridos no centro do labirinto, com a cabeça voltada para um dos BFs, e então terão seus movimentos registrados por 5 minutos, verificando o tempo de entrada e permanência em cada uma das regiões (Ramos et al., 1997).

5.9. Eutanásia

Os animais serão pesados e então será realizada eutanásia com uso de Isoflurano 5% em câmara fechada seguido de deslocamento cervical, para confirmação da morte será verificada a ausência de respiração por mais de um minuto, ausência de reflexos corneal e pedal, e ausência de batimentos cardíacos à palpação torácica.

5.10. Extração de Material

Após a eutanásia, para confirmação que a cânula atingiu o ventrículo lateral direito, será aplicado azul de metileno através dela em todos os indivíduos. Em seguida, o cérebro será removido e serão realizados cortes histológicos e produção de lâminas para e confirmação.

Após o procedimento precedente, o cérebro será inserido em solução sacarose a 30%, Ácido ascórbico 0,1% , EDTA 1 mM, e então armazenado em freezer -80 °C. Posteriormente será dosado o conteúdo de DA por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção Eletroquímica (HPLC-EC) ou por Espectrometria de Massas Acoplada à Cromatografia (LC-MS/MS).

5.11. Análise Estatística

As análises propostas pelo presente projeto serão feitas utilizando o programa GraphPadPrism 6.0 com uso de ANOVA unidirecional, para avaliar a variância nos comportamentos demonstrados entre os grupos de animais mencionados, posteriormente, serão realizadas análises post hoc Student NewMan-Keuls. Serão considerados estatisticamente significativos os resultados com $p < 0,05$, assumindo distribuição normal dos dados.

6. CRONOGRAMA E EXECUÇÃO

Etapas	MESES											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1) Revisão de literatura	X	X	X					X	X	X	X	X
2) Obtenção de documentação necessária (CEUA)	X	X	X									
3) Purificação e verificação do grau de pureza da AvTx1		X	X									
4) Experimentação animal (SHR controle; SHR AvTx1 dose1; SHR AvTx1 dose2; SHR AvTx1 dose3; testes comportamentais)				X	X	X	X					
5) Verificação do posicionamento da cânula				X	X	X	X					
6) 6) Seminários no Laboratório	X	X	X	X		X		X		X	X	X
7)Análise estatística							X	X	X	X	X	
9) Divulgação dos resultados em congressos específicos da área e redação de um artigo científico											X	X

7. REFERÊNCIAS

ADRIANI, W. et al. Methylphenidate administration to adolescent rats determines plastic changes on reward-related behavior and striatal gene expression. *Neuropsychopharmacology*, v. 31, n. 9, p. 1946–1956, 2006. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300962>

ARNSTEN, A. F. T.; DUDLEY, A. G. Methylphenidate improves prefrontal cortical cognitive function through $\alpha 2$ adrenoceptor and dopamine D1 receptor actions: Relevance to therapeutic effects in attention deficit hyperactivity disorder. *Behavioral and Brain Functions*, v. 1, p. 2, 2005.

ASSOCIAÇÃO PSIQUIÁTRICA AMERICANA. *Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais: DSM-5*. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. <https://doi.org/10.1176/appi.books.9780890425596>

AYANO, G. et al. The global prevalence of attention deficit hyperactivity disorder in children and adolescents: An umbrella review of meta-analyses. *Journal of Affective Disorders*, v. 339, p. 860–866, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2023.07.071>

BIEŚ, R. et al. The Risk of Methylphenidate Pharmacotherapy for Adults with ADHD. *Pharmaceuticals*, v. 16, n. 9, p. 1292, 2023. <https://doi.org/10.3390/ph16091292>

CAMARGO, L. C. et al. Peptides isolated from animal venom as a platform for new therapeutics for the treatment of Alzheimer's disease. *Neuropeptides*, v. 67, p. 79–86, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2017.11.010>.

CAMARGO, L. C.; VERAS, L. G.; VAZ, G.; SOUZA, A. C. B.; MORTARI, M. R. Octovespin, a peptide bioinspired by wasp venom, prevents cognitive deficits induced by amyloid- β in Alzheimer's disease mouse model. *Neuropeptides*, v. 93, p. 102233, jun. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2022.102233>.

CARPENA, M. et al. Bee Venom: An Updating Review of Its Bioactive Molecules and Its Health Applications. *Nutrients*, v. 12, n. 11, p. 3360, 2020. <https://doi.org/10.3390/nu12113360>

CHANG, Z. et al. Stimulant ADHD medication and risk for substance abuse. *Journal of Child Psychology and Psychiatry*, v. 55, n. 8, p. 878–885, 2014. <https://doi.org/10.1111/jcpp.12164>

CORTESE, S. et al. Incidence, prevalence, and global burden of ADHD from 1990 to 2019 across 204 countries: data, with critical re-analysis, from the Global Burden of Disease study. *Molecular Psychiatry*, v. 28, p. 4823–4830, 2023. <https://doi.org/10.1038/s41380-023-02228-3>

COSTA NETO, E. M.; RAMOS-ELORDUY, J.; PINO, J. M. P. Los insectos medicinales de Brasil: primeros resultados. *Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa*, n. 38, p. 395–414, 2006.

DA SILVA, J. A.; BIAGIONI, A. F.; ALMADA, R. C.; DE SOUZA CRIPPA, J. A.; CECÍLIO HALLAK, J. E.; ZUARDI, A. W.; COIMBRA, N. C. Dissociation between the panicolytic effect of cannabidiol microinjected into the substantia nigra, pars reticulata, and fear-induced antinociception elicited by bicuculline administration in deep layers of the superior colliculus: The role of CB1-cannabinoid receptor in the ventral mesencephalon. *European Journal of Pharmacology*, v. 758, p. 153-163, 5 jul. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.03.051>.

DEL CAMPO, N. et al. The roles of dopamine and noradrenaline in the pathophysiology and treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biological Psychiatry*, v. 69, n. 12, p. e145–e157, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2011.02.036>

FARAONE, S. V. The pharmacology of amphetamine and methylphenidate: Relevance to the neurobiology of attention-deficit/hyperactivity disorder and other psychiatric comorbidities. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, v. 87, p. 255–270, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2018.02.001>

FERRIN, M. et al. Medication adherence and persistence in children and adolescents with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): A systematic review and qualitative update. *European Child & Adolescent Psychiatry*, v. 34, n. 3, p. 867–882, 2025. <https://doi.org/10.1007/s00787-024-02538-z>

GERASIMOV, M. R. et al. Comparison between intraperitoneal and oral methylphenidate administration: A microdialysis and locomotor activity study. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 295, n. 1, p. 51–57, 2000.

MAIA, C. R. et al. Cost-utility analysis of methylphenidate treatment for children and adolescents with ADHD in Brazil. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, São Paulo, v. 38, n. 1, p. 30-38, 2016. <https://doi.org/10.1590/1516-4446-2014-1516>.

MORTARI, M. R. et al. A new class of peptides from wasp venom: A pathway to antiepileptic/neuroprotective drugs. *Brain Communications*, v. 5, n. 1, p. fcad016, 2023. <https://doi.org/10.1093/braincomms/fcad016>

KAISARI, P. et al. Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD) and disordered eating behaviour: A systematic review and a framework for future research. *Clinical Psychology Review*, v. 53, p. 109–121, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.cpr.2017.03.002>

KOHN, R. et al. Mental health in the Americas: an overview of the treatment gap. *Revista Panamericana de Salud Pública*, v. 42, e165, 2018. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2018.165>

KOIRALA, S. et al. Neurobiology of attention-deficit hyperactivity disorder: historical challenges and emerging frontiers. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 25, n. 12, p. 759–775, 2024. <https://doi.org/10.1038/s41583-024-00869-z>

LARA, C. et al. Childhood predictors of adult attention-deficit/hyperactivity disorder: results from the World Health Organization World Mental Health Survey Initiative. *Biological Psychiatry*, v. 65, n. 1, p. 46–54, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2008.10.005>.

LAURINDO, L. F. *et al.* The therapeutic potential of bee venom-derived Apamin and Melittin conjugates in cancer treatment: A systematic review. *Pharmacological Research*, v. 209, p. 107430, nov. 2024. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2024.107430>.

Liberato, J. L., Godoy, L. D., Cunha, A. O. S., Mortari, M. R., de Oliveira Beleboni, R., Fontana, A. C. K., Lopes, N. P., & Dos Santos, W. F. (2018). Parawixin2 Protects Hippocampal Cells in Experimental Temporal Lobe Epilepsy. *Toxins*, 10(12), 486. <https://doi.org/10.3390/toxins10120486>

LUEPTOW, L. M. Novel Object Recognition Test for the Investigation of Learning and Memory in Mice. *Journal of Visualized Experiments*, n. 126, e55718, 2017. <https://doi.org/10.3791/55718>

PIRES, Samia Marcia Araujo Monteiro; PONTES, Fernando Augusto Ramos; PEREIRA, Bárbara Lúcia da Silva; AMORAS, Jair Deivison Freire; SILVA, Simone Souza da Costa. Impactos do TDAH à adolescência: revisão sistemática de literatura. *Revista Brasileira de Educação Especial*, Dourados, v. 30, e0174, p. 1–20, 2024. DOI: 10.1590/1980-54702024v30e0174

MATTOS, P. et al. Adult ADHD Symptoms in a Large Metropolitan Area From Brazil: Prevalence and Associations with Psychiatric Comorbidity, Bullying, Sexual Abuse, and Quality of Life. *Journal of Attention Disorders*, v. 28, n. 7, p. 1082-1091, 2024. <https://doi.org/10.1177/10870547241229097>

NÔGA, D. A. et al. Anticonvulsant Effects of Fractions Isolated from *Dinoponera quadricaps* Ant Venom. *Toxins*, v. 9, n. 1, p. 5, 2016. <https://doi.org/10.3390/toxins9010005>

OLIVEIRA, V. F. L. et al. Methylphenidate: a review. *Revista Científica Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento*, v. 6, n. 5, p. 05-14, 2021.

<https://doi.org/10.32749/nucleodoconhecimento.com.br/health/methylphenidate-a-review>

PATRICIO, F.; MORALES-ANDRADE, A. A.; PATRICIO-MARTÍNEZ, A.; LIMÓN, I. D. Cannabidiol as a Therapeutic Target: Evidence of its Neuroprotective and Neuromodulatory Function in Parkinson's Disease. *Frontiers in Pharmacology*, v. 11, p. 595635, 15 dez. 2020. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.595635>.

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, n. 3, p. 149–167, 1985.

[https://doi.org/10.1016/0165-0270\(85\)90031-7](https://doi.org/10.1016/0165-0270(85)90031-7)

PIZZO, A. B. *Caracterização bioquímica e atividade biológica de componentes isolados da peçonha da vespa social Agelaia vicina (Hymenoptera: Vespidae) em sistemas de neurotransmissão*. 2004.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2004. Andrea B. Pizzo.

Caracterização química e atividade biológica de frações isoladas da peçonha da vespa social agelaia vicina (Hymenoptera Vespidae). Bolsa de doutorado FAPESP. Processo: 00/08010-5).

PIZZO, A. B. et al. Characterization of the actions of AvTx 7 isolated from *Agelaia vicina* (Hymenoptera: Vespidae) wasp venom on synaptosomal glutamate uptake and release. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, v. 18, n. 2, p. 61-68, 2004. DOI: 10.1002/jbt.20014.

POSNER, J. et al. Attention-deficit hyperactivity disorder. *The Lancet*, v. 395, n. 10222, p. 450–462, 2020.

[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)33004-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)33004-1)

RAMOS, A. et al. A multiple-test study of anxiety-related behaviours in six inbred rat strains.

Behavioural Brain Research, v. 85, n. 1, p. 57–69, 1997. [https://doi.org/10.1016/s0166-4328\(96\)00164-7](https://doi.org/10.1016/s0166-4328(96)00164-7)

RAONY, Í., Domith, I., Lourenco, M. V., Paes-de-Carvalho, R., & Pandolfo, P. (2022). Trace amine-associated receptor 1 modulates motor hyperactivity, cognition, and anxiety-like behavior in an animal model of ADHD. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, 117, 110555. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2022.110555>

REALE, L. et al. Comorbidity prevalence and treatment outcome in children and adolescents with ADHD. *European Child & Adolescent Psychiatry*, v. 26, n. 12, p. 1443–1457, 2017.

<https://doi.org/10.1007/s00787-017-1005-z>

SILVA, J. et al. Pharmacological Alternatives for the Treatment of Neurodegenerative Disorders:

Wasp and Bee Venoms and Their Components as New Neuroactive Tools. *Toxins*, v. 7, n. 8, p. 3179–3209, 2015. <https://doi.org/10.3390/toxins7083179>

STOREBØ, O. J. et al. Methylphenidate for children and adolescents with attention deficit

hyperactivity disorder (ADHD). *Cochrane Database of Systematic Reviews*, n. 11, Art. CD009885, 2018. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD009885.pub3>

WALSH, R. N.; CUMMINS, R. A. The open-field test: A critical review. *Psychological Bulletin*, v. 83, n. 3, p. 482–504, 1976. <https://doi.org/10.1037/0033-2909.83.3.482>

WENTHUR, C. J. Classics in Chemical Neuroscience: Methylphenidate. *ACS Chemical Neuroscience*, v. 7, n. 8, p. 1030–1040, 2016. <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.6b00199>

WOLRAICH, M. L. et al. Clinical Practice Guideline for the Diagnosis, Evaluation, and Treatment of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder in Children and Adolescents. *Pediatrics*, v. 144, n. 4, e20192528, 2019. <https://doi.org/10.1542/peds.2019-2528>

YANG, X. et al. Animal Venom Peptides as a Treasure Trove for New Therapeutics Against Neurodegenerative Disorders. *Current Medicinal Chemistry*, v. 26, n. 25, p. 4749–4774, 2019. <https://doi.org/10.2174/0929867325666181031122438>