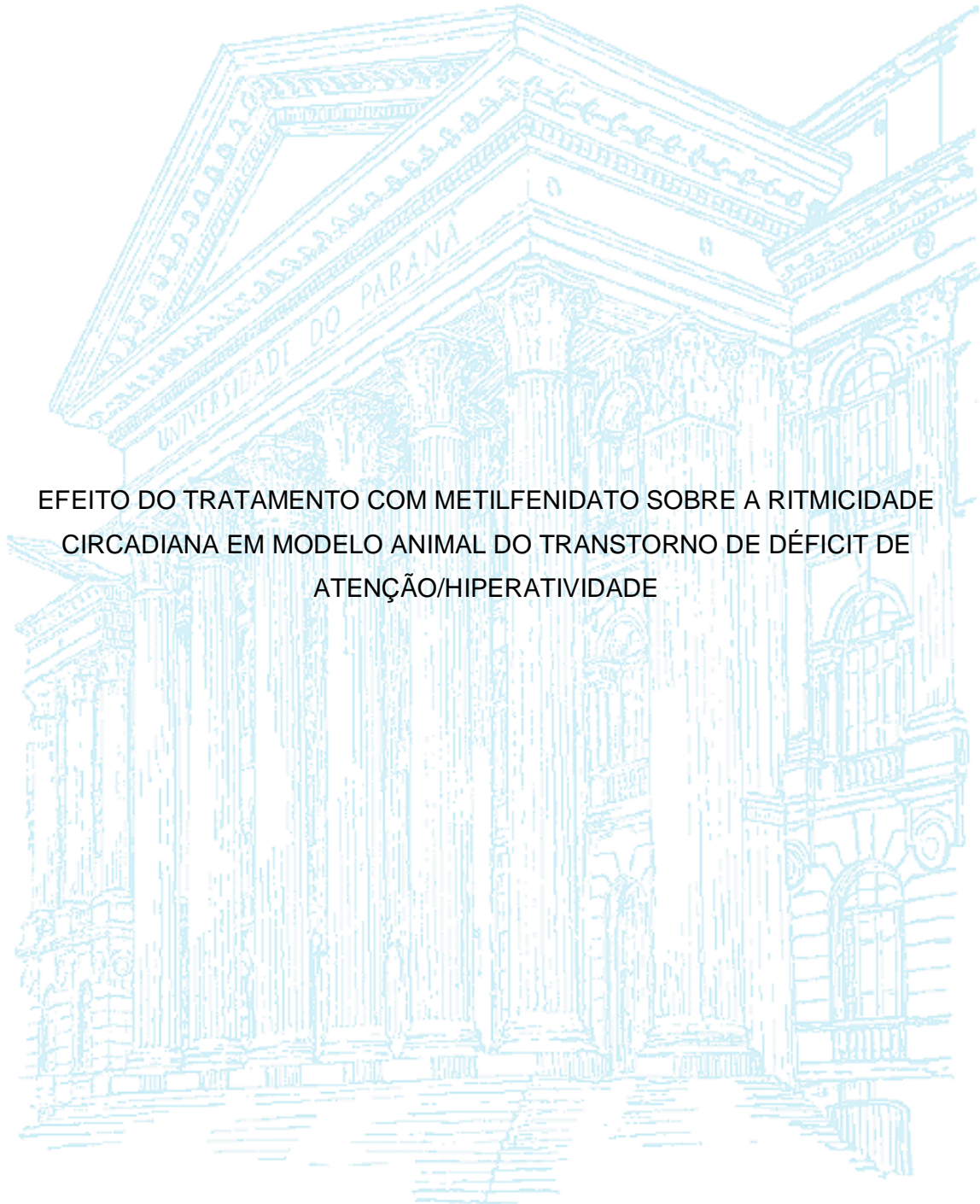


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LAURA SIMÕES DA COSTA PINTO



EFEITO DO TRATAMENTO COM METILFENIDATO SOBRE A RITMICIDADE
CIRCADIANA EM MODELO ANIMAL DO TRANSTORNO DE DÉFICIT DE
ATENÇÃO/HIPERATIVIDADE

Curitiba

2013

LAURA SIMÕES DA COSTA PINTO

EFEITO DO TRATAMENTO COM METILFENIDATO SOBRE A RITMICIDADE
CIRCADIANA EM MODELO ANIMAL DO TRANSTORNO DE DÉFICIT DE
ATENÇÃO/HIPERATIVIDADE

Monografia apresentada à disciplina BIO027
Estágio Supervisionado em Biologia II, como
requisito parcial para obtenção do grau de
Bacharel em Ciências Biológicas no curso de
Ciências Biológicas, Departamento de
Fisiologia, Setor de Ciências Biológicas da
Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Mazzilli
Louzada.

Curitiba

2013

À minha mãe, Tereza Cristina (*in memoriam*), pela saudade que deixou.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Professor Fernando Louzada, por ter me acolhido como aluna de Iniciação Científica durante anos, pelo incentivo, pela confiança e por ter aceitado a realização de um estudo com experimentação animal, mesmo estando em um Laboratório de Cronobiologia Humana.

Às amigas e companheiras de laboratório Taísa Adamowicz, Tâmile Stella Anacleto e Thaís Schaedler, que mesmo sem nenhuma experiência anterior com animais me socorreram nos momentos em que eu não dava conta de cuidar sozinha dos ratinhos. Um agradecimento extra à Taísa, que atrapalhei em vários momentos nos últimos anos para tirar as infinitas dúvidas em estatística.

Ao colega Bruno Martynhak, que foi o responsável pelo meu primeiro contato com a manipulação animal, e que me proporcionou o interesse pela realização deste trabalho. Aos demais colegas de laboratório pela oportunidade de conhecer um pouco mais sobre outros campos de estudo e pelas experiências trocadas.

Aos amigos feitos durante toda a graduação, principalmente aqueles que suportaram os meus desabafos e preocupações ao longo do desenvolvimento do curso.

À minha família, que apesar de não entender exatamente como funciona um laboratório de pesquisa e qual era o meu objetivo e função durante a realização do trabalho, sempre apoiaram as minhas decisões.

Ao CNPq pela bolsa de Iniciação Científica.

Ao curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, aos funcionários e professores do curso, pelo conhecimento adquirido durante todos esses anos.

“Viva como se fosse morrer amanhã. Aprenda como se fosse viver para sempre.”

(Mahatma Gandhi)

RESUMO

O transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) é o transtorno mais comum na infância e a droga mais utilizada em seu tratamento é o metilfenidato. Um modelo animal que tem sido utilizado para estudo do TDAH é a linhagem de ratos SHR, que apresentam hiperatividade locomotora, impulsividade e problemas de atenção sustentada. Até o momento o efeito do metilfenidato sobre a ritmicidade circadiana não foi avaliado em ratos SHR, sendo o objetivo deste estudo avaliar o efeito da administração de metilfenidato sobre a ritmicidade circadiana neste modelo animal. Para avaliar parâmetros do ritmo de atividade/repouso destes animais, ratos Wistar e SHR foram mantidos isolados em gaiolas individuais a partir do dia pós-natal 28 em ciclo claro/escuro 12:12 ou em escuro constante, com a atividade locomotora registrada durante 40 dias. Os dados de atividade foram agrupados em blocos de 5 minutos para a construção de actogramas e para a realização de análise espectral. Ambas as linhagens mostraram-se sincronizadas ao ciclo claro/escuro, com ritmo circadiano de atividade/repouso com período de 24h. Não foram encontradas diferenças entre as linhagens quando a atividade motora foi comparada na fase clara, na fase escura e durante 24 horas. Em escuro constante, Ratos Wistar expressaram um período endógeno maior {24,73(0,29)h} quando comparados aos ratos SHR {24,06(0,07)h}. Para a escolha da dose de metilfenidato a ser utilizada durante o tratamento crônico foram realizadas administrações agudas de diferentes doses do medicamento (3;5;7 e 10 mg/kg), as quais tiveram seus efeitos sobre a locomoção no aparato de Campo Aberto comparados com animais que receberam solução salina. No parâmetro locomoção periférica não foram encontradas diferenças entre os tratamentos. Entretanto, com a dose 10mg/kg houve um aumento no tempo gasto nos quadrantes centrais em relação às demais doses. Na locomoção total, a dose de 10 mg/kg aumentou a frequência de exploração em comparação a todos os tratamentos, e ratos que receberam a dose de 7 mg/kg apresentaram maior frequência de exploração em relação ao grupo tratado com solução salina. Entre as doses testadas, a de 5 mg/kg foi a maior dose que não interferiu na locomoção, sendo então a dose escolhida para o tratamento crônico. O tratamento crônico foi realizado durante três semanas com metilfenidato ou solução salina, sendo que o metilfenidato foi capaz de adiantar o horário de acrofase em ratos WIS e SHR em relação ao tratamento controle. Esse adiantamento não se manteve nos finais de semana, momento em que os animais não eram manipulados. Por esse motivo, concluímos que o efeito do metilfenidato não caracterizou um adiantamento de fase e sim um mascaramento. Os resultados não dão respaldo à ideia de que ratos SHR são um bom modelo para TDAH.

Palavras chave: TDAH, metilfenidato, SHR, ritmos circadianos.

ABSTRACT

The attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) is the most common disorder in childhood and methylphenidate is the most used treatment. A widely used animal model for ADHD is the spontaneously hypertensive rats (SHR), that exhibit locomotor hyperactivity, impulsivity and poor sustained attention. So far, the effect of methylphenidate on circadian rhythms was not evaluated in SHR rats. The aim of this study was evaluate the effect of administration of methylphenidate on circadian rhythms in this animal model. To evaluate parameters of rest/activity cycle, Wistar and SHR rats were maintained isolated in individual cages from postnatal day 28 in light/dark cycle 12:12 or constant darkness during 40 days. Locomotor activity was recorded during all the experiment. Activity data was grouped in 5-min bins, plotted in actograms and spectral analysis was performed. Both strains were synchronized to light/dark cycle, showing period of rest/activity cycle of 24 hours. Under constant darkness, Wistar rats expressed longer free-running periods {24.73(0.29)h} when compared to SHR rats {24.06(0.07)h}. To choose the dose of methylphenidate to use during the chronic treatment, acute administration of different doses of the drug (3; 5; 7 and 10 mg/kg) were performed in comparison to saline in rats with evaluation of treatment effect on locomotion parameters in the Open Field. There were no differences between treatments in peripheral locomotion. However, with the 10 mg/kg dose there was an increase in the time spent in the central quadrant compared to the other doses. In total locomotion, the dose of 10 mg/kg increased the frequency of exploration compared to other treatments, and the dose of 7 mg/kg increased the frequency compared to the saline control. Among the tested doses, 5 mg/kg was the highest dose that did not affect the locomotion and was chosen for the chronic treatment. Chronic treatment was carried out for three weeks with saline or methylphenidate. Methylphenidate was able to advance the time of acrophase in WIS and SHR rats compared to control treatment. This advance was not maintained during the weekends, when animals were not manipulated. Therefore, we conclude that the effect of methylphenidate did not feature an advance phase, but a masking condition. Also, the present results do not support the idea that SHR rats are a good model for ADHD.

Keyword: ADHD, methylphenidate, SHR, circadian rhythms.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DAT	–	Transportador de dopamina
DD	–	Condição de escuro constante
FDS	–	Fim de semana
LD	–	Condição de claro/escuro 12:12
MTP	–	Metilfenidato
PN	–	Dia pós-natal
SAL	–	Solução salina
SD	–	Ratos Sprague-Dawley
SEM	–	Semana
SHR	–	Ratos espontaneamente hipertensos
TDAH	–	Transtorno de déficit de atenção/hiperatividade
WIS	–	Ratos Wistar
WKY	–	Ratos Wistar-Kyoto

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
1.1	TRANSTORNO DE DÉFICIT DE ATENÇÃO/HIPERATIVIDADE	10
1.2	TRATAMENTOS PARA TDAH.....	11
1.3	MODELOS ANIMAIS DE TDAH.....	13
1.4	RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS (SHR)	14
1.5	OBJETIVOS	15
2	MATERIAIS E MÉTODOS	16
2.1	ANIMAIS	16
2.2	REGISTRO DA ATIVIDADE LOCOMOTORA.....	16
2.3	DESENHO EXPERIMENTAL.....	17
3	RESULTADOS	21
3.1	RITMO ATIVIDADE/REPOUSO DE RATOS WISTAR E SHR	21
3.2	ESCOLHA DA DOSE DE METILFENIDATO.....	26
3.3	EFEITO DO TRATAMENTO CRÔNICO COM METILFENIDATO SOBRE A RITMICIDADE CIRCADIANA DE RATOS SHR E WISTAR.....	28
3.4	SÍNTESE DOS PRINCIPAIS RESULTADOS.....	37
4	DISCUSSÃO.....	39
	REFERÊNCIAS.....	45
	ANEXOS	50

1 INTRODUÇÃO

1.1 TRANSTORNO DE DÉFICIT DE ATENÇÃO/HIPERATIVIDADE

O transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) é considerado o transtorno psiquiátrico mais comum na infância e na adolescência. Esse transtorno é caracterizado por um padrão crônico de desatenção e/ou hiperatividade/impulsividade, apresentando uma alta heterogeneidade clínica. Devido a seus sintomas, pode causar prejuízos ao desempenho acadêmico, à capacidade intelectual e às habilidades sociais (CORTESE et al., 2006; TSAI e HUANG, 2010). Não existe um marcador biológico para identificação do TDAH, portanto seu diagnóstico é fundamentado em um quadro clínico comportamental, de acordo com a quarta edição do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-IV). Nesta versão do manual existem nove sintomas de hiperatividade/impulsividade e nove sintomas de desatenção. De acordo com a quantidade de sintomas que o indivíduo apresenta e o tempo de duração dos mesmos, pode ser diagnosticado como TDAH do subtipo predominantemente desatento, subtipo predominantemente hiperativo/impulsivo ou subtipo combinado (PEREIRA et al., 2005).

A etiologia do Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade não está esclarecida, mas é considerado um transtorno complexo e multifatorial, causado pelas relações de fatores de risco genéticos e ambientais. A hipótese dopaminérgica para a explicação da fisiopatologia do TDAH aponta para um déficit de dopamina na região do córtex frontal e núcleo estriado. Esta hipótese é favorecida por evidências farmacológicas. Esse déficit levaria à manifestação dos sintomas cognitivos apresentados em pacientes com TDAH (COELHO et al., 2009).

Existem diversos estudos sobre o ciclo vigília/sono em pacientes com TDAH feitos por meio de relatos, actimetria ou polissonografia. Uma maior atividade motora durante a noite foi detectada em pacientes adultos com TDAH

em relação aos controles saudáveis (BAIRD et al., 2011). De acordo com o relato de pais, crianças diagnosticadas com TDAH apresentam pior qualidade de sono quando comparadas às crianças controle, entretanto esses resultados não se confirmam quando avaliadas em exame de polissonografia (CHOI et al., 2010). Uma meta-análise publicada em 2009, incluindo dezenove estudos, mostrou que existe uma maior resistência das crianças diagnosticadas com TDAH para se deitar, maior número de despertares noturnos e maior dificuldade para se levantar de manhã, quando comparadas a crianças controle, de acordo com o relato dos pais. Além disso, por meio da análise de dados de actimetria e polissonografia, foi observada maior latência, menor duração e menor eficiência de sono em crianças com TDAH (CORTESE et al., 2009). Apesar da variedade de estudos realizados até o momento, ainda não existe consenso sobre as relações entre sono, ritmicidade circadiana e TDAH (YOON et al., 2011).

1.2 TRATAMENTOS PARA TDAH

O tratamento para o TDAH é principalmente realizado com metilfenidato, psicoestimulante estruturalmente similar às anfetaminas (SWANSON et al., 2011), e tem sido o tratamento preferencial tanto para crianças quanto para adultos há décadas (BOONSTRA et al., 2007). O efeito do metilfenidato se daria pelo bloqueio da receptação da dopamina e noradrenalina em neurônios pré-sinápticos, levando a uma maior disponibilidade destas catecolaminas na fenda sináptica. A atomoxetina, um inibidor seletivo da recaptção de noradrenalina sem ação psicoestimulante, também é utilizada para o tratamento do TDAH (CORMAN et al., 2004). Entretanto, o uso da atomoxetina em pacientes com TDAH não é liberado no Brasil.

Alterações de sono têm sido propostas como associadas tanto ao TDAH como à medicação para o seu tratamento. Um estudo observou que o tratamento com metilfenidato aumenta a atividade motora entre se deitar e dormir, além de atrasar os horários de sono e diminuir a amplitude da ritmicidade circadiana (IRONSIDE et al., 2010). Outro estudo demonstra que

crianças tratadas com metilfenidato apresentam maior latência de sono, passam menos tempo na cama e menos tempo dormindo. Porém, quando o uso do metilfenidato é suspenso, essas variáveis se assemelham às das crianças controle (GALLAND et al., 2010). Os ritmos circadianos possuem duração aproximada de 24 horas, tendo como principal característica seu caráter endógeno e a capacidade de sincronização com pistas ambientais, principalmente o ciclo claro/escuro. O período de um ritmo biológico é resultado de sua ritmicidade endógena gerada por um oscilador interno e sua interação com o ambiente. Ainda que em condições ambientais constantes, os ritmos continuam a ser expressos, evidenciando seu caráter endógeno. Essa situação em que se exhibe ritmicidade na ausência de pistas e em condições constantes é chamada de livre-curso (GOLOMBEK e ROSENSTEIN, 2010). Além do estímulo fótico, calendário social e disponibilidade de comida são exemplos de sincronizadores. Em mamíferos, a estrutura responsável pela integração de informações ambientais ao ritmo endógeno se localiza nos núcleos supraquiasmáticos do hipotálamo.

Sabe-se que em roedores, a administração crônica de anfetamínicos regularmente no mesmo horário, leva a uma antecipação comportamental à droga, que estaria relacionada ao hipotético oscilador sincronizado pela meta-anfetamina (TATAROGLU et al., 2006). Dessa forma, psicoestimulantes seriam capazes de promover a sincronização da ritmicidade circadiana em roedores. Além disso, alterações de fase também foram observadas com uma administração única de atomoxetina em camundongos (O'KEEFFE et al., 2012).

Parâmetros de atividade locomotora e comportamento estereotipado foram avaliados após administração única de metilfenidato em diferentes concentrações em ratos Sprague–Dawley (GAYTAN et al., 1996; GAYTAN et al., 1997). Efeitos do tratamento prolongado com metilfenidato também foram avaliados por meio de variações nos padrões de atividade comportamental diurna em ratos Sprague–Dawley e ratos Wistar (ALGAHIM et al., 2009; ALGAHIM et al., 2010; GOMES et al., 2009; LEE et al., 2011). Assim como as relações entre sono, ritmicidade circadiana e TDAH, o efeito da utilização de estimulantes sobre parâmetros de atividade/repouso ainda não está claro.

1.3 MODELOS ANIMAIS DE TDAH

Existem diversos modelos animais de TDAH (ARIME et al., 2011), dentre eles camundongos nocaute para o transportador de dopamina (DAT) e modelos baseados em exposições a toxinas, como a administração intracisterna de 6-hidroxidopamina em ratos neonatos. Estes modelos devem mimetizar os principais comportamentos encontrados no transtorno (hiperatividade locomotora, impulsividade e atenção reduzida), sendo revertidos por meio de tratamento farmacológico.

Camundongos nocaute para DAT não expressam o transportador de dopamina, responsável pela remoção da dopamina extracelular. Esses camundongos apresentam hiperatividade locomotora quando colocados em ambientes novos, além de aprendizagem e memória prejudicada. A validade deste modelo se dá pelo fato do tratamento com metilfenidato reduzir a hiperatividade. Todavia, existem limitações para estes animais, como o fato de não possuírem a proteína DAT, alvo da ação do metilfenidato e anfetamina (ARIME et al., 2011). O modelo de administração intracisterna de 6-hidroxidopamina em ratos neonatos se baseia na lesão de neurônios, levando a uma diminuição nos níveis de noradrenalina e dopamina. Esses animais lesionados possuem hiperatividade locomotora entre os dias pós-natal 21 e 45, assim como déficit na aprendizagem e memória (BREESE et al., 2005). Camundongos mutantes *colboma* (nocaute do gene SNAP-25) apresentam hiperatividade locomotora espontânea, mas o tratamento com metilfenidato não é capaz de diminuir a hiperatividade, e sim aumentá-la (ARIME et al., 2011). Pela ausência de efeito do metilfenidato e a falta de evidência de outros comportamentos que mimetizam os de TDAH, a validação deste modelo ainda é questionável. O modelo de hipóxia neonatal gera sintomas de hiperatividade e dificuldade de aprendizagem, sendo que a hiperatividade locomotora é normalizada entre a sexta e nona semana de vida. O tratamento com anfetamina é capaz de reduzir a hiperatividade locomotora, mas este modelo

ainda necessita de outros estudos para atestar sua validade (VAN DER KOOIJ & GLENNON, 2007).

Existem outros modelos menos utilizados, mas que também simulam os sintomas encontrados no TDAH. Entretanto, o modelo mais estudado e mais validado é o que utiliza animais espontaneamente hipertensos (SHR) (SAGVOLDEN et al., 2009).

1.4 RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS (SHR)

Os SHR são usualmente utilizados como modelo animal de hipertensão (SAFAR et al., 2001). Entretanto, além de alterações no sistema cardiovascular, os SHR também apresentam comportamento diferenciado em relação às linhagens Wistar, Wistar-Kyoto e Sprague-Dawley (SAGVOLDEN et al., 2009). Uma destas diferenças comportamentais é a hiperatividade locomotora. Devido à hiperatividade, esta linhagem passou também a ser utilizada como modelo animal de déficit de atenção/hiperatividade (SAGVOLDEN et al., 1993). Apesar das características encontradas em ratos SHR serem compatíveis com TDAH, a hipertensão não é uma comorbidade comum em pacientes com o transtorno. Porém, esses animais não apresentam hipertensão antes da fase adulta, sendo mais fiéis às características do transtorno em crianças quando utilizados na fase pré-púbere (ARIME et al., 2011).

Outros comportamentos comumente associados com o TDAH além da hiperatividade também foram observados nos SHR em relação a animais controles. Em estudo envolvendo procedimento de escolha intertemporal, na qual o indivíduo pode escolher entre uma pequena recompensa de entrega imediata ou uma maior recompensa com um maior tempo de espera, os SHR mostraram realizar mais escolhas impulsivas do que o controle Wistar-Kyoto (FOX et al., 2008). Ratos SHR apresentam também atenção reduzida (SAGVOLDEN, 2000) e pior desempenho em testes de memória espacial e memória de trabalho quando comparados a ratos controle (CLEMENTS e WAINWRIGHT, 2006; NAMAKURA-PALACIOS et al., 1996; PREDIGER et al.,

2005). Estes parâmetros associados com o TDAH foram revertidos em tratamento crônico com metilfenidato, a droga comumente utilizada no tratamento do TDAH (THANOS et al., 2010). Além de parâmetros comportamentais, ratos SHR apresentam deficiência na liberação de dopamina no córtex pré-frontal, núcleo accumbens e estriado (ARIME et al., 2011).

Apesar da existência de diversos estudos sobre ratos SHR, ainda existem poucas pesquisas acerca do efeito do tratamento crônico com metilfenidato sobre parâmetros de ritmicidade circadiana neste modelo animal.

1.5 OBJETIVOS

Comparar parâmetros do ritmo atividade/repouso de ratos Wistar e SHR.

Avaliar o efeito da administração crônica de metilfenidato sobre a ritmicidade circadiana em ratos espontaneamente hipertensos, modelo animal de TDAH.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 ANIMAIS

Ratos Wistar (WIS) machos e fêmeas adultos foram fornecidos pelo biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Ratos SHR machos e fêmeas adultos foram fornecidos pelo professor Reinaldo Takahashi do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina. Os animais foram mantidos sob temperatura controlada ($22\pm 3^{\circ}\text{C}$), ciclo claro/escuro de 12:12 (luzes acessas às 7h e apagadas às 19h), com água e ração *ad libitum*. Os experimentos realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFPR, protocolo #630) (ANEXO 1).

Para cada um dos experimentos que envolvia o registro de atividade locomotora, foram realizados os cruzamentos entre ratos machos e fêmeas de cada linhagem, sempre mantidos em ciclo claro/escuro 12:12. Vinte e um dias após o nascimento foi realizado o desmame, com os filhotes sendo separados por sexo, e os machos de cada ninhada colocados no aparato de registro de atividade locomotora para uma semana de adaptação. A partir deste momento os animais foram mantidos isolados em gaiolas individuais. O registro de atividade para cada experimento teve início no dia pós-natal (PN) 21, sendo registrada como semana de adaptação até o dia PN28, quando iniciaram os experimentos.

2.2 REGISTRO DA ATIVIDADE LOCOMOTORA

Para o registro da atividade locomotora o Sistema de Aquisição de Controle, desenvolvido pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), foi utilizado. O sistema consiste em um sensor de presença acoplado acima da caixa do animal conectado a uma placa de aquisição de dados

(iUSBDAQ – U120816AO) ligada via USB em um computador (FIGURA 1). Os dados da placa de aquisição são computados pelo programa SAP (Software de Aacionamento Programado). Durante todos os experimentos, enquanto os ratos estiveram isolados e em suas respectivas caixas, a atividade locomotora foi registrada para análises posteriores.

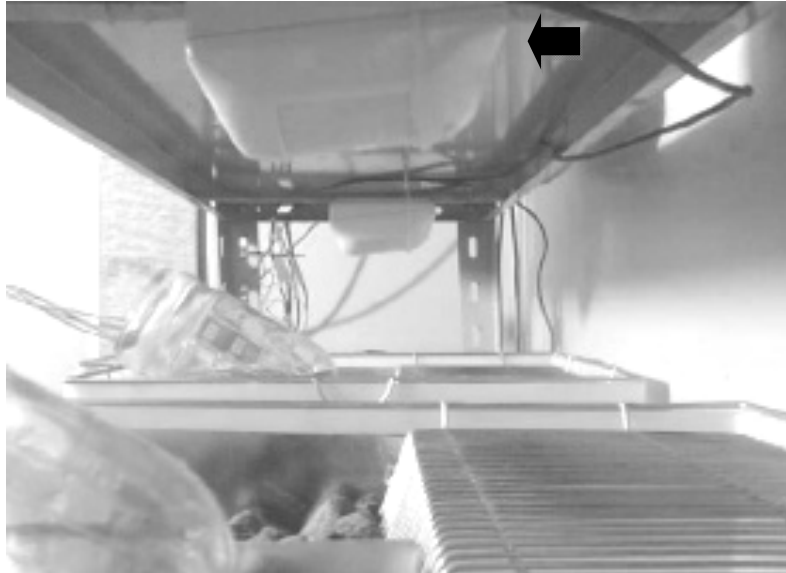


FIGURA 1. Exemplo de uma estante com o sensor de presença acoplado acima das caixas. A seta preta indica o sensor de presença.

2.3 DESENHO EXPERIMENTAL

2.3.1 Comparação entre ratos Wistar e SHR em ciclo claro/escuro 12:12

Para avaliação da sincronização ao ciclo claro/escuro, ratos Wistar e SHR (cinco animais por grupo) foram mantidos isolados em gaiolas individuais a partir do dia PN28 em ciclo claro/escuro 12:12, temperatura controlada ($22\pm 3^{\circ}\text{C}$) e água e ração *ad libitum*, durante 40 dias. Os dados de atividade foram agrupados em blocos de 5 minutos para a construção de actogramas. A capacidade de sincronização ao ciclo claro/escuro, atividade locomotora total e durante a fase clara e escura e a atividade locomotora hora a hora foram

comparadas entre as linhagens. Para comparar as médias obtidas entre as linhagens foi utilizado o teste t de Student. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

2.3.2 Comparação do ritmo endógeno entre ratos Wistar e SHR

Para avaliação da ritmicidade circadiana em situação de livre-curso, ratos Wistar e SHR (cinco animais por grupo) foram mantidos isolados em gaiolas individuais a partir do dia PN28 em escuro constante (< 0.5 lux), temperatura controlada ($22 \pm 3^\circ\text{C}$) e água e ração *ad libitum*, durante 40 dias. Os dados de atividade foram agrupados em blocos de 5 minutos para construção de actogramas. O período circadiano endógeno foi avaliado por meio da análise dos periodogramas, utilizando o algoritmo de Sokolove-Bushell. Para avaliar possíveis diferenças entre as linhagens foi utilizado o teste t de Student e valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

2.3.3 Escolha da dose de metilfenidato

Para a escolha da dose de metilfenidato a ser utilizada no tratamento crônico, foram feitas aplicações agudas de solução salina ou metilfenidato nas doses de 3 mg/kg, 5 mg/kg, 7 mg/kg e 10 mg/kg, por via intraperitoneal, em ratos Wistar machos adultos, pesando em média 325(23)g. Foram utilizados 11 animais por grupo, exceto para a maior dose que possuía apenas cinco animais. A dose de 10 mg/kg foi feita com menor quantidade de animais devido ao aumento de comportamentos estereotipados, tendo menor efeito na locomoção. Trinta minutos após administração da droga os animais foram testados no campo aberto.

O aparato de campo aberto consiste em círculo de acrílico com 90 cm de diâmetro e paredes de 30 cm de altura. O fundo do aparato é branco e marcado por três círculos concêntricos. O círculo mais externo é dividido em 12

retângulos disformes, o círculo médio é dividido em seis retângulos e o círculo central não apresenta divisões. No teste de campo aberto, o animal é colocado no centro da arena e é deixado para explorar durante 5 minutos. Comportamentos como a locomoção total e a frequência da exploração do círculo central podem ser analisadas por registros de vídeo feitos durante o teste. A locomoção é contabilizada pelo número de retângulos invadidos com as quatro patas pelo animal. Por meio deste teste é possível avaliar a locomoção do animal e a reação a tratamentos farmacológicos. Foram analisadas a frequência de entrada na periferia, frequência de entrada na região central e locomoção total. A dose a ser utilizada nos experimentos seguintes foi escolhida de maneira a não afetar a locomoção do animal, ou seja, a maior dose testada que não provoca aumento da atividade locomotora do animal.

As variáveis de locomoção obtidas foram analisadas por ANOVA de uma via, seguidas por *post-hoc* Fisher. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

2.3.4 Efeito do tratamento crônico com metilfenidato sobre a ritmicidade circadiana de ratos SHR e Wistar

Ratos Wistar e SHR foram mantidos isolados em gaiolas individuais a partir do dia PN21 em ciclo claro/escuro 12:12, temperatura controlada ($22 \pm 3^\circ\text{C}$) e água e ração *ad libitum*. Os animais foram tratados cronicamente com metilfenidato 5m g/kg (via intraperitoneal) durante três semanas a partir do dia PN28. A administração foi realizada às 17h30 e ocorreu apenas de segunda a sexta-feira. O tratamento ocorreu do mesmo modo como feito em crianças que são tratadas com metilfenidato, as quais utilizam o medicamento cerca de uma hora antes do período escolar. A administração foi escolhida para ser realizada neste horário coincidindo com o aumento antecipatório da atividade motora devido ao apagar das luzes às 19h. Os dados de atividade foram agrupados em blocos de 5 minutos para construção de actogramas, e os

parâmetros analisados foram a acrofase¹ da atividade dos animais e as médias de atividade locomotora de hora em hora. As médias das acrofases obtidas foram comparadas por meio de ANOVA de medidas repetidas, seguidas por *post-hoc* Fisher. A atividade locomotora foi avaliada a cada hora por ANOVA de uma via, seguidas por *post-hoc* Fisher. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

¹ Acrofase: Horário no qual a probabilidade de se encontrar o valor mais elevado de uma variável, a partir da curva senoidal ajustada aos dados, é maior.

3 RESULTADOS

3.1 RITMO ATIVIDADE/REPOUSO DE RATOS WISTAR E SHR

Ambas as linhagens estudadas mostraram-se sincronizadas ao ciclo claro/escuro, com ritmo circadiano de atividade/repouso com período de 24h durante o primeiro experimento, como mostrado na figura 2.

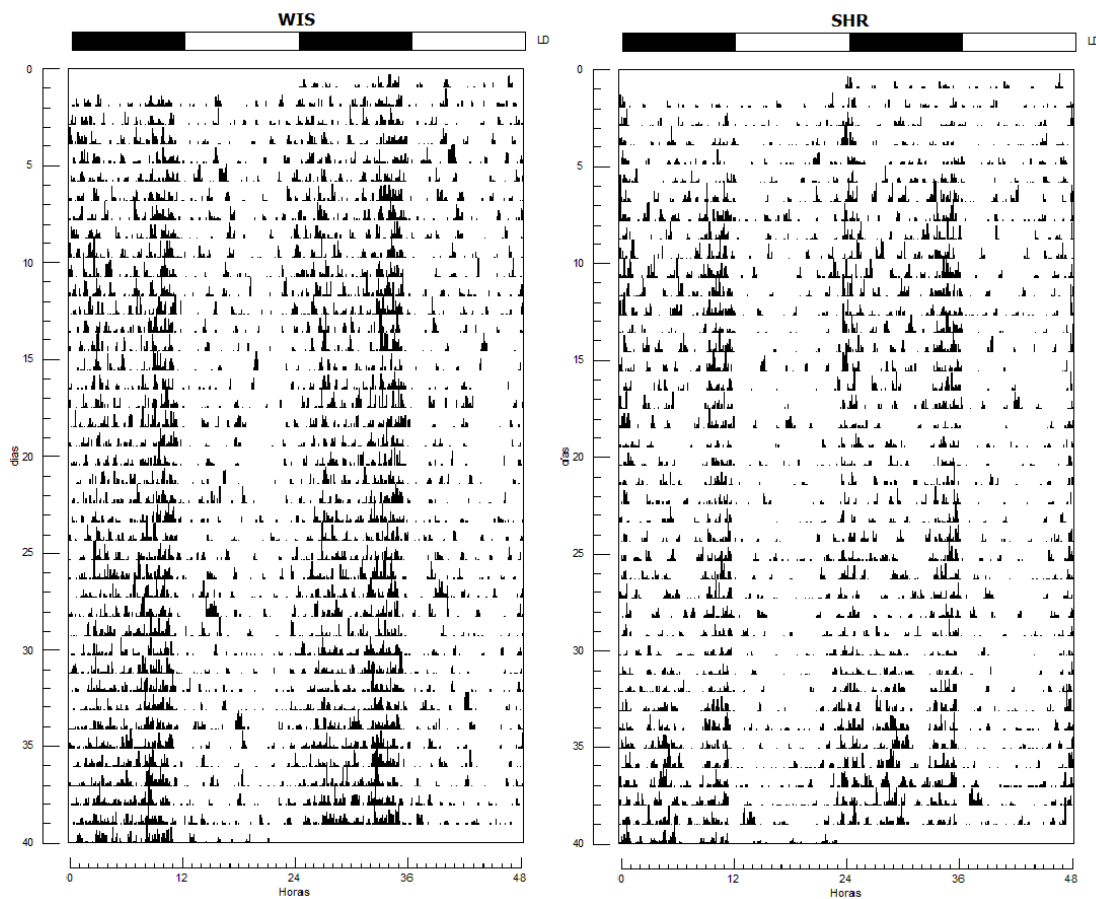


FIGURA 2. Actogramas de ratos mantidos em ciclo claro/escuro 12:12. O gráfico está duplicado na horizontal para facilitar a visualização dos dados. Cada linha representa um dia, e as barras verticais pretas indicam atividade do animal. Ritmo de atividade/repouso sincronizado com acender e apagar das luzes. WIS – Exemplo de actograma de rato Wistar. SHR – Exemplo de actograma de rato espontaneamente hipertenso.

As atividades nas fases clara e escura, assim como a atividade motora total, não foram diferentes entre ratos Wistar {fase clara: 730,35(129,89); fase escura: 2320,85(426,18); atividade total: 3051,22(506,81)} e ratos SHR {fase clara: 757,73(100,60); fase escura: 2279,00(218,40); atividade total: 3036,72(289,76)} ($p=0,7191$; $p=0,8499$; $p=0,9571$, respectivamente) (FIGURA 3). Não houve diferença entre as linhagens para a razão entre a fase de atividade (fase escura) e fase de repouso (fase clara) ($p=0,6111$) (FIGURA 4).

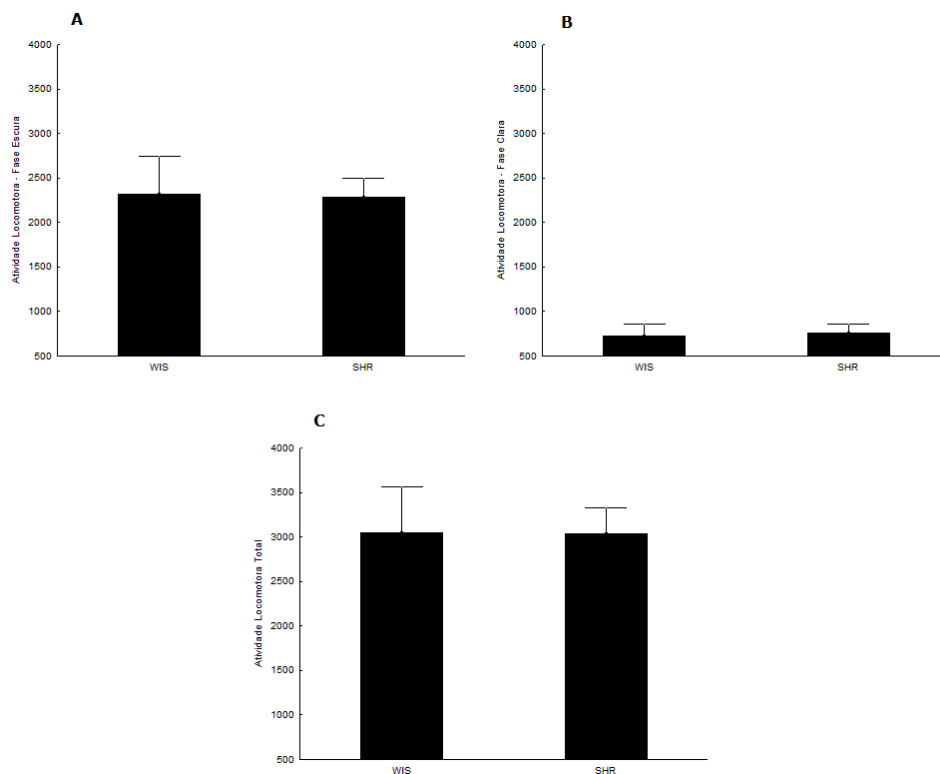


FIGURA 3. (A) Atividade locomotora média durante a fase escura. (B) Atividade locomotora média durante a fase clara. (C) Atividade locomotora média durante as 24 horas. Não foram encontradas diferenças significativas entre as linhagens. WIS – Ratos Wistar. SHR – Ratos espontaneamente hipertensos.

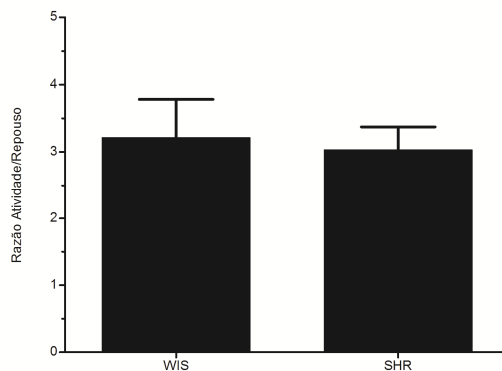


FIGURA 4. Razão entre a atividade locomotora nas fases de atividade e repouso (atividade na fase escura/atividade na fase clara). Não foram encontradas diferenças significativas entre as linhagens. WIS – Ratos Wistar. SHR – Ratos espontaneamente hipertensos.

A figura 5 representa a média de atividade locomotora de ambas as linhagens de hora em hora, ao longo de 24 horas. Ratos SHR apresentaram maior atividade locomotora em comparação a ratos Wistar em 4 horários: à 1 hora {WIS: 10,48(3,17); SHR: 15,67(3,36); $p=0,0365$ }, às 16 horas {WIS: 2,52(1,15); SHR: 5,04(0,77); $p=0,0036$ }, às 18 horas {WIS: 6,65(2,13); SHR: 10,30(1,72); $p=0,0177$ } e às 19 horas {WIS: 13,30(5,22); SHR: 24,03(4,40); $p=0,0136$ }.

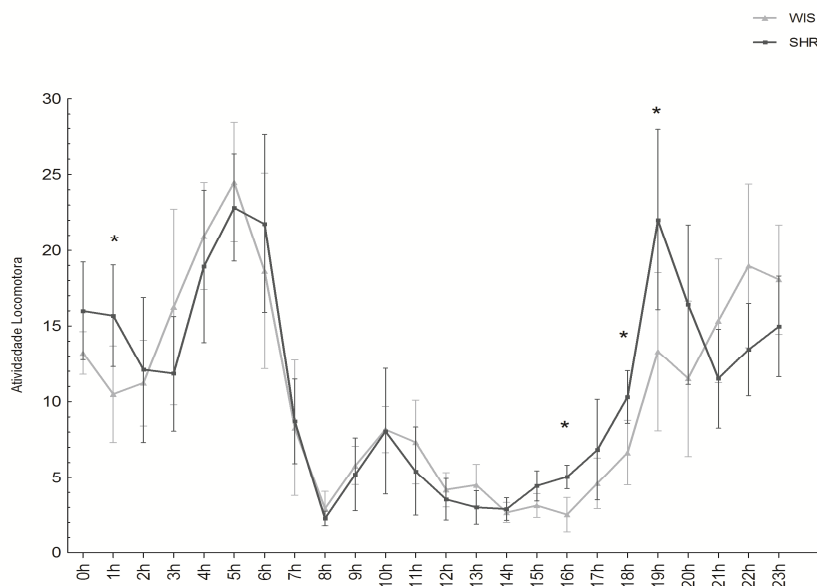


FIGURA 5. Curva representando padrão de atividade locomotora ao longo de 24 horas. Ratos Wistar representados em linha cinza. Ratos SHR representados em linha preta. Foram encontradas diferenças na atividade locomotora a 1, 16, 18 e 19 horas. * $p<0,05$.

No experimento para comparação do ritmo em livre-curso entre as linhagens, houve perda dos dados de atividade de um rato Wistar devido a problemas no sensor de locomoção. Portanto, o grupo Wistar ficou com amostra final de 4 animais e o grupo SHR com 5 animais. Em escuro constante houve diferenças no período endógeno quando as duas linhagens foram comparadas (FIGURA 6). Ratos Wistar expressaram um período endógeno maior {24,73(0,29)h} quando comparados aos ratos SHR {24,06(0,07)h} ($p=0,0015$), como pode ser visto nas figuras 7 e 8.

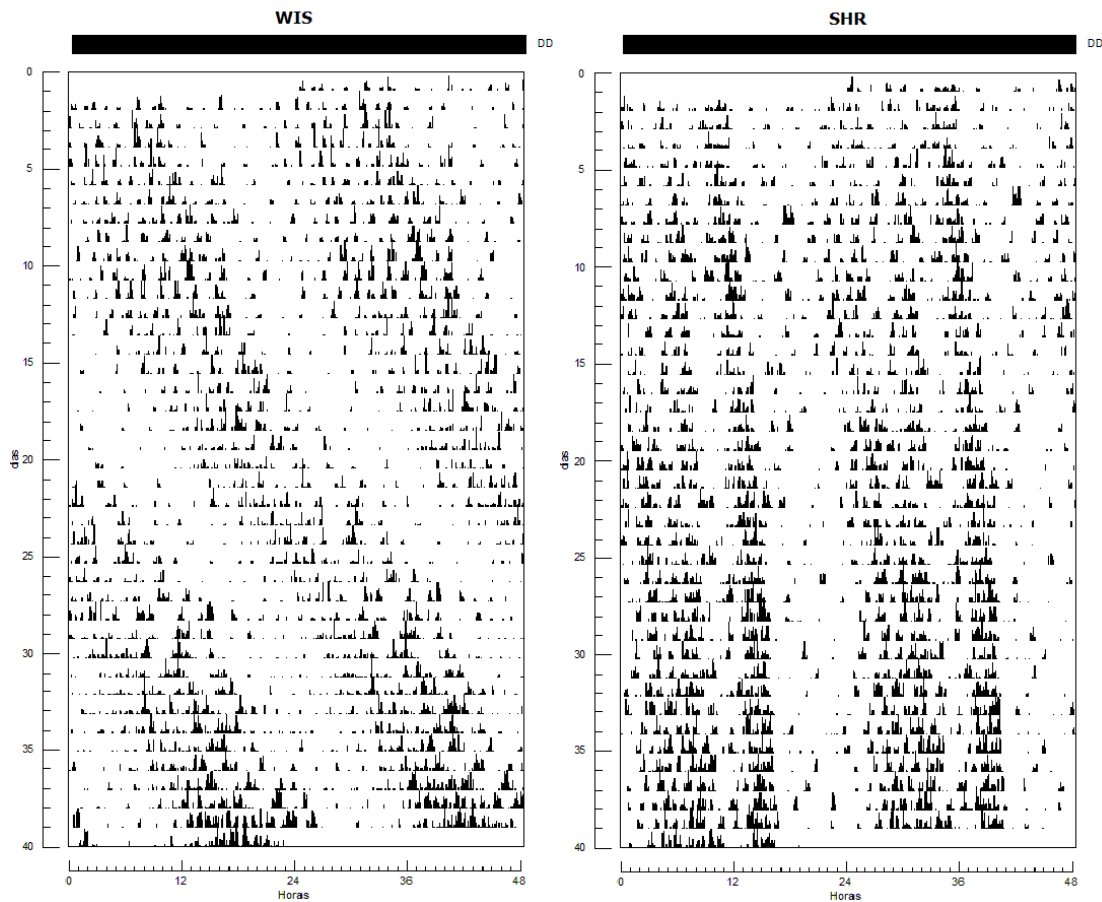


FIGURA 6. Actogramas de ratos mantidos em escuro constante, expressando seus períodos endógenos. O gráfico está duplicado na horizontal para facilitar a visualização dos dados. Cada linha representa um dia, e as barras verticais pretas indicam atividade do animal. WIS – Exemplo de actograma de rato Wistar. SHR – Exemplo de actograma de rato espontaneamente hipertenso.

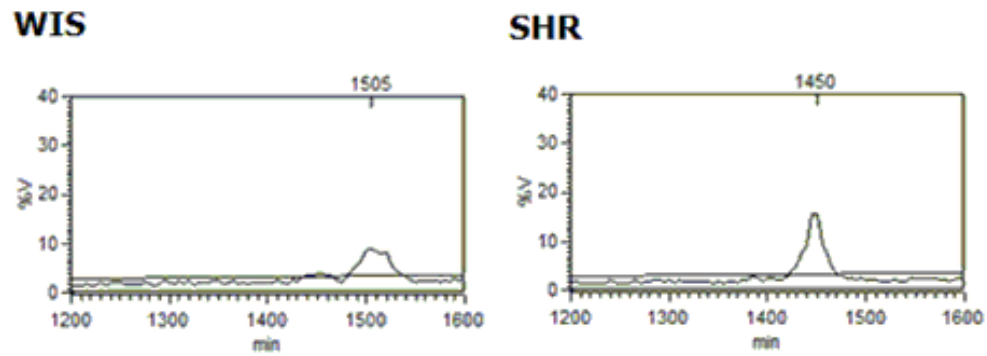


FIGURA 7. Resultado da análise de periodograma de Sokolov-Bushell. WIS – Exemplo de rato Wistar, expressando período endógeno maior do que 24 horas (1440 minutos). SHR – Exemplo de rato SHR expressando período endógeno próximo de 24 horas (1440 minutos).

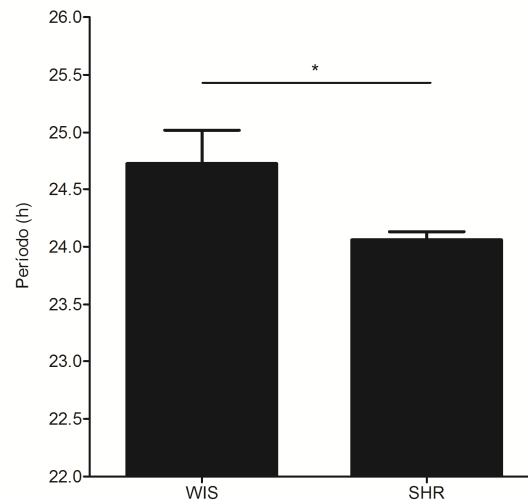


FIGURA 8. Período endógeno médio das duas linhagens mantidas em escuro constante. *Diferença no período endógeno entre ratos WIS e SHR ($p < 0,05$).

3.2 ESCOLHA DA DOSE DE METILFENIDATO

No teste de campo aberto realizado para escolha da dose de metilfenidato a ser utilizada no tratamento crônico, não foram encontradas diferenças entre as doses do medicamento utilizadas no parâmetro locomoção periférica ($p=0,4352$) (FIGURA 9). Entretanto, com a dose 10 mg/kg houve um aumento no tempo gasto nos quadrantes centrais em relação às demais doses ($p=0,0144$) (FIGURA 10).

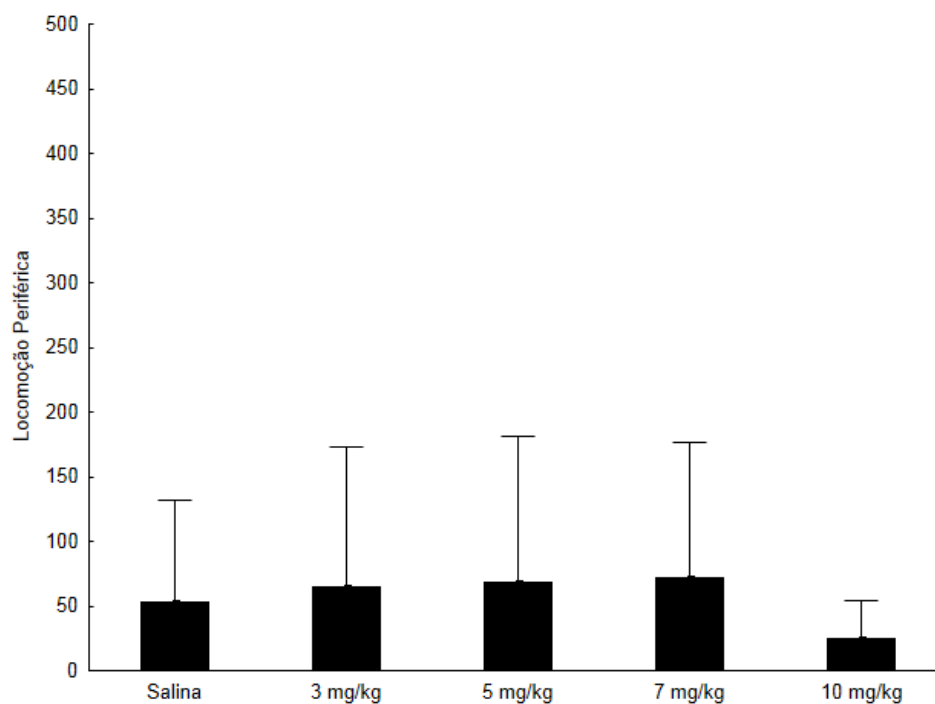


FIGURA 9. Locomoção periférica no aparato de Campo Aberto nas cinco doses utilizadas. Não foram encontradas diferenças entre os tratamentos no parâmetro locomoção periférica.

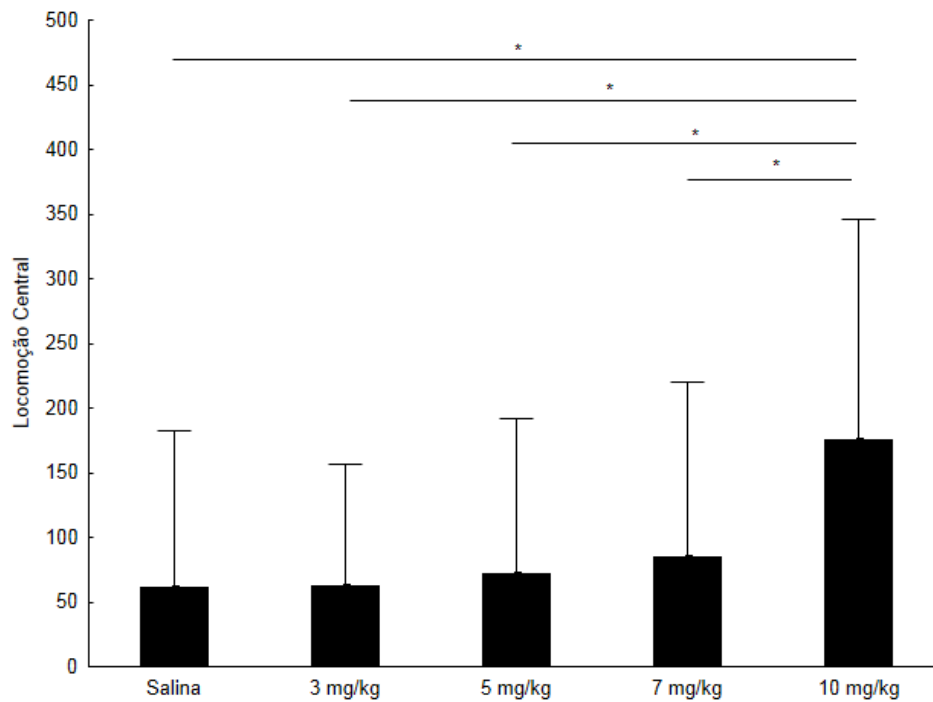


FIGURA 10. Locomoção central no aparato de Campo Aberto nas cinco doses utilizadas. *Diferença entre os tratamentos no parâmetro locomoção central ($p < 0,05$).

Na locomoção total, a dose de 10 mg/kg aumentou a frequência de exploração em comparação a todos os tratamentos, e a dose de 7 mg/kg mostrou-se maior em relação ao controle salina ($p = 0,0026$) (FIGURA 11). Entre as doses testadas, a de 5 mg/kg foi a maior dose que não interferiu na locomoção, sendo então a dose escolhida para o tratamento crônico.

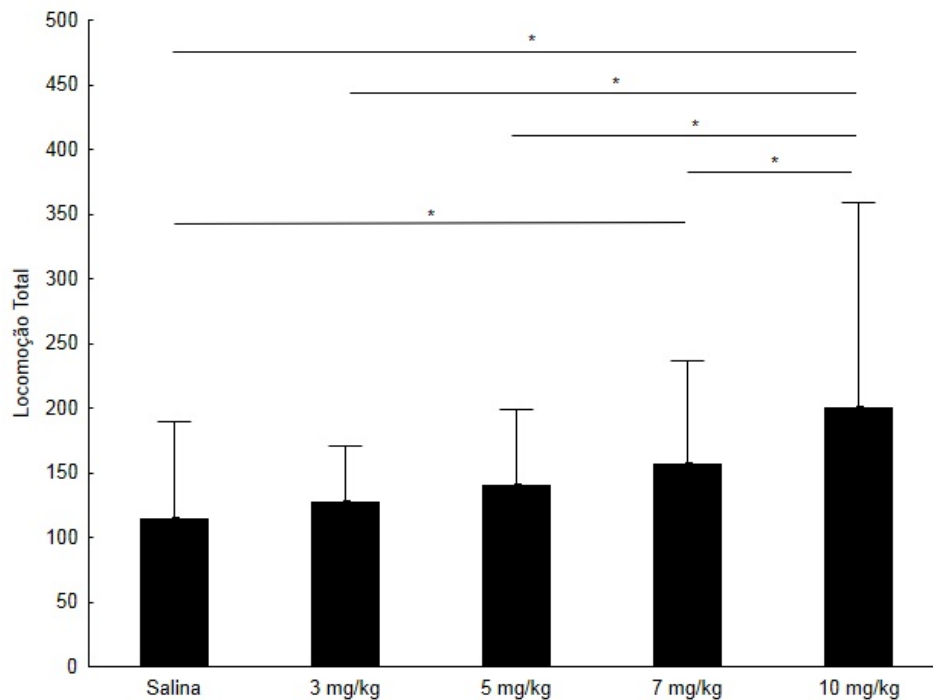


FIGURA 11 Locomoção total no aparato de Campo Aberto nas cinco doses utilizadas. *Diferença entre os tratamentos no parâmetro locomoção total ($p < 0,05$).

3.3 EFEITO DO TRATAMENTO CRÔNICO COM METILFENIDATO SOBRE A RITMICIDADE CIRCADIANA DE RATOS SHR E WISTAR

Para avaliar o tratamento com metilfenidato, foram utilizados os dados do início da segunda ao final da terceira semana de tratamento (PN35 a PN48), devido à maior consolidação do ritmo em relação às outras semanas (semana de habituação – PN21 a PN27 e primeira semana de tratamento – PN28 a PN34). Os actogramas abaixo demonstram exemplos de ratos WIS e SHR, com os dados de todas as quatro semanas de experimento (FIGURA 12 e 13).

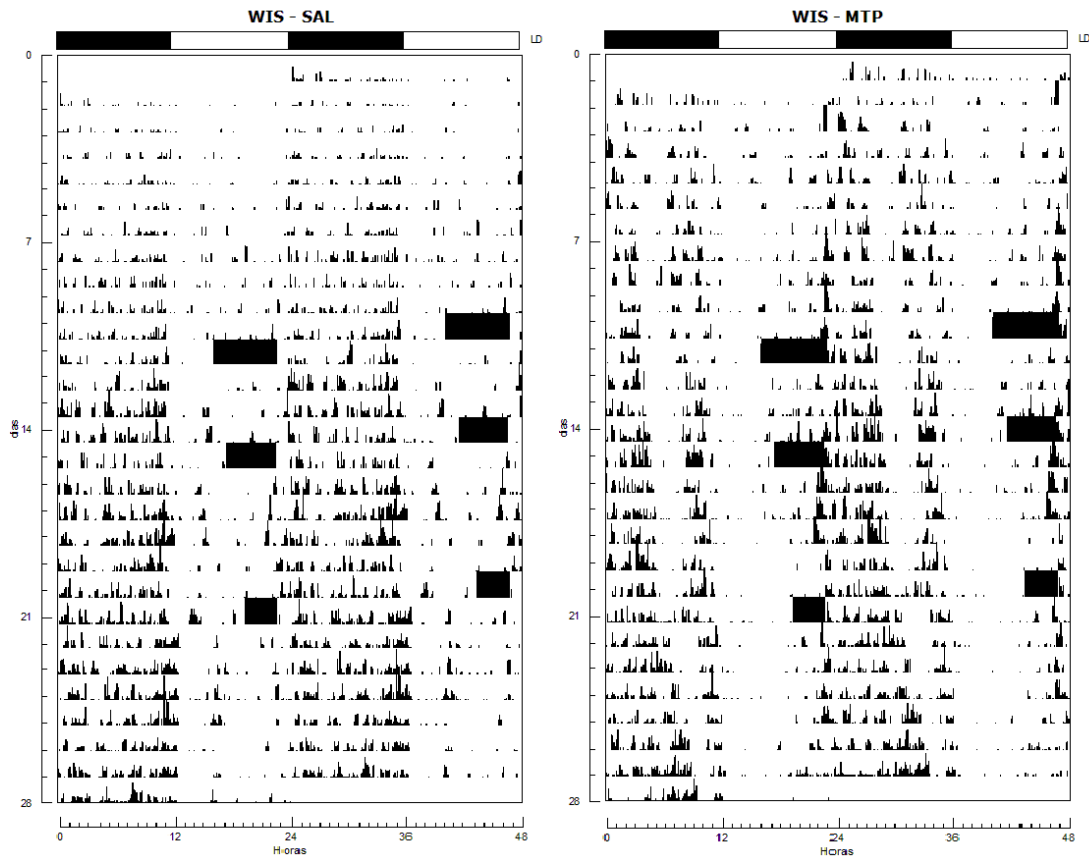


FIGURA 12. Actogramas de ratos mantidos em ciclo claro/escuro 12:12. O gráfico está duplicado na horizontal para facilitar a visualização dos dados. Cada linha representa um dia, e as barras verticais pretas indicam atividade do animal. Ritmo de atividade/repouso sincronizado com acender e apagar das luzes. WIS – SAL: Exemplo de actograma de rato Wistar tratado com solução salina. WIS – MTP: Exemplo de actograma de rato Wistar tratado com metilfenidato. As barras pretas contínuas demarcam perda de dados.

Para avaliar a acrofase, ou seja, o horário no qual existe a maior probabilidade de se encontrar o pico de atividade locomotora destes animais durante o tratamento com solução salina ou metilfenidato, foram utilizados dados de 48 horas de cada uma das semanas (SEM – com tratamento) e 48 horas de cada fim de semana (FDS – sem tratamento). Os valores de acrofase para cada grupo em cada um dos momentos analisados podem ser encontrados na tabela 1 (ANEXO 2).

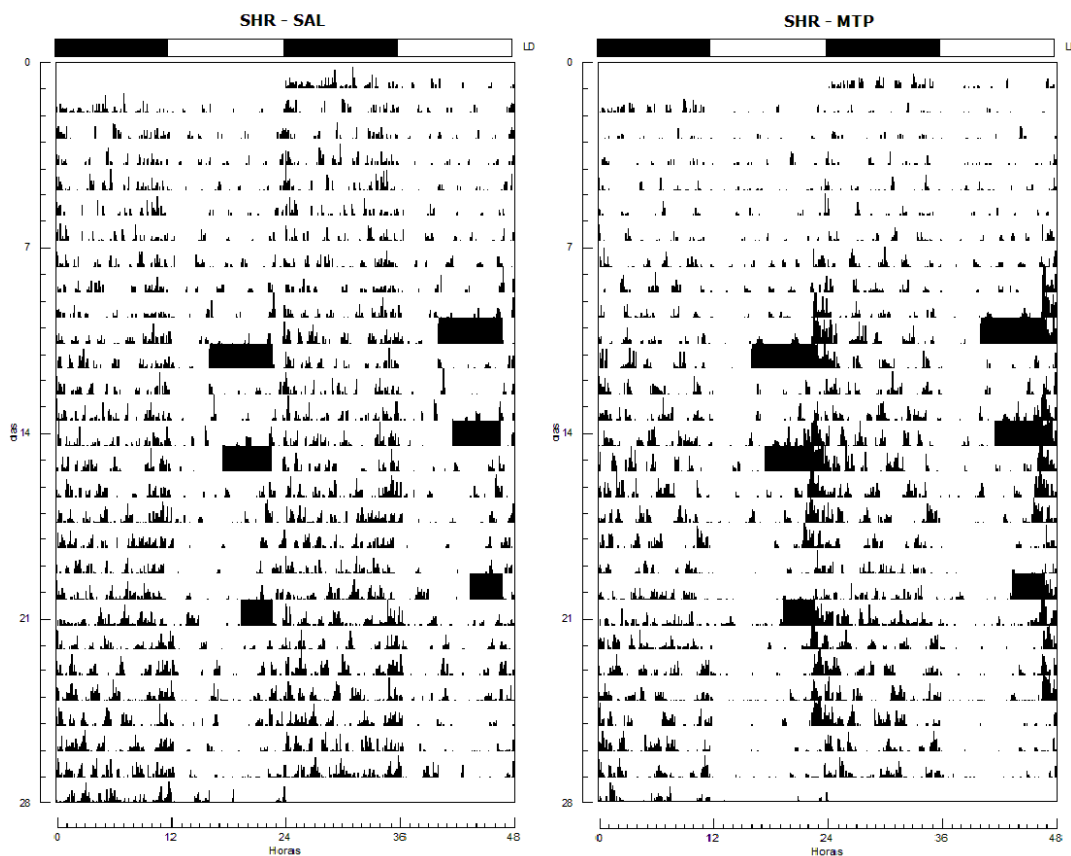


FIGURA 13. Actogramas de ratos mantidos em ciclo claro/escuro 12:12. O gráfico está duplicado na horizontal para facilitar a visualização dos dados. Cada linha representa um dia, e as barras verticais pretas indicam atividade do animal. Ritmo de atividade/repouso sincronizado com acender e apagar das luzes. SHR – SAL: Exemplo de actograma de rato SHR tratado com solução salina. SHR – MTP: Exemplo de actograma de rato SHR tratado com metilfenidato. As barras pretas contínuas demarcam perda de dados.

Na segunda semana de tratamento (SEM 2), os grupos tratados com solução salina apresentaram o pico de atividade em horário mais tardio {WIS-SAL: 3:28(0:42)h; SHR-SAL: 3:15(1:29)h} em relação aos grupos tratados com metilfenidato {WIS-MTP: 1:11(2:16)h; SHR-MTP: 0:38(1:35)h}, {(WIS-SAL x WIS-MTP: $p=0,0132$); (WIS-SAL x SHR-MTP: $p=0,0026$); (SHR-SAL x SHR-MTP: $p=0,0053$); (SHR-SAL x WIS-MTP: $p=0,0245$)} (FIGURA 14).

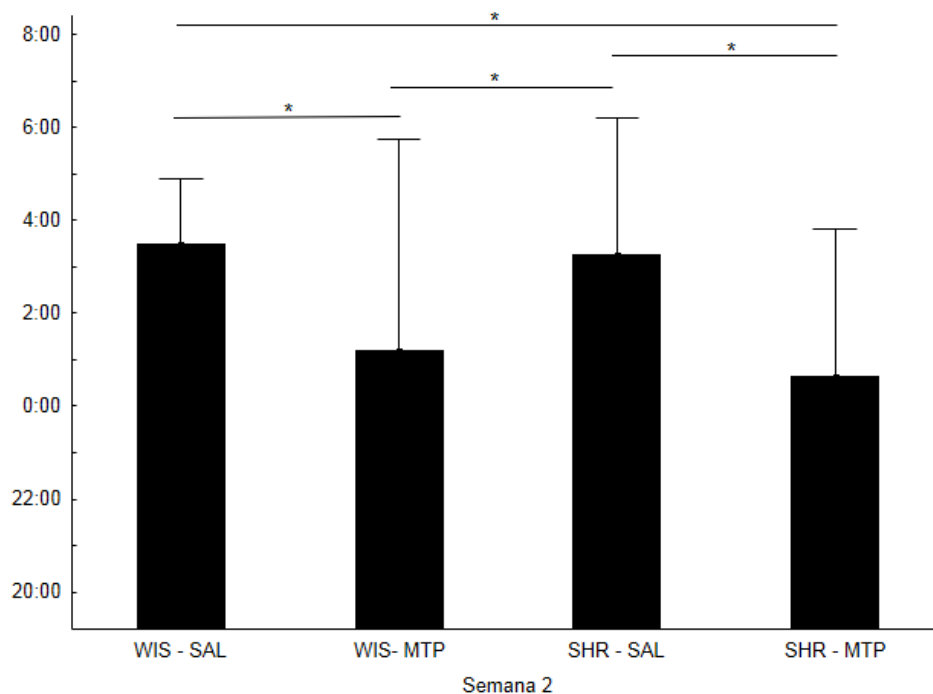


FIGURA 14. Acrofases médias para os diferentes grupos durante a segunda semana de tratamento. * $p < 0,05$.

Na terceira semana, tanto o grupo WIS-SAL {3:23(1:48)h} quanto WIS-MTP {2:47(1:54)h} apresentou acrofase tardia quando comparado ao grupo SHR-MTP {0:51(1:09)h}, ($p=0,0064$ e $p=0,0344$, respectivamente) (FIGURA 15). Durante os finais de semanas, não foram encontradas diferenças entre os grupos (FIGURA 16 e 17).

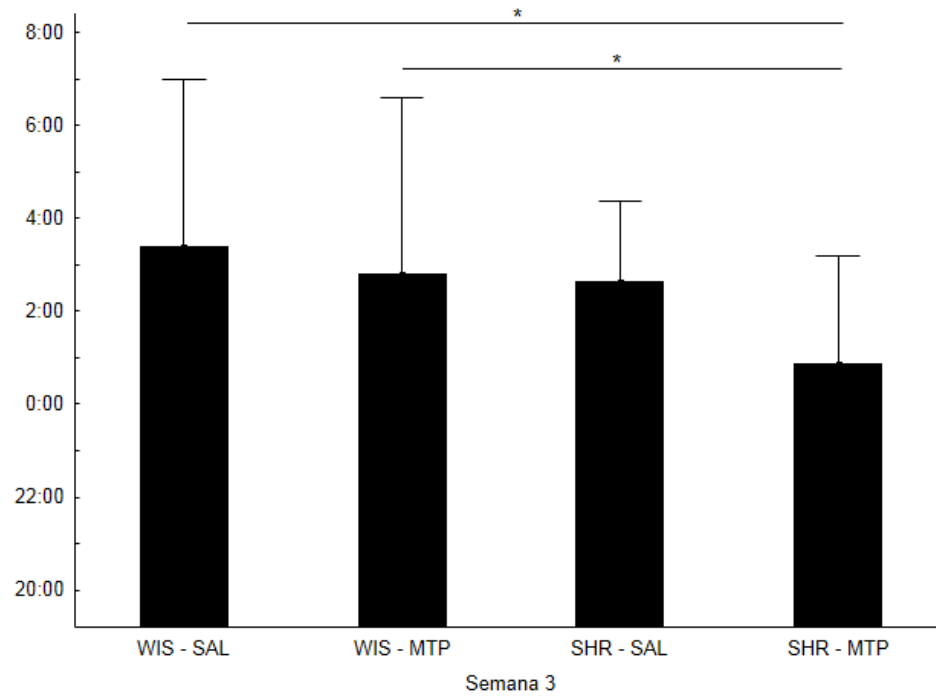


FIGURA 15. Acrofasas médias para os diferentes grupos durante a terceira semana de tratamento. * $p < 0,05$.

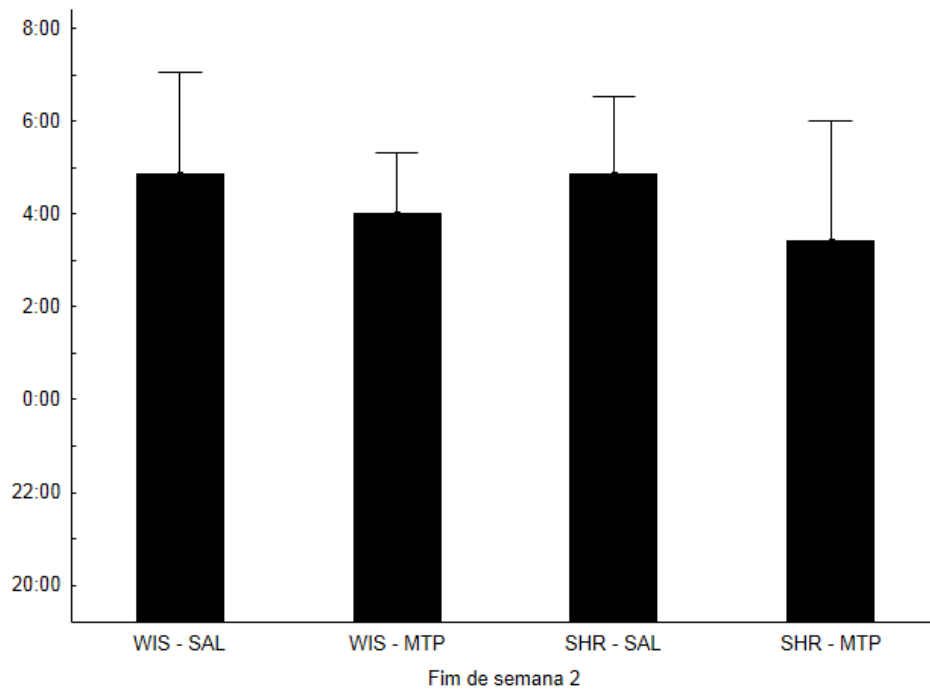


FIGURA 16. Acrofasas médias para os diferentes grupos durante o fim de semana da segunda semana de tratamento. Não foram encontradas diferenças significativas.

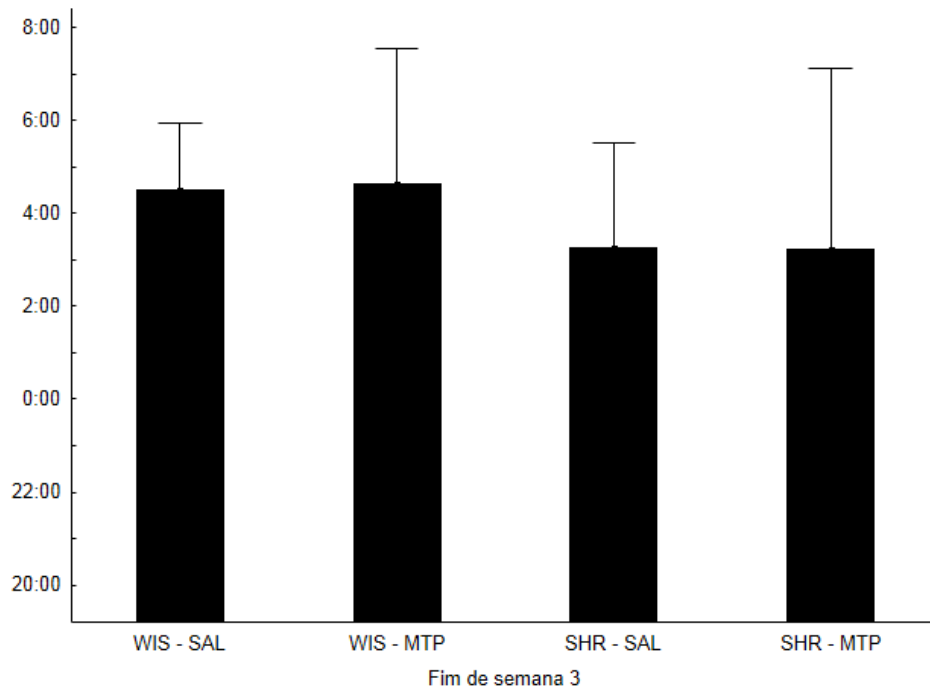


FIGURA 17. Acrofases médias para os diferentes grupos durante o fim de semana da segunda semana de tratamento. Não foram encontradas diferenças significativas.

Analisando dentro do grupo WIS-SAL, este apresentou horário de pico de atividade mais cedo na semana 2 {3:38(0:42)h} e semana 3 {3:23(1:48)h} em relação ao FDS 2 {4:52(1:05)h}, ($p=0,0315$ e $p=0,0233$, respectivamente) (ANEXO 3). Do mesmo modo, o grupo WIS-MTP adiantou sua acrofase na semana 2 {1:11(2:16)h} em relação aos FDS 2 {4:01(0:39)h; $p<0,0001$ }, FDS 3 {4:38(1:27)h; $p<0,0001$ } e semana 3 {2:47(1:54)h; $p=0,0145$ }. Neste grupo a semana 3 mostrou valor de acrofase menor em relação ao fim de semana 3 ($p=0,0054$) (ANEXO 4).

O grupo SHR-SAL apresentou valor maior de acrofase no FDS 2 {4:52(0:49)h} em relação à semana 2 {3:15(1:29)h; $p=0,0139$ }, semana 3 {2:38(0:52)h; $p=0,0009$ } e FDS 3 {3:15(1:07)h; $p=0,01469$ } (ANEXO 5). Já para o grupo SHR-MTP, o FDS 2 possui maior valor de acrofase {3:25(1:17)h} em relação à semana 2 {0:38(1:35)h; $p<0,0001$ } e à semana 3 {0:51(1:09)h; $p=0,0001$ }. O FDS 3 também apresentou maior valor de acrofase {3:12(1:56)h} em relação à semana 2 ($p=0,0001$) e semana 3 ($p=0,0005$) (ANEXO 6).

A atividade locomotora destes animais foi avaliada hora a hora ao longo das 24 horas, para as semanas 2 e 3 (tratamento). Foram encontrados maiores valores de locomoção em ratos SHR tratados com metilfenidato em relação aos tratados com solução salina na semana 2 nos horários das 17h {SHR-SAL: 23,69(6,33); SHR-MTP: 49,22(13,01); $p=0,001$ } e 18h {SHR-SAL: 8,60(4,26); SHR-MTP: 43,38(8,99); $p<0,001$ } (FIGURA 18). A mesma diferença se manteve na terceira semana de tratamento, com os ratos SHR tratados com metilfenidato apresentando maior atividade as 17h {SHR-SAL: 13,83(3,99); SHR-MTP: 38,44(7,37); $p<0,001$ } e 18h {SHR-SAL: 9,74(4,44); SHR-MTP: 40,93(13,39); $p<0,001$ } (FIGURA 19).

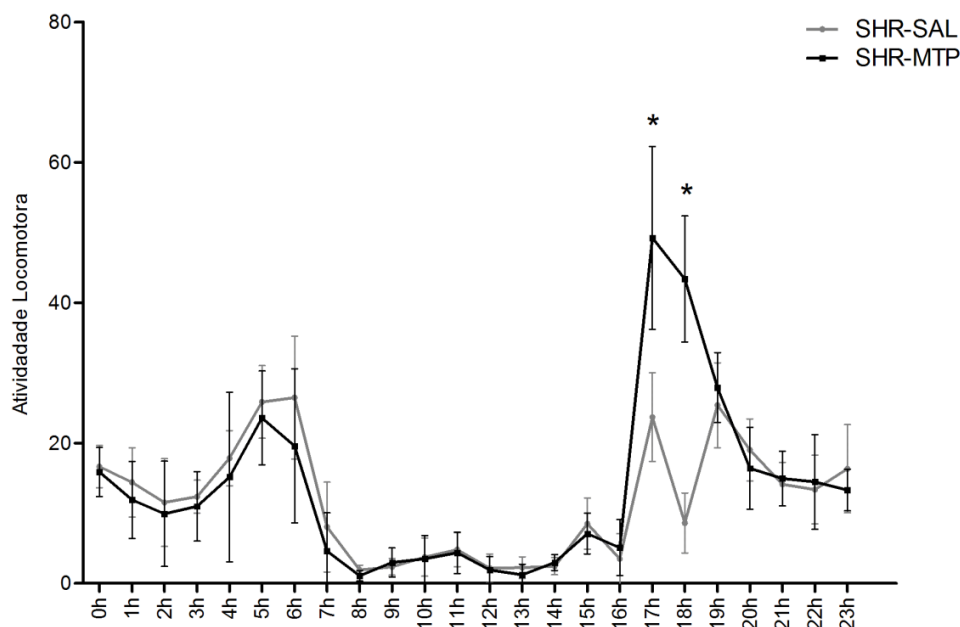


FIGURA 18. Atividade locomotora de ratos SHR tratados com solução salina ou metilfenidato (segunda semana) ao longo de 24 horas. Foram encontradas diferenças na atividade locomotora as 17 e 18h. * $p<0,05$.

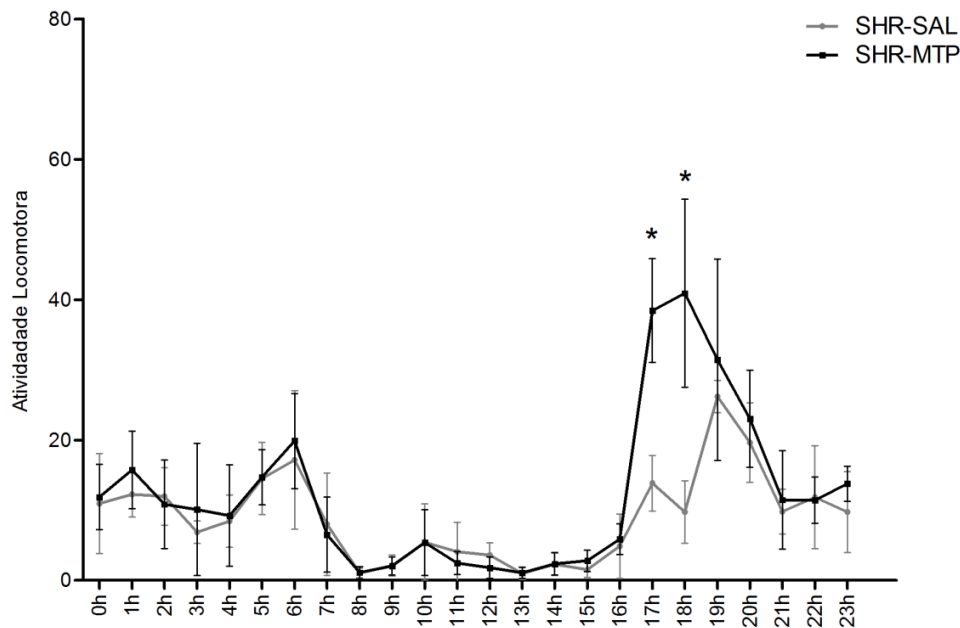


FIGURA 19. Atividade locomotora de ratos SHR tratados com solução salina ou metilfenidato (terceira semana) ao longo de 24 horas. Foram encontradas diferenças na atividade locomotora as 17 e 18h. * $p < 0,05$.

Para os ratos Wistar, o tratamento com solução salina aumentou a atividade locomotora em relação ao metilfenidato no horário das 3h {WIS-SAL: 12,76(2,82); WIS-MTP: 5,02(2,71); $p=0,002$ }. O metilfenidato aumentou a atividade no horário das 17h {WIS-SAL: 17,86(4,45); WIS-MTP: 39,77(13,23); $p=0,003$ }, e 18h {WIS-SAL: 5,59(1,77); WIS-MTP: 26,44(5,59); $p < 0,001$ } durante a segunda semana (FIGURA 20), e somente às 17h {WIS-SAL: 11,98(4,87); WIS-MTP: 22,62(9,71); $p=0,02$ } na terceira semana (FIGURA 21).

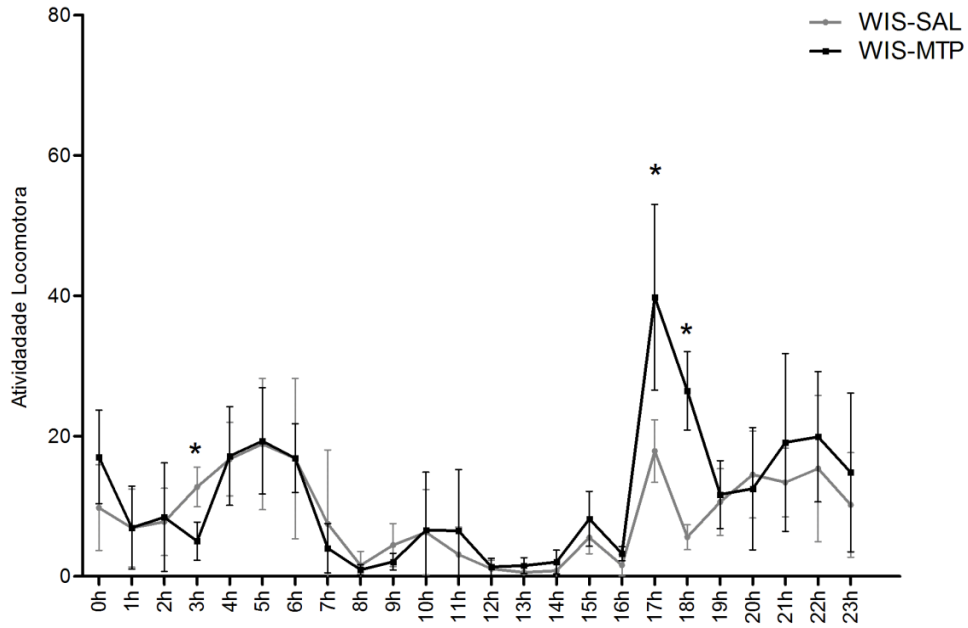


FIGURA 20. Atividade locomotora de ratos Wistar tratados com solução salina ou metilfenidato (segunda semana) ao longo de 24 horas. Foram encontradas diferenças na atividade locomotora as 17 e 18h. * $p < 0,05$.

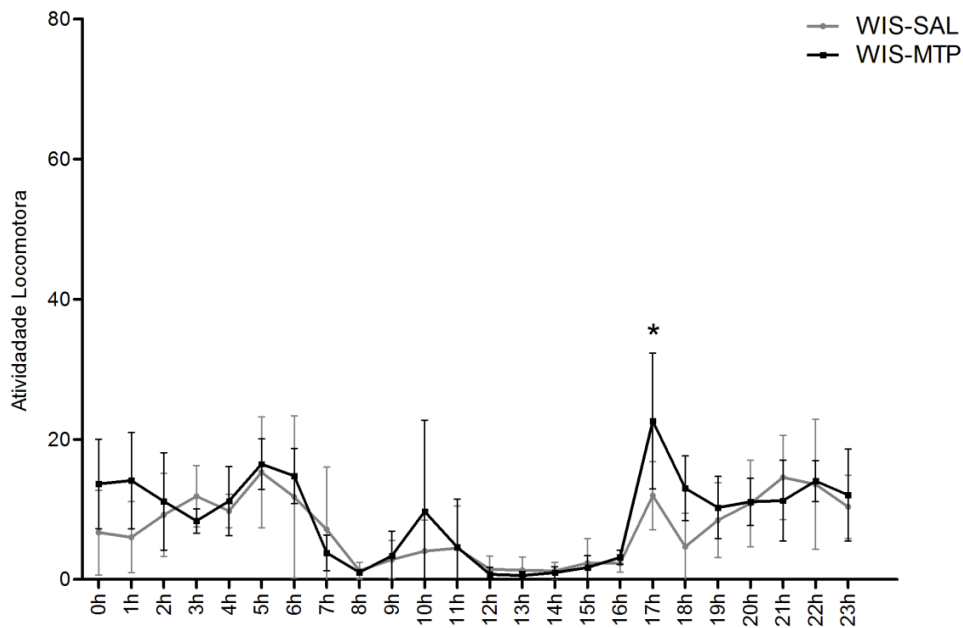


FIGURA 21. Atividade locomotora de ratos Wistar tratados com solução salina ou metilfenidato (terceira semana) ao longo de 24 horas. Foram encontradas diferenças na atividade locomotora as 17h. * $p < 0,05$.

Avaliando o tratamento com solução salina, foram encontradas diferenças às 19h {WIS-SAL: 10,59(4,75); SHR-SAL: 25,39(6,04); $p < 0,001$ } na segunda semana (ANEXO 7) e às 19h {WIS-SAL: 8,48(5,34); SHR-SAL: 26,19(2,30); $p = 0,003$ } e 20h {WIS-SAL: 10,85(6,16); SHR-SAL: 19,63(5,65); $p = 0,02$ } na terceira semana (ANEXO 8).

Comparando ratos Wistar e SHR, ambos tratados com metilfenidato, foram encontradas diferenças na atividade locomotora na segunda semana às 3h {WIS-MTP: 5,02(2,71); SHR-MTP: 10,97(4,96); $p = 0,01$ }, às 18h {WIS-MTP: 26,44(5,59); SHR-MTP: 43,38(8,99); $p < 0,001$ } e às 19h {WIS-MTP: 11,67(4,84); SHR-MTP: 27,90(4,98); $p < 0,001$ } (ANEXO9). Na terceira semana, as diferenças encontradas foram nos horários das 17h {WIS-MTP: 22,62(9,71); SHR-MTP: 38,44(7,37); $p = 0,002$ }, 18h {WIS-MTP: 13,01(4,62); SHR-MTP: 40,93(13,39); $p < 0,001$ } e 19h {WIS-MTP: 10,25(4,44); SHR-MTP: 31,45(14,33); $p < 0,001$ } (ANEXO10).

3.4 SÍNTESE DOS PRINCIPAIS RESULTADOS

- Em ciclo claro/escuro 12:12, ratos SHR e WIS não diferiram na soma da atividade locomotora na fase clara, na fase escura e na atividade total. Entretanto, ao longo de 24 horas, ratos SHR apresentaram maior atividade média nos horários da 1, 16, 18 e 19 horas.
- Em escuro constante, ratos SHR apresentaram período em livre curso menor do que ratos WIS.
- Entre as doses de metilfenidato testadas em ratos Wistar no aparato de campo aberto, a maior dose que não alterou parâmetros de locomoção em relação ao controle solução salina foi a de 5 mg/kg, escolhida para ser utilizada no tratamento crônico.
- Ratos WIS e SHR adiantaram a acrofase quando tratados com metilfenidato 5 mg/kg em relação aos ratos tratados com solução salina.

Esse adiantamento não se manteve nos finais de semana, momento em que os animais não eram manipulados.

- Ratos WIS e SHR tratados com metilfenidato apresentaram maior atividade locomotora média às 17 e 18h em relação aos tratados com solução salina.

4 DISCUSSÃO

Entre os objetivos deste estudo estava avaliar diferenças entre parâmetros de ritmicidade em ratos espontaneamente hipertensos, devido ao uso destes ratos como modelo animal do transtorno de déficit de atenção/hiperatividade. O principal motivo para o uso da linhagem SHR se baseia em sua hiperatividade locomotora, impulsividade e atenção reduzida (FOX et al., 2008) e o fato destas características serem revertidas com o uso do metilfenidato, droga comumente utilizada no tratamento de TDAH em humanos. Somando estas características, esta linhagem mimetiza os sintomas do subtipo combinado do TDAH (SAGVOLDEN et al., 2009). Entretanto, nossos resultados mostraram que não existem diferenças na atividade locomotora total e nas fases clara e escura quando as linhagens Wistar e SHR são comparadas, resultado discrepante de muitos dados da literatura, os quais reportam essa hiperatividade locomotora.

Apesar da divergência de metodologia, os resultados obtidos por Rosenwasser e Plante (1993) também mostram que os ratos SHR possuem períodos endógenos menores do que o controle, no caso ratos Wistar Kyoto (WKY). Neste estudo, o período em livre-curso dos ratos SHR foi próximo de 25,5h e de ratos WKY próximo de 26h, utilizando o protocolo de claro constante e rodas de atividade. Outro estudo conduzido por Peters et al. (1994), utilizando o protocolo de escuro constante e rodas de atividade, teve como resultado período em livre curso de 23,54h para ratos SHR e 23,95 para ratos WKY. Estes estudos, além de apresentarem diferentes condições (claro constante e escuro constante, respectivamente) apresentaram valores de período em livre curso diferentes para ambas as linhagens (SHR: 25,5h x 23,54h; WKY: 26h x 23,95h). Nossas comparações entre ratos WIS e SHR em escuro constante demonstraram que ratos SHR apresentam período endógeno muito próximo de 24h, enquanto ratos WIS tendem a apresentar um período de 25h. Resultados similares foram encontrados em estudo recente que demonstra que ratos SHR possuem períodos em livre-curso menores em

relação a ratos Wistar (24,08h e 24,26h, respectivamente) (SLÁDEK et al., 2012).

Neste estudo realizado por Sládek et al. (2012), quando analisados os dados de ratos SHR e WIS mantidos em ciclo claro/escuro, não foram encontradas diferenças na atividade locomotora das linhagens, assim como não foram encontradas em nosso estudo. Todavia, apesar da ausência de diferença na atividade locomotora como um todo, o que Sládek e colaboradores encontraram foi uma maior atividade locomotora dos ratos SHR antes do apagar das luzes, enquanto os ratos Wistar apenas aumentaram a atividade após o apagar das luzes. Deste modo, os ratos SRH apresentariam um padrão de atividade que poderia ser comparado ao cronotipo matutino em humanos (SLÁDEK et al., 2012). Resultado semelhante foi encontrado na análise de nossos dados, que mostraram maior atividade locomotora em ciclo claro/escuro de ratos SHR às 16h, 18h e 19h (o apagar das luzes ocorreu às 19h) em comparação a ratos WIS.

Há alguns anos foi proposta a hipótese de que indivíduos diagnosticados com TDAH apresentam um atraso de fase dos ritmos circadiano, ou seja, teriam uma tendência à vespertinidade (CACI et al., 2009). Porém, a maior atividade locomotora precedente ao acender das luzes encontradas por Sládek (2013), repetida em nosso estudo, e a extrapolação a um cronotipo matutino em ratos SHR iria contra esta teoria. Esta evidência, juntamente com a discrepância entre estudos quanto a hiperatividade locomotora, se contrapõem à ideia de que ratos SHR seriam bons modelos animais de TDAH,.

Ainda que existam muitos estudos caracterizando essa linhagem como o melhor modelo animal para TDAH, outros estudos indicam que as extrapolações devem ser feitas cuidadosamente devido a evidências de grande variabilidade entre os ratos SHR e de subpopulações impulsivas e não impulsivas nesta linhagem (ADRIANI, 2003), além das divergências entre os resultados obtidos em diferentes aparatos utilizados para registro da atividade locomotora (FERGUSON e CADA, 2003). Além disso, estudos que afirmam que ratos SHR são um bom modelo para TDAH apontam também para a

importância da escolha da linhagem correta a ser utilizada como controle, sugerindo a utilização de ratos Wistar-Kyoto (SAGVOLDEN et al., 2009).

Muitos estudos já avaliaram o efeito do tratamento com metilfenidato em diferentes linhagens, avaliando respostas dependentes de dose na locomoção dos animais. Gomes et al. (2009) demonstraram que o tratamento com metilfenidato 2 mg/kg durante 28 dias em ratos Wistar alterou a atividade locomotora no aparato de campo aberto durante as sessões de treino e de teste. Gaytan et. al. (1996) mostraram um aumento na atividade locomotora de ratos Sprague-Dawley tratados com injeção única de metilfenidato nas doses de 2,5, 10 e 40 mg/kg, administrados uma hora após o início da fase escura. Nesse mesmo estudo, a dose de 0,6 mg/kg não alterou parâmetros de locomoção em relação ao controle tratado com solução salina. Outro estudo realizado pelo mesmo grupo administrou metilfenidato nestas mesmas doses em momentos diferentes do dia, com o intuito de avaliar respostas locomotoras diferentes de acordo com o horário da administração (GAYTAN et al., 1997). O tratamento realizado uma hora após o início da fase clara mostrou que o metilfenidato aumentou a atividade locomotora (distância total percorrida) em relação ao tratamento com solução salina, exceto para a dose de 0,6 mg/kg. A dose de 40 mg/kg apresentou um padrão diferente de resposta, apresentando dois picos de atividade locomotora interrompidos por um longo período de baixa atividade (120 minutos, aproximadamente) e movimentos estereotipados (GAYTAN et al., 1997). Quando o tratamento foi realizado no meio da fase clara, uma hora após o início da fase escura ou no meio da fase escura, não foram encontradas diferenças na atividade locomotora em relação ao tratamento realizado uma hora após o início da fase clara. Deste modo, apesar das variações na atividade durante as fases clara e escura no dia usado como base, os efeitos na locomoção gerados pelas doses mais baixas de metilfenidato (2,5 e 10 mg/kg) não são dependentes do horário da administração. Outro fato importante é que as alterações na locomoção após administração única de metilfenidato não se mantiveram no dia após o tratamento para nenhuma das doses testadas (GAYTAN et al., 1997).

Em estudo conduzido por Algahim et al. (2009), foram demonstradas mudanças no padrão de atividade de ratos Sprague-Dawley adultos tratados

durante seis dias consecutivos com metilfenidato 2,5 mg/kg às 6h30 (acender das luzes às 6h), levando ao deslocamento de 1,4h da acrofase em direção à fase escura quando comparada ao dia de base com tratamento salina e deslocamento de 2,4h no fase de retirada do medicamento. Outro estudo publicado por Algahim et al. em 2010 teve resultados diferentes para ratos Sprague-Dawley jovens, no qual foram encontradas mudanças no padrão de atividade locomotora na dose mais alta (10 mg/kg) na fase de retirada do medicamento

Em camundongos, o tratamento com metilfenidato durante três semanas alterou o padrão de atividade locomotora, atrasando o início e aumentando a atividade na metade final da noite em relação ao controle, atrasando o horário de início do sono e diminuindo o total de sono em 24h (ANTLE et al., 2012). Entretanto, neste estudo o metilfenidato foi disponibilizado em forma de solução na água fornecida a esses animais, estando disponível ao animal ao longo de todo o dia.

Como resultado do tratamento crônico com metilfenidato 5 mg/kg, foi encontrado um adiantamento da acrofase em relação ao tratamento com solução salina de ratos SHR e WIS. Porém, esse adiantamento não se manteve aos finais de semana, na ausência da manipulação dos animais. Por esse motivo, podemos concluir que o efeito do metilfenidato não caracterizou um adiantamento de fase e sim um mascaramento, ou seja, o tratamento com metilfenidato está modificando a expressão do ritmo sem arrastá-lo. Além disso, o tratamento com metilfenidato aumentou a atividade locomotora em ambas as linhagens às 17 e 18h, uma hora antes do apagar das luzes (19h) e próximo ao horário da administração do tratamento (17h30). Esse aumento de atividade ocorreu em horários similares ao encontrado sem a manipulação dos animais, avaliando apenas a atividade locomotora das linhagens.

Nossos resultados encontrados de adiantamento da acrofase durante o tratamento com metilfenidato são discrepantes dos resultados encontrados por Algahim et al. (2009), o qual demonstra um atraso na acrofase de animais adultos tratados com metilfenidato 2,5 mg/kg. A outra dose testada (10mg/kg) neste estudo não teve resultados no padrão de atividade locomotora. Outro

estudo com ratos jovens realizado por Algahim (2010) demonstrou mudanças no padrão de atividade em doses altas (10 mg/kg), e não em doses baixas como encontrada com ratos adultos. Apesar dos dados serem discrepantes, é preciso levar em consideração a diferença das linhagens utilizadas (ratos Sprague-Dawley foram utilizados por Algahim, e ratos Wistar e SHR em nosso estudo), a idade dos animais e a diferença nas doses de metilfenidato utilizadas.

Poucos estudos até o momento avaliaram diferenças de ritmicidade entre ratos SHR e Wistar, assim como o efeito do tratamento crônico com metilfenidato no ritmo circadiano nessa linhagem de ratos SHR. Nossos estudos apontam para a inexistência de diferenças na atividade locomotora de ratos SHR e Wistar, e a existência de diferenças no período endógenos desses animais. Desta forma, podemos concluir que ratos SHR não caracterizam um bom modelo para o transtorno de déficit de atenção/hiperatividade.

O tratamento com metilfenidato nesses ratos adiantou o horário de acrofase, o que não se manteve na ausência do tratamento. Esse dado foi divergente de outros estudos que avaliaram o efeito do metilfenidato em outras linhagens de animais. Por esse motivo, talvez a linhagem SHR não seja um bom modelo para avaliar efeitos do tratamento com metilfenidato na ritmicidade circadiana, e outros estudos são necessários para melhor caracterizar a resposta ao tratamento com esse medicamento.

CONCLUSÕES

- Ratos SHR não são diferentes de ratos Wistar na atividade locomotora quando mantidos em ciclo claro/escuro.

- Em escuro constante, ratos SHR apresentaram período em livre curso menor do que ratos WIS.

- O tratamento crônico com metilfenidato adiantou o horário de acrofase em ratos WIS e SHR em relação ao tratamento controle com solução salina, o qual não se manteve nos finais de semana, momento em que os animais não eram manipulados.

- Nossos resultados não corroboram a ideia de que ratos SHR são um bom modelo animal para estudo do TDAH.

REFERÊNCIAS

ADRIANI, W.; CAPRIOLI, A.; GRANSTREM, O.; CARLI, M.; LAVIOLA, G. The spontaneously hypertensive-rat as an animal model of ADHD: evidence for impulsive and non-impulsive subpopulations. **Neurosci Biobehav Rev.** 2003 Nov; 27(7): 639-51.

ALGAHIM, M. F.; YANG, P. B.; WILCOX, V. T.; BURAU, K. D.; SWANN, A. C.; DAFNY, N. Prolonged methylphenidate treatment alters the behavioral diurnal activity pattern of adult male Sprague-Dawley rats. **Pharmacol Biochem Behav.** 2009 Mar; 92(1):93-9.

ALGAHIM, M. F.; YANG, P. B.; BURAU, K. D.; SWANN, A. C.; DAFNY, N. Repetitive Ritalin treatment modulates the diurnal activity pattern of young SD male rats. **Cent Nerv Syst Agents Med Chem.** 2010 Sep 1; 10(3):247-57.

ANTLE, M. C.; VAN DIEPEN, H.; DEBOER, T.; PEDRAM, P.; PEREIRA, R. R.; MEIJER, J. Methylphenidate modifies the motion of the circadian clock. **Neuropsychopharmacology.** 2012 Oct; 37(11):2466-55.

ARIME, Y.; KUBO, Y.; SORA, I. Animal models of attention-deficit/hyperactivity disorder. **Biol Pharm Bull.** 2011; 34(9):1373-6.

BAIRD, A. L.; COOGAN, A. N.; SIDDIGUI, A.; DONEV, R. M.; THOME, J. Adult attention-deficit hyperactivity disorder is associated with alterations in circadian rhythms at the behavioural, endocrine and molecular levels. **Mol Psychiatry.** 2012 Oct; 17(10):988-95.

BOONSTRA, A. M.; KOOIJ, J. J.; OOSTERLAAN, J.; SERGEANT, J. A.; BUITELAAR, J. K.; VAN SOMEREN, E. J. Hyperactive night and day? Actigraphy studies in adult ADHD: a baseline comparison and the effect of methylphenidate. **Sleep.** 2007 Apr; 30(4): 433-42.

BREESE, G. R.; KNAPP, D. J.; CRISWELL, H. E.; MOY, S. S.; PAPADEAS, S. T.; BLAKE, B. L. The neonate-6-hydroxydopamine-lesioned rat: a model for clinical neuroscience and neurobiological principles. **Brain Res Brain Res Rev.** 2005; 48(1):57-73.

CACI, H.; BOUCHEZ, J.; BAYLÉ, F. J. Inattentive symptoms of ADHD are related to evening orientation. **J Atten Disord**. 2009 Jul; 13(1):36-41.

CHOI, J.; YOON, I. Y.; KIM, H. W.; CHUNG, S.; YOO, H. J. Differences between objective and subjective sleep measures in children with attention deficit hyperactivity disorder. **J Clin Sleep Med**. 2010; 6(6):589-95.

CLEMENTS, K. M.; WAINWRIGHT, P. E. Spontaneously hypertensive, Wistar-Kyoto and Sprague-Dawley rats differ in performance on a win-shift task in the water radial arm maze. **Behav Brain Res**. 2006 Feb 28; 167(2):295-304.

COELHO, L.; CHAVES, E.; VASCONCELOS, S.; FONTELES, M.; DE SOUZA, F.; VIANA, G. Transtorno do déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) na criança: aspectos neurobiológicos, diagnóstico e conduta terapêutica. **Acta Med Port**. 2010; 23:689-696.

CORMAN, S. L.; FEDUTES, B. A.; CULLEY, C. M. Atomoxetine: the first nonstimulant for the management of attention-deficit/hyperactivity disorder. **Am J Health Syst Pharm**. 2004; 61(22):2391-9.

CORTESE, S.; KONOFAL, E.; YATEMAN, N.; MOUREN, M. C.; LECENDREUX, M. Sleep and alertness in children with attention-deficit/hyperactivity disorder: a systematic review of the literature. **Sleep**. 2006 Apr; 29(4):504-11.

CORTESE, S.; FARAONE, S. V.; KONOFAL, E.; LECENDREUX, M. Sleep in children with attention-deficit/hyperactivity disorder: meta-analysis of subjective and objective studies. **J Am Acad Child Adolesc Psychiatry**. 2009 Sep; 48(9):894-908.

FERGUSON, S. A.; CADA, A. M. A longitudinal study of short- and long-term activity levels in male and female spontaneously hypertensive, Wistar-Kyoto, and Sprague-Dawley rats. **Behav Neurosci**. 2003;117(2):271-82.

FOX, A. T.; HAND, D. J.; REILLY, M. P. Impulsive choice in a rodent model of attention-deficit/hyperactivity disorder. **Behav Brain Res**. 2008 Feb 11;187(1):146-52.

GALLAND, B. C.; TRIPP, E. G.; TAYLOR, B. J. The sleep of children with attention deficit hyperactivity disorder on and off methylphenidate: a matched case-control study. **J Sleep Res**. 2010 Jun;19(2):366-73.

GAYTAN, O.; GHELANI, D.; MARTIN, S.; SWANN, A.; DAFNY, N. Dose response characteristics of methylphenidate on different indices of rats' locomotor activity at the beginning of the dark cycle. **Brain Res.** 1996 Jul 15;727(1-2):13-21.

GAYTAN, O.; GHELANI, D.; MARTIN, S.; SWANN, A.; DAFNY, N. Methylphenidate: diurnal effects on locomotor and stereotypic behavior in the rat. **Brain Res.** 1997 Nov 28;777(1-2):1-12.

GOLOMBEK, D. A.; ROSENSTEIN, R. E. Physiology of circadian entrainment. **Physiol Rev.** 2010 Jul; 90(3):1063-102.

GOMES, K. M.; SOUZA, R. P.; VALVASSORI, S. S.; RÉUS, G. Z.; INÁCIO, C. G.; MARTINS, M. R.; COMIM, C. M.; QUEVEDO, J. Chronic methylphenidate-effects over circadian cycle of young and adult rats submitted to open-field and object recognition tests. **Curr Neurovasc Res.** 2009 Nov;6(4):259-66.

IRONSIDE, S.; DAVIDSON, F.; CORKUM, P. Circadian motor activity affected by stimulant medication in children with attention-deficit/hyperactivity disorder. **J Sleep Res.** 2010 Dec;19(4):546-51.

LEE, M. J.; YANG, P. B.; WILCOX, V. T.; BURAU, K. D.; SWANN, A. C.; DAFNY, N. Repetitive methylphenidate administration modulates the diurnal behavioral activity pattern of adult female SD rats. **J Neural Transm.** 2011 Feb;118(2):285-98.

NAKAMURA-PALACIOS, E. M.; CALDAS, C. K.; FIORINI, A.; CHAGAS, K. D.; CHAGAS, K. N.; VASQUEZ, E. C. Deficits of spatial learning and working memory in spontaneously hypertensive rats. **Behav Brain Res.** 1996 Jan;74(1-2):217-27.

O'KEEFFE, S. M.; THOME, J.; COOGAN, N. A. The noradrenaline reuptaker inhibitor atomoxetine phase-shifts the circadian clock in mice. **Neuroscience.** 2012 Jan 10;201;219-30.

PEREIRA, H. S.; ARAÚJO, A. P. Q. C.; MATTOS, P. Transtorno do déficit de atenção e hiperatividade (TDAH): aspectos relacionados à comorbidade com distúrbios de atividade motora. **Ver Bras Saúde Matern Infant.** 2005 Out/Dez; 5(4):391-402.

PETERS, R. V.; ZOELLER, R. T.; HENNESSEY, A. C.; STOPA, E. G.; ANDERSON, G.; ALBERS, H. E. The control of circadian rhythms and the levels of vasoactive intestinal peptide mRNA in the suprachiasmatic nucleus are altered in spontaneously hypertensive rats. **Brain Res.** 1995 Mar; 639(2):217-27.

PREDIGER, R. D.; PAMPLONA, F. A.; FERNANDES, D.; TAKAHASHI, R. N. Caffeine improves spatial learning deficits in an animal model of attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) -- the spontaneously hypertensive rat (SHR) **Int J Neuropsychopharmacol.** 2005 Dec;8(4):583-94.

ROSENWASSER, A. M.; PLANTE, L. Circadian activity rhythms in SHR and WKY rats: strain differences and effects of clonidine. **Physiol Behav.** 1993 Jan; 53(1):23-9.

SAFAR, M.; CHAMIOT-CLERC, P.; DAGHER, G.; RENAUD, J. F. Pulse pressure, endothelium function, and arterial stiffness in spontaneously hypertensive rats. **Hypertension.** 2001;38(6):1416-21.

SAGVOLDEN, T.; PETTERSEN, M. B.; LARSEN, M. C. Spontaneously hypertensive rats (SHR) as a putative animal model of childhood hyperkinesis: SHR behavior compared to four other rat strains. **Physiol Behav.** 1993;54(6):1047-55.

SAGVOLDEN, T. Behavioral validation of the spontaneously hypertensive rat (SHR) as an animal model of attention-deficit/hyperactivity disorder (AD/HD). **Neurosci Biobehav Rev.** 2000;24(1):31-9.

SAGVOLDEN, T.; JOHANSEN, E. B.; WØIEN, G.; WALAAS, S. I.; STORM-MATHISEN, J.; BERGERSEN, L. H.; HVALBY, O.; JENSEN, V.; AASE, H.; RUSSELL, V. A.; KILLEEN, P. R.; DASBANERJEE, T.; MIDDLETON, F. A.; FARAONE, S. V. The spontaneously hypertensive rat model of ADHD--the importance of selecting the appropriate reference strain. **Neuropharmacology.** 2009;57(7-8):619-26.

SLÁDEK, M.; POLIDAVORÁ, L.; NOVÁKOVÁ, M.; PARKANOVÁ, D.; SUMOVÁ, A. Early chronotype and tissue-specific alterations of circadian clock function in spontaneously hypertensive rats. **PLoS One.** 2012; 7(10):346951.

SWANSON, J.; BALER, R. D.; VOLKOWND, N. D. Understanding the effects of stimulant medications on cognition in individuals with attention-deficit

hyperactivity disorder: a decade of progress. **Neuropsychopharmacology**. 2011;36(1):207-26.

TATAROGLU, O.; DAVIDSON, A. J.; BENVENUTO, L. J.; MENAKER, M. The methamphetamine-sensitive circadian oscillator (MASCO) in mice. **J Biol Rhythms**. 2006;21(3):185-94.

THANOS, P. K.; IVANOV, I.; ROBINSON, J. K.; MICHAELIDES, M.; WANG, G. J.; SWANSON, J. M.; NEWCORN, J. H.; VOLKOW, N. D. Dissociation between spontaneously hypertensive (SHR) and Wistar-Kyoto (WKY) rats in baseline performance and methylphenidate response on measures of attention, impulsivity and hyperactivity in a Visual Stimulus Position Discrimination Task. **Pharmacol Biochem Behav**. 2010;94(3):374-9.

TSAI, M. H.; HUANG, Y. S. Attention-deficit /Hyperactivity Disorder and Sleep Disorders in Children. **The Medical Clinics of North America**, v. 94, p. 615-632, 2010.

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

YOON, S. Y.; JAIN, U.; SHAPIRO, C. Sleep in attention-deficit/hyperactivity disorder in children and adults: Past, present, and future. **Sleep Med Rev**. 2011 Oct 25.

ANEXOS

ANEXO 1 – APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	51
ANEXO 2 – TABELA 1.....	52
ANEXO 3 – GRÁFICO COM COMPARAÇÃO SEMANA A SEMANA DO TRATAMENTO COM SOLUÇÃO SALINA EM RATOS WISTAR	53
ANEXO 4 – GRÁFICO COM COMPARAÇÃO SEMANA A SEMANA DO TRATAMENTO COM METILFENIDATO EM RATOS WISTAR.....	54
ANEXO 5 – GRÁFICO COM COMPARAÇÃO SEMANA A SEMANA DO TRATAMENTO COM SOLUÇÃO SALINA EM RATOS SHR	55
ANEXO 6 – GRÁFICO COM COMPARAÇÃO SEMANA A SEMANA DO TRATAMENTO COM METILFENIDATO EM RATOS SHR	56
ANEXO 7 – GRÁFICO COM COMPARAÇÃO HORA A HORA DO TRATAMENTO COM SOLUÇÃO SALINA EM RATOS WISTAR E SHR – SEMANA 2.....	57
ANEXO 8 – GRÁFICO COM COMPARAÇÃO HORA A HORA DO TRATAMENTO COM SOLUÇÃO SALINA EM RATOS WISTAR E SHR – SEMANA 3.....	58
ANEXO 9 – GRÁFICO COM COMPARAÇÃO HORA A HORA DO TRATAMENTO COM METILFENIDATO EM RATOS WISTAR E SHR – SEMANA 2.....	59
ANEXO 10 – GRÁFICO COM COMPARAÇÃO HORA A HORA DO TRATAMENTO COM METILFENIDATO EM RATOS WISTAR E SHR – SEMANA 3.....	60

ANEXO 1 – APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso de Animais
(CEUA)



Nº 630

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento da CEUA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno da CEUA, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

CERTIFICATION

The Ethics Animal Experiment Committee of the Setor de Ciências Biológicas of the Federal University of Paraná, established by the DECREE Nº 787/03-BL on June 11th 2003, based upon the RESOLUTION Nº 01/03-BL from May 9th 2003, and upon the CEUA internal regiment, CERTIFIES that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the ethical principals established by the Experimental Animal Brazilian Council (COBEA), and with the requirements of the "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

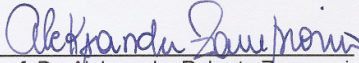
PROCESSO: 23075.031714/2012-33

APROVADO: 18/09/2012 – R.E. 01/2012

TÍTULO: Efeito do tratamento com metilfenidato sobre a ritmicidade circadiana em modelo animal do transtorno do déficit de atenção/hiperatividade

AUTORES: Fernando Mazzilli Louzada, Laura Simões da Costa Pinto, Bruno Jacson Martynhak

DEPARTAMENTO: Fisiologia


Prof. Dr. Aleksander Roberto Zamprônio
Coordenador da CEUA

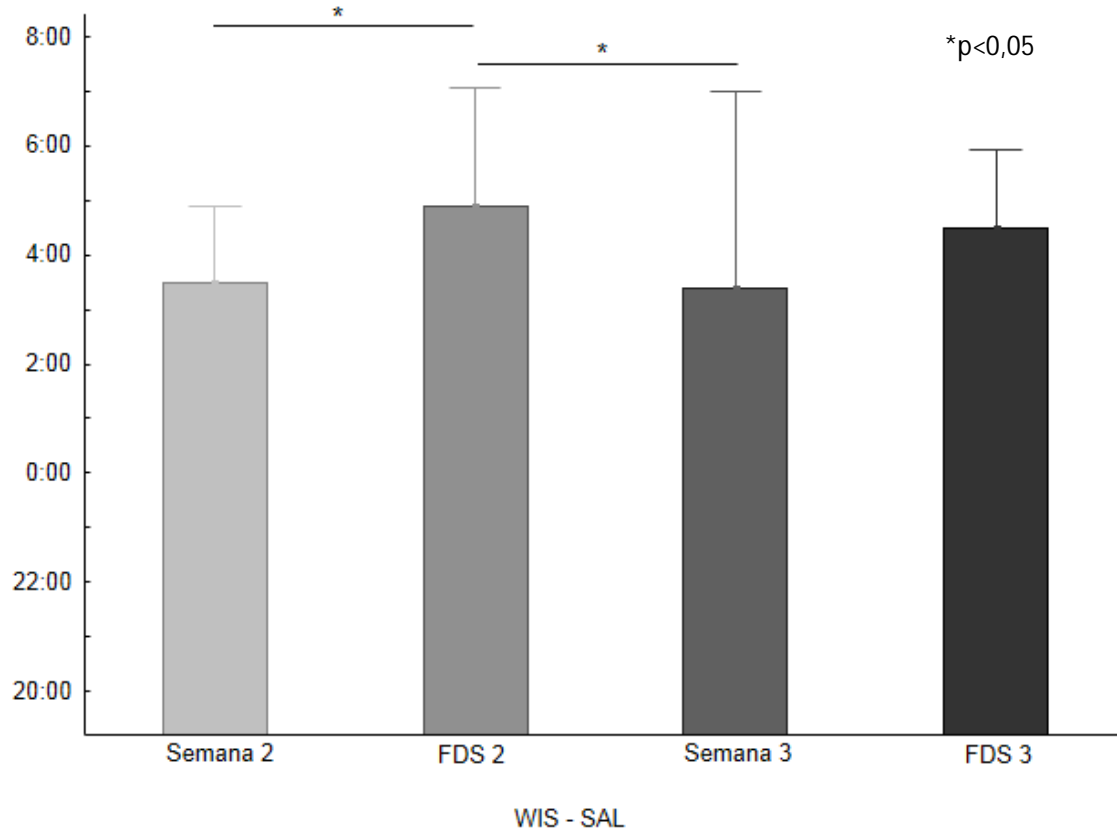
ANEXO 2 – TABELA 1

TABELA 1 – VALORES DE ACROFASE DURANTE TRATAMENTO

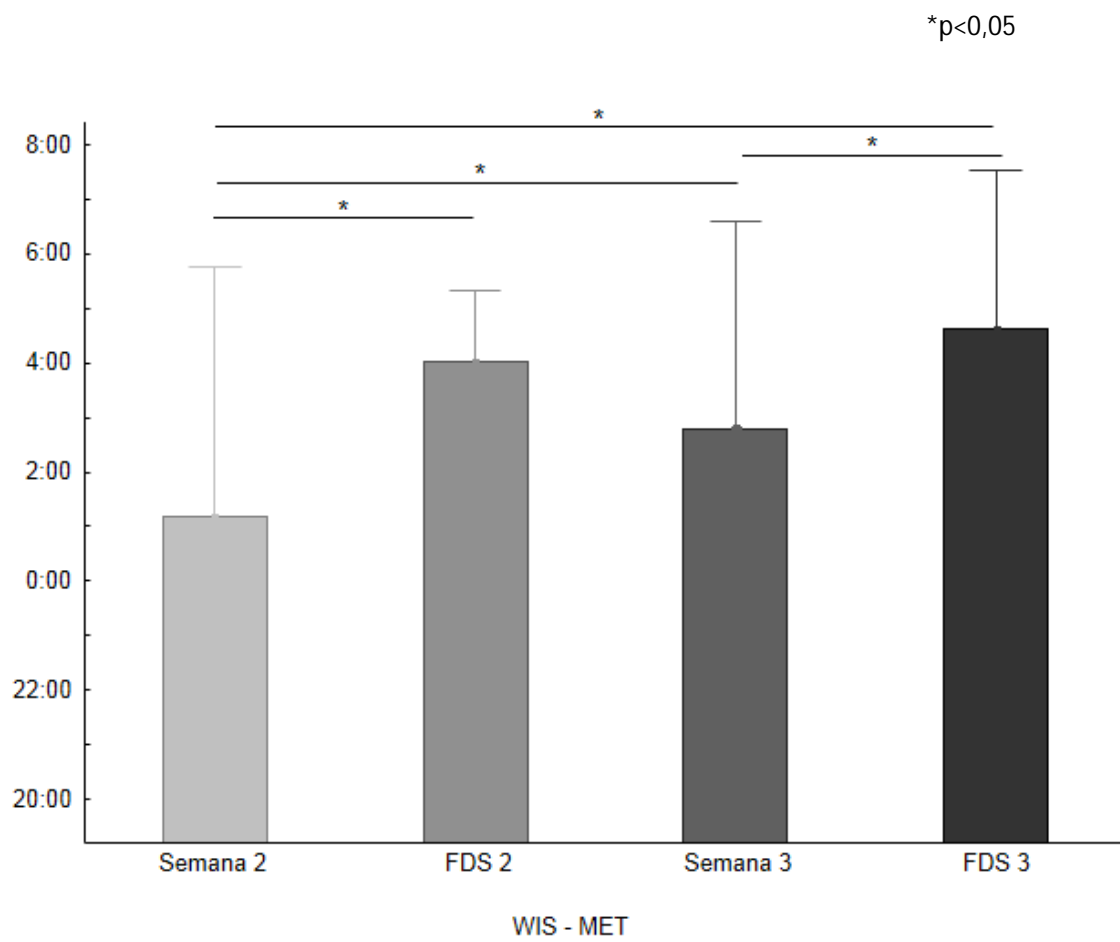
Grupo	Período	Acrofase ^a
WIS-SAL	SEM 2	3:28(0:42)
	FDS 2	4:52(1:05)
	SEM 3	3:23(1:48)
	FDS 3	4:29(0:43)
WIS-MTP	SEM 2	1:11(2:16)
	FDS 2	4:01(0:39)
	SEM 3	2:47(1:54)
	FDS 3	4:38(1:27)
SHR-SAL	SEM 2	3:15(1:29)
	FDS 2	4:52(0:49)
	SEM 3	2:38(0:52)
	FDS 3	3:15(1:07)
SHR-MTP	SEM 2	0:38(1:35)
	FDS 2	3:25(1:17)
	SEM 3	0:51(1:09)
	FDS 3	3:12(1:56)

a – Média(desvio padrão), em horas.

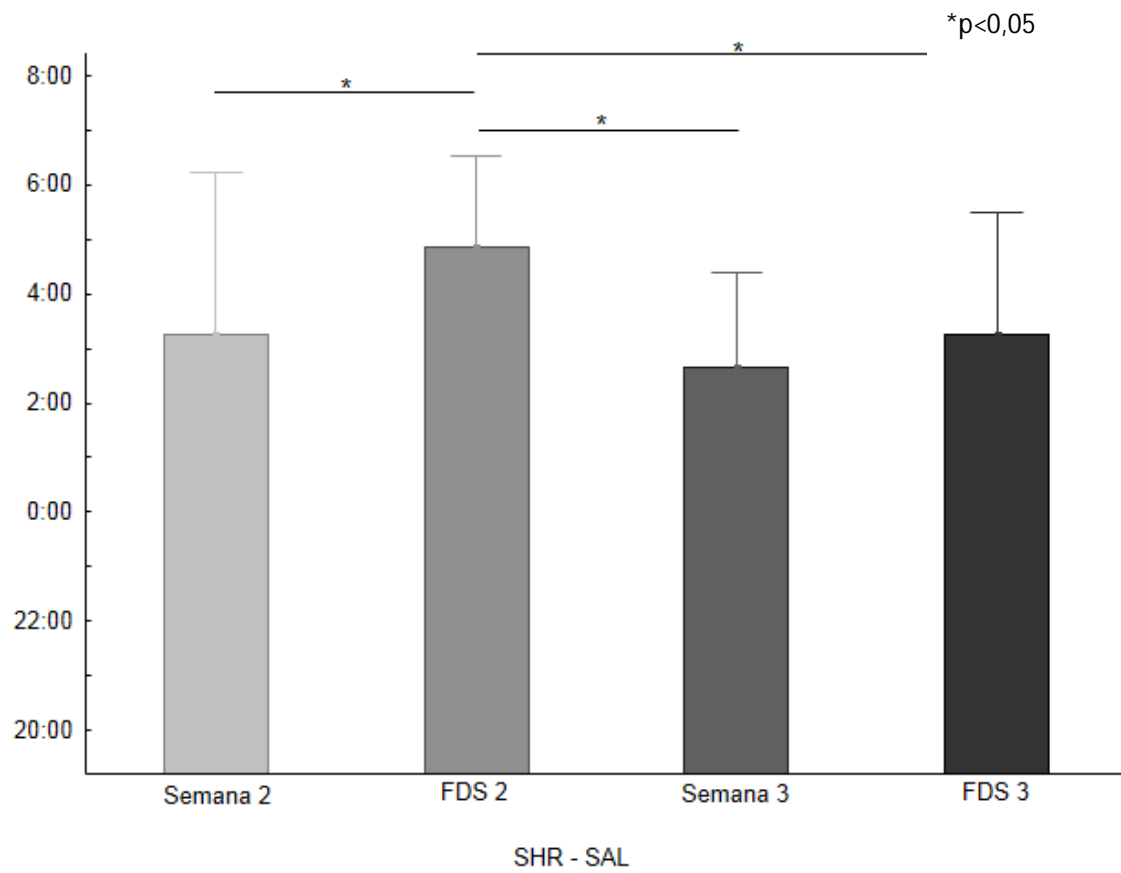
ANEXO 3 – GRÁFICO COM COMPARAÇÃO SEMANA A SEMANA DO TRATAMENTO COM SOLUÇÃO SALINA EM RATOS WISTAR



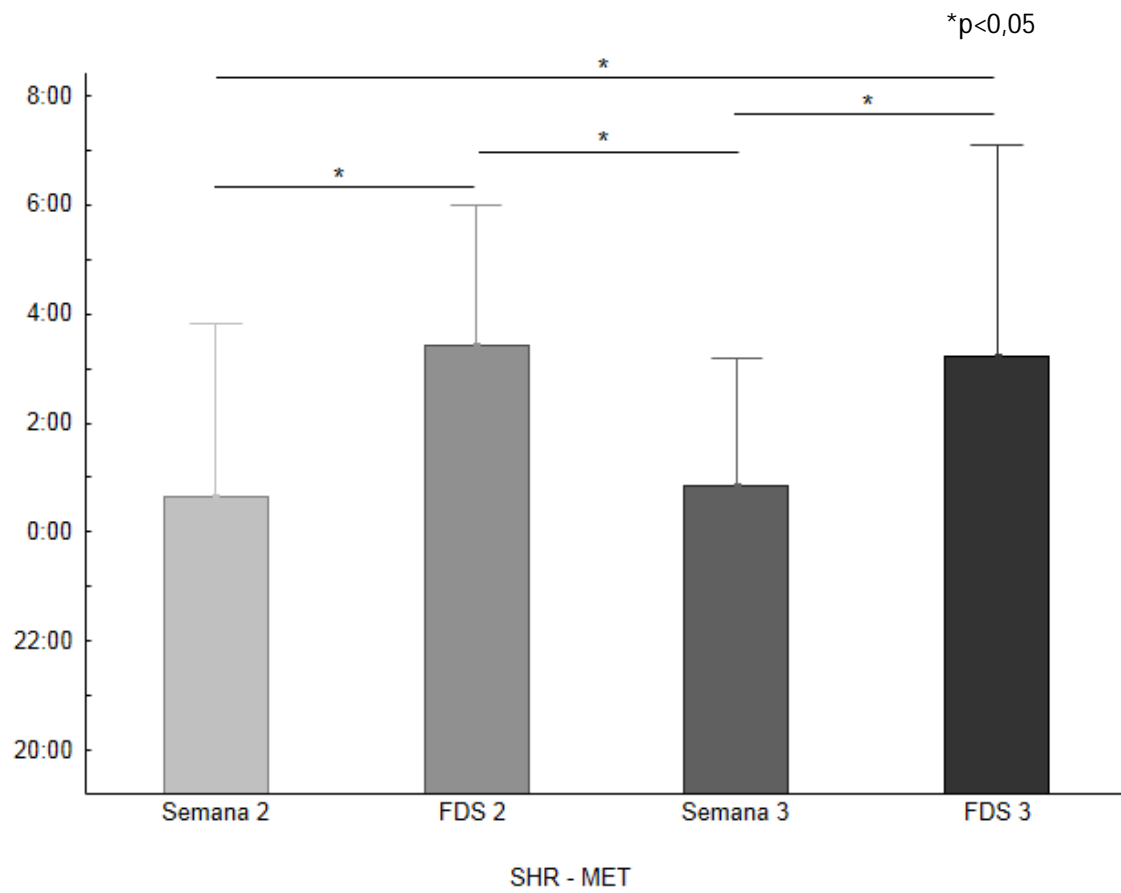
ANEXO 4 – GRÁFICO COM COMPARAÇÃO SEMANA A SEMANA DO TRATAMENTO COM METILFENIDATO EM RATOS WISTAR



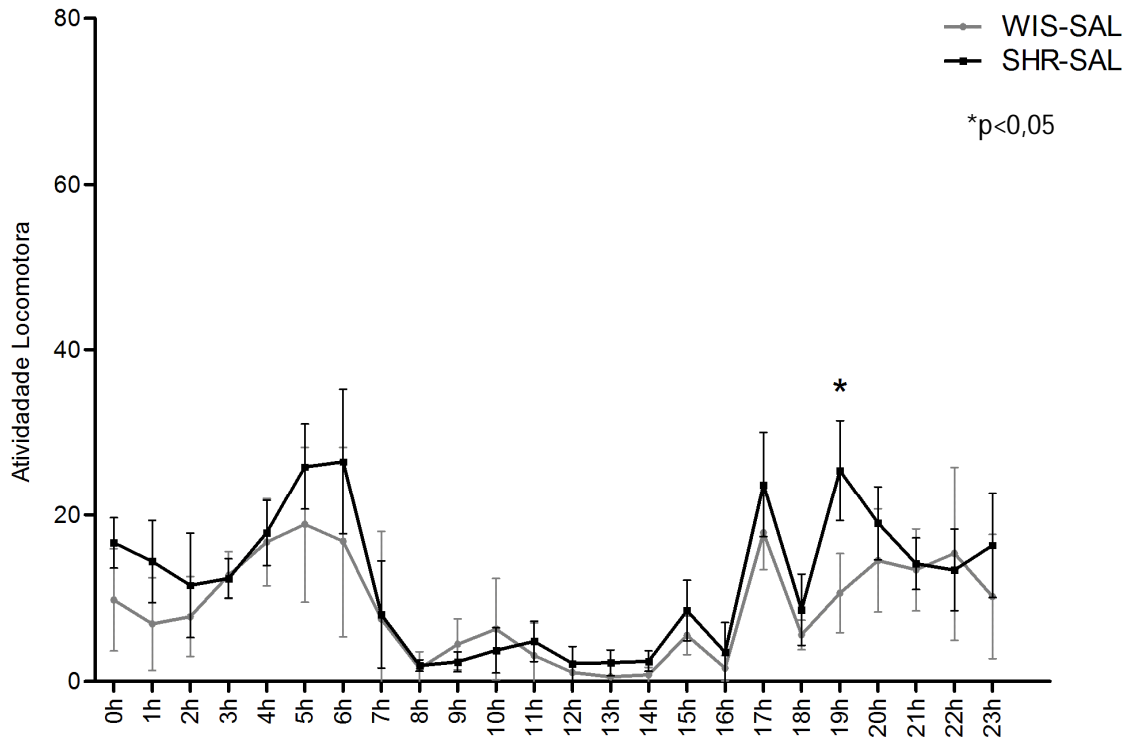
ANEXO 5 – GRÁFICO COM COMPARAÇÃO SEMANA A SEMANA DO TRATAMENTO COM SOLUÇÃO SALINA EM RATOS SHR



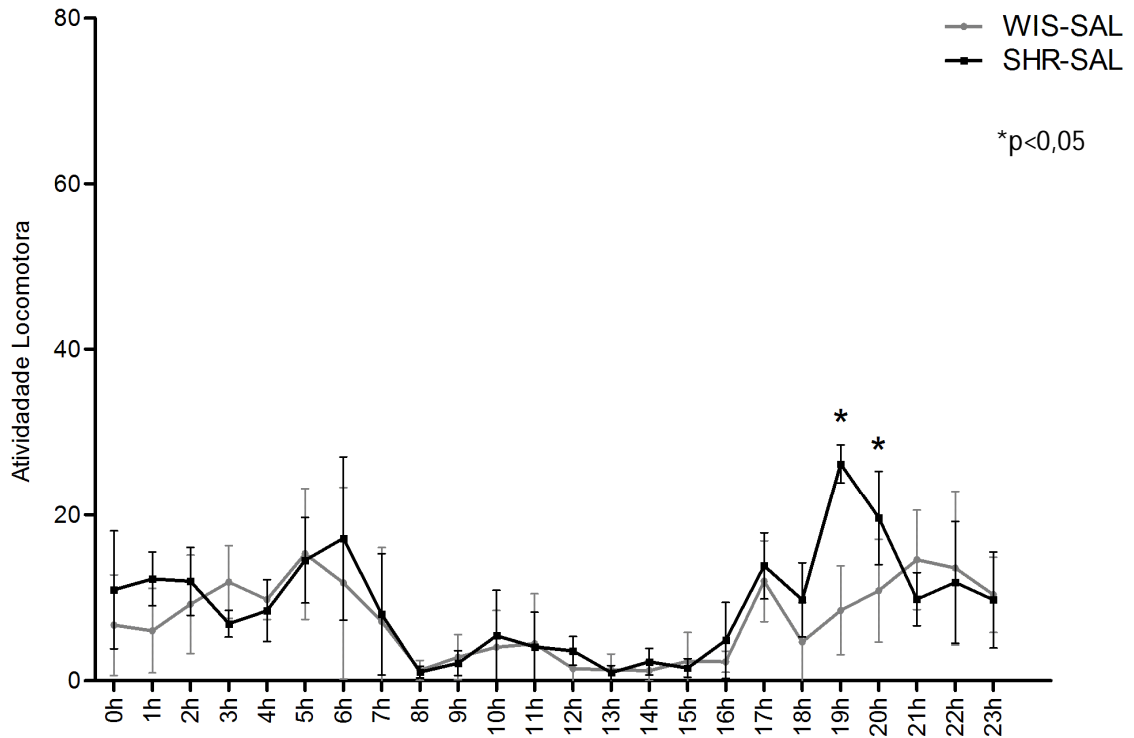
ANEXO 6 – GRÁFICO COM COMPARAÇÃO SEMANA A SEMANA DO TRATAMENTO COM METILFENIDATO EM RATOS SHR



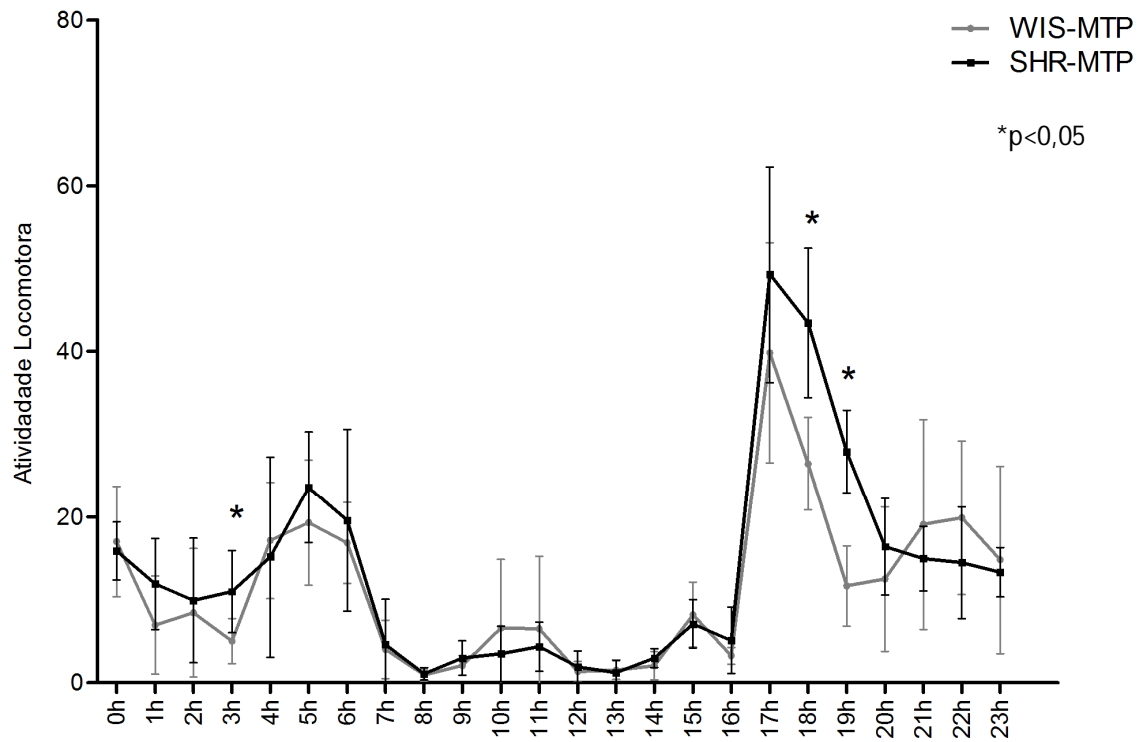
ANEXO 7 – GRÁFICO COM COMPARAÇÃO HORA A HORA DO TRATAMENTO COM SOLUÇÃO SALINA EM RATOS WISTAR E SHR – SEMANA 2



ANEXO 8 – GRÁFICO COM COMPARAÇÃO HORA A HORA DO TRATAMENTO COM SOLUÇÃO SALINA EM RATOS WISTAR E SHR – SEMANA 3



ANEXO 9 – GRÁFICO COM COMPARAÇÃO HORA A HORA DO TRATAMENTO COM METILFENIDATO EM RATOS WISTAR E SHR – SEMANA 2



ANEXO 10 – GRÁFICO COM COMPARAÇÃO HORA A HORA DO TRATAMENTO COM METILFENIDATO EM RATOS WISTAR E SHR – SEMANA 3

