

GRASIELLE AVELAR VIEIRA RODRIGUES

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE CLORIDRATO DE METILFENIDATO  
(Ritalina<sup>®</sup>) SOBRE OS TESTÍCULOS DE CAMUNDONGOS BALB/C**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de Magister Scientiae.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2019

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

R696e  
2019  
Rodrigues, Grasielle Avelar Vieira, 1988-  
Efeitos da administração de cloridrato de metilfenidato  
(Ritalina®) sobre os testículos de camundongos Balb/c /  
Grasielle Avelar Vieira Rodrigues. – Viçosa, MG, 2019.  
viii, 46 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Sérgio Luis Pinto da Matta.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Testículos. 2. Reprodução. 3. Espermatogênese em  
animais. 4. Metilfenidato. I. Universidade Federal de Viçosa.  
Departamento de Biologia Geral. Programa de Pós-Graduação  
em Biologia Celular e Estrutural. II. Título.

CDD 22. ed. 573.655

GRASIELLE AVELAR VIEIRA RODRIGUES

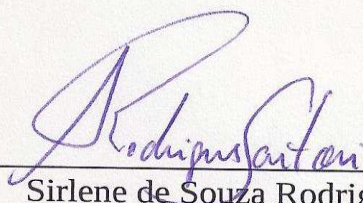
**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE CLORIDRATO DE METILFENIDATO  
(Ritalina®) SOBRE OS TESTÍCULOS DE CAMUNDONGOS BALB/C**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 29 de julho de 2019.



Marcos de Lucca Moreira Gomes



Sirlene de Souza Rodrigues Sartori



Sérgio Luis Pinto da Matta  
(Orientador)

## DEDICATÓRIA

Ao meu sobrinho Rodrigo:  
O destino une e separa. Mas nenhuma força é suficiente para fazer esquecer pessoas que  
por algum motivo um dia nos fizeram felizes.  
Eternas saudades!

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me permitir chegar até aqui. Por ser sustento em todos os momentos da minha vida!

À minha mãe, Amélia, pelo cuidado, pelas orações, por muitas vezes se privar para me oferecer o melhor que podia, e pelo seu imenso amor!

Ao meu pai, Gabriel, por me apresentar a UFV e “insistir” que eu deveria estudar aqui. Hoje agradeço imensamente esse empurrãozinho! Você é meu exemplo!

À minha irmã Isabella por compartilhar momentos de alegria e descontração. Por ser companhia desde a infância.

Ao meu marido, Hudson, com quem compartilho minha vida. Obrigada por tornar meus dias mais leves.

À Uiara, D. Fátima, Sr. Jair e ao pequeno Gabriel por ser também minha família!

À minha vovó Doinha, que sempre comemorou minhas conquistas e mesmo de longe torce pelo meu sucesso.

Aos meus tios, tias, primos e primas pela constante torcida! Em especial Teto, Lucas e Ana Eliza.

À todos os meus amigos. Obrigada pela amizade tão verdadeira e por tornar minha vida mais alegre e florida!

Ao professor Sérgio, meu orientador, pelos ensinamentos, pelo carinho constante durante esse período de convivência; sou muito grata pela confiança, pelas oportunidades e acima de tudo por acreditar em mim desde o primeiro momento!

À Fernanda, minha coorientadora, pela oportunidade de conviver um pouco mais de perto durante o mestrado, pela receptividade, por todo o suporte necessário para a coleta dos dados, pelas sábias sugestões e pelo carinho com que me recebeu.

Aos colegas e amigos do laboratório 333. Obrigada pelas trocas de ideias, pelos momentos de descontração e por todo o carinho! Em especial “as meninas do Sérgio”, Ana Luiza, Amanda Diane e Beth por todas as contribuições neste projeto. Sem vocês nada seria!

A banca pelas valiosas considerações.

Aos meus xodozinhos, Tininha, Billy e Lindinha que me permitiram ter dias mais alegres.

A todos os animais utilizados no experimento.

Ao Departamento de Biologia Geral, pela oportunidade de obter minha formação acadêmica.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural.

Aos laboratórios de Biologia Estrutural, Biologia Molecular de Insetos e Beagle por todo auxílio durante o projeto.

À UFV, por todo suporte durante meus dez anos de aprendizado.

Agradeço finalmente, a todos que de alguma maneira colaboraram para a concretização deste estudo, por toda a força, pela torcida para que tudo desse certo, porque embora não tenha sido uma experiência simples, foi sem dúvida muito edificante.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO .....</b>	<b>vii</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>viii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1. Gerais .....</b>	<b>3</b>
<b>2.2. Específicos.....</b>	<b>3</b>
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>4</b>
<b>3.1. Metilfenidato.....</b>	<b>4</b>
3.1.1. Classificação farmacológica .....	4
3.1.2. História .....	5
3.1.3. Propriedades farmacológicas .....	6
3.1.4. Farmacocinética e metabolismo .....	7
3.1.5. Mecanismos de ação.....	7
3.1.6. Toxicidade .....	8
<b>3.2. Morfofisiologia dos Testículos .....</b>	<b>10</b>
3.2.1. Células de Leydig.....	11
3.2.2. Espermatogênese.....	12
<b>3.3. Estresse Oxidativo .....</b>	<b>12</b>
<b>4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>14</b>
<b>ARTIGO.....</b>	<b>20</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>21</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>22</b>
<b>2.1. Animais experimentais .....</b>	<b>22</b>
<b>2.2. Grupos experimentais e administração do fármaco.....</b>	<b>23</b>
<b>2.3. Coleta do material biológico.....</b>	<b>23</b>
<b>2.4. Processamento histológico e microscopia de luz.....</b>	<b>23</b>
<b>2.5. Biometria testicular .....</b>	<b>24</b>
<b>2.6. Morfometria Tubular .....</b>	<b>24</b>
2.6.1. Proporção volumétrica (%) dos componentes do parênquima testicular ....	24
2.6.2. Diâmetro tubular, altura do epitélio e comprimento dos túbulos seminíferos	24
2.6.3. Índice tubulossomático e epiteliossomático .....	25
2.6.4. Áreas tubular, luminal, epitelial e relação túbulo/epitélio (T/E) .....	25

<b>2.7. Morfometria Intertubular</b> .....	25
2.7.1. Proporção volumétrica (%) dos componentes do intertúbulo .....	25
2.7.2. Diâmetro nuclear, volumes nuclear e citoplasmático e número de células de Leydig .....	26
2.7.3. Índice Leydigossomático .....	26
<b>2.8. Histopatologia</b> .....	26
<b>2.9. Estresse oxidativo testicular</b> .....	27
2.9.1. Determinação de catalase .....	27
2.9.2. Determinação da superóxido dismutase .....	27
2.9.3. Determinação do malondialdeído .....	27
2.9.4. Determinação de nitrito .....	28
2.9.5. Proteína Total.....	28
<b>2.10. Dosagem da testosterona sérica</b> .....	28
<b>2.11. Produção diária de espermatozoides, número de espermatozoides e tempo de trânsito epididimário</b> .....	28
<b>2.12. Análises estatísticas</b> .....	29
<b>3. RESULTADOS</b> .....	<b>29</b>
<b>3.1. Peso corporal e biometria testicular</b> .....	29
<b>3.2. Histomorfometria testicular</b> .....	29
<b>3.3. Histopatologia</b> .....	32
<b>3.4. Histomorfometria Intertubular</b> .....	33
<b>3.5. Estresse Oxidativo Testicular</b> .....	35
<b>3.6. Testosterona Sérica</b> .....	37
<b>3.7. Produção diária de espermatozoides, número de espermatozoides e tempo de trânsito epididimário</b> .....	37
<b>4. DISCUSSÃO</b> .....	<b>38</b>
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	<b>42</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>43</b>

## RESUMO

RODRIGUES, Grasielle Avelar Vieira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2019. **Efeitos da administração de cloridrato de metilfenidato (Ritalina<sup>®</sup>) sobre os testículos de camundongos Balb/c.** Orientador: Sérgio Luis Pinto da Matta. Coorientadora: Fernanda Carolina Ribeiro Dias.

Metilfenidato é um estimulante que atua no Sistema Nervoso Central, possuindo ações e estrutura semelhantes às anfetaminas. Foi usado inicialmente para tratar fadiga. Hoje é um medicamento muito conhecido no mercado para tratar Transtorno do Déficit de Atenção com Hiperatividade (TDAH). Em indivíduos com TDAH, os neurotransmissores dopamina e noradrenalina apresentam-se deficitários em quantidade e funcionamento. Desse modo, o mecanismo de ação do metilfenidato consiste em bloquear os transportadores de dopamina e noradrenalina. Baseado nestes dados, o objetivo foi avaliar os efeitos de duas doses de metilfenidato, sobre os testículos de camundongos adultos, por meio de avaliações morfológicas, histométricas, hormonais e espermáticas. Vinte e quatro camundongos Balb/c foram divididos aleatoriamente em três grupos experimentais (n=8): Grupo 01: controle (água destilada); Grupo 02: cloridrato de metilfenidato na dosagem de 20mg/kg/dia (MFD20); Grupo 03: cloridrato de metilfenidato na dosagem de 40mg/kg/dia (MFD40). O tratamento com metilfenidato causou alteração do peso corporal que pode indicar efeitos tóxicos causados pelo uso prolongado do medicamento. O diâmetro do túbulo seminífero e o diâmetro do lume não sofreram alterações com o tratamento. Em relação ao percentual e volume dos componentes tubulares, houve aumento na porcentagem de túbulo e epitélio, porém os percentuais de lume e túnica própria diminuíram. Os volumes de túbulo, túnica própria e lume reduziram nos grupos tratados. Neste estudo não foram observadas alterações patológicas significativas, mantendo inalterada a microestrutura tecidual. Houve reduções nos percentuais de espaço linfático, tecido conjuntivo e macrófagos, com consequente redução no percentual de intertúbulo. O tratamento com metilfenidato durante a fase adulta diminuiu as concentrações plasmáticas da testosterona nos grupos tratados e comprometeu o processo espermatogênico levando à redução no número de espermátides e espermatozoides, na produção espermática e no tempo de trânsito espermático no epidídimo. Dessa forma, pudemos comprovar que o metilfenidato pode prejudicar a fertilidade masculina.

## ABSTRACT

RODRIGUES, Grasielle Avelar Vieira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2019. **Effects of the administration of methylphenidate chloridrate (Ritalin®) on Balb/c testis.** Advisor: Sérgio Luis Pinto da Matta. Co-Adviser: Fernanda Carolina Ribeiro Dias.

Methylphenidate is a stimulant that acts in the Central Nervous System, possessing actions and structure similar to amphetamines. It was initially used to treat fatigue. Today is a well-known medicine in the market to treat Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD). In individuals with ADHD, the neurotransmitters dopamine and noradrenaline are deficient in both quantity and function. Thus, the mechanism of action of methylphenidate is to block the dopamine and noradrenaline transporters. Based on these data, the objective was to evaluate the effects of two doses of methylphenidate on the testes of adult mice through morphological, histometric and hormonal evaluations. Twenty four Balb/c mice were randomly divided into three experimental groups (n = 8): Group 01: control (distilled water); Group 02: methylphenidate hydrochloride at a dosage of 20 mg/kg/day (MFD20); Group 03: methylphenidate hydrochloride at a dosage of 40 mg/kg/day (MFD40). Treatment with methylphenidate has caused a change in body weight that may indicate toxic effects caused by prolonged use of the drug. The diameter of the seminiferous tubule and lumen diameter did not change with treatment. In relation to the percentage and volume of the tubular components, there was an increase in the tubule and epithelium percentage, but the percentage of lumen and proper tunic decreased. The volume of tubule, proper tunic and lumen reduced in the treated groups. In this study, no significant pathological changes were observed, maintaining the tissue microstructure unchanged. There were reductions in the percentages of lymphatic space, connective tissue and macrophages, with consequent reduction in intertubule percentage. Methylphenidate treatment during adulthood decreased plasma testosterone concentrations in the treated groups and compromised the spermatogenic process leading to a reduction in sperm and sperm count, sperm production and sperm transit time in the epididymis. Thus, we could prove that methylphenidate can impair male fertility.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

Metilfenidato é um estimulante que atua no Sistema Nervoso Central (SNC), possuindo ações e estrutura semelhantes às anfetaminas. Pode ser encontrado sob a forma de um sal, o cloridrato de metilfenidato, sendo caracterizado como um pó cristalino branco, inodoro e fino, solúvel em água, etanol, metanol, e fracamente solúvel em acetona e clorofórmio (COSTA, 2016). A molécula de metilfenidato foi sintetizada pela primeira vez em 1944 pelo químico italiano Leandro Panizzon. A empresa suíça Ciba, hoje conhecida como Novartis, foi a primeira responsável pela comercialização do medicamento sob nome de Ritalina. O medicamento recebeu este nome em homenagem à esposa de Panizzon, que tinha apelido de Rita (MYERS, 2007).

Metilfenidato foi usado inicialmente para tratar fadiga. Hoje é um medicamento muito conhecido no mercado para tratar Transtorno do Déficit de Atenção com Hiperatividade (TDAH). Este é um transtorno comportamental que acomete em maior número crianças, caracterizado pela existência de padrões persistentes de desatenção, hiperatividade e impulsividade em situações diversas do cotidiano (MORTON E STOCKTON, 2000). O medicamento pode ser encontrado sob três formas, Ritalina®, Ritalina LA® e Concerta®. A primeira de absorção imediata e as duas últimas de ação prolongada.

Em indivíduos com TDAH, os neurotransmissores dopamina (DA) e noradrenalina (NA) apresentam-se deficitários em quantidade e funcionamento. Desse modo, o mecanismo de ação do metilfenidato, assim como das anfetaminas, consiste em bloquear os transportadores de dopamina (DAT) e noradrenalina (NAT). Metilfenidato se liga ao DAT e NAT e impede a recaptação de dopamina e noradrenalina para o terminal pré-sináptico levando ao aumento da disponibilidade sináptica dos dois neurotransmissores. Esse aumento resulta num estado de vigília, manifestando-se fisiologicamente no aumento da capacidade de concentrar-se. Esse aumento da concentração tem levado pessoas saudáveis, em grande parte estudantes e trabalhadores (que não apresentam critérios para diagnóstico de TDAH ou qualquer outra doença que justifique o uso do medicamento), a utilizar esse fármaco para melhorar o desempenho, tanto acadêmico quanto profissional. Porém, o aumento dos níveis de DA e NA no corpo estriado pode causar sérios efeitos colaterais, entre eles, estereotipia e distúrbios motores como tiques, convulsões, palpitações, taquicardia, hipertensão, mania ou ideação suicida (STAHL, 2005).

As pesquisas ainda são escassas, principalmente no que diz respeito ao

aparelho reprodutor masculino. Há evidências de que receptores D2 de dopamina (DRD2) e vários receptores adrenérgicos são expressos nos testículos e espermatozoides de ratos, camundongos e humanos (ADEOYA-OSIGUWA et al., 2006). Embora o mecanismo exato ainda não tenha sido identificado, esses achados aparentemente explicam o caminho dos efeitos do medicamento nos tecidos reprodutivos masculinos dos mamíferos. Há estudo demonstrando que a administração de doses terapêuticas do medicamento provoca lesões testiculares como vacuolização, redução do peso testicular e da quantidade de espermátides arredondadas e perda de peso corporal (FAZELIPOUR, 2014) e, que doses altas têm levado ao aparecimento de câncer hepatocelular (DUNNICK, 1995). Portanto, neste estudo, avaliou-se o efeito do uso crônico de metilfenidato sobre a biometria corporal e testicular além dos seus efeitos sobre os parâmetros histomorfométricos testiculares e espermáticos de camundongos Balb/c em idade reprodutiva.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Gerais**

Avaliar os efeitos de doses crescentes de metilfenidato sobre os testículos de camundongos adultos, por meio de avaliações morfológicas, histométricas, hormonais e espermáticas.

### **2.2. Específicos**

- ✓ Obter o peso corporal e testicular;
- ✓ Determinar a proporção volumétrica e o volume dos componentes tubulares e intertubulares;
- ✓ Calcular os índices gonadossomático (IGS), parenquimossomático (IPS), tubulossomático (ITS), epiteliossomático (IES) e Leydigossomático (ILS);
- ✓ Mensurar o diâmetro dos túbulos seminíferos, diâmetro do lume e altura do epitélio seminífero;
- ✓ Calcular o comprimento total dos túbulos seminíferos e o comprimento total de túbulo por grama de testículo;
- ✓ Calcular as áreas tubular, luminal e epitelial;
- ✓ Avaliar as alterações estruturais do compartimento tubular;
- ✓ Mensurar o diâmetro e volume nuclear, os volumes citoplasmático e celular da célula de Leydig e calcular o número de células de Leydig por testículo e por grama de testículo;
- ✓ Determinar a concentração das enzimas antioxidantes catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione S-transferase (GST) nos testículos;
- ✓ Mensurar a concentração de óxido nítrico (NO) e malondialdeído (MDA) nos testículos;
- ✓ Realizar avaliação histopatológica dos testículos;
- ✓ Mensurar a concentração de testosterona sérica;
- ✓ Calcular a produção diária de espermatozoides, número de espermatozoides e tempo de trânsito epididimário.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. Metilfenidato

##### 3.1.1. Classificação farmacológica

O metilfenidato (MFD) é uma droga psicoestimulante leve, que atua no Sistema Nervoso Central (SNC) com ações semelhantes às anfetaminas. Suas propriedades farmacológicas têm sido bem descritas, mas seu mecanismo de ação não está completamente elucidado (SOLANTO, 1998; CONNERS, 2002). O metilfenidato (Figura 1) é derivado da piperidina, uma amina heterocíclica com um anel de seis membros contendo cinco átomos de carbono e um átomo de nitrogênio, e da fenetilamina comum à dopamina e noradrenalina. O nome químico é metil 2-fenil-2-(2-piperidil) acetato e apresenta uma massa molar de 233,311 g/mol (FRATI et al., 2015). A fórmula pura é insolúvel em água e solúvel em etanol, acetato de etila e éter (SOUSA, 2015).

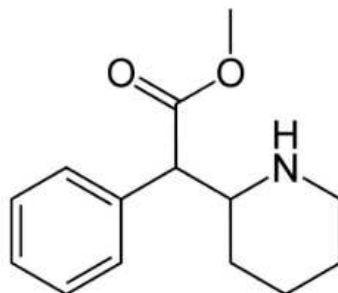


Figura 1. Estrutura do metilfenidato (SMITH, 2012).

Pode ser encontrado sob a forma de um sal, o cloridrato de metilfenidato (Figura 2), sendo caracterizado como um pó cristalino branco, inodoro e fino, solúvel em água, etanol, metanol, e fracamente solúvel em acetona e clorofórmio (COSTA, 2016). O MFD é comercializado como a mistura racêmica de d- e l- enantiômeros, ou seja, consiste de uma mistura 1:1 de d-metilfenidato e l-metilfenidato.

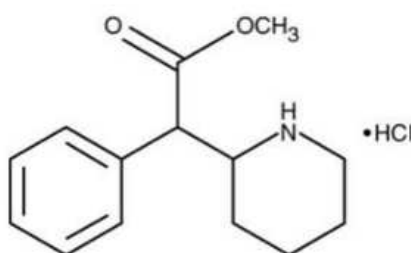


Figura 2. Estrutura do cloridrato de metilfenidato (DUNNICK, 1995).

### 3.1.2. História

A molécula de MFD foi sintetizada pela primeira vez em 1944 pelo químico italiano Leandro Panizzon. A partir da década de 50 ela foi patenteada e ensaios clínicos passaram a ser realizados em humanos. O próprio Panizzon e sua esposa relataram fazer uso da substância, então descrita como estimulante e tonificante do humor. Marguerite, que apresentava pressão arterial baixa, utilizava o estimulante especialmente para prática de tênis. O medicamento recebeu o nome de Ritalina em homenagem a esposa de Panizzon, que tinha como apelido Rita (MYERS, 2007).

A empresa suíça Ciba, hoje conhecida como Novartis, foi a primeira responsável pela comercialização do medicamento sob nome de Ritalina®. Em um primeiro momento o fármaco foi indicado para tratar fadiga crônica, especialmente em atletas, não estando, inicialmente, relacionado a diagnósticos psiquiátricos (ITABORAHY, 2009). Em 1960 a Ritalina® foi indicada no tratamento da “síndrome hiperkinética” (futuramente TDAH). Nos anos 80 ocorreu um aumento gradual do uso de Ritalina® e outros estimulantes no tratamento de TDAH. A partir do século XXI esse aumento se tornou abusivo, gerando preocupação em especialistas da área. Segundo uma pesquisa feita pela Organização das Nações Unidas, a produção mundial de MFD passou de 2,8 toneladas em 1990 para quase 38 toneladas em 2006 (ITABORAHY E ORTEGA, 2011).

O MFD ficou conhecido nos últimos anos por sua associação ao TDAH. Atualmente, o TDAH é considerado por psiquiatras e neurologistas um transtorno comportamental derivado de um conjunto de anormalidades em vários circuitos do córtex pré-frontal comum em crianças e adolescentes variando a uma taxa de 5% a 7% em todo o mundo (THOMAS et al., 2015). É caracterizado pela existência de padrões persistentes de desatenção, hiperatividade e impulsividade em situações diversas do cotidiano. Atualmente, entende-se que os sintomas persistem até a idade adulta, com uma margem de 60%, embora muitos não saibam que os têm. O MFD também tem sido usado no tratamento de outras desordens, como depressão, narcolepsia, lesão cerebral, dor, distúrbios cognitivos e esquizofrenia (MORTON E STOCKTON, 2000).

A comercialização do metilfenidato no Brasil teve início em 1998, quando a Ritalina® foi inserida no mercado nacional. Atualmente, o MFD está disponível no mercado brasileiro sob três formas, Ritalina®, Ritalina LA® e Concerta®. A primeira de absorção imediata e as duas últimas de ação prolongada. A principal diferença entre as três fórmulas é o tempo de ação. A Ritalina® tem duração menor no organismo por ter

absorção imediata sendo necessário que seja administrada de 3 a 4 vezes ao dia (RITALINA<sup>®</sup>. Bula, Novartis Biociências S/A). Por outro lado, Ritalina LA<sup>®</sup> e Concerta<sup>®</sup> possuem tempo de ação mais prolongado se comparado à Ritalina<sup>®</sup>, podendo chegar a 13 horas. A ação do medicamento ocorre de forma gradativa, permitindo que o paciente não apresente alterações de humor e oscilações durante o dia.

### **3.1.3. Propriedades farmacológicas**

O MFD é considerado a primeira escolha por especialistas para o tratamento medicamentoso do TDAH, e segunda escolha no controle da narcolepsia e obesidade (ITABORAHY, 2009). No TDAH, o MFD aumenta a concentração, atenção e memória enquanto, que na narcolepsia produz estimulação do SNC, aumento da vigília, diminuição da sensação de fadiga e elevação do estado de ânimo, entendido como alegria e ligeira euforia (BRANT E CARVALHO, 2012).

A Ritalina<sup>®</sup> possui ação de três a quatro horas, sendo a dose média diária de 10mg, administrada de três a cinco vezes ao dia (RITALINA<sup>®</sup>. Bula, Novartis Biociências S/A). Os efeitos clínicos farmacológicos são observados de 4 a 6 horas após uma dose oral. A Ritalina LA<sup>®</sup> deve ser tomada de uma a duas vezes ao dia com dosagens de 10, 20, 30 ou 40mg, enquanto o Concerta LA<sup>®</sup> tem duração de 12 horas, com apenas uma dose diária, e se apresenta em dosagens de 18, 36 e 54mg (CONCERTA<sup>®</sup>. Bula, Janssen-Cilag Farmacêutica Ltda). Os efeitos farmacológicos são observados de 3 a 9 horas após sua ingestão, para as duas formas que possuem ação prolongada. Tanto para Ritalina<sup>®</sup>, quanto para Ritalina LA<sup>®</sup> e Concerta LA<sup>®</sup>, uma dose diária máxima de 60mg não deve ser excedida. Caso a ingestão seja superior à máxima permitida, pode ocorrer agitação, tremores, euforia, espasmos musculares e convulsões possivelmente seguidas por coma.

Diante do seu efeito, principalmente em aumentar a concentração, pessoas saudáveis, em grande parte estudantes e trabalhadores (que não apresentam critérios para diagnóstico de TDAH ou qualquer outra doença que justifique o uso do medicamento), passaram a utilizar esse fármaco para melhorar o desempenho acadêmico e profissional. Por outro lado, MFD não tem sido usado para fins recreativos ou por simples curiosidade, como acontece com outras substâncias psicotrópicas (BRANT E CARVALHO, 2012).

### **3.1.4. Farmacocinética e metabolismo**

As propriedades farmacocinéticas e o metabolismo do MFD são iguais, independente da idade do paciente, e da forma utilizada (de absorção imediata ou de ação prolongada) (WIGAL et al., 2015). A dissolução do MFD de absorção imediata ocorre em maior parte no estômago, enquanto que a de absorção prolongada acontece no intestino. Ambas as formas de liberação são dissolvidas no fluido luminal intestinal e depois sofrem difusão passiva para os enterócitos (COSTA, 2016).

O MFD apresenta curta duração, em média duas a três horas após sua absorção completa, sendo metabolizado por meio do sistema microsomal hepático por desesterificação pela carboxilesterase CES1A1, com formação do ácido ritalínico. Menos de 1% é excretado inalteradamente na urina, enquanto 80% é excretado como ácido ritalínico (MORTON E STOCKTON, 2000). Além do ácido ritalínico, são metabolizados outros produtos em menor quantidade, dentre eles, o lactamo (<1%, considerado farmacologicamente inativo), lactamo desesterificado (5-12%) e o p-hidroximetilfenidato (metabólito ativo).

Há ainda o metabólito etilfenidato, formado quando se consome o MFD em altas doses associado com bebidas alcoólicas. Essa reação é uma transesterificação mediada pela CES1A1, e resulta na conversão do éster metilo presente no MFD em éster etilo formando o etilfenidato (VANDENBERG, 2016).

### **3.1.5. Mecanismos de ação**

Em níveis normais, os neurotransmissores dopamina (DA) e noradrenalina (NA) são liberados no córtex pré-frontal estimulando alguns receptores nos neurônios pós-sinápticos, o que possibilita níveis ótimos de transmissão de sinais e descargas neuronais (STAHL, 2014). Normalmente, DA e NA são liberados podendo atuar nos receptores pós-sinápticos ou podem ser captados de volta por seus transportadores aos neurônios dopaminérgicos e noradrenérgicos, respectivamente. Uma vez dentro dos neurônios, são armazenados em vesículas pelo transportador vesicular de monoaminas (VMAT). Assim, essas vesículas podem se fundir com a membrana, o que resulta em maior liberação de DA e NA, garantindo que nunca alcancem níveis tóxicos.

É nesse ponto que o metilfenidato atua, bloqueando os transportadores de dopamina (DAT) e noradrenalina (NAT), assim como as anfetaminas, embora seja sugerido que o efeito terapêutico do MFD se deve principalmente ao bloqueio do DAT (GATLEY, 1996; KUCZENSKI, 1997; PARK et al., 2014). O MFD se liga ao DAT e

NAT e impede a recaptação de DA e NA para o terminal pré-sináptico levando ao aumento da disponibilidade sináptica dos dois neurotransmissores. Esse aumento promove um estado de vigília no indivíduo tratado, manifestando-se fisiologicamente no aumento da capacidade de concentração, atenção e memória.

Por outro lado, o aumento dos níveis de DA e NA no corpo estriado pode causar efeitos colaterais como, estereotipia e distúrbios motores como tiques (VOLKOW et al., 2001). O aumento do nível dessas catecolaminas no nucleus accumbens explica seu potencial como droga de abuso (KUCZENSKI E SEGAL, 1997; KUCZENSKI E SEGAL, 1999), na diminuição do apetite, insônia, agitação e psicose (STAHL, 2005). Efeitos colaterais secundários também podem aparecer no paciente tratado com MFD, sendo os mais comuns as convulsões, palpitações, taquicardia, hipertensão, mania ou ideação suicida (STAHL, 2005).

### **3.1.6. Toxicidade**

O metilfenidato tem sido considerado uma droga com danos colaterais severos ou excessivos, tanto por sua utilização lícita quanto por sua utilização de forma ilícita, como droga de abuso. Além dos efeitos colaterais previstos na bula, estudos têm demonstrado que outros danos estão associados ao uso prolongado da droga. De acordo com NUTT et al. (2007), quando associados aos danos físicos, o metilfenidato tem superado o tabaco, dietilamida do ácido lisérgico (LSD), Cannabis (maconha), metilenodioximetanfetamina (MDMA), dentre outras. Atualmente existem poucas pesquisas sobre a genotoxicidade e carcinogenicidade do MFD em animais ou humanos, embora o fármaco esteja no mercado há mais de 70 anos. ADRIANI et al. (2006) avaliaram os perfis da expressão gênica do corpo estriado do cérebro em ratos com 30-44 dias de idade. Neste estudo, os animais receberam 2mg/kg/dia de MFD.

Os resultados evidenciaram que o tratamento com MFD subcrônico pareceu potencializar a expressão de genes específicos, dentre eles, proteases de matriz (ADAM-1, MMP14), seus inibidores (TIMP-2, TIMP-3) e fatores de crescimento (fator de crescimento transformador  $\beta$ 3 [TGF-  $\beta$ 3]), cuja atividade é indicativa de plasticidade neural e sináptica. A exposição ao MFD durante adolescência pode causar mudanças estruturais e funcionais nos circuitos estriados do cérebro relacionados à recompensa. Estes podem, por sua vez, explicar a ação moduladora positiva do MFD no processamento comportamental alterado, demonstrado por modelos animais de TDAH.

Em relação ao câncer, estudos experimentais nos dão informação sobre

efeitos da administração, em longo prazo, desta droga: não houve evidência de efeito carcinogênico de metilfenidato em ratos, mas em camundongos houve alguma evidência de atividade tumorigênica baseada no aumento da incidência de tumores hepatocelulares em machos e fêmeas em altas doses (50-60mg/kg de peso corporal). Além disso, em camundongos em que foram administradas altas doses, houve aumento na incidência de focos eosinofílicos e focos totais no fígado e um aumento no número de animais com múltiplos adenomas hepatocelulares (DUNNICK, 1995). Embora a incidência de carcinomas hepatocelulares isoladamente não tenha aumentado, a incidência combinada de adenomas e carcinomas hepatocelulares foi aumentada em camundongos que receberam alta dose.

FAZELIPOUR et al. (2014) relataram que a administração da menor dose indicada por especialistas, 10mg/kg/dia, acarretou a diminuição significativa no peso corporal de camundongos tratados com MFD por 40 dias, em relação ao controle. Em várias pesquisas foi demonstrado que a redução do peso corporal após administração de MFD poderia ser devida à diminuição do apetite, acarretando menor consumo de ração ou absorção reduzida de nutrientes, que estão diretamente relacionados ao peso corporal e crescimento do animal. Outros efeitos inespecíficos da perda de peso, que podem afetar indiretamente o crescimento e o desenvolvimento puberal incluem: complicações gastrointestinais, retardo do esvaziamento gástrico e má absorção. O mesmo estudo evidencia ainda, discretas alterações histopatológicas e histomorfométricas testiculares nos mesmos animais.

Poucos estudos foram realizados para investigar primariamente os possíveis efeitos do metilfenidato sobre os órgãos reprodutores masculinos. FAZELIPOUR et al. (2014) evidenciaram discretas alterações histopatológicas e histomorfométricas testiculares em camundongos tratados com 2mg/kg e 10mg/kg de MFD por 40 dias. Houve aumento no número de espermatogônias e diminuição da espessura do epitélio germinativo em todos os grupos experimentais. MONTAGNINI et al. (2014) demonstraram aumento significativo no volume do tecido intersticial em ratos submetidos à administração de doses diárias de 2,5 e 5mg/kg de MFD durante 40 dias. O tratamento com MFD também resultou em diferentes alterações na população celular do epitélio germinativo, como aumento no número de espermatogônias do tipo A no grupo MFD 5.0; e no grupo MFD 2.5, houve redução no número de espermatócitos I no preleptóteno. Desse modo, concluiu-se que o tratamento com MFD pode prejudicar a espermatogênese.

CANSU et al. (2010) verificaram possíveis efeitos do MFD em testículos de ratos Wistar submetidos a doses diárias de 5 e 10mg/kg durante 90 dias. O grupo MFD 5.0 apresentou redução de espermátides arredondadas no estágio II. O grupo MFD 10 apresentou redução tanto nas espermátides do estágio II quanto do estágio V, além de menor peso testicular. Em relação à expressão de fatores de crescimento (TGF), p53 foi aumentada no grupo MFD 10; e nos grupos MFD 5.0 e MFD 10, a expressão de TGF- $\beta$ 1 foi reduzida e o índice apoptótico aumentado. Os pesos corporais permaneceram estáveis em ambos os grupos. De acordo com CANSU, estes resultados mostraram que o metilfenidato pode afetar negativamente a espermatogênese não apenas pela redução do peso testicular e da quantidade de espermátides arredondadas, mas também pelo aumento da morte apoptótica e da ativação da p53.

### **3.2. Morfofisiologia dos Testículos**

O aparelho reprodutor masculino é composto por testículos, ductos genitais, glândulas acessórias e pênis (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2013). O testículo é o órgão responsável pela espermatogênese e síntese de hormônios sexuais (ROSS, 2016). Nos mamíferos, o testículo é dividido em dois compartimentos: intertubular (ou intersticial) e tubular, sendo o compartimento tubular constituído de túbulos seminíferos (RUSSELL et al., 1990). A maior parte do testículo é constituída do compartimento tubular que ocupa, na maioria dos mamíferos, de 70% a 90% do parênquima testicular (FRANÇA E RUSSELL, 1998). Os túbulos seminíferos são desprovidos de vascularização sendo constituídos por túnica própria, epitélio seminífero e lúmen. A túnica própria envolve o túbulo externamente, sendo composta de células mioídes, fibras colágenas e membrana basal. As células mioídes são contráteis com características de células musculares lisas, sendo responsáveis pela movimentação de fluidos e propulsão dos espermatozoides através do lúmen tubular (DAMASCENO, 2017).

No epitélio seminífero são encontrados dois tipos celulares: as células que constituem a linhagem espermatogênica (espermatogônias, espermátócitos e espermátides) e as células de Sertoli (KIERSZENBAUM, 2008). As células de Sertoli constituem um importante componente estrutural dos testículos. Entre suas funções está o suporte, a proteção e o suprimento nutricional de espermatozoides em desenvolvimento, e por meio de seus receptores para o hormônio folículo estimulante (FSH) controla a iniciação e regula a espermatogênese (BACCETTI et al., 1998).

Os componentes do tecido intersticial são as células de Leydig, vasos

sanguíneos e linfáticos, feixes nervosos e tecido conjuntivo, constituído por várias células, principalmente fibroblastos, mastócitos e macrófagos (RUSSELL et al., 1990). A célula de Leydig é o elemento mais frequente do compartimento intertubular (GODINHO, 1999). Possui receptor para o hormônio luteinizante (LH) e apresenta marcante produção de esteroides, a testosterona - o principal hormônio produzido nos testículos, e seu metabólito, a di-hidrotestosterona (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2013). A testosterona é responsável pela masculinização do feto, pelo desenvolvimento da genitália interna, desenvolvimento das características sexuais masculinas secundárias e pela manutenção da espermatogênese. A di-hidrotestosterona é responsável pela diferenciação dos órgãos genitais masculinos durante a puberdade (TEERDS et al., 1999; YE et al., 2011).

### **3.2.1. Células de Leydig**

As células de Leydig (ou células intersticiais) são originadas nos testículos durante o período embrionário. São células grandes, poligonais e eosinófilas, que contêm gotículas de lipídios no citoplasma (ROSS, 2016). Estão localizadas no interstício dos testículos, constituindo o principal componente endócrino deste órgão. Após a puberdade e sob a estimulação do hormônio luteinizante (LH), as células de Leydig sintetizam esteroides que incluem a testosterona e seu metabólito, a diidrotestosterona. Essas células são responsáveis pela produção de cerca de 95% da testosterona circulante no homem adulto (BARDIN, 1996). O restante é produzido pela glândula adrenal. A testosterona encontra-se em altas concentrações nos testículos a fim de impulsionar a espermatogênese, garantir a diferenciação da genitália externa na fase fetal, além de promover e manter os caracteres sexuais secundários. A diidrotestosterona, por sua vez, é responsável pela manutenção funcional das glândulas acessórias e do epidídimo (LUKE E COFFEY, 1994; FAN E ROBAIRE, 1998; GOYAL et al., 1999).

Nos mamíferos, as células de Leydig podem ser temporalmente subdivididas em seis categorias e incluem: as células de Leydig fetais; do recém-nascido; da puberdade; adultas; sazonais e envelhecidas. Dos tipos citados, podem ser destacadas as células de Leydig fetais, que são produtoras de testosterona responsável pela masculinização fetal e as células de Leydig do tipo adulto produtoras de testosterona responsável pelas características sexuais secundárias e pelo processo espermatogênico (KERR E KNELL, 1988).

### **3.2.2. Espermatogênese**

A espermatogênese é um evento fisiológico complexo e bem organizado de divisões celulares que ocorrem no interior dos túbulos seminíferos, com a finalidade de produzir espermatozoides sendo inteiramente regulada por hormônios (ROSS, 2016). Acontece num intervalo de tempo entre 40 a 60 dias na maioria dos mamíferos (RUSSELL et al., 1990), iniciando-se durante a puberdade.

A espermatogênese é dividida em três fases distintas, a saber: 1) fase espermatogonial, em que as espermatogônias dividem-se por mitose que irão dar origem aos espermatócitos primários; 2) fase espermatocítica, na qual os espermatócitos primários sofrem duas divisões meióticas e produzem células haploides, denominadas espermatídes; e 3) fase espermatídica ou espermiogênica, em que as espermatídes diferenciam-se em espermatozoides maduros (RUSSELL et al., 1990; SHARPE, 1994). No final da espermatogênese, as espermatídes sofrem sua maturação final e são liberadas no lúmen do túbulo seminífero durante um processo denominado espermição (ROSS, 2016).

Durante a puberdade, células denominadas espermatogônias iniciam um processo de mitose produzindo gerações de células-filhas. Uma célula-filha se mantém como célula-tronco e a outra inicia uma sequência de divisões mitóticas, dando origem a espermatogônias do tipo A e do tipo B, morfologicamente distintas. As espermatogônias do tipo B passam por divisões mitóticas e completam a fase S (síntese de DNA) do ciclo celular dando origem a espermatócitos primários. Os espermatócitos primários duplicam seu DNA e, durante a anáfase da meiose I, originam os espermatócitos secundários. Estes entram na meiose II, originando as espermatídes. As espermatídes diferenciam-se em espermatozoides num processo denominado espermiogênese (KIERSZENBAUM, 2008; JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2013).

### **3.3. Estresse Oxidativo**

O estresse oxidativo é causado pelo desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (EROs / ERNs) provenientes do meio ambiente ou geradas pelo próprio organismo sendo o excesso desses radicais livres combatido por antioxidantes (SIES, 1985; PERSSON et al., 2014). Entende-se como radicais livres os átomos ou moléculas que possuam um ou mais elétrons desemparelhados no último orbital externo, tornando-o altamente reativo a qualquer outro tipo de molécula como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos (VANNUCCHI et al.,

1998).

O organismo humano sofre ação constante de EROs e ERNs e seu excesso causa danos prejudiciais, como a peroxidação dos lipídios de membrana e agressão às proteínas dos tecidos e de membranas, às enzimas, aos carboidratos e ao DNA e RNA, o que tem sido relacionado à patogênese de várias doenças degenerativas. As principais EROs são a hidroxila ( $\text{OH}^\cdot$ ), o radical livre mais deletério ao organismo, formado principalmente pela reação de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), o qual pode difundir-se facilmente pelas membranas celulares, e o radical superóxido ( $\text{O}_2^\cdot$ ), que atua na produção do radical hidroxila e na defesa do organismo contra infecções. Dentre as ERNs destaca-se o óxido nítrico (NO), que isolado não causa danos à célula, porém pode reagir com o  $\text{O}_2^\cdot$  e gerar agentes com capacidade de alterar a estrutura de proteínas (BARREIROS et al., 2006).

A proteção do organismo contra as EROs e ERNs ocorre por meio de enzimas antioxidantes que podem ter origem no próprio corpo ou serem adquiridas pela dieta. São conhecidos três sistemas enzimáticos antioxidantes: superóxido dismutase (SOD) que catalisa enzimaticamente  $\text{O}_2^\cdot$  em  $\text{H}_2\text{O}_2$  (DROGE, 2002); catalase (CAT), encarregada de decompor  $\text{H}_2\text{O}_2$  em  $\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{O}_2$  (AEBI, 1984) e glutatona S-transferase (GST) que catalisa a dismutação do  $\text{H}_2\text{O}_2$  em  $\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{O}_2$  e participa da desintoxicação celular contra substâncias exógenas, por meio de conjugados de glutatona com xenobióticos e produtos aldeídicos que são produzidos na peroxidação lipídica (HABIG et al., 1974; HERMES-LIMA, 2004). Por meio destes sistemas, a concentração de EROs é mantida dentro dos limites fisiológicos, formando assim o mecanismo antioxidante enzimático (RIBEIRO et al., 2005). Existem ainda antioxidantes biológicos como a bilirrubina, ubiquinona, carotenoides e ácido úrico, além da vitamina C (ANTUNES-NETO et al., 2005).

A produção de peróxidos e superóxidos de hidrogênio podem iniciar a peroxidação lipídica com a formação de radicais de ácidos graxos. O malondialdeído (MDA), produzido pela oxidação lipídica, é um importante sinalizador de estresse oxidativo utilizado para quantificar a peroxidação lipídica em amostras (JANERO, 1990; VANNUCCHI et al., 1998).

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEOYA-OSIGUWA, S. A.; GIBBONS, R.; FRASER, L. R. Identification of functional alpha2- and beta-adrenergic receptors in mammalian spermatozoa. **Human Reproduction**: v. 21, p. 1555–1563, 2006.

ADRIANI, W.; LEO, D.; GUARINO, M.; NATOLI, A.; CONSIGLIO, E.; ANGELIS, G.; TRAINA, E.; TESTAI, E.; PERRONE-CAPANO, C.; LAVIOLA, G. Short-Term Effects of Adolescent Methylphenidate Exposure on Brain Striatal Gene Expression and Sexual/Endocrine Parameters in Male Rats. **New York Academy of Science**: v. 1074, n. 1, p. 52–73, 2006.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**: n.105 p.121–126, 1984.

ANTUNES-NETO, J. M. F.; SILVA, L. P.; MACEDO, D. V. Biomarcadores de estresse oxidativo: novas possibilidades de monitoramento em treinamento físico. **Revista Brasileira Ciência Movimento**: vol. 13, n. 2, p. 7-15, 2005.

BACCETTI, B.; COLLODEL, G.; COSTANTINO-CECCARINI, E.; ESHKOL, A.; GAMBERA, L.; MORETTI, E.; STRAZZA, M.; PIOMBONI, P. Localization of human follicle-stimulating hormone in the testis. **Faseb Journal**: v. 12, p.1045-1054, 1998.

BARDIN, C. W. Androgens: early attempts to evaluate Leydig cell function in man. In: The Leydig cell. Payne, A. H.; Hardy, M. P.; Russell, L. D. Vienna, **Cache River Press**: p. 31-42, 1996.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Oxidative stress: relations between the formation of reactive species and the organism's defense. **Química Nova**: v. 1, n. 29, p. 113–123, 2006.

BRANT, L.; CARVALHO, T. Metilfenidato: medicamento gadget da contemporaneidade. **Interface - Comunicação, Saúde, Educação**: v. 16, n. 42, p.623 - 636, 2012.

CANSU, A.; EKINCI, O.; SERDAROGLU, A.; ERDOGAN, D.; COSKUN, Z. K.; GURGEN, S. G. Methylphenidate has dose-dependent negative effects on rat spermatogenesis: decreased round spermatids and testicular weight and increased p53 expression and apoptosis. **Human and Experimental Toxicology**: v. 30, n.10, p.1592–1600, 2010.

CONCERTA®. Bula, Janssen-Cilag Farmacêutica Ltda, 2018.

COSTA, J. S. **Metilfenidato: Uso e quantificação**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde – Universidade Fernando Pessoa, 2016.

CONNERS, C. K. - Forty Years of Methylphenidate Treatment in Attention-Deficit Hyperactivity Disorder. **Journal Attention Disorder**: v. 6, n. 1, p. 17-30, 2002.

DAMASCENO, E. M. **Efeitos do extrato alcoólico de cipó-cravo *Thynanthus fasciculatus* Miers (Bignoliaceae) sobre testículos de camundongos Swiss adultos**. Viçosa – UFV, 2017. (Tese de Doutorado).

DROGE, W. Free radicals in the Physiological Control of Cell Function. **Physiological Reviews:** n.1, p. 47-95, 2002.

DUNNICK, J. K.; HAILEY, J. R. Experimental studies on the long-term effects of methylphenidate hydrochloride. **Toxicology:** v. 103, p. 77–84, 1995.

FAN, X.; ROBAIRE, B. Orchiectomy induces a wave of apoptotic cell death in the epididymis. **Endocrinology:** v. 139, p. 2128 - 2136, 1998.

FAZELIPOUR, S.; TOOTIAN, Z.; SAREMI, Z. G.; SHAFII, M.; SHEIBANI, M. T.; KIAEI, S. B.; KIUMARSI, M.; ASSADI, F. Evaluation of histopathologic and histomorphometric changes of testicular tissue and gonadotropin levels following consumption of methylphenidate in male mice. **Turkish Journal of Medical Sciences:** v. 44, p. 554-559, 2014.

FAZELIPOUR, S.; JAHROMY, M. H.; TOOTIAN, Z.; KIAEI, S. B.; SHEIBANI, M. T.; TALAEE, N. The Effect of Chronic Administration of Methylphenidate on Morphometric Parameters of Testes and Fertility in Male Mice. **Journal Reproduction Infertility:** v. 13, n. 4, p. 232-236, 2012.

FRANÇA, L. R.; RUSSELL, L. D. The testis of domestic mammals. In: Regadera, J., Martinez-Garcia, F. (Eds.). Male reproduction: a multidisciplinary overview. **Churchill Communications**, Madrid, p.197-219, 1998.

FRANÇA, L. R.; HESS, R. A.; DUFOUR, J. M.; HOFMANN, M. C.; GRISWOLD, M. D. The Sertoli cell: one hundred fifty years of beauty and plasticity. **Andrology:** n.4, p. 189-212, 2016.

FRATI, P.; KYRIAKOU, C.; DEL, R. A.; MARINELLI, E.; VERGALLO, G. M.; ZAAMI, S.; BUSARDO, F. Smart Drugs and Synthetic Androgens for Cognitive and Physical Enhancement: Revolving Doors of Cosmetic Neurology. **Current Neuropharmacology:** v. 13, n. 1, p. 5-11, 2015.

GATLEY, S.; JOHN, P. D.; CHEN, R.; CHATURVEDI, G.; DING, Y. S. Affinities of methylphenidate derivatives for dopamine, norepinephrine and serotonin transporters. **Life Sciences:** v. 58, n. 12, p. 231-239, 1996.

GODINHO, C. L. **Análise histométrica do testículo e duração da espermatogênese em gatos (*Felis domestica*), sexualmente maduros.** Belo Horizonte – UFMG 1999. (Dissertação, Mestrado).

GOYAL, H. O.; WILLIAMS, C. S.; KHALIL, M. K.; VIG, M. M.; MALONEY, M. A. Postnatal differentiation of ductus deferents, tail of the epididymis, and distal body of epididymis in goats occurs independently of rete testis fluid. **Anatomical Record:** v. 254, p. 508-520, 1999.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-Transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. **The Journal of Biological Chemistry:** v. 22, n. 249, p. 7130-7139, 1974.

HERMES-LIMA, M. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In: WILEY & SONS, J., HOBOKEN, N. J. **Functional Metabolism: Regulation and Adaptation**. Ed. K. B. Storey, p. 640, 2004.

ITABORAHY, C. **A Ritalina no Brasil: Uma Década de Produção, Divulgação e Consumo**. Dissertação (Mestrado em Medicina Social) – Instituto de Medicina Social – Universidade Estadual do Rio de Janeiro, 2009.

ITABORAHY, C.; ORTEGA, F. O metilfenidato no Brasil: uma década de publicações. Instituto de Medicina Social-UERJ. Rio de Janeiro, v.18, n. 3, p. 803-806, 2011.

JANERO, D. R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. **Free Radical Biology & Medicine**: v. 6, n. 9, p.515-540, 1990.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. Cap. 21: Aparelho Reprodutor Masculino. Texto e Atlas. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 12 ed, p. 411-426, 2013.

KARL, J.; CAPEL, B. Sertoli cell of the mouse testis originate from the coelomic epithelium. **Developmental Biology**: v. 203, p. 323-333, 1998

KEMPINAS, W. G.; SUAREZ, J. D.; ROBERTS, N. L.; STRADER, L.; FERRELL, J.; GOLDMAN, J. M.; KLINEFELTER, G. R. Rat epididymal sperm quantity, quality and transit time after guanethidine-induced sympathectomy. **Biology of Reproduction**: v. 59, p. 890–896, 1998.

KERR, J. B.; KNELL, C. M. The fate of fetal Leydig cell during the development of the fetal and postnatal. **Development**: n. 103, p. 535-544, 1988.

KIERSZENBAUM, A. L. **Histologia e biologia celular: uma introdução à patologia**. Cap. 20: Espermatogênese. 2º edição. Ed. Elsevier, p. 573-595, 2008.

KRANE, R. J.; GOLDSTEIN, I.; SAENS, T. I. Impotence. **New England Journal of Medicine**: v. 321, p.1648-1659, 1989.

KUCZENSKI, R.; SEGAL, D. S. Effects of methylphenidate on extracellular dopamine, serotonin, and norepinephrine: Comparison with amphetamine. **Journal Neurochemical**: v. 68, p. 2032-2037, 1997.

KUCZENSKI, R.; SEGAL, D. S. Locomotor effects of acute and repeated threshold doses of amphetamine and methylphenidate: relative roles of dopamine and norepinephrine. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**: v.296, p.876-883, 2001.

LUKE, M. C.; COFFEY, D. S. The male sex accessory tissue: structure, androgen action and physiology. In: Knobil, E. (Ed). **The physiology of reproduction**: New York: Raven Press, p. 1435 - 1488, 1994.

MONTAGNINI, B. G.; SILVA, L. S.; SANTOS, A. H.; ANSELMO-FRANCI, J. A.; FERNANDES, G. S. A.; MESQUITA, S. F. P.; GERARDIN, D. C. C. Effects of repeated administration of methylphenidate on reproductive parameters in male rats. **Physiology & Behavior**: v. 133, p. 122-129, 2014.

MORTON, W. A.; STOCKTON, G. G. Methylphenidate Abuse and Psychiatric Side Effects. **Primary Care Companion Journal Clinical Psychiatry**: v. 2, n. 5, p. 159–164, 2000.

MYERS, R. L. **Methylphenidate (Ritalin)**. In: \_\_\_\_\_. The 100 Most Important Chemical Compounds: A Reference Guide. Greenwood Press: Westport: p.178-180, 2007.

NUTT, D.; KING, L. A.; SAULSBURY, W.; BLAKEMORE, C. Development of a rational scale to assess the harm of drugs of potential misuse. **The Lancet**: v. 369, n. 9566, p. 1047-1053, 2007.

PARK, P.; CABALLERO, J.; OMIDIAN, H. Use of serotonin norepinephrine reuptake inhibitors in the treatment of attention-deficit hyperactivity disorder in pediatrics. **Annals of Pharmacotherapy**: v. 48, n. 1, p. 86-92, 2014.

PERSSON, T.; POPESCU, B. O.; CEDAZO-MINGUEZ, A. Oxidative stress in Alzheimer's disease: why did antioxidant therapy fail? **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**: p.1-11, 2014.

RIBEIRO, S. M. R.; QUEIROZ, J. H.; PELÚZO, M. C. G.; COSTA, N. M. B.; MATTA, S. L. P.; QUEIROZ, M. E. L. R. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Bioscience Journal**: v. 3, n. 21, p. 133-149, 2005.

RICART-JANÉ, D.; LLOBERA, M.; LÓPEZ-TEJERO, M. D. Anticoagulants and other preanalytical factors interfere in plasma nitrate/nitrite quantification by the Griess method. **Nitric Oxide**: v. 6, p.178-185, 2002.

RITALINA<sup>®</sup>. Bula, Novartis Biociências S.A, 2018.

ROBB, G. W.; AMMAN, R. P.; KILLIAN, G. J. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. **The Journal of the Society Reproduction and Fertility**: v. 54, p.103-7, 1978.

ROSS, M. H.; PAWLINA, W. **Histologia: Texto e Atlas**. Cap. 22: Sistema Reprodutor Masculino. 7 ed. – Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 1211-1273, 2016.

RUSSELL, L. D.; ETTLIN, R. A.; SINHA, HIKIM A. P.; CLEGG, E. D. Mammalian spermatogenesis. In: Russell L. D.; Ettlín, R. A.; Sinha, Hikim A. P.; Clegg, E. D. editors. **Histological and Histopathological Evaluation of the Testis**: Florida, p. 1–40, 1990.

SHARPE, R. M.; MADDOCKS, S.; KERR, J. B. Cell-cell interactions in the control of spermatogenesis as studied using Leydig cell destruction and testosterone replacement. **American Journal of Anatomy**: v. 188, p. 3-20, 1990.

SIES, H. Oxidative stress: Introductory remarks. In: SIES, H. (ed). **Oxidative Stress**. Academic Press: London, p. 1-8, 1985.

SMITH, L. N.; BACHUS, S. E.; MCDONALD, C. G.; SMITH, R. F. Role of the D3 dopamine receptor in nicotine sensitization. **Behavioural Brain Research**: v. 289, p. 92-104, 2015.

SMITH, G. **Medicines that make you smarter. Is harder, stronger, faster really better?** Disponível em <<http://www.thenakedscientists.com/HTML/articles/article/medicines-that-make-you-smarter/2016>>. Acesso em: 11 maio 2018.

SOLANTO, M. Neuropsychopharmacological mechanisms of stimulant drug action in attention-deficit hyperactivity disorder: a review and integration. **Behavioural Brain Research**: Dusseldorf, v. 94, p. 127-152. 1998.

SOUSA, P. (2015). **Ritalina**. Disponível em: <<http://sofiasoso251.wixsite.com/ffup-ritalina>>. Acesso em: 11 maio 2018.

STAHL, M. S. **Psicofarmacologia: bases neurocientíficas e aplicações práticas**. Cap. 12: Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade e seu Tratamento. 4 ed – Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 435- 464, 2014.

STAHL, M. S. **Essential Psychopharmacology: The Prescriber's Guide**. Cap. 22: d,l-methylphenidate. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 121 - 126, 2005.

TEERDS, K. J.; BROUWER, B. M.; DORRINGTON, J. H.; BALVERS, M.; IVELL, R. Identification of markers for precursor and Leydig cell differentiation in the adult rat testis following ethane dimethyl sulphonate administration. **Biology of Reproduction**: v. 60, n. 6, p. 1437-1445, 1999.

THOMAS, R.; SANDERS, S.; DOUST, J.; BELLER, E.; GLASZIOU, P. Prevalence of attention-deficit/hyperactivity disorder: A systematic review and meta-analysis. **Pediatrics**: v. 135, n. 4, p. 994-1001, 2015.

TRAISH, A. M. Androgens play a pivotal role in maintaining penile tissue architecture and erection: A review. **Journal of Andrology**: v. 30, p. 363-36.

VANDENBERG, C. Stimulants and Other Non-stimulants for Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder In: Jann, M. et al. **Applied Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Psychopharmacological Agents**. 2016.

VANNUCCHI, E.; MOREIRA, E. A. M.; CUNHA, D. F.; JUNQUEIRA-FRANCO, M. V. M.; BERNARDES, M. M.; JORDÃO, J. R. A. A. Papel dos nutrientes na peroxidação lipídica e no sistema de defesa antioxidante. **Medicina (Ribeirão Preto Online)**: v. 1, n. 31, p. 31-44, 1998.

VOLKOW, N. D.; WANG, G.; FOWLER, J. S.; LOGAN, J.; GERASIMOV, M.; MAYNARD, L.; DING, Y.; GATLEY, S. J.; GIFFORD, A.; FRANCESCHI, D. Therapeutic doses of oral methylphenidate significantly increase extracellular dopamine in the human brain. **Journal of Neuroscience**: v. 15, p. 121, 2001.

WIGAL, S. B.; NORDBROCK, E.; ADJEI, A. L.; CHILDRESS, A.; KUPPER, R. J.; GREENHILL, L. Efficacy of methylphenidate hydrochloride extended-release capsules (Aptensio XR™) in children and adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder: a phase III, randomized, double-blind study. **CNSDrugs**: v. 29, p. 331–340, 2015.

YE, L.; SU, Z.; GE, R. Inhibitors of testosterone biosynthetic and metabolic activation enzymes. **Molecules**: v. 16, n. 12, p. 9983-10001, 2011.

**USO FREQUENTE DE CLORIDRATO DE METILFENIDATO (Ritalina®) CAUSA  
REDUÇÃO NA PRODUÇÃO ESPERMÁTICA E AUMENTO DO TEMPO DE  
TRÂNSITO ESPERMÁTICO EM CAMUNDONGOS BALB/C**

## 1. INTRODUÇÃO

O metilfenidato (MFD) é um medicamento indicado para tratar normalmente crianças com Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH), entre outras doenças do Sistema Nervoso Central, como a narcolepsia. Seus efeitos colaterais mais frequentes são a ação broncodilatadora, insônia, redução do apetite, alterações no humor, náuseas e vômitos e dores abdominais. A princípio o medicamento tem o poder de tranquilizar o paciente, estimulando sua concentração e sua capacidade de focalizar-se em uma atividade por mais tempo, sem a sensação ou aparência de quem está dopado, ao mesmo tempo sem ficar agitado (COUTINHO, 2009).

Em um primeiro momento o fármaco foi indicado para tratar fadiga crônica, especialmente em atletas, não estando, inicialmente, relacionado a diagnósticos psiquiátricos (ITABORAHY, 2009). Em 1960 a Ritalina<sup>®</sup> foi indicada no tratamento da “síndrome hiperkinética” (futuramente TDAH). Nos anos 80 ocorreu um aumento gradual do uso de Ritalina<sup>®</sup> e outros estimulantes no tratamento de TDAH. A partir do século XXI esse aumento se tornou abusivo, principalmente entre a população de jovens universitários. Pressionados por provas, exames e trabalhos de faculdade, estudantes começaram a fazer uso do remédio, trocando o tradicional café ou pó de guaraná pela Ritalina<sup>®</sup>. O objetivo seria melhorar a concentração e diminuir o cansaço, agindo como uma espécie de anabolizante para o cérebro, para conseguir acumular mais informação em menos tempo. No mercado de trabalho, ela também entrou para o cardápio: executivos passaram a procurar no medicamento uma forma de suportar batentes que costumam ultrapassar dez horas (MATOS, et al., 2004).

Em indivíduos com TDAH, os neurotransmissores dopamina (DA) e noradrenalina (NA) apresentam-se deficitários em quantidade e funcionamento. Desse modo, o mecanismo de ação do metilfenidato, assim como das anfetaminas, consiste em bloquear os transportadores de dopamina (DAT) e noradrenalina (NAT). Metilfenidato se liga ao DAT e NAT e impede a recaptação de dopamina e noradrenalina para o terminal pré-sináptico levando ao aumento da disponibilidade sináptica dos dois neurotransmissores. Esse aumento resulta num estado de vigília, manifestando-se fisiologicamente no aumento da capacidade de concentrar-se. Porém, o aumento dos níveis de DA e NA no corpo estriado, podem causar sérios efeitos colaterais, entre eles, estereotipia e distúrbios motores como tiques, convulsões, palpitações, taquicardia, hipertensão, mania ou ideação suicida, e potencial uso como droga de abuso.

As pesquisas ainda são escassas, principalmente no que diz respeito ao

aparelho reprodutor masculino. Há evidências de que receptores D2 de dopamina (DRD2) e vários receptores adrenérgicos são expressos nos testículos e espermatozoides de ratos, camundongos e humanos (ADEOYA-OSIGUWA et al., 2006). Embora o mecanismo exato ainda não tenha sido identificado, esses achados aparentemente explicam o caminho dos efeitos do medicamento nos tecidos reprodutivos masculinos dos mamíferos. Estudos demonstraram que a administração de doses terapêuticas do medicamento tem sido relacionada a lesões testiculares e alteração do comportamento sexual em modelos animais, danos no fígado, além do aparecimento de câncer hepatocelular. Porém, há necessidade de estudo mais detalhado envolvendo histopatologia, morfometria e estereologia testiculares, realizando-se análises até agora não efetuadas relacionadas ao processo espermatogênico. Portanto, neste estudo avaliou-se o efeito do uso crônico de metilfenidato sobre a biometria corporal e testicular, além dos seus efeitos sobre os parâmetros histomorfométricos e estereológicos testiculares, o nível de testosterona sérica e o tempo de trânsito epididimário de camundongos Balb/c em idade reprodutiva.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Animais experimentais**

Foram utilizados 24 camundongos machos Balb/c, pesando entre 35 e 45g, em idade reprodutiva (80 dias), provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa – Campus Viçosa. Os animais foram mantidos no Biotério Setorial do Laboratório de Biologia Estrutural do Departamento de Biologia Geral com controle de iluminação ambiente (12h claro/12h escuro), umidade (60 – 70%) e temperatura ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ), tendo acesso a alimento (ração comercial) e água ad libitum. Os animais permaneceram em período de adaptação por duas semanas. Para definir o tamanho da amostra utilizamos o programa WinPepi, com um nível de significância de 5% e um grau de certeza de 10%, conferindo ao teste um poder de 90%.

Todos os procedimentos experimentais adotados seguiram os padrões determinados pelo CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa (CEUA/UFV), sob o protocolo 70/2018.

## **2.2. Grupos experimentais e administração do fármaco**

Os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos experimentais (n=8): Grupo 01-água destilada (controle); Grupo 02- cloridrato de metilfenidato na dosagem de 20mg/kg/dia (MFD20); Grupo 03- cloridrato de metilfenidato na dosagem de 40mg/kg/dia (MFD40). Após a pesagem dos camundongos, os grupos foram tratados por 42 dias consecutivos, considerando o tempo de duração do ciclo do epitélio seminífero no camundongo (RUSSELL et al., 1990). A administração das doses foi realizada de 12h em 12h (7h/19h) por gavagem através de cânula de metal orofaríngea. Foi administrado um volume de 0,5ml em cada dose, totalizando 1ml ao dia.

## **2.3. Coleta do material biológico**

Após 24 horas da última gavagem, os animais de cada grupo foram pesados em balança de precisão 0,01g (AS500, Marte), anestesiados com tiopental (150mg/kg) intraperitoneal e eutanasiados por exsanguinação. A coleta do sangue foi realizada por meio de punção cardíaca. O sangue foi centrifugado a 2000rpm por 20 minutos para obtenção do soro, que foi armazenado em microtubos e congelado a -20°C para análises posteriores.

Em seguida, os testículos foram removidos e pesados. Quatro testículos direitos foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer -80°C para análises de estresse oxidativo e quatro testículos direitos foram congelados no gelo e armazenados a -20°C para análises de trânsito espermático. Os testículos esquerdos foram fixados em solução de Karnovsky (paraformaldeído 4% e glutaraldeído 4%, em tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,4) (KARNOVSKY, 1965), por 24 horas, e transferido após esse período para etanol 70%, sendo utilizado para análises histométricas em microscopia de luz.

## **2.4. Processamento histológico e microscopia de luz**

Fragmentos dos testículos foram desidratados em concentrações crescentes de etanol (80%, 95% e 100%) e incluídos em 2-hidroxietil metacrilato (Historesin<sup>®</sup>, Leica). Secções semisseriadas de 3µm de espessura foram obtidas em micrótomo rotativo (RM 2255, Leica), respeitando-se intervalos de, no mínimo, 40 µm entre os cortes. As preparações histológicas foram coradas com azul de toluidina - borato de sódio 1% e montadas com Entellan<sup>®</sup> (Merck, Frankfurt, Alemanha). As imagens foram obtidas em fotomicroscópio de campo claro (Olympus BX -53, Tokyo, Japan) equipado

com câmera digital (Olympus AX 70 TRF, Tokyo, Japan) e a morfometria foi realizada por meio do software Image J<sup>®</sup> (National Institute of Health, USA).

## **2.5. Biometria testicular**

Depois de fixados, os testículos esquerdos foram pesados. A partir do peso testicular foi calculado o índice gonadossomático (IGS). O IGS representa o percentual de peso corporal alocado em gônadas, a partir da fórmula  $IGS (\%) = (PG/PC) \times 100$ , onde PG = peso das gônadas e PC = peso corporal. Para determinar o peso do parênquima testicular a albugínea foi retirada e pesada, descontando seu peso do testículo inteiro. A relação entre o parênquima e o peso corporal, é o índice parenquimossomático (IPS), obtido através da equação:  $IPS (\%) = (PP/PC) \times 100$ , onde PP é o peso do parênquima testicular.

## **2.6. Morfometria Tubular**

### **2.6.1. Proporção volumétrica (%) dos componentes do parênquima testicular**

A proporção volumétrica entre os elementos que compõem o parênquima testicular foi estimada a partir da contagem de 2.660 pontos por animal, utilizando-se retículo com 266 intersecções (pontos), em aumento de 100X, realizando-se a contagem de dez campos aleatoriamente distribuídos para cada animal. Foram contabilizados pontos incidentes sobre o túbulo (túnica própria, epitélio seminífero e lume) e intertúbulo. Para cálculo do volume dos componentes testiculares foi utilizada a fórmula:  $\text{Volume} = \% \text{ de epitélio seminífero, \% túnica própria, \% lume ou \% intertúbulo} / 100 \times \text{peso do parênquima de um testículo}$ .

### **2.6.2. Diâmetro tubular, altura do epitélio e comprimento dos túbulos seminíferos**

O diâmetro tubular médio por animal foi obtido a partir da mensuração, ao acaso, de 20 secções transversais de túbulos seminíferos, que apresentavam diâmetro o mais circular possível, independente do estágio do ciclo em que se encontravam. Nas mesmas secções utilizadas para se medir o diâmetro tubular foi mensurada a altura do epitélio seminífero, a qual foi tomada da túnica própria até o lume tubular. O valor encontrado para a altura do epitélio, em cada túbulo, representou a média de duas medidas tomadas de forma diametralmente opostas.

O comprimento total dos túbulos seminíferos por testículo (CTT/t), expresso em metros, foi estimado a partir do conhecimento do volume ocupado pelos túbulos

seminíferos no testículo e do diâmetro tubular médio obtido para cada animal, empregando-se a fórmula (ATTAL E COUROT, 1963):  $CTT = VTS/\pi R^2$ , onde VTS = volume total de túbulos seminíferos;  $\pi R^2$  = área da seção transversal dos túbulos seminíferos; R = diâmetro tubular/2. O comprimento total dos túbulos seminíferos por grama de testículo (CTT/g) foi calculado a partir da fórmula:  $CTT/g = (CTT/t)/\text{peso bruto dos testículos (g)}$ .

### **2.6.3. Índice tubulossomático e epiteliossomático**

O índice tubulossomático (ITS) refere-se ao percentual de massa corporal alocado em túbulos seminíferos visando, portanto, quantificar o investimento em produção espermática com relação à massa corporal, a partir da fórmula  $ITS = (VTS/PC) \times 100$ , onde VTS = volume do túbulo seminífero e PC = peso corporal. O índice epiteliossomático foi calculado a partir da fórmula  $IES = (VES/PC) \times 100$ , onde VES = volume de epitélio seminífero.

### **2.6.4. Áreas tubular, luminal, epitelial e relação túbulo/epitélio (T/E)**

Para os cálculos das áreas tubular (ART), luminal (ARL) e epitelial (ARE) foram utilizadas as seguintes equações:  $ART = \pi \times RT^2$ , onde RT = raio tubular;  $ARL = \pi \times RL^2$ , onde RL = raio luminal;  $ARE = ART - ARL$  e a Relação T/E =  $ART/ARE$ .

## **2.7. Morfometria Intertubular**

### **2.7.1. Proporção volumétrica (%) dos componentes do intertúbulo**

A proporção volumétrica dos elementos do intertúbulo foi estabelecida pela contagem de 1000 pontos por animal, em imagens do intertúbulo obtidas dos preparados histológicos. Foram contabilizados os pontos incidentes sobre os elementos do tecido conjuntivo, macrófagos, vasos linfáticos, vasos sanguíneos, núcleo e citoplasma de Leydig. Para o cálculo utilizou-se a seguinte fórmula:  $\text{Proporção volumétrica (\%)} = (\% \text{ proporção volumétrica de intertúbulo} \times \% \text{ proporção volumétrica do componente no intertúbulo})/100$ . O volume (mL) dos componentes do intertúbulo nos testículos foi calculado pela equação:  $\text{Volume} = \% \text{ do elemento nos testículos} \times \text{PPT}/100$ , onde: PPT = peso do parênquima testicular.

### **2.7.2. Diâmetro nuclear, volumes nuclear e citoplasmático e número de células de Leydig**

Para o cálculo do diâmetro nuclear médio das células de Leydig, em  $\mu\text{m}$ , foram medidos 30 núcleos esféricos para cada animal, com cromatina perinuclear e nucléolos bastante evidentes. A partir das fórmulas abaixo, foram calculados então os volumes nuclear (VNL) e citoplasmático (VCL) e, conseqüentemente, o volume de cada célula de Leydig (VL):  $VNL = 4/3\pi R^3$ , onde R = raio nuclear;  $VCL = \%CL \times VNL/\%NL$ , onde %CL= proporção volumétrica de citoplasma de Leydig e %NL = proporção volumétrica de núcleo de Leydig;  $VL = VNL + VCL$ .

O volume ocupado pelas células de Leydig por testículo (VLT) foi calculado pela seguinte equação:  $VLT (\mu\text{L}) = \text{Proporção volumétrica da célula de Leydig no parênquima testicular} \times \text{Peso do parênquima testicular}/100$ . O volume das células de Leydig por grama de testículo (VL/gT) foi obtido pela equação:  $(VL/gT) = VLT/\text{peso bruto dos testículos}$ . De posse do volume individual da célula de Leydig e do volume total ocupado por estas células no testículo, foram calculados o número de células de Leydig por testículo (NL/t) e por grama de testículo (NL/gT) por meio da seguinte equação:  $NL/t = VLT/VL$ ;  $NL/gT = NL/PT$ , onde PT = peso de um testículo.

### **2.7.3. Índice Leydigossomático**

Este índice determina o percentual de massa corporal alocado em células de Leydig, e foi obtido a partir da fórmula:  $ILS = (VCL/PC) \times 100$ , onde VCLT = volume de células de Leydig nos dois testículos e PC = peso corporal.

## **2.8. Histopatologia**

Para estimar as proporções de túbulos seminíferos normais e patológicos, a análise histopatológica se deu pela contagem, ao acaso, de 200 secções das preparações histológicas. A classificação das patologias se deu pelo score de JOHNSEN (1970) modificado por DIAS et al. (2019), dividido em oito níveis: Nível 1 – túbulos íntegros, com células germinativas dispostas no seu sítio de localização normal e poucos vacúolos; Nível 2 – túbulos com vacúolos na base do epitélio; Nível 3- túbulos com vacúolos no ápice do epitélio; Nível 4 – túbulos com vacúolos na base e no ápice do epitélio; Nível 5 – células espermatogênicas no interior do lúmen e presença de células em processo de degeneração; Nível 6 – túbulos apenas com células basais; Nível 7 – túbulos apenas com células de Sertoli; Nível 8 – túbulos seminíferos desprovidos de

células de Sertoli ou germinativas, caracterizando um estado irreversível de degeneração. Estes níveis foram agrupados em normal (nível 1), leve (níveis 2 e 3), moderado (níveis 4 e 5) e severo (níveis 6, 7 e 8).

## **2.9. Estresse oxidativo testicular**

Para as análises do estresse oxidativo, foram utilizados os testículos direitos mantidos no ultrafreezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Os testículos foram pesados e homogeneizados em 1000  $\mu\text{L}$  de solução tampão fosfato de potássio (pH 7.4) e centrifugados a 12000 rpm,  $4^{\circ}\text{C}$ , por 10 minutos. O sobrenadante foi utilizado para dosagem de óxido nítrico (ON), das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST), de malondialdeído (MDA) e proteína total. Os dados bioquímicos foram normalizados em relação aos níveis de proteína total no sobrenadante. Todas as concentrações enzimáticas foram determinadas em duplicata usando um espectrofotômetro (UV-Mini 1240, Shimadzu) ou um leitor ELISA (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA).

### **2.9.1. Determinação de catalase**

A concentração da catalase (CAT) foi avaliada de acordo com o método descrito por AEBI (1984), medindo a taxa de decomposição de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) em espectrofotômetro a 240nm durante 60 segundos. Os resultados foram expressos em U/mg.

### **2.9.2. Determinação da superóxido dismutase**

A concentração da superóxido dismutase (SOD) foi determinada em leitor de ELISA a 570nm, baseado na capacidade desta enzima em catalisar a reação do superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) em peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e, assim, diminuir a razão de auto-oxidação do pirogalol (SARBAN et al., 2005). Os resultados foram expressos U/mg.

### **2.9.3. Determinação do malondialdeído**

A concentração de malondialdeído (MDA) foi estimada conforme descrito por WALLIN et al. (1993), determinada por meio de curva padrão a partir de concentrações conhecidas de 1,1,3,3- tetramethoxypropane 99% (TMPO). Os resultados foram expressos em  $\mu\text{M}/\text{mg}$ .

#### **2.9.4. Determinação de nitrito**

A concentração do óxido nítrico (NO) foi determinada por meio do teor de nitrito/nitrato pela reação de Griess (RICART-JANÉ et al., 2002). Os resultados foram expressos em  $\mu\text{M}$ .

#### **2.9.5. Proteína Total**

A proteína total foi mensurada utilizando albumina do soro bovino como curva padrão (LOWRY et al., 1951), e utilizada para homogeneização dos dados do estresse oxidativo.

#### **2.10. Dosagem da testosterona sérica**

A concentração plasmática de testosterona foi obtida pelo método de quimioluminescência, utilizando-se kit Access<sup>®</sup> Testosterone (Beckman, USA). Os resultados foram expressos em ng/dL.

#### **2.11. Produção diária de espermatozoides, número de espermatozoides e tempo de trânsito epididimário**

As espermátides testiculares resistentes à homogeneização (estágio 19 da espermatogênese) e os espermatozoides da cabeça/corpo e da cauda epididimários foram contados como descrito por ROBB et al. (1978) e modificado por FERNANDES et al. (2007). O testículo foi descapsulado, pesado e homogeneizado em 5mL de NaCl a 0,9% (Triton X-100 0,05%) por 3 minutos. Em seguida diluído 5 vezes (1:5) na mesma solução e transferido para a câmara de Neubauer, onde foi contabilizado o número de espermátides resistentes a homogeneização. Para determinar a produção espermática diária, o número de espermátides por testículo foi dividido por 4,84, que é o número de dias em que as espermátides maduras estão presentes no epitélio seminífero de camundongos (ROBB et al., 1978; FERNANDES et al., 2007). Da mesma forma, a cabeça/corpo e cauda do epidídimo foram homogeneizados, sendo que 200mg de tecido da cabeça/corpo e 100mg de cauda foram homogeneizados em 1mL de solução NaCl a 0,9% (Triton X-100 a 0,05%) por 3 minutos. Em seguida, o homogenato da cabeça/corpo foi diluído 2 vezes (1:2), enquanto o da cauda não passou por uma segunda diluição. Para o cálculo do tempo de trânsito em cada região epididimária em dias, o número total de espermatozoides de cada segmento foi dividido pela produção espermática diária (ROBB et al., 1978; FERNANDES et al., 2007).

## 2.12. Análises estatísticas

Os resultados obtidos foram submetidos a um teste de normalidade Shapiro-Wilk e em seguida ao teste de análise de variância (ANOVA), e as médias entre os grupos experimentais foram comparadas pelo teste Student Newman-Keuls. Foi utilizado o software STATISTICA for WINDOWS 3.11, considerando o nível de significância  $p \leq 0,05$ . Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio-padrão.

## 3. RESULTADOS

### 3.1. Peso corporal e biometria testicular

O peso corporal e os dados biométricos testiculares estão apresentados na tabela 1. O peso corporal reduziu em ambos os grupos tratados. O peso testicular e o peso do parênquima reduziram no grupo de animais que receberam 20mg/kg/dia de metilfenidato. O IPS reduziu no grupo de animais que receberam 20mg/kg/dia de metilfenidato. Somente o peso da albugínea e IGS não alteraram com os tratamentos.

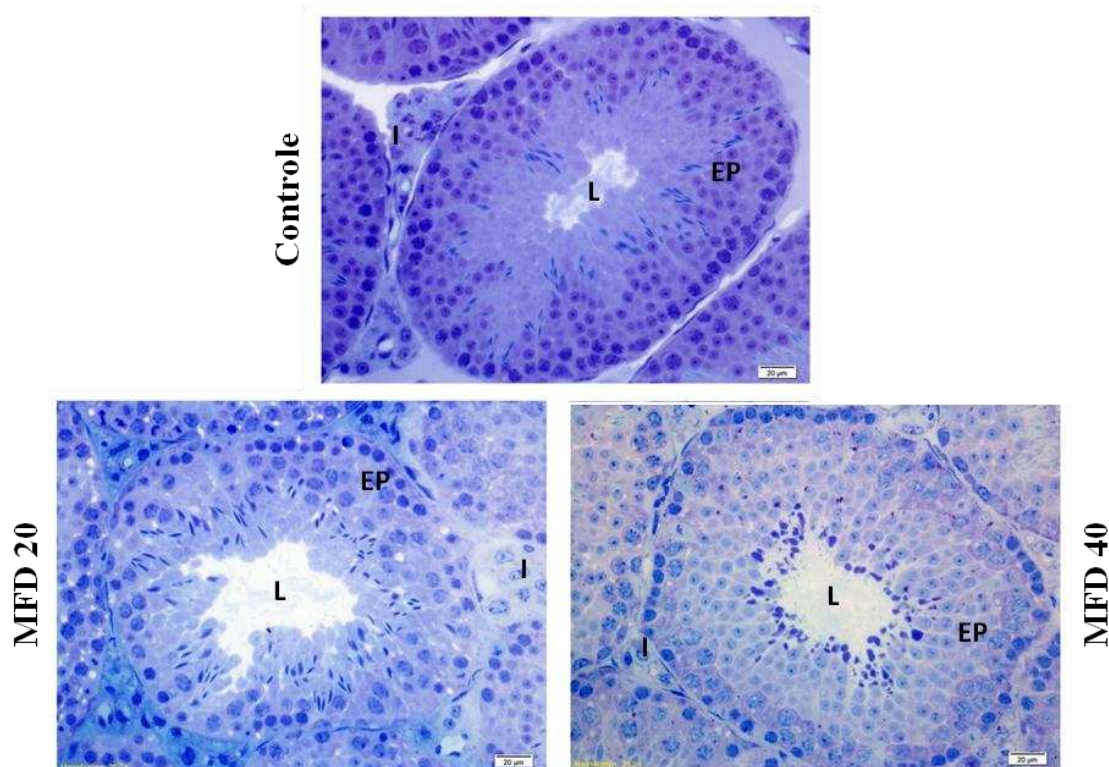
**Tabela 1.** Peso corporal e os dados biométricos testiculares de camundongos Balb/c tratados com duas doses de metilfenidato (MFD).

	<b>Controle</b>	<b>MFD 20</b>	<b>MFD 40</b>
<b>Peso Corporal (g)</b>	41,97 $\pm$ 3,58 <sup>a</sup>	37,48 $\pm$ 1,45 <sup>b</sup>	37,72 $\pm$ 2,41 <sup>b</sup>
<b>Peso Testicular (g)</b>	0,26 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	0,18 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>	0,22 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>
<b>Peso da Albugínea (g)</b>	0,01 $\pm$ 0,003 <sup>a</sup>	0,02 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,02 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>
<b>Peso do Parênquima (g)</b>	0,24 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	0,16 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>	0,20 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>
<b>IGS (%)</b>	0,62 $\pm$ 0,11 <sup>a</sup>	0,47 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup>	0,59 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup>
<b>IPS (%)</b>	0,59 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup>	0,42 $\pm$ 0,11 <sup>b</sup>	0,54 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>

IGS – Índice gonadossomático; IPS – Índice parenquimossomático. Controle (água destilada), MFD 20 (20mg/kg/dia), MFD 40 (40mg/kg/dia). Dados expressos como média  $\pm$  desvio-padrão. Letras diferentes, entre grupos, representam diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) (Student Newman Keuls).

### 3.2. Histomorfometria testicular

A estrutura tecidual pode ser observada na figura 3. A porcentagem e o volume dos componentes testiculares e índices tubulossomático e epiteliossomático estão apresentados na tabela 2. Os percentuais de túbulos seminíferos e epitélio aumentaram nos grupos tratados, porém os percentuais de túnica própria e lume diminuíram. O volume de túbulo diminuiu no grupo que recebeu 20mg/kg/dia do medicamento e os volumes de lume e túnica própria diminuíram em ambos os grupos tratados. Não houve alterações no volume de epitélio, no índice epiteliossomático e no índice tubulossomático.



**Figura 3.** Fotomicrografias de secções testiculares de camundongos dos grupos controle e tratados com Metilfenidato (MFD), nas doses de 20mg/kg/dia (MFD 20) e 40mg/kg/dia (MFD 40). L = Lume; EP = Epitélio seminífero; I = Intertúbulo. Barra: 20µm.

**Tabela 2.** Percentual (%) e volume (mL) dos componentes tubulares e índices tubulossomático e epiteliossomático de camundongos Balb/c tratados com duas doses de metilfenidato (MFD).

	<b>Controle</b>	<b>MFD 20</b>	<b>MFD 40</b>
<b>Túbulo (%)</b>	86,27 ± 2,23 <sup>a</sup>	92,25 ± 1,06 <sup>b</sup>	90,78 ± 1,86 <sup>b</sup>
<b>Epitélio (%)</b>	62,05 ± 0,66 <sup>a</sup>	80,66 ± 0,96 <sup>b</sup>	80,91 ± 1,20 <sup>b</sup>
<b>Túnica Própria (%)</b>	10,37 ± 1,42 <sup>a</sup>	2,34 ± 0,64 <sup>b</sup>	2,25 ± 0,12 <sup>b</sup>
<b>Lume (%)</b>	13,85 ± 1,47 <sup>a</sup>	9,25 ± 0,74 <sup>b</sup>	7,61 ± 2,27 <sup>b</sup>
<b>Volume Túbulo (mL)</b>	0,21 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,15 ± 0,04 <sup>b</sup>	0,19 ± 0,04 <sup>a</sup>
<b>Volume Epitélio (mL)</b>	0,15 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,13 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,17 ± 0,03 <sup>a</sup>
<b>Volume Túnica Própria (mL)</b>	0,03 ± 0,004 <sup>a</sup>	0,004 ± 0,002 <sup>b</sup>	0,005 ± 0,001 <sup>b</sup>
<b>Volume Lume (mL)</b>	0,03 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,01 ± 0,003 <sup>b</sup>	0,02 ± 0,004 <sup>b</sup>
<b>ITS (%)</b>	0,51 ± 0,09 <sup>a</sup>	0,39 ± 0,10 <sup>a</sup>	0,49 ± 0,08 <sup>a</sup>
<b>IES (%)</b>	0,36 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,34 ± 0,09 <sup>a</sup>	0,44 ± 0,08 <sup>a</sup>

ITS - Índice tubulossomático; IES - Índice epiteliossomático. Controle (água destilada), MFD 20 (20mg/kg/dia), MFD 40 (40mg/kg/dia). Dados expressos como média ± DP. Letras diferentes, entre grupos, representam diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) (Student Newman Keuls).

Os diâmetros de túbulo, lume e altura de epitélio, comprimento total de túbulo por testículo e por grama de testículo, as áreas tubular, epitelial e luminal e a relação túbulo/epitélio estão apresentados na tabela 3. A altura do epitélio aumentou no grupo que recebeu 40mg/kg/dia do medicamento e o comprimento total de túbulo por testículo diminuiu no grupo que recebeu 20mg/kg/dia.

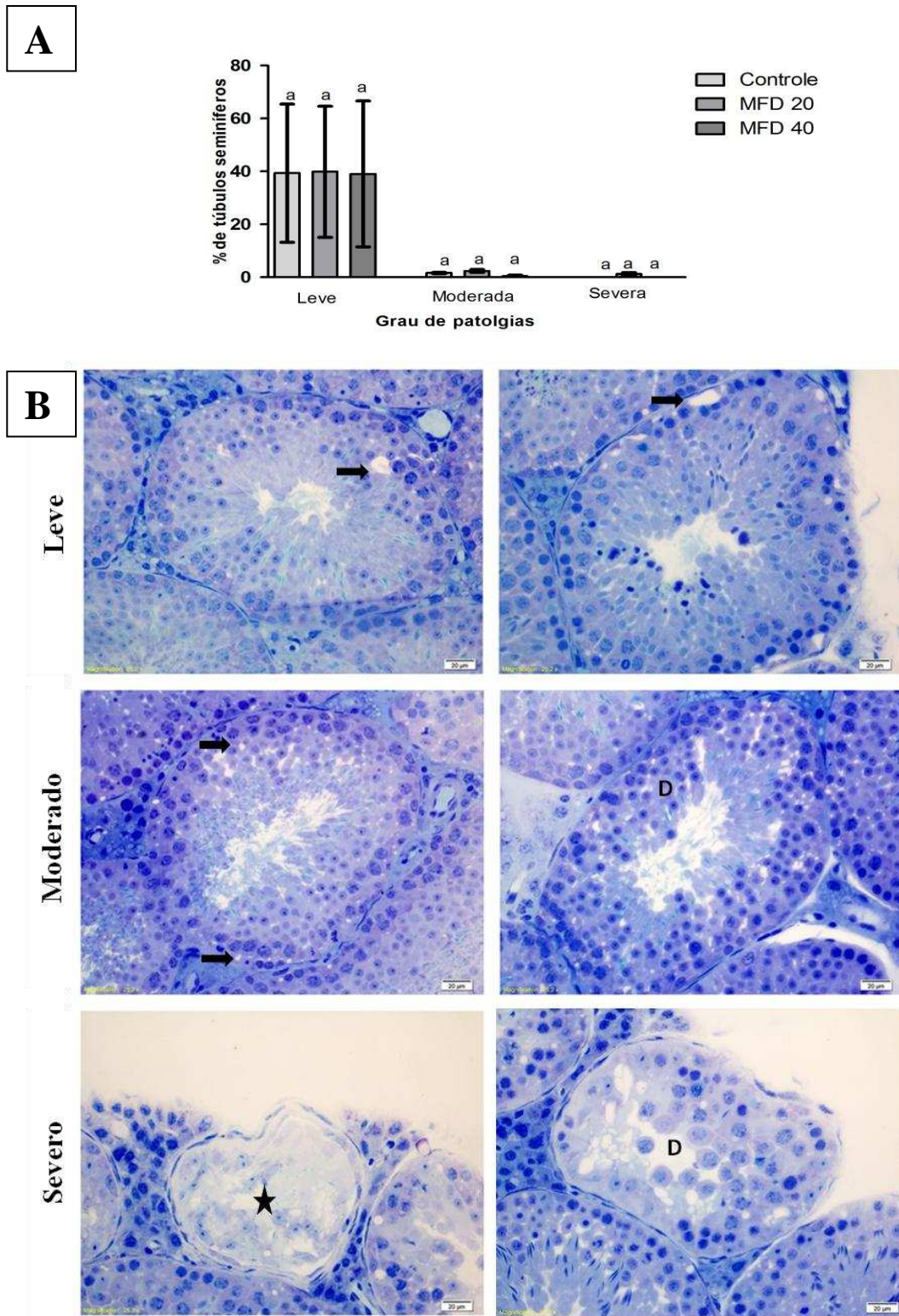
**Tabela 3.** Morfometria de túbulo seminífero de camundongos Balb/c tratados com duas doses de metilfenidato (MFD).

	<b>Controle</b>	<b>MFD 20</b>	<b>MFD 40</b>
<b>Diâmetro de Túbulo (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	199,29 $\pm$ 8,81 <sup>a</sup>	196,93 $\pm$ 12,18 <sup>a</sup>	200,9 $\pm$ 15,15 <sup>a</sup>
<b>Altura do Epitélio (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	75,37 $\pm$ 3,23 <sup>a</sup>	76,15 $\pm$ 3,03 <sup>a</sup>	81,13 $\pm$ 4,44 <sup>b</sup>
<b>Diâmetro de Lume (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	48,56 $\pm$ 8,45 <sup>a</sup>	44,63 $\pm$ 7,99 <sup>a</sup>	38,67 $\pm$ 11,79 <sup>a</sup>
<b>CTT/t (m)</b>	6,83 $\pm$ 1,26 <sup>a</sup>	4,86 $\pm$ 1,47 <sup>b</sup>	5,82 $\pm$ 0,61 <sup>a</sup>
<b>CTT/gt (m/g)</b>	26,44 $\pm$ 2,61 <sup>a</sup>	27,32 $\pm$ 3,94 <sup>a</sup>	26,80 $\pm$ 4,17 <sup>a</sup>
<b>Área do túbulo (<math>\mu\text{m}^2 \times 10^4</math>)</b>	3,12 $\pm$ 0,28 <sup>a</sup>	3,05 $\pm$ 0,38 <sup>a</sup>	3,18 $\pm$ 0,48 <sup>a</sup>
<b>Área do lúmen (<math>\mu\text{m}^2 \times 10^4</math>)</b>	0,19 $\pm$ 0,063 <sup>a</sup>	0,16 $\pm$ 0,068 <sup>a</sup>	0,13 $\pm$ 0,078 <sup>a</sup>
<b>Área do epitélio (<math>\mu\text{m}^2 \times 10^4</math>)</b>	2,93 $\pm$ 0,23 <sup>a</sup>	2,87 $\pm$ 0,35 <sup>a</sup>	3,02 $\pm$ 0,46 <sup>a</sup>
<b>Relação Túbulo/Epitélio</b>	1,06 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	1,05 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	1,04 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>

CTT/t- Comprimento total de túbulo seminífero por testículo; CTT/gt- Comprimento total de túbulo seminífero por grama de testículo. Controle (água destilada), MFD 20 (20mg/kg/dia), MFD 40 (40mg/kg/dia). Dados expressos como média  $\pm$  desvio-padrão. Letras diferentes, entre grupos, representam diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) (Student Newman Keuls).

### 3.3. Histopatologia

A figura 4 representa os dados da análise de túbulos patológicos. Não houve diferenças quanto ao percentual de patologias leves, moderadas e severas.



**Figura 4.** A - Proporção de túbulos seminíferos patológicos em camundongos dos grupos controle e tratados com metilfenidato (MFD), nas doses de 20mg/kg/dia (MFD 20) e 40mg/kg/dia (MFD 40). Dados expressos como média  $\pm$  desvio-padrão. Letras diferentes, entre grupos, representam diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) (Student Newman Keuls). B- Secções histológicas de testículo de animais tratados com Metilfenidato, evidenciando as patologias encontradas. D = Degeneração; ★ = Túbulos apenas com células de Sertoli; Seta = Vacúolos. Barra = 20  $\mu$ m.

### 3.4. Histomorfometria Intertubular

A porcentagem e volume dos componentes intertubulares estão apresentados na tabela 4. Os percentuais de intertúbulo, espaço linfático, tecido conjuntivo e macrófagos reduziram nos grupos tratados. O percentual de núcleo de Leydig reduziu no grupo de animais que receberam 20mg/kg/dia de metilfenidato enquanto o percentual do citoplasma de Leydig aumentou em ambos os grupos tratados. Não houve alterações nos percentuais de vaso sanguíneo e células de Leydig.

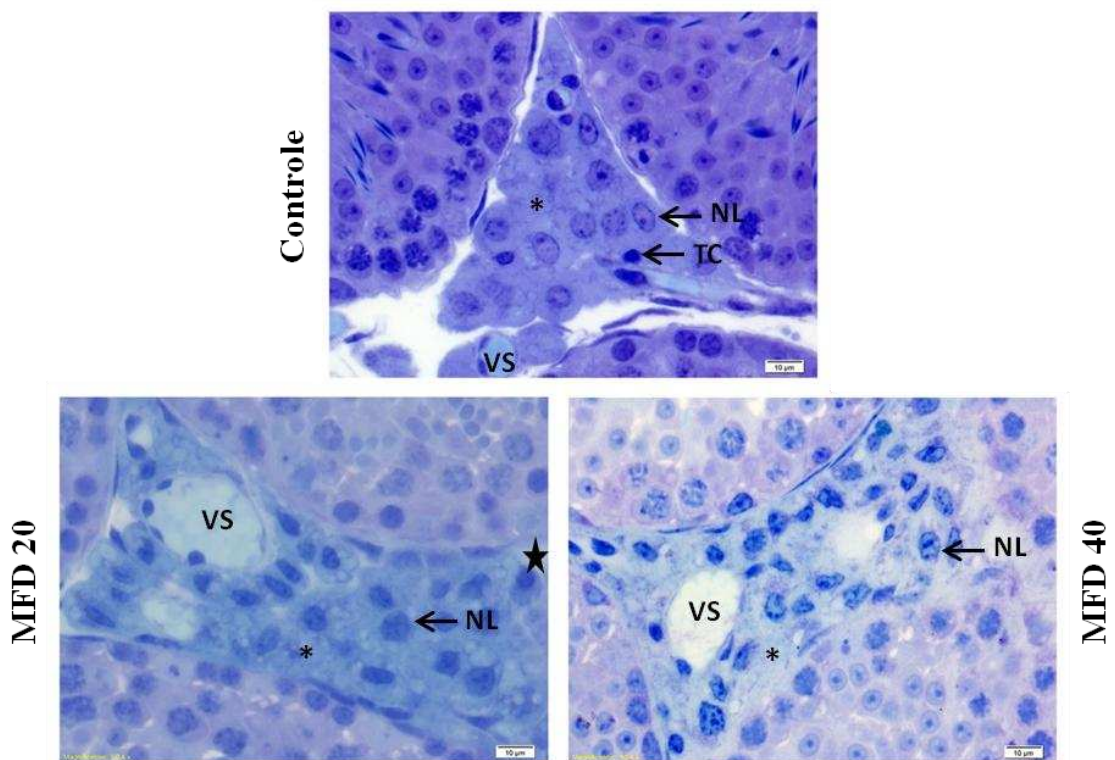
Os volumes de intertúbulo, espaço linfático, núcleo de Leydig, tecido conjuntivo e macrófago diminuíram em ambos os grupos tratados. Os volumes de vaso sanguíneo e célula de Leydig reduziram somente no grupo de animais que receberam 20mg/kg/dia de metilfenidato. Não houve alterações no volume de citoplasma de Leydig.

**Tabela 4.** Percentual e volume dos componentes do intertúbulo de camundongos Balb/c tratados com duas doses de metilfenidato (MFD).

	<b>Controle</b>	<b>MFD 20</b>	<b>MFD 40</b>
<b>Intertúbulo (%)</b>	13,73 ± 2,73 <sup>a</sup>	7,75 ± 1,06 <sup>b</sup>	9,22 ± 1,86 <sup>b</sup>
<b>Vaso sanguíneo (%)</b>	0,81 ± 0,28 <sup>a</sup>	0,14 ± 0,12 <sup>a</sup>	0,59 ± 0,85 <sup>a</sup>
<b>Espaço Linfático (%)</b>	5,54 ± 1,66 <sup>a</sup>	0,40 ± 0,44 <sup>b</sup>	0,33 ± 0,40 <sup>b</sup>
<b>Núcleo de Leydig (%)</b>	2,01 ± 0,39 <sup>a</sup>	1,27 ± 0,34 <sup>b</sup>	1,64 ± 0,47 <sup>a</sup>
<b>Citoplasma de Leydig (%)</b>	4,52 ± 0,57 <sup>a</sup>	5,65 ± 1,07 <sup>b</sup>	6,41 ± 1,30 <sup>b</sup>
<b>Leydig (%)</b>	6,54 ± 0,68 <sup>a</sup>	6,91 ± 1,32 <sup>a</sup>	8,05 ± 1,74 <sup>a</sup>
<b>Tecido Conjuntivo (%)</b>	0,45 ± 0,13 <sup>a</sup>	0,31 ± 0,13 <sup>b</sup>	0,26 ± 0,11 <sup>b</sup>
<b>Macrófago (%)</b>	0,55 ± 0,38 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>b</sup>	0,01 ± 0,01 <sup>b</sup>
<b>Intertúbulo (mL) (x10<sup>-4</sup>)</b>	336 ± 78 <sup>a</sup>	120 ± 26 <sup>b</sup>	189 ± 52 <sup>b</sup>
<b>Vaso sanguíneo (mL) (x10<sup>-4</sup>)</b>	20 ± 8,15 <sup>a</sup>	2,42 ± 2,24 <sup>b</sup>	11,40 ± 15,23 <sup>a</sup>
<b>Espaço Linfático (mL) (x10<sup>-4</sup>)</b>	136,17 ± 49,83 <sup>a</sup>	6,5 ± 7,4 <sup>b</sup>	5,7 ± 6,8 <sup>b</sup>
<b>Núcleo de Leydig (mL) (x10<sup>-4</sup>)</b>	49,01 ± 10,55 <sup>a</sup>	19,5 ± 5,1 <sup>b</sup>	33,7 ± 11,6 <sup>b</sup>
<b>Citoplasma de Leydig (mL) (x10<sup>-4</sup>)</b>	110,84 ± 21,95 <sup>a</sup>	87,3 ± 19,4 <sup>a</sup>	133, 2 ± 45 <sup>a</sup>
<b>Leydig (mL) (x10<sup>-4</sup>)</b>	159,85 ± 27,35 <sup>a</sup>	106,7 ± 23,5 <sup>b</sup>	166,9 ± 56 <sup>a</sup>
<b>Tecido Conjuntivo (mL) (x10<sup>-4</sup>)</b>	11,03 ± 3,31 <sup>a</sup>	4,9 ± 2,6 <sup>b</sup>	5,3 ± 2,1 <sup>b</sup>
<b>Macrófago (mL) (x10<sup>-4</sup>)</b>	13,55 ± 10,16 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>b</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>b</sup>

Controle (água destilada), MFD 20 (20mg/kg/dia), MFD 40 (40mg/kg/dia). Dados expressos como média ± desvio-padrão. Letras diferentes, entre grupos, representam diferença significativa (p≤0,05) (Student Newman Keuls).

A estrutura intertubular pode ser observada na figura 5. Os parâmetros morfométricos e estereológicos das células de Leydig estão apresentados na tabela 5. Não houve alterações no diâmetro e no volume nuclear de Leydig. Os volumes do citoplasma de Leydig e de célula de Leydig aumentaram em ambos os grupos tratados. O volume de célula de Leydig por testículo diminuiu no grupo de animais que receberam 20mg/kg/dia de metilfenidato, porém o volume de célula de Leydig por grama de testículo não alterou nos grupos experimentais. O número de células de Leydig por testículo diminuiu em ambos os grupos experimentais enquanto o número de célula de Leydig por grama de testículo diminuiu somente no grupo que recebeu 20mg/kg/dia de metilfenidato. Não houve alterações no índice Leydigossomático.



**Figura 5.** Fotomicrografia de seções testiculares evidenciando a estrutura intertubular de camundongos dos grupos controle e tratados com Metilfenidato (MFD), nas doses de 20mg/kg/dia (MFD 20) e 40mg/kg/dia (MFD 40). NL = Núcleo de Célula de Leydig; \* = Citoplasma de Célula de Leydig; ★ = Espaço linfático; VS = Vaso sanguíneo; TC = Tecido conjuntivo. Barra: 10µ m.

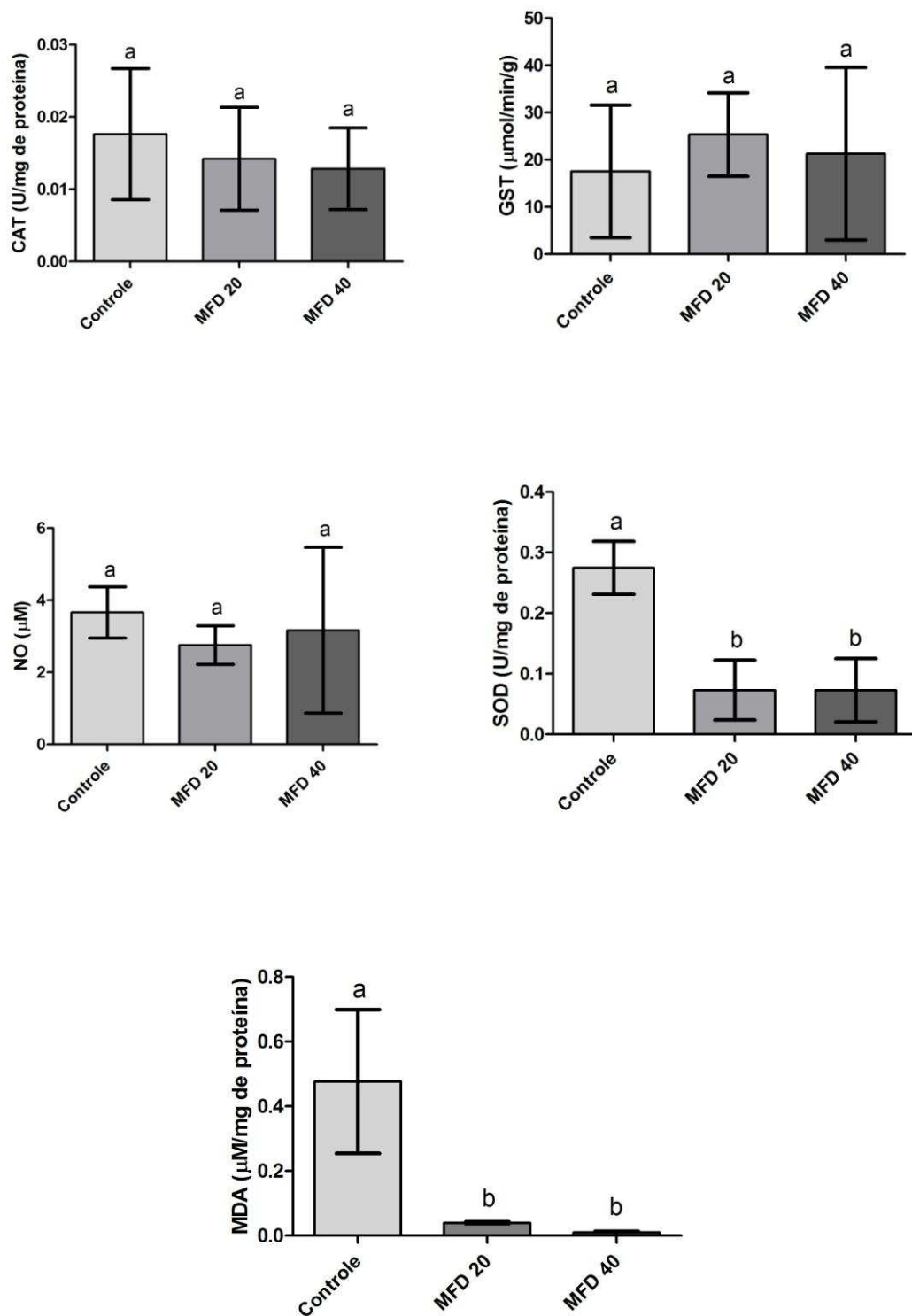
**Tabela 5.** Parâmetros morfométricos e estereológicos das células de Leydig de camundongos Balb/c tratados com duas doses de metilfenidato (MFD).

	<b>Controle</b>	<b>MFD 20</b>	<b>MFD 40</b>
<b>Diâmetro Nuclear (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	6,65 $\pm$ 0,23 <sup>a</sup>	7,17 $\pm$ 1,17 <sup>a</sup>	7,17 $\pm$ 0,75 <sup>a</sup>
<b>Volume do Núcleo (<math>\mu\text{m}^3</math>)</b>	154,02 $\pm$ 15,58 <sup>a</sup>	204,71 $\pm$ 80,83 <sup>a</sup>	197,91 $\pm$ 60,05 <sup>a</sup>
<b>Volume do citoplasma (<math>\mu\text{m}^3</math>)</b>	356,30 $\pm$ 79,74 <sup>a</sup>	898,36 $\pm$ 334,54 <sup>b</sup>	788,21 $\pm$ 256,01 <sup>b</sup>
<b>Volume da célula (<math>\mu\text{m}^3</math>)</b>	510,33 $\pm$ 90,52 <sup>a</sup>	1103,07 $\pm$ 410,97 <sup>b</sup>	986,12 $\pm$ 313,48 <sup>b</sup>
<b>Volume de Leydig/ t (<math>\times 10^9</math>) (<math>\mu\text{m}^3</math>)</b>	15,98 $\pm$ 2,73 <sup>a</sup>	10,7 $\pm$ 2,4 <sup>b</sup>	16,7 $\pm$ 5,6 <sup>a</sup>
<b>Volume de Leydig/ gt (<math>\times 10^9</math>) (<math>\mu\text{m}^3</math>)</b>	62,10 $\pm$ 6,4 <sup>a</sup>	61,3 $\pm$ 9,5 <sup>a</sup>	74,2 $\pm$ 16,4 <sup>a</sup>
<b>Número Leydig / t (<math>\times 10^6</math>)</b>	32,57 $\pm$ 9,89 <sup>a</sup>	11,8 $\pm$ 7,12 <sup>b</sup>	17,3 $\pm$ 4,4 <sup>b</sup>
<b>Número Leydig / gt (<math>\times 10^7</math>)</b>	12,66 $\pm$ 3,55 <sup>a</sup>	6,8 $\pm$ 4,24 <sup>b</sup>	8,05 $\pm$ 2,7 <sup>a</sup>
<b>ILS (%)</b>	0,038 $\pm$ 0,007 <sup>a</sup>	0,028 $\pm$ 0,006 <sup>a</sup>	0,044 $\pm$ 0,014 <sup>a</sup>

t – testículo; gt – grama por testículo; ILS – Índice Leydigossomático. Controle (água destilada), MFD 20 (20mg/kg/dia), MFD 40 (40mg/kg/dia). Dados expressos como média  $\pm$  desvio-padrão. Letras diferentes, entre grupos, representam diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) (Student Newman Keuls).

### 3.5. Estresse Oxidativo Testicular

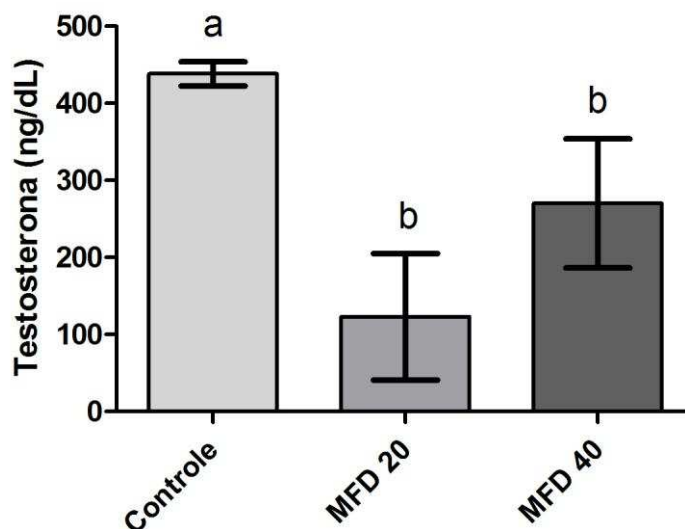
A figura 6 representa os gráficos da concentração das enzimas antioxidantes CAT, SOD e GTS e as dosagens de MDA e NO. Não houve alterações nas dosagens CAT, GTS e NO, no entanto, SOD e MDA reduziram em ambos os grupos tratados.



**Figura 6.** Atividade das enzimas antioxidantes e dosagens de malondialdeído e óxido nítrico testiculares em camundongos dos grupos controle e tratados com Metilfenidato (MFD), nas doses de 20mg/kg/dia (MFD 20) e 40mg/kg/dia (MFD 40). CAT – Catalase; MDA – Malondialdeído; GST – Glutathione S-transferase; NO – Óxido Nítrico; SOD – Superóxido Dismutase. Dados expressos como média  $\pm$  desvio-padrão. Letras diferentes, entre grupos, representam diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) (Student Newman Keuls).

### 3.6. Testosterona Sérica

A figura 7 representa os níveis de testosterona sérica nos animais tratados. Houve redução em ambos os grupos que receberam metilfenidato.



**Figura 7.** Concentração de testosterona sérica em camundongos dos grupos controle e tratados com Metilfenidato (MFD), nas doses de 20mg/kg/dia (MFD 20) e 40mg/kg/dia (MFD 40). Dados expressos como média  $\pm$  desvio-padrão. Letras diferentes, entre grupos, representam diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) (Student Newman Keuls).

### 3.7. Produção diária de espermatozoides, número de espermatozoides e tempo de trânsito epididimário

Os resultados da produção diária de espermatozoides, número de espermatozoides e tempo de trânsito epididimário estão representados na tabela 6. O número de espermátides por testículo e por grama de testículo, bem como a produção espermática diária por testículo e por grama de testículo diminuiu em ambos os grupos tratados com metilfenidato. O número de espermatozoides por testículo na cabeça/corpo e cauda do epidídimo aumentou no grupo que recebeu 40mg/kg/dia de metilfenidato. Já o número de espermatozoides por grama de testículo na cabeça/corpo diminuiu em ambos os grupos, no entanto, na cauda do epidídimo diminuiu somente no grupo que recebeu 20mg/kg/dia do medicamento. O tempo de trânsito epididimário na cabeça/corpo e na cauda do epidídimo aumentou nos dois grupos.

**Tabela 6.** Produção diária de espermatozoides, número de espermatozoides e tempo de trânsito epididimário de camundongos Balb/c tratados com duas doses de metilfenidato (MFD).

	<b>Controle</b>	<b>MFD 20</b>	<b>MFD 40</b>
<b>Número de espermátide/t</b>	8,22 ± 0,60 <sup>a</sup>	6,96 ± 0,08 <sup>b</sup>	7,2 ± 0,49 <sup>b</sup>
<b>Número de espermátide/gt</b>	169,99 ± 7,98 <sup>a</sup>	54,4 ± 12,00 <sup>b</sup>	60,88 ± 5,25 <sup>b</sup>
<b>Produção espermática diária/t</b>	1,69 ± 0,12 <sup>a</sup>	1,43 ± 0,01 <sup>b</sup>	1,48 ± 0,10 <sup>b</sup>
<b>Produção espermática diária/gt</b>	28,08 ± 0,27 <sup>a</sup>	10,69 ± 1,96 <sup>b</sup>	11,63 ± 1,01 <sup>b</sup>
<b>Número de espermatozoide CC/t</b>	2,89 ± 0,42 <sup>a</sup>	4,68 ± 0,76 <sup>a</sup>	4,93 ± 0,16 <sup>b</sup>
<b>Número de espermatozoide CC/gt</b>	168,64 ± 1,62 <sup>a</sup>	138,75 ± 3,53 <sup>b</sup>	139,58 ± 6,48 <sup>b</sup>
<b>Tempo de trânsito CC</b>	1,73 ± 0,16 <sup>a</sup>	3,26 ± 0,56 <sup>b</sup>	3,32 ± 0,10 <sup>b</sup>
<b>Nº de espermatozoide cauda/t</b>	2,89 ± 0,25 <sup>a</sup>	2,59 ± 0,13 <sup>a</sup>	3,47 ± 0,30 <sup>b</sup>
<b>Nº de espermatozoide cauda/gt</b>	180,41 ± 7,66 <sup>a</sup>	136,66 ± 7,66 <sup>b</sup>	175,62 ± 0,88 <sup>a</sup>
<b>Tempo de trânsito na cauda</b>	1,72 ± 0,26 <sup>a</sup>	1,8 ± 0,07 <sup>b</sup>	2,32 ± 0,04 <sup>b</sup>

t – testículo; gt – grama por testículo; CC – cabeça/corpo do epidídimo. Controle (água destilada), MFD 20 (20mg/kg/dia), MFD 40 (40mg/kg/dia). Dados expressos como média ± desvio-padrão. Letras diferentes, entre grupos, representam diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) (Student Newman Keuls).

#### 4. DISCUSSÃO

Este estudo descreve os efeitos da administração de metilfenidato em doses de 20 e 40mg/kg/dia sobre parâmetros espermáticos e reprodutivos de camundongos Balb/c. Observaram-se alterações em parâmetros biométricos, tubulares, intertubulares e espermáticos. Verificou-se a redução do número de espermátides nos testículos e prejuízo à produção espermática diária, resultando na diminuição da produção de espermatozoides, além de aumento do tempo de trânsito em ambos os grupos tratados.

A análise do peso corporal fornece informações importantes sobre a toxicidade geral de um composto e possíveis implicações para a saúde (FERNANDEZ et al., 2008). Neste trabalho, a administração diária de ambas as doses diminuiu o peso corpóreo dos animais. Em concordância com nossos resultados, a administração diária de metilfenidato via gavagem nas doses de 2mg/kg/dia e 10mg/kg/dia causou diminuição significativa no peso corporal de camundongos (FAZELIPOUR et al., 2012). Em ratos, a administração diária via gavagem de metilfenidato reduziu o ganho de peso de forma dose-dependente, observado em animais juvenis em doses acima de 50mg/kg/dia (BECKMAN et al., 2008), bem como em adultos em doses acima de 20mg/kg/dia (TEO et al., 2002).

Estudos demonstram que um dos efeitos colaterais mais comumente

associado ao tratamento com metilfenidato é a falta de apetite que ocasiona a perda de peso, mas tal sintoma tende a desaparecer com o tempo (POULTON et al., 2003; PTACEK et al., 2009).

Em nossos achados, o peso dos testículos reduziu com o tratamento de 20mg/kg/dia de metilfenidato. Há indícios de que o metilfenidato possa promover mudanças no perfil de hormônios sexuais, em machos, por ação direta sobre a função das células de Leydig (ADRIANI et al., 2006). Dados na literatura demonstram que o tratamento via gavagem na dose de 10mg/kg/dia, causou diminuição no peso testicular de ratos (CANSU et al., 2011). Outro estudo em ratos, demonstrou que a administração via gavagem de 15mg/kg/dia de cloridrato de cocaína, estruturalmente semelhante ao metilfenidato, por 100 dias, resultou em redução do peso testicular (GEORGE et al., 1996). Essa diminuição do peso testicular pode ser interpretada como um indicador de depleção de células germinativas e consequente redução na produção espermática (LANNING et al., 2002). Não houve alteração do IGS e ITS em ambos os grupos experimentais, ressaltando-se que, esses índices, quando avaliados conjuntamente quantificam o investimento do corpo na produção espermática.

O diâmetro do túbulo seminífero e diâmetro do lume não sofreram alterações com o tratamento. A altura do epitélio aumentou no grupo que recebeu 40mg/kg/dia do medicamento. De acordo com FRANÇA E RUSSELL (1998), o diâmetro tubular não sofre alteração significativa após o estabelecimento da maturidade sexual. Já a altura do epitélio seminífero, na maioria das espécies domésticas, apresenta pequenas variações devido a associações celulares ou variações nas células de Sertoli. Assim como os diâmetros, as áreas de túbulo seminífero, epitélio ou lume não alteraram com o tratamento. A relação túbulo/epitélio que permite avaliar a área de epitélio em relação a área tubular também não apresentou diferença. Estes achados são semelhantes aos encontrados em grupos de ratos tratados com 2,5mg/kg/dia e 5mg/kg/dia de metilfenidato via gavagem (MONTAGNINI, 2014), os quais não alteraram diâmetro tubular. Porém, ratos tratados com 15mg/kg/dia de cloridrato de cocaína via gavagem, apresentaram o diâmetro médio dos túbulos seminíferos reduzido (GEORGE et al., 1996). Em estudo semelhante, houve diminuição significativa na espessura do epitélio germinativo no grupo de camundongos que recebeu metilfenidato cronicamente por gavagem na dose de 2mg/kg/dia, e no grupo que recebeu uma dose de 10mg/kg/dia (FAZELIPOUR et al., 2014).

Em relação ao percentual e volume dos componentes tubulares, embora

houvesse aumento no percentual de epitélio e túbulo, houve redução do volume de túbulo, em razão da redução do peso parenquimal. A redução nos percentuais de lume e túnica própria refletiu na redução do volume desses componentes em ambos os grupos expostos ao metilfenidato. A redução no percentual de túnica própria pode refletir danos ao processo espermatogênico, porém, ainda não se tem conhecimento claro sobre essa relação (BHIDE et al., 2005; ORGEL et al., 2009; ADAM et al., 2011).

Neste estudo não foram observadas alterações patológicas significativas, mantendo inalterada a microestrutura tecidual. Estes achados são semelhantes aos encontrados em camundongos tratados com 2 e 10mg/kg/dia de metilfenidato por gavagem, nos quais não foram observadas alterações histopatológicas significativas para vacuolização de células de Sertoli, descamação de células germinativas maduras ou alterações de células de Leydig (FAZELIPOUR et al., 2014).

Neste estudo houve reduções nos percentuais de espaço linfático, tecido conjuntivo e macrófagos com conseqüente redução no percentual de intertúbulo. O componente testicular mais sensível a exposição por agentes externos é o intertúbulo (BLANCO et al., 2007). Os macrófagos são a maior população de leucócitos nos testículos e, de acordo com BHUSHAN E MEINHARDT (2017), a redução no percentual e volume de macrófagos pode alterar a homeostase normal dos testículos. O volume de intertúbulo reduziu nos grupos tratados assim como os volumes (mL) de núcleo de Leydig, de célula de Leydig e de macrófagos. Tais reduções refletiram em diminuição do número de células de Leydig nos grupos tratados. Segundo RUSSELL (1996), o valor estimado de ILS para camundongos é de 0,03%. Como os valores observados neste trabalho foram de 0,03 e 0,044 para os grupos que receberam 20 e 40mg/kg/dia de metilfenidato, respectivamente, entende-se que estão dentro do padrão normal para a espécie.

O tratamento com metilfenidato durante a fase adulta interferiu nas concentrações plasmáticas do hormônio testosterona nos grupos tratados. A testosterona tem importante função no sistema reprodutor masculino promovendo o crescimento, desenvolvimento e a atividade secretora dos órgãos sexuais (TREMBLAY, 2015; HAFEZ, 1970). De acordo com CASTRO et al. (2002), o volume nuclear de células de Leydig está altamente relacionado com os níveis de testosterona plasmática. Essa diminuição no volume nuclear poderia causar redução nos níveis de testosterona, o que foi observado neste trabalho. Resultados encontrados para ratos tratados por duas semanas com 10mg/kg/dia do medicamento via gavagem indicam que os níveis de

testosterona sérica aumentaram. Porém, no mesmo estudo conduzido por 11 semanas em ratos adultos, houve redução da concentração plasmática de testosterona pela administração de metilfenidato (10mg/kg/dia, por gavagem) (KIANIFARD et al., 2013).

Os níveis de NO não alteraram nos grupos tratados com metilfenidato, o que ajuda a manter a função reprodutiva masculina. A disponibilidade dos níveis normais de NO é um mediador vital no sistema reprodutivo masculino (CHAMNESS et al., 1995). Além disso, NO pode eliminar radicais livres, interrompendo a produção de ânions superóxidos que causam peroxidação lipídica, um processo que compromete a função dos espermatozoides. Em estudo utilizando cafeína e ácido cafeico, os níveis de NO aumentaram significativamente no epidídimo de ratos Wistar que receberam doses combinadas de 50mg/kg cafeína + 50mg/kg de ácido cafeico por gavagem, sugerindo-se que a disponibilidade de NO está relacionada com a consequente melhora na função reprodutiva masculina (AKOMOLAFE et al., 2017).

Além disso, observamos neste estudo, a redução da SOD e manutenção das atividades de CAT e GST em ambos os grupos tratados. Esse resultado sugere que a SOD agiu como primeira linha de defesa da célula contra efeitos deletérios causados pelos radicais livres, podendo ter chegado a sua exaustão, ocasionando na sua redução. A enzima antioxidante SOD tem o papel de catalisar a reação de conversão do radical superóxido ( $O_2^-$ ) em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). No entanto, embora chegando à exaustão, ela mostrou-se eficiente, pois observamos redução dos níveis de MDA em ambos os grupos tratados. Em pesquisa realizada com camundongos machos C57BL/6, a injeção intraperitoneal de 10mg/kg de cocaína e doses combinadas de 10mg/kg de cocaína + 5mg/kg de cafeína aumentaram a produção de MDA nos dois grupos em comparação ao veículo, indicativo de aumento nos níveis de EROS (GONZÁLEZ et al., 2015).

Nossos resultados mostraram ainda que o tratamento com metilfenidato causou redução na produção espermática diária e no número de espermátides nos grupos tratados. Esses parâmetros testiculares são importantes indicadores da fertilidade masculina, pois o número de espermátides maduras está diretamente relacionado à produção diária de espermatozoides (FRANÇA E RUSSELL, 1998; FERNANDEZ et al., 2008). WORKING et al. (1985) citam que essa redução indica que houve depleção ou degeneração de células da linhagem germinativa em estádios anteriores à fase de espermátide. Os resultados encontrados estão de acordo com a literatura, em que estudo conduzido por 11 semanas em ratos adultos revelou que o tratamento com metilfenidato

reduziu o número de espermatozoides em comparação aos controles e aos grupos tratados por duas semanas (KIANIFARD et al., 2013).

A redução do número de espermatozoides na cabeça/corpo em ambos os grupos e na cauda do epidídimo no grupo que recebeu 20mg/kg/dia do medicamento pode ter ocorrido em consequência da diminuição da produção espermática diária e do número de espermátides no testículo. Nossos dados corroboram com estudos anteriores em que houve diminuição significativa na contagem de espermátides em grupos de animais que receberam 5mg/kg de MDMA (BARENYS et al., 2009).

O aumento do tempo de trânsito observado em ambos grupos tratados pode causar alterações morfológicas em espermatozoides e embora alguns autores apontem que a redução do tempo de trânsito seja a causa de defeitos aos espermatozoides (KLINEFELTER, 2002), seu aumento também pode causar danos devido à permanência dos espermatozoides no epidídimo por período prolongado, tornando-os susceptíveis a alterações (CUMMINS et al., 1994).

Assim, inferimos que o tratamento com metilfenidato causou alterações biométricas, nos compartimentos tubulares e intertubulares e na produção espermática.

Houve redução do peso corporal e no peso dos testículos. Além disso, causou redução no número de espermátides e de espermatozoides que pode ser reflexo da redução nos níveis de testosterona plasmática observados em ambos os grupos tratados. Essa redução pode ser consequência de uma diminuição no volume nuclear de Leydig.

## **5. CONCLUSÕES**

O tratamento com metilfenidato causou redução do peso corporal, além de apresentar efeitos sobre o túbulo seminífero e células de Leydig. Houve redução da testosterona sérica comprometendo o processo espermatogênico, causando redução do número de espermatozoides, da produção espermática e aumento do tempo de trânsito espermático. Todas as alterações podem prejudicar a fertilidade masculina.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAM, M.; SCHWARZER, J. U.; KÖHN, F. M.; STRAUSS, L.; POUTANEN, M.; MAYERHOFER, A. Mast cell tryptase stimulates production of decorin by human testicular peritubular cells: Possible role of decorin in male infertility by interfering with growth factor signaling. **Human Reproduction**: v. 26, p. 2613-2625, 2011.

ADEOYA-OSIGUWA, S. A.; GIBBONS, R.; FRASER, L. R. Identification of functional alpha2- and beta-adrenergic receptors in mammalian spermatozoa. **Human Reproduction**: v. 21, p. 1555–1563, 2006.

ADRIANI, W.; LEO, D.; GRECO, D.; REA, M.; DI PORZIO, U.; LAVIOLA, G.; PERRONE-CAPANO, C. Methylphenidate administration to adolescent rats determines plastic changes on reward-related behavior and striatal gene expression. **Neuropsychopharmacology**: v. 31, n.9, p. 1946-56, 2006.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**: n.105, p.121–126, 1984.

AKOMOLAFE, S. F.; AKINYEMI, A. J.; OBOH, G.; OYELEYE, S. I.; AJAYI, O. B.; OMONISI, A. E.; OWOLABI, F. L.; ATOYEBI, D. A.; IGE, F. O.; ATOKI, V. A. Co-administration of caffeine and caffeic acid alters some key enzymes linked with reproductive function in male rats. **Andrology**: v. 50, p. 12839, 2018.

ATTAL, J.; COUROT, M. Développement testiculaire et établissement de la spermatogénèse chez le taureau. **Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique**: n. 3, p. 219–241, 1963.

BARENYS, M.; MACIA, N.; CAMPS, L.; DE LAPUENTE, J.; GOMEZ-CATALAN, J.; GONZALEZ-LINARES, J.; BORRAS, M.; RODAMILANS, M.; LLOBET, J. M. Chronic exposure to MDMA (ecstasy) increases DNA damage in sperm and alters testes histopathology in male rats. **Toxicology Letters**: v. 191, p. 40–46, 2009.

BECKMAN, D. A.; SCHNEIDER, M.; YOURENEFF, M.; TSE, F. L. Juvenile toxicity assessment of d,l-methylphenidate in rats. **Developmental Reproductive Toxicology**: v. 83, n. 1, p. 48-67, 2008.

BHIDE, V. M.; LASCHINGER, C. A.; ARORA, P. D.; LEE, W.; HAKKINEN, L.; LARJAVA, H.; SODEK, J.; MCCULLOCH, C. A. Collagen Phagocytosis by Fibroblasts Is Regulated by Decorin. **Journal of Biological Chemistry**: v. 280, p. 3103-3113, 2005.

BLANCO, A.; MOYANO, R.; VIVO, J.; FLORES-ACUÑA, R.; MOLINA, A.; BLANCO, C.; AGÜERA, E.; MONTERDE, J. Quantitative changes in the testicular structure in mice exposed to low doses of cadmium. **Environmental Toxicology and Pharmacology**: v. 23, p. 96-101, 2007.

BHUSHAN S.; MEINHARDT A. (2017). The macrophages in testis function. **Journal of Reproductive Immunology**: v. 119, p.107–112, 2007.

BRANT, L.; CARVALHO, T. Metilfenidato: medicamento gadget da contemporaneidade. **Interface - Comunicação, Saúde, Educação**: v. 16, n. 42, p.623 - 636, 2012.

CANSU, A. Methylphenidate has dose-dependent negative effects on rat spermatogenesis: decreased round spermatids, testicular weight, increased p53 expression, and apoptosis. **Human & Experimental Toxicology**: v. 30, n 10, 2011.

CASTRO, A. C. S.; BERNDTSON, W. E.; CARDOSO, F. M. Plasma and testicular testosterone levels, volume density and number of Leydig cells and spermatogenic efficiency of rabbits. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**: v. 35, n. 4, p. 493-498, 2002.

CHAMNESS, S. L; RICKER, D. D; CRONE, J. K; DEMBECK, C. L; MAGUIRE, M. P; BURNETT, A. L; CHANG, T. S. The effect of androgen on nitric oxide synthase in the male reproductive tract of the rat. **Fertility and Sterility**: v. 63, p. 1101-1107. 1995.

COUTINHO, R. (2009). Ritalina. Disponível em: <<http://www.culturamix.com/saude/ritalina/>>. Acesso em: 14 de junho de 2019.

CUMMINS, J. M.; JEQUIER, A. M.; KANI, R. Molecular Biology of Human Male Infertility: Links With Aging, Mitochondrial Genetics, and Oxidative Stress? **Molecular Reproduction and Development**: v. 362, p. 345–362, 1994.

DIAS, F. C R.; MARTINS, A. L. P.; DE MELO, F. C. S. A.; CUPERTINO, M. DO C.; GOMES, M. DE L. M.; DE OLIVEIRA, J. M.; DAMASCENO, E. M.; SILVA, J.; OTONI, W. C.; DA MATTA, S. L. P. Hydroalcoholic extract of *Pfaffia glomerata* alters the organization of the seminiferous tubules by modulating the oxidative state and the microstructural reorganization of the mice testes. **Journal of Ethnopharmacology**: v. 233, p. 179-189, 2019

FAZELIPOUR, S.; JAHROMY, M. H.; TOOTIAN, Z.; KIAEI, S. B.; SHEIBANI, M. T.; TALAEI, N. The effect of chronic administration of methylphenidate on morphometric parameters of testes and fertility in male mice. **Journal Reproductive Infertility**: v. 13, n. 4, p.232-6, 2012.

FAZELIPOUR, S.; TOOTIAN, Z.; GHAHRI, S. Z.; SHAFII, M.; SHEIBANI, M. T.; KIAEI, S. B.; KIUMARSI, M.; ASSADI, F. Evaluation of histopathologic and histomorphometric changes of testicular tissue and gonadotropin levels following consumption of methylphenidate in male mice. **Journal of Medical Sciences**: v. 44, p. 554-559, 2014.

FERNANDES, G. S. A.; ARENA, A. C.; FERNANDEZ, C. D. B.; MERCADANTE, A.; BARBISAN, L. F.; KEMPINAS, W. G. Reproductive effects in male rats exposed to diuron. **Reproductive Toxicology**: v. 23, p. 106–112, 2007.

FERNANDEZ, C. D. B.; PORTO, E. M.; ARENA, A. C.; KEMPINAS, W. G. Effects of altered epididymal sperm transit time on sperm quality. **International Journal of Andrology**: v. 31, p. 427-437, 2008.

FRANÇA, L. R.; RUSSELL, L. D. The testis of domestic mammals. In: Martinez-Garcia, F.; Regadera, J. (eds). **Male reproduction - a multidisciplinary overview**. Madrid, Churchill Communications: p.198-219, 1998.

GEORGE, V. K.; LI H.; TELOKEN, C.; GRIGNON, D. J.; LAWRENCE, W. D.; DHABUWALA, C. B. Effects of long-term cocaine exposure on spermatogenesis and fertility in peripubertal male rats. **Journal Urology**: v. 155, n.1, p. 327–31, 1996.

GONZÁLEZ, C. R.; GONZÁLEZ, B.; MATZKIN, M. E.; MUNIZ, J. A.; CADET, J. L.; GARCIA-RILL, E.; URBANO, F. J.; VITULLO, A. D.; BISAGNO, V. Psychostimulant-Induced testicular toxicity in mice: evidence of cocaine and caffeine effects on the local dopaminergic system. **PLoS One**: v. 10, n. 11, e0142713, 2015.

HAFEZ, E. S. E. *Reproduction and Breeding Techniques for Laboratory Animals*. Philadelphia: **Lea and Febiger**: p. 273-298, 1970.

ITABORAHY, C. **A Ritalina no Brasil: Uma Década de Produção, Divulgação e Consumo**. Dissertação (Mestrado em Medicina Social) – Instituto de Medicina Social – Universidade Estadual do Rio de Janeiro, 2009.

JOHNSEN, S. G. Testicular Biopsy Score Count – A Method for Registration of Spermatogenesis in Human Testes: Normal Values and Results in 335 Hypogonadal Males. **Hormones**: n.1, p. 2–25, 1970.

KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal Cellular Biology**: v. 27, n.15, p. 137, 1965.

KIANIFARD, D.; HASANZADEH, S.; KIANIFARD, L. The study of time dependent administration of methylphenidate on the microscopic indices of spermatogenesis and sperm analysis in adult rats. **Journal of Experimental & Integrative Medicine**: v. 3, n.2, p. 121-125, 2013.

KLINEFELTER, G. R. Actions of toxicants on the structure and function of the epididymis. In: Robaire, B.; Hinton, B. T.; editors. **The Epididymis – from molecules to clinical practice**. New York: Kluwer Academic/ Plenum Publisher: p. 353-369, 2002.

LANNING, L. L.; CREASY, D. M.; CHAPIN, R. E.; MANN, P. C.; BARLOW, N. J.; REGAN, K. S. Recommended approaches for the evaluation of testicular and epididymal toxicity. **Toxicologic Pathology**: v. 30, p. 507–520, 2002.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, L.; RABDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**: v. 193, p. 265–275, 1951.

MATTOS, P.; ROHDE, L.; LOUZÃ, M. Resposta à matéria “Ritalina, usos e abusos”. **Revista Veja**, 2004. Disponível em: <[www.tdah.org.br](http://www.tdah.org.br)>. Acesso em: 18 maio, 2018.

MONTAGNINI, B. G.; SIENNA, S. L.; SANTOS, A. H.; ANSELMO-FRANCI, J. A.; FERNANDES, G. S. A.; MESQUITA, S. de F. P.; GERARDIN, D. C. C. Effects of repeated administration of methylphenidate on reproductive parameters in male rats. **Physiology & Behavior**: v. 133, p. 122-129, 2014.

ORGEL, J. P. R. O.; EID, A.; ANTIPOVA, O.; BELLA, J.; SCOTT, J. E. Decorin pore protein (Decoron) Shape Complements Collagen Fibril Surface Structure and Mediates its Binding. **PLoS One**: v. 4, n. 9, p.7028, 2009.

POULTON, A.; COWELL, C. T. Slowing of growth in height and weight on stimulants: a characteristic pattern. **Journal Paediatric Child Health**: v. 39, p.180-185, 2003.

PTACEK, R.; KUZELOVA, H.; PACLT, I. Effect of stimulants on growth of ADHD children: a critical review. **Activitas Nervosa Superior**: v. 51, n.4, p. 140-146, 2009.

RICART-JANÉ, D.; LLOBERA, M.; LÓPEZ-TEJERO, M. D. Anticoagulants and other preanalytical factors interfere in plasma nitrate/nitrite quantification by the Griess method. **Nitric Oxide**: v. 6, n. 2, p.178–85, 2002.

ROBB, G. W.; AMMAN, R. P.; KILLIAN, G. J. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. **Journal Reproductive Fertility**: p. 103–107, 1978.

RUSSELL, L. D.; ETTLIN, R. A.; SINHA, HIKIM A. P.; CLEGG, E. D. Mammalian spermatogenesis. In: Russell, L. D.; Ettlin, R. A.; Sinha, Hikim A. P.; Clegg, E. D. editors. **Histological and Histopathological Evaluation of the Testis**. Florida, p. 1–40, 1990.

RUSSELL, L. D. Mammalian Leydig cell structure. In: Payne, A. H.; Hardy, M. P.; Russell, L. D. (Eds). **The Leydig cell**. Vienna: Cache River Press, p. 218-222, 1996.

SARBAN, S.; KOCYIGIT, A.; YAZAR, M.; ISIKAN, U. E. Plasma total antioxidant capacity, lipid peroxidation, and erythrocyte antioxidant enzyme activities in patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. **Clinical Biochemistry**: n. 38, p. 981–986, 2005.

TEO, S.; STIRLING, D.; THOMAS, S.; HOBERMAN, A.; KIORPES, A.; KHETANI, V. A 90-day oral gavage toxicity study of d-methylphenidate and d,l-methylphenidate in Sprague–Dawley rats. **Toxicology**: v. 179, n. 3, p.183-196, 2002.

TREMBLAY, J. J. Molecular regulation of steroidogenesis in endocrine Leydig cells. **Steroids**: v.103, p.3-10, 2015.

WALLIN, B.; ROSENGREN, B.; SHERTZER, H.G.; CAMEJO, G. Lipoprotein oxidation and measurement of thiobarbituric acid reacting substances formation in a single microtiter plate: its use for evaluation of antioxidants. **Analytical Biochemistry**: n.1, p. 10–15, 1993.

WORKING, P. K.; BUS, J.S.; HAMM, T.E. Reproductive effects of inhaled methyl chloride in the male Fischer rat spermatogonial toxicity and sperm quality. **Toxicology Applied Pharmacology**: v. 77, p. 144-157, 1985.