



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO E INOVAÇÃO
TECNOLÓGICA EM MEDICAMENTOS

ESTUDO DE SEGURANÇA DA RITALINA® (CLORIDRATO DE
METILFENIDATO) EM ANIMAIS ADULTOS: ASPECTOS DE
NEUROTOXICIDADE E NEFROTOXICIDADE

LUIZA HERBENE MACEDO SOARES SALVIANO

Orientadora: Profa. Dra. Marta Maria de França Fonteles

Co-orientadora: Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins

FORTALEZA – CE

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO E INOVAÇÃO
TECNOLÓGICA EM MEDICAMENTOS

ESTUDO DE SEGURANÇA DA RITALINA® (CLORIDRATO DE
METILFENIDATO) EM ANIMAIS ADULTOS: ASPECTOS DE
NEUROTOXICIDADE E NEFROTOXICIDADE

LUIZA HERBENE MACEDO SOARES SALVIANO

Orientadora: Profa. Dra. Marta Maria de França Fonteles

Co-orientadora: Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos (PPGDITM) da Universidade Federal do Ceará como requisito à obtenção do título de Doutora.

FORTALEZA – CE

2015

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

-
- S175e Salviano, Luiza Herbene Macedo Soares.
 Estudo de segurança da ritalina (cloridrato de metilfenidato) em animais adultos: aspectos de neurotoxicidade e nefrotoxicidade. / Luiza Herbene Macedo Soares Salviano. – 2015.
 148 f.: il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará; Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem; Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos, Fortaleza, 2015.
 Área de Concentração: Inovação Tecnológica em Medicamentos.
 Orientação: Profa. Dra. Marta Maria de França Fonteles.
 Co-Orientação: Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins.
1. Transtorno do Deficit de Atenção com Hiperatividade. 2. Metilfenidato. 3. Avaliação de Medicamentos. I. Título.

CDD 616.8589

**ESTUDO DE SEGURANÇA DA RITALINA® (CLORIDRATO DE
METILFENIDATO) EM ANIMAIS ADULTOS: ASPECTOS DE
NEUROTOXICIDADE E NEFROTOXICIDADE**

Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica (PPGDITM) da Universidade Federal do Ceará (UFC), como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutora.

Aprovada em: ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Marta Maria de França Fonteles (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará- UFC

Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins (Co-Orientadora)
Universidade Federal do Ceará- UFC

Profa. Dra. Tereza Maria de Jesus Ponte Carvalho
Universidade Federal do Ceará- UFC

Profa. Dra. Rita Neuma Dantas Cavalcante de Abreu
Universidade de Fortaleza- UNIFOR

Profa. Dra. Edna Maria Camelo Chaves
Universidade Estadual do Ceará- UECE

EPÍGRAFE

O tempo

A vida é o dever que nós trouxemos para fazer em casa.
Quando se vê, já são seis horas!
Quando se vê, já é sexta-feira!
Quando se vê, já é natal...
Quando se vê, já terminou o ano...
Quando se vê perdemos o amor da nossa vida.
Quando se vê passaram 50 anos!
Agora é tarde demais para ser reprovado...
Se me fosse dado um dia, outra oportunidade, eu nem olhava o relógio.
Seguiria sempre em frente e iria jogando pelo caminho a casca dourada e inútil das horas...
Seguraria o amor que está a minha frente e diria que eu o amo...
E tem mais: não deixe de fazer algo de que gosta devido à falta de tempo.
Não deixe de ter pessoas ao seu lado por puro medo de ser feliz.
A única falta que terá será a desse tempo que, infelizmente, nunca mais voltará.

Mario Quintana

DEDICATÓRIA

À *Deus*, pelo dom da vida e por permitir que eu chegasse até aqui, com fé e perseverança.

"Andar com fé eu vou, que a fé não costuma falhar."

Aos meus pais, *Luiz e Terezinha*, que me apoiaram e estiveram sempre comigo ao longo dessa caminhada, torcendo e orando por mim, para que eu conseguisse atingir esse meu objetivo.

AGRADECIMENTOS

Ao meu filho, *Túlio*, que muitas vezes tive que deixar na companhia de outros para que eu pudesse viajar a Fortaleza e desempenhar minhas tarefas. Sou grata pela sua compreensão, ainda que seja tão pequeno para entender tudo isso;

À minha orientadora, *profa. Dra. Marta Maria de França Fonteles*, pela paciência que teve comigo durante esses anos e por aceitar me orientar à distância. Agradeço muito os seus ensinamentos, a disponibilidade em ajudar e o incentivo e atenção prestados;

À *profa. Dra. Alice Maria Costa Martins*, pela acolhida no Laboratório de Cultivo Celular (LCC), pelos ensinamentos e por aceitar participar da co-orientação desta tese;

Às colegas *Isabel e Dânya*, pela ajuda valiosíssima na obtenção dos meus resultados. A ajuda de vocês foi imprescindível para que eu chegasse até aqui. A vocês, o meu muito obrigada;

Aos colegas de laboratório: Edith, Alana, Klistenes, Felipe, Adriano, o meu agradecimento pela ajuda nos experimentos, construção dos gráficos e elaboração do artigo científico. A participação de cada um de vocês, por menor que fosse, foi fundamental para conquista de hoje;

À minha prima *Patrícia*, pela ajuda na impressão de todos os documentos desta tese, parceria e paciência de me ouvir treinando a defesa durante dias, obrigada pelo companheirismo durante toda essa trajetória;

Ao psiquiatra do CAPS do município de Jardim *Dr. Carlos Ticiano Dantas*, por fornecer as prescrições de Metilfenidato que utilizamos nesta pesquisa;

À Funcap, pelo apoio financeiro.

RESUMO

O Metilfenidato (MFD) é o psicoestimulante mais utilizado no Brasil para o tratamento do Transtorno do Déficit da Atenção e Hiperatividade (TDAH), distúrbio neuropsiquiátrico muito freqüente na infância, crianças na idade escolar e adolescência, porém está sendo muito prescrito, gerando a necessidade de estudar a segurança de seu uso. Objetivou-se avaliar a segurança da ritalina®, em animais adultos, contemplando aspectos de neuro e nefrotoxicidade. Avaliou-se os efeitos do Metilfenidato utilizando modelos neurocomportamentais de avaliação de ansiedade, depressão, atividade locomotora e convulsão, após tratamento agudo em animais adultos, identificou-se os seus efeitos sobre os níveis de monoaminas no hipocampo e corpo estriado, investigou-se a atividade da acetilcolinesterase em hipocampo e corpo estriado (modelo colinérgico de convulsão), avaliou-se o efeito do MFD em rim isolado, em células tubulares renais sobre a viabilidade e proliferação da linhagem celular em estudo e avaliou-se os parâmetros bioquímicos renais *in vivo*. O MFD aumentou todos os parâmetros analisados nos testes do labirinto em cruz elevado, comprovando seu efeito ansiolítico, aumentou a atividade locomotora no teste do campo aberto, não alterando o *grooming* e *rearing*, sugerindo um efeito ansiolítico e desinibitório; No teste do *rota rod*, a coordenação motora dos animais não foi alterada, mostrando que os efeitos do MFD não se relacionam com o bloqueio neuromuscular periférico, mas sim, ocasionados centralmente; O MFD apresentou efeito antidepressivo no teste do nado forçado, pois diminuiu o tempo de imobilidade dos animais, sugerindo uma maior investigação nesse contexto, uma vez que o fármaco não é usado na clínica como antidepressivo. Verificou-se o aumento da concentração das aminas biógenas estudadas, corroborando com o efeito antidepressivo observado no modelo nado forçado. No teste da convulsão induzida por pilocarpina, o MFD diminuiu as latências de convulsão e de morte, demonstrando uma atividade proconvulsivante. Além disso, reduziu a atividade da AChE no corpo estriado, sugerindo um possível mecanismo colinérgico para potencialização das convulsões no modelo do P400. O MFD reduziu o fluxo urinário, o ritmo de filtração glomerular e o percentual de transporte tubular de sódio (%TNa⁺) quando comparado com o grupo controle. Nos experimentos *in vivo*, com 24 e 48 horas após tratamento com MFD, os parâmetros da função renal: uréia, creatinina, clearance de creatinina, excreção de Na⁺ e K⁺ não foram alterados. O MFD não causou alterações histológicas em rins após 24 e 48h de tratamento. Nos testes com células tubulares renais MDCK, o MFD não causou redução na viabilidade das células epiteliais renais do túbulo distal. Diante dos resultados, embora o MFD pareça ser uma opção segura para o tratamento do TDAH, ele deve ser utilizado com cautela, uma vez que foram detectadas alterações nos parâmetros de função renal, sugerindo um possível efeito nefrotóxico, devendo ser investigado em maior profundidade, a fim de avaliar a intensidade desses efeitos em longo prazo.

Palavras-chave: Metilfenidato; Neurotoxicidade; Nefrotoxicidade

ABSTRACT

Methylphenidate (MFD) is the most widely used psychostimulant in Brazil for the treatment of Attention Deficit and Hyperactivity Disorder (ADHD), very frequent neuropsychiatric disorder in childhood, school-age children and adolescents; however, it is being prescribed too frequently, creating the need to study the safety of its use. The objective was to evaluate the safety of Ritalin use in adult animals, considering neuro- and nephrotoxicity aspects. We evaluated the effects of methylphenidate using neurobehavioral evaluation models of anxiety, depression, motor activity and seizures after acute treatment in adult animals, identified its effects on monoamine levels in the hippocampus and striatum investigated acetylcholinesterase activity in the hippocampus and striatum (cholinergic seizure model), evaluated the effect of MFD on isolated kidney, on kidney tubular cells regarding the viability and proliferation of the assessed cell line and evaluated renal biochemistry parameters *in vivo*. MFD increased all analyzed parameters in the elevated plus maze tests, demonstrating its anxiolytic effect, increased locomotor activity in the open field test, without changing the grooming and rearing, suggesting an anxiolytic and disinhibitory effect; in the rotarod test, the animals' coordination was not affected, indicating that MFD effects are not related to the peripheral neuromuscular blockade, but rather caused centrally; MFD showed an antidepressant effect in the forced swimming test, as it decreased the immobility time of animals, suggesting further investigation in this context, since the drug is not used in clinical practice as an antidepressant. The levels of the assessed biogenic amines were increased, corroborating the antidepressant effect observed in the forced swimming model. In the pilocarpine-induced seizure test, MFD decreased the seizure latency and death, showing a proconvulsant activity. In addition, it decreased AChE activity in the striatum, suggesting a possible cholinergic mechanism for seizure enhancement in the P400 model. MFD reduced urinary flow, glomerular filtration rate and renal sodium tubular transport percentage (%TNa⁺) compared with the control group. In *in vivo* experiments, 24 and 48 hours after treatment with MFD, the parameters of renal function: urea, creatinine, creatinine clearance, Na⁺ and K⁺ excretion remained unaltered. In the histological analysis, MFD did not exert harmful effects on the kidney. In tests with MDCK renal tubular cells, MFD did not reduce the viability of renal epithelial cells of the distal tubule. Based on the results, although MFD seems to be a safe choice for the treatment of ADHD, it should be used with caution, as changes were detected in renal function parameters, suggesting a possible nephrotoxic effect that should be investigated more thoroughly, to evaluate the intensity of these long-term effects.

Keywords: Methylphenidate; Neurotoxicity; Nephrotoxicity

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura do Metilfenidato (MFD)	35
Figura 2. Ilustração do instrumento utilizado no teste Labirinto em Cruz Elevado	50
Figura 3. Teste do Campo Aberto. A. Caixa em acrílico, com o piso dividido em nove partes. B. Grooming C. Rearing	51
Figura 4. Ilustração do instrumento utilizado no teste do Rota Rod	52
Figura 5. Teste do Nado Forçado.	53
Figura 6. Foto do sistema de perfusão de rim isolado.	61
Figura 7. Desenho esquemático do sistema de perfusão de rim isolado.	63
Figura 8. Fotografia do rim de rato isolado no sistema de perfusão	64
Figura 9. Efeito do MFD e Diazepam sobre o número de entrada nos braços abertos (NEBA) no teste Labirinto em Cruz Elevado em animais adultos.	73
Figura 10. Efeito do MFD e diazepam sobre a percentagem de entradas nos braços abertos (PEBA) no teste Labirinto em Cruz Elevado em animais adultos.	73
Figura 11. Efeito do MFD e diazepam sobre o tempo de permanência nos braços abertos (TPBA) no teste Labirinto em Cruz Elevado em animais adultos.	74
Figura 12. Efeito do MFD e diazepam sobre a percentagem do tempo de permanência nos braços abertos (PTBA) no teste Labirinto em Cruz Elevado em animais adultos.	74
Figura 13. Efeito do MFD e diazepam sobre a atividade locomotora espontânea no teste do Campo Aberto em animais adultos.	76
Figura 14. Efeito do MFD e diazepam sobre o número de <i>rearing</i> no teste do Campo Aberto em animais adultos.	76
Figura 15. Efeito do MFD e diazepam sobre o número de <i>grooming</i> no teste do Campo Aberto em animais adultos.	77
Figura 16. Efeito do MFD e imipramina sobre o tempo de imobilidade no teste Nado Forçado em animais adultos.	79
Figura 17. Concentração de monoaminas no corpo estriado de animais	81

adultos submetidos ao tratamento agudo com MFD.

Figura 18. Concentração de serotonina no corpo estriado de animais adultos submetidos ao tratamento agudo com MFD. **81**

Figura 19. Efeito do MFD sobre a latência de convulsão no teste de Convulsão Induzida por Pilocarpina em animais adultos. **83**

Figura 20. Efeito do MFD sobre a sobrevida no teste de Convulsão Induzida por Pilocarpina em animais adultos. **83**

Figura 21. Efeito do MFD sobre a atividade da AChE em hipocampo de animais adultos durante as convulsões induzidas por P400. **84**

Figura 22. Efeito do MFD sobre a atividade da AChE em corpo estriado de animais adultos durante as convulsões induzidas por P400. **85**

Figura 23. Fluxo Urinário (FU; a) e Ritmo de Filtração Glomerular (RFG; b) nos grupos controle e tratado com Metilfenidato (MFD). **86**

Figura 24. Pressão de Perfusão (PP; a) e Resistência Vascular Renal (RVR; b) nos grupos controle e tratado com Metilfenidato (MFD). **87**

Figura 25. Percentual de Transporte Tubular de Sódio (%TNa⁺) e Percentual de Transporte Tubular de Potássio (%TK⁺) nos grupos controle e tratado com Metilfenidato (MFD). **88**

Figura 26. Fotomicrografia dos animais 24 horas após a administração com Metilfenidato (hematoxilina-eosina). **90**

Figura 27. Efeito do Metilfenidato e diferentes concentrações (1000; 500; 250; 100; 50; 5 ug/mL) sobre células MDCK pelo método do MTT. **91**

Figura 28. Porcentagem de liberação da enzima Lactato Desidrogenase de células MDCK induzida pelo Metilfenidato (1000; 500; 250; 100; 50; 5 ug/mL). **92**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Preparações de Metilfenidato comercializadas no Brasil para o tratamento do TDAH.	34
Tabela 2. Elenco de Referência de Medicamentos para a Assistência Farmacêutica na Atenção Secundária em Saúde.	42
Tabela 3. Parâmetros comportamentais observados	55
Tabela 4. Substâncias usadas na perfusão renal	62
Tabela 5. Efeito do Metilfenidato e Diazepam sobre o número de quedas e tempo de permanência na barra no teste Rota <i>Rod</i> em animais adultos	78
Tabela 6. Efeitos do MFD (10mg) sobre a função renal dos animais após 24h e 48h	89

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

mRNA – Ácido Ribonucleico mensageiro
5-HT - 5-hidroxitriptamina; serotonina
ALE - Atividade Locomotora Espontânea
ACh - Acetilcolina
AChE - Acetilcolinesterase
ANOVA - Análise de Variância
CaCl₂ - Cloreto de Cálcio
Clcr - Clearance de Creatinina
CAPS – Centro de Atenção Psicossocial
CEPA - Comitê de Ética em Pesquisa Animal
CIB/CE - Comissão Intergestora Biparte do Ceará
CIT - Comissão Intergestores Tripartite
COASF - Coordenadoria de Assistência Farmacêutica
CP - Creatinina Plasmática
CU - Creatinina Urinária
DA - Dopamina
DAT - Transportador de Dopamina
DSM - Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders
DZP - Diazepam
DST - Doenças Sexualmente Transmissíveis
EPM - Erro padrão da média
FENa⁺ - Fração Excretada de Sódio
FEK⁺ - Fração Excretada de Potássio
FU - Fluxo Urinário
HPLC - Cromatografia líquida de alta performance
i.p. - Via Intraperitoneal
KCl - Cloreto de Potássio
LCE - Labirinto em Cruz Elevado
LDH - Lactato Desidrogenase
MDCK - Madin-Darby Canine Kidney
MFD – Metilfenidato
MgSO₄ - Sulfato de Magnésio

MTT - 3-(4,5-dimetilazil-2-il)-2,5 difenil tetrazólico
NaCl - Cloreto de Sódio
NaH₂PO₄ - Fosfato de Sódio
NaHCO₃ - Carbonato de Sódio
NA - Noradrenalina
NET - Transportador de Noradrenalina
NEBA - Número de Entradas nos Braços Abertos
NEBF - Número de Entradas nos Braços Fechados
NUMEX - Núcleo de Medicamentos de Caráter Excepcional
NUFITO - Núcleo de Fitoterápicos
NUMES - Núcleo de Medicamentos Essenciais e Estratégicos
P400 - Pilocarpina
PDR - Physicians Desk Reference
PP - Pressão de Perfusão
PNAF - Política Nacional de Assistência Farmacêutica
RFG - Ritmo de Filtração Glomerular
RPM - Rotações Por Minuto
RVR - Resistência Vascular Renal
s.c. - Subcutâneo
SCP - Sinais Colinérgicos Periféricos
SDS - Dodecil Sulfato de Sódio
SESA - Secretaria de Saúde
SMS - Secretarias Municipais de Saúde
SNC - Sistema Nervoso Central
TDAH - Transtorno do Déficit de Atenção e Hiperatividade
TNF - Teste do Nado Forçado
TPBF - Tempo de Permanência nos Braços Fechados
TPBA - Tempo de Permanência nos Braços Abertos
UFC - Universidade Federal do Ceará
VU - Volume Urinário
v.o. - Via Oral
%TNa⁺ - Percentual de Transporte Tubular de Sódio
%TK⁺ - Percentual de Transporte Tubular de Potássio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1. Transtorno do Déficit da Atenção e Hiperatividade – TDAH	23
2.2. Neurobiologia do TDAH	29
2.2.1. Hipocampo	30
2.2.2. Corpo Estriado	32
2.3. Metilfenidato (MFD)	33
2.4. A inclusão do Metilfenidato na Assistência Farmacêutica do Ceará	40
3. OBJETIVOS	46
3.1 Geral	46
3.2 Específicos	46
4. MATERIAL E MÉTODOS	47
4.1. ESTUDOS NEUROCOMPORTAMENTAIS	47
4.1.1. Animais Utilizados	47
4.1.2. Tratamento dos Grupos Experimentais	47
4.1.3. Protocolo Experimental	48
4.1.4. Atividade Ansiolítica	49
4.1.4.1. Teste do Labirinto em Cruz Elevado (Plus maze)	49
4.1.5. Atividade Motora	50
4.1.5.1. Teste do Campo Aberto	50
4.1.5.2. Teste do <i>Rota Rod</i>	52
4.1.6. Atividade Antidepressiva	53
4.1.6.1 Teste do Nado Forçado	53
4.1.7. Atividade Anticonvulsivante	54

4.1.7.1	Teste da convulsão induzida por pilocarpina	54
4.1.7.2.	Dissecação das Áreas Cerebrais (Hipocampo e Corpo Estriado)	55
4.1.7.3.	Determinação das concentrações de Monoaminas com HPLC	56
4.1.7.3.1.	Procedimento Experimental	57
4.1.7.3.2.	Soluções Reagentes	58
4.1.7.4.	Determinação da Atividade da Acetilcolinesterase (AChE).	59
4.1.7.4.1	Método	59
4.1.7.4.2.	Soluções Reagentes	59
4.2.	ESTUDOS DE AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO RENAL	60
4.2.1.	Animais Utilizados	60
4.2.2.	Avaliação da Função renal “ <i>ex vivo</i> ”	60
4.2.2.1.	Perfusão em Rim Isolado	60
4.2.2.2.	Calibração do Sistema	61
4.2.2.3.	Solução Perfusora	62
4.2.2.4.	Técnica Cirúrgica	63
4.2.2.5.	Protocolo Experimental	64
4.2.2.6.	Grupos Experimentais	65
4.2.2.7.	Parâmetros Funcionais Renais	65
4.2.3.	Avaliação da Função Renal “ <i>in vivo</i> ”	67
4.2.3.1.	Animais Experimentais	67
4.2.3.2.	Protocolo Experimental	67
4.2.4.	Avaliação do efeito do Metilfenidato sobre células renais	69
4.2.4.1.	Linhagem Celular e Condições de Cultivo	69
4.2.4.2.	Ensaio de viabilidade	70
4.2.4.2.1.	MTT	70

4.2.4.2.2. Lactato Desidrogenase (LDH)	70
4.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA	71
4.4. ASPECTOS ÉTICOS	71
5. RESULTADOS	72
5.1. Avaliação da Atividade Ansiolítica	72
5.1.1. Teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE)	72
5.2. Avaliação da Atividade Locomotora	75
5.2.1. Teste do Campo Aberto	75
5.2.2. Teste do <i>Rota Rod</i>	77
5.3. Avaliação da Atividade Antidepressiva	79
5.3.1. Teste do Nado Forçado	79
5.4. Determinação das Concentrações de Monoaminas	80
5.5. Avaliação da Atividade Anticonvulsivante	82
5.5.1. Teste da Convulsão Induzida por Pilocarpina	82
5.6. Efeitos do MFD sobre a atividade da acetilcolinesterase em hipocampo e corpo estriado de animais adultos tratados ou não com P400	84
5.7. Avaliação da Função Renal “ <i>ex vivo</i> ”	85
5.8. Avaliação da Função Renal “ <i>in vivo</i> ”	89
5.8.1. Análise Bioquímica 24h e 48h após MFD	89
5.8.2. Análise Histológica dos rins tratados com MFD	89
5.9. Efeitos do MFD em células tubulares renais MDCK	90
5.9.1. Ensaio de Viabilidade Celular	90
5.9.1.1. Ensaio de Redução do MTT	90
5.9.1.2. Ensaio de Liberação da enzima Lactato Desidrogenase (LDH)	91
6. DISCUSSÃO	93

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	114
8. CONCLUSÃO	116
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	117

1. INTRODUÇÃO

O Transtorno do Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH) é um distúrbio neuropsiquiátrico comum que causa transtornos sociais, acadêmicos e ocupacionais principalmente em crianças e adolescentes (WIGAL; TAN; APPETON, 2009). No Brasil, a prevalência desse transtorno é em torno de 7% (COUTO et al, 2010).

O Metilfenidato (MFD) é o fármaco de primeira escolha no tratamento do TDAH (ITABORAHY; ORTEGA, 2013), apresenta ação curta, de 2 a 3 horas, com concentração plasmática 2 horas após a ingestão oral (GREENHILL et al., 2002). O medicamento parece ser efetivo em todas as idades, mesmo nos pré-escolares e naqueles que têm a TDAH instalada na vida adulta e parece ser seguro (DOPPHEIDE; PLISZKA, 2009; LEONARD, 2004).

Trata-se do psicoestimulante mais consumido em termos mundiais (ITABORAHY; ORTEGA, 2013). Estudos mostram que sua produção passou de 2,8 toneladas, em 1990, para quase 38 toneladas, em 2006; e isto se deve não somente à sua vinculação ao TDAH, mas principalmente à intensa publicidade acerca do medicamento (ITABORAHY; ORTEGA, 2013). No Brasil, seguindo essa tendência mundial, o consumo também está crescendo ao longo dos anos. Em 2007, foram vendidas para a população quase 1.150.000 caixas de MFD (ITABORAHY, 2009).

De fato, existe a preocupação da sociedade com a publicidade maciça da indústria farmacêutica envolvendo o MFD, uma vez que, por meio de informes publicitários, ocorre a valorização apenas dos benefícios desse fármaco, ampliando a necessidade de consumo. Tais preocupações podem funcionar como uma coerção para o uso abusivo do MFD, principalmente em relação ao seu efeito de promover o aprimoramento cognitivo, expressamente relatado por jovens universitários dentre outros aspectos, além do seu uso no TDAH, com diagnósticos imprecisos (ORTEGA; BARROS, 2011).

Na verdade, o fato do diagnóstico do TDAH ser clínico e de não existir medidas objetivas que o confirme (KEEN; HADJIKOUMI, 2008), faz com que o TDAH se torne um grande problema de saúde pública, pois os diagnósticos podem estar superestimados, levando a um aumento na prescrição de MFD (WANNMACHER, 2006; GRUND et al., 2006; ASKENASY et al., 2007). O metilfenidato é indicado em THDA para crianças a partir de seis anos de idade, adolescentes e adultos; contudo, é crescente seu uso ‘não aprovado’ em crianças com menos de seis anos (OESTREICHER et al., 2007).

O Metilfenidato bloqueia a recaptação de dopamina e noradrenalina para dentro dos neurônios e parece estimular o córtex cerebral e estruturas subcorticais (VOLKOW, 2002). As principais manifestações clínicas causadas pela “overdose” de metilfenidato são agitação, crise convulsiva, alucinações, psicose, letargia, tonteira, taquicardia, hipertensão e hipertermia (KLEIN-SCHWARTZ, 2002; TORRES, 2008; TAN; APPETON; HIGGINS, 2009). Contudo, tais manifestações devem ser melhor investigadas pois, por exemplo, existem poucos estudos mostrando se o MFD desenvolve epilepsia ou exacerba as convulsões em crianças com diagnóstico de epilepsia já estabelecido, fazendo com que haja a recomendação do uso cauteloso de MFD em crianças com epilepsia e TDAH (TORRES, 2008; TAN; APPETON, 2009).

Casos de mortes súbitas em crianças e adolescentes, efeitos adversos sobre o Sistema Nervoso Central (SNC) e efeitos sobre o crescimento têm propiciado a introdução de novas substâncias e maiores investigações relacionadas à eficácia e segurança desses medicamentos na terapia e manejo do TDAH (WIGAL, 2009).

Estudos em animais mostram que a administração aguda e crônica de MFD aumenta o índice de danos ao DNA no corpo estriado e hipocampo, o que pode ser devido a, pelo menos em parte, radicais livres gerados durante a oxidação da dopamina, que por sua vez, é metabolizada, gerando radical hidroxila (ANDREAZZA et al., 2007).

Estudos demonstraram que a exposição ao MFD em longo prazo pode modificar comportamentos relacionados à ansiedade, depressão, convulsão e circuitos neurais relacionados na idade adulta em animais (BRITTON; BETHANCOURT, 2009).

Assim, estudos em animais são muito importantes para elucidar os mecanismos pelos quais o MFD altera o funcionamento do sistema nervoso central. Quando modelos animais são utilizados para reproduzir condições clínicas, eles devem ser capazes de mimetizar os sintomas fundamentais da condição estudada, confirmar o racional teórico implicado na gênese do problema e prever aspectos do comportamento, genética e neurobiologia da doença em questão (KOOJI; GLENNON, 2007).

O metilfenidato, além de ser largamente utilizado para o tratamento do TDAH e para a narcolepsia, um raro transtorno do sono, tem outros três usos “não médicos” relatados na literatura: o recreativo, para aumentar o tempo de vigília e disposição durante o lazer; o estético, para auxiliar o emagrecimento; e o aprimoramento cognitivo, para melhorar o desempenho cognitivo profissional e acadêmico (NIDA, 2005).

Alguns estudos epidemiológicos (LOW; GENDASZEK, 2002; HALL, 2005; WHITE, 2006; TETER, 2006) apontam que o MFD é um dos medicamentos mais utilizados para aprimoramento cognitivo. O uso do metilfenidato está aumentando entre os estudantes para melhorar o rendimento acadêmico, proporcionando aumento na capacidade de concentração, atenção e estado de alerta também em pessoas saudáveis (NIDA, 2005).

Um estudo realizado no Ceará analisou 57 processos de solicitação do Metilfenidato no Estado do Ceará e encontrou que a diminuição dos sintomas do transtorno e a melhora do convívio social e escolar foram as principais justificativas para a indicação do metilfenidato (OLIVEIRA, 2013). O autor ainda revela que a demanda de solicitação do medicamento vem aumentando a cada ano.

Além disso, pouco se conhece acerca do funcionamento renal e os efeitos comportamentais dos pacientes em uso de MFD, e se esse fármaco, de forma aguda ou crônica, provoca ou não algum efeito sobre o SNC e sistema renal. É importante, então, identificar evidências robustas de efetividade e segurança de seu uso na população (DIAS; HOEFLER, 2009).

Devido à necessidade de se investigar apropriadamente os efeitos do MFD, em estudos animais e em humanos, associado ao fato do aumento do número de prescrições e do seu uso continuado até a vida adulta (HIGGINS, 2009), uma vigilância pós-comercialização é justificada, abrangendo estudos de utilização do medicamento e farmacovigilância, de modo a possibilitar o uso eficaz e seguro nas pessoas e sociedade. Vale ressaltar, o uso indiscriminado desse medicamento que constitui uma problemática atual, uma vez que é usado em diferentes idades e particularmente, em jovens, para aumentar a concentração em situações difíceis como realização de exames escolares.

Nesse sentido, o presente trabalho objetivou, num contexto de investigação dos aspectos de segurança, estudar o Metilfenidato em animais adultos, em dose única, particularmente focalizando os possíveis efeitos desse fármaco sobre o SNC e na função renal.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Transtorno do Déficit da Atenção e Hiperatividade (TDAH)

O Transtorno do Déficit da Atenção e Hiperatividade (TDAH) é um distúrbio neuropsiquiátrico muito freqüente na infância, em crianças na idade escolar e na adolescência (KLEIN-SCHWARTZ, 2003), que causa transtornos sociais, acadêmicos e ocupacionais principalmente em crianças e adolescentes (TAN; APPETON, 2005; WIGAL, 2009).

Ao longo da história, o TDAH tem aparecido com variações na sua nomenclatura, incluindo algumas denominações como Lesão Cerebral Mínima, Reação Hiperkinética da Infância, Distúrbio do Déficit de Atenção ou Distúrbio de Hiperatividade com Déficit de Atenção/Hiperatividade (POETA; NETO, 2006).

A etiologia do TDAH é multifatorial, ou seja, não há um único fator e inclui diversos fatores como baixo peso ao nascer, exposição pré-natal ao álcool ou cigarro (MICK et al., 2002), idade e saúde materna, duração do parto, sofrimento fetal (SPENCER et al., 2002) e componentes genéticos. A hereditariedade tem sido muito estudada, mostrando que o TDAH é transmitido entre familiares (FARAONE, 2004). Estudos realizados com gêmeos e com crianças adotadas relatam que os genes têm papel importante na transmissão do TDAH em uma família (BIEDERMAN; FARAONE, 2005).

Esses estudos vêm sendo conduzidos para relacionar genes reguladores dos receptores dopaminérgicos, transportador de dopamina e adrenorreceptores com o TDAH e diferentes respostas ao tratamento com metilfenidato (ROHDE et al., 2003; LOWE et al., 2004). Os resultados são consistentes com a idéia de que há uma vulnerabilidade genética para o TDAH sendo mediada por genes de pequeno efeito (FARAONE et al., 2005), porém, os estudos

genéticos ainda são muito controversos, principalmente quanto o papel dos genes DRD4 e DAT1, primeiros genes diretamente relacionados ao TDAH (COUTO et al., 2010).

Alguns autores apontam evidências de que o TDAH se trata de um distúrbio neurobiológico, podendo estar atribuídas a duas possíveis causas: uma relacionada ao déficit funcional do lobo frontal, mais precisamente o córtex cerebral e a outra ao déficit funcional de certos neurotransmissores (SEGENREICH; MATTOS, 2007).

O TDAH está associado com sintomas clínicos heterogêneos: comorbidade e eventos psicossociais. Estudos clínicos e epidemiológicos mostram que os indivíduos que apresentam TDAH têm risco aumentado de desenvolver comorbidades e de usarem substâncias de abuso (MURPHY et al., 2002; COX et al., 2004; ABIKOFF et al., 2004).

Em crianças com TDAH é bastante freqüente o surgimento de outras comorbidades mentais. Souza et al. (2001) estudaram um grupo de crianças e adolescentes com TDAH e descobriu que mais de 85% tinham transtornos comórbidos. As desordens de conduta e desafiador de oposição foram os mais comuns. Outros estudos também indicam a presença de transtornos de ansiedade, depressão, transtorno bipolar e tiques motores (GHANIZADEH, 2009).

Dige e Wik (2005) examinaram a memória em funcionamento em 48 pacientes adultos com TDAH não tratados. Em comparação com controles sadios, os pacientes com TDAH pontuaram piora significativa nos testes para avaliação de memória da dupla tarefa verbal, teste de memória de curto e longo prazo, teste de recordação imediata e atrasada, o reconhecimento e testes de aprendizagem visual.

Porém, estudos realizados por Verster et al., (2010), que analisaram os efeitos do metilfenidato sobre funcionamento da memória de adultos com TDAH, mostraram uma significativa melhoria na memória declarativa de funcionamento após administração do MFD.

Já a associação entre TDAH e epilepsia, assim como outras comorbidades, pode causar importante impacto na vida social dos indivíduos afetados e seus familiares. Estudos clínicos sugerem que 30-40% das pessoas com epilepsia também apresentam TDAH (ALDENKAM et al., 2006).

Os pacientes com epilepsia geralmente são excluídos dos ensaios clínicos que estabeleceram a segurança e eficácia dos medicamentos estimulantes, incluindo o MFD para o tratamento do TDAH. Consequentemente, a maioria dos pacientes que têm TDAH em comorbidade com epilepsia não recebem tratamento para o TDAH por causa de preocupações de que os estimulantes possam piorar as crises (TAN; APPLETON, 2005).

Nesses casos, é importante levar em consideração antes de iniciar o uso de MFD, a adequação do uso de fármacos anti-epiléticos, além de intervenções psicossociais e alternativas para tratamento (GONZALEZ-HEYDRICH et al., 2006; BAPTISTA-NETO et al., 2008).

Estima-se que quase 50% dos casos de TDAH em adultos levam a um ou mais transtornos de ansiedade, com maior prevalência em mulheres que em homens. Cerca de 30% dos adultos com TDAH têm dependência de álcool/drogas. Além disso, a maior taxa de transtornos de ansiedade também existe nos indivíduos com TDAH e álcool/dependência de drogas, em comparação com grupo controle ou com indivíduos somente com TDAH, álcool e dependência de drogas (BIEDERMAN; FARAONE, 2005; WILENS et al., 2005).

Estudos utilizando cérebro de ratos jovens após exposição crônica ao MFD mostraram que enzimas da cadeia respiratória mitocondrial são ativadas (FAGUNDES et al., 2007) contrastando com outros estudos que resultaram em insuficiência de energia por disfunção mitocondrial, cujo efeito leva à patogênese de várias doenças como demência, isquemia cerebral, alzheimer e parkinson (BLASS, 2001; SCHURR, 2002). Outros estudos em animais

têm demonstrado que o MFD pode acarretar alterações no processo da cognição (CHUHAN, 2006; LEBLANC, 2007; BETHANCOURT, 2009).

A prevalência do TDAH na população varia de 2,2% a 17,8% e é provável que essa variação decorra mais das escolhas metodológicas dos diversos estudos do que das diferenças geográficas (FARAONE et al., 2003; POLANCZYK et al., 2007; SKOUNTI et al., 2007). O TDAH afeta 8-12% de crianças em todo o mundo. A prevalência desse transtorno nos Estados Unidos da América é 6-9% nos jovens (isto é, crianças e adolescentes), e 3-5% nos adultos. A taxa de prevalência nos jovens é semelhante em todo o mundo (DUNN, 2003; DOPPHEIDE; PLISZKA, 2009).

No Brasil, as publicações de maior rigor metodológico, indicam a prevalência em torno de 5% em crianças de idade escolar (SKOUNTI et al., 2007). Estudos em adultos indicam uma prevalência de 2,0% a 4,0% (KESSLER et al., 2006).

Há estudos epidemiológicos mostrando que o sexo masculino e baixa renda familiar estão associados ao alto risco de prevalência desta doença (DOYLE, 2004). Há casos de TDAH em meninas, porém a incidência é menor do que em meninos. Esta diferença das taxas de prevalência entre os sexos é devido ao fato de que o TDAH é menos disruptivo em mulheres do que em homens (BIEDERMAN; FARAONE, 2004).

A incidência do TDAH é maior em crianças. Este transtorno pode ocorrer com comorbidades afetando o desenvolvimento, tanto neurológico quanto psicológico da criança. No entanto, não há estudos avaliando a consequência dos efeitos do Metilfenidato em longo prazo.

Em relação à sintomatologia clínica do TDAH, as crianças com TDAH geralmente são muito inquietas, agitam-se, interrompem conversas, não aguardam sua vez em brincadeiras ou na escola, perdem seus objetos com frequência. Por serem impulsivos, geralmente respondem

aos professores muitas vezes antes de ouvir uma pergunta até o final (BARKLEY, 2002; KONESKI, 2007).

Na escola, cometem erros simples, por distração (troca de sinais, letras, estrutura das operações matemáticas). Porém, no geral, não têm dificuldades de aprender, mas sim para executar as tarefas, com rendimento escolar abaixo do esperado (BENCZIK, 2002; PASTURA et al., 2005). Muitas vezes são rotuladas como malandras, preguiçosas, que vivem no “mundo da lua”, especialmente porque, quando numa atividade de maior interesse, conseguem permanecer mais atentas (BARKLEY, 2002; KONESKI, 2007).

A apresentação clínica varia conforme a idade da criança. Os mais novos são mais inquietos e impulsivos, enquanto nos adolescentes e adultos, predominam as características da desatenção (DOYLE, 2004; BIEDERMAN; FARAONE, 2005). Cerca de 60% dos pacientes mantêm os sintomas na vida adulta, com menor hiperatividade, persistindo a desatenção. Apresentam dificuldades no relacionamento conjugal, se envolvem mais frequentemente em acidentes de trânsito, apresentam problemas no emprego e maior incidência de transtornos por uso de substância psicoativa (KESSLER et al., 2006; MATTOS et al., 2006; BALINT et al., 2009).

O TDAH é classificado em três subtipos: a) com predomínio de sintomas de desatenção, cerca de 30%; b) com predomínio de sintomas de hiperatividade/impulsividade, cerca de 20%; c) subtipo combinado, cerca de metade dos casos. O tipo com predomínio de sintomas de desatenção é mais freqüente no sexo feminino, e é o que mais acarreta prejuízo no rendimento escolar, enquanto no subtipo com predomínio hiperatividade/impulsividade, encontram-se crianças com maior comprometimento social (ROHDE et al., 2004; LUBKE et al., 2007).

Quanto ao diagnóstico do TDAH, o critério classificatório mais utilizado na literatura é fornecido pelo Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais – quarta edição

(*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth edition – DSM-IV*). O diagnóstico requer, pelo menos, a presença de seis de nove características comportamentais de desatenção e hiperatividade/impulsividade, esses sintomas devem estar presentes, no mínimo, há pelo menos seis meses, tendo iniciado antes dos sete anos de idade, e resultando essa sintomatologia num funcionamento mal adaptativo e inconsistente com o nível de desenvolvimento. Tais sintomas devem estar presentes em dois ou mais ambientes distintos (por exemplo: casa e escola), o que pode causar prejuízo acadêmico e social para os indivíduos (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2002).

O diagnóstico do TDAH é fundamentalmente clínico, pois atualmente não existe nenhum marcador bioquímico para esse transtorno (TRIPP; WICKENS, 2009). Tal diagnóstico requer a avaliação das manifestações caracterizadas por uma combinação de problemas com a atenção (baixa concentração, distractibilidade e esquecimentos) e também hiperatividade e impulsividade. Tais sintomas frequentemente persistem na idade adulta (FARAONE et al., 2003).

É importante destacar que para o diagnóstico de TDAH é necessário correlacionar os sintomas com a história de vida da criança, desde que a desatenção, a hiperatividade e a impulsividade, isoladamente, podem ser resultantes de problemas no relacionamento das crianças com os pais e amigos, sistemas educacionais inadequados ou outros transtornos comumente encontrados na infância e adolescência. Além disso, o diagnóstico realizado antes dos sete anos de idade deve ser cauteloso, pois entre quatro e cinco anos um certo grau de hiperatividade em crianças é aceitável, uma vez que o desenvolvimento neuroevolutivo do cérebro, com a completa mielinização da área pré-frontal, ocorre nessa faixa etária (MICK et al., 2002).

2.2. Neurobiologia do TDAH

A teoria científica atual defende que no TDAH existe uma disfunção da neurotransmissão dopaminérgica na área frontal (pré-frontal, frontal motora, giro cíngulo); regiões subcorticais (estriado, tálamo médiodorsal) e a região límbica cerebral (núcleo acumbens, amígdala e hipocampo). Alguns trabalhos indicam uma evidente alteração destas regiões cerebrais resultando na impulsividade do paciente (RUBIA et al., 2001).

Alterações em vias dopaminérgicas e noradrenérgicas desempenham importante papel na fisiopatologia do TDAH, apesar de não existir ainda compreensão total a respeito dos mediadores químicos envolvidos (PRINCE, 2008; WILENS, 2008).

Evidências obtidas por meio de estudos farmacológicos, de neuroimagem e de lesões cerebrais, sugerem que as catecolaminas, dopamina e noradrenalina desempenham papel fundamental (PRINCE, 2008; LEVY, 2009). Mas, apesar desse maior envolvimento com as catecolaminas, é provável que ocorra desequilíbrio entre os vários sistemas de neurotransmissores que interagem entre si, determinando os diferentes fenótipos observados (KHAN; FARAONE, 2006; PRINCE, 2008; MICK; FARAONE, 2008).

Investigação neurobiológica realizada em pacientes com TDAH tem mostrado uma falta de conexão nas principais regiões cerebrais envolvidas, deficiência de controle inibitório e retardo na maturação do cérebro, bem como disfunção dopaminérgica e noradrenérgica em várias regiões cerebrais (DOPPHEIDE; PLISZKA, 2009).

Nos últimos anos, também se atribui papel relevante a outros neurotransmissores bioquímicos, como a serotonina, glutamina, histamina e acetilcolina (WILENS, 2008; PERLOV et al., 2008; SZOBOT et al., 2008). Especificamente, as insuficiências nos circuitos do córtex pré-frontal e amígdala, a partir da neurotransmissão das catecolaminas, resultam nos sintomas de esquecimento, distraibilidade, impulsividade e desorganização (ARMSTEN; LI,

2005). Nos estudos utilizando imagens de ressonância magnética, demonstrou-se a diminuição de atividade neural na região frontal, córtex cingular anterior e nos gânglios da base de pacientes com TDAH (BUSH et al., 1999).

Em apoio às evidências neurológicas, estudos genéticos indicam que a maioria dos genes específicos implicados no TDAH codifica sistemas de sinais de catecolaminas e incluem o transportador de dopamina (DAT), transportador de noradrenalina (NET), receptores dopaminérgicos D4 e D5, dopamina b-hidroxilase e a proteína-25 (SNAP-25) que facilitam a liberação dos neurotransmissores implicados no TDAH (YANG et al., 2004; FARAONE et al., 2005).

Na região cerebral, a ação reguladora do comportamento humano é feita pelo lobo frontal, que exerce uma série de funções de caráter inibitório como impulsos e velocidade de ações e pensamentos. No entanto o cérebro é formado por uma rede de conexões resultando em interligações entre suas regiões cerebrais formando uma rede de informação. Essas informações são passadas através dos neurônios que no caso do TDAH seriam a dopamina e a noradrenalina.

Várias estruturas cerebrais estão envolvidas na organização do comportamento emocional, tais como hipocampo e corpo estriado. Essas estruturas possuem importante interação anatômica e estão envolvidas em modalidades funcionais interdependentes que coordenam o comportamento emocional e cognitivo, além disso foram as estruturas cerebrais onde foram avaliados os parâmetros neurotóxicos e oxidativos.

2.2.1. Hipocampo

O hipocampo possui importantes conexões com o tálamo, hipotálamo e córtex entorrinal. Estas conexões lhe permitem atuar como conferidor das informações sensoriais

provenientes do córtex entorrinal, e confrontá-las com as predições geradas no sistema límbico, que, por sua vez, integra informações de outras partes do cérebro, incluindo o córtex pré-frontal. O hipocampo funciona como modalidade controle, que gera inibição comportamental, acompanhada por aumento de atenção ao meio e do aumento da vigilância aos estímulos potencialmente perigosos (McNAUGHTON; GRAY, 2000; BRANDÃO, 2001). Esta função hipocampal é de grande importância em situações em que se estabelece o conflito entre evitar o estímulo potencialmente perigoso e aproximar-se dele (McNAUGHTON; GRAY, 2000).

O hipocampo, que faz parte do sistema límbico, atua na regulação do comportamento emocional, memória e aprendizagem. Do ponto de vista neuroquímica, as áreas encefálicas relacionadas ao comportamento emocional são importantes porque apresentam enorme diversidade de substâncias ativas, como as monoaminas. A riqueza dessas áreas em monoaminas, em especial a noradrenalina, serotonina e dopamina, é muito significativa tendo em vista que muitos medicamentos usados no tratamento de distúrbios do comportamento agem modificando o teor das monoaminas cerebrais (MACHADO, 2004).

Os mecanismos serotoninérgicos do hipocampo são importantes no processo de informação aversiva (GRAEFF, 1997; DEAKIN; GRAEFF; GUIMARÃES, 1992; GOLDSTEIN et al., 1996). O efeito amnésico causado por lesões hipocampais é bem documentado, levando a numerosas teorias de função hipocampal sobre memória, contudo, esses danos podem resultar em desinibição comportamental e redução da ansiedade. Um número crescente de estudos sugere que esses efeitos comportamentais diversificados devem ser associados a diferentes subregiões hipocampais. O hipocampo dorsal tem papel preferencial em certas formas de aprendizagem e Memória, notavelmente aprendizagem espacial, enquanto o hipocampo ventral exerce atividade em processos cerebrais associados à ansiedade (BANNERMAN et al., 2004).

2.2.2. *Corpo Estriado*

O corpo estriado é uma estrutura onde estímulos com valores afetivos e emocionais interagem com áreas motoras (MOGENSON; JONES; YIM, 1980; PENNARTZ; GROENEWEGWN; LOPEZ DA SILVA, 1994). O corpo estriado é considerado uma importante área de produção de respostas emocionais, contudo, mudanças no seu conteúdo monoaminérgico podem implicar em várias desordens cerebrais, incluindo a ansiedade (SESACK; PICKEL, 1992).

O corpo estriado funciona como uma interface entre os sistemas motivacional e motor, de modo a servir de canal por onde o estímulo com valor afetivo e emocional acessa as vias efectoras-motoras (MOGENSON; JONES; YIM, 1980; PENNARTZ; GROENEWEGWN; LOPEZ DA SILVA, 1994).

Sabe-se que a exposição a um estresse moderado ativa o sistema dopaminérgico no córtex pré-frontal enquanto não afeta o metabolismo dopaminérgico no estriado. Por outro lado, a exposição a um estresse mais intenso resulta em um recrutamento do sistema dopaminérgico mesolímbico que inerva o corpo estriado (ROTH et al., 1988; GOLDSTEIN et al., 1996).

O córtex pré-frontal e corpo estriado estão, portanto, conectados anatômica e funcionalmente. A regulação cognitiva que o córtex pré-frontal exerce sobre a reatividade emocional organizada no corpo estriado é uma evidência importante nesse sentido (GOLDSTEIN et al., 1996).

As conexões do corpo estriado são muito complexas. Sabe-se hoje que suas funções são exercidas através de um circuito básico que liga o córtex cerebral, o qual por sua vez, é modulado ou modificado por circuitos subsidiários ou satélites que a ele se ligam. O estriado (núcleo caudado e putâmen), assim como o cerebelo, tem a função do planejamento motor.

Alguns autores acreditam que o estriado também pode influenciar a área pré-frontal, ligadas a funções psíquicas (MACHADO, 2004).

2.3. Metilfenidato (MFD)

Tratamentos comportamentais e intervenções psicossociais são necessários ao adequado manejo de pacientes com TDAH (VAN DER OORD et al., 2008; FABIANO et al., 2009), porém o tratamento medicamentoso é fundamental. O metilfenidato (MFD) é o psicoestimulante mais utilizado no Brasil para o tratamento do TDAH (SZOBOT et al., 2008).

O metilfenidato é comercializado no Brasil com os nomes Ritalina®, Ritalina LA®, e Concerta®. Além da dose, o que diferencia o Concerta® da Ritalina® é a sua forma de liberação lenta no organismo, sendo administrado apenas uma vez ao dia e a Ritalina®, prescrita em duas ou três doses diárias. A Ritalina LA® também é uma formulação de liberação controlada. Tais formulações de ação prolongada são consideradas mais eficazes por diminuir o risco de abuso e facilitar o tratamento (LOUZÃ; MATTOS, 2007).

O MFD é um fármaco simpatomimético, com ação farmacológica relacionada à valorização extracelular dos níveis de dopamina no estriado (TEO et al., 2003; BIEDERMAN; FARAONE, 2005), através do bloqueio dos transportadores de dopamina, ampliando a duração da resposta de dopamina além da estimulação noradrenérgica no córtex (BIEDERMAN; FARAONE, 2005; VOLKOW et al., 2005; WILENS, 2008) e produz respostas motoras após a administração repetida do mesmo (BRANDON et al., 2001). A distribuição no cérebro humano é heterogênea, com as maiores concentrações no corpo estriado, córtex cerebral e no cerebelo (VOLKOW et al., 2005).

O MFD aumenta as concentrações extracelulares de dopamina nos circuitos de recompensa do cérebro de ratos, incluindo o núcleo accumbens e as regiões relacionadas da

mesma forma que outros estimulantes como a cocaína e anfetaminas conhecidas pelo uso como drogas de abuso (SWANSON; VOLKOW, 2002). Foi verificado que o uso ilícito de MFD aumentou entre os adolescentes nos últimos anos (ACHAT-MENDES et al., 2003).

A dose terapêutica situa-se entre 20 e 60mg/dia (GREENHILL et al., 2001; TEICHER et al., 2006). Como a meia-vida do metilfenidato é curta – cerca de quatro horas, geralmente se utiliza o esquema de duas ou três doses por dia, com ajustes da dose, conforme a resposta clínica (GREENHILL et al., 2002).

Tabela 1. Preparações de Metilfenidato comercializadas no Brasil para o tratamento do TDAH.

Medicamentos	Forma farmacêutica	Preparações (mg)	Duração aproximada (h)	Dose recomendada
Ritalina®	Comprimido	10	3-4	0,3-1 mg/kg 3 vezes/dia; até 60 mg/dia
Ritalina LA®	Cápsula	20, 30, 40	8	até 60 mg/dia
Concerta®	Comprimido	18, 36, 54	12	até 54 mg/dia

Fonte: OLIVEIRA, 2013.

O Metilfenidato é hoje o psicoestimulante mais consumido no mundo, mais que todos os outros estimulantes somados. Segundo o relatório da Organização das Nações Unidas sobre produção de psicotrópicos, (ITABORAHY; ORTEGA, 2013) sua produção mundial passou de 2,8 toneladas em 1990 para quase 38 toneladas em 2006. Isto se deve, não somente à sua vinculação ao TDAH, mas principalmente à intensa publicidade do medicamento voltada diretamente aos consumidores norte-americanos. No Brasil, o consumo também vem crescendo ao longo dos anos. Em 2000, o consumo nacional de metilfenidato foi de 23 kg. A produção brasileira passou de 40 kg em 2002 para 226 kg em 2006. Além disso, em 2006, o Brasil importou 91 kg do estimulante (INCB, 2008).

A resposta ao MFD é altamente eficaz, promovendo uma melhora significativa em aproximadamente 70 % dos pacientes com TDAH (ZITO et al., 2000; ACCARDO; BLONDIS, 2001), sendo que pode variar conforme a dosagem utilizada, a presença de comorbidades e as associações medicamentosas (TEICHER et al., 2008; VAN DER OORD et al., 2008; GARCIA et al., 2009).

Normalmente o MFD é prescrito por um período prolongado de tempo e como a taxa de diagnóstico de TDAH tem aumentado nos últimos anos, a utilização do medicamento aumentou (GRUND et al., 2006; ASKENASY et al., 2007).

O MFD apresenta baixa frequência de efeitos colaterais, que foram considerados leves em 3%, e moderados em 10% dos casos (TEICHER et al., 2006), sendo que os efeitos adversos mais observados são perda de apetite, cefaléia, dor abdominal, irritabilidade, dificuldade em iniciar o sono e, com menor frequência, taquiarritmia ou hipertensão (NISSEN, 2006; KENDALL et al., 2008).

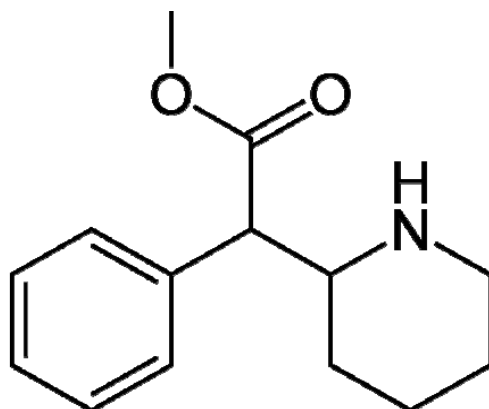


Figura 1. Estrutura do Metilfenidato (MFD)

Fonte: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Methylphenidate-2D-skeletal.svg>

Quanto aos eventos adversos envolvendo o MFD, bem como interações deste com outros fármacos, tem sido relatado em artigos científicos. Dentre os efeitos colaterais do MFD

que surgem em curto prazo, prevalecem a redução de apetite, insônia, cefaléia e dor abdominal, sendo dose-dependente e de média intensidade. Em relação à overdose, as principais manifestações clínicas envolvendo o MFD são: agitação, crise convulsiva, alucinações, psicose, letargia, tonteira, taquicardia, hipertensão e hipertermia (KLEIN-SCHWARTZ, 2002; TAN; APPETON, 2005; TORRES, 2008; HIGGINS, 2009). No entanto, a exposição precoce pode aumentar o risco para o abuso subsequente de anfetaminas (VALVASSORI et al., 2007). O abuso e a dependência ao medicamento são observados muito raramente (PASTURA; MATOS, 2004).

Em longo prazo, são descritas alterações discretas de pressão arterial e frequência cardíaca e uma possível discreta diminuição da estatura. Deve-se ficar alerta ao risco cardiovascular. A cefaléia deve ser investigada, sendo importante um exame físico completo da criança a fim de descartar outras patologias pediátricas que possam causar cefaléia: hipertensão intracraniana, glomerulonefrite aguda com aumentos de pressão arterial (PASTURA; MATOS, 2004). O tratamento crônico induz ao estresse oxidativo no cérebro de ratos jovens dependendo da idade de exposição ao medicamento, bem como a efeitos neuroquímicos que modificam alguns comportamentos na idade adulta (MARTINS et al., 2006; GRAY et al., 2007).

Hennesy et al., (2010) desenvolveu um estudo observacional para avaliar a segurança cardiovascular de medicamentos para o TDAH, como o Metilfenidato, já alertando para os possíveis riscos cardiovasculares do medicamento, especialmente a longo prazo, embora isso seja um fator limitante em seu estudo, tendo em vista que 33% das crianças contempladas nessa pesquisa, foram tratadas por mais de dois anos, não podendo assim inferir que tal reação possa surgir a longo prazo. O autor enfatiza que tais eventos são raros, especialmente em crianças, sendo necessárias amostras maiores para realizar o estudo.

Outros autores ainda relatam, num estudo de coorte, uma associação significativa entre a exposição ao estimulante e visitas ao departamento de emergência cardíaca e doenças do aparelho circulatório, não havendo diferença significativa entre MFD e anfetamina (WINTERSTEIN et al., 2009).

Quanto à teratogenicidade do medicamento, existem poucos dados que abordem o assunto em seres humanos. A segurança da exposição pré-natal ao MFD ainda não foi bem estabelecida. Além disso, sabe-se que há muita exposição accidental aos fármacos estimulantes entre as mulheres por conta do alto índice de gestações não planejadas (HUMPHREYS et al., 2007). O autor identificou em sua revisão que 63 casos de exposição ao MFD já foram relatados na literatura. Um estudo realizado com um grupo de 13 recém-nascidos em que as mães estiveram expostas ao fármaco durante a gravidez, identificou-se uma malformação cardíaca (BRIGGS; FREEMAN; YAFFE, 2005).

Outros estudos apontam que o MFD reduziu o estado de fosforilação da proteína DARPP-32 no cérebro de ratos. Tal proteína desempenha um papel central na biologia dos neurônios dopaminérgicos. Essa redução foi dependente da idade e da posologia (SOUZA et al., 2009). Relataram-se, ainda, alterações na DARPP-32 mRNA, em pacientes com esquizofrenia (ALBERT et al., 2002).

Importantes interações medicamentosas relacionando o MFD também foram relatadas na literatura, especialmente com antipsicóticos atípicos. Hollis e Thompson, (2007) relataram um estudo de caso de um menino de sete anos de idade, com transtorno de conduta e TDAH, que era tratado com risperidona. A retirada abrupta de tal medicamento e introdução do MFD levaram a criança a apresentar episódios de discinesia aguda e transitória. A associação de psicoestimulantes e fármacos antipsicóticos atípicos são comuns para o tratamento de TDAH, associados a outras comorbidades, porém os médicos devem estar cientes de que essa

associação poderá trazer episódios de discinesias, após descontinuidade abrupta de um dos medicamentos.

Sabuncuoglu (2007) relatou o caso de três crianças em que o uso da risperidona foi retirado abruptamente, sendo posteriormente administrado MFD. A primeira criança apresentou reações comportamentais, como agitação, irritação e violência, descrita pela própria mãe como “*ele está ficando louco*”. A segunda criança estudada apresentou reações semelhantes, mostrando na avaliação psiquiátrica um estado quase maníaco, com sintomas que incluem humor irritável, agitação, pensamentos rápidos e distração. A terceira criança apresentou sintomas de irritabilidade, agitação e desconforto. Em todos os casos, as reações adversas cessaram após a retirada do MFD.

Coskun, Tutkunkardas e Zoroglu (2009) relataram estudo de caso de uma criança de 8 anos que apresentou erupções cutâneas maculopapular pruriginosa após tratamento com MFD. O paciente já fazia uso de valproato e, após retirada deste, de gabapentina. O autor ainda questiona que a bula do MFD alerta para possíveis reações cutâneas após tratamento com o referido fármaco, mas não menciona os outros componentes da formulação do medicamento, que possivelmente possam estar envolvidos em tal reação. Outros autores discutem que o MFD raramente tem sido relatado como causador de erupções na pele em indivíduos com TDAH (CONFINO; GOLDBERG, 2005).

Alguns autores recentemente descobriram que a utilização concomitante de MFD e álcool aumenta os sentimentos de prazer em relação à utilização do MFD sozinho (PATRICK et al., 2007).

Além disso, relatos de abuso do MFD parecem ser, em parte, impulsionada pela crença “generalizada” de que os medicamentos estimulantes, juntamente com o álcool, facilitam as festas de fim de noite (GODFREY, 2009).

Griffin et al., (2010) examinaram os efeitos do MFD e do álcool em relação à atividade locomotora num modelo de camundongo, estabelecendo que essa atividade pode estar aumentada após administração das duas drogas concomitantes, além de outras alterações farmacodinâmicas e farmacocinéticas. Essas descobertas levantam preocupações acerca do abuso de tais drogas e merecem atenção por parte dos profissionais de saúde, tendo em vista que cerca de um terço dos medicamentos prescritos para o TDAH são para indivíduos com pelo menos 20 anos de idade (OKIE, 2006).

Alguns estudos têm demonstrado que a exposição intra-uterina à nicotina é um fator de risco significativo para o desenvolvimento de TDAH em crianças cujas mães foram fumantes (SCHMITZ et al., 2006).

Lee et al., (2009) desenvolveu um estudo prospectivo com crianças coreanas para avaliar variabilidade da resposta ao tratamento com o MFD, sugerindo que pacientes com grande variabilidade de resposta podem ter mais disfunção neuronal severa, o que pode predizer má resposta do medicamento para o tratamento em crianças com TDAH.

Assim, estudos de vigilância pós-comercialização são necessários para investigar incertezas remanescentes quanto à eficácia e/ou ao perfil de segurança do medicamento. Investigações dessa natureza podem ser feitas para analisar um evento adverso ou um sinal que tenha sido detectado inesperadamente após a comercialização. O desenvolvimento desses estudos vem sendo proibido em muitos países pelo muito que influenciam a prescrição médica, distorcendo o seu objetivo precípua de beneficiar os pacientes (COBERT, 2007; MANN, 2007).

2.4. A Inclusão do Metilfenidato na Assistência Farmacêutica do Ceará

A Assistência Farmacêutica tem caráter sistêmico, multidisciplinar e envolve o acesso a todos os medicamentos considerados essenciais. O Conselho Nacional de Saúde (CNS) aprovou em 2004, através da Resolução n. 338, a Política Nacional de Assistência Farmacêutica (PNAF), que define a Assistência Farmacêutica como um conjunto de ações voltadas à promoção, proteção e recuperação da saúde, tanto individual como coletiva, tendo o medicamento como insumo essencial e visando o acesso e seu uso racional. Este conjunto envolve a pesquisa, o desenvolvimento e a produção de medicamentos e insumos, bem como a sua seleção, programação, aquisição, distribuição, dispensação, garantia da qualidade dos produtos e serviços, acompanhamento e avaliação de sua utilização, na perspectiva da obtenção de resultados concretos e da melhoria da qualidade de vida da população (BRASIL, 2004).

A Portaria do Ministério da saúde - GM/MS n. 204/2007 de 29 de janeiro de 2007 prevê financiamento para a estruturação dos serviços e a organização de ações da Assistência Farmacêutica (BRASIL, 2007).

O financiamento da Assistência Farmacêutica é de responsabilidade das três esferas de gestão do SUS e pactuado na Comissão Intergestores Tripartite (CIT). Conforme estabelecido na Portaria GM/MS n. 204/2007, os recursos federais são repassados na forma de blocos de financiamento, entre os quais o Bloco de Financiamento da Assistência Farmacêutica, que é constituído por três componentes (BRASIL, 2007):

- Componente Básico da Assistência Farmacêutica: destina-se à aquisição de medicamentos e insumos de Assistência Farmacêutica no âmbito da atenção básica em saúde e àquelas relacionadas a agravos e programas de saúde específicos, inseridos na rede de cuidados da atenção básica.

- Componente Estratégico da Assistência Farmacêutica: financiamento para o custeio de ações de assistência farmacêutica nos seguintes programas de saúde estratégicos: controle de endemias, tais como a tuberculose, hanseníase, malária, leishmaniose, doença de Chagas e outras doenças endêmicas de abrangência nacional ou regional; anti-retrovirais dos Programas de Doenças Sexualmente Transmissíveis - DST/Aids, Sangue e Hemoderivados e Imunobiológicos.

- Componente de Medicamentos de Dispensação Excepcional: financiamento do Programa de Medicamentos de Dispensação Excepcional, para a aquisição e distribuição do grupo de medicamentos da tabela de procedimentos ambulatoriais.

No estado do Ceará, a Coordenadoria de Assistência Farmacêutica (COASF) é o órgão responsável por assegurar a execução da Política de Assistência Farmacêutica e garantir as ações de controle e acompanhamento de insumos da saúde, visando à melhoria da qualidade dos serviços prestados. A COASF/CE é constituída por três núcleos: o Núcleo de Medicamentos de Caráter Excepcional (NUMEX), o Núcleo de Fitoterápicos (NUFITO) e o Núcleo de Medicamentos Essenciais e Estratégicos (NUMES) (CEARÁ, 2008).

Em 2007, o Estado do Ceará lançou uma proposta para a criação de um Componente de Financiamento de Medicamentos para a Assistência Farmacêutica na Atenção Secundária à Saúde, com financiamento Municipal e Estadual. Após quase três anos, a proposta foi aprovada, entrando em vigor em 2010.

Durante esse processo, foi realizada uma seleção criteriosa dos medicamentos a serem contemplados, com a publicação da Portaria Estadual nº 6185/2009 e a Resolução nº145/2009 da Comissão Intergestora Biparte do Ceará - CIB/CE. Dentre o elenco de medicamentos escolhidos e padronizados para este financiamento, encontra-se o Cloridrato de Metilfenidato, que foi alvo do presente estudo. Hoje, o elenco de medicamentos contém 51

itens de medicamentos, estabelecidos através da Resolução nº16/2015 da Comissão Intergestora Biparte do Ceará - CIB/CE. (**Tabela 2.**).

Assim, a inclusão do metilfenidato no elenco de referência de medicamentos para a Assistência Farmacêutica na Atenção Secundária em Saúde foi resultado desse processo de seleção realizado na Secretaria de Saúde do Estado, em parceria com profissionais farmacêuticos dos municípios e médicos especialistas, que considerou, além dos critérios de segurança e eficácia, os frequentes expedientes administrativos e judiciais encaminhados às Secretarias de Saúde Estadual e Municipais, a existência de agravos que não possuem cobertura e que não se enquadram na definição dos componentes de financiamento da Assistência Farmacêutica e a necessidade de garantir o acesso aos medicamentos pela população, de forma regular e contínua.

Tabela 2. Elenco de Referência de Medicamentos para a Assistência Farmacêutica na Atenção Secundária em Saúde, 2015.

ORDEM	MEDICAMENTOS
1	Acarbose 50mg
2	Ácido Ursodesoxicólico 300mg comprimidos
3	Alprazolam 0,5mg
4	Alprazolam 1mg
5	Alprazolam 2mg
6	Baclofeno 10mg
7	Bimatoprost 0,3 mg/ml colírio
8	Brizolamida ou Dorzolamida ou Brimonidina colírio
9	Brimonidina 1,5mg/ml

- 10 Cilostazol 100mg comprimidos
- 11 Ciprofibrato 100mg
- 12 Clonazepam 0,5mg
- 13 Clonazepam 2mg
- 14 Citalopram 20mg
- 15 Clopidogrel 75mg comprimidos
- 16 Dalteparina Sódica 25.000UI/ml
- 17 Dorzolamida 20mg/ml sol.oftálmica
- 18 Domperidona 1mg/ml sol.oral
- 19 Gabapentina 300mg
- 20 Glicosamoina+Condroitina 1,5+1,2mg
- 21 Glimepirida 2mg
- 22 Indapamida 2,5mg
- 23 Insulina Aspart 100UI/ml frasco c/3ml
- 24 Insulina Aspart 100UI/ml frasco c/10ml
- 25 Insulina Detemir 100UI/ml frasco c/10ml
- 26 Insulina Glargina 100UI/ml frasco c/3ml
- 27 Insulina Glargina 100UI/ml frasco c/10ml
- 28 Insulina Glulisina 100UI/ml frasco c/3ml
- 29 Insulina Glulisina 100UI/ml frasco c/10ml
- 30 Insulina Lispro 100UI/ml frasco c/3ml
- 31 Insulina Lispro 100UI/ml frasco c/10ml
- 32 Latanoprost 0,05% colírio

33	Levomepromazina 25mg
34	Levomepromazina 100mg
35	Metilfenidato 20mg
36	Oxcarbamazepina 300mg comprimidos
37	Oxcarbamazepina 6% sol.oral
38	Oxibutinina 1mg/ml
39	Oxibutinina 5mg
40	Protetor Solar FPS 30
41	Protetor Solar FPS 60
42	Paracetamol + Codeína 500+30mg
43	Paroxetina 20mg
44	Periciazina 4% sol.oral
45	Risperidona 1mg
46	Risperidona 3mg
47	Risperidona 1mg/ml sol.oral
48	Sitagliptina 100mg – Vildagliptina 50mg – Iganagliptina 5mg – Saxagliptina 5mg
49	Travoprost 0,04% colírio
50	Venlafaxina 75mg
51	Venlafaxina 150mg

Fonte: OLIVEIRA, 2013.

Atualmente, o elenco de medicamentos da Assistência Farmacêutica na Atenção Secundária em Saúde destina-se ao atendimento dos agravos mais prevalentes e de maior demanda no Sistema Único de Saúde (SUS) e àqueles relacionados a agravos e programas de

saúde específicos, inclusive, os medicamentos mais requisitados em expedientes administrativos e judiciais destinados à Secretaria de Saúde (SESA) e às Secretarias Municipais de Saúde (SMS).

Oliveira (2013) analisou a demanda judicial de solicitação do metilfenidato no Estado do Ceará de 2007 a 2012 e verificou que a adesão dos municípios do Estado ao financiamento da Assistência Farmacêutica na Atenção Secundária em Saúde foi crescendo ao longo dos anos e que atualmente, a grande maioria dos municípios cearenses faz parte da Política, o que significa que esses municípios provavelmente têm demanda para os medicamentos padronizados.

Oliveira (2013) ainda discute que, apesar de apresentar um discreto aumento no decorrer dos anos, pode-se supor que mesmo após a incorporação do metilfenidato por meio de uma política estadual, muitas pessoas ainda continuam a não ter acesso ao medicamento, seja por desconhecimento da distribuição do mesmo pela rede pública, seja pela “falta” desse item no município de residência do paciente ou ainda por dificuldades em adequar a dose entre os medicamentos prescritos e o disponível.

A popularização do uso do metilfenidato e a sua eficácia no tratamento do TDAH parecem contribuir para a crescente demanda anual do medicamento na COASF, bem como o fato do metilfenidato ser distribuído de forma gratuita pelo Governo. Assim, faz-se necessário investigar a segurança acerca do medicamento, já que a literatura aponta relatos de aumento nas prescrições de Metilfenidato e de forma contínua.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Avaliar a segurança do Metilfenidato (Ritalina®), administrado agudamente, em modelos animais adultos, contemplando aspectos neurocomportamentais, neuroquímicos e de função renal.

3.2. Específicos

1. Avaliar os efeitos do Metilfenidato utilizando modelos neurocomportamentais de avaliação de ansiedade, depressão, atividade locomotora e convulsão, após tratamento agudo em animais adultos;
2. Identificar os efeitos do Metilfenidato sobre os níveis de monoaminas no hipocampo e corpo estriado em animais adultos;
3. Investigar a atividade da acetilcolinesterase em hipocampo e corpo estriado de animais;
4. Avaliar o efeito do Metilfenidato em rim isolado e células tubulares renais;
5. Avaliar a função renal *in vivo* após tratamento com Metilfenidato.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. ESTUDOS NEUROCOMPORTAMENTAIS

4.1.1. Animais Utilizados

Foram utilizados camundongos albinos (*Mus musculus*), variedade *Swiss*, machos, pesando entre 25-30g (animais adultos). Os animais foram provenientes do Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia e do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará, mantidos em caixas de propileno $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$, com ciclos claro/escuro de 12 em 12 horas, recebendo ração padrão (Purina Chow) e água “ad libitum”. Os animais foram colocados em jejum de sólidos de 6 horas, antes da realização de cada experimento onde a via oral foi utilizada para a absorção das substâncias. Os protocolos experimentais utilizados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da Universidade Federal do Ceará (UFC) (Protocolo nº 09/12).

4.1.2. Tratamento dos grupos experimentais

Os animais foram tratados com Metilfenidato, de forma aguda, nas doses de 2,5mg, 5mg, 10mg e 20 mg/Kg através da via oral (v.o.). Eles foram submetidos aos testes neuroquímicos 60 minutos após o tratamento oral. Para a avaliação da atividade antidepressiva, foi utilizada Imipramina 10mg/kg, via intraperitoneal (i.p.) no teste do nado forçado, como padrão positivo. Para avaliação da ansiedade, foi utilizado Diazepam (controle positivo) 1mg/kg (i.p.), DZP-1, no teste do labirinto em cruz elevado e Dizepam 2mg/kg (i.p.), DZP-2, no teste do campo aberto. Diazepam 2mg/kg (i.p.), DZP 2, foi utilizado,

também, no modelo rota *rod*, como padrão para atividade relaxante muscular. No teste de convulsão foi utilizada pilocarpina 400 mg/kg (i.p.). Os grupos controle receberam veículo (água destilada). As demais drogas utilizadas ao longo dos experimentos foram dissolvidas e diluídas diretamente em água destilada. O volume total de solução administrada, por via oral, foi de 10 mL/Kg. As prescrições do Metilfenidato foram fornecidas pelo psiquiatra cadastrado no Centro de Atenção Psicossocial (CAPS) do município de Jardim-CE.

4.1.3. Protocolo Experimental

Antes dos experimentos, os animais foram colocados em ambiente fechado, desprovido de barulho externo, com a temperatura constante ($24 \pm 1^\circ \text{C}$) e iluminação de baixa intensidade (lâmpada vermelha de 15 W), de modo a se adaptarem com o ambiente do experimento para a realização dos estudos comportamentais. Os testes do campo aberto e rota *rod* foram realizados com os mesmos grupos de animais da maneira descrita a seguir: primeiramente os animais, um por vez, foram colocados no campo aberto onde foram avaliados durante 5 minutos e, em seguida, foram transferidos para o rota *rod* onde a atividade foi observada por 1 minuto. Os outros testes comportamentais, como labirinto em cruz elevado, nado forçado e convulsão induzida por pilocarpina foram realizadas com grupos diferentes de animais. Em todos os testes, com exceção, apenas, do nado forçado, após cada observação animal, foi utilizado álcool 70% para remoção de resíduos e odor do animal.

4.1.4. Atividade Ansiolítica

4.1.4.1. Teste do Labirinto em Cruz Elevado (*Plus maze*)

Os camundongos foram divididos em 6 grupos (n=08) de animais, onde foram tratados com veículo (água destilada), cloridrato de metilfenidato (2,5, 5, 10 e 20 mg/Kg, v.o) e diazepam (1mg/Kg, i.p.). Este modelo (LISTER, 1987) consiste de dois braços abertos opostos (30 x 5 cm) e dois fechados (30 x 5 x 25cm), também opostos, em forma de cruz, conectados por uma plataforma central (5 x 5cm). A plataforma e as paredes laterais dos braços fechados são confeccionadas em acrílico transparente e o chão em acrílico preto. O aparelho está elevado a uma altura de 45 cm do nível do chão. Após 60 minutos do tratamento v.o., os animais foram colocados no centro do aparelho com a cabeça voltada para um dos braços fechados e o seu comportamento foi observado por 5 minutos. As medidas comportamentais observadas foram: número de entradas e o tempo despendido nos braços abertos e fechados, respectivamente. A frequência total de entradas é obtida pela soma simples das frequências de entradas nos braços abertos e fechados. Para análise estatística dos dados e confecção dos gráficos, a percentagem de entradas nos braços abertos será calculada dividindo-se a frequência de entradas nos braços abertos pela frequência total de entradas, e esse índice multiplicado por 100. De maneira semelhante foi calculada a percentagem de tempo em que os animais permaneceram nos braços abertos. Dessa forma, os parâmetros utilizados para a análise estatística foram: número de entradas no braço aberto (NEBA), tempo de permanência no braço aberto (TPBA), número de entrada nos braços fechados (NEBF) e tempo de permanência nos braços fechados (TPBF). Para a análise estatística todos os grupos foram comparados ao grupo controle. Neste modelo, os roedores evitam os braços abertos do labirinto, restringindo a maioria de suas atividades aos braços fechados. Um

aumento seletivo nos parâmetros correspondentes aos braços abertos (entradas e tempo) revela um efeito ansiolítico (PELLOW *et al.*, 1985; PELLOW; FILE, 1986), e o inverso é verdade para compostos ansiogênicos. O número de entradas nos braços fechados avalia a atividade motora dos animais (RODGERS *et al.*, 1997).

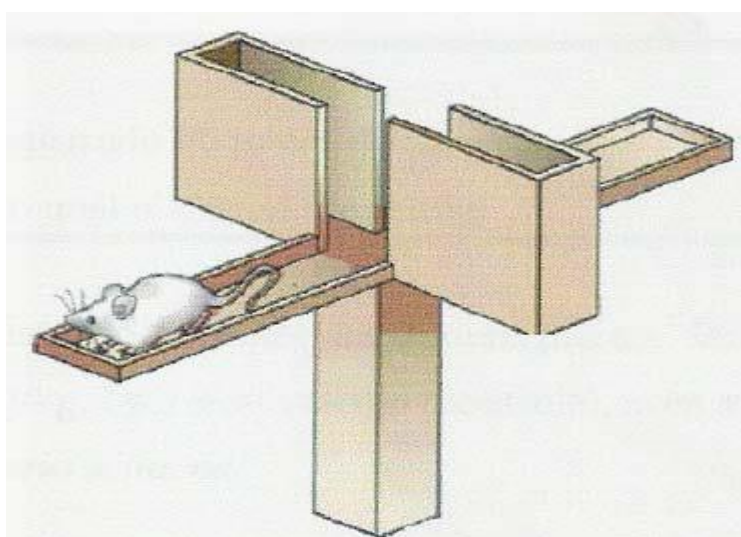


Figura 2. Ilustração do instrumento utilizado no teste Labirinto em Cruz Elevado

Fonte: VENÂNCIO, 2009.

4.1.5. Atividade Motora

4.1.5.1. Teste do Campo Aberto

O efeito do metilfenidato sobre a atividade motora espontânea dos animais foi avaliado na tentativa de verificar uma atividade sedativo-depressora no Sistema Nervoso Central. Os camundongos foram divididos em 6 grupos (n=08) de animais, sendo tratados com veículo

(água destilada), cloridrato de metilfenidato (2,5, 5, 10 e 20 mg/Kg) e diazepam (2 mg/Kg, i.p.).

A atividade motora dos animais foi verificada por meio de um campo aberto feito de acrílico (paredes transparentes e piso preto, 30 x 30 x 15 cm) e dividido em 9 quadrantes iguais, baseado no modelo descrito por Archer (1973). Após 60 minutos dos tratamentos v.o., os animais, um por vez, foram colocados no centro do campo aberto onde o número de cruzamentos com as quatro patas (atividade locomotora espontânea; ALE), número de comportamento de autolimpeza (grooming) e o número de levantamentos (rearing), sem encostar-se à parede, foram observados durante o tempo de 5 minutos.

A tendência natural do animal em um ambiente novo é a de explorá-lo, apesar do conflito com o medo provocado pela situação nova (MONTGOMERY, 1955). Assim, esse teste permite uma avaliação da atividade estimulante ou depressora de um dado composto, podendo ainda indicar atividades mais específicas como a ansiolítica.

**A****B****C**

Figura 3. Teste do Campo Aberto. A. Caixa em acrílico, com o piso dividido em nove partes. B. Grooming C. Rearing.

Fonte: LINHARES, 2012.

4.1.5.2. Teste do Rota Rod

O teste do *rota rod* mede o efeito do relaxamento muscular ou incoordenação motora produzidos por drogas nos animais (CARLINI; BURGOS, 1979). Para este teste, os camundongos, divididos em 3 grupos (n=8) foram colocados com as quatro patas sobre uma barra de 2,5cm de diâmetro, elevada a 25 cm do piso, em uma rotação de 12 rpm, por um período de 1 minuto. Foram registrados o tempo de permanência na barra giratória, em segundos (s), e o número de quedas, com três reconduções, no máximo (DUNHAM; MIYA, 1957).

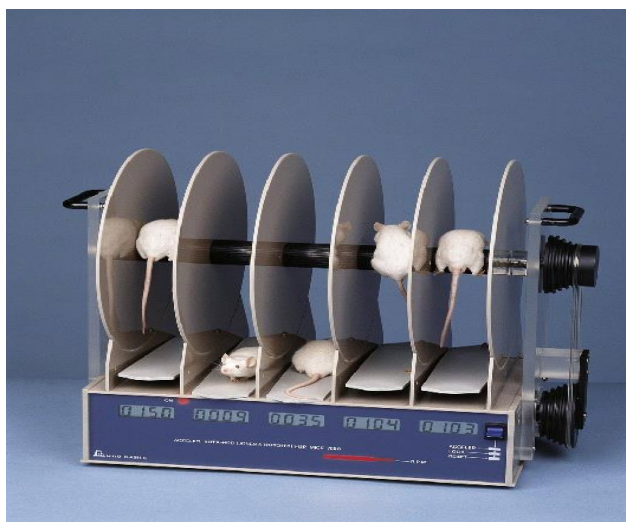


Figura 4. Ilustração do instrumento utilizado no teste do Rota Rod

Fonte: VENÂNCIO, 2009.

4.1.6. Atividade Antidepressiva

4.1.6.1. Teste do Nado Forçado

Para este experimento (PORSOLT, et al., 1977) foram utilizados tanques de 22 cm de diâmetro e 40 cm de altura contendo água fresca a $23 \pm 1^\circ \text{C}$ até a metade do tanque. Os camundongos foram divididos em 5 grupos de animais, sendo tratados com veículo (água destilada), Metilfenidato (2 e 5 mg/Kg), Imipramina (10 mg/Kg i.p.). Após 60 minutos dos tratamentos v.o., os animais foram colocados, um por vez, no tanque onde o tempo de imobilidade, em segundos, será registrado durante cinco minutos.

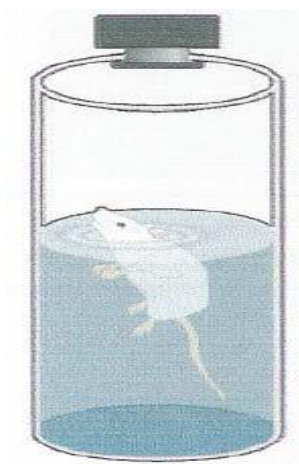


Figura 5. Teste do Nado Forçado.

Fonte: VENÂNCIO, 2009.

4.1.7. Atividade Anticonvulsivante

4.1.7.1. Teste da Convulsão induzida por Pilocarpina

Este experimento foi realizado seguindo a metodologia descrita por Turski et al., (1983), cuja finalidade foi analisar a atividade pro ou anticonvulsivante do metilfenidato e induzir dano neuronal no cérebro dos animais, para posterior avaliação dos efeitos neuroprotetores ou não do fármaco em estudo. Os animais foram tratados com veículo (água destilada), com Metilfenidato (2 e 5 mg/Kg), v.o., e com Diazepam (1 mg/kg) (i.p.) que foi usado como padrão positivo. Trinta minutos após o último tratamento com MFD, de acordo com os períodos de tratamento em estudo, foi feita a administração em todos os animais com pilocarpina 400 mg/kg, subcutâneo (s.c.). Em seguida, os animais tratados e controles, serão divididos em gaiolas contendo 5 a 10 animais e colocados em ambiente reservado, sendo feita a observação direta. Todos os grupos experimentais foram observados durante 1 hora após a última injeção pilocarpina, de acordo com o tratamento previsto. Os seguintes parâmetros foram observados: presença de sinais colinérgicos periféricos, convulsões motoras, instalação de estado epiléptico, número de mortes, latência de convulsão e latência de morte em cada grupo. A **Tabela 3.** apresenta estes parâmetros juntamente com suas características.

Tabela 3. Parâmetros comportamentais observados

PARÂMETROS	CARACTERÍSTICAS
Sinais Colinérgicos Periféricos (SCP)	Tremores, miose, cromodacriorréia, piloereção, diarreia, salivação
Convulsão	Tônico / clônica
Estado Epiléptico	Convulsões intermitentes
Nº de Mortes	Determinado durante o período de 1 hora depois da última administração realizada
Latência de Convulsão	Intervalo de tempo em minutos entre a última injeção e o aparecimento da primeira convulsão
Latência de Morte	Intervalo de tempo em minutos entre a última injeção e a morte do animal

Fonte: Adaptado de Turski et al., 1983.

4.1.7.2. Dissecção das Áreas Cerebrais (Hipocampo e Corpo Estriado)

Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, os encéfalos retirados e rapidamente colocados sobre papel alumínio em uma placa de Petri com gelo.

Acompanhando a fissura sagital mediana, a camada cortical cerebral foi retirada das leptomeninges com o auxílio de uma pinça reta de microdissecação, a qual, progredindo delicadamente e tangencialmente aos ventrículos laterais, divulsionou o córtex em toda a sua extensão fronto-occipital. O córtex já divulsionado foi rebatido para os lados, expondo parte do hipocampo que, com divulsionamento, foi deslocado e retirado. O hipocampo foi utilizado para a Determinação da Atividade da Acetilcolinesterase.

O corpo estriado foi isolado das estruturas circunjacentes por divulsionamento com uma tesoura de microdissecação, sendo a sua retirada orientada pelo diâmetro da porção

tuberosa visível desses núcleos, após o rebatimento lateral do córtex. O corpo estriado foi utilizado para a Determinação da Atividade da Acetilcolinesterase e para a Determinação das Concentrações de Monoaminas.

Terminada a dissecação, cada área cerebral (hipocampo e corpo estriado) foi acondicionada em papel alumínio devidamente identificado, pesado e conservado a -70 °C para uso posterior. Quando necessária a estocagem por um determinado período de tempo (no máximo 1 mês a -70 °C) os tecidos foram considerados como tendo a mesma viabilidade para experimentação que os ensaiados imediatamente ou 24 h após a dissecação (BURKE GREENBAUN, 1987).

4.1.7.3. Determinação das concentrações de Monoaminas com HPLC

Para a determinação das concentrações de monoaminas foi utilizado o equipamento de HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Performance). Na cromatografia líquida clássica, um adsorvente (alumina ou sílica) é empacotado em uma coluna e é eluído por um líquido ideal (fase móvel). Uma mistura para ser separada é introduzida na coluna e é carregada através da mesma por um líquido eluente (fase móvel). Se um composto da mistura (soluto) é adsorvido fracamente pela superfície da fase sólida estacionária, ele atravessará a coluna mais rapidamente que um outro soluto que seja mais fortemente adsorvido. Então, a separação dos solutos é possível se existem diferenças na adsorção pelo sólido. Os detectores eletroquímicos medem a condutância do eluente ou a corrente associada com a oxidação ou redução dos solutos. Para ser capaz de detectar no primeiro caso, os solutos devem ser iônicos e no segundo caso, os solutos devem ter a característica de serem relativamente fáceis de oxidarem ou reduzirem.

Detectores eletroquímicos que medem corrente associada com a redução ou oxidação de solutos são chamados detectores amperométricos ou coulométricos. Neste estudo foi utilizado o tipo amperométrico que reage com uma quantidade muito menor de soluto, em torno de 1 %. Todas as técnicas eletroquímicas envolvem a aplicação de um potencial para um eletrodo (geralmente de carbono vítreo), oxidação da substância que está sendo estudada próximo à superfície do eletrodo seguindo a amplificação e medida da corrente produzida. As monoaminas são oxidadas nos grupos de anel hidroxil para produzir um derivado ortoquinona com a liberação de dois elétrons.

4.1.7.3.1. Procedimento Experimental

Os animais foram decapitados 60 minutos após a administração do metilfenidato (2,5; 5; 10 e 20 mg/kg) e água destilada (controle) e tiveram seus cérebros dissecados sobre gelo. O corpo estriado foi utilizado para preparar o homogenato a 10% (10 mg de área/100 µL de tampão). Os tecidos cerebrais foram homogeneizados em ácido perclórico (HClO₄) e centrifugados por 15 minutos em centrífuga refrigerada (4°C) a 15.000 rpm. Uma alíquota de 20 µL do sobrenadante foi, então, injetada no equipamento de HPLC, para a análise química.

Para a análise das monoaminas, uma coluna BDS HYPERSIL C18 com comprimento de 250 mm, calibre 4,6 mm e de partícula de 5 µm, da T'hermo Scientific, foi utilizada. A fase móvel utilizada era composta por tampão ácido cítrico 0,163 M, pH 3,0, contendo ácido octanosulfônico sódico (SOS) 0,69 M, como reagente formador do par iônico, acetonitrila 4 % v/v e tetrahidrofurano 1,7 % v/v. NA, DA, DOPAC, HVA, 5-HT e 5-HIAA foram eletronicamente detectados usando um detector amperométrico (Modelo L-ECD-6A da Shimadzu, Japão) pela oxidação em um eletrodo de carbono vítreo fixado em 0,85V relativo a um eletrodo de referência de Ag-AgCl. (HALLMAN, JOSSON, 1984).

4.1.7.3.2. Soluções Reagentes

Fase Móvel

Para preparar um volume de 500 mL de fase móvel foram pesados 15,75 g de ácido cítrico (Grupo Química, RJ., Brasil) e 0,292 g de Cloreto de Sódio (Grupo Química, RJ., Brasil) completado para um volume de 400 mL com água puríssima (Milli-Q). Esta solução foi ajustada para pH 3,0 com hidróxido de sódio 12,5 M (Reagen, RJ, Brasil). A esta solução foi adicionado o SOS 75 mg (Sigma, MO, USA) e completado o volume para 470 mL com água Milli-Q. Em seguida, foi procedida a filtração e degaseificação, e posteriormente adição de 20 mL de acetonitrila (Carlo Erba Reagenti, MI, Itália) e 10 mL de tetrahidrofurano (Sigma, MO, USA) para um volume final de 500 mL.

Ácido Perclórico 0,1 M

Adicionou-se 1,8 mL de ácido perclórico (Sigma, MO, USA) em um balão volumétrico e o volume ajustado para 300 mL.

Padrões

Os padrões foram preparados em uma concentração final de 4 ng/20 µL de solução de NA, DA, 5-HT, DOPAC, HVA e 5-HIAA (Sigma, MO, EUA). A partir da área dos picos desses padrões, as concentrações das amostras foram calculadas utilizando o programa Microsoft Excel® e os resultados expressos em mol/g de tecido.

4.1.7.4. Determinação da Atividade da Acetilcolinesterase (AChE).

4.1.7.4.1 Método

A atividade da acetilcolinesterase cerebral (AChE) foi determinada segundo Ellman *et al* (1961), tendo como princípio a medida da velocidade de produção de tiocolina, à proporção que a acetiltiocolina (ATC), utilizada como substrato, é hidrolisada. O acompanhamento é realizado pela reação contínua do tiol com o íon 5:5-ditiobis-2-nitrobenzoato (I) para produzir o ânion amarelo do ácido 5-tio-2-nitro-benzóico (II), cuja coloração é medida em 412 nm, através de um espectrofotômetro Beckman DU, o que permitiu leituras automáticas em sistema digital e forneceu maior sensibilidade.

A atividade enzimática é medida através da leitura da variação da absorbância por minuto, durante 3 minutos, sendo a reação linear durante pelo menos 10 minutos. A atividade específica foi expressa em nanomoles de ATC hidrolisados por miligrama de proteína por minuto (nmoles/mg de proteína/min).

4.1.7.4.2. Soluções Reagentes

- ✓ Tampão fosfato de sódio - $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$ (Reagen, Rio de Janeiro, Brasil) 0,1 M em água bidestilada, pH 7,0.
- ✓ Solução de iodeto de acetiltiocolina $\square$ ATC (Sigma, St. Louis, MO, EUA) 75 mM em água bidestilada.
- ✓ Solução de ácido 5:5-ditiobis-2-nitrobenzoato - DTNB (Sigma, St. Louis, MO, EUA) 10 mM em tampão fosfato de sódio.

4.2. ESTUDOS DE AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO RENAL

4.2.1. Animais Utilizados

Ratos Wistar adultos, de ambos os sexos, pesando entre 250 a 300g, provenientes do Biotério de Pesquisa Clínica da Universidade Federal do Ceará. Todos os animais foram mantidos em jejum nas 24 horas que antecederiam os experimentos, com água *ad libitum*.

4.2.2. Avaliação da Função Renal “ex vivo”

4.2.2.1. Perfusão em Rim Isolado

O sistema de perfusão renal foi desenvolvido por Bowman e Maack (1974) e Ross (1978) e modificado por Fonteles (1980) através da adaptação do pulmão artificial do tipo silático, baseado no modelo de Hamilton e cols. (1974).

O sistema usado consiste na perfusão de rim isolado com recirculação (Fonteles et al., 1983), e dois subsistemas, um *in situ* e outro circuito fechado para perfusão *in vitro*, mantidos ambos à temperatura de 37°C. Este sistema apresenta como vantagem a manutenção constante de parâmetros funcionais renais; a utilização de albumina e outras substâncias na solução perfusora em pequena quantidade; a manutenção constante de substâncias dialisáveis no perfusato e a oxigenação adaptada ao sistema (MONTEIRO, 1990).



Figura 6. Sistema de perfusão de rim isolado.

Fonte: LAFAVET – UFC

4.2.2.2. Calibração do Sistema

Antes de cada experimento, o sistema foi lavado e calibrado. A calibração objetiva conhecer o fluxo de perfusão renal em relação à resistência da cânula. Na calibração foram usadas quatro curvas, tendo pressão (mmHg) e fluxo (mL/min) como variáveis. A bomba que compõe o sistema de perfusão possui cinco velocidades, em cada velocidade foi medido o fluxo na ponta da cânula e a pressão foi registrada em manômetro de mercúrio. Duas curvas foram feitas com a velocidade da bomba no eixo da abcissa (X), fluxo e pressão no eixo da ordenada (Y) e as outras duas curvas com fluxômetro no eixo da abcissa (X), fluxo e pressão no eixo da ordenada (Y).

Tabela 4 - Substâncias usadas na perfusão renal

Substâncias	Marca
Cloreto de Sódio (NaCl)	Synth
Fosfato de Sódio (NaH ₂ PO ₄)	Synth
Cloreto de Potássio (KCl)	Merck
Carbonato de Sódio (NaHCO ₃)	Synth
Sulfato de Magnésio (MgSO ₄)	Reagen
Cloreto de Cálcio (CaCl ₂)	Reagen
Albumina bovina fração V	Sigma
Glicose	Squibb
Insulina	Sigma
Heparina	CEME
Penicilina G Potássica Cristalina	Squibb
Pentobarbital Sódico	Sigma
Uréia	Reagen
Manitol	Reagen

Fonte: MARTINS, 2001

4.2.2.3. Solução Perfusora

A solução perfusora usada foi de Krebs-Henseleit modificada, concentrada 20 vezes com NaCl (138,0g), KCl (7,0g), NaH₂PO₄.H₂O (3,2g), MgSO₄.7H₂O (5,8g) e uréia (10,0g). Foram retirados 100ml da solução descrita 48 horas antes do experimento e acrescentados NaHCO₃ (4,2g), CaCl₂.2H₂O (0,74g), glicose (2,0g), penicilina (50mg) e o volume completado para 2000mL com água bidestilada. Após esse experimento foram retirados 300ml desta última solução e adicionada albumina bovina 6,0g%, em seguida a solução foi dialisada com o objetivo de eliminar várias substâncias contaminantes como citrato, piruvato e lactato (HANSON e BALLARD, 1968; COHEN e cols., 1977; ROSS, 1978). O restante da solução (1700mL) serviu como solução de diálise, a qual foi trocada com 24 horas. Ao final

da diálise (48 horas) foi acrescentada inulina (0,15g). O pH da solução perfusora foi ajustado entre 7,3 e 7,4.

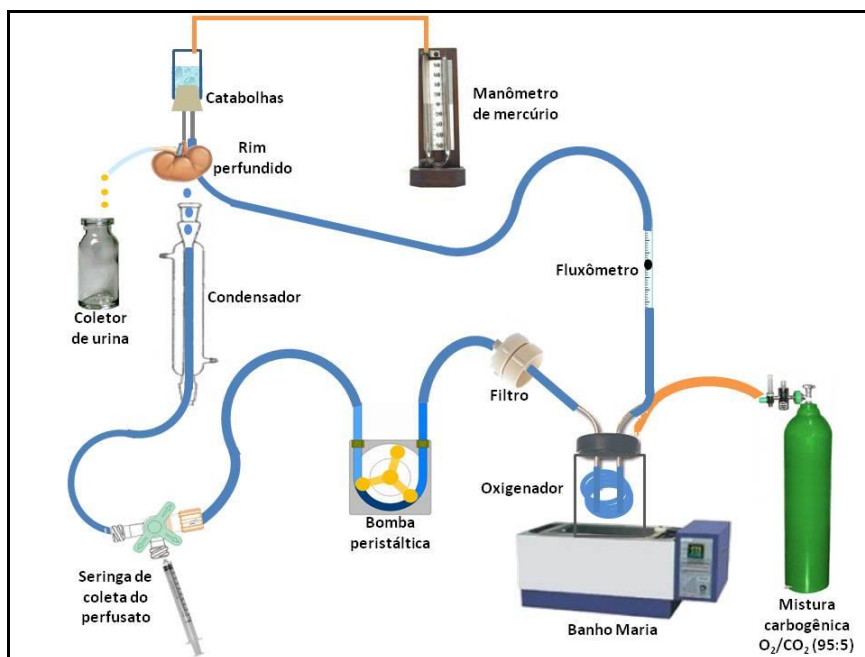


Figura 7. Desenho esquemático do sistema de perfusão de rim isolado.

Fonte: LAFAVET – UFC

4.2.2.4. Técnica Cirúrgica

Os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com pentobarbital sódico na dose de 50mg/kg de peso corporal. Em seguida, a veia femoral esquerda foi isolada e 3mL de manitol a 20% foram administrados. Foi iniciada a cirurgia com uma incisão mediana e duas incisões perpendiculares a linha alba. O ureter direito foi isolado e dissecado, sendo em seguida canulado com tubo de polietileno (PE 50), a uma distância aproximadamente de 3cm do pedúnculo renal. O rim foi descapsulado e dissecado, a supra-renal foi isolada e seccionada. A artéria renal direita e a artéria mesentérica superior foram identificadas e isoladas. O rim foi isolado com pinças hemostáticas e a artéria renal foi canulada através da

artéria mesentérica superior (WEISS e cols. 1959; NISHITSUJ-UWO e cols., 1967). Logo após o rim foi retirado junto com o ureter e fixado à cânula perfusora do sistema, sem interrupção do fluxo vascular.



Figura 8. Fotografia do rim de rato isolado no sistema de perfusão

Fonte: LAFAVET – UFC

4.2.2.5. Protocolo Experimental

Os experimentos foram iniciados após a estabilização e adaptação do órgão às novas condições. Os 30 minutos iniciais foram utilizados como controle interno. Os 30 minutos iniciais serão utilizados como controle interno. Após este período procede-se a adição do Metilfenidato em diferentes concentrações para avaliação dos efeitos sobre a pressão de perfusão (PP), resistência vascular renal (RVR), ritmo de filtração glomerular (RFG), fluxo urinário (FU) e transporte tubular de sódio e potássio. Para tanto, a cada cinco minutos foram registrados a pressão de perfusão e o fluxo de perfusão em manômetro e fluxômetro, respectivamente, em um período total de 120 min. As amostras de urina e perfusato foram coletadas a cada 10 min. E depois foram congeladas a -20°C para posterior dosagem de sódio,

potássio, inulina e osmolaridade, importantes na determinação dos parâmetros de função renal.

4.2.2.6. Grupos Experimentais

- **Grupo Controle** – Os rins foram perfundidos somente com a solução de Krebs-Henseleit (n=6).
- **Grupo Tratado (MFD)** - Os rins foram perfundidos com a solução de Krebs-Henseleit, sendo adicionado o MFD (10mg/mL) aos 30 minutos de perfusão (n=6).

4.2.2.7. Parâmetros Funcionais Renais

As fórmulas abaixo foram utilizadas para determinação dos parâmetros de função renal (MARTINEZ-MALDONADO e cols., 1978; FONTELES, 1980).

- **FU ($\text{mL.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$) = Fluxo Urinário**

$\text{FU} = \text{Peso do volume urinário} / \text{Peso do rim esquerdo} \cdot 10$

*admitiu-se que a urina possui a mesma densidade da água

- **PP= Pressão de Perfusão (mmHg) = Análise direta em manômetro**

- **RVR ($\text{mmHg/mL.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$) = Resistência Vascular Renal**

$\text{RVR} = \text{PP (mmHg)} / \text{FPR}$

- **RFG ($\text{mL.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$) = Ritmo de Filtração Glomerular**

$$RFG = DOU_{in} / DOP_{in} \cdot FU$$

DOU_{in} = Densidade ótica da inulina na urina

DOP_{in} = Densidade ótica da inulina no perfusato

- FNa^+ ($\mu Eq \cdot g^{-1} \cdot min^{-1}$) = Sódio Filtrado

$$FNa^+ = RFG \cdot PNa^+$$

PNa^+ = Concentração de sódio no perfusato

- ENa^+ ($\mu Eq \cdot g^{-1} \cdot min^{-1}$) = Sódio excretado

$$ENa^+ = FU \cdot UNa^+$$

UNa^+ = Concentração de sódio na urina

- TNa^+ ($\mu Eq \cdot g^{-1} \cdot min^{-1}$) = Sódio Transportado

$$TNa^+ = FNa^+ - ENa^+$$

- % TNa^+ = Percentual de Sódio Transportado

$$\%TNa^+ = TNa^+ \cdot 100 / FNa^+$$

Todos os cálculos feitos para determinação dos parâmetros de sódio acima citados foram repetidos para o potássio.

4.2.3. Avaliação da Função Renal “*in vivo*”

4.2.3.1. Animais Experimentais

Foram usados camundongos Swiss, adultos, pesando 15 a 35 g proveniente do Bioterio Central da Universidade Federal do Ceará. Os animais foram mantidos em gaiola sob condições ambientais padronizadas (ciclo 12h claro/escuro e temperatura entre 23±2 °C) e alimentados com ração e água potável à vontade.

Nos ensaios *in vivo*, os animais foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos, cada um contendo 4 animais:

Grupo Controle: animais foram submetidos à administração oral de veículo (solução aquosa).

Grupo 10mg: animais foram submetidos à administração oral de Metilfenidato na dose de 10mg/kg. A dose de 10mg foi escolhida para os testes *in vivo*, em virtude de ter sido verificado que nesta dose, existem alterações significativas nos parâmetros neurotóxicos estudados.

4.2.3.2. Protocolo Experimental

Os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas individuais para adaptação as condições experimentais por 24 horas. Após esse tempo os animais receberam o MFD e após 24 e 48 horas, os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg/kg) e, em seguida, conduzida uma laparotomia e dissecação da veia cava abdominal, por onde foi coletado o sangue através da punção deste vaso.

As amostras de sangue coletadas foram centrifugadas a 1500rpm por 10min, e em seguida foi extraído o plasma para a determinação de Uréia, Creatinina, Sódio e Potássio. Essas dosagens também foram feitas na urina de 24h. Uréia e creatinina foram medidas através de método colorimétrico por um aparelho semi-automático (LABQUEST®), usando kits de diagnóstico (LABTEST®, Brasil). A determinação de sódio e potássio foi feita através do aparelho eletrodo íon-seletivo (RapidChem 744, Bayer Diagnostic). Com as concentrações plasmáticas e urinárias de sódio e potássio, foram determinadas as frações de excreção de Na^+ e K^+ (FENa^+ , FEK^+) para avaliar a capacidade funcional tubular renal.

O cálculo utiliza as seguintes formulas:

$$\text{FENa}^+ = \frac{\text{Clearance Na}^+}{\text{Clearance de creatinina}} \times 100$$

$$\text{FEK}^+ = \frac{\text{Clearance K}^+}{\text{Clearance de creatinina}} \times 100$$

Ao final do experimento foi retirado um fragmento longitudinal do rim e colocado em formol a 10% para posterior exame histológico. Os fragmentos obtidos foram submetidos à desidratação e diafanização e, em seguida, cortados numa espessura de 5µm. Foram realizadas colorações de hematoxilina-eosina (HE) e as lâminas analisadas através de um microscópio óptico (NIKON). Todos os esforços foram feitos para minimizar o número e o sofrimento dos animais utilizados. Os ensaios com os animais seguiram os padrões exigidos de ética e biossegurança.

4.2.4. Avaliação do efeito do Metilfenidato sobre células renais

4.2.4.1. Linhagem Celular e Condições de Cultivo

As células tubulares renais, MDCK, foram cultivadas em garrafas para cultivo celular com o meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal, 100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina e mantidas a uma temperatura de 37 °C em estufa contendo 5% de CO₂. As alíquotas de célula para estoque serão congeladas a -70 °C e mantidas em nitrogênio líquido (FRESHENY, 2000).

Antes de cada experimento as células foram armazenadas em meio sem SBF por 24h para a obtenção de células na fase G₀ do ciclo celular. Para cada experimento foi removido o meio da cultura e a mesma será incubada com tripsina-EDTA (0,25/0,02% v/v) a 37°C por aproximadamente 10 min. A tripsina foi inativada adicionando o mesmo volume de meio com SBF. A suspensão foi então centrifugada a 200G por 10 min (MARTINS et al., 2005; CHAIM, 2005). O sobrenadante foi descartado e as células re-suspensas em meio de cultura. As células foram quantificadas em câmara de Neubauer e subcultivadas (1-2x10⁵céls/ml) permitindo o crescimento confluyente por 24h. As células foram avaliadas na presença de diferentes concentrações do metilfenidato, solubilizados em PBS estéril, pH 7.4. Durante o experimento as placas foram avaliadas com 24, 48 e 72hs de cultivo, usando microscópio invertido. Após esses períodos também foram realizados ensaios de viabilidade e citotoxicidade celular. As alíquotas de células para estoque serão mantidas em meio de cultura RPMI 1640 acrescido de SBF a 50% e DMSO a 10%, congeladas primeiramente à -80°C e mantidas em nitrogênio líquido (FRESHENY, 2000).

4.2.4.2. Ensaios de Viabilidade

4.2.4.2.1. MTT

As células MDCK cultivadas em placas de 96 poços (1×10^5 céls/mL) foram expostas ao metilfenidato como descrito acima. Após o tratamento das células, foram retirados 100µL de sobrenadante de cada poço, e então adicionado 10µL o 3-(4,5-dimetilazil-2-il)-2,5 difenil tetrazólico (MTT) 2,5mg/mL dissolvido em PBS. Este método baseia-se na atividade metabólica de células viáveis, formando um produto colorido (cristal de formazan, que é insolúvel em água). Após incubação por 24 horas à 37°C em estufa com 5% de CO₂, os cristais foram dissolvidos com a adição de 90µL de uma solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10% em HCl 0,01N. Em seguida as placas foram incubadas por 17 horas e a leitura realizada espectrofotômetro (570nm) (MOSMAN, 1983; GÓMEZ, 2006). Os poços referentes ao controle foram mantidos nas mesmas condições que os poços submetidos ao tratamento havendo substituição do fármaco em estudo por PBS (pH 7,2).

4.2.4.2.2. Lactato Desidrogenase (LDH)

Para avaliar a integridade de membrana no processo de morte celular, foi quantificada a liberação da enzima Lactato Desidrogenase (LDH). As células foram cultivadas em placas de 96 poços, sob as condições de cultivo. Decorridas 24h do tratamento com diferentes concentrações das substâncias em estudo, 20µL do sobrenadante foram incubados com 1mL de uma solução de NADH e piruvato (ANALISA kit, LABTEST Diagnóstica AS, MG, Brazil) e o decréscimo da absorbância a 340nm será utilizado para o cálculo da atividade enzimática (RACHER et al., 1990).

4.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Em relação à perfusão renal, os trinta minutos iniciais de cada experimento serviram como controle interno. As tabelas e os gráficos dos parâmetros de função renal foram analisados de acordo com o tempo de perfusão, que foi dividido em intervalos de 30 minutos.

Para os ensaios *ex vivo* e *in vivo*, os resultados obtidos foram comparados através do teste de “t” de Student, utilizando-se como critério de significância $p < 0.05$.

Para os ensaios *in vitro*, os dados foram expressos como média E.P.M e analisado por ANOVA, com pós-teste Bonferroni ($p < 0,05$). A CI_{50} (concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo) foi determinada a partir de uma curva de regressão não-linear.

A análise estatística dos dados foi realizada através do software GraphPad Prism versão 5.0 para Windows, GraphPad Software, San Diego, Califórnia EUA. Copyright (c) 1992- 2007 por GraphPad Software.

4.4. ASPECTOS ÉTICOS

Os protocolos experimentais utilizados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da Universidade Federal do Ceará (UFC) (Protocolo nº 09/12).

5. RESULTADOS

5.1. Avaliação da Atividade Ansiolítica

5.1.1. Teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

O Labirinto em Cruz Elevado é provavelmente o modelo animal de ansiedade mais empregado atualmente (CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005). O comportamento exibido pelo animal durante o teste tem sido atribuído a aversão natural dos animais (ratos ou camundongos) a espaços abertos, representada pela esquivas dos braços abertos. Drogas ansiolíticas aumentam a exploração destas áreas sem alterarem a atividade motora dos animais (LISTER, 1987; CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005).

O Número de Entrada nos Braços Abertos (NEBA), a Percentagem de Entrada nos Braços Abertos (PEBA), o Tempo de Permanência nos Braços Abertos (TPBA) e a Percentagem do Tempo de Permanência nos Braços Abertos (PTBA) foram os parâmetros avaliados nesse teste.

Os resultados com animais submetidos ao tratamento agudo por via oral com MFD nas doses de 2,5, 5, 10 e 20 mg/Kg, no LCE mostraram que houve um aumento significativo apenas na dose de 20mg/Kg (MFD 20) nos seguintes parâmetros: NEBA (**Figura 9.**) [MFD 20: $10,14 \pm 1,18$]; TPBA (**Figura 11.**) [MFD 20: $113,3 \pm 9,02$]; PTBA (**Figura 12.**) [MFD 20: $49,54 \pm 3,48$] quando comparados com os respectivos controles (Cont): NEBA [$5,11 \pm 0,75$]; TPBA [$69,75 \pm 7,27$]; PTBA [$30,67 \pm 2,44$]. O parâmetro PEBA (**Figura 10.**) não foi alterado em nenhuma das doses.

O diazepam 1mg/kg aumentou todos os parâmetros: NEBA: [$14,43 \pm 1,86$]; PEBA: [$53,65 \pm 5,64$]; TPBA: [$168,4 \pm 14,87$]; PTBA: [$61,41 \pm 5,98$]; em relação aos controles (**Figuras 9., 10., 11., 12.**).

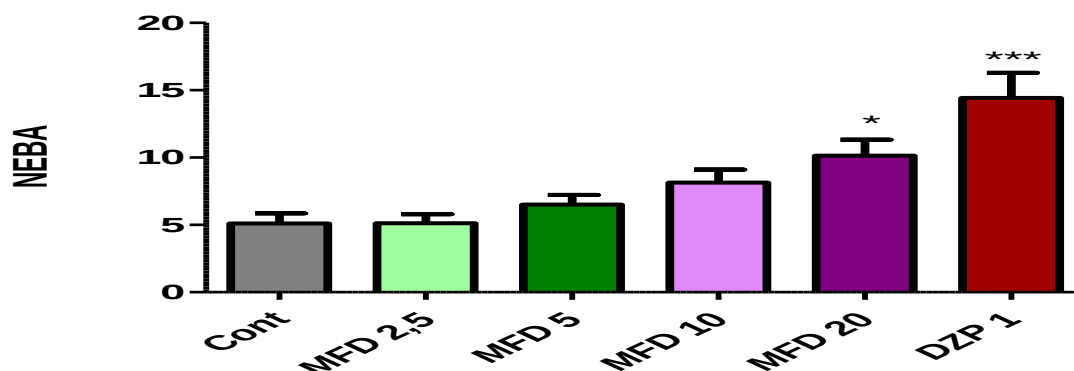


Figura 9. Efeito do MFD e Diazepam sobre o número de entrada nos braços abertos (NEBA) no teste Labirinto em Cruz Elevado em animais adultos.

Controle (veículo), MFD (v.o) e diazepam (DZP, i.p.) foram administrados 30 (i.p.) ou 60 min (v.o.) antes do experimento. Os valores representam a média $\pm$ E.P.M do número de entradas nos braços abertos (NEBA) durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguida por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos: * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ vs controle.

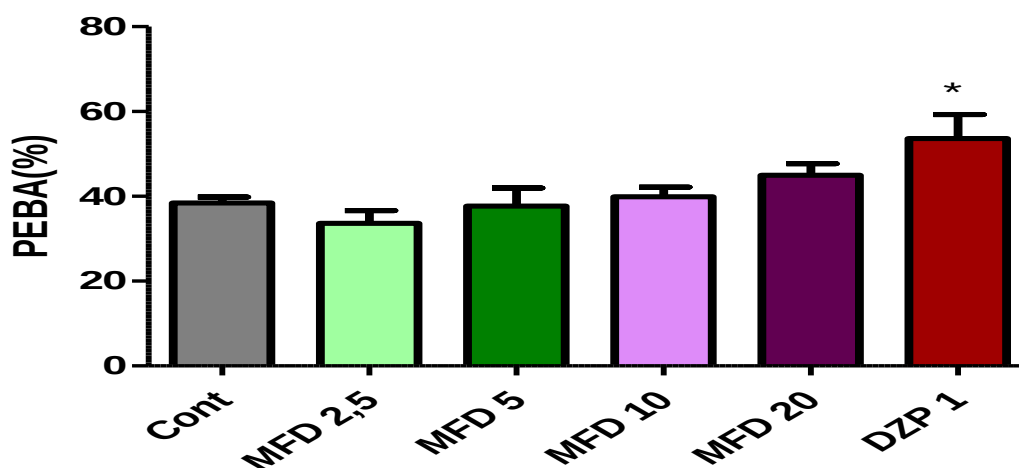


Figura 10. Efeito do MFD e diazepam sobre a percentagem de entradas nos braços abertos (PEBA) no teste Labirinto em Cruz Elevado em animais adultos.

Controle (veículo), MFD (v.o) e diazepam (DZP, i.p.) foram administrados 30 (i.p.) ou 60 min (v.o.) antes do experimento. Os valores representam a média $\pm$ EPM da percentagem de entradas nos braços abertos (PEBA) durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguida por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos: * $p < 0,05$ vs controle.

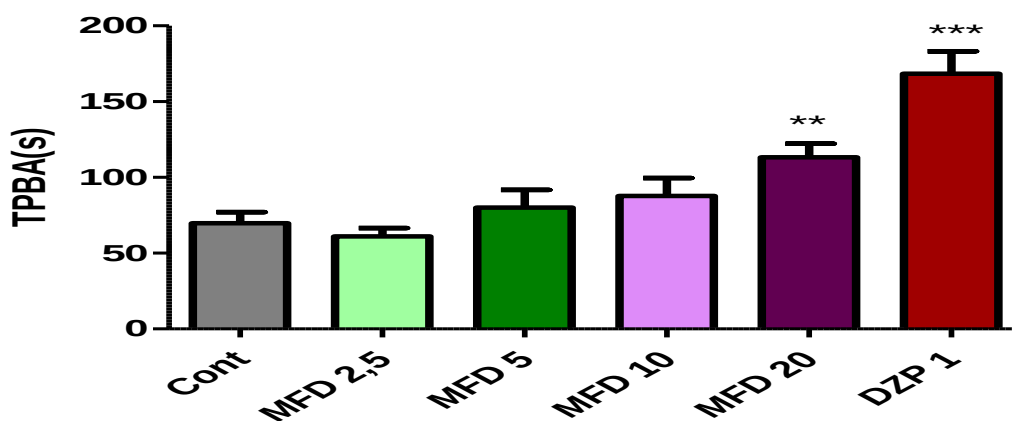


Figura 11. Efeito do MFD e diazepam sobre o tempo de permanência nos braços abertos (TPBA) no teste Labirinto em Cruz Elevado em animais adultos.

Controle (veículo), MFD (v.o) e diazepam (DZP, i.p.) foram administrados 30 (i.p.) ou 60 min (v.o.) antes do experimento. Os valores representam a média $\pm$ EPM do tempo de permanência nos braços abertos (TPBA) durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguida por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos: ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs controle.

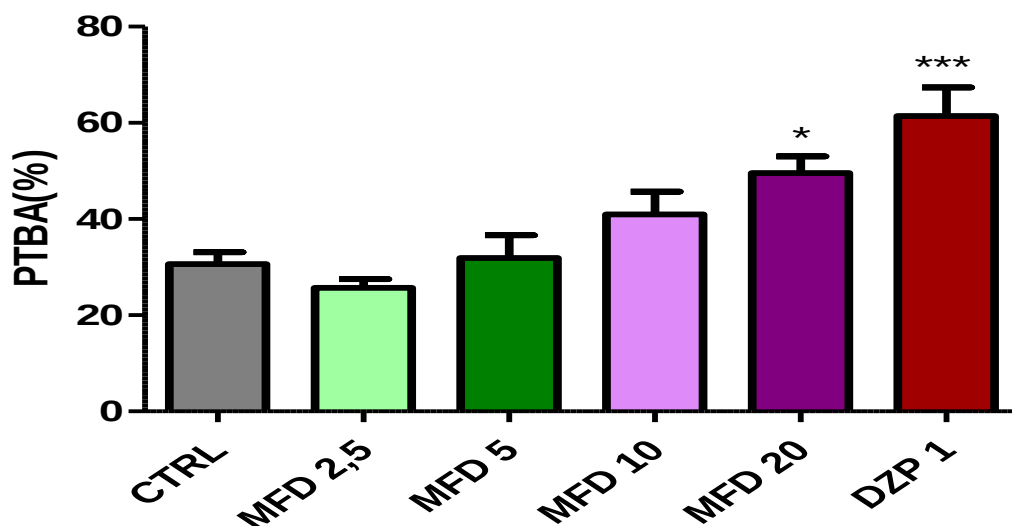


Figura 12. Efeito do MFD e diazepam sobre a percentagem do tempo de permanência nos braços abertos (PTBA) no teste Labirinto em Cruz Elevado em animais adultos.

Controle (veículo), MFD (v.o) e diazepam (DZP, i.p.) foram administrados 30 (i.p.) ou 60 min (v.o.) antes do experimento. Os valores representam a média $\pm$ EPM da percentagem de tempo de permanência nos braços abertos (NEBA) durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguida por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos: * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ vs controle.

5.2. Avaliação da Atividade Locomotora

5.2.1. Teste do Campo Aberto

A atividade locomotora espontânea (ALE), *rearing* e *grooming* foram os parâmetros analisados e os resultados foram expressos como número de cruzamentos, de *rearing* e *grooming*.

O MFD aumentou a atividade locomotora apenas nas doses de 10 e 20 mg/Kg (**Figura 13.**) [MFD10: $92,75 \pm 3,41$; MFD20: $113,4 \pm 5,75$] quando comparado ao respectivo grupo controle [Cont: $51,75 \pm 2,85$].

O diazepam 2mg/Kg, i.p., usado como droga padrão, reduziu a atividade locomotora dos animais [DZP2: $21,63 \pm 1,35$] em relação ao controle.

Não foi observada nenhuma alteração no parâmetro *rearing* nos grupos tratados com MFD: (**Figura 14.**): [[MFD2,5: $14,57 \pm 1,44$; MFD5: $15,88 \pm 0,91$; MFD10: $18,43 \pm 1,79$; MFD20: $19,67 \pm 2,68$] quando comparado ao grupo controle Cont: $19,86 \pm 2,28$]. O diazepam 2mg/Kg, i.p., usado como droga padrão, reduziu o *rearing* em relação ao controle [DZP2: $0,60 \pm 0,22$].

No *grooming*, os animais não apresentaram diferença significativa em nenhuma das doses observadas: animais adultos (**Figura 15.**): [MFD2,5: $3,75 \pm 0,41$; MFD5: $4,25 \pm 0,36$; MFD10: $4,28 \pm 0,42$; MFD20: $4,14 \pm 0,40$] quando comparado ao controle: [Cont: $5,25 \pm 0,25$]. O diazepam 2mg/Kg, i.p., usado como droga padrão, reduziu o *grooming* em relação ao controle [DZP2: $2,30 \pm 0,36$].

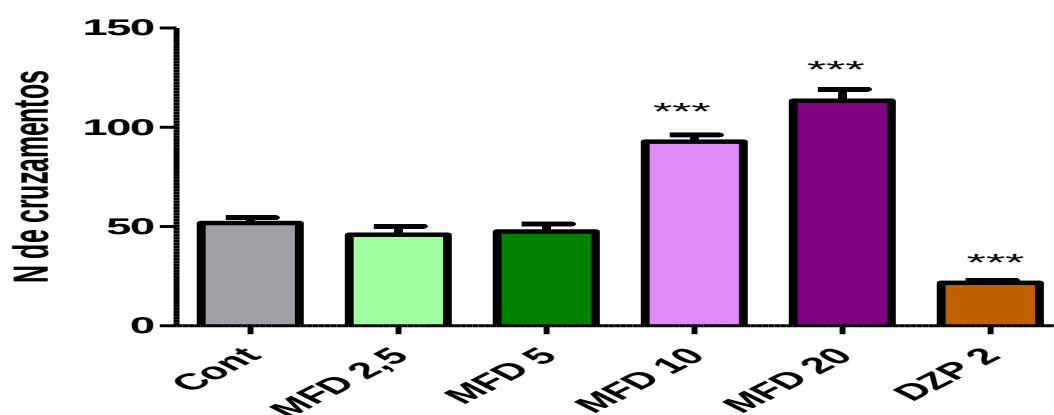


Figura 13. Efeito do MFD e diazepam sobre a atividade locomotora espontânea no teste do Campo Aberto em animais adultos.

Controle (veículo), MFD (v.o) e diazepam (DZP, i.p.) foram administrados 30 (i.p.) ou 60 min (v.o.) antes do experimento. Os valores representam a média $\pm$ EPM do número de cruzamentos durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguida por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos: *** $p < 0,001$ vs controle.

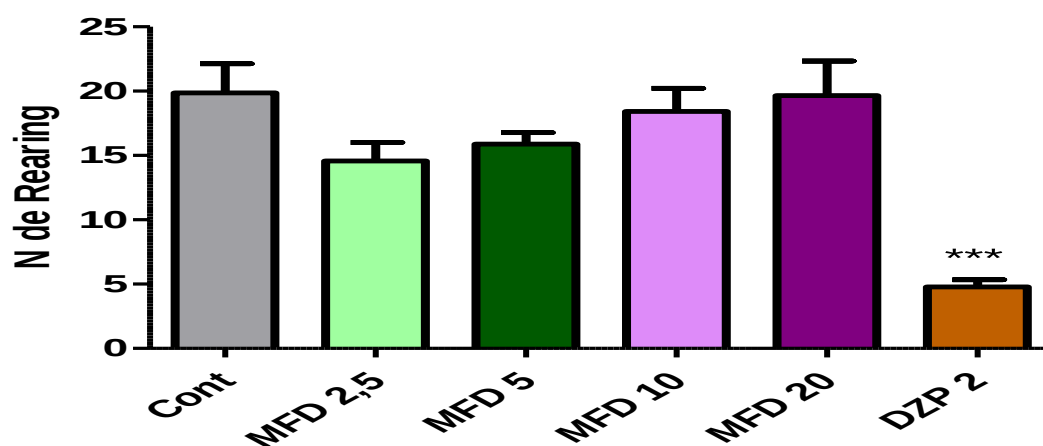


Figura 14. Efeito do MFD e diazepam sobre o número de *rearing* no teste do Campo Aberto em animais adultos.

Controle (veículo), MFD (v.o) e diazepam (DZP, i.p.) foram administrados 30 (i.p.) ou 60 min (v.o.) antes do experimento. Os valores representam a média $\pm$ EPM do número de cruzamentos durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguida por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos: *** $p < 0,001$ vs controle.

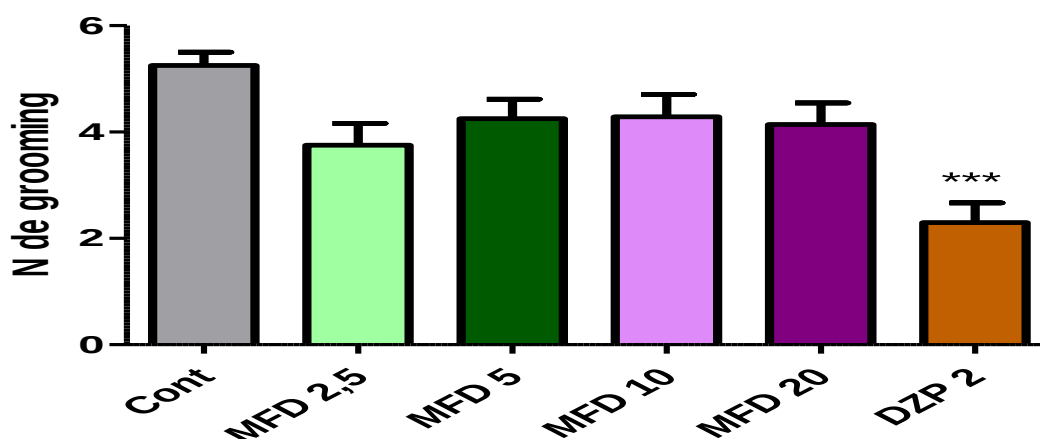


Figura 15. Efeito do MFD e diazepam sobre o número de *grooming* no teste do Campo Aberto em animais adultos.

Controle (veículo), MFD (v.o) e diazepam (DZP, i.p.) foram administrados 30 (i.p.) ou 60 min (v.o.) antes do experimento. Os valores representam a média $\pm$ EPM do número de rearing durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguida por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos: * $p < 0,05$ vs controle.

5.2.2. Rota Rod

O número de quedas e o tempo de permanência na barra foram os parâmetros analisados nos animais.

O tratamento agudo por via oral com o metilfenidato nas doses de 2,5, 5, 10 e 20 mg/Kg nos animais adultos, no teste *Rota Rod* mostrou que não houve diferença significativa no número de quedas [MFD2,5: $0,57 \pm 0,29$; MFD5: $0,62 \pm 0,26$; MFD10: $1,14 \pm 0,26$; MFD20: $0,85 \pm 0,40$] quando comparada ao controle [Cont: $0,12 \pm 0,12$].

Também, nenhuma diferença significativa foi observada no tempo de permanência na barra com os animais tratados com metilfenidato nas mesmas doses descritas anteriormente (**Tabela 5**): [MFD2,5: $56,50 \pm 1,41$; MFD5: $57,00 \pm 1,29$; MFD10: $56,86 \pm 0,98$; MFD20: $57,71 \pm 1,10$] quando comparado ao controle [Cont: $59,75 \pm 0,25$].

Por sua vez, Diazepam (2mg/Kg), utilizado como droga padrão, aumentou o número de quedas: DZP2: $[2,87 \pm 0,12]$ e reduziu o tempo de permanência na barra: DZP2: $[41,67 \pm 4,21]$ quando comparados aos grupos controle.

Tabela 5. Efeito do metilfenidato e diazepam sobre o número de quedas e tempo de permanência na barra no teste Rota Rod em animais adultos

Tratamento	Parâmetros	
	Nº de Quedas	Tempo de Permanência(s)
Controle	$0,12 \pm 0,12$	$59,75 \pm 0,25$
Metilfenidato 2,5mg/Kg, v.o.	$0,57 \pm 0,29$	$56,50 \pm 1,41$
Metilfenidato 5mg/Kg, v.o.	$0,62 \pm 0,26$	$57,00 \pm 1,29$
Metilfenidato 10 mg/Kg, v.o.	$1,14 \pm 0,26$	$56,86 \pm 0,98$
Metilfenidato 20mg/Kg, v.o.	$0,85 \pm 0,40$	$57,71 \pm 1,10$
Diazepam, i.p.	$2,87 \pm 0,12$ ***	$41,67 \pm 4,21$ ***

Os valores representam a média $\pm$ EPM do número de quedas e tempo de permanência na barra. Foram utilizados grupos de 6-10 animais. Para análise estatística do parâmetro número de quedas foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal –Wallis seguido por Dunns como teste *post hoc*. Para a análise do parâmetro tempo de permanência na barra foi realizado ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos comparados ao controle (***p<0,001).

5.3. Avaliação da Atividade Antidepressiva

5.3.1. Teste do Nado Forçado

O tratamento agudo por via oral, nas doses de 2,5, 5, 10 e 20 mg/Kg, de MFD no teste do nado forçado mostrou que houve uma diminuição no tempo de imobilidade nos animais, na dose de 20 mg/Kg (**Figura 16.**): [MFD20:91,38±8,97] quando comparado ao grupo controle [Cont: 143,2±7,60].

A Imipramina (10mg/Kg), utilizada como padrão positivo, reduziu o tempo de imobilidade nos animais [IMI-10: 66,67±7,15] quando comparada ao grupo controle.

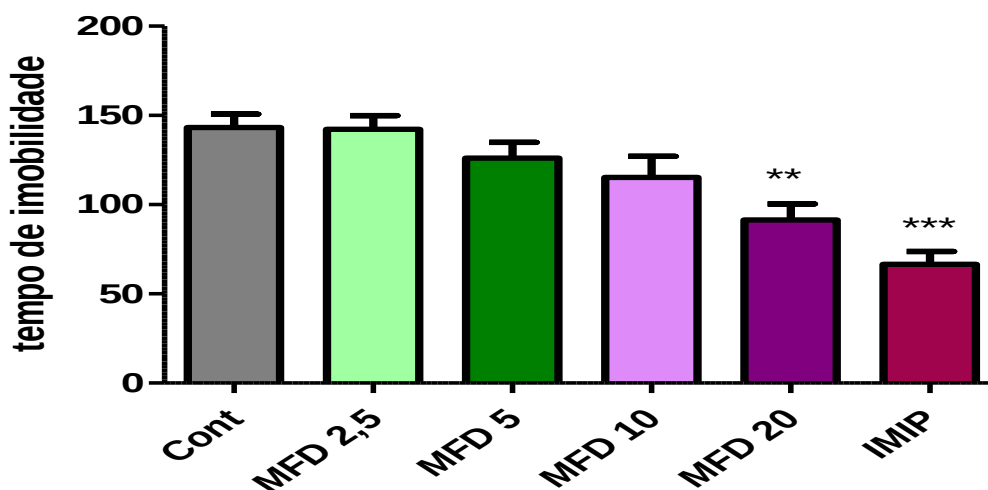


Figura 16. Efeito do MFD e imipramina sobre o tempo de imobilidade no teste Nado Forçado em animais adultos.

Controle (veículo), metilfenidato (v.o.) e imipramina (IMI, i.p.) foram administrados 30 (i.p.) ou 60 min (v.o.) antes do experimento. Os valores representam a média ± EPM do tempo de imobilidade durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos comparados ao controle (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

5.4. Determinação das Concentrações de Monoaminas

A análise química realizada pelo método de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) em amostras de tecido cerebral (corpo estriado) mostrou que o tratamento agudo com o metilfenidato nas doses de 2,5, 5, 10 e 20 mg/Kg promoveu alterações nas concentrações das monoaminas.

O tratamento agudo por via oral do MFD não alterou significativamente a concentração de DA (**Figura 17.**) em nenhuma das doses observadas [MFD2,5: $59,84 \pm 10,89$; MFD5: $58,65 \pm 15,01$; MFD10: $41,71 \pm 2,67$; MFD20: $74,24 \pm 5,79$] em relação ao controle [Cont: $57,07 \pm 5,91$].

O tratamento agudo por via oral do MFD aumentou significativamente a concentração de NA (**Figura 17.**) nas doses de 5, 10 e 20 mg/Kg [MFD5: $63,14 \pm 3,96$; MFD10: $69,90 \pm 7,50$; MFD20: $61,99 \pm 8,81$] em relação ao controle [Cont: $8,46 \pm 0,63$]. O tratamento agudo por via oral com MFD diminuiu significativamente a concentração de 5-HT (**Figura 18.**) apenas nas doses de 10 e 20 mg/Kg [MFD10: $1,95 \pm 0,17$; MFD20: $0,58 \pm 0,13$] em relação ao controle [Cont: $5,03 \pm 0,60$].

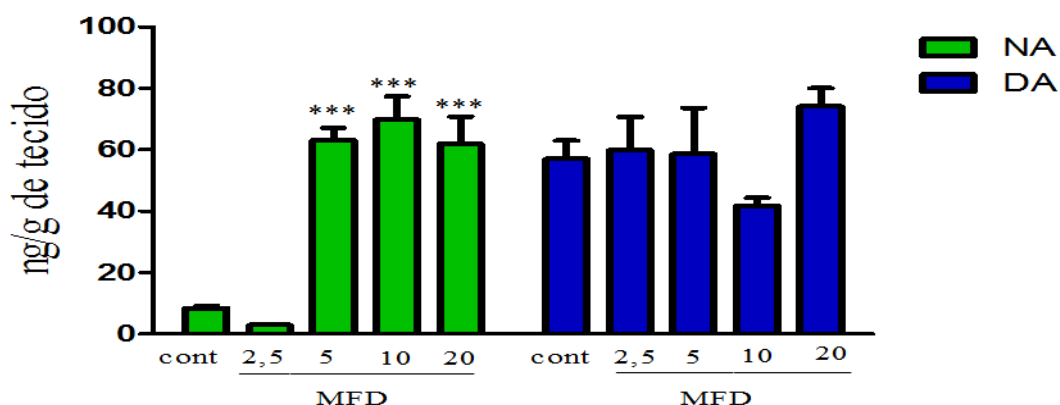


Figura 17. Concentração de monoaminas no corpo estriado de animais adultos submetidos ao tratamento agudo com MFD.

Após 60 minutos da administração do MFD ou veículo, os animais foram dissecados e o corpo estriado foi retirado. A determinação das monoaminas foi realizada pela técnica HPLC com detecção eletroquímica. As barras representam a média±EPM. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos comparados ao controle (***p<0,001).

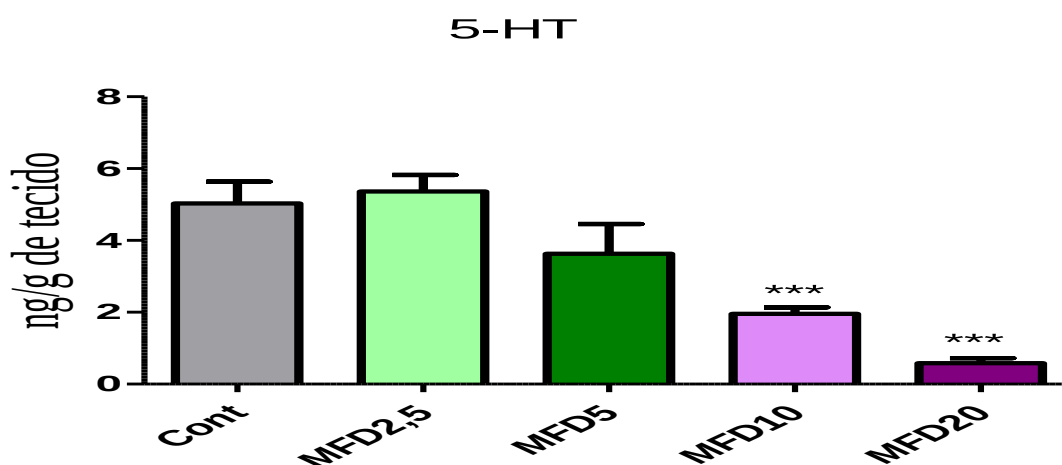


Figura 18. Concentração de serotonina no corpo estriado de animais adultos submetidos ao tratamento agudo com MFD.

Após 60 minutos da administração do MFD ou veículo, os animais foram dissecados e o corpo estriado foi retirado. A determinação das monoaminas foi realizada pela técnica HPLC com detecção eletroquímica. As barras representam a média±EPM. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos comparados ao controle (***p<0,001).

5.5. Avaliação da Atividade Anticonvulsivante

5.5.1. Teste da Convulsão Induzida por Pilocarpina

Após alguns minutos da administração da pilocarpina, 400 mg/Kg, i.p. (P400), animais apresentaram sinais colinérgicos periféricos (100%) (miose, piloereção, cromodaciorréia, salivação, diarréia, diurese e tremores) movimentos estereotipados (aumento da atividade de roer, coçar, mastigar e *wet-dog shakes* – ato de sacudir semelhante a um cachorro molhado), seguidos por convulsões motoras límbicas. Essas mudanças foram mais pronunciadas nos grupos pré-tratados com metilfenidato.

Neste teste foram avaliados as latências de convulsão e o tempo de sobrevida, em segundos. Os animais adultos tratados com MFD em todas as doses diminuíram a latência de convulsão [MFD2,5: 564,3±44,76; MFD5: 632,3±46,90; MFD10: 677,9±43,54; MFD20: 696,0±25,99] quando comparado ao grupo da pilocarpina [P400: 875,7±42,80] (**Figura 19.**).

Em relação à sobrevida, houve uma diminuição na latência de morte em todas as doses, onde 100% dos animais morreram [MFD 2,5 (n=8); MFD 5 (n=8); MFD 10 (n=14); MFD 20 (n=12)] quando comparado com o grupo de pilocarpina, onde 64,28% (9/14) dos animais morreram (**Figura 20.**).

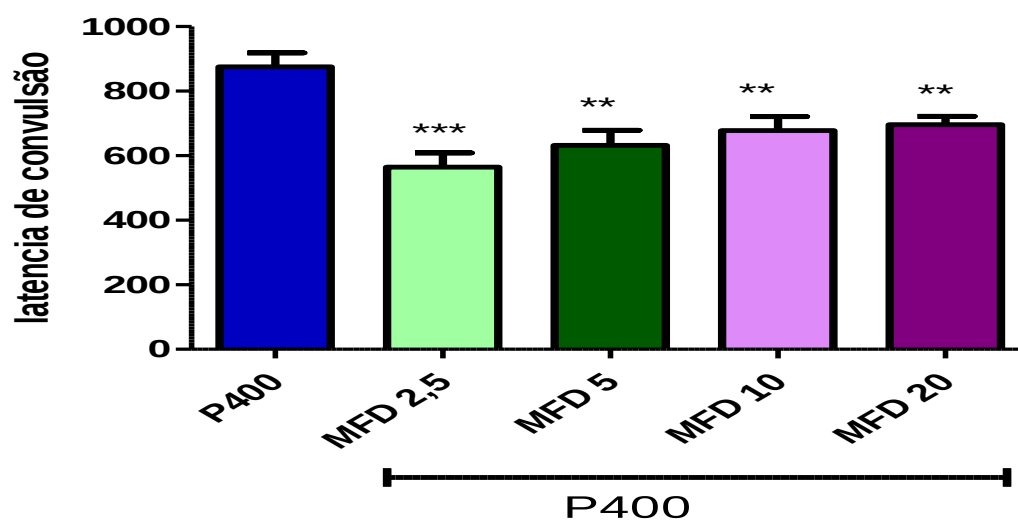


Figura 19. Efeito do MFD sobre a latência de convulsão no teste de Convulsão Induzida por Pilocarpina em animais adultos.

Grupo pré-tratados com metilfenidato (v.o.) e após 1 hora foi induzida a convulsão com P400 (400 mg/Kg; i.p.). Os valores representam a média $\pm$ EPM da latência de convulsão. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos comparados ao controle (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

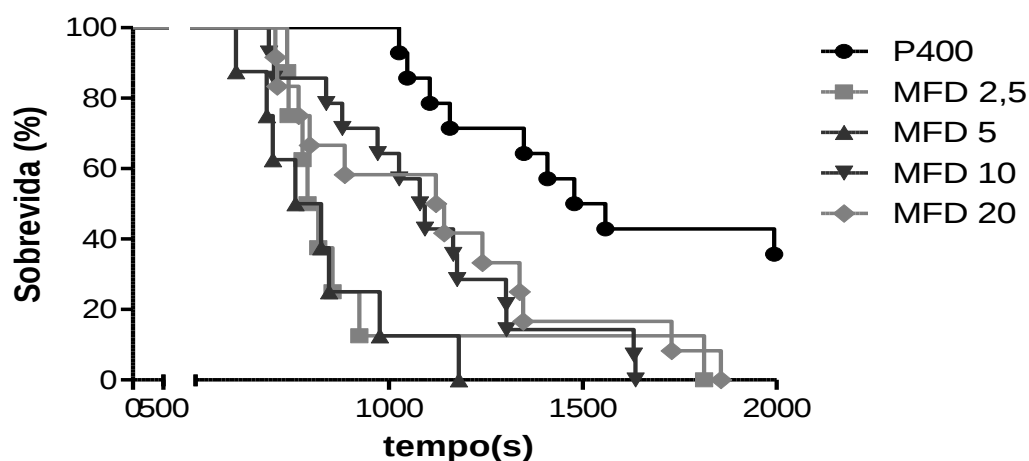


Figura 20. Efeito do MFD sobre a sobrevivida no teste de Convulsão Induzida por Pilocarpina em animais adultos.

Grupo pré-tratados com metilfenidato (v.o.) e após 1 hora foi induzida a convulsão com P400 (400 mg/Kg; i.p.). Os valores representam a média $\pm$ EPM da latência de convulsão.

5.6. Efeitos do MFD sobre a atividade da acetilcolinesterase em hipocampo e corpo estriado de animais adultos tratados ou não com P400

A administração de P400 foi capaz de reduzir significativamente ($p < 0,001$) a atividade da AChE no hipocampo e corpo estriado dos animais em relação ao controle. Não foi observada nenhuma diferença significativa no hipocampo dos animais pertencentes aos diferentes grupos tratados (**Figura 21.**) [(Cont= $63,06 \pm 7,10$; P400= $19,04 \pm 2,80$; MFD2,5+P400= $45,40 \pm 4,02$; MFD5+P400= $40,61 \pm 5,99$; MFD10+P400= $69,84 \pm 5,23$; MFD20+P400= $54,72 \pm 7,76$]. No corpo estriado, os grupos pré-tratados com MFD 2,5 e MFD 5 reduziu significativamente o nível de atividade da enzima AChE quando comparado ao grupo controle (**Figura 22.**) (Cont= $141,8 \pm 12,71$; P400= $48,76 \pm 4,70$; MFD2,5+P400= $64,48 \pm 4,34$; MFD5+P400= $56,50 \pm 5,30$; MFD10+P400= $136,7 \pm 17,70$; MFD20+P400= $143,0 \pm 16,60$].

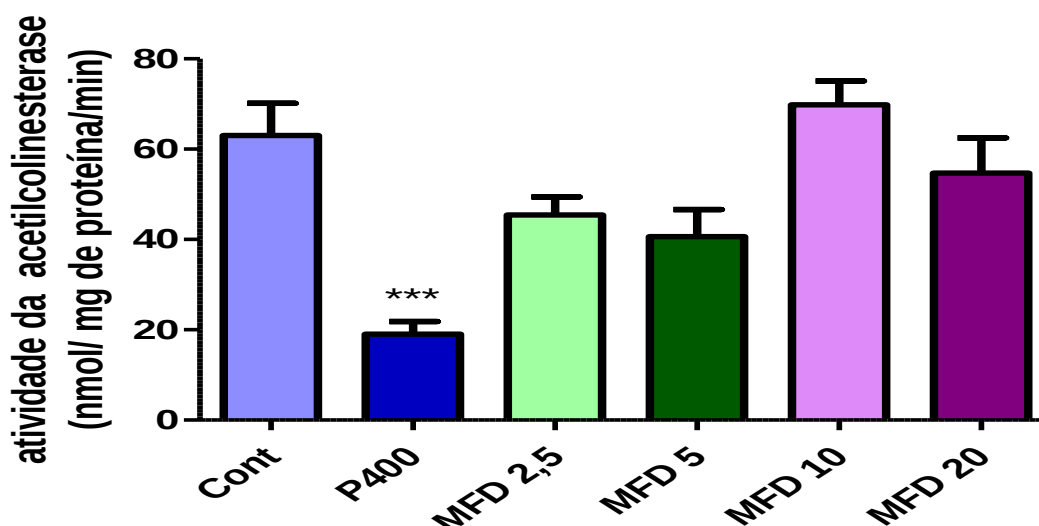


Figura 21. Efeito do MFD sobre a atividade da AChE em hipocampo de animais adultos durante as convulsões induzidas por P400. Os resultados representam média ± EPM. ** $p < 0,01$ comparado com o controle. (ANOVA and Student-Newman-Keuls).

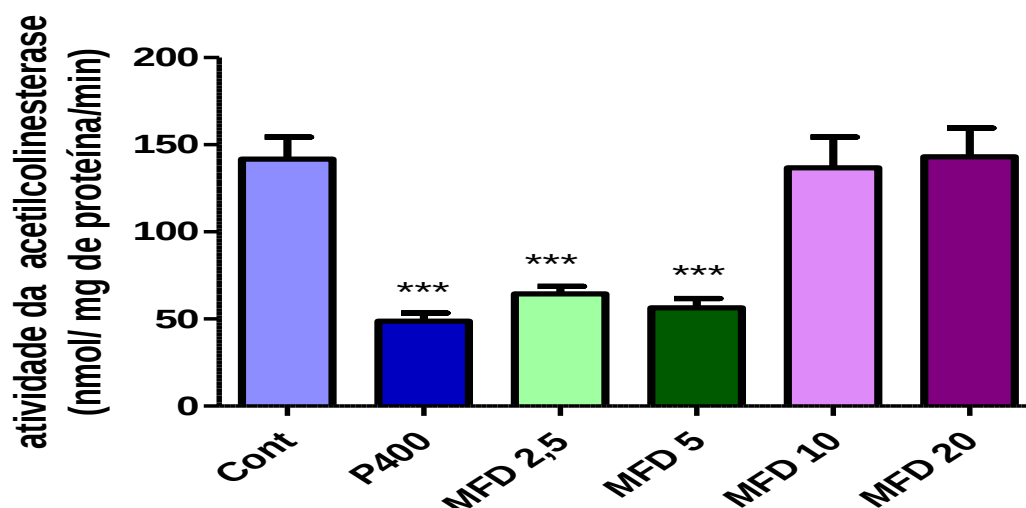


Figura 22. Efeito do MFD sobre a atividade da AChE em corpo estriado de animais adultos durante as convulsões induzidas por P400. Os resultados representam $\text{media} \pm \text{EPM}$. *** $p < 0,001$ comparado com o controle. (ANOVA and Student-Newman-Keuls).

5.7. Avaliação da função renal “ex vivo”

O MFD, na concentração de 10mg, reduziu o fluxo urinário (**Figura 23. a**) e o ritmo de filtração glomerular (**Figura 23. b**) quando comparado com o grupo controle. A pressão de perfusão (**Figura 24. a**) e a resistência vascular renal (**Figura 24. b**), não sofreram alteração após a infusão do MFD.

O percentual de transporte tubular de sódio ($\%TNa^+$) reduziu após a administração do MFD quando comparado com o grupo controle (**Figura 25. a**), enquanto o percentual de transporte tubular de potássio ($\%TK^+$) permaneceu inalterado (**Figura 25. b**).

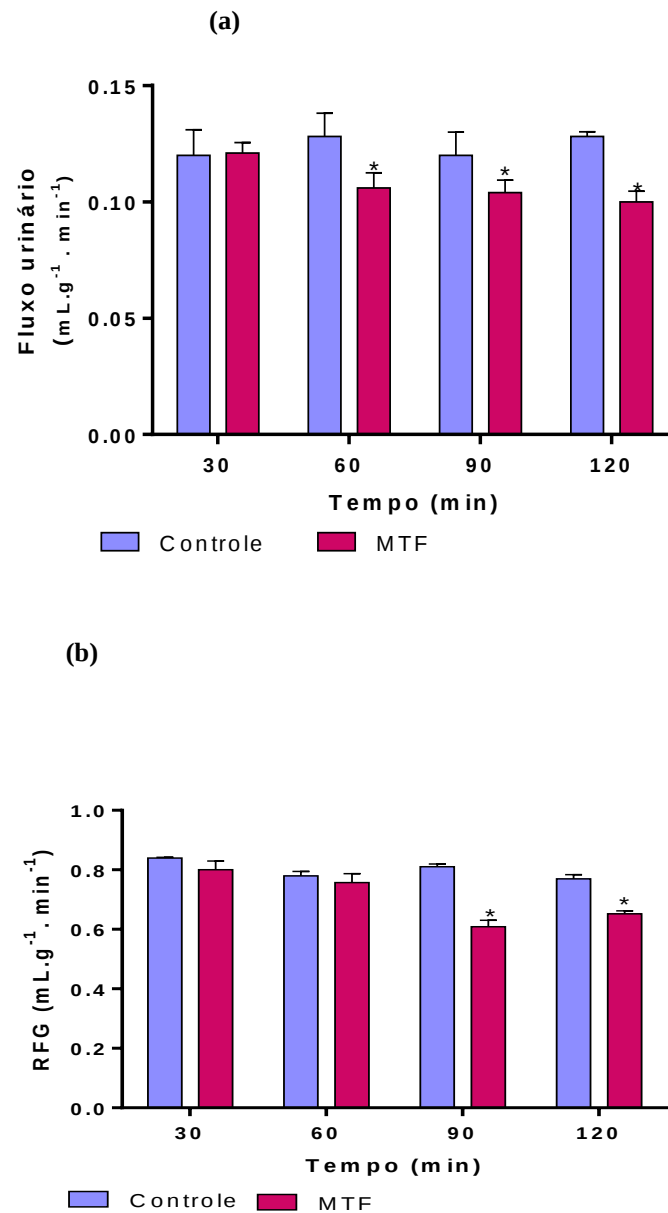


Figura 23. Fluxo Urinário (FU; a) e Ritmo de Filtração Glomerular (RFG; b) nos grupos controle e tratado com Metilfenidato (MFD). Os resultados foram expressos em média e erro padrão da média (E.P.M). * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (teste t de Student).

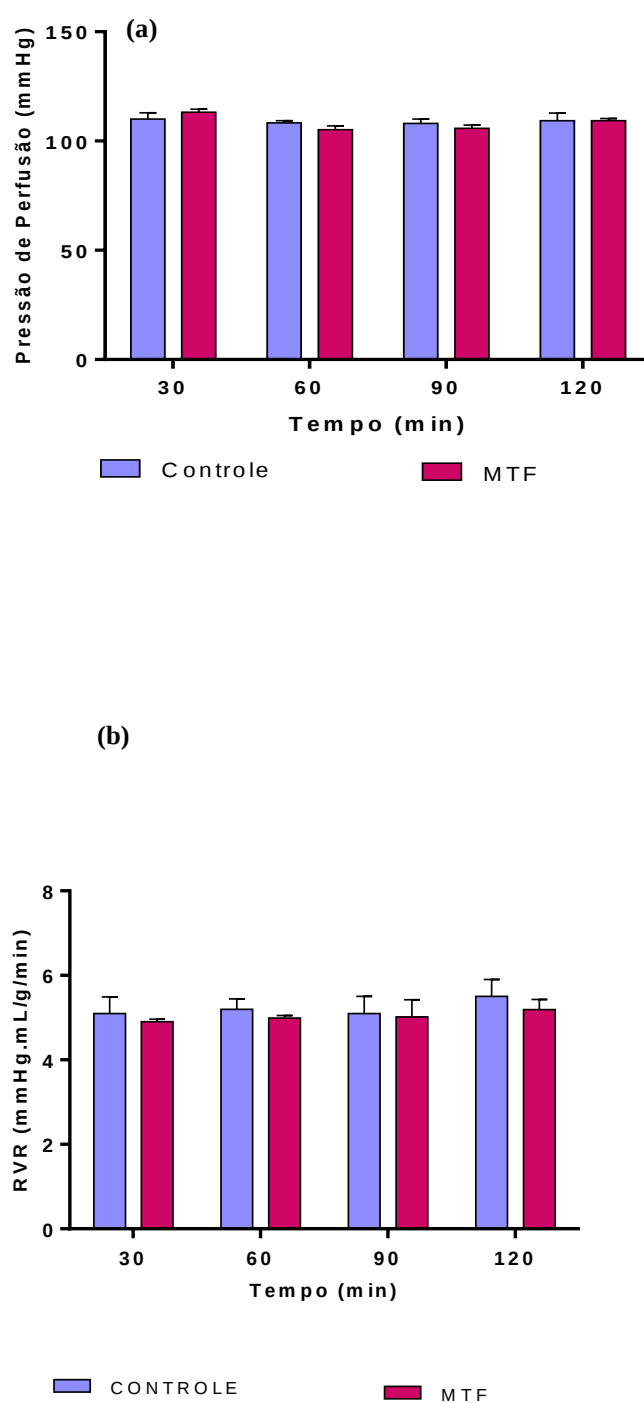


Figura 24. Pressão de Perfusão (PP; a) e Resistência Vascular Renal (RVR; b) nos grupos controle e tratado com Metilfenidato (MFD). Os resultados foram expressos em média e erro padrão da média (E.P.M). * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (teste t de Student).

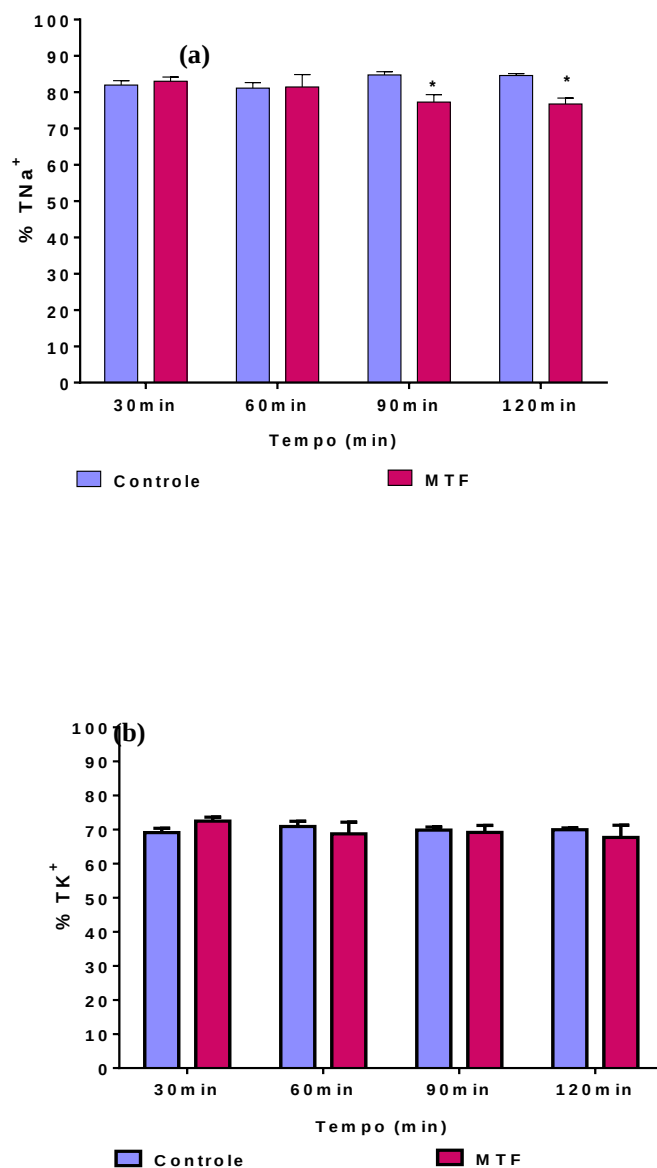


Figura 25. Percentual de Transporte Tubular de Sódio (%TNa⁺) e Percentual de Transporte Tubular de Potássio (%TK⁺) nos grupos controle e tratado com Metilfenidato (MTF). Os resultados foram expressos em média e erro padrão da média (E.P.M). *p<0,05 em relação ao grupo controle (teste t de Student).

5.8. Avaliação da função renal “in vivo”

5.8.1. Análise Bioquímica

Não foram observadas alterações nos parâmetros de função renal nas 24 e 48 horas após o tratamento com MFD na concentração de 10mg. Os níveis de uréia e creatinina se mantiveram dentro dos valores normais em amostras de urina e plasma. O clearance de creatinina foi calculado para estimar a taxa de filtração glomerular e também se mostrou estável quando comparado com o grupo controle que recebeu somente salina. A percentual de excreção de sódio e potássio foi calculado para avaliar a capacidade funcional tubular e não houve alterações nesses parâmetros quando comparado com o controle (**Tabela 6.**).

Tabela 6. Efeitos do MFD (10mg) sobre a função renal dos animais após 24h e 48h

Grupos	Uréia	Creatinina	Cl Creatinina	(%) Excreção Na⁺	(%) Excreção K⁺
24h	(U)	(Cr)	(ClCr)	(ENa+)	(EK+)
	Mean±SD	Mean±SD	Mean±SD	Mean±SD	Mean±SD
CT	39,25±2,1	0,65±0,05	0,76±0,15	0,42±0,40	1,72±0,20
10mg	37,88±4,6	0,60±0,08	0,97±0,12	0,40±0,09	1,30±0,25

Grupos	Uréia	Creatinina	Cl Creatinina	(%) Excreção Na⁺	(%) Excreção K⁺
48h	(U)	(Cr)	(ClCr)	(ENa+)	(EK+)
CT	37,5±1,1	0,7±0,06	0,72±0,05	0,44±0,12	1,55±0,24
10mg	35,8±3,9	0,62±0,1	0,92±0,23	0,37±0,06	1,41±0,31

U: Uréia (mg/dL); Cr: Creatinina (mg/dL); Cl Cr: Clearance de Creatinina (mg/min); ENa⁺: Percentual de Excreção de Sódio (%); EK⁺: Percentual de Excreção de Potássio (%); CT: Controle

5.8.2. Análise histológica dos rins tratados com MFD

Na análise histológica dos rins tratados com o Metilfenidato na concentração de 10mg/kg, não foram observadas alterações nas estruturas renais, apresentando glomérulos, túbulos, vasos e interstícios normais (**Figura 26.**).

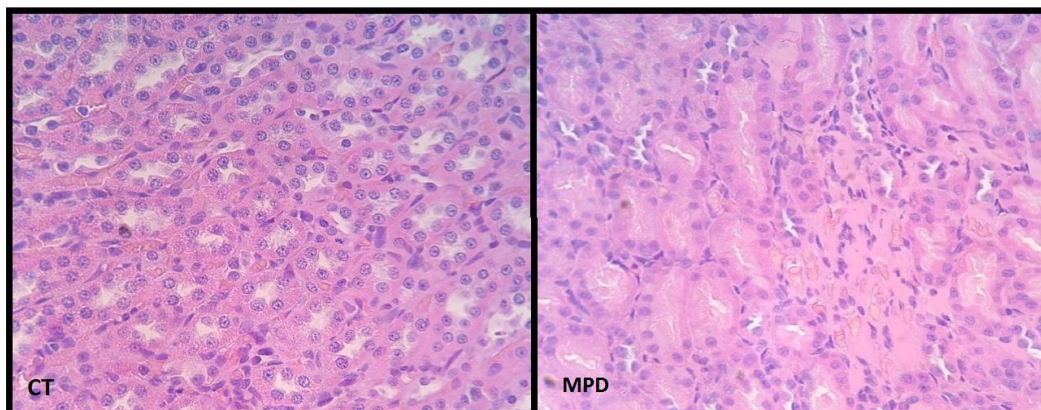


Figura 26. Fotomicrografia dos animais 24 horas após a administração com Metilfenidato (hematoxilina-eosina). Aumento 400X. CT=Controle; MPD= 10mg/kg MFD.

5.9. Efeitos do MFD em células tubulares renais MDCK

5.9.1. Ensaio de Viabilidade Celular

5.9.1.1. Ensaio de Redução do MTT

O efeito do MFD nas células tubulares renais foi avaliado através de culturas de células MDCK (Madin-Darby Canine Kidney). A viabilidade das culturas tratadas ($1,0 \times 10^5$ / poço) com o MFD foi analisada pelo método MTT após 24h de incubação. O Metilfenidato não causou redução na viabilidade das células epiteliais renais do túbulo distal (**Figura 27**).

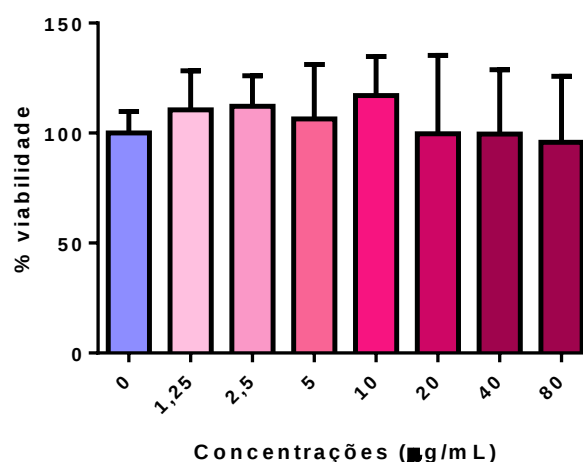


Figura 27. Efeito do Metilfenidato em diferentes concentrações (1000; 500; 250; 100; 50; 5 ug/mL) sobre células MDCK pelo método do MTT. Dados expressos como média E.P.M e analisado por ANOVA, com pós-teste Bonferroni ($p < 0,05$).

5.9.1.2. Ensaio de Liberação da enzima Lactato Desidrogenase (LDH)

A integridade de membrana celular no processo de morte foi avaliada pelo método de determinação da liberação da enzima Lactato Desidrogenase (LDH) em culturas de células tubulares renais (MDCK) tratadas com Metilfenidato em diferentes concentrações (1000; 500; 250; 100; 50; 5 ug/mL) por 24 horas. Nesse experimento foi observada liberação da enzima LDH nas concentrações mais altas quando comparadas com o grupo controle (**Figura 28.**).

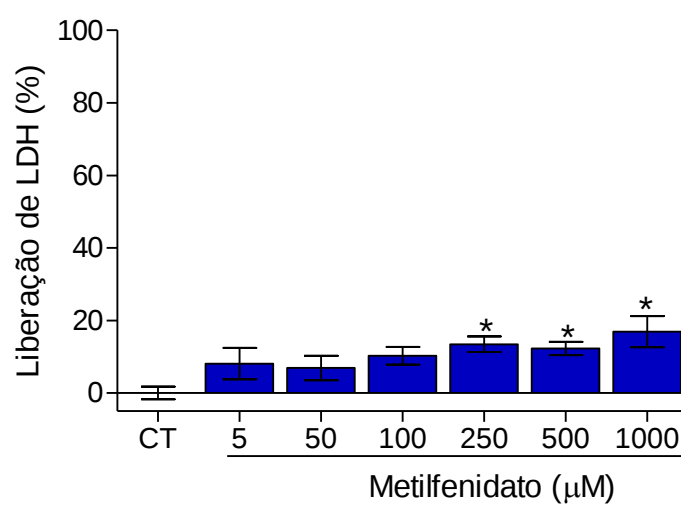


Figura 28. Porcentagem de liberação da enzima Lactato Desidrogenase de células MDCK induzida pelo Metilfenidato (1000; 500; 250; 100; 50; 5 ug/mL). Dados expressos como média $\pm$ E.P.M e por ANOVA, com pós-teste Bonferroni ($p < 0,05$).

6. DISCUSSÃO

Os efeitos do metilfenidato no SNC foram estudados utilizando-se vários modelos de comportamento animal, tais como o labirinto em cruz elevado (LCE), campo aberto, Rota *rod*, nado forçado e convulsão induzida por pilocarpina. Estes testes são modelos clássicos para *screening* de atividades no sistema nervoso central, fornecendo informações sobre desempenho psicomotor, ansiolítico, antidepressivo, atividade miorrelaxante e anticonvulsivante (LINHARES, 2012).

O labirinto em cruz elevado (*“elevated plus-maze”*) é provavelmente o modelo animal de ansiedade mais empregado atualmente (PELLOW et al., 1985; CAROBREZ e BERTOGLIO, 2005). O comportamento exibido pelo animal durante o teste tem sido atribuído a aversão natural dos animais (ratos ou camundongos) a espaços abertos, representada pela esquiva dos braços abertos. Drogas ansiolíticas aumentam a exploração destas áreas sem alterarem a atividade motora dos animais (LISTER, 1987; CAROBREZ e BERTOGLIO, 2005). Já as drogas ansiogênicas diminuem o número de entradas e o tempo de permanência nos braços fechados do labirinto (PELLOW et al.1985).

Neste estudo, o diazepam na dose de 1mg/Kg foi utilizado como padrão positivo, produzindo significativo aumento em todos os parâmetros analisados. Estes parâmetros foram o número de entradas nos braços abertos (NEBA), percentual do número de entradas nos braços abertos (PEBA), tempo de permanência nos braços abertos (TPBA) e percentual do tempo de permanência nos braços abertos (PTBA). Isto indica, conforme esperado, que o diazepam provocou um comportamento ansiolítico nos animais, pois diminuiu o medo natural a espaços desprotegidos e elevados.

O metilfenidato foi administrado por via oral nas doses de 2,5; 5; 10 e 20 mg/Kg em animais adultos. Foi observado que apenas na dose de 20mg/Kg, assim como o diazepam,

aumentou significativamente os parâmetros analisados. Esses dados são similares aos encontrados em outros estudos, no qual diazepam e outros benzodiazepínicos produzem um robusto efeito ansiolítico em vários outros modelos animais de ansiedade, sugerindo um efeito ansiolítico similar ao diazepam (RABBANI; SAJJADI e MOHAMMADI, 2008).

Corroborando com os nossos achados, alguns autores realizaram estudo com ratos jovens expostos ao MFD, utilizando o teste de labirinto em cruz elevado e verificaram que os animais passaram mais tempo além dos trilhos sobre os braços abertos, e apresentaram comportamentos de avaliação de risco alterados sugerindo um efeito ansiolítico do MFD (ZHU; WEEDON; DOW-EDWARDS, 2010).

Pesquisa revelou que camundongos jovens tratados com metilfenidato nas doses de 10 e 20mg/Kg conseguiram ficar mais tempo nos braços abertos do labirinto, apresentando comportamento ansiolítico (LINHARES, 2012).

Pesquisa revelou que administrações orais de MFD (3mg/kg) atuaram como uma droga ansiolítica, facilitando o movimento dos animais sobre os braços abertos e elevados do labirinto radial quando comparados com os controles, que não foram explorar o labirinto. Tais achados relacionam-se aos dados humanos, demonstrando que MFD reduz a ansiedade em pacientes com TDAH (BOUFFARD et al., 2003).

Um estudo anterior mostrou um melhor desempenho em ratos jovens tratados com MFD no braço labirinto radial (ZHU et al., 2007).

Em contrapartida, outros estudiosos apresentam resultados distintos dos nossos achados, apontando que camundongos lesados por etanol no período de neurodesenvolvimento apresentaram um comportamento ansioso, permanecendo menos tempo nos braços abertos quando comparados aos controles. O metilfenidato não conseguiu reverter esse efeito, ou seja, apresentar propriedades ansiolíticas (RIBEIRO, 2008).

Ueno et al., (2002) mostraram que o metilfenidato não reverteu o comportamento ansioso de modelo animal de déficit de atenção no teste do Plus-Maze. Outros estudos associam ainda o uso crônico do metilfenidato com a resposta aumentada ao estresse, níveis plasmáticos elevados de corticosterona, além de efeitos depressivos na idade adulta (CARLEZON et al., 2003).

Estudos demonstraram que o MFD (3 mg / kg) administrado via oral, aumentou a atividade locomotora, em ratos jovens, levando os animais a explorarem o labirinto radial do braço, enquanto os animais do grupo controle pouco exploraram os braços (ZHU; WEEDON; DOW-EDWARDS, 2010).

Já os estudos conduzidos por Britton e Bethancourt (2009), avaliaram os efeitos em longo prazo em animais expostos cronicamente ao MFD, indicando que o tratamento prolongado, em doses terapêuticas, tem pouco ou nenhum efeito duradouro sobre a ansiedade, ou seja, um período mais prolongado de exposição produziu menos ansiedade em relação ao período de exposição mais curto do fármaco, o que pode sugerir que é importante considerar o tempo de exposição de drogas em estudos pré-clínicos que visam investigar os efeitos da exposição MFH em populações de TDAH.

Apesar das dificuldades inerentes à extrapolação para a condição humana, estes resultados sublinham a importância do diagnóstico correto do TDAH antes de iniciar o tratamento com um estimulante. Sendo assim, é necessária uma avaliação mais aprofundada das potenciais adaptações neurobiológicas induzidas por experiências no início da vida que podem contribuir para a fisiopatologia dos transtornos neuropsiquiátricos em longo prazo.

Muitos modelos animais de ansiedade têm sido desenvolvidos com base na sua sensibilidade aos benzodiazepínicos. No entanto, altas doses podem induzir sedação, causar uma significativa redução dos parâmetros observados (CRAWLEY, 1981) e resultar em falso-positivo/negativo nos modelos de ansiedade. Portanto, para verificar a relação do efeito

ansiolítico do MFD com alteração da atividade locomotora foi realizado o teste campo aberto (TREIT; FUNDYTUS, 1989).

O campo aberto (*“open-field”*) é uma metodologia que possibilita avaliar a “emocionalidade” do animal, pois sabe-se que a ambulação e o comportamento de levantar sejam atividades ligadas, principalmente, a uma boa coordenação motora, enquanto que o comportamento de *“grooming”* e *“rearing”* estejam associados muito mais ao estado emocional do animal (ARCHER, 1973).

O teste do campo aberto é empregado para avaliar a atividade exploratória dos animais. A tendência natural do animal em um ambiente novo é a de explorá-lo, apesar do estresse e do conflito provocado por este ambiente (MONTGOMERY, 1958).

Os roedores parecem preferir a periferia ao centro do campo aberto, normalmente ambulados em contato com as paredes, ou seja, apresentam tigmotaxia. Portanto, assim como no labirinto em cruz elevado, a tigmotaxia estaria relacionada com a ansiedade no campo aberto (CAROLA et al., 2002; PRUT; BELZUNG, 2003). O comportamento dos roedores é determinado pelo conflito entre explorar áreas/objetos desconhecidos e o instinto de evitar perigos potenciais.

A ansiedade inibe o comportamento exploratório (atividade locomotora, rearing, climbing, e manipulação de objetos) do animal (BARNETT, 1975). Um aumento ou diminuição deste comportamento pode ser indiretamente uma medida do nível de ansiedade (CRAWLEY; GOODWIN, 1980; PELLOW et al., 1985).

Desta forma, a locomoção, rearing e grooming em roedores, observados no campo aberto, são os parâmetros comportamentais mais usados para descrever influências dos eventos da vida ou da administração de drogas (MONTGOMERY, 1958; ARAKAWA; IKEDA, 1991; REX et al., 1996).

O modelo de campo aberto possibilita discutir a especificidade do efeito de uma droga, caso ela seja estimulante, sedativa, ansiolítica ou ansiogênica (LISTER, 1987). Alguns estudos demonstraram que a redução na atividade locomotora espontânea dá uma indicação do nível de excitabilidade do sistema nervoso central (MANSUR; MARTZ; CARLINI, 1971) e esta redução pode estar relacionada com a sedação resultante da depressão do sistema nervoso central (OZTURK et al., 1996; PEREZ et al., 1998).

Neste estudo, o metilfenidato aumentou a atividade locomotora dos animais adultos apenas nas doses mais elevadas, 10 e 20 mg/Kg. Esse resultado talvez encontre respaldo nos estudos de Fredriksson e Archer, 2004, que avaliaram o mesmo modelo utilizado neste estudo e observaram que uma possibilidade é de que os animais adultos, por já serem adultos, teriam menos hiperatividade do que os animais jovens e, portanto, menor rendimento na exploração dos ambientes no campo aberto.

Outros estudos mostram que o MFD muitas vezes aumenta a atividade locomotora em animais jovens. É possível que o MFD suprima a atividade locomotora quando o ambiente promove a atividade e aumente a atividade locomotora em ratos nos aparatos simples. Da mesma forma, a anfetamina reduz a hiperatividade ao mesmo tempo que aumenta a atividade locomotora em campo aberto (YANG et al., 2003; YANG et al., 2006).

Alguns estudos reforçam essa redução da atividade locomotora com a utilização do MFD. Experimentos realizados com animais tratados com MFH reduziu a hiperatividade de camundongos tanto no campo aberto como no nado forçado (HUANG et al., 2012).

Claussen, Chong e Dafny (2012), utilizando a metodologia do campo aberto em seus experimentos, verificaram que o metilfenidato não obteve efeito sobre a atividade locomotora quando comparado ao controle.

Alguns autores verificaram que ratos espontaneamente hipertensos (SHR), tratados com metilfenidato, apresentaram locomoção horizontal reduzida num teste de campo aberto

em relação ao grupo controle, embora tenha diminuído a hiperatividade. Estes resultados sugerem que o MFD tenha potencial para amenizar anormalidade motora no modelo SHR (UMEHARA et al., 2013).

Já o diazepam, na dose de 2mg/Kg, diminuiu a atividade locomotora indicando efeito sedativo comum aos benzodiazepínicos. Isso mostra que a atividade ansiolítica do metilfenidato não está relacionada com a atividade motora.

Considerando que a ansiedade pode reduzir a atividade exploratória (PRUT, 2003), propomos que o MFD, nesse estudo, parece gerar um efeito ansiolítico e desinibitório.

Em nosso estudo não houve alteração no número de *rearing* nem no número de *grooming* nos animais tratados com MFD no campo aberto. O diazepam, na dose de 2 mg/kg, diminuiu o *rearing* e o *grooming*. Tal efeito já era esperado, já que alguns trabalhos relatam que a diminuição no *rearing* sugere uma atividade sedativa (CHINDO et al., 2012), bem como drogas ansiolíticas reduzem também as atividades de *grooming* no campo aberto (KALUEFF et al., 2004).

Animais tratados com MFD, nos estudos de Bolaños et al (2003), Britton et al., (2007) e Carlezon et al., (2003) mostraram-se mais vulneráveis a situações adversas, gastando significativamente mais tempo envolvido em self-grooming, uma resposta comportamental conhecida a situações de ansiedade.

A atividade de *rearing* parece estar relacionada com a hiperatividade dopaminérgica. Estudos apontam que o aumento da atividade dopaminérgica induz um maior comportamento de *rearing* (SWANSON et al., 1998). Em alguns estudos o *rearing* tem sido focalizado como um aspecto de comportamento exploratório (JOHANSSON; AHLENIUS, 1989), embora alguns autores sugiram que drogas ansiolíticas diminuam o número de *rearing* (HUGHES, 1972; STOUT; WEISS, 1994).

Quase todos os animais gastam uma significativa parte do tempo no comportamento de grooming. Embora vários transmissores possam modular a expressão deste comportamento (MOODY; MERALI; CRAWLEY, 1993), a dopamina está particularmente envolvida (DRAGO et al., 2000).

A literatura refere que o aumento de grooming é observado em roedores apreensivos (ARCHER, 1973), e em um grande número de estudos, pesquisadores observaram que drogas ansiolíticas reduzem o grooming no campo aberto (BARROS et al., 1994; DUNN et al., 1981).

Em seguida avaliamos os efeitos do MFD na coordenação motora, considerando que drogas como o diazepam apresentam efeito ansiolítico e em doses mais altas, alteram a coordenação motora. Essa sequência se deu a partir dos dados obtidos com o LCE, em que os efeitos do metilfenidato demonstraram atividade ansiolítica similar ao diazepam, nas doses mais altas (LINHARES, 2012).

O teste do rota *rod* é usado para medir o desempenho da coordenação motora nos animais (SEDELIS; SCHWARTING; HUSTON, 2001), ou seja, é um modelo que serve para detectar déficits neurológicos em ratos e camundongos (DUNHAM; MIYA, 1957). A coordenação motora é um comportamento complexo e pode refletir equilíbrio, força muscular e alterações na deambulação. Dificuldades na performance motora podem prejudicar a realização de testes comportamentais.

Nesse caso, quanto mais intenso for o efeito, menor será o tempo em que o animal consegue se equilibrar sobre a barra. Ressalta-se, no entanto, que se trata de um método não-específico, uma vez que mede indistintamente, efeitos neurológicos, estimulantes e depressores sobre a coordenação motora, aos quais também é atribuído o termo neurotoxicidade (DALLMEIER; CARLINI, 1981).

Quando um roedor é colocado repetidamente em um cilindro em rotação constante, o animal rapidamente se adapta à rotação. Entretanto, após a administração de um depressor do SNC, o animal facilmente cai da haste giratória. Com a finalidade de avaliar uma possível atividade miorrelaxante do metilfenidato, foi utilizado o teste do rota *rod*, um modelo animal clássico usado para determinar o efeito de drogas na coordenação motora de roedores (BOHLEN et al., 2009).

Nossos achados sugerem que o Metilfenidato, em todas as doses utilizadas (2,5; 5; 10 e 20 mg/Kg), não alterou a coordenação motora de forma significativa no teste do rota *rod*, diferentemente do diazepam 2mg/Kg que aumentou o número de quedas e diminuiu o tempo de permanência na barra por ser uma droga ansiolítica e apresentar um efeito relaxante muscular. Esses resultados sugerem que o metilfenidato, provavelmente, pode não apresentar bloqueio neuromuscular periférico, mas seus efeitos devem envolver neurônios que controlam a atividade depressora central (ADZU et al., 2002; AMOS et al., 2001).

Em contrapartida, vários autores sugerem em seus estudos, aumento da atividade locomotora em animais pré-tratados com MFD (KLEBAUR et al., 2001; BEVINS; PETERSON, 2004; YANG et al., 2006).

Zhu, Weedon e Dow-Edwards (2010) sugerem que o MFD, além de aumentar a atividade locomotora, sugere melhora do desempenho em testes cognitivos, como diminuição da ansiedade, maior atividade locomotora e melhoria na atenção.

Alguns estudos demonstraram que a redução na atividade locomotora dá uma indicação do nível de excitabilidade do sistema nervoso central (MANSUR, MARTZ e CARLINI, 1971) e, esta redução pode estar relacionada com a sedação resultante da depressão do sistema nervoso central (OZTURK et al., 1996; PEREZ et al., 1998).

Adiante, investigamos o possível efeito antidepressivo do MFD no Teste do Nado Forçado (TNF). Tal modelo animal em questão é amplamente utilizado para screening de

fármacos com efeito antidepressivo (BASSO et al., 2009; FRANKOWSKA et al., 2007), e apresenta facilidade de uso, confiabilidade, especificidade e sensibilidade à administração aguda de antidepressivos (CRYAN et al., 2002; HENNINGSEN et al., 2009).

Nesse modelo, os animais são expostos a situações estressantes e inescapáveis que geram um comportamento inicial de luta/fuga. Esse comportamento tende a diminuir ao longo do experimento, sendo alternado com períodos de imobilidade. Considera-se que esta imobilidade está relacionada a um comportamento de desespero e depressão mental. Portanto, a diminuição significativa do tempo de imobilidade de um grupo padrão-positivo ou teste em relação ao grupo controle, sugere uma resposta antidepressiva (STERU et al.1985).

Estudos têm demonstrado que a exposição a eventos estressantes aumenta a vulnerabilidade a depressão. Aparentemente, a exposição ao estresse tem por consequência um efeito neurotóxico sobre o hipocampo, provavelmente mediado pelo aumento de glicocorticóides, que predispõe ao desenvolvimento da depressão (HENNINGSEN et al., 2009).

Nesse estudo observou-se que o MFD diminuiu o tempo de imobilidade de forma significativa apenas na dose de 20 mg/Kg. Os resultados também mostraram que a imipramina (inibidor de recaptação de noradrenalina e serotonina) usada como padrão positivo nos testes no nado forçado, também diminuiu o tempo de imobilidade dos animais, corroborando com os estudos que mostraram a sensibilidade deste teste às várias doses de drogas antidepressivas (KULKARNI et al., 2008). Os resultados deste estudo forneceram evidências de que o MFD apresentou um efeito antidepressivo, uma vez que houve uma diminuição no tempo de imobilidade no teste do nado forçado.

Estudos apontam que a exposição ao MFD diminui a latência para a imobilidade, um efeito oposto ao observado após tratamentos com antidepressivos (BOLÃÑOS et al., 2003; CARLEZON et al., 2003; BRITTON et al., 2007).

Estudo mostra que roedores expostos ao MFD no período pré-puberal apresentam aumento do comportamento depressivo e vulnerabilidade aumentada a ambientes estressantes, bem como reatividade diminuída a recompensas naturais (CARLEZAN et al., 2003).

Outros autores apontam que animais tratados com MFD apresentam um menos tempo de latência para atingir a imobilidade, que foi revertido pelo antidepressivo fluoxetina (BOLÃNOS et al., 2008).

Alguns autores comparam a imobilidade a um estado de desesperança, onde o animal não tem mais porque lutar/nadar (mobilidade) para escapar do estresse. A conseqüente imobilidade neste modelo é diminuída pelo uso de várias drogas antidepressivas (MACHADO-VIEIRA; KAPCZINSKI; SOARES, 2004).

Enquanto o teste de natação forçada é um modelo animal válido e confiável, os resultados podem ser variáveis (REED et al., 2008; IÑIGUEZ et al., 2010). A administração de MFD e a associação de MFD + Fluoxetina em animais adultos apresentaram maior susceptibilidade ao estresse no nado forçado, enquanto os ratos pré-tratados apenas com fluoxetina mostraram diminuição da vulnerabilidade. Juntas, essas evidências fornecem suporte de que a exposição precoce a MFD induz vulnerabilidade permanente de estresse (LAGACE et al., 2006; HALLADAY et al., 2009; WILEY et al., 2009), enquanto que a exposição à fluoxetina é ansiogênico e induz fenótipo de estresse comportamental na idade adulta (KARPOVA et al., 2009; IÑIGUEZ et al., 2010).

Para corroborar os resultados dos experimentos comportamentais, determinamos as concentrações da Noradrenalina (NA), Dopamina (DA) e Serotonina (5HT) após tratamento agudo com MFD, nos níveis extracelulares de monoaminas no hipocampo e corpo estriado de camundongos adultos.

Neste estudo, o MFD aumentou os níveis de DA e NA, reduzindo a concentração de 5HT apenas nas doses maiores, ou seja, de 10 e 20 mg/Kg, sugerindo que o MFD age como

um ansiolítico, visto através do modelo comportamental de ansiedade. Tais testes foram realizados no corpo estriado dos animais.

O corpo estriado ajuda a iniciar e a controlar ações corticais que incluem os movimentos voluntários, o comportamento e, em parte a cognição. Em modelos animais, a elevação da DA no corpo estriado promove aumento da área locomotora percorrida no campo aberto (CORREIA et al., 2009). Neste estudo, os animais tratados com MFD apresentaram aumento na atividade locomotora percorrida no campo aberto nas doses de 10 e 20mg/Kg nos animais adultos.

Estudos realizados em humanos sugerem que o bloqueio dos transportadores de dopamina seja responsável pelo efeito terapêutico do metilfenidato (VOLKOW et al., 2002). Adicionalmente, é sugerido que o metilfenidato apresente especificidade regional, bloqueando preferencialmente a recaptação de dopamina no córtex pré-frontal, em regiões límbicas e no estriado (LEONARD et al., 2004).

Em geral, a habilidade dos psicoestimulantes em aumentar a neurotransmissão dopaminérgica exerce papel crucial nos efeitos comportamentais dessas drogas, embora outros neurotransmissores como a noradrenalina e a serotonina possam contribuir para o efeito estimulante desses compostos (KUZENSKI et al., 1995).

Em roedores, foi demonstrado que o metilfenidato aumenta a concentração extracelular de dopamina no estriado e de noradrenalina no hipocampo, mas apresenta uma ação fraca ou ausente sobre a serotonina (KUZENSKI; SEGAL, 1997).

Van der Kooij e Glennon (2007) descreveram e compararam 14 modelos animais de TDAH, demonstrando algum tipo de disfunção em relação à Dopamina. Genro et al. (2010) mostraram em uma revisão, evidências de modelos animais, farmacologia, neuroimagens e estudos genéticos que apóiam a idéia de que o transtorno de déficit de atenção/hiperatividade é uma doença do sistema dopaminérgico.

Acredita-se que as monoaminas estejam envolvidas na patogenia de muitas doenças mentais. Sabe-se da participação da dopamina na psicose, pois muitos fármacos antipsicóticos bloqueiam receptores dopaminérgicos (SEEMAN, 1987).

Para explicar a patogenia da depressão surgiu a hipótese das monoaminas, que afirma que a depressão é causada por um déficit funcional das monoaminas transmissoras em certos locais no cérebro, enquanto a mania resulta de um excesso funcional (MANJI; DREVETS; CHARNEY, 2001).

Esta hipótese surgiu originalmente das associações entre os efeitos clínicos de vários fármacos que causam ou aliviam os sintomas da depressão e seus efeitos neuroquímicos conhecidos sobre a transmissão monoaminérgica no cérebro. Apesar da teoria das monoaminas, foi sugerido que o neurotransmissor dopamina também participa na depressão (BROWN, 1993; KAPUR e MANN, 1992). A dopamina está implicada na regulação do humor (DAILLY et al., 2004) e foi mostrado que, em modelos animais de depressão, os níveis de dopamina extracelular no cérebro estavam diminuídos (ROSSETTI et al., 1993). Além disso, tem sido considerado que a dopamina está envolvida com os efeitos antidepressivos de drogas (JOCA et al., 2003).

A principal objeção da hipótese dopaminérgica da depressão é que clinicamente os antidepressivos efetivos inibem a recaptação da serotonina ou noradrenalina, mas não dopamina. Existe uma aparente contradição no mecanismo de ação desses antidepressivos, pois apesar do bloqueio da recaptação de serotonina e noradrenalina ocorrerem imediatamente após o tratamento agudo, o efeito clínico dos antidepressivos acontece apenas após duas ou quatro semanas de tratamento. Essa afirmativa pode fortalecer a hipótese dopaminérgica, pois estudos mostram que o tratamento crônico com todos os inibidores da recaptação de serotonina e noradrenalina potencializam a transmissão dopaminérgica no núcleo accumbens (TAYLOR, 2005; TEIXEIRA et al., 2013).

Em animais, não há condição conhecida que corresponda à condição inata da depressão em seres humanos, mas vários procedimentos foram descritos, que produzem em animais estados comportamentais (retirada da interação social, perda de apetite, atividade motora reduzida, estresse, situações inescapáveis, entre outros), típicos da depressão humana (PORSOLT et al., 1987).

A noradrenalina é um transmissor da via inibitória do locus ceruleus para o corno dorsal e possivelmente também em outras vias antinociceptivas. A teoria das monoaminas sugere que a depressão resulta da deficiência funcional da transmissão dessa monoamina, relacionando especificamente com os receptores adrenérgicos do tipo $\alpha 1$ (HIRANO et al., 2007).

Muitos pesquisadores estudaram os efeitos do metilfenidato em receptores dopaminérgicos e no transportador de dopamina, mas pouco se comenta sobre sua ação em receptores adrenérgicos $\alpha 2$ e no transportador de noradrenalina (NAT). Estudos bioquímicos mais recentes utilizando baixas doses de metilfenidato demonstraram um efeito mais potente de concentração de noradrenalina no hipocampo do que propriamente na dopamina estriatal (ARNSTEN; DUDLEY, 2005).

Assim, ao analisarmos a concentração de DA e NA no corpo estriado dos animais tratados com MFD observamos que, de maneira geral, o MFD alterou, levando a um aumento das concentrações dessas monoaminas. Esses resultados confirmam a atividade antidepressiva do MFD, determinada após a análise dos modelos animais comportamentais de depressão. Além disso, estudos mostram que a liberação de NA estava marcadamente reduzida em pacientes depressivos (LAMBERT et al., 2000), evidenciando o poder antidepressivo do MFD.

Já a 5-HT está envolvida em muitos distúrbios neuróticos, incluindo ansiedade, distúrbios do pânico (FRAZER; HENSLER, 1999). Os neurônios serotoninérgicos e receptores

são alvos para uma ampla variedade de drogas, como antidepressivos, ansiolíticos, antipsicóticos, envolvidas no tratamento de náusea e vômitos e depressão e, por fim, vários estudos experimentais e clínicos indicaram que o sistema noradrenérgico está envolvido na fisiopatologia da depressão (NUTT, 2006).

A falta destes neurotransmissores no cérebro ou anormalidades em seu metabolismo tem sido relacionada com a atenção, sono, memória, aprendizagem, ansiedade, depressão, agressividade, comportamento compulsivo, problemas afetivos, dentre outros (SILVA et al, 2010).

A administração de cocaína, outra substância com mecanismo de ação semelhante ao metilfenidato, também age inibindo os transportadores dos neurotransmissores monoaminérgicos NA e 5-HT, que estão relacionados com o estado motivacional e resposta (PULCHERIO et al., 2010).

Para a investigação dos aspectos relacionados à convulsão foi utilizado o modelo experimental da Pilocarpina. Tal modelo, nas décadas de 80 e 90, foi extensamente utilizado o por replicar características fenomenológicas das epilepsias humanas do lobo temporal (TURSKI et al., 1983; 1989). A administração local ou sistêmica desse composto resulta em um padrão de crise límbica duradoura bastante característica (status epilepticus), que após um período conhecido como silencioso (de 3 a 14 dias), leva o animal a apresentar crises espontâneas e recorrentes (TURSKI et al., 1983).

Neste estudo, as convulsões dos animais pré-tratados com MFD foram potencializadas, sendo observados efeitos não só na redução do tempo para o início do aparecimento da primeira convulsão, mas também na redução do tempo para o início da morte dos animais após a administração de P400 quando comparados aos animais tratados apenas com P400.

A epilepsia é uma das mais comuns doenças neurológicas graves, afetando mais de 50 milhões de pessoas em todo o mundo. As convulsões são causadas por súbitas, excessivas e recorrentes descargas eléctricas a partir de células do cérebro (RODRIGUES et al, 2012). É um dos distúrbios neurológicos mais comuns, apresentando taxa de prevalência de 5% (DE LORENZO et al., 2001).

A ativação colinérgica é essencial para o início do processo convulsivo em modelos de epilepsia do lobo temporal, visto que estas convulsões podem ser bloqueadas pelo pré-tratamento com o antagonista muscarínico atropina (MARINHO et al., 1998; DE BRUIN et al., 1999). A pilocarpina exacerba a atividade colinérgica provavelmente por influência direta, aumentando a ação da ACh circulante, modificando o *binding* dos receptores muscarínicos (HRUSKA et al., 1984) e diminuindo a atividade acetilcolinesterásica (IMPERATO et al., 1998).

Convulsões induzidas por pilocarpina produzem disfunções diversas em muitas regiões do cérebro, como hipocampo, estriado, córtex frontal entre outros (FREITAS et al., 2005) como consequência da ruptura de conexões neuronais entre as regiões cerebrais. As mudanças comportamentais durante as convulsões em ratos têm sido amplamente relatadas (XAVIER et al., 2007; MILITÃO; FERREIRA; FREITAS, 2010).

As análises comportamentais para a latência de convulsão e sobrevivência sugerem que o MFD possui um mecanismo via colinérgica e parece não proteger contra convulsões em modelos colinérgicos (LINHARES et al., 2014).

Sabe-se que uma overdose de MFD pode levar a estimulação do sistema nervoso central ou do sistema simpaticomimético, causando manifestações graves, incluindo convulsões (KLEIN-SCHWARTZ, 2002).

O Physicians Desk Reference (PDR), manual que recomenda e orienta a prescrição de medicamentos disponíveis no mercado, amplamente utilizado por médicos norte-americanos e

revisto anualmente, adverte e recomenda cautela no uso do MFD em pessoas com epilepsia e, na presença de convulsões, sua prescrição deve ser suspensa, embora não haja nenhum estudo controlado para demonstrar efetivamente tal vulnerabilidade (TORRES et al., 2008; KONESKI; CASELLA, 2010).

Para melhor compreender o papel da transmissão colinérgica em convulsões e morte observadas com MFD, a atividade AChE cerebral dos animais foi determinada. Em nosso estudo, o pré-tratamento com MFD reduziu significativamente a atividade da AChE nas doses de 2,5 e 5mg/Kg quando comparado ao grupo controle apenas no corpo estriado, corroborando com os achados de Linhares et al., (2014). Em nosso estudo, não houve diferenças significativas no hipocampo de animais pré-tratados com MFD.

Embora o mecanismo das crises convulsivas induzidas por pilocarpina e estado de mal epiléptico (EME) não esteja completamente esclarecido, sabe-se que este depende da ativação muscarínica e também de alterações nas atividades da colina acetiltransferase (ChAT) e da enzima acetilcolinesterase (AChE) em hipocampo de ratos (FREITAS et al., 2010).

Estudos apontam que o mecanismo de convulsões causadas pelo metilfenidato pode envolver uma interação com o sistema gabaérgico e glutamatérgico, através de uma modulação no sistema colinérgico, com possível redução da atividade da enzima acetilcolinesterase, culminando com o aumento dos níveis de acetilcolina (LINHARES, 2012).

Acredita-se que a diminuição do metabolismo da acetilcolina, pela redução ou bloqueio da atividade da AChE, pode facilitar a instalação da atividade epiléptica, em virtude do aumento da concentração da acetilcolina endógena, que pode ativar diretamente o sistema colinérgico e, de forma direta ou indireta, induzir mudanças neuroquímicas em outros sistemas de neurotransmissão, dentre eles, glutamatérgico e GABAérgico, uma vez que estes

podem estar implicados no desenvolvimento das convulsões límbicas (IMPERATO et al., 1998).

Em relação aos ensaios de avaliação de da função renal, sabe-se que o MFD, na prática clínica, é uma substância bem tolerada utilizado no tratamento de TDAH. Embora as alterações do sistema urinário tenham sido relatados como efeitos adversos, há pouca evidência científica sobre o efeito da droga sobre as funções fisiológicas do sistema renal (MELGAÇO et al., 2010).

A insuficiência renal é um dos principais contribuintes para a alta taxa de morbidade e mortalidade associadas com o uso indiscriminado de medicamentos (MELGAÇO et al., 2010). Assim, é importante investigar os efeitos do MFD na função renal para garantir o uso seguro do fármaco.

Os rins recebem aproximadamente 25% de todo o débito cardíaco e são o principal órgão de excreção (JOHN; HERZENBERG, 2009). A filtração e a produção de urina dependem de diversos fatores. O mais importante é a auto-regulação do fluxo sanguíneo através dos glomérulos. Assim, se a função glomerular é prejudicada, o fluxo urinário será alterado (UTLEY, 1993).

Neste contexto, podem afetar várias condições de filtração glomerular. As alterações no fluxo sanguíneo renal afetam o coeficiente de filtração e a quantidade de urina produzida e o tônus vascular das arteríolas dos glomérulos afeta a pressão de filtração e também influencia o volume de urina produzida. Algumas drogas produzem constrição intensa das arteríolas, reduzindo a pressão glomerular, a filtração de plasma e, portanto, a formação de urina (UTLEY, 1993).

Em ensaio com o rim isolado, o MFD reduziu a taxa de filtração glomerular, o fluxo urinário e a percentagem de transporte tubular de sódio durante os experimentos de perfusão. A auto-regulação do fluxo sanguíneo através dos glomérulos e o saldo tubular dependem da

integridade dos mecanismos de reabsorção de sódio. Neste contexto, este efeito sobre o rim pode ser relacionado com a ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona, uma vez que a aldosterona, similar à ação do MFD, é capaz de reduzir a eliminação de sódio e causar vasoconstrição renal (UTLEY, 1993).

Além disso, as prostaglandinas, como a PGI₂, PGE₂ e PGD₂, também são fundamentais para manter um fluxo de sangue renal normal e taxa de filtração glomerular. Estas substâncias são capazes de causar vasodilatação e diminuição da resistência vascular, melhorar a perfusão renal, com a redistribuição de fluxo de sangue a partir do córtex para a região justamedulares (OATES et al., 1988).

A síntese das prostaglandinas pode ser alterada em algumas doenças renais ou condições que afetam a função renal, tais como a doença glomerular, insuficiência renal, hipercalemia, situações de depleção do volume plasmático, insuficiência cardíaca, cirrose e choque hipovolêmico. Em algumas destas circunstâncias, como situações extremas hipovolemia, o sistema renina-angiotensina-aldosterona também é estimulado, resultando em vasoconstrição e um aumento na reabsorção renal de sódio e água. O tônus vascular aumenta como resultado da estimulação do sistema simpático. Nesta condição, as prostaglandinas podem proporcionar uma vasodilatação compensatória, para garantir a perfusão adequada e prevenir a perda da filtração glomerular e da função renal (VONKEMAN; VAN DE LAAR, 2010).

Em nosso estudo, o MFD pode ter interferido com o efeito vasodilatador de prostaglandinas, uma vez que reduziu o fluxo urinário e taxa de filtração glomerular. Este efeito pode causar vasoconstrição renal e, após tratamento em longo prazo, provocar lesão renal. Além disso, uma redução nos parâmetros acima referidos podem também sugerir alterações dos efeitos da vasopressina, através da inibição da síntese de prostaglandina renal

ou a redução da capacidade renal de diluição da urina, levando a hiponatremia (ROSNER; KIRVEN, 2007).

Não foram encontrados estudos em que a doença renal esteja associada com o uso de MFD. No entanto, distúrbios eletrolíticos, insuficiência renal e danos às células tubulares são frequentemente associados com os efeitos nefrotóxicos de alguns medicamentos, especialmente a sua ação inibitória sobre a síntese de prostaglandinas (MELGAÇO et al., 2010; JOHN; HERZENBERG, 2009; EJAZ et al., 2004). Resultados semelhantes ao nosso estudo foram encontrados para o analgésico parenteral “ketorolac”, o que reduziu a taxa de filtração glomerular em alguns pacientes, tinha potencial nefrotóxico e aumentou o risco de insuficiência renal (ROSE; POST, 2010).

Apesar disso, a pressão de perfusão, a resistência vascular renal e a percentagem de transporte tubular de potássio não sofreram alterações significativas. Estudos sobre o antidepressivo sertralina não relataram mudança nos parâmetros renais após o tratamento dos animais, semelhante aos nossos resultados (EJAZ et al., 2004). Além disso, em nosso trabalho, a perfusão renal com solução de Krebs-Henseleit sozinho não afetou os parâmetros renais avaliados, o que corrobora estudos anteriores (EVANGELISTA et al., 2008; FONTELES et al., 2009).

Por outro lado, em experimentos in vivo, uréia, creatinina, clearance de creatinina, FENa⁺ e FEK⁺ não mostraram alterações significativas em relação aos outros parâmetros da função renal nos dois períodos de observação (24h e 48h). No entanto, os resultados foram apresentados, por não encontrarmos na literatura outros relatos de estudos em animais in vivo, mostrando dados da bioquímica renal com a administração do MFD.

No início de uma síndrome renal induzida por drogas, os níveis de uréia, creatinina e potássio são elevados. No entanto, em alguns casos, por exemplo, de agentes anti-inflamatórios, o aumento da creatinina no soro podem ser observados apenas após os

primeiros três a sete dias de utilização. Esta quantidade de tempo é requerida antes um fármaco atinja os seus níveis máximos e, por conseguinte, um máximo de inibição da síntese das prostaglandinas (BRICKS; SILVA, 2005). Os nossos resultados demonstram que o MFD não alterou estes parâmetros bioquímicos renais no período de tempo do presente estudo. No entanto, a monitorização da função renal em longo prazo pode ser necessária para que as alterações sejam detectadas.

Quando o potencial de citotoxicidade de MFD para as células renais foi avaliado, o MFD não reduziu a viabilidade das células MDCK, sugerindo que o seu potencial efeito sobre os rins acontece a nível de túbulo distal.

Para avaliar a integridade de membrana no processo de morte celular foi realizado o teste de citotoxicidade *in vitro* pela medida da liberação *in vitro* da Lactato Desidrogenase (LDH). A liberação dessa enzima, normalmente localizada no citoplasma, é indicativa de ruptura da membrana celular.

A perda da integridade da membrana celular é caracterizada de necrose, que envolve vários eventos que culminam numa resposta inflamatória à lesão, como clivagem de componentes celulares, quimioatração de células apresentadoras de antígenos e liberação de material citoplasmático. A detecção da liberação desses componentes, como a enzima LDH, pode prover informações importantes sobre o mecanismo de lesão celular (MCHUGH; TURINA, 2006).

Além disso, a análise histopatológica dos rins, 24 horas após a administração MFD em animais, também mostrou que o MFD não apresenta citotoxicidade em células dos túbulos renais. Esta descoberta, juntamente com os resultados acima, reforça que o possível efeito nefrotóxico do MFD provavelmente não é mediado por alterações nos túbulos renais.

Este estudo amplia o conhecimento dos efeitos do MFD nos rins, no entanto, são necessários estudos futuros com esquema de administração crônica e períodos de seguimento

mais longos de análise, uma vez que algumas alterações na função renal e histologia podem aparecer apenas no final e cronicamente ao tratamento com esta droga. Então, a investigação dos efeitos do MFD em parâmetros renais em animais jovens parece ser uma direção para futuras pesquisas devido ao uso considerável de MFD em idades mais precoces do desenvolvimento humano.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

1. Nos experimentos do labirinto em cruz elevado, o metilfenidato os parâmetros analisados de forma significativa nas doses de 10 e 20mg, comprovando seu efeito ansiolítico;
2. Nos experimentos do campo aberto, o metilfenidato aumentou a atividade locomotora nas doses de 10 e 20mg e não alterou o *grooming* e *rearing*, sugerindo um efeito ansiolítico e desinibitório;
3. No teste do *rota rod*, a coordenação motora dos animais não foi alterada, mostrando que os efeitos desta substância não estão relacionados com o bloqueio neuromuscular periférico, mas sim, ocasionados centralmente;
4. No teste do nado forçado, o metilfenidato apresentou efeito antidepressivo, pois diminuiu o tempo de imobilidade dos animais, levando-nos a sugerir uma maior investigação nesse contexto, uma vez que o fármaco não é, tradicionalmente, usado como antidepressivo, na clínica;
5. Após a análise das monoaminas, verificou-se que o metilfenidato aumentou a concentração da Noradrenalina de forma significativa, corroborando com o efeito antidepressivo observado no modelo de nado forçado.
6. No teste da convulsão induzida por pilocarpina, o metilfenidato diminuiu as latências de convulsão e de morte, demonstrando apresentar uma atividade proconvulsivante.

7. O pré-tratamento com metilfenidato reduziu o nível de atividade da enzima AChE no corpo estriado, induzida por P400, mas não no hipocampo, sugerindo um possível mecanismo colinérgico como mecanismo alternativo para potencialização das convulsões induzidas por Pilocarpina;
8. Nos experimentos de perfusão de rim isolado, o metilfenidato reduziu o fluxo urinário e a taxa de filtração glomerular, reduzindo também a percentagem de transporte tubular de sódio;
9. Nos ensaios *in vitro*, o MFD não alterou a viabilidade de células MDCK. A capacidade do MFD não causar danos nestas células, sugere que o possível efeito adverso não compromete as estruturas renais distais;
10. Nos experimentos *in vivo*, o metilfenidato não alterou os parâmetros renais em 24h e 48h após a administração do MFD;

8. CONCLUSÃO

Embora o metilfenidato pareça ser uma opção segura para o tratamento do TDAH, ele deve ser usado com cautela, uma vez que ele demonstrou apresentar atividade proconvulsivante, bem como foram detectadas alterações nos parâmetros de função renal, sugerindo um possível efeito nefrotóxico do MFD, devendo ser investigado com maior profundidade, a fim de avaliar a intensidade desses efeitos e para minimizar os riscos, diante da utilização deste medicamento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIKOFF, H.; HECHTMAN, L.; KLEIN, R.G.; et al. Symptomatic improvement in children with ADHD treated with long-term methylphenidate and multimodal psychosocial treatment. *J.Am.Acad. Child.Adolesc.Psychiatry*. 43: 802-811, 2004.

ACHAT-MENDES, C.; ANDERSON, KL. ; ITZHAK, Y. Methylphenidate and MDMA adolescent exposure in mice: long-lasting consequences on cocaine-induced reward and psychomotor stimulation in adulthood. *Neuropharmacology*, 45,106–115, 2003.

ACCARDO, P.; BLONDIS, TA. What's all the fuss about Ritalin? *J. Pediatr*. 138, 6 - 9, 2001.

ADZU, B.; AMOS, S.; DZARMA, S.; MUAZZAM, I.; GAMANIEL, K.S. Pharmacological evidence favouring the folkloric use of *Diospyros mespiliformis* Hochst in the relief of pain and fever. *J. Ethnopharmacol.*, 82: 191-195, 2002.

ALBERT, KA.; HEMMINGS, HC.; ADAMO, AI.; POTKIN, SG.; AKBARIAN, S.; SANDMAN, CA.; COTMAN, CW.; BUNNEY, WE.; GREENGARD, P. Evidence for decreased DARPP-32 in the prefrontal cortex of patients with schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry* 59, 705–712, 2002.

ALDENKAM, A.P.; ARZIMANOGLU, A.; REIJS R.; VAN MIL S. Optimizing therapy of seizures in children and adolescents with ADHD. *Neurology*. 67 (4): 49-51, 2006.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, APA. *Diagnostical and statistical manual of mental disorders* (5ª ed.). Washington, DC, 2002.

AMOS, S.; ADZU, B.; BINDA, L.; WAMBEBE, C.; GAMANIEL, K. Neuropharmacological effect of the aqueous extract of *Sphaeranthus senegalensis* in mice. *J. Ethnopharmacol.*, v. 78, n. 1, p. 33-37, 2001.

ANDREAZZA, AC; FREY, BN.; VALVASSORI, S.S.; ZANOTTO, C.; GOMES, K M.; COMIM, C.M.; CASSINI, C.; STERTZ, L.; RIBEIRO, L.C.; QUEVEDO, J.; KAPCZINSKI, F.; BERK, M.; GONÇALVES, CA. DNA damage in rats after treatment with methylphenidate. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*. 31,1282–1288, 2007.

ARAKAWA, O.; IKEDA, T. Apomorphine effects on single and paired rat open-field behavior. *Physiol. Behav.*, v. 50, p. 189-194, 1991.

ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice. A review. *Anim. Behav.*, v. 21, p. 205-35, 1973.

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 Brain Functions*, v. 1, p. 2, 2005.

ARNSTEN, A.F.T.; LI, B. Neurobiology of executive functions: catecholamine influences on prefrontal cortical functions. *Biol. Psych.*, 57, 1377-1384, 2005.

ASKENASY, E.P.; TABER, K.H.; YANG, PB.; DAFNY, N.. Methylphenidate (Ritalin): behavioral studies in the rat. *Int. J. Neurosci.* 117, 757–794, 2007.

AURIEL, E.; HAUSDORFF, J.M.; GILADE, N. Methylphenidate for treatment of Parkinson disease and other neurological disorder. *Clin Neuropharmacol*, v.32, p.75-81, 2009.

BAHLMANN, J.; GIEBISCH, G.; OCHWADT, B. Micropuncture study of isolated perfused rat kidney. *Am J. Physiol.*, v.212, p.77-82, 1967.

BALINT, S.; CZOBOR, P.; KOMLOSI, S.; MESZAROS, A.; SIMON, V.; BITTER, I. attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD): gender-and age-related differences in neurocognition. *Psychol Med.* 39(8): 1337-1345, 2009.

BANNERMAN, D.M.; RAWLINS, J.N.P.; MCHUGH, S.B.; DEACON, R.M.J.; YEE, B.K.; BAST, T.; ZHANG, W.N. POTHUIZEN, H.H.J.; FELDON, J. Regional dissociations with in the hippocampus-memory and anxiety. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 28, p. 273-283, 2004.

BAPTISTA-NETO, L.; DODS, A.; RAO, S.; WHITNEY, J.; TORRES, A.; GONZALEZ-HEYDRICH, J. An expert opinion on methylphenidate treatment for attention deficit hyperactivity disorder in pediatric patients with epilepsy. *Expert Opin Investig Drugs*. 17: 77-84, 2008.

BARKLEY, R.A. Transtorno do Déficit de Atenção / Hiperatividade: guia completo e autorizado para pais, professores e profissionais de saúde. Porto Alegre: Artmed: 35-64, 2002.

BARROS, H.M.; TANHAUSER, S.L.; TANHAUSER, M.A.; TANHAUSER, M. The effects of GABAergic drubs on grooming behavior in the open field. *Pharmacol. Toxicol.*, v. 74, p. 339-344, 1994.

BASSO, A.M. et al. Behavioral profile of P2X₇ receptor knockout mice in animal models of depression and anxiety: Relevance for neuropsychiatric disorders. *Behav. Brain Res.*, v.198, p.83-90, 2009.

BENCZIK, E.B.P. TDAH: Um guia de orientações para profissionais. 2 ed. São Paulo: Casa do Psicólogo; 110p.; 2002.

BETHANCOURT, J.A.; CAMARENA, Z.Z.; BRITTON, G.B. Exposure to oral methylphenidate from adolescence through young adulthood produces transient effects on hippocampal-sensitive memory in rats. *Behavioural Brain Research*. 202, 50-57, 2009.

BEVINS, R.A.; PETERSON, J.L. Individual differences in rats' reactivity to novelty and the unconditioned and conditioned locomotor effects of methamphetamine. *Pharmacol Biochem Behav*. 79:65–74, 2004.

BLASS, J.P. Brain metabolism and brain disease: is metabolic deficiency the proximate cause of Alzheimer dementia? *J. Neurosci. Res*. 66, 851–856, 2001.

BIEDERMAN, J.; FARAONE, S.V. The Massachusetts General Hospital studies of gender influences on attention-deficit/hyperactivity disorder in youth and relatives. *Psychiatr. Clin. North Am.* 27: 225-232, 2004.

BIEDERMAN, J.; FARAONE, SV. Attention-deficit hyperactivity disorder. *Lancet* 366, 237–248, 2005.

BIEDERMAN, J.; MONTEAUX, M.C.; SPENCER, T.; WILENS, T.E.; FARAONE, S.V.; Do stimulants protect against psychiatric disorders in youth with ADHD? A 10-year follow-up study. *Pediatrics*, 124(1):71-78, 2009.

BOHLEN, M. et al. Calibration of rotational acceleration for the rota rod test of rodent motor coordination. *J. Neurosci. Methods.*, v.178, p.10-14, 2009.

BOLANOS, C.A.; BARROT, M.; BERTON, O.; WALLACE-BLACK, D.; NESTLER, E.J. Methylphenidate treatment during pre-and periadolescence alters behavioral responses to emotional stimuli at adulthood. *Biol Psychiatry*, v.54, p.1317-1329, 2003.

BOWMAN, R. H.; MAACK, T. Glucose transport by the isolated perfused rat kidney. *Am. J. Physiol.*, v.222, n.6, p. 1499-1504, 1972.

BOWMAN, R. H.; MAACK, T. Effect of albumin concentration and ADH on H₂O and electrolyte in perfused rat kidney. *Am. J. Physiol.*, v.226, n.2, p.426-430, 1974.

BRANDÃO, M.L. Comportamento emocional In: *Psicofisiologia: As bases fisiológicas do comportamento*. 2ª ed. São Paulo: Editora Atheneu, cap.7, p.125-149, 2001.

BRANDON, C.L.; MARINELLI, M.; BAKER, L.K.; WHITE, F.J.; Enhanced reactivity and vulnerability to cocaine following methylphenidate treatment in adolescent rats. *Neuropsychopharmacology*, 25, 651–661, 2001.

BRASIL. Conselho Nacional de Saúde. Resolução n. 338, de 06 de maio de 2004. Aprova a Política Nacional de Assistência Farmacêutica. *Diário Oficial da União, Poder Executivo*, Seção 1 n. 96, 20 de maio de 2004. Brasília: Ministério da Saúde, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria GM/MS n.204, de 29 de janeiro de 2007. Regulamenta o financiamento e a transferência dos recursos federais para as ações e os serviços de saúde, na forma de blocos de financiamento, com o respectivo monitoramento e controle. Brasília: Ministério da Saúde, 2007.

BRICKS, L.F.; DA SILVA, C.A.A. Toxicidade dos anti-inflamatórios não hormonais. *Pediatrics* (São Paulo). 27(3): 181-193, 2005.

BRIDGET, M.K. Stimulant use linked to sudden death in children without heart problems. *JAMA*, 302 (6), 613, 2009.

BRIGGS, G.G.; FREEMAN, R.K.; YAFFE, S.J. *Drugs in pregnancy and lactation*. Philadelphia, Pa: Lippincott Williams and Wilkins. 7., 2005.

BRITTON, R.A.; WEN, T.; SCHAEFER, L.; PELLEGRINI, O.; UICKER, W.C.; MATHY, N.; TOBIN, C.; DAOU, R.; SZYK, J.; CONDON, C. Maturation of the 5' end of *Bacillus subtilis* 16S rRNA by the essential ribonuclease YkqC/RNase J1. *Molecular Microbiology*. 63:127-38, 2007.

BRITTON, G.B.; BETHANCOURT, J.A. Characterization of anxiety-related responses in male rats following prolonged exposure to therapeutic doses of oral methylphenidate. *Pharmacol Biochem Behav*. 93(4):451-9, 2009.

BROWN, G.W. The role of life events in the aetiology of depressive and anxiety disorders. In: STANNFORD S., SAMON, P. *Stress: from synapse to syndrome*. London: Academic Press, p. 23-50, 1993.

BROWN, M.F.; YAKAMOTO, S. Effects of amphetamine on mitochondrial function: role of free radicals and oxidative stress. *Pharmacol & Therap*. 99: 45-53, 2003.

BURKE, R.E.; GREENBAUM, D. Effect of post-mortem factors on muscarinic receptor subtypes in rat brain. *Journal of Neurochemistry*, 49: 529-596, 1987.

BUSH, G.; FRAZIER, J.A.; RAUCH, S.L.; SEIDMAN, L.J. E JANIKE, M.A. Anterior cingulate cortex dysfunction in attention deficit/hyperactivity disorder revealed by MRI and counting stroop. *Biol. Psychiatry.*, 45, 1542-1552, 1999.

CARLEZON, J.R.; MAGUE, S. D.; ANDERSEN, S.L. Enduring behavioral effects of early exposure to methylphenidate in rats. *Biol. Psychiatry*, v.54, p.1330-1337, 2003.

CARLINI, E.A.; BURGOS, V. Screening farmacológico de ansiolíticos: Metodologia laboratorial e comparação entre diazepam e clorobenzepam. *Rev. Ass. Bras. Psiquiatria*, 1, 25-31, 1979.

CARLINI, E.A. et al. Pharmacology of Lemon-Grass (*Cymbopogon citratus* Stapf). Effects of teas prepared from leaves on laboratory-animals. *Journal of Ethnopharmacology*, 17, 37-64, 1986.

CAROBREZ, A.P.; BERTOGLIO, L.J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 29 (8), 1193-1205, 2005.

CAROLA, V. et al. Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behavior in inbred mice. *Behav. Brain Res.*, v.21, p.49-57, 2002.

CEARÁ. Secretaria da Saúde. Coordenadoria de Assistência Farmacêutica. Assistência Farmacêutica. 2008. Disponível em: <<http://www.saude.ce.gov.br/index.php/rede-de-servicos/assistencia-farmacutica>> Acesso em: 28 jul. 2013.

CHAVEZ, B.; SOPKO, M.A.; EHRET, M.J.; PAULINO, R.E.; GOLDBERG, K.R.; ANGSTADT, K.; BOGART, G.T. An update on central nervous system stimulant formulations in children and adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Ann Pharmacother*, 43 (6), 1084-1095, 2009.

CHINDO, B. A. et al. Ketamine enhanced immobility in forced swim test: a possible animal model for the negative symptoms of schizophrenia. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, v. 38, n. 2, p. 310–6, 2012.

CHUHAN , Y.S.; TAUKULIS, H.K. Impairment of single-trial memory formation by oral methylphenidate in the rat. *Neurobiol Learn Mem* , 85, 125-131, 2006.

CLAUSSEN, C.M.; CHONG, S.L.; DAFNY, N. Selective bilateral lesion to caudate nucleus modulates the acute and chronic methylphenidate effects. *Pharmacol Biochem Behav.* 101(2):208-16, 2012.

COBERT, B. *Manual of Drug Safety and Pharmacovigilance*. Jones and Bartlett Publishers. p.292, 2007.

COHEN, J.J.; KOOK, Y.J.; LITTLE, J.R. Substrate-limited function and metabolism of the isolated perfused rat kidney: Effects of lactate and glucose. *J. Physiol.*, v.226, p.103-121, 1977.

CONFINO-COHEN, R.; GOLDBERG, A. Successful desensitization of methylphenidate-induced rash. *J Child Adolesc Psychopharmacol.* 15: 703–705, 2005.

CORRÊA, P.T.F. Avaliação comportamental em modelo animal de esquizofrenia induzido por cetamina. Dissertação (Mestrado). Universidade do extremo sul catarinense programa de pós-graduação em ciências da saúde – ppg-cs.Criciúma, SC, 2009.

COSKUN, M.; TUTKUNKARDAS, M.D.; ZOROGLU, S. OROS Methylphenidate-Induced Skin Eruptions. *Journal of Child and Adolescent Psychopharmacology.* 19(5), 2009.

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

COX, D.J.; HUMPHREY, J.W.; MERKEL, R.L.; PENBERTHY, J.K; KOVATCHEV, B. Controlled-release methylphenidate improves attention during onroad driving by adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder. *J AM Board Fam Pract.* 17: 235-239, 2004.

CRAWLEY, J.N.; GOODWIN, F.K. Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 13, 167-170, 1980.

CRAWLEY, J.N. Neuropharmacologic specificity of a simple model for the behavioural actions of benzodiazepines. *Pharmacology Biochemistry Behavior*, v. 15, p. 695-699, 1981.

CRAWLEY, J. N. Exploraty behavior models of anxiety in mice. *Neurosci. Biobehav. Rev.* v.9, p.37-44, 1985.

CROSS, C.E.; VALACCHI, G.; SHOCK, B.; WILSON, M.; WEBER, S., EISERICH, J.; VLIET, A. Enviromental Oxidant Pollutant Effects on Biologic System. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* v.166, p.44-50, 2002.

CRYAN, J.F.; PAGE, M.E.; LUCKI, I. Noradrenergic lesions differentially alter the antidepressant-like effects of reboxetine in a modified forced swim test. *Eur. J. Pharmacol.*; v. 436, p. 197-205, 2002.

DAILLY, E.; CHENU, F.; RENARD, C.E.; BOURIN, M. Dopamine, depression and antidepressants. *Fundam. Clin. Pharmacol.* v.18, p.601-607, 2004.

DALLMEIER, K.; CARLINI, E.A. Anesthetic, hypothermic, myorelaxant and anticonvulsant effects of synthetic eugenol derivatives and natural analogues. *Pharmacology*, v. 22, p. 113-127, 1981.

DEAKIN, J.F.; GRAEFF, F.G.; GUIMARÃES, F.S. 5-HT receptors subtypes and the modulation of aversion. In: MARSDEN, C.A.; HEAL, D.J. *Central Serotonin Receptors and Psychotropic Drugs*, London: Blackwell, p. 147-174, 1992.

DE BRUIN, V.M.S.; MARINHO, M.M.F.; SOUSA, F.C.F.; VIANA, G.S.B. Behavioural and neurochemical alterations after Lithium-Pilocarpine administration in young and adult rats: a comparative study. *Pharmacology Biochemistry and Behaviour*, v. 65, n.3, p.547-551, August 1999.

DE LORENZO, R.J.; RAZA, M.; PAL, S.; RAFIQ, A. Long-term alteration of calcium homeostatic mechanisms in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Brain Research*. v. 903, p. 1-12, 2001.

DE MELLO, G.; MAACK, T. Nephron function of isolated perfused rat kidney. *Am. J. Psysiol.*, v.231, n.6, p.1699-1707, 1976.

DIAS, C.D.; HOEFLER, R. Distúrbio de Hiperatividade e Déficit de Atenção. Conselho Federal de Farmácia. *Boletim Farmacoterapêutica*; XIV (5-6), 2009.

DIGE, N.; WIK, G. Adult attention deficit hyperactivity disorder identified by neuropsychological testing. *Int J Neurosci*. 2005; 115:169–183.

DOPHEIDE, J.A.; PLISZKA, S.R. Attention-deficit-hyperactivity disorder: an update. *Pharmacotherapy*, 29 (6), 256-279, 2009.

DOYLE, R. The history of adult attention-deficit/hyperactivity disorder. *Psychiatr. Clin. North Am*. 2004, 27: 203-214.

DRAGO, F.; AREZZI, A.; VIRZI, A. Effects of acute or chronic administration of substituted benzamides in experimental models of depression in rats. *Eur. Neuropsychopharmacol.*, v.10, p.437-442, 2000.

DUNHAM, N.W.; MIYA, T.S. A note on a simple apparatus for detection neurological deficit in rats a mice. *Journal of the American Pharmaceutical Association*, v.46, p.208-9, 1957.

DUNN, A.J.; GUILD, A.L.; KRAMARCY, N.R.; WARE, M.D. Benzodiazepines decrease grooming in response to novelty but not ACTh or beta-endorphin. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, v. 15, p. 605-608, 1981.

DUNN, D.W.; AUSTIN, J.K.; HAREZLAK, J. et al. ADHD and epilepsy in childhood. *Dev Child Neurol*, 45, 50-54, 2003.

EJAZ, P. et al. NSAIDs and kidney. *J Assoc Physicians India* 2004; 52: 632-640.

EVANGELISTA, J.S.A.M. et al. Renal and vascular effects of the natriuretic peptide isolated from *Crotalus durissus cascavella* venom. *Toxicon* 2008; 52 (7): 737-744.

FABIANO, G.A.; PELHAM, W.E., Jr.; COLES, E.K.; GNAGY, E.M.; CHRONISTUSCANO, A.; O'CONNOR, B.C. A meta-analysis of behavioral treatments for attention-deficit/hyperactivity disorder. *Clin Psychol Rev.* 29(2): 129-140, 2009.

FAGUNDES, A.O.; REZIN, G.T.; ZANETTE, F.; GRANDI, E.; ASSIS, L.C.; DALPIZZOL, F.; QUEVEDO, J.; STRECK, E.L. A administração crônica de metilfenidato ativa mitocondrial cadeia respiratória em cérebro de ratos jovens. *Int. J. Devl Neuroscience*, 25, 47-51, 2007.

FARAONE, S.V; SERGEANT, J; GILLBERG, C; BIEDERMAN, J. The worldwide prevalence of ADHD: is it an American condition? *World Psychiatry.* 2, 104-113, 2003.

FARAONE, SV; Genetics of adult attention-deficit/hyperactivity disorder. In: Spencer, T. ed. *Psychiatric clinics of North America*. Philadelphia, PA.: Saunders Press, 303-321, 2004.

FARAONE, S.V; PERLIS, R.H.; DOYLE, A.E.; SMOLLER, J.W.; GORALNICK, J.J.; HOLMGREN, M.A.; SKLAR, P. Molecular Genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol. Psychiatry.* 25:1313-1323, 2005.

FONTELES, M. C. Efeitos do ácido 2-tetradecilglicídico no rim isolado: papel dos lipídios endógenos no transporte de sódio e função renal. Fortaleza, Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Ceará, 1980.

FONTELES, M.C.; LEIBACH, F.H. Glucose formation from glutathione in the isolated perfused rat kidney. *Arch. Int. Psysiol. Biochim.* V.90, p. 159-161, 1982.

FONTELES, M.C.; COHEN, J.J.; BLACK, A.J.; WERTHEIM, S. J. Support of renal kidney function by long-chain fatty acids derived from renal tissue. *Am. J. Psysiol.*, v.224, p.235-246, 1983.

FONTELES, M.C. et al. Highsalt intake primes the rat kidney to respond to a subthreshold uroguanylin dose during ex vivo renal perfusion. *Regul. Pept* 2009; 158 (1-3): 6-13.

FRANKOWSKA, M.; FILIP, M.; PRZEGALINSKI, E. Effects of GABA_B receptor ligands in animal tests of depression and anxiety. *Pharmacol. Rep.*, v.59, p.645-655, 2007.

FRAZER, A.; HENSLER, J.G. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. 6th edition., Texas, 1999.

FREDRIKSSON, A.; ARCHER, T. Neurobehavioural deficits associated with apoptotic neurodegeneration and vulnerability for ADHA. *Neurotox. Res.*, v.6, n.6, p.435-456, 2004.

FREITAS, R.M.; SOUZA, F.C.F.; VASCONCELOS, S.M.M.; VIANA G.S.B.; FONTELES M.M.F. Oxidative stress in the hippocampus after status epilepticus in rats. *The FEBS Journal*, v. 272, p. 1307-1312, 2005.

FREITAS, R.M. Vigabatrina aumenta atividade da superóxido dismutase no corpo estriado de ratos após crises convulsivas induzidas pela pilocarpina. *Revista de Psiquiatria Clínica*, v. 37, n. 1, p. 36-40, 2010.

FRESHENEY, R.I. *Culture of Animal Cells: a manual of basic techniques*. New York, 4^a ed., 2000.

GARCIA, S.P.; GUIMARAES, J.; ZAMPIERI, J.F.; MARTINEZ, A.L.; POLANCZYK, G.; ROHDE, L.A. Response to methylphenidate in children and adolescents with ADHD: does comorbid anxiety disorders matters? *J Neural Transm*, 116(5): 631-636, 2009.

GENRO, J.P.; KIELING, C.; ROHDE, L.A.; HUTZ, M.H. Attention-deficit/hyperactivity disorder and the dopaminergic hypotheses. *Expert Rev Neurother.* 10(4):587-601, 2010.

GHANIZADEH, A. Psychiatric comorbidity differences in clinic-referred children and adolescents with ADHD according to the subtypes and gender. *J Child Neurol.* 24(6): 679-84, 2009.

GODFREY, J. Safety of therapeutic methylphenidate in adults: a systematic review of the evidence. *J Psychopharmacol.* 23:194–205, 2009.

GOLDSTEINS, L.E.; RASMUSSEN, A.M.; BUNNEY, B.S.; ROTH, R.T. The NMDA glycine site antagonist (+)-HÁ-966 selectively regulates conditioned stress-induced metabolic activation of the mesoprefrontal cortical dopamine but not serotonin systems: a behavioral, neuroendocrine, and neurochemical study in the rat. *J. Neurosci.* V.14, n.8, p.4937-4950, 1994.

GONZALEZ-HEYDRICH, J.; WEISS, M.; CONNOLLY, M. et al. Pharmacological management of a youth with ADHD and a seizure disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 45:1527-1532, 2006.

GOULD, MS; WALSH, BT.; MUNFAKH, JL; KLEINMAN, M.; DUAN, N.; OLFSON, M.; GREENHILL, L.; COOPER, T. Sudden death and use of stimulant medications in youths, *Am J. Psychiatry*, 166 (9), 955-957, 2009.

GRAEFF, F.G. Serotonergic systems. *Psychiatr. Clin. North Am.*, v.20, n.4, p.723-739, 1997.

GRAHAM, D.G.; Oxidative pathways for catecholamines in the genesis of neuromelanin and cytotoxic quinones. *Mol. Pharmacol.* 14, 633-643, 1978.

GRAHAM, J.; COGHILL, D. Adverse effects of pharmacotherapies for attention-deficit/hyperactivity disorder: epidemiology, prevention and management. *CNS Drugs*, 22(3): 213-237, 2008.

GRAY, J.D.; PUNSONI, M.; TABORI, N.E.; MELTON, J.T.; FANSLOW, V.; WARD, M.J.; ZUPAN, B.; MENZER, D.; RICE, J.; DRAKE, C.T.; ROMEO, R.D.; BRAKE, W.G.; TORRES-REVERON, A.; MILNER, T.A. Methylphenidate administration to juvenile rats alters brain areas involved in cognition, motivated behaviors, appetite, and stress. *The Journal of Neuroscience*, 27, 7196–7207, 2007.

GREENHILL, L.L.; PLISZKA, S.; DULCAN, M.K.; BERNET, W.; ARNOLD, V.; BEITCHMAN, J, et al. Summary of the practice parameter for the use of stimulant medications in the treatment of children, adolescents and adults. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 40(11): 1352-1355, 2001.

GREENHILL, L.L.; PLISZKA, S.; DULCAN, M.K.; BERNET, W.; ARNOLD, V.; BEITCHMAN, J, et al. Practice parameter for the use of stimulant medications in the treatment of children, adolescents and adults. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 41(2 Suppl): 26S-49S, 2002.

GRIFFIN, W.C.; NOVAK, A.J.; MIDDGAUGH, L.D.; PATRICK, K.S. The interactive effects of methylphenidate and ethanol on ethanol consumption and locomotor activity in mice. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 95: 267–272, 2010.

GRUND, T.; LEHMANN, K.; BOCK, N.; ROTHENBERGER, A.; TEUCHERT-NOODT, G. Influence of methylphenidate on brain development – an update of recent animal experiments. *Behav. Brain Funct.* 2, 2, 2006.

HALL K. et al. Illicit use of prescribed stimulant medication among college students. *Journal of American College Health*, Linthicum, 2005; 4; 53: 167-174.

HALLMAN, H.; JOSSON, G. Neurochemical studies on central dopamine neurons-regional characterization of dopamine turnover. *Medical Biology*, v. 62, p. 209, 1984.

HAMILTON, R.L.; BENNY, N.M.; WILLIAMS, M.C.; SEVERINGHAUS, E.M.A Simple and inexpensive membrane “lung” for small organ perfusion. *J. Lipid. Res.*, v.15, p. 182-186, 1974.

HANSON, R.W.; BALLARD, F.S. Cytrate, pyruvate and lactate contaminants of comercial serum albumin. *J. Lipid. Res*, v.9, p.667-668, 1968.

HENESSY, S.; SCHELLEMAN, H.; DANIEL, G.W.; BILKER, W.B.; KIMMEL, S.E.; GUEVARA, J.; CZIRAKY, M.J.; STROM, B.L. Cardiovascular safety of ADHD medications: rationale for and design of an investigator-initiated observational study. *Pharmacoepidemiology and Drug Safety*. 19: 934–941, 2010.

HENNINGSSEN K.; ANDREASEN J.T.; BOUZINOVAE, V.B.; JAYATISSAM, N.; JENSEN, M.S.; REDROBEJ, J.P.; WIBORG, O. Cognitive deficits in the rat chronic mild stress model for depression: Relation to anhedonic-like responses. *Behavioural Brain Research*. V198, 1, pp. 136-141, 2009.

HIGGINS, E.S. Do ADHD drugs take a toll on the brain? *Scientific American Mind*, july/august, 39-43, 2009.

HIRANO, S.; MIYATA, S.; ONODERA, K.; KAMEI, J. Involvement of dopamine D1 receptors and α 1-adrenoceptors in the antidepressant-like effects of chlorpheniramine in the mouse tail suspension test. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 562, p. 72-76, 2007.

HOLLIS, C.P.; THOMPSON, A. *MRCPsych. Acute Dyskinesia on Starting Methylphenidate After Risperidone Withdrawal*. Elsevier, *J.pediatrneurol*, 2007.

HRUSKA, R.E., LUDMER, L.M., PERT, A., PETER, J.R., BUNNEY, W.E. Effects of lithium on [3H] quinuclidinyl benzilate binding to rat brain muscarinic cholinergic receptors. *J Neurosci Res*, v. 11, p. 171-180, 1984.

HUGHES, R.N. Chlordiazepoxide-modified exploration in rats. *Psychopharmacology*, Berlin, v. 24, p. 462-469, 1972.

HUMPHREYS C.; GARCIA-BOURNISSEN, F.; ITO, S.; KORAN, G. Exposure to attention deficit hyperactivity disorder medications during pregnancy. *Canadian Family Physician*. 2007; 53.

IMPERATO, A., DAZZI, L., CARTA, G., COLOMBO, G., BIGGION, G. Rapid increase in basal acetylcholine release in the hippocampus of freely moving rats induced by withdrawal from long-term ethanol intoxication. *Brain Res.*, v.784, p. 347-350, 1998.

INTERNATIONAL NARCOTICS CONTROL BOARD (INCB). Psychotropic substances: statistics for 2006, assessments of annual medical and scientific requirements for substances. New York: United Nations; 2008. [acessado 2012 mai 02]. Disponível em: <http://www.incb.org>.

ITABORAHY, C. A Ritalina no Brasil: uma década de produção, divulgação e consumo. Dissertação de Mestrado. Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ). Rio de Janeiro, RJ, 2009.

ITABORAHY C, ORTEGA F. O metilfenidato no Brasil: Uma década de publicações. *Ciência & Saúde Coletiva*. 3; 18: 803-816, 2013.

IRVINE, J.; KAHASHI, L.; LOCKHRT, K.; CHEONG, J.; JONH, W.; TOLAN, H.E.; SELICK and RUSSEL, J. MDCK (Madin–Darby Canine Kidney) Cells: A Tool for Membrane Permeability Screening. *J Pharm Sci*. 88(1), 28-33, 1999.

JOCA, S.R.; PADOVAN, C.M.; GUIMARÃES, F.S. Estresse, depressão e hipocampo. *Rev. Bras. Psiquiatr.*, v. 25 (supl II), p. 46-51, 2003.

JOHANSSON, C.; AHLENIUS, S. Evidence for the involvement of 5-HT_{1A} receptors in the mediation of exploratory locomotor activity in the rat. *J. Psychopharmacol.*, v. 3, p. 32-35; 1989.

JOHN R.; HERZENBERG, A.M. Renal toxicity of therapeutic drugs. *J Clin Pathol*; 62: 505-515, 2009.

KALUEFF, A.V.; LOU, Y.R.; LAAKSI, I.; TUOHIMAA, P. Impaired motor performance in mice lacking neurosteroid vitamin D receptors. *Brain Res Bull*. 64(1):. 25-9, 2004.

KAPPUR, S.; MANN, J.J. Role of the dopaminergic system in depression. *Biol. Psychiatry*. V.32, n.1, p.1-17, 1992.

KEEN, D.; HADJIKOUMI, I. ADHD in children and adolescents. *BMJ Clinical Evidence*. 10, 312, 2008.

KENDALL, T; TAYLOR, E; PEREZ, A.; TAYLOR, C. Diagnosis and management of attention-deficit/hyperactivity disorder in children, young people, and adults: summary of NICE guidance. *Bmj*; 337 a 1239, 2008.

KESSLER, R.C.; ADLER, L. BARKLEY, R. BIEDERMAN, J.; CONNERS, C.K.; DEMLER, O, et al. The prevalence and correlates of adult ADHD in the United States: results from the National Comorbidity Survey Replication. *Am J Psychiatric*. 163(4): 716-723, 2006.

KHAN, S.A.; FARAONE, S.V. The genetics of ADHD: a literature review of 2005. *Curr Psychiatry Rep*. 8(5): 393-397, 2006.

KLEBAUR, J.E.; BEVINS, R.A.; SEGAR, T.M.; BARDO, M.T. Individual differences in behavioral responses to novelty and amphetamine self-administration in male and female rats. *Behav. Pharmacol*. 12, 267– 275, 2001.

KLEIN-SCHWARTZ, W. Abuse and toxicity of methylphenidate. *Curr Opin Pediatr* 14(2): 219-23, 2002.

KLEIN-SCHWARTZ, W. Pediatric methylphenidate exposures: 7-year experience of poison centers in the United States. *Clin Pediatr (Phila)*;42:159–64, 2003.

KONESKI, J.A.S. Transtorno do Déficit de Atenção e Hiperatividade. *Rev Cat Ped*; 10(10): 22-24, 2007.

KONESKI, J.A.; CASELLA, E.B. Attention deficit and hyperactivity disorder in people with epilepsy: diagnosis and implications to the treatment. *Arq Neuropsiquiatr*. 68(1):107-14, 2010.

KUCZENSKI, R.; SEGAL, D.S.; CHO, A.K.; MELEGA, W.P. Hippocampus norepinephrine; caudate dopamine and serotonin; and behavioral responses to stereoisomers of amphetamine and methamphetamine. *J Neurosci*, v.15, p.1308-1317, 1995.

KUCZENSKI, R.; SEGAL, D.S. Effects of methylphenidate on extracellular dopamine, serotonin, and norepinephrine: comparison with amphetamine. *J Neurochem*, v.68, p. 2032-3037, 1997.

KUEHN, B.M. Stimulant use linked to sudden death in children without heart problems, *JAMA*, 302 (6) 613-614, 2009.

KULKARNI, S.K.; BHUTANI, M.K.; BISHNOI, M. Antidepressant activity of curcumin: involvement of serotonin and dopamine system. *Psychopharmacology (Berl)*; 201(3): 435-42, 2008.

LAGACE, D.C.; YEE, J.K.; BOLAÑOS, C.A.; EISCH, A.J. Juvenile administration of methylphenidate attenuates adult hippocampal neurogenesis. *Biological Psychiatry*, 60 (10): 1121-1130, 2006.

LAMBERT, G. *et al.* Reduced brain norepinephrine and dopamine release in treatment-refractory depressive illness. *Archives of General Psychiatry*, v. 57, p. 787-793, 2000.

LEBLANC-DUCHIN, D.; TAUKULIS, H.K. Chronic oral methylphenidate administration to periadolescent rats yields prolonged impairment of memory for objects. *Neurobiol Learn Mem*, 88, 312-320, 2007.

LEE, S.H.; SONG, D.H.; KIM, B.N.; JOUNG, Y.S.; HA, E.H.; CHEON, K.A.; SHIN, Y.J.; YOO, H.J.; SHIN, D.W. Variability of Response Time as a Predictor of Methylphenidate Treatment Response in Korean Children with Attention Deficit Hyperactivity Disorder. *Yonsei Med J*. 50(5): 650-655, 2009.

LEONARD, B.E; MCCARTAN, D.; WHITE, J.; KING, D.J. Methylphenidate: a review of its neuropharmacological, neuropsychological and adverse clinical effects. *Hum Psychopharmacol* 19, 151-180, 2004.

LEVY, F. Dopamine vs noradrenaline: inverted-U affects and ADHD theories. *Aust N Z J Psychiatric*. 43(2): 101-108, 2009.

LIMA, D.B. Estudo dos efeitos renais do veneno da formiga *Dinoponera quadricaps*. Graduação em Farmácia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

LINHARES, M. I. Estudo da Ritalina® (Cloridrato de Metilfenidato) sobre o sistema nervoso central de animais jovens e adultos: Aspectos Comportamentais e Neuroquímicos. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

LINHARES, M.I.; VENÂNCIO, E.T.; LIMA, C.N.C.; FEITOSA, M.L.; SALVIANO, L.H.M.S.; SOUZA, A.G.; ALVES, K.; SOUSA, F.C.F.; WOODS, D.J.; AGUIAR, L.M.V.; FONTELES, M.M.F. Methylphenidate: Proconvulsant effect and action on acetyl cholinesterase activity in Young and adult mice. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. Vol 6, 7, 2014.

LISTER, R.G. The use of plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology*, 92, 180-185, 1987.

LITTLE, J. R.; COHEN, J. J. Effect of albumin concentration of functional isolated perfused rat kidney. *Am. J. Physiol.*, v.226, n.3, p.512-517, 1974.

LOUZÃ M.R.; MATTOS P. Questões atuais no tratamento farmacológico do TDAH em adultos com metilfenidato. *J. Bras. Psiquiatr.* 1; 56: 53-56, 2007.

LOW K.G.; GENDASZEK A.E. Illicit use of psychostimulants among college students: a preliminary study. *Psychology, Health and Medicine*, Oxfordshire. 2002; 7; 3: 283-287.

LOWE, N.; KIRLEY, A.; HAWI, Z.; SHAM, P.; WICKHAM, H.; KRATOCHVILL, C.J. et al. Joint analysis of DRD5 marker concludes association with ADHD confined to the predominantly inattentive and combined subtypes. *Am J Hum Genet*. 74: 348-356, 2004.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDAL, R.J. Protein measurement with follin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* v.193, p.265-75, 1951.

LUBKE, G.H.; MUTHEN, B; MOILANEN, I.K.; McGOUGH, J.J.; LOO, S.K.; SWANSON, J.M et al. Subtypes versus severity differences in attention-deficit/hyperactivity disorder in the Northern Finnish Birth Cohort. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 46(12): 1584-1593, 2007.

MACHADO, A. *Neuroanatomia Funcional*. 2ª edição. São Paulo: Atheneu, 2004.

MACHADO-VIEIRA, R.; KAPCZINSKI, F.; SOARES, J.C. - Perspectives for the Development of New Animal Models of Bipolar Disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 28: 209-224, 2004.

MACNAUGHTON, N.; GRAY, J.A. Anxiolytic action on the behavioural inhibition system implies multiple types of arousal contribute to anxiety. *Journal of Affective Disorders*, v. 61, p.161-176, 2000.

MANJI, H.K.; DREVETS, W.C.; CHARNEY, D.S. the cellular neurobiology of depression. *Nat. Med.*, v.7, p. 541-547, 2001.

MANN, R.D. *Pharmacovigilance*. West Sussex, England: John Wiley & Sons, Ltda, 2 ed.: p.686, 2007.

MANSUR, J.; MARTZ, R.M.W.; CARLINI, E.A. Effects of acute chronic and administration of cannabis sativa and (-) 9-trans tetrahydrocannabinol on the behaviour of rats in open field arena. *Psychopharmacology*, v.19, p.338-397, 1971.

MARINHO, M.M.F. et al. Effects of lithium, alone or associated with pilocarpine, on muscarinic and dopaminergic receptors and on phosphoinositide metabolism in rat hippocampus and striatum. *Neurochemistry International*, v. 33, p. 299-306, 1998.

MARTINS, M.R.; REINKE, A.; PETRONILHO, F.C.; GOMES, KM.; DAL-PIZZOL, F.; QUEVEDO, J. Methylphenidate treatment induces oxidative stress in young rat brain. *Brain Res.* 1078, 189–197, 2006.

MARTINEZ-MALDONADO, M.; STAWROULAKI-TSAPARA, A.; TSAPARA, N.; SUKI, W. N.; EKNOYAN, G. Renal effects of lithium administration in rats: alteration in water and electrolyte metabolism and the response to vasopressin and cyclic-adenosine monophosphate during prolonged administration. *J. Lab. Clin. Med.*, v.80, n.3, p.445-461, 1978.

MATTOS, P.; PALMINI, A.; SALGADO, C.A.; SEGENREICH, D, et al. Painel brasileiro de especialistas sobre diagnóstico do transtorno do déficit da atenção e hiperatividade (TDAH) em adultos. *Rev Psiquiatr RS*, 28(1): 50-60, 2006.

MCHUGH, P.; TURINA, M. Apoptosis and necrosis: a review for surgeons. *Surg Infect (Larchmt)*. 7(1):53-68, 2006.

MELGAÇO, S.S.C. et al. Nefrotoxicidade dos anti-inflamatórios não esteroidais. *Medicina (Ribeirão Preto)*. 43(4): 382-390, 2010.

MICK, E.; BIEDERMAN, J.; PRINCE, J.; FISCHER, M.J.; FARAONE, S.V. impact of low birth weight on attention-deficit hyperactivity disorder. *J Dev. Behav. Pediatr.* Fev; 23 (1): 16-22, 2002.

MICK, E. FARAONE, S.V.; Genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am.* 17(2): 261-284, 2008.

MILITÃO, G.C.G.; FERREIRA, P.M.P.; FREITAS, R.M. Effects of lipoic acid on oxidative stress in rat striatum after pilocarpine-induced seizures. *Neurochemistry International*, v. 56, p. 16-20, 2010.

MONCADA S, HIGGS E.A. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *Eur J Clin Invest.* 21(4):361-74, 1991.

MONGENSON, G.J.; JONES, D.L.; YIM, C.Y. From motivation to action: functional interface between the limbic system and the motor system. *Prog. Neurobiol.*, v,14, p.69-97, 1980.

MONTGOMERY, K. C. The relation ship between fear induced by novel stimulation and exploratory behaviour. *J. Comp. Psysiol. Psychol.* v. 48. p. 254-260, 1958

MONTEIRO, H.S.A. Efeitos nefrotóxicos do veneno de *Bothrops jararaca* no rim perfundido de rato. Estudo de antagonistas do PAF e da indometacina. Campinas, 1990. Tese (Doutorado) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade de Campinas.

MOODY, T.W.; MERALI, Z.; CRAWLEY, J.N. The effects of anxiolytics and other agents on rat grooming behavior. *Nn. NY Acad. Sci.*, v.90, p. 281-290, 1993.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and citotoxicity. *J Immunol Methods*, 65, 55-63, 1983.

MURPHY, K.R.; BARKLEY, R.A.; BUSH, T. Young adults with attention deficit hyperactivity disorder: subtype differences in comorbidity, educational and clinical history. *J Nerv Ment Dis.* 190: 147-157, 2002.

NIDA - National Institute On Drug Abuse. *Prescription drugs: abuse and addiction.* Bethesda, 2005. (Research Report Series).

NISHITSUTJI-UWO, G.M.; ROSS, B.D.; KERBS, H.A Metaboli activities of the isolated perfused rat kidney. *Biochem. J.*, v.103, p.852-862, 1967.

NISSEN, S.E. ADHD drugs and cardiovascular risk. *N Engl Med.* 6; 354(14): 1445-1448, 2006.

NOVARTIS BIOCIENTÍAS SA. *Ritalina*: cloridrato de metilfenidato. Brasília, DF: Anvisa, Bula. (Citado em: 05/2013.) Disponível em: <<http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/BM/BM%5B26162-1-0%5D>>, 2007.

NUTT, D.J. the neuropharmacology of serotonin and norepinephrine in depression. *Int Clin Psychopharmacol*, v. 17, pp. 1-12, 2002.

NUTT, D.J.; BALDWIN, D.M.; CLAYTON, A.H; ELGIE, R.; LECRUBIER, Y.; MONTEJO, A.L.; PAPAPOSTAS, G.I.; SOUERY, D.; TRIVEDI, M.H.; TYLEE, A. The role of dopamine and norepinephrine in depression and antidepressant treatment – consensus statement and research needs. *The Journal of Clinical Psychiatry*, v.67, p.46-9, 2006.

OATES, J.A. et al. Clinical implications of prostaglandins and thromboxane A2 formation. *N Engl J Med*; 319: 761-767, 1988.

OESTREICHER, N.; FRIEDMAN, G.D.; JIAN, S.F.; CHAN, J.; QUESENBERRY, C.; HABEL, L.A. Methylphenidate use in children and risk of cancer at 18 sites: results of surveillance analyses. *Pharmacoepidemiology and Drug Safety*. 16, 1268-1272, 2007.

OJEWOLE, JA. Anticonvulsant property of *Sutherlandia frutescens* R. BR. (variety Incana E. MEY.) [Fabaceae] shoot aqueous extract. *Brain Res Bull*, Jan 31; 75(1):126-32. 2008.

OKIE, S. ADHD in adults. *N Engl J Med*. 354: 2637–41, 2006.

ORTEGA, F.; BARROS, D. Metilfenidato e Aprimoramento Cognitivo Farmacológico: representações sociais de universitários. *Saúde Soc. São Paulo*, 2011; 20: 350-362.

OZTURK, Y.; AYDINI, S.; BEIS, R.; BASER, K.H.C.; BERBEROGLU, H. Effect of *Hypericum perforatum* L. and *Hypericum calximum* L. extract on the central nervous system in mice. *Phytomedicine*, v. 3, p. 139-146, 1996.

PASTOR, P.N.; REUBEN, C.A.; Diagnosed attention deficit hyperactivity disorder and learning disability: United States, 2004-2006. National Center for Health Statistics. *Vital Health Stat*, 10, 237, 2008.

PASTURA, G.; MATTOS, P. Efeitos Colaterais do Metilfenidato. Rev. Psiqu. Clin. 31 (2), 100-104, 2004.

PASTURA, G.M.; MATTOS, P.; ARAÚJO, A.P. Desempenho escolar e transtorno do déficit de atenção e hiperatividade. Rev Psiqu Clin. 32(6): 324-329, 2005.

PATRICK, K.S.; STRAUGHN, A.B.; MINHINHETT, R.R.; YEATTS, S.D.; HERRIN, A.E.; DEVANE, C.L. et al. Influence of ethanol and gender on methylphenidate pharmacokinetics and pharmacodynamics. Clin Pharmacol Ther. 81: 346–53, 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.

PELLOW, S.; FILE, S. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. Pharmacol. Biochem. Behav., v. 24, p. 525, 1986.

PENNARTZ, C.; GROENEWEGWN, H.; LOPEZ DA SILVA, F.H. The nucleus accumbens as a complex of functionally distinct neuronal ensemble: an integration of behavioural, electrophysiological and anatomical data. Prog.Neurobiol., v.42, p.719-761, 1994.

PEREZ, R.M.G.; PEREZ, J. A.; GARCIA, L. M.; SOSSA, H. Neuropharmacological activity of *Solanum nigrum* fruit. J. Ethnopharmacol., v. 62, p. 43-48, 1998.

PERLOV, E.; PHILIPSEN, A.; MATTIES, S.; DRIELING, T.; MAIER, S.; DUBL, E, et al. Spectocopic findings in attention-deficit/hyperactivity disorder: Review and meta-analysis. World J Biol Psychiatry, 12:1-11, 2008.

POETA, L.S.; NETO, F.R. Estudo epidemiológico dos sintomas do transtorno do déficit de atenção/hiperatividade e transtornos de comportamento em escolas da rede pública de Florianópolis usando a EDAH. Rev. Bras. Psiquiatr., 26 (3), 150-155, 2006.

POLANCZIK G.; DE LIMA M.S.; HORTA B.L.; BIEDERMAN J.; ROHDE L.A. The worldwide prevalence of ADHD: a systematic review and meta-regression analysis. *Am J Psychiatry*. 164: 942-948, 2007.

PORSOLT, R.D.; ANTON, N.B.; JALFRE, M. Behavioural despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Archives Internationales de Pharmacodynamie*, v. 229, p. 327-336, 1987.

PRINCE, J. Catecholamine dysfunction in attention-deficit/hyperactivity disorder: an update. *J Clin Psychopharmacol*. 28(3 suppl): 39-45, 2008.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open fields as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European Journal of Pharmacology*, v. 463, p.3-33, 2003.

PULCHERIO, G.; STOLF, A.R.; PETTENON, M.; FENSTERSEIFER, D.P.; KESSLER, F. Crack – da pedra ao tratamento. *Revista da AMRIGS*, Porto Alegre, 54 (3): 337-343, jul.-set. 2010.

RABBANI, M.; SAJJADI, S.E.; MOHAMMADI, A. Evaluation of the anxiolytic effect of *Nepeta persica* Boiss. in mice. *Evid. Based Complement. Alternat. Med*. v.5, n.2, p.181-186, 2008.

RACHER, A.J.; LOOBY, D.; GRIFFITHS. Use of lactate dehydrogenase release to assess changes in culture viability. *Cytotechnology* 3: 301-307, 1990.

RAUPP, I.M. et al. Anxiolytic-like effect of chronic treatment with *Erythrina velutina* extract in the elevated plus-maze test. *J. Ethnopharmacol.*, v.118, p.295-299, 2008.

REX, A.; STEPHENS, D.N.; FINK, H. “Anxiolytic” action of diazepam and abecarnil in a modified open Field test. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, v.53, p. 1005-1012, 1996;

RIBEIRO, M.V. Efeitos comportamentais do metilfenidato e da reboxetina em modelo animal de déficit de atenção induzido pela lesão por etanol em camundongos. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Ceará, 2008.

RHODE, L.A.; ROMAN, T.; SZOBOT, C. CUNHA, R.D.; HUTZ, M.H.; BIEDERMAN, J. Dopamine Transporter gene, response to methylphenidate and cerebral blood flow in attention-deficit/hyperactivity disorder: a pilot study. *Synapse*. 48(2): 87-89, 2003.

RHODE, L.A.; BARBOSA, G.; TRAMONTINA, S. E POLANCZYK, G. Transtorno de déficit de atenção/hiperatividade: Atualização diagnóstica e terapêutica. *Rev. Bras. Psiquiatr.*, 22 (2), 7-11, 2004.

RODGERS, R.J. *et al.* Animal models of anxiety on ethological perspective. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 30, p. 289–304, 1997.

RODRIGUES, A.D. *et al.* Neuroprotective and anticonvulsant effects of organic and conventional purple grape juices on seizures in Wistar rats induced by pentylentetrazole . *Neurochemistry International* 60: 799–805, 2012.

ROLLAND, A. *et al.* Behavioural effects of the American traditional plant *Eschscholzia californica*: sedative and anxiolytic properties. *Plant Med.* 57, 212-216, 1991.

ROSE, B.D.; POST, T.W. NSAIDs: acute kidney injury (acute renal failure) and nephritic syndrome. www.uptodate.com (acessado em 20 de abril de 2014), 2010.

ROSNER, M.H.; KIRVEN, J. Exercise-associated hyponatremia. *Clin J Am Soc Nephrol* 2: 151-161, 2007.

ROSS, B. D.; EPSTEIN, F. H.; LEAF. A Sodium reabsorption in the perfused rat kidney. *Am J. Physiol.*, v.225, n.5, p. 1165-1171, 1973.

ROSS, B. D. The isolated perfused rat kidney. *Clin. Sci. Mol. Med.*, v.55, p. 13-21, 1978.

ROSSETTI, Z.L. *et al.* Depletion of mesolimbic dopamine during behavioral despair: partial reversal by chronic imipramine. *European Journal of Pharmacology*, v. 242, p. 313-315, 1993.

ROTH, R.H.; TAM, S-Y.; IDA, Y.; YANG, J.X.; DEUTCH, A.Y. Stress and mesocorticolimbic dopamine systems. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 537, p.138-147, 1988.

RÚBIA, K.; TAYLOS, E.; SMITH, A.B.; OKASANEN, H.; OVERMEYER, S. Neuropsychological analyses of impulsiveness in childhood hyperactivity. *Br. J. Psychiatry.*, 179, 138-143, 2001.

SABUNCUOGLU, O. Risperidone-to-methylphenidate switch reaction in children: three cases. *J Psychopharmacol.* 21: 216, 2007.

SCHIMITZ, M.; DENARDIN, D.; LAUFER SILVA, T. et al. Smoking during pregnancy and attention deficit/hyperactivity disorder, predominantly inattentive type: a case-control study. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 45:1338-1345, 2006.

SCHUREK, H.J. Albumin filtration and affective pressure in nephrons in the isolated perfused rat kidney. In: *INTERNATIONAL COGRESS OF NEPHROLOGY*, 7, Montreal. Proceeding, 1978.

SCHUREK, H.J. Application of the isolated perfused rat kidney. *Contrib. Nephrol.*, v.19, p.176-190, 1980.

SCHURR, A. Energy metabolism, stress hormones and neural recovery from cerebral ischemia/hypoxia. *Neurochem. Int.* 41, 1–8, 2002.

SEDELIS, M.; SCHWARTING, R.K.; HUSTON, J.P. Behavioral phenotyping of the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Behavioural Brain Research.* 125:109–125, 2001.

SEEMAN, P. Dopamine receptors and the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Synapse*, v.1, p.133-152, 1987.

SEGENREICH, D.; MATTOS, P. Atualização sobre comorbidade entre transtorno do déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) e transtornos invasivos do desenvolvimento (TID). *Rev.Psiquiatr Clin.*, 34 (4),184-90, 2007.

SEKINE, Y.; MINABBE, Y.; OUCHI, Y.; TAKEI, N.; IYO, M.; NAKAMURA, K.; SUZUKI, K.; TSUKADA, H.; OKADA, H.; YOSHIKAWA, E.; FUTATASUBASHI, K.; MORI, N. Association of dopamine transporter loss in orbitofrontal and dorsolateral prefrontal cortices with methamphetamine-related psychiatric symptoms. *Am J Psychiatry*. 160: 1699-1701, 2003.

SESACK, S.R.; PICKEL, V.M. Prefrontal cortical efferents in the rat synapse on unlabeled neuronal targets of catecholamines terminal in the nucleus accumbens septi and on dopamine neurons in the ventral tegmental area. *The Journal of Comparative Neurology*, v. 320, p.145-160, 1992.

SHANKLAND S.J.; WOLF G. Cell cycle regulatory proteins in renal disease: role in hypertrophy, proliferation, and apoptosis. *Am J Physiol Renal Physiol*. 278(4), F515-29, 2000.

SILVA, M.; CITÓ, M.; VASCONCELOS, P.; VASCONCELOS, S.; SOUSA, F. Cocaína: história, ações neurobiológicas do vício e recaída e perspectivas terapêuticas. *Acta Medica Portuguesa, América do Norte*, 23, abr. 2010. Disponível em: <<http://www.actamedicaportuguesa.com/revista/index.php/art icle/view/609>>. Acesso em: 14 abr. 2015.

SKOUNTI, M.; PHILALITHIS, A.; GALANAKIS, E.; Variations in prevalence of attention deficit hyperactivity disorder worldwide. *Eur J Pediatr*. 166: 117-123, 2007.

SOUZA, I.; SERRA, M.A.; MATTOS, P.; FRANCO, V.A. Comorbidades em crianças e adolescentes com transtorno do déficit de atenção: resultados preliminares. *Arq Neuropsiquiatr*. 59: 401-406, 2001.

SOUZA, R.P.; SOARES, E.C.; ROSA, D.V.F.; SOUZA, B.R.; GOMES, K.M.; VALVASSORI, S.S.; RÉUS, G.Z.; INÁCIO, C.G.; MARTINS, M.R.; GOMEZ, M.V.; QUEVEDO, J; ROMANO-SILVA, M.A. Cerebral DARPP-32 expression after methylphenidate administration in young and adult rats. *Int. J. Devl Neuroscience* 27 () 1–7, 2009.

SPENCER, T.; BIEDERMAN, J.; WILWNS, T.; FARAONE, V. Overview and neurobiology of attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Clin Psychiatry*. 63 (Suppl 112): 3-9, 2002.

STERU, L.; CHERMAT, T.R.; THIERRY, B.; SIMON, P. Tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology*, v.85, n.3, p.367-370, 1985.

STOUT, J.C.; WEISS, J.M. An animal model for measuring behavioral responses to anxiogenic and anxiolytic manipulation. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, v.47, p. 459-465, 1994.

SUN, J.; ZHANG, X.; BRODERICK, M.; FEIN, H. Measurement of Nitric Oxide Production in Biological Systems by Using Griess Reaction Assay. *Sensors*. 3, 276-284, 2003.

SWANSON, J.; CASTELLANOS, F.X.; MURIAS, M.; LAHOSTE, G.; KENNEDY, J. Cognitive neuroscience of attention deficit hyperactivity disorder and hyperkinetic disorder. *Current Opinion Neurobiology*. 8:263-271, 1998.

SWANSON, J.M.; VOLKOW, N.D. Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of stimulants: implications for the design of new treatments for ADHD. *Behav. Brain Res*. 130, 73-78, 2002.

SZOBOT, C.M.; SHIN, M.C.; SCHAEFER, T.; JUNIOR, N.; HOEXTER, M.Q.; FU, Y.K, et al. Methylphenidate DAT binding in adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder comorbid with Substance Use Disorder-a single photon emission computed tomography with Tc(99m)TRODAT-1 study. *Neuroimage*. 15; 40(3): 1195-201, 2008.

TAN, M.; APPLETON, R. Attention deficit and hyperactivity disorder, methylphenidate and epilepsy. *Arch.Dis. Child*, 90, 57-59, 2005.

TAYLOR, L.; The healing power of rainforest herbs. A guide to understanding and using herbal medicinal, New York, Square One Publishers, 2005.

TEICHER, M.H.; POLCARI, A.; FOLEY, M.; VALENTE, E.; MCGREENERY C.E.; CHANG, W.W et al. Methylphenidate blood levels and therapeutic response in children with attention-deficit/hyperactivity disorder: I. Effects of different dosing regimens. *J Child Adolesc Psychopharmacol*; 16(4): 416-431, 2006.

TEICHER, M.H.; POLCARI, A.; MCGREENERY C.E.; Utility of objective measures of activity and attention in the assessment of therapeutic response to stimulants in children with attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Child Adolesc Psychopharmacol*; 18(3): 265-270, 2008.

TEO, S.K.; STIRLING, D.I.; THOMAS, S.D.; HOBERMAN, A.M.; CHRISTIAN, M.S.; KHETANI, V.D. The perinatal and postnatal toxicity of d-methylphenidate and d,l-Methylphenidate in rats, *Reproductive Toxicology*, 16, 353–366, 2002.

TEO, S.K.; SAN, R.H.; WAGNER, V.O.; GUDI, R.; STIRLING, D.I.; THOMAS, S.D. et al. D-Methylphenidate is non-genotoxic in vitro and in vivo assays. *Mutat Res*; 537, 67–79, 2003.

TETER C. et al. Illicit use of specific prescription stimulants among college students: prevalence, motives, and routes of administration. *Pharmacotherapy*, Boston. 2006; 26; 10: 1501-1510.

TEIXEIRA, C.P.L.; DE MELO, C.T.V.; DE ARAUJO, F.L.; DE CARVALHO, A.M.; SILVA, M.I.; BARBOSA-FILHO, J.M.; MACEDO, D.S.; DE BARROS VIANA, G.S.; DE SOUZA, F.C. Antidepressant-like effect of riparin II from *Aniba riparia* in mice: evidence for the involvement of the monoaminergic system. *Fundam Clin Pharmacol*. 27(2): 129-37, 2013.

TORRES, A.R.; WHITNEY, J.; GONZALEZ-HEYDRICH, J. Attention-deficit hyperactivity disorder in pediatric patients with epilepsy: review of pharmacological treatment. *Epilepsy & Behavior*, 12, 217-233, 2008.

TREIT, D.; FUNDYTUS, M. Thigmotaxis as a test of anxiolytic activity in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, v. 31, p. 959-62, 1989.

TRIMBLE, M.E.; BOWMAN, R.H. Renal Na^+ and K^+ transport: effects of glucose, palmitate and α -bromopalmitate. *Am. J. Physiol.* V.225, n.5, p.771-784, 1973.

TRIPP, G.; WICKENS, J.R. Neurobiology of ADHD. *Neuropharmacology*; 57: 579-589, 2009.

TURSKI, L. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: a behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. *Behavior Brain Research*. v. 9, p. 315-335, 1983

TURSKI, L, IKONOMIDOU, C, TURSKI, W.A.; BORTOLOTO, Z.A.; e CAVALHEIRO, E.A. Review: cholinergic mechanisms and epileptogenesis. The seizures induced by pilocarpine: a novel experimental model of intractable epilepsy, *Synapse*, v. 3, p. 154-71, 1989.

UENO, K.I.; TOGASHI, H.; MORI, K.; MATSUMOTO, M. OHASHI, S. HOSHINO, A.; FUJITA, T.; SAITO, H.; MINAMIC, M.; YOSHIOKA, M. Behavioral and pharmacological relevance of stroke-prone spontaneously hypertensive rats as an animal model of a developmental disorder. *Behavioral Pharmacology*, v. 13, p. 1-13, 2002.

UTLEY, J.R. Renal Effects of Cardiopulmonary Bypass. In Gravlee GP et al. *Cardiopulmonary Bypass. Principles and Practice*. Williams & Wilkins, Baltimore, 1993.

VALVASSORI, S.S.; FREY, B.N.; MARTINS, M.R.; REUS, G.Z.; SCHIMIDTZ, F.; INÁCIO, C.G.; KAPCZINSKI, F.; QUEVEDO, J. Sensitization and cross-sensitization after chronic treatment with methylphenidate in adolescent Wistar rats. *Behavioural Pharmacology*, 18, 205–212, 2007.

VAN DER KOOIJ, M.A.; GLENNON, J.C. Animal models concerning the role of dopamine in attention-deficit hyperactivity disorder. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, v.31, n.4, p.597-618, 2007.

VAN DE OORD, S.; PRINS, P.J.; OOSTERLAAN, J.; EMMELKAMP, P.M.; Efficacy of methylphenidate, psychosocial treatments and their combination in school-aged children with ADHD: a meta-analysis. *Clin Psychol Rev.* 28(5):783-800, 2008.

VENÂNCIO, E.T. Estudo dos efeitos comportamentais e neuroquímicos do extrato padronizado de *Justicia pectoralis* (chambá) em camundongos. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

VESTER, J.C.; BEKKER, E.M.; KOOJI, J.J.S.; BUITELAAR, J.K.; VERBATEN, M.N.; VOLKERTS, E.R.; OLIVIER, B. Methylphenidate significantly improves declarative memory functioning of adults with ADHD. *Psychopharmacology.* 212: 277–281, 2010.

VOLKOW, ND.; WANG, G.; FOWLER, JS.; LOGAN, J.; GERASIMOV, M.; MAYNARD, L. Therapeutic doses of oral methylphenidate significantly increases extracellular dopamine in the human brain. *J. Neurosci.* 21, 121, 2001.

VOLKOW, ND.; FOWLER, JS.; WANG, G.; et al. Mechanism of action of methylphenidate: insights from PET imaging studies. *J Attention Disord* 6, S 31-43, 2002.

VOLKOW, ND.; WANG, G.; FOWLER, JS.; DING, Y.; Imaging the effects of methylphenidate on brain dopamine: new model on its therapeutic actions for attention-deficit/hyperactivity disorder. **Biological Psychiatry** 57, 1410–1415, 2005.

VONKEMAN, H.E.; VAN DE LAAR, M.A.F.J. Nonsteroidal antiinflammatory drugs: adverse effects and their prevention. *Semin Arthritis Rheum*; 39: 294-312, 2010.

WAMBEBE, C. Influence of the dopaminoreceptor agents on nitrazepam-induced sleep in the domestic fowl and rats. *Jpn J Pharmacol*, 40 (3), 357-365, 1986.

WANNMACHER, L. THDA: correto diagnóstico para real indicação de psicoestimulantes. In: OPAS. Uso racional de medicamentos. PAHO. Rational use of medicines. Temas Seleccionados. Brasília. 3 (10), 1-6. www.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/v3n10/dhda/psicoestimulantes/pdf (acessado em 12 de abril de 2014), 2006.

WEISS, J. Autoregulation of flow in isolated rat kidney in the absence of red cells. *Am. J. Physiol.*, v.195, n.5, p.1115-1118, 1959.

WHITE P. et al. Stimulant medication use, misuse, and abuse in an undergraduate and graduate. *The Journal of American College Health*, Linthicum, 2006; 5; 54: 261-268.

WIGAL, S.B. Efficacy and safety limitations of attention-deficit hyperactivity disorder pharmacotherapy and children and adults. *CNS drugs*, Suppl 1, 21-31, 2009.

WILENS, T. et al. Pharmacotherapy of ADHD in adults: A review of the literature. *J Atten Disord.* 4: 189-202, 2002.

WILENS, T.E; KWON, A; TANGUAY, S; CHASE, R; MOORE, H; FARAONE, S.V. et al. Characteristics of adults with attention deficit hyperactivity disorder plus substance use disorder: the role of psychiatric comorbidity. **Am J Addict** 14:319–327, 2005.

WILENS, T.E. Effects of methylphenidate on the catecholaminergic system in attention-deficit/hyperactivity disorder. **Journal of Clinical Psychopharmacology** 28, S46–53, 2008.

WINTERSTEINS, A.G.; GERHARD, T.; SHUSTER, J.; SAIDI, A. Cardiac safety of methylphenidate versus amphetamine salts in the treatment of ADHD. *Pediatrics*. 124: 75–80, 2009.

XAVIER, S.M.; BARBOSA, C.O.; BARROS, D.O.; SILVA, R. F.; OLIVEIRA, A.A.; FREITAS, R.M. Vitamin C antioxidante effects in hippocampus of adult Wistar rats after seizures and status epilepticus induced by pilocarpine. *Neuroscience Letters*, v. 8, p. 76-79, 2007.

YANG, P.B.; AMINI, B.; SWANN, A.C.; DAFNY, N. Strain differences in the behavioral responses of male rats to chronically administered methylphenidate. *Brain Research*, v. 971,p.139-152, 2003.

YANG, S.M.; WANG, Y-U.; FARAONE, S.V. Association of norepinephrine transporter gene with methylphenidate response. *J. Am. Acad. Child. Adolesc. Psychiatry*, 43, 1154-1158, 2004.

YANG, P.B.; SWANN, A.C.; DAFNY, N. Acute and chronic methylphenidate dose-response assessment on three adolescent male rat strains. *Brain Research Bulletin*, v. 71, p.301-310, 2006.

ZHU, N.; WEEDON, J.; DOW-EDWARDS, D.L. Oral methylphenidate improves spatial learning and memory in pre- and periadolescent rats. *Behav Neurosci*; 121: 1272-9, 2007.

ZHU, N.; WEEDON, J.; DOW-EDWARDS, D.L. The multifaceted effects of oral administration of methylphenidate in juvenile rats: anxiety, activity, and attention. *Eur Neuropsychopharmacol*. 20(4):236-44, 2010.

ZITO, JM.; SAFER, DJ.; DOS REIS, S.; GARDNER, JF.; BOLES, M.; LYNCH, F.; Trends in the prescribing of psychotropic medications to preschoolers. *JAMA* 283, 1025–1030, 2000.