

Efeitos do metilfenidato sobre as glândulas salivares maternas de camundongos

Methylphenidate effects on maternal salivary glands of mice

Karol Sartori LIMA^a, Antonio Eduardo SALLES^a, Gabriel Araujo COSTA^a, Solange Paula RAMOS^a,
Maria José Sparça SALLES^{a*}

^aUEL – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil

Resumo

Introdução: O metilfenidato (MFD) é um derivado anfetamínico estimulante do sistema nervoso central, que vem sendo cada vez mais consumido pela população mundial, incluindo as mulheres em idade fértil. Ainda não foram estabelecidos os efeitos deste medicamento nas glândulas salivares, durante a gestação. **Objetivo:** Identificar alterações histomorfológicas em glândulas salivares maternas expostas ao metilfenidato. **Material e método:** Para análise histológica, foram utilizadas 32 fêmeas de camundongos Swiss prenhes, distribuídas em um grupo controle e um grupo tratado. A administração foi realizada do quinto ao 17º dia de gestação, via injeção subcutânea; o grupo tratado recebeu 5 mg/kg de metilfenidato, enquanto o grupo controle recebeu o mesmo volume de solução salina estéril. As fêmeas foram eutanasiadas e tiveram suas glândulas salivares removidas e incluídas em parafina para análise em microscopia óptica. Para avaliar a associação entre as variáveis dos grupos, o teste de Kolmogorov-Smirnov e o teste T foram utilizados. **Resultado:** As glândulas parótidas do grupo tratado apresentaram alterações no raio dos ductos e na quantidade de ácinos, quando comparadas às glândulas parótidas do grupo controle. A glândula submandibular do grupo tratado foi a mais afetada: mostrou diferença estatisticamente significativa na espessura da parede dos ductos secretores, no raio dos ductos e no raio dos ácinos, quando comparada à glândula submandibular do grupo controle. A glândula sublingual não apresentou alterações significativas. **Conclusão:** Neste delineamento experimental, o metilfenidato apresentou-se como agente indutor de alterações morfológicas das glândulas salivares, promovendo alterações significativas nos raios de ductos e ácinos das mesmas, sendo a glândula submandibular a mais susceptível a este fármaco.

Descritores: Metilfenidato; glândulas salivares; gestação.

Abstract

Introduction: Methylphenidate (MPD) is a stimulant amphetamine derivative of the central nervous system, which is being increasingly consumed by the world population, including women of childbearing age. It has not yet established the effects of this medicine in the salivary glands during pregnancy. **Objective:** Evaluate the exposure effects to the MPD in the maternal salivary glands. **Material and method:** For prenatal study, 32 pregnant female Swiss mice were used, divided into a control and a treated group. The treated group received 5 mg/kg of MPD via subcutaneous injection from the 5th to the 17th day and the control received sterile saline in the same volume and pregnancy period. Females were euthanized and had their salivary glands removed and embedded in paraffin for analysis in optical microscopy. To evaluate the association between the variables of the groups, the Kolmogorov-Smirnov test and T test were used. **Result:** The parotid glands of the treated group showed statistically significant change within the ducts and the amount of acini when compared to the control group. The submandibular gland was the most affected, it showed a difference statistically significant in wall thickness of the secretory ducts, within the ducts and within the acini when compared to the control group. The sublingual gland showed no significant changes. **Conclusion:** In this experiment methylphenidate is presented as inducing agent morphological changes of the salivary glands, promoting significant changes in ducts radii and acini, submandibular gland being more susceptible to this drug.

Descriptors: Methylphenidate; salivary glands; pregnancy.

INTRODUÇÃO

O cloridrato de metilfenidato (MFD) é um psicoestimulante derivado de piperidina, da família das anfetaminas, de fórmula molecular $C_{14}H_{19}NO_2$. Esse medicamento, sujeito à prescrição médica, promove um aumento da atenção e do controle de impulsos de crianças que apresentem Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade. Este é um dos transtornos neurológicos do comportamento mais comuns da infância, que afeta 8 a 12% das crianças no mundo, sendo o motivo mais frequente de consulta nos serviços de saúde mental envolvendo esses pacientes¹. No sistema nervoso central, neurotransmissores, como a dopamina e a noradrenalina, são removidos da fenda sináptica principalmente por meio da ação de transportadores pré-sinápticos específicos, cujo papel é o de recepção de neurotransmissores, interrompendo seus efeitos². Substâncias psicoestimulantes, como a cocaína, as anfetaminas e o MFD, inibem os transportadores de dopamina e de noradrenalina, gerando um aumento na disponibilidade destes neurotransmissores na fenda sináptica. Isto resulta, por conseguinte, num efeito estimulatório sobre o sistema nervoso central².

A produção mundial do metilfenidato aumentou mais de dez vezes nos últimos anos, saltando de 4,2 toneladas, em 1992 para 45,2 toneladas, em 2011. Em 2009, ultrapassou a fabricação global combinada de todas as anfetaminas, com produção contínua e crescente. O consumo mundial subiu de 4,2 toneladas para 51 toneladas, neste mesmo período³. A alta produção se dá pelo grande interesse por este tipo de medicamentos estimulantes, que aumentam o nível de energia e concentração, diminuindo a necessidade de descanso⁴. Neste contexto, o uso do medicamento tem se estabelecido de forma equivocada pela população, sendo utilizado como instrumento de melhoria do desempenho de crianças, adolescentes e adultos, incluindo mulheres na idade fértil, podendo, assim, haver riscos durante a gestação.

A gravidez e o período perinatal são caracterizados por importantes mudanças psicossociais e biológicas no eixo neuroendócrino, que influenciam mãe e feto. Assim, o fluxo salivar pode ser comprometido pelas mudanças hormonais e metabólicas ocorridas durante a gravidez.

A segurança do uso de metilfenidato durante a gravidez não foi estabelecida, de forma que a qualidade e a quantidade dos dados de exposição pré-natal ao medicamento não permitem uma avaliação específica de risco. Estudos recentes com roedores mostram que a exposição ao MFD durante o desenvolvimento tem efeitos leves, porém significantes, de diminuição do peso corporal materno pela diminuição da ingestão de alimentos durante a gestação⁵.

De acordo com a literatura consultada, a segurança para o uso do metilfenidato durante a gestação ainda não foi estabelecida. Desta forma, este trabalho teve como objetivo investigar alterações nas glândulas salivares de fêmeas de camundongos expostas à droga no período de gestação.

MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizados 32 camundongos Swiss (*Mus musculus*), fêmeas, adultas, pesando aproximadamente 35 g, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas da Universidade

Estadual de Londrina. O metilfenidato utilizado foi a Ritalina® (Novartis). Durante a execução deste trabalho, os animais foram mantidos em regime de luminosidade controlada, ciclo de 12 horas claro/escuro, a 22 ± 2 °C, com água e ração à vontade.

Os animais foram colocados para acasalar no final da tarde, em gaiolas individuais, na proporção de dois camundongos fêmea para um camundongo macho, sendo que as fêmeas prenhes foram aleatoriamente designadas para o grupo experimental ou o grupo controle. Nos dias seguintes, com um intervalo de 12 horas, a vagina das fêmeas foi examinada para verificar a ocorrência do *plug* vaginal, o qual determinou o dia zero de prenhez, ocasião em que as fêmeas foram identificadas e pesadas.

O grupo de tratamento foi composto por 16 animais, que receberam 5 mg/kg de metilfenidato, diluídos em solução salina estéril, via injeção subcutânea, sendo utilizadas agulhas-seringa para insulina. A administração do fármaco foi realizada uma vez ao dia, do quinto ao 17º dia de gestação, com base nas fases de desenvolvimento dos roedores. Dado o maior metabolismo do MFD em roedores em comparação com os seres humanos, uma dose de 5 mg/kg deve ser, aproximadamente, equivalente a uma dose clinicamente relevante em seres humanos, que varia de 0,3 até 1 mg/kg⁶.

O grupo controle, com 16 animais, recebeu um volume equivalente de solução salina estéril, sob o mesmo delineamento experimental. No 18.º dia de gestação, as fêmeas foram eutanasiadas por deslocamento cervical e, em seguida, estas tiveram as glândulas salivares removidas para a análise histológica.

As glândulas salivares foram identificadas e fixadas em 10% de solução tamponada de formalina, durante 24 horas. Os espécimes foram processados para procedimento histológico e corados por hematoxilina e eosina, com 20 cortes sagitais das glândulas submandibulares, sublinguais e parótidas, com sete micrômetros de espessura. Foram analisadas três lâminas de cada órgão e, para cada lâmina, cinco campos foram analisados. Os cortes foram fotografados em câmera digital acoplada em microscópio óptico (Moticam, Motic Co, Xiamen, China) e analisados em software Motic Image Plus 2.0 (Motic Co, Xiamen, China), em 5, 10 e 20× de aumento, por avaliador treinado e calibrado.

Para a análise histológica, foram medidos a espessura da parede dos ácinos e o raio dos ductos secretores e dos ácinos, e contada a quantidade de ácinos presentes na área⁷. Os dados foram analisados com auxílio do pacote estatístico SPSS 20.0. Inicialmente, foi empregado o teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar a distribuição dos dados. Na sequência, foi empregado o teste t para amostras independentes e, em seguida, a metodologia de intenção de tratar e a posterior análise de comparações entre controle e tratado. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

Todos os procedimentos aqui descritos estão em conformidade com os Princípios Éticos da Experimentação Animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA e com a Lei n.º 11.794, de 08/out./2008, tendo sido aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação animal da Universidade Estadual de Londrina sob o número 9397. 2014.90.

RESULTADO

A Tabela 1 apresenta os dados quanto à média e ao desvio padrão da espessura da parede dos ductos secretores, do raio dos ductos e do raio e da quantidade dos ácidos.

Na comparação dos grupos, observou-se que as glândulas parótidas apresentaram, no grupo tratado, **diferença** estatisticamente significativa no raio dos ductos (14,79 μm) quando comparadas ao grupo controle (raio dos ductos de 11,61 μm), e houve **diferença** na quantidade de ácidos, sendo de 57 por campo no grupo controle e 40,5 por campo no grupo tratado (Figuras 1 e 2 respectivamente).

A glândula submandibular foi a mais afetada: mostrou diferença estatisticamente significativa na espessura da parede dos ductos secretores do grupo tratado, com média de 13,11 μm , e no grupo controle, de 9,64 μm ; foi observada ainda diferença no raio dos ductos do grupo tratado (15,67 μm) e do grupo controle (12,33 μm), e no raio dos ácidos do grupo tratado (18,82 μm) e do grupo controle (12,94 μm).

As glândulas sublinguais não apresentaram nenhuma alteração significativa em nenhuma das variáveis analisadas.

DISCUSSÃO

O fluxo salivar pode ser comprometido pelas mudanças hormonais e metabólicas ocorridas durante a gravidez⁷; por essa razão, a composição da saliva, a hipossalivação e o pH salivar têm sido estudados em gestantes. Entretanto, alterações dos parâmetros salivares no período gestacional apresentam controvérsias na literatura⁸⁻¹¹.

Estudos mostram que os antidepressivos têm ação farmacológica sobre o sistema nervoso central, alterando a função das glândulas salivares¹². As tentativas para esclarecer os efeitos xerostômicos de tais drogas têm sido de grande valor científico, tanto na explicação dos efeitos fisiofarmacológicos quanto em trazer benefícios adicionais para os pacientes que fazem uso destas drogas¹².

A morfometria digitalizada é um importante método de quantificação de estruturas, que permite identificar as alterações morfofuncionais dos organismos com elevado grau de precisão. Por este método, pode-se verificar que o metilfenidato produziu alteração no tamanho do raio dos ductos secretores e dos ácidos das glândulas parótida e submandibular dos camundongos do grupo tratado. É importante ressaltar que as glândulas salivares são inervadas pelo sistema nervoso autônomo simpático e parassimpático. Os estímulos vêm dos centros autônomos e chegam às glândulas, agindo nos receptores alfa e beta adrenérgicos¹³. Os fármacos simpatomiméticos, como o metilfenidato, têm afinidade pelos receptores adrenérgicos presentes nas glândulas salivares e, como efeito colateral, inibem a ação secretora, levando à hipossalivação.

As drogas de ação central promovem uma hipertrofia das células das glândulas salivares¹⁴. Sabe-se que a hipertrofia das células da parótida e da submandibular, com alargamento dos ácidos e acúmulo de grânulos de secreção, promove retenção de saliva e ocasionam o aparecimento da hipossalivação, relatada com outras drogas de ação central, como, por exemplo, o cloridrato de bupropiona¹⁴. Os resultados deste estudo corroboram com relatos de Eisenberg¹⁴. No estudo de Thomsom et al.¹⁵, é relatado que pacientes com alterações psiquiátricas que fazem uso deste fármaco queixam-se de boca seca. Ainda com relação ao aparecimento deste achado, é sabido que as glândulas submandibulares e sublinguais

Tabela 1. Comparação de dados entre grupos Controle e Tratado

		Controle		Tratado		P
		Média	DP	Média	DP	
Parótida	Espessura parede ductos secretores (μm)	10,00	0,95	10,94	1,65	0,253
	Raio dos ductos (μm)	11,61	1,51	14,79	2,63	0,028*
	Raio dos ácidos (μm)	12,45	1,81	15,31	2,95	0,071
	Quantidade de ácidos	57,0	7,7	40,5	5,6	0,003*
Sublingual	Espessura parede ductos secretores (μm)	12,41	1,40	11,10	2,38	0,260
	Raio dos ductos (μm)	18,47	3,97	18,63	5,98	0,957
	Raio dos ácidos (μm)	19,89	1,44	19,53	2,41	0,764
	Quantidade ácidos	46,0	2,4	48,0	2,8	0,963
Submandibular	Espessura parede ductos secretores (μm)	9,64	1,03	13,11	2,20	0,006*
	Raio dos ductos (μm)	12,33	1,64	15,67	2,52	0,022*
	Raio dos ácidos (μm)	12,94	0,98	18,82	3,10	0,001*
	Quantidade ácidos	46,5	10,4	41,3	11,7	0,440

*Dados estatisticamente significativos.

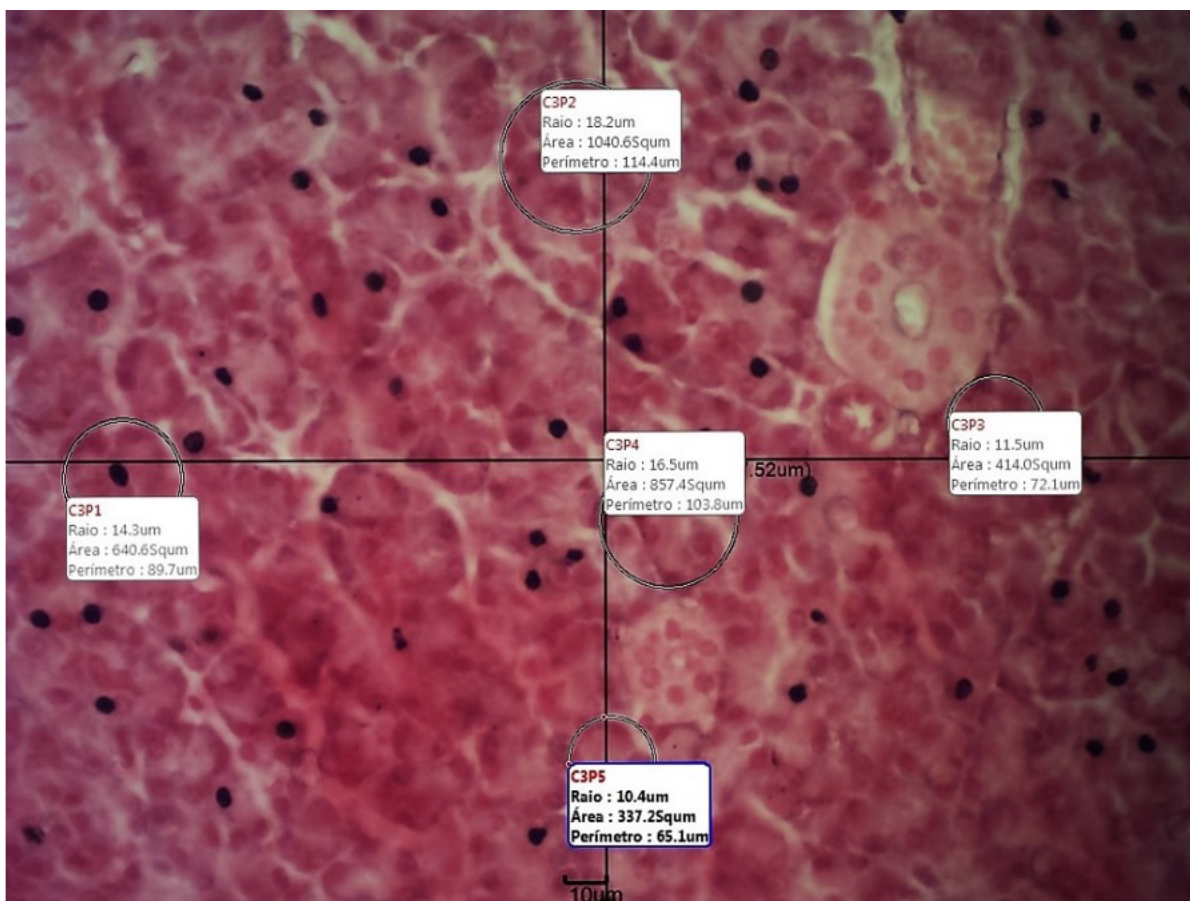


Figura 1. Glândula parótida - grupo controle, mostrando a medição do raio dos ácinos.

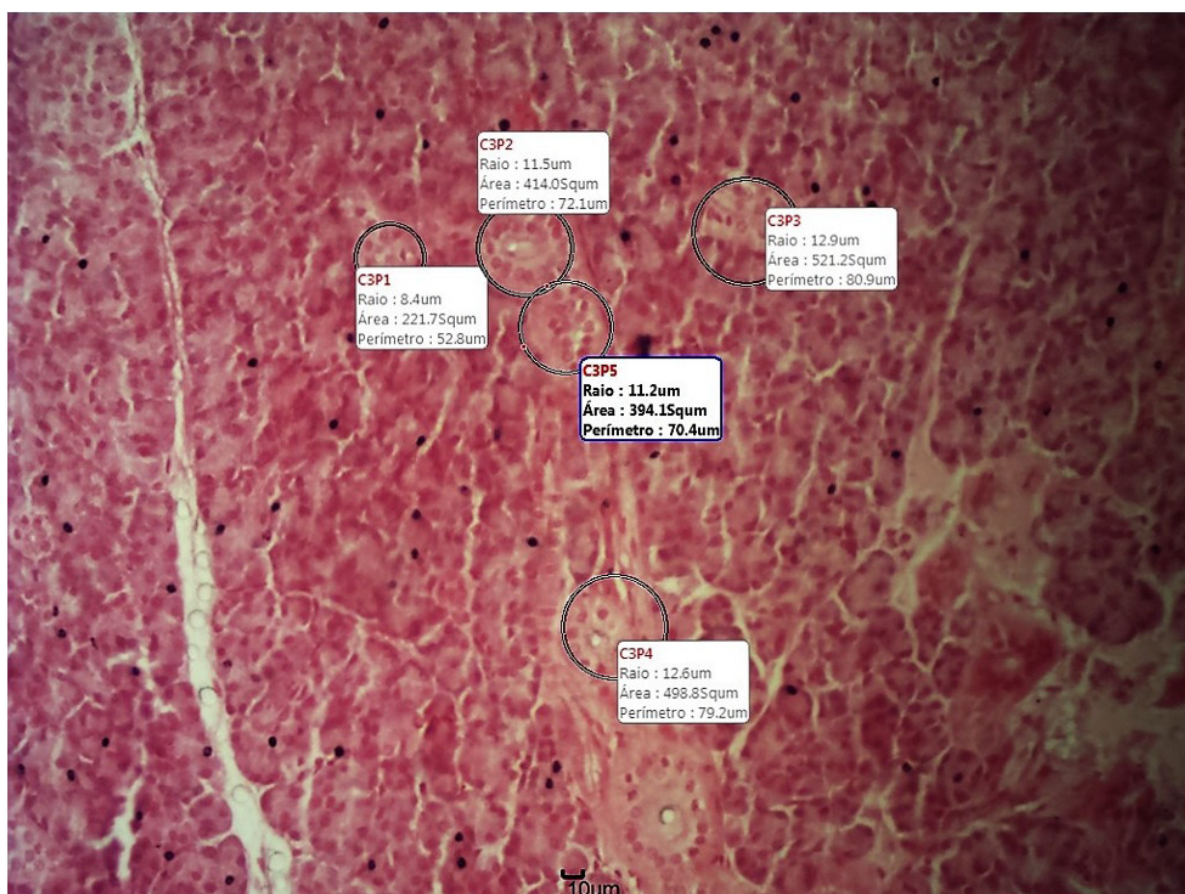


Figura 2. Glândula parótida - grupo tratado, mostrando a medição do raio dos ductos secretores.

são responsáveis pela produção de mucina, produto responsável por promover a sensação de lubrificação da mucosa¹⁶⁻¹⁷. Foi constatado que a glândula submandibular mostra-se mais susceptível às perturbações causadas pelos medicamentos¹⁸.

O mecanismo de ação dos ansiolíticos, associado às atividades noradrenérgica e dopaminérgica, aumenta a liberação de noradrenalina corpórea¹⁹ e não interage com receptores histamínicos e colinérgicos, levando a uma maior tolerabilidade^{19,20}. Os efeitos adversos mais frequentemente observados são: agitação, rash cutâneo, diminuição do apetite e boca seca. Estes efeitos colaterais associados aos medicamentos desta classe podem ser resultado de alterações adaptativas que mais frequentemente envolvem o ajuste de receptores para compensar a atividade farmacológica da droga, descritas como efeito rebote²¹.

Os dados encontrados neste trabalho podem ser utilizados como base para futuras discussões e estudos, principalmente porque a

literatura é escassa em relação aos efeitos do MFD sobre a gestante. É importante destacar que estudos clínicos são necessários para confirmar as hipóteses levantadas no presente estudo. Outros estudos que se aprofundem nesta temática serão relevantes para contribuir com os programas de saúde pública de cuidados no pré-natal, possibilitando maior atenção no acompanhamento de mulheres em idade fértil que façam o uso do metilfenidato de forma contínua.

CONCLUSÃO

Neste delineamento experimental, o metilfenidato apresentou-se como agente indutor de alterações morfológicas das glândulas salivares, promovendo alterações significativas nos raios de ductos e ácinos das mesmas, sendo a glândula submandibular a mais susceptível a este fármaco.

REFERÊNCIAS

- Biederman J, Faraone SV. Attention-deficit hyperactivity disorder. *Lancet*. 2005 Jul;366(9481):237-48. PMID:16023516. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)66915-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(05)66915-2).
- Freese L, Signor L, Machado C, Ferigolo M, Barros HMT. Non-medical use of methylphenidate: a review. *Trends Psychiatry Psychother*. 2012;34(2):110-5. PMID:25922930. <http://dx.doi.org/10.1590/S2237-60892012000200010>.
- International Narcotics Control Board. Precursors and chemicals frequently used in the illicit manufacture of narcotic drugs and psychotropic substances. Report of the International Narcotics Control Board for 2012 on the Implementation of Article 12 of the United Nations Convention against Illicit Traffic in Narcotic Drugs and Psychotropic Substances of 1988 (E/INCB/2012/4); 2012 fev 28; New Delhi. New York: United Nations Publication; 2013. p. 36-47.
- Arria AM, Wish ED. Nonmedical use of prescription stimulants among students. *Pediatr Ann*. 2006 Aug;35(8):565-71. PMID:16986451. <http://dx.doi.org/10.3928/0090-4481-20060801-09>.
- Panos JJ, Law CD, Ferguson SA. Effects of perinatal methylphenidate (MPH) treatment in male and female Sprague-Dawley offspring. *Neurotoxicol Teratol*. 2014 Mar-Apr;42:9-16. PMID:24444667. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ntt.2014.01.004>.
- McFadyen-Leussis MP, Lewis SP, Bond TL, Carrey N, Brown RE. Prenatal exposure to methylphenidate hydrochloride decreases anxiety and increases exploration in mice. *Pharmacol Biochem Behav*. 2004 Mar;77(3):491-500. PMID:15006459. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbb.2003.12.011>.
- Nanci A. Ten Cate histologia oral: desenvolvimento, estrutura e função. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2013.
- Laine M, Pienihäkkinen K. Salivary buffer effect in relation to late pregnancy and postpartum. *Acta Odontol Scand*. 2000;58(1):8-10. PMID:10809393. <http://dx.doi.org/10.1080/000163500429361>.
- Laine M, Tenovuo J, Lehtonen OP, Ojanotko-Harri A, Vilja P, Tuohimaa P. Pregnancy-related changes in human whole saliva. *Arch Oral Biol*. 1988;33(12):913-7. PMID:3256298. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-9969\(88\)90022-2](http://dx.doi.org/10.1016/0003-9969(88)90022-2).
- Gonzalez M, Monte de Oca L, Jimenez G. Cambios en la composición de la saliva de pacientes gestantes y no gestantes. *Perinatol Reprod Hum*. 2001 Jul-Set;15(3):195-201.
- Kivelä J, Laine M, Parkkila S, Rajaniemi H. Salivary carbonic anhydrase VI and its relation to salivary flow rate and buffer capacity in pregnant and non-pregnant women. *Arch Oral Biol*. 2003 Aug;48(8):547-51. PMID:12828982. [http://dx.doi.org/10.1016/S0003-9969\(03\)00096-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0003-9969(03)00096-7).
- Mattioli TME, Silva S, Grégio AMT, Machado MAN, Lima AAS, Azevedo-Alanis LR. The effects of antidepressants and pilocarpine on rat parotid glands: an immunohistochemical study. *Clinics (Sao Paulo)*. 2011 Sep;66(9):1605-10. PMID:22179167. <http://dx.doi.org/10.1590/S1807-59322011000900017>.
- Wu A, Ship JA. A characterization of major salivary gland flow rates in the presence of medications and systemic diseases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1993 Sep;76(3):301-6. PMID:8378045. [http://dx.doi.org/10.1016/0030-4220\(93\)90258-6](http://dx.doi.org/10.1016/0030-4220(93)90258-6).
- Eisenberg MJ, Filion KB, Yavin D, Bélisle P, Mottillo S, Joseph L, et al. Pharmacotherapies for smoking cessation: a meta-analysis of randomized controlled trials. *CMAJ*. 2008 Jul;179(2):135-44. PMID:18625984. <http://dx.doi.org/10.1503/cmaj.070256>.
- Thomson WM, Chalmers JM, Spencer AJ, Slade GD. Medication and dry mouth: findings from a cohort study of older people. *J Public Health Dent*. 2000;60(1):12-20. PMID:10734611. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1752-7325.2000.tb03286.x>.
- Aranha FL. Bioquímica odontológica. São Paulo: Sarvier; 1996.

17. Vissink A, Waterman HA, 's-Gravenmade EJ, Panders AK, Vermey A. Rheological properties of saliva substitutes containing mucin, carboxymethylcellulose or poliethylenoxide. *J Oral Pathol.* 1984 Feb;13(1):22-8. PMID:6422019. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0714.1984.tb01397.x>.
18. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ. *Farmacologia*. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2007.
19. Feighner JP. Mechanism of action of antidepressant medications. *J Clin Psychiatry.* 1999;60(Suppl 4):4-11, discussion 12-3. PMID:10086478.
20. Horst WD, Preskorn SH. Mechanisms of action and clinical characteristics of three atypical antidepressants: venlafaxine, nefazodone, bupropion. *J Affect Disord.* 1998 Dec;51(3):237-54. PMID:10333980. [http://dx.doi.org/10.1016/S0165-0327\(98\)00222-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0165-0327(98)00222-5).
21. Bezchlibnyk-Butler KZ, Jeffries JJ. *Clinical handbook of psychotropic drugs*. 9th ed. Seattle: Hogrefe & Huber; 1999.

CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

*AUTOR PARA CORRESPONDÊNCIA

Maria José Sparça Salles, Departamento de Biologia Geral, Centro de Ciências Biológicas, UEL – Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, Km 380, s/n, Campus Universitário, 86057-970 Londrina - PR, Brasil, e-mail: salmjs00@gmail.com

Recebido: Agosto 24, 2015

Aprovado: Agosto 11, 2016