



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
Departamento de Farmácia
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas



DANIELLY CHIERRITO DE OLIVEIRA TOLENTINO

**TRATAMENTO DO TRANSTORNO DE DÉFICIT DA ATENÇÃO COM
HIPERATIVIDADE: REVISÃO SISTEMÁTICA E CULTURA DE CÉLULAS**

MARINGÁ

2021

DANIELLY CHIERRITO DE OLIVEIRA TOLENTINO

**Tratamento do Transtorno de Déficit da Atenção com Hiperatividade: revisão
sistemática e cultura de células**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos Biologicamente Ativos), da Universidade Estadual de Maringá, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello

Co-orientadora: Profa. Dra. Andreia Cristina Conegero Sanches

MARINGÁ

2021

**AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO,
POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE PESQUISA
OU ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR, Brasil)

T649t

Tolentino, Danielly Chierrito de Oliveira

Tratamento do Transtorno de Déficit da Atenção com Hiperatividade : revisão sistemática e cultura de células / Danielly Chierrito de Oliveira Tolentino. -- Maringá, PR, 2021.

104 f.: il. color., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello.

Coorientadora: Profa. Dra. Andreia Cristina Conegero Sanches.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2021.

1. Transtorno de Déficit da Atenção com Hiperatividade - Tratamento - Opções terapêuticas. 2. Cultura de células. 3. Viabilidade celular. 4. Aspectos metodológicos. I. Mello, João Carlos Palazzo de, orient. II. Sanches, Andreia Cristina Conegero, coorient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências da Saúde. Departamento de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. IV. Título.

CDD 23.ed. 615.50724


DANIELLY CHIERRITO DE OLIVEIRA TOLENTINO

**TRATAMENTO DO TRANSTORNO DE DÉFICIT DA ATENÇÃO COM HIPERATIVIDADE:
REVISÃO SISTEMÁTICA E CULTURA DE CÉLULAS**

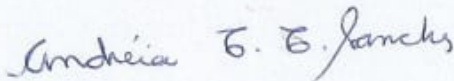
124ª Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 12 de fevereiro de 2021.

BANCA EXAMINADORA



João Carlos Palazzo de Mello
Universidade Estadual de Maringá



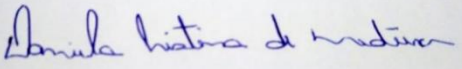
Andreia Cristina Conegero Sanches
Universidade Estadual do Oeste do Paraná



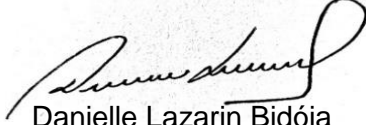
Fernando Fernandez-Llimos
Universidade do Porto




Almeriane Maria Weffort Santos
Universidade Federal do Paraná



Daniela Cristina de Medeiros Araújo
Centro Universitário Ingá



Danielle Lazarin Bidóia
Universidade Estadual de Londrina



Fernanda Stumpf Tonin
Consultora Health Economics and Outcomes Research

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Farmacêutica (PALAFITO) (Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello) da Universidade Estadual de Maringá (UEM), em parceria com a Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE) (Profa. Dra. Andréia Cristina Conegero Sanches) e Universidade do Porto (Prof. Dr. Fernando Fernandez-Llimos).

Partes deste trabalho foram apresentadas nos seguintes eventos:

CHIERRITO, D.; VILLAS-BOAS, C. B.; TONIN, F. S.; FERNANDEZ-LLIMOS, F.; SANCHES, A. C. C.; MELLO, J. C. P. Cultura de células e Transtorno de Déficit da Atenção com Hiperatividade: Condições de cultivo. 7º COSIMP - 7º Congresso de Ciências Farmacêuticas do Mercosul, 7º Simpósio em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Mercosul e 2º Encontro de Pesquisa e Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Cascavel, 2018.

CHIERRITO, D.; VILLAS-BOAS, C. B.; TONIN, F. S.; FERNANDEZ-LLIMOS, F.; SANCHES, A. C. C.; MELLO, J. C. P. Cultura de células e TDAH: Análise da qualidade metodológica de estudos experimentais *in vitro*. 7º COSIMP - 7º Congresso de Ciências Farmacêuticas do Mercosul, 7º Simpósio em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Mercosul e 2º Encontro de Pesquisa e Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Cascavel, 2018.

CHIERRITO, D.; VILLAS-BOAS, C. B.; TONIN, F. S.; FERNANDEZ-LLIMOS, F.; SANCHES, A. C. C.; MELLO, J. C. P. Neuroblastoma SH-SY5Y and investigation for Attention Deficit Hyperactivity Disorder: a systematic review. I International Meeting of Pharmaceutical Sciences, IX Seminário Anual do PCF e I Seminário Anual do PROFAR. Maringá, 2018.

CHIERRITO, D.; VILLAS-BOAS, C. B.; TONIN, F. S.; FERNANDEZ-LLIMOS, F.; SANCHES, A. C. C.; MELLO, J. C. P. Neuroblastoma SH-SY5Y and Attention Deficit Hyperactivity Disorder: analysis of the methodological quality. I International Meeting of Pharmaceutical Sciences, IX Seminário Anual do PCF e I Seminário Anual do PROFAR. Maringá, 2018.

CHIERRITO, D.; VILLAS-BOAS, C. B.; TONIN, F. S.; GALENDE, S. B.; FERNANDEZ-LLIMOS, F.; SANCHES, A. C. C.; MELLO, J. C. P. Estudos experimentais *in vitro* e avaliação biológica de espécies vegetais: aspectos metodológicos. XII Simpósio Brasileiro de Farmacognosia e XVII Simpósio Latinoamericano de Farmacobotânica. Curitiba, 2019.

CHIERRITO, D.; VILLAS-BOAS, C. B.; TONIN, F. S.; FERNANDEZ-LLIMOS, F.; SANCHES, A. C. C.; MELLO, J. C. P. Main characteristics of cell culture models for Attention Deficit Hyperactivity Disorder. II International Meeting of Pharmaceutical Sciences e X Seminário Anual do PCF. Maringá, 2019.

CHIERRITO, D.; SILVA, T. P.; GANCEDO, N. C.; ARAÚJO, D. C. M.; MELLO, J. C. P. Avaliação do extrato bruto de *Limonium brasiliense* na viabilidade celular de células

neuroblastoma humano SH-SY5Y. 8º COSIMP - Congresso de Ciências Farmacêuticas do Mercosul, 8º Simpósio em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Mercosul, XII CISDEM - Fórum da Catedra Iberoamericana-Suiza de Desarrollo de Medicamentos e IV EPPGCF - Encontro de Pesquisa e Pósgraduação em Ciências Farmacêuticas. Cascavel, 2020.

Parte deste trabalho foi publicado no periódico *Current Neuropharmacology* (IF: 4.668):

CHIERRITO, D.; VILLAS-BOAS, C. B.; TONIN, F. S.; FERNANDEZ-LLIMOS, F.; SANCHES, A. C. C.; MELLO, J. C. P. Using cell cultures for the investigation of treatments for Attention Deficit Hyperactivity Disorder: a systematic review. *Current Neuropharmacology*, v. 17, p. 916-925, 2019.

A Deus,
À minha família pelo amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida, proteção e orientação diária. Agradeço todas as bênçãos concedidas e por colocar pessoas tão especiais em minha vida.

À toda minha família. Em especial, meus pais Rosimeire Chierrito de Oliveira e Arildo Paulino de Oliveira, pelo incentivo desde o meu primeiro ano de escola, pelas palavras sábias e por estarem ao meu lado em todas as decisões importantes de minha vida. Ao meu esposo Luiz Aurélio Domenes Tolentino, pelo amor, amizade e apoio de sempre. Obrigada por estar ao meu lado nos momentos de aprendizados, desafios e conquistas. Aos meus irmãos Lucas, Guilherme e Lívia, por iluminarem a minha vida e pelo amor e amizade entre nós. À minha avó Maria Mito de Andrade, por ser a minha segunda mãe e um exemplo para nós. Aos meus avós, por demonstrarem o significado da palavra família. Agradeço imensamente por vocês me ensinarem o que é amar e ser amada. Eu amo vocês!

Aos meus professores ao longo da minha caminhada. Em especial, ao meu orientador Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello, pela confiança e oportunidades desde a nossa primeira conversa. Obrigada por me receber em seu laboratório, por estar sempre disposto a ajudar e conversar sobre os desafios e imprevistos ao longo do caminho. À minha co-orientadora Profa. Dra. Andréia Cristina Conegero Sanches, pela parceria, colaboração e carinho desde a minha graduação. Obrigada por estar presente em mais esta etapa de minha vida, como profissional e amiga. Obrigada por vocês acompanharem o meu desenvolvimento profissional e pessoal nestes últimos anos.

Ao Prof. Dr. Fernando Fernandez-Llimos, Me. Camila Borges Villas-Boas e Dra. Fernanda Stumpf Tonin pela disponibilidade, parceria e colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

À Me. Naiara Cássia Gancedo, Thalita Prates da Silva, Dra. Daniela Cristina de Medeiros Araújo, Me. Mariana Nascimento de Paula, Me. Raquel Garcia Isolani, Me. Larissa Machado Valone, Me. Ana Carolina Guidi, Me. Taisa Ribeiro, Dra. Ana Luiza Sereia, Me. Thalita Zago, Maria Carolina do Valle, Dra. Danielle Bidóia e Prof. Dra. Catarina Satie Takahashi, pelas contribuições no laboratório de cultura de células e no desenvolvimento deste trabalho. Agradeço a ajuda, apoio e aprendizados durante esta caminhada.

À todos do laboratório Palafito, pela recepção, companheirismo, auxílio e troca de experiências diárias, profissionais e pessoais. Em especial, as pessoas que hoje posso chamar de amigos e que fazem parte de minha vida. Agradeço muito por ter encontrado vocês.

Aos meus amigos, pelos momentos especiais, de carinho, apoio e alegrias durante este período e ao longo de minha vida.

Aos membros da banca, pela disponibilidade e contribuições para melhoria deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá, pela oportunidade de realização deste trabalho. Em especial, agradeço a Francisca Helena Mesquita de Carvalho, por toda ajuda, disponibilidade e atenção em todas as etapas deste período.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), pelo suporte financeiro.

Agradeço a todos que, de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho e meu crescimento profissional e pessoal. Meu sincero muito obrigada!

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence os obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis”.

José de Alencar

BIOGRAFIA



Danielly Chierrito de Oliveira Tolentino nasceu no dia 29 de maio de 1991 em Goioerê/PR. Em 2010, iniciou o curso de Farmácia pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE). Durante a graduação, participou do Programa de Iniciação Científica e de outros projetos de ensino, pesquisa e extensão, formando-se em 2014. Em 2015, iniciou o curso de mestrado acadêmico no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pela mesma instituição, sob orientação da Profa. Dra. Andréia Cristina Conegero Sanches, concluindo-o em 2016. O projeto de pesquisa resultou na dissertação intitulada “Segurança e tolerabilidade do tratamento medicamentoso do Transtorno de Déficit da Atenção com Hiperatividade em adultos: revisão sistemática e meta-análise”. Atualmente, é doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Estadual de Maringá (UEM), sob orientação do Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello e co-orientação da Profa. Dra. Andréia Cristina Conegero Sanches. Participou de disciplinas, cursos, eventos nacionais e internacionais com apresentação de trabalhos, tendo resumos e artigos publicados nas revistas *Current Neuropharmacology*, *Journal of Attention Disorders*, *PloS One*, *Natural Products Research*, *International Clinical Psychopharmacology* e *Value in Health*.

CHIERRITO, D 2021. **Tratamento do Transtorno de Déficit da Atenção com Hiperatividade: revisão sistemática e cultura de células.** Tese de doutorado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá. 104p.

Os avanços na biologia básica e molecular promoveram o uso de cultura de células nas mais diversas áreas da saúde, incluindo a avaliação da eficácia, segurança e toxicidade de medicamentos. O objetivo deste estudo foi fornecer uma visão geral dos parâmetros metodológicos de cultura de células utilizadas para investigar opções terapêuticas para o Transtorno de Déficit da Atenção com Hiperatividade (TDAH), por meio de uma revisão sistemática (capítulo 1). Em seguida, avaliar a atividade do extrato bruto (EB), fração acetato de etila (FAE), fração aquosa (FAQ) e substâncias isoladas da espécie vegetal *Limonium brasiliense* em cultura de células neuroblastoma humano SH-SY5Y (capítulo 2). Na revisão sistemática, a busca foi realizada nas bases de dados eletrônicas PubMed/Medline, Scopus e DOAJ. Estudos experimentais *in vitro* que utilizaram cultura de células foram incluídos. O total de 328 estudos foi inicialmente identificado, do qual 83 foram incluídos para leitura na íntegra e 16 incluídos para síntese qualitativa. Sete estudos utilizaram células neuronais, neuroblastoma SH-SY5Y e linhagem celular PC12, e nove utilizaram células não neuronais. Todos os estudos descreveram as condições de cultura, mas a maioria foi inconsistente em relação ao reporte dos resultados. Sugerimos um fluxograma para orientar o planejamento e a execução de estudos experimentais *in vitro* e um *checklist* para ser preenchido pelos autores, para permitir o relato padronizado dos resultados. Estas ferramentas foram consideradas para o delineamento metodológico do capítulo 2, como na escolha da linhagem celular e condições de cultivo. A viabilidade celular, ensaio que pode ser realizado após definição do objetivo do estudo, foi realizado pelo método brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT). Nesta avaliação, a FAQ apresentou menor efeito na viabilidade celular (maior concentração citotóxica para 50% das células - CC₅₀) nas células SH-SY5Y em 24 e 48 h de exposição. Em relação as substâncias isoladas, a samarangenina A foi associada ao menor impacto na viabilidade celular, sendo considerada uma substância promissora para continuidade das investigações em células neuronais. Assim, esse estudo demonstra a aplicação de modelos *in vitro* de cultura de células para a investigação de potenciais tratamentos, como extratos de drogas vegetais. Além disso, nota-se a importância e aplicabilidade das evidências geradas no capítulo 1, que podem resultar em otimização de parâmetros laboratoriais, economia de tempo e recursos financeiros, além de aperfeiçoamento de recursos humanos.

Palavras-chave: células SH-SY5Y, aspecto metodológico, fluxograma, *checklist*, viabilidade celular

CHIERRITO, D 2021. **Treatment of Attention Deficit Hyperactivity Disorder: systematic review and cell culture.** Ph.D. Thesis, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá. 104p.

Advances in basic and molecular biology have promoted the use of cell cultures in a wide range of health areas, including the evaluation of drug efficacy, safety, and toxicity. The aim of this study was to provide a general overview of the methodological parameters of cell cultures used to investigate therapeutic options for Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD), through a systematic review (chapter 1). Then, this study evaluated the activity of crude extract (CE), ethyl acetate fraction (EAF), aqueous fraction (AF), and isolated substances from *Limonium brasiliense* in SH-SY5Y human neuroblastoma cells (chapter 2). In the systematic review, the search was performed in the electronic databases PubMed/Medline, Scopus, and DOAJ. *In vitro* experimental studies using cell cultures were included. A total of 328 studies were initially identified, of which 83 were included for full-text reading and 16 were included for qualitative synthesis. Seven studies used neuronal cells, SH-SY5Y neuroblastoma and PC12 cell lines, and nine used non-neuronal cells. All the studies described the culture conditions, but most studies were inconsistent about reporting results. We suggested a flowchart to guide the planning and execution of *in vitro* studies, and a checklist to be completed by authors to allow the standardized reporting of results. These tools were considered for the methodological design of chapter 2, as in the choice of cell line and culture conditions. Cell viability, the test that can be performed after defining the purpose of the study, was performed by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) method. In this evaluation, the AF showed less effect on cell viability (higher cytotoxic concentration for 50% of cells - CC_{50}) in the SH-SY5Y cells in 24 and 48h of exposure. Regarding isolated substances, samarangenin A was associated with less impact on cell viability, being considered a promising substance for further investigations on neuronal cells. Thus, this study demonstrates the application of *in vitro* cell culture models for an investigation of potential treatments, such as extracts of plant drugs. Also, the importance and applicability of the evidence generated in chapter 1 is noted, which can result in optimization of laboratory parameters, saving in time and financial resources, in addition to improving human resources.

Keywords: SH-SY5Y cells, methodological aspect, flowchart, checklist, cell viability

LISTA DE FIGURAS

| Figura | | Página |
|---------------|--|---------------|
| 1 | Modelo de prática baseada em evidências | 29 |
| 2 | Pirâmide de evidências | 30 |
| 3 | Sugestão de nova pirâmide de evidências | 31 |
| 4 | Pergunta elaborada de acordo com o acrônimo PICOS | 32 |
| 5 | Operadores booleanos AND, OR e NOT | 34 |
| 6 | Fluxograma do processo de seleção dos artigos | 35 |
| 7 | <i>Limonium brasiliense</i> (Boiss.) Kuntze (Plumbaginaceae) | 38 |

LISTA DE TABELAS

| Tabela | | Página |
|---------------|---|---------------|
| 1 | Opções terapêuticas para o tratamento do TDAH | 26 |
| 2 | Principais diferenças entre revisão narrativa e sistemática | 37 |

LISTA DE QUADRO

| Quadro | | Página |
|---------------|---|---------------|
| 1 | Estratégia de busca com descritores no PubMed/Medline | 33 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|------------------|--|
| ABDA | Associação Brasileira do Déficit de Atenção |
| ABTS | 2,2´azino-bis-3-etilbenzotiazolin 6-ácido sulfônico |
| ATP | Adenosina trifosfato |
| BVS | Biblioteca Virtual em Saúde |
| CC ₅₀ | Concentração citotóxica para 50% da população em estudo |
| CHO | Células de ovário de hamster chinês |
| CI ₅₀ | Concentração necessária para inibir 50% da população em estudo |
| CONITEC | Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS |
| DeCS | Descritores em Ciências da Saúde |
| DL ₅₀ | Dose letal para 50% da população em estudo |
| DPPH | 2,2-difenil-1-picril-hidrazil |
| EB | Extrato bruto |
| FAE | Fração acetato de etila |
| FAQ | Fração aquosa |
| FRAP | Determinação do poder antioxidante de redução do ferro |
| GWAS | Estudos de associação genômica ampla |
| HEK-293 | Linhagem celular embrionária renal humana |
| HEK293rtTA | Linhagem celular embrionária renal humana com expressão do transativador de tetraciclina |
| HL | Linfócitos humanos |
| JAR | Linhagem celular de coriocarcinoma placentário humano |
| L929sA | Linhagem celular de fibrossarcoma de rato |
| LCL | Linhagem celular linfoblastoides |
| LDH | Lactato desidrogenase |
| MDCK | Linhagem celular renal canina Madin-Darby |
| MTT | 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| PALAFITO | Laboratório de Biologia Farmacêutica da Universidade Estadual de Maringá |
| PBMC | Células mononucleares de sangue periférico |
| PC12 | Linhagem celular de feocromocitoma de rato |
| PCDT | Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas |
| SUS | Sistema Único de Saúde |

| | |
|----------|--|
| TDAH | Transtorno de Déficit da Atenção com Hiperatividade |
| TsA201 | Linhagem celular derivada de células embrionárias renais humanas |
| UEM | Universidade Estadual de Maringá |
| UFPR | Universidade Federal do Paraná |
| UNIOESTE | Universidade Estadual do Oeste do Paraná |

LIST OF ABBREVIATIONS AND ACRONYMS

| | |
|------------------|---|
| ADHD | Attention Deficit Hyperactivity Disorder |
| AF | Aqueous fraction |
| APA | American Psychological Association |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| CADDRA | Canadian ADHD Resource Alliance |
| CC ₅₀ | Cytotoxic concentration for 50% of cells |
| CE | Crude extract |
| DOAJ | Directory of Open Access Journals |
| DSM | Diagnostic Statistical Manual of Mental Disorders |
| EAF | Ethyl acetate fraction |
| Emtree | Embase subject headings |
| GCCP | Guidance on Good Cell Culture Practice |
| MeSH | Medical Subject Heading |
| MIQE | Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments |
| MTT | 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide |
| NCBI | National Center for Biotechnology Information |
| NICE | National Institute for Health and Care Excellence |
| PRISMA | Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses |
| PROSPERO | International Prospective Register of Systematic Reviews |
| SYRCLE's | SYstematic Review Center for Laboratory Animal Experimentation tool |

LISTA DE SÍMBOLOS

| | |
|-----------------|--------------------------|
| % | Porcentagem |
| ° | Grau |
| ' | Minuto |
| " | Segundo |
| °C | Grau Celsius |
| cm ² | Centímetro quadrado |
| g/kg | Grama por quilograma |
| h | Horas |
| µg/mL | Micrograma por mililitro |
| µL/mL | Microlitro por mililitro |
| µM | Micromolar |
| mg/mL | Miligramma por mililitro |
| mL | Mililitro |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 22 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA | 24 |
| 2.1 TRANSTORNO DE DÉFICIT DA ATENÇÃO COM HIPERATIVIDADE | 24 |
| 2.2 SAÚDE BASEADA EM EVIDÊNCIAS | 28 |
| 2.2.1 Revisão sistemática..... | 31 |
| 2.3 ASPECTOS GERAIS DA ESPÉCIE VEGETAL AVALIADA..... | 37 |
| 3 OBJETIVO | 41 |
| 3.1 OBJETIVO GERAL..... | 41 |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 41 |
| 4 CAPÍTULO 1 - USO DE CULTURA DE CÉLULAS PARA INVESTIGAÇÃO DE TRATAMENTOS PARA O TRANSTORNO DE DÉFICIT DA ATENÇÃO COM HIPERATIVIDADE: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA..... | 42 |
| 5 CAPÍTULO 2 - IMPACTO DA ESPÉCIE VEGETAL <i>Limonium brasiliense</i> NA VIABILIDADE DE CÉLULAS NEUROBLASTOMA HUMANO SH-SY5Y..... | 77 |
| 6 DISCUSSÃO GERAL | 88 |
| 7 CONCLUSÃO GERAL | 92 |
| ANEXO A - <i>Checklist</i> PRISMA..... | 93 |
| APÊNDICE A - <i>Checklist</i> para condução e relato de estudos experimentais <i>in vitro</i> ... | 95 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 96 |

1 INTRODUÇÃO

O Transtorno de Déficit da Atenção com Hiperatividade (TDAH) é um distúrbio neurológico caracterizado por sintomas de desatenção, desorganização, hiperatividade e/ou impulsividade que interferem no desenvolvimento do indivíduo, por pelo menos seis meses (APA, 2013; OMS, 2018). Estima-se que sua prevalência seja de 3,4% a 15,5% em crianças e adolescentes (POLANCZYK et al., 2015; THOMAS et al., 2015; WOLRAICH et al., 2019), e de aproximadamente 2,5% em adultos (SIMON et al., 2009).

Em relação ao tratamento, as opções terapêuticas disponíveis incluem psicoestimulantes (metilfenidato e lisdexanfetamina) como primeira linha de tratamento, agentes noradrenérgicos (atomoxetina), antidepressivos (imipramina, nortriptilina, bupropiona), alfa-agonistas (clonidina) e outros, como modafinila. A escolha da opção mais adequada deve ser baseada em informações relacionadas às manifestações clínicas, comorbidades, histórico do indivíduo diagnosticado e aspectos do medicamento. Além disso, intervenções comportamentais, psicológicas e sociais são recomendadas para auxiliar no controle e/ou melhora dos sintomas, de forma individual ou associada (THAPAR; COOPER, 2016; ABDA, 2017; WOLRAICH et al., 2019).

O uso de cultura de células tem sido destaque em pesquisas de novos tratamentos para o TDAH, como investigação da segurança e toxicidade das opções terapêuticas já disponíveis (SCHMIDT et al., 2010a; SCHMIDT et al., 2010b; KNORLE, 2012; FEIO-AZEVEDO et al., 2017). Esta metodologia permite o uso de linhagens celulares imortalizadas e proliferativas para a avaliação de mecanismos moleculares e processos fisiológicos, como a regulação, sinalização e interação celular (BARBOSA et al., 2015; ARORA, 2016).

Para o estudo desse transtorno, as linhagens celulares mais relatadas na literatura como modelos de pesquisa incluem células neuronais, como as de neuroblastoma humano SH-SY5Y (FEIO-AZEVEDO et al., 2017) e de feocromocitoma de rato (PC12) (BARTL; WALITZA; GRUNBLATT, 2014), além de células não neuronais, como as embrionárias renais humanas (HEK293rtTA, HEK-293, TsA201) (CRAENENBROECK et al., 2006; WAKAMATSU et al., 2009; LUDOLPH et al., 2010), linfóides e linfoblastoides (HL, LCL) (SUTER; MARTUS; ELHAJOUJI, 2006; SCHWARZ et al., 2014), mononucleares do sangue periférico (PBMC) (KITTEL-SCHNEIDER et al., 2016), de coriocarcinoma placentário humano (JAR) (KNORLE, 2012), fibrossarcoma de rato (L929sA) (CRAENENBROECK et al., 2006), ovarianas de hamster (CHO) (ZHAO et al., 2007), e renais caninas Madin-Darby (MDCK) (SALVIANO et al., 2015).

O desenvolvimento de pesquisas laboratoriais com culturas de células requer o conhecimento de informações relacionadas à escolha da linhagem celular, como condições de cultura e opções de metodologias aplicáveis para cada tipo de célula, e ao objetivo de

estudo. Essa busca permite delinear metodologicamente pesquisas *in vitro* em desenvolvimento e futuras, e estabelecer práticas e protocolos laboratoriais com parâmetros padronizados, para que seja possível alcançar resultados reprodutíveis e confiáveis (COECKE et al., 2005).

Neste contexto, um tipo de estudo que pode ser delineado é a revisão sistemática, estudo retrospectivo secundário que avalia estudos primários, transformando informações isoladas em conhecimento fundamentado. Assim, esse tipo de estudo permite reunir todas as informações de interesse, de forma reprodutível e imparcial, sendo considerado o nível mais alto de evidência científica (BRASIL, 2014).

Desta forma, este estudo foi dividido em dois capítulos. O primeiro refere-se a uma visão geral dos aspectos metodológicos do uso de culturas de células na investigação de possíveis opções terapêuticas para o tratamento do TDAH, por meio de uma revisão sistemática. O segundo capítulo foi desenvolvido de acordo com as recomendações do capítulo 1, sendo a linhagem celular neuroblastoma SH-SY5Y escolhida como modelo *in vitro* para avaliação dos efeitos sobre a viabilidade celular após tratamento com o extrato bruto (EB), fração acetato de etila (FAE), fração aquosa (FAQ) e substâncias isoladas da FAE de *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 TRANSTORNO DE DÉFICIT DA ATENÇÃO COM HIPERATIVIDADE

O Transtorno de Déficit da Atenção com Hiperatividade (TDAH) é definido como um quadro persistente, de no mínimo seis meses, de desatenção e/ou hiperatividade/impulsividade que compromete o desenvolvimento do indivíduo em mais de um ambiente, como lar, escola, trabalho e cenários relacionados a outras atividades (APA, 2013; OMS, 2018). Estudos revelam que sua prevalência diminuiu conforme o aumento da idade do indivíduo diagnosticado, sendo estimada em torno de 3,4% a 15,5% em crianças e adolescentes (POLANCZYK et al., 2015; THOMAS et al., 2015; WOLRAICH et al., 2019) e em torno de 2,5% em adultos (SIMON et al., 2009).

O desenvolvimento do TDAH envolve fatores ambientais, genéticos e neurobiológicos, por isso é considerado multifatorial. O início deste transtorno pode ser desencadeado por predisposição genética ou exposição pré-natal a substâncias e/ou medicamentos específicos, como tabaco, álcool, pesticidas organofosforados, organoclorados, zinco e chumbo (FARAONE et al., 2015). Em relação a herdabilidade, aproximadamente 40% dos casos podem ser associados a variantes genéticas comuns (FARAONE et al., 2015). Uma meta-análise de estudos de associação genômica ampla (GWAS), envolvendo 55.374 indivíduos de 12 estudos de coorte, relatou 12 loci de risco de variantes significantes, localizados principalmente em ou próximos a genes relacionados aos processos de neurodesenvolvimento, como FOXP2, SORCS3 e DUSP6 (DEMONTIS et al., 2019). Outros estudos sugerem que variantes funcionais dos genes KCNJ6, LPHN3, PIK3CG, SLC6A1 e STX1A também estão associados ao TDAH, os quais influenciam processos executivos e relacionados à recompensa (YUAN et al., 2017; GU et al., 2018; HUANG et al., 2019; WANG et al., 2019; ZIEGLER et al., 2019). Estudos de neuroimagem indicam alterações estruturais e funcionais nas regiões corticais do cérebro de indivíduos diagnosticados com TDAH, principalmente em sistemas relacionados a atenção, memória, tomada de decisões e planejamento estratégico (córtex pré-frontal). Essas alterações estão associadas a uma disfunção da neurotransmissão de catecolaminas, relacionada ao controle executivo, funções motoras e processo de recompensa (BARKLEY; GRODZINSKY; DUPAUL, 1992; CORTESE et al., 2012; APA, 2013; FURUKAWA et al., 2014; FARAONE et al. 2015).

Conforme as manifestações clínicas do paciente, o TDAH é classificado em três subtipos. O mais prevalente (56% a 62%) é o subtipo combinado, quando o paciente apresenta sintomas de desatenção e hiperatividade/impulsividade, seguido do subtipo inatento (31% a 37%), quando o paciente apresenta comportamentos predominantes de desatenção, e o subtipo hiperativo/impulsivo (2% a 7%), caracterizado por comportamentos

predominantes de hiperatividade/impulsividade (MILLSTEIN et al., 1997; WILENS et al., 2009). A desatenção está relacionada a distração, falta de organização e planejamento em atividades que não requerem alto nível de estimulação cerebral. A hiperatividade está relacionada a dificuldade do controle comportamental, uma vez que o indivíduo apresenta atividade motora excessiva. Por sua vez, a impulsividade está relacionada a falta de análise dos riscos e consequências de ações realizadas, sendo que o indivíduo tende a responder a estímulos de forma imediata (OMS, 2018). Geralmente, a hiperatividade e a impulsividade são menos evidentes em indivíduos adultos, uma vez que estes sintomas tendem a diminuir durante a infância e adolescência (BIEDERMAN; MICK; FARAONE, 2000; ABDA, 2017).

Esses comportamentos devem ser avaliados de forma detalhada, uma vez que o diagnóstico do TDAH é essencialmente clínico. É importante identificar o início precoce das manifestações clínicas, presença dos sintomas em diferentes ambientes, nível de comprometimento funcional, interferência em atividades do âmbito familiar, profissional e social, presença de comorbidades associadas e histórico familiar. Assim, é importante que o paciente não seja a única fonte de informação (MATTOS et al., 2006; FARAONE et al. 2015; WOLRAICH et al., 2019). Este processo pode ser auxiliado por ferramentas que definem critérios gerais e específicos de diagnóstico, como o “*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*” (DSM), 5ª edição, da Associação Americana de Psiquiatria (APA, 2013) e a “Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde”, 11ª revisão, da Organização Mundial da Saúde (OMS) (OMS, 2018).

No Brasil, em novembro de 2019, a Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias (CONITEC) no Sistema Único de Saúde (SUS) publicou a Enquete nº 20/2019 sobre a proposta de escopo do Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas (PCDT) para TDAH. O objetivo deste documento é otimizar a abordagem clínica, com informações de classificação, diagnóstico, tratamento e monitorização deste transtorno. Além disso, estruturar este serviço de atendimento no âmbito SUS, baseado em evidências científicas disponíveis (CONITEC, 2019).

Em relação ao tratamento do TDAH, este pode ser multimodal, composto por intervenções sociais, psicológicas, comportamentais e farmacológicas, associadas ou de forma individual. As abordagens não farmacológicas são recomendadas para o controle e/ou melhora dos sintomas e aumento da adesão do paciente ao tratamento, como treinamento cognitivo e *neurofeedback*, psicoterapia e psicoeducação individual e familiar (ABDA, 2017; BUSSALB et al., 2019).

De acordo com a Associação Brasileira do Déficit de Atenção (ABDA), os medicamentos disponíveis estão expostos na Tabela 1. Os psicoestimulantes, como o cloridrato de metilfenidato (de ação curta e prolongada), e lisdexanfetamina, são considerados

opções de primeira escolha. Em casos de efeitos indesejáveis ou contra-indicação, outros medicamentos podem ser considerados, como a atomoxetina, primeiro não estimulante cerebral aprovado para o tratamento do TDAH em crianças maiores de seis anos, adolescentes e adultos. Ainda, outras opções são os antidepressivos (imipramina, nortriptilina e bupropiona), alfa-agonista (clonidina) e modafinila. Estudos conduzidos para avaliar o impacto clínico destes medicamentos relatam melhora dos sintomas característicos do transtorno, como atenção, concentração, memória e função cognitiva (BOLEA-ALAMAÑAC et al., 2014; THAPAR; COOPER, 2016; ABDA, 2017).

Tabela 1- Opções terapêuticas para o tratamento do TDAH

| Nome | Nome comercial | Mecanismo de ação |
|------------------------------------|---------------------------|---|
| Metilfenidato (ação curta) | Ritalina® | Inibição da recaptação de dopamina e noradrenalina |
| Metilfenidato (ação prolongada) | Concerta® Ritalina LA® | |
| Lisdexanfetamina | Venvanse® | |
| Atomoxetina | Strattera® | Inibição seletiva da recaptação de noradrenalina |
| Imipramina | Tofranil® | Inibição seletiva da recaptação de noradrenalina e serotonina (antidepressivos tricíclicos) |
| Nortriptilina | Pamelor® | |
| Bupropiona | Wellbutrin SR® | Inibição seletiva da recaptação de dopamina |
| Clonidina | Atensina® | Anti-hipertensivo agonista alfa-2 |
| Modafinila | Stavigile® | Atividade neuronal e aumento da histamina |

Fonte: Adaptado de ABDA (2017).

Diretrizes e documentos oficiais orientam a escolha da melhor opção terapêutica, sendo importante o clínico se basear em evidências robustas e de qualidade, tanto em relação aos aspectos intrínsecos ao medicamento como em relação às manifestações clínicas do paciente, contraindicações e comorbidades associadas. Além disso, nota-se a importância da atuação de uma equipe multidisciplinar para acompanhar o paciente e realizar avaliação detalhada e completa durante o tratamento (CADDRA, 2018; NICE, 2018; WOLRAICH et al., 2019).

Em geral, um terço dos pacientes em uso de psicoestimulantes relatam eventos adversos, como aumento da pressão arterial sistêmica, desregulação de sono e do humor, quadros de irritação ou sentir-se deprimido, efeito “*zombie like*”, dores abdominais e de cabeça, entre outros (BIEDERMAN; SPENCER; WILENS, 2004; SARRIS et al., 2011; LEVY; DADDS, 2014).

Neste contexto, estudos têm sido realizados para avaliar possíveis alternativas para o tratamento do TDAH, como as drogas vegetais, as quais têm sido a base de medicamentos tradicionais em todo o mundo, devido a presença de substâncias biologicamente ativas (SALEHI et al., 2010; KO et al., 2014; ANHEYER et al., 2017). Ensaio clínico randomizado avaliaram os efeitos de extratos de espécies vegetais comparados ao metilfenidato ou placebo (AKHONDZADEH et al., 2005; TREBATICK et al., 2006; SALEHI et al., 2010; KO et al., 2014). Pacientes tratados com extrato de *Passiflora incarnata* L. (n=34) por oito semanas, relataram menor incidência de eventos adversos, como ansiedade, diminuição de apetite e irritabilidade quando comparados a pacientes tratados com metilfenidato. Os dois tratamentos demonstraram melhora clínica significativa (AKHONDZADEH et al. 2005). Outro estudo relatou menos eventos adversos (dor de cabeça, diminuição de apetite e insônia) em crianças diagnosticadas com TDAH (n=50) tratadas com cápsulas de extrato de *Ginkgo biloba* L., quando comparadas ao grupo tratado com metilfenidato (SALEHI et al., 2010). Resultados de melhora estatisticamente significativa dos sintomas de desatenção, hiperatividade/impulsividade foram observados em crianças diagnosticadas com TDAH tratadas com extrato de *Panax ginseng* C.A. Mey. (n=37), comparadas ao grupo tratado com placebo (n=32) (KO et al., 2014). Com o objetivo de controle/melhora dos sintomas desencadeados por este transtorno, uma opção considerada como complementar foi o uso do extrato de *Pine bark* (*Pinus pinaster* Aiton.) (TREBATICK et al., 2006). Revisão sistemática de nove ensaios clínicos randomizados avaliaram o tratamento com formulações com *G. biloba*, *Hypericum perforatum* L., *Melissa officinalis* L., Óleo de *Prímula*, *P. incarnata*, casca de *Pinus* e *Valeriana officinalis* L. comparado ao metilfenidato ou placebo. A população dos estudos foram crianças e adolescentes diagnosticadas com TDAH (n=464). Em relação a eficácia, apenas os tratamentos com *M. officinalis* e *V. officinalis* demonstraram melhora nos testes cognitivos e psicomotores. Desta forma, nenhuma recomendação foi sugerida pelos autores, uma vez que a maioria dos resultados não foram estatisticamente significativos (ANHEYER et al., 2017).

Assim, o potencial dos produtos naturais para o tratamento do TDAH, torna os metabólitos secundários de plantas, como os polifenóis, por exemplo, de interesse para a pesquisa de novos fármacos, uma vez que podem ter ação neuroprotetora, neuromoduladora e anti-neuroinflamatória, atuando em vias de sinalização de processos cognitivos (SPENCER,

2005; ANGELONI et al., 2014; TREBATICKÁ; DURACKOVÁ, 2015). O efeito neuroprotetor pode estar relacionado à melhora do fluxo sanguíneo cerebral através da inibição da agregação plaquetária e estimulação da formação de óxido nítrico no endotélio (SCHAFFER; HALLIWELL, 2012; TREBATICKÁ; DURACKOVÁ, 2015).

O Laboratório de Biologia Farmacêutica (PALAFITO) da Universidade Estadual de Maringá (UEM) conduz estudos com extratos e frações de espécies vegetais, os quais são produzidos e caracterizados química/biologicamente. Para investigação de possíveis atividades biológicas, testes *in vitro* em cultura de células podem ser utilizados, como modelos experimentais complementares ao modelo animal. Esta metodologia possibilita o estudo de mecanismos moleculares das células e processos fisiológicos, como regulação, sinalização e interação celular (BARBOSA et al., 2015; ARORA, 2016). De acordo com o objetivo de interesse, os aspectos metodológicos devem ser definidos e padronizados, como a escolha da linhagem celular, composição do meio de cultura e condições de cultivo celular, para que seja possível desenvolver um protocolo laboratorial e direcionar a pesquisa (XICOY; WIERINGA; MARTENS, 2017).

Assim, neste estudo foi realizada uma revisão sistemática para fornecer uma visão geral dos aspectos do uso de culturas de células na investigação de possíveis opções terapêuticas para o TDAH. Além disso, baseado nas evidências geradas foi estabelecido protocolo laboratorial para avaliação dos efeitos do extrato bruto (EB), frações acetato de etila (FAE) e aquosa (FAQ) e, substâncias isoladas dos rizomas de *L. brasiliense* sobre a viabilidade de células neuroblastoma SH-SY5Y.

2.2 SAÚDE BASEADA EM EVIDÊNCIAS

A Saúde Baseada em Evidências envolve tomada de decisões baseadas nas melhores evidências científicas, representando um elo entre o manejo clínico do paciente e a ciência. Assim, está relacionada com a redução da incerteza, a partir da análise e síntese crítica de informações e, com isso, melhora da qualidade de serviços e assistência à saúde (ATALLAH, CASTRO; 1998; AKOBENG, 2005; GUAUDARD, 2008).

Esta prática é considerada transdisciplinar, a qual associa a identificação da melhor evidência disponível com conhecimento técnico, experiência profissional, características, necessidades e valores do paciente, e fatores ambientais e organizacionais, conforme demonstrado na Figura 1 (AKOBENG, 2005; SATTERFIELD et al., 2009). Sua aplicação é importante tanto na prática clínica, como na elaboração e gestão de políticas públicas, diretrizes e protocolos clínicos e laboratoriais (BRASIL, 2014; BRASIL, 2016).

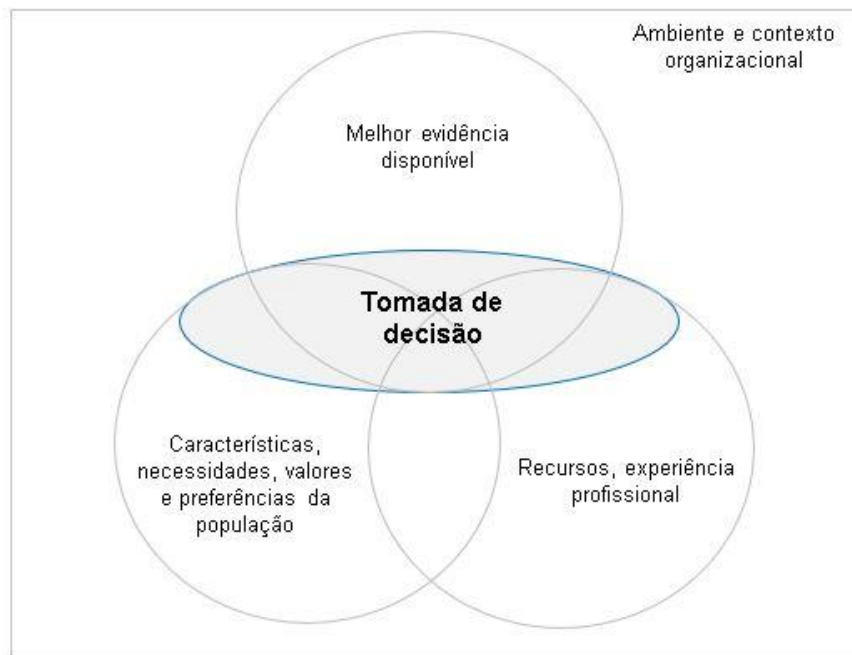


Figura 1. Modelo de prática baseada em evidências. **Fonte:** adaptado de Satterfield et al. (2009).

Neste contexto, as evidências científicas são classificadas em níveis hierárquicos, de acordo com a credibilidade (qualidade) das informações. A base da pirâmide é constituída por estudos primários de menor qualidade, como opinião de especialistas, relatos e séries de caso, e de estudos primários mais robustos, como coortes e ensaios clínicos randomizados. Por sua vez, o topo da pirâmide é formado por estudos secundários, considerados fontes de informações de maior qualidade, sendo o nível mais alto, os estudos de revisão sistemática com ou sem meta-análise (Figura 2) (HIGGINS; GREEN, 2020).

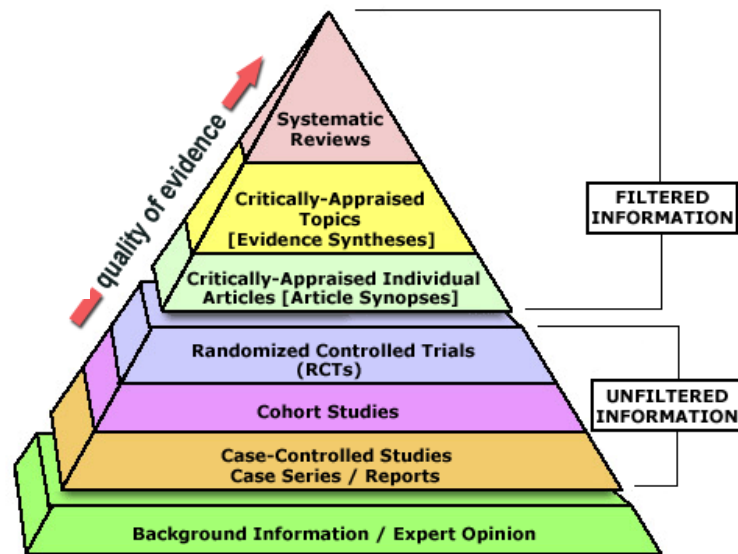


Figura 2. Pirâmide de evidências. Estudos com localização superior indicam maior qualidade da evidência. **Fonte:** Adaptado de Trustees of Dartmouth College and Yale University (2006).

Pesquisadores discutem esta percepção e sugerem um novo modelo de pirâmide de evidências, que dispõe o topo da pirâmide anterior como ferramenta de avaliação, síntese e aplicação de evidências dos estudos primários. Além disso, modificaram as linhas que separam os desenhos de estudo, de retas para onduladas, para representar a transitividade entre eles, conforme qualidade metodológica e das evidências geradas (Figura 3) (MURAD et al., 2016).

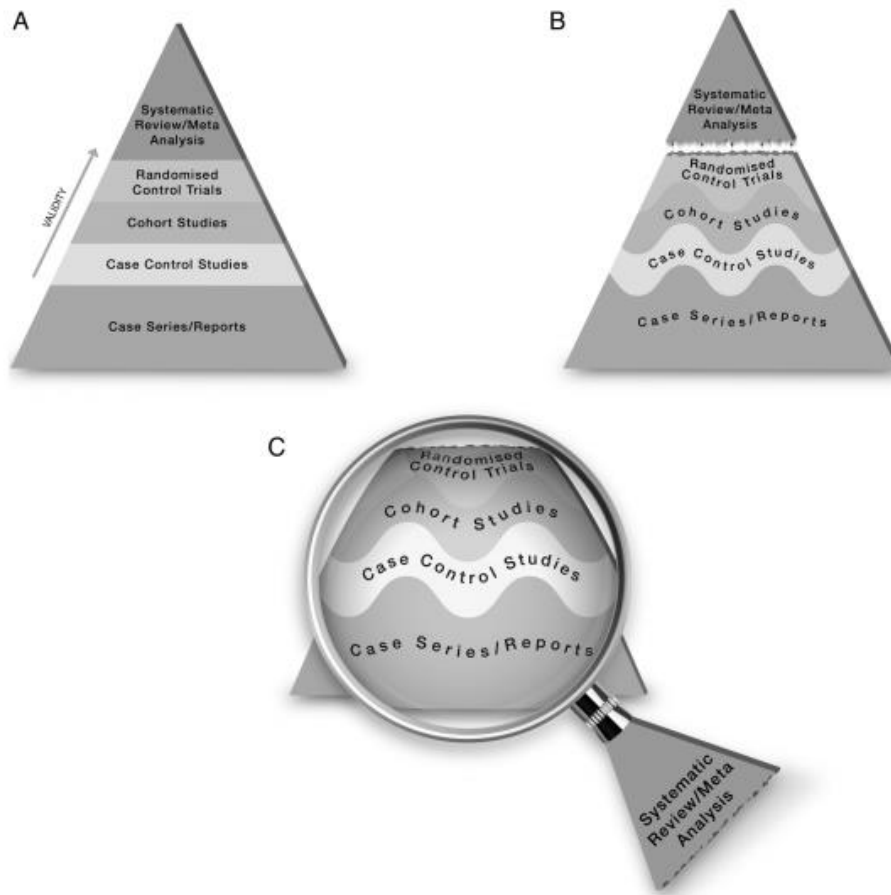


Figura 3. Sugestão de nova pirâmide de evidências. (A) Pirâmide tradicional; (B) Proposta de nova pirâmide; (C) Pirâmide revisada. Revisões sistemáticas são lentes que permitem a visão da evidência.

Fonte: Murad et al., 2016.

2.2.1 Revisão sistemática

A revisão sistemática é um tipo de estudo retrospectivo secundário, que resulta na síntese de evidências disponíveis na literatura com o intuito de responder uma pergunta de pesquisa. Assim, é possível mapear todas as informações do assunto de interesse, agrupá-las e analisá-las, facilitando o acesso e interpretação pelos profissionais (ATALLAH; CASTRO, 1998; GUAUDARD, 2008; BRASIL, 2014; HIGGINS; GREEN, 2020).

A Colaboração Cochrane é uma organização internacional que permite o acesso às revisões sistemáticas, criada em 1993 no Reino Unido e em 1996 no Brasil, na Universidade Federal de São Paulo. O Centro Cochrane Brasil tem como missão “elaborar, manter e divulgar revisões sistemáticas de ensaios clínicos randomizados, o melhor nível de evidência para as decisões em saúde” (HIGGINS; GREEN, 2020; COCHRANE, 2021). Esta colaboração define os critérios metodológicos sistematizados que devem ser considerados para o desenvolvimento deste tipo de estudo, os quais são agrupados nos seguintes passos (HIGGINS; GREEN, 2020):

- (1) Formulação da pergunta de pesquisa e definição dos critérios de elegibilidade (inclusão e exclusão) dos estudos;
- (2) Busca e seleção dos estudos;
- (3) Extração de dados;
- (4) Avaliação da qualidade e risco de viés dos estudos incluídos;
- (5) Análise e apresentação dos dados;
- (6) Interpretação dos dados;
- (7) Aprimoramento e atualização da revisão.

No primeiro passo, a pergunta de pesquisa deve ser elaborada de acordo com o acrônimo PICOS, com definição da População que será avaliada, Intervenção (tipo de tratamento), Comparador ou Controle (tipo de tratamento/placebo), *Outcomes* (desfechos de interesse) e *Study design* (desenho do estudo), conforme exemplificado na Figura 4 (HIGGINS; GREEN, 2020).

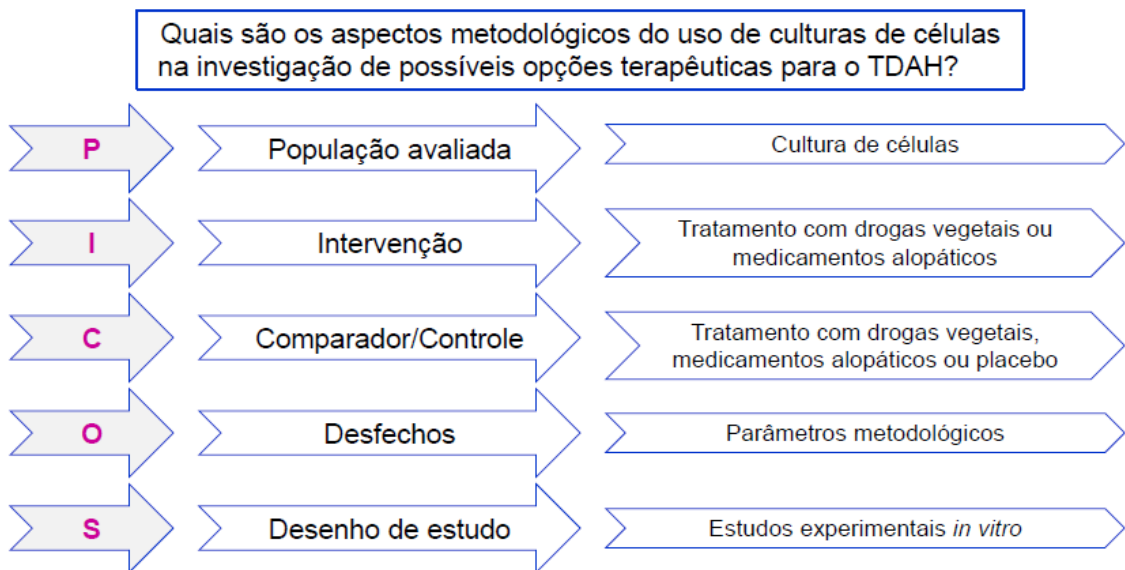


Figura 4. Pergunta elaborada de acordo com o acrônimo PICOS. **Fonte:** baseado em Chierrito et al. (2019).

Após estruturar a pergunta, devem ser definidos, com clareza, os critérios de elegibilidade (inclusão e exclusão) (HIGGINS; GREEN, 2020). De acordo com o exemplo da Figura 4, pode-se definir que serão incluídos estudos experimentais *in vitro* que utilizaram cultura de células para investigação de possíveis opções terapêuticas para o tratamento do TDAH, como drogas vegetais e medicamentos alopáticos, comparados ou não ao grupo controle. Os estudos que não atenderem a estes critérios serão excluídos, como estudos *in vivo* ou que investigaram opções terapêuticas para outra patologia (CHIERRITO et al., 2019).

A busca sistemática na literatura deve ser realizada em mais de uma base de dados eletrônica, pois estas possuem abrangência de literatura científica diferente, como por exemplo: Medline via PubMed, um serviço da biblioteca nacional de medicina dos Estados Unidos, desenvolvida pela *National Center for Biotechnology Information* (NCBI); Embase, que recupera principalmente publicações da literatura europeia; Lilacs, recupera principalmente publicações da América Latina e Caribe e pode ser acessada via Portal Regional da Biblioteca Virtual em Saúde (BVS). Além disso, sugere-se que seja realizada a busca manual, por meio de referências bibliográficas dos estudos de interesse, revistas não indexadas, bancos de teses, anais e resumos de eventos, assim como solicitar estudos de interesse para autores ou especialistas da área (BRASIL, 2014; HIGGINS; GREEN, 2020).

Nesta etapa, devem ser elaboradas estratégias de busca, com termos livres (sinônimos, siglas, termos relacionados ao tema) e descritores, termos ou palavras-chaves que a base de dados utiliza para indexar o artigo, como exemplificado no Quadro 1. Nas bases Medline, Embase e Lilacs, os descritores são denominados *Medical Subject Heading* (MeSH), *Embase subject headings* (Emtree) e Descritores em Ciências da Saúde (DeCS), respectivamente (BRASIL, 2014).

Quadro 1- Estratégia de busca com descritores no PubMed/Medline

| | |
|-----------------------|---|
| PubMed/Medline | <p>#1: (“attention deficit hyperactivity with disorder”[MH] OR “attention deficit hyperactivity with disorder”[TW] OR “attention deficit hyperactivity disorder”[TW] OR “attention deficit-hyperactivity disorder”[TW] OR “attention deficit disorder”[TW] OR “adhd”[TW])</p> <p>#2: (“cell line”[ALL] OR “cell culture”[TIAB] OR “Cells, Cultured”[MH] OR “cell model”[TIAB] OR “neuronal cell” OR “ADHD model” OR “neuroblastoma”[ALL] OR “Cell Survival”[MH] OR “Neural Stem Cells”[MH])</p> <p>#3: (#1 AND #2)</p> |
|-----------------------|---|

[ALL]: all fields; [MH]: MeSH terms, [TIAB]: title/abstract; [TW]: text word. **Fonte:** Chierrito et al. (2019).

No mecanismo de busca, os operadores booleanos ou operadores de pesquisa permitem que os termos sejam combinados de diferentes formas, conforme representado na Figura 5. O operador “AND” representa a intersecção dos termos, o “OR” a união e o “NOT” a exclusão. Esta etapa é essencial para a condução da revisão sistemática, uma vez que deve garantir que toda literatura disponível de interesse seja recuperada (BRASIL, 2014).

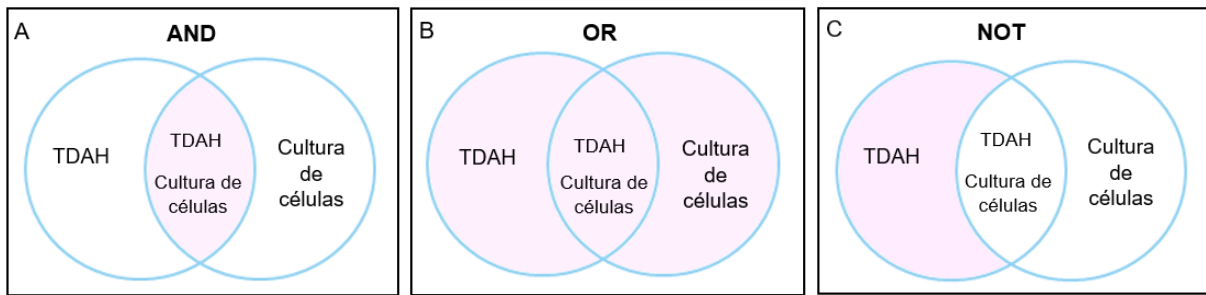


Figura 5. Operadores booleanos AND, OR e NOT. (A) Representa a intersecção dos termos. (B) Representa a união dos termos. (C) Representa a exclusão dos termos. TDAH: Transtorno de Déficit da Atenção com Hiperatividade. **Fonte:** adaptado de Brasil (2014).

Após realizada a busca sistemática nas bases de dados e a busca manual, os estudos recuperados podem ser gerenciados por *softwares*, como EndNote® e Mendeley®, para facilitar o processo de seleção dos estudos (triagem e elegibilidade). Todo esse processo deve ser demonstrado em fluxograma, como exemplificado na Figura 6, de acordo com o *checklist Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA)* (Anexo A). Este documento é composto por itens que podem ser reportados e identificados no desenvolvimento e escrita de uma revisão sistemática, permitindo que os autores verifiquem se realizaram todas as etapas recomendadas (LIBERATI et al., 2009).

A etapa de identificação envolve todos os estudos recuperados por meio da busca nas bases de dados eletrônicas e da busca manual. Deste total, devem ser excluídos os estudos duplicados (recuperados por mais de uma base de dados), resultando no total de estudos selecionados para etapa de triagem. Nessa etapa, é realizada a leitura dos títulos e resumos para selecionar os estudos que atendem ou não aos critérios de inclusão, previamente definidos. Os estudos incluídos para próxima etapa (elegibilidade) são selecionados a partir da leitura na íntegra, sendo excluídos os estudos que não atendem um ou mais critérios de inclusão. No final do processo, os estudos incluídos (elegíveis) são considerados para as próximas etapas da revisão sistemática (BRASIL, 2014; HIGGINS; GREEN, 2020).

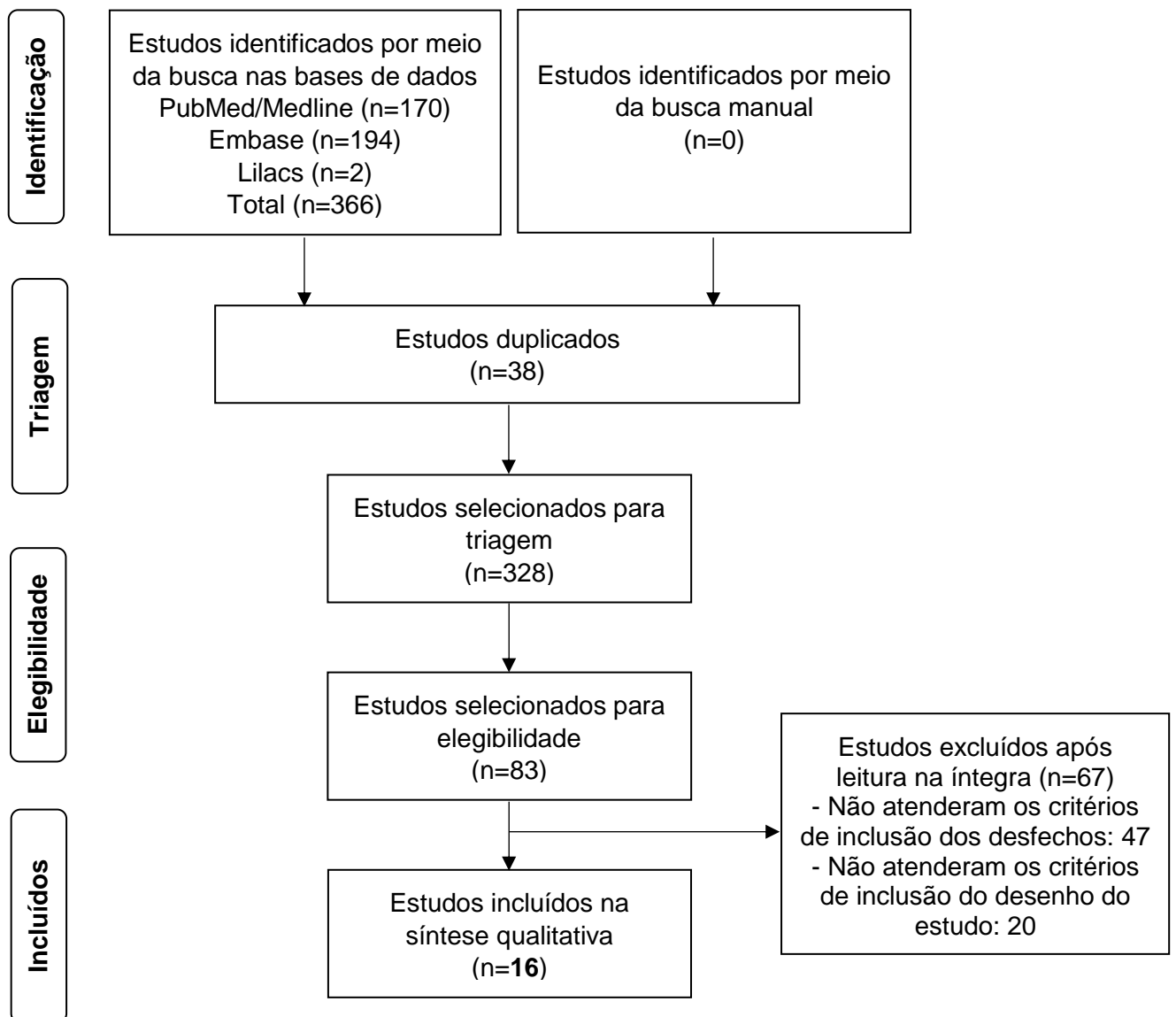


Figura 6. Fluxograma do processo de seleção dos artigos. **Fonte:** adaptado de Chierrito et al. (2019), de acordo com Liberati et al. (2009).

Após o processo de seleção dos estudos, a extração dos dados pode ser realizada em tabelas padronizadas com campos para todas as informações de interesse, isso permite que o processo seja organizado e facilita o manuseio dos dados. Características gerais de cada estudo incluído podem ser coletadas, como autor, ano de publicação, país de publicação, tipo de estudo e informações relacionadas a pergunta de pesquisa, elaborada inicialmente, como características da população e resultados dos desfechos (BRASIL, 2014; HIGGINS; GREEN, 2020). Conforme exemplificado na Figura 4, podemos considerar que os autores devem extrair dados referentes aos aspectos metodológicos dos testes realizados, tipo de linhagem celular e condições de cultura. Recomenda-se que todas as etapas descritas acima, sejam

realizadas por dois revisores independentes e que, em casos de dúvidas ou divergências, seja realizada uma reunião de consenso ou consultado um terceiro revisor (BRASIL, 2014; HIGGINS; GREEN, 2020).

O quarto passo é a avaliação da qualidade e risco de viés dos estudos incluídos na revisão sistemática, a qual possibilita estimar a probabilidade da existência de fontes de vieses nos dados, como de seleção, publicação e outros, como financiamento ou suporte da indústria farmacêutica (HIGGINS; GREEN, 2020). Para isso, existem ferramentas disponíveis para cada desenho de estudo, como a escala de Jadad (JADAD et al., 1996) e critérios disponíveis pela Colaboração Cochrane (HIGGINS; GREEN, 2020) para ensaios clínicos randomizados, *Newcastle Ottawa Scale* (WELLS et al., 2019) para estudos observacionais, *SYstematic Review Center for Laboratory Animal Experimentation tool* (SYRCLE's) (HOOIJMANS et al., 2014) para estudos com modelo animal. Até o momento, não foi encontrado na literatura uma ferramenta de avaliação metodológica de estudos experimentais *in vitro*.

A análise, apresentação e interpretação dos dados extraídos podem ser realizadas de forma qualitativa (descritiva) ou quantitativa, por meio de meta-análise, definida como uma análise estatística que combina e resume os resultados combináveis de estudos primários, gerando uma estimativa única dos efeitos (COOK; MULROW; HAYNES, 1997). Além da síntese dos dados, deve ser realizada uma discussão objetiva, baseada em estudos anteriores, que possa fundamentar recomendações e aplicabilidade das evidências encontradas na prática laboratorial, clínica e estudos futuros. Além disso, é recomendado relatar as limitações da revisão sistemática, que podem envolver poucos estudos incluídos, possibilidade ou não de realizar meta-análise e falta de dados de interesse nos estudos incluídos (BRASIL, 2014; HIGGINS; GREEN, 2020).

Em relação ao aprimoramento e atualização de uma revisão sistemática, deve-se considerar a disponibilidade de novas publicações que podem ter impacto nas conclusões iniciais. Na literatura, é recomendado que o processo de atualização seja realizado a cada biênio (MOHER et al., 2008; GARRITTY et al., 2010; AHMADZAI, et al., 2013; SHEA et al., 2017).

Com o intuito de evitar que revisões sistemáticas com os mesmos objetivos, relacionadas aos desfechos da área da saúde e assistência social, sejam conduzidas concomitantemente, é possível cadastrar a proposta de estudo na plataforma *International prospective register of systematic reviews*, conhecida como PROSPERO. Este banco também permite o acesso às revisões sistemáticas cadastradas, seus detalhes metodológicos e de análise (BRASIL, 2014; PROSPERO, 2021).

A partir do exposto neste tópico, podemos considerar que o processo de uma revisão sistemática é reproduzível e imparcial, sendo considerada uma publicação do tipo original na

maioria das revistas de pesquisa clínica (MEERPOHL et al., 2012; BRASIL, 2014). Portanto, difere-se de uma revisão narrativa, que é principalmente descritiva e com caráter informativo, podendo incluir viés de seleção dos estudos, uma vez que não segue, obrigatoriamente, critérios e etapas detalhadas. As principais diferenças entre estes tipos de estudos estão expostas na Tabela 2 (BRASIL, 2014; HARTLING; VANDERMEER; FERNANDES, 2014).

Tabela 2- Principais diferenças entre revisão narrativa e sistemática

| Características | Revisão narrativa | Revisão sistemática |
|------------------------|---|--|
| Pergunta | Geralmente é ampla | Específica, com definição da população, intervenção, comparador, desfechos e desenho de estudo |
| Busca na literatura | Geralmente não reportada e sistematizada | Ampla e em diferentes bases de dados eletrônicas e busca manual |
| Seleção dos estudos | Geralmente não reportada e com total de estudos incluídos enviesado | Conforme critérios de elegibilidade, previamente definidos |
| Avaliação da qualidade | Geralmente não reportada | Avaliação metodológica e risco de viés conforme desenho de estudo |
| Síntese dos dados | Geralmente qualitativa | Qualitativa ou quantitativa |

Fonte: adaptado de Brasil (2014).

Neste contexto, considerando as etapas abordadas, um estudo de revisão sistemática pode ser delineado para responder a pergunta elaborada na Figura 4, uma vez que até o momento, estudos de padronização do uso de cultura de células como modelo de pesquisa de doenças neurológicas são escassos (VISWANATH et al., 2015; XICOY; WIERINGA; MARTENS, 2017) e nenhum foi encontrado para o TDAH. Dessa forma, o capítulo 1 deste estudo fornece uma visão geral dos aspectos metodológicos do uso de culturas de células na investigação de possíveis opções terapêuticas para o tratamento do TDAH.

2.3 ASPECTOS GERAIS DA ESPÉCIE VEGETAL AVALIADA

A espécie vegetal *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze, Plumbaginaceae, representa o gênero *Limonium* Mill. no Brasil. Popularmente é conhecida como “baicuru”, “guaicuru”, “guaicurá”, é uma erva terrícola, nativa e não endêmica do Brasil, com ocorrência

no domínio da Mata Atlântica, presente nos estados do Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Rio de Janeiro (Figura 7) (DIAS DA SILVA, 1920; FUNEZ, 2021).



Figura 7. *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze (Plumbaginaceae). (A) partes aéreas e rizomas, (B) exsicata das partes aéreas e (C) exsicata dos rizomas. **Fonte:** Blainski (2010).

Para caracterizar a droga vegetal e assegurar seu uso e efetividade foram estabelecidos os critérios de caracterização físico-química, padronização do extrato e controle de qualidade dos rizomas de *L. brasiliense*. Conforme determinado por Antonelli-Ushirobira et al. (2015a), são os rizomas (Figura 7) e não as raízes a parte da planta utilizada pela população como medicinal. Desta forma, a análise química dos rizomas de *L. brasiliense*, demonstrou a presença de taninos hidrolisáveis e condensados, ácido 4-O-metilgálico, sitosterol e saponinas triterpênicas (ROSITO, 1975), além do ácido gálico, ácido elágico, β -sitosterol, benzoato de benzila, sacarose, miricetina, flavona, isoflavona, flavonona, cumarina e três saponinas triterpênicas (MOURA, 1985). Blainski (2016), confirmou a presença de ácido gálico, galocatequina, epigalocatequina e prodelfinidinas-galato. O estudo fitoquímico dos rizomas de *L. brasiliense*, levou ao isolamento e identificação de substâncias fenólicas, tais como miricetina-3-O- α -L-ramnosídeo, miricetina-3-O- β -D-galactosídeo-6"-galato, galocatequina, epigalocatequina, epigalocatequina-3-O-galato, epigalocatequina-3-O-galato-(4 β →8)-epigalocatequina-3-O-galato, além de monômeros e dímeros do tipo B duplamente ligados, como epigalocatequina-3-O-(2'→O→4")-galato, epigalocatequina-3-O-(2'→O→3")-galato (4 β →8) epigalocatequina-3-O-galato e samarangenina B (BLAINSKI, 2016). Caleare (2017) e Isolani (2018) elucidaram as substâncias epigalocatequina-3-O-galato, samarangenina A e samarangenina B.

Os rizomas desta espécie vegetal, ricos em substâncias fenólicas, são responsáveis por diferentes atividades biológicas, incluindo capacidade antioxidante (MURRAY et al., 2004; SEREIA et al., 2019), atividades anti-inflamatória (MOURA et al., 1985; RODRIGUES et al., 2011), hormonal (BLAINSKI, 2010; ANTONELLI-USHIROBIRA et al., 2015a, 2015b) e antimicrobiana (ROSITO, 1975; FARAL-TELLO et al., 2012; BLAINSKI et al., 2017; CALEARE et al., 2017; CORDEIRO, 2017; ISOLANI, 2018).

A atividade antioxidante foi avaliada por Murray et al. (2004), pelo método de 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), expressa através do valor da concentração inibitória de 50% (CI₅₀) da concentração inicial de DPPH. O extrato bruto (EB) de *L. brasiliense* e o composto isolado miricetina-3-O- α -raminopiranosídeo apresentaram CI₅₀ de 20,0 e 40,0 μ M respectivamente, quando comparados ao composto quercetina com CI₅₀ de 20,7 μ M. Sereia et al. (2019) também demonstraram atividade antioxidante do EB e FAE de *L. brasiliense* por meio do método DPPH, além dos ensaios de determinação do poder antioxidante de redução do ferro (FRAP), 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin 6-ácido sulfônico (ABTS) e atividade da xantina oxidase.

Moura et al. (1985) demonstraram atividade anti-inflamatória do extrato dos rizomas de *L. brasiliense*, por via intraperitoneal, na dose de 250 mg/kg, pela redução do edema da pata do rato induzido por carragenina. No teste de toxicidade excessiva, o extrato, na dose de 2,0 g/kg, por via intravenosa (veia caudal), apresentou sinais expressivos de toxicidade, sendo que até 1,5 g/kg não foi relatado morte. A atividade anti-inflamatória do EB de *L. brasiliense* também foi avaliada *in vitro*, com uso da linhagem celular RAW 264.7 estimuladas por lipopolissacarídeos. Além do EB, os pesquisadores avaliaram a substância isolada miricetina-3-O-ramnosídeo frente à superprodução de óxido nítrico, sendo que essa apresentou melhor resultado (RODRIGUES et al., 2011).

A atividade hormonal do EB de *L. brasiliense* foi avaliada em ratas imaturas, nas doses de 400, 800 e 1.200 mg/kg, sendo constatado tendência em diminuir a idade de abertura do canal vaginal, quando comparado os grupos tratados e controle, com efeito do tipo antiestrogênico (BLAINSKI, 2010). Antonelli-Ushirobira et al. (2015a, 2015b) também avaliaram *in vivo* a segurança e a atividade hormonal do EB de *L. brasiliense*. A avaliação da toxicidade demonstrou que a administração do EB não resultou em alterações clínicas nos animais avaliados e que a dose capaz de matar 50% dos animais (DL₅₀) foi de 4,8 g/kg. A mutagenicidade foi avaliada pelo teste do micronúcleo e demonstrou baixo potencial mutagênico em doses \leq 2,0 g/kg. Além disso, os resultados apontam possível efeito sobre o sistema reprodutor feminino, uma vez que atividade hormonal resultou em retardo na idade de abertura do canal vaginal, aumento do peso relativo do útero e ações da progesterona e estrogênio.

O extrato bruto de *L. brasiliense* demonstrou potencial antibacteriano inibindo o desenvolvimento de cepas de *Bacillus mycoides*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, dentre outras (ROSITO, 1985). Essa atividade também foi descrita por Blainski et al. (2017) e Cordeiro (2017) contra cepas de *Enterococcus faecium* resistente à vancomicina, *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina e de *Staphylococcus epidermidis*. A linhagem celular epitelial humana KB foi o modelo *in vitro* para demonstrar que o EB de *L. brasiliense* foi capaz de inibir a adesão da bactéria *Porphyromonas gingivalis*. O estudo relatou que em concentrações $\leq 100 \mu\text{g/mL}$, o EB não exerceu efeito citotóxico nas células KB e não influenciou a fisiologia celular após 24 h de tratamento. Além disso, o extrato reduziu as atividades das gingipaínas, principal fator de virulência de *P. gingivalis* (CALEARE et al., 2017).

Faral-Tello et al. (2012) e Isolani (2018) demonstraram atividade antiviral do extrato de *L. brasiliense* contra o vírus herpes simples tipo I (HSV-1), o qual inibiu a replicação *in vitro*, com concentração citotóxica para 50% das células (CC_{50}) de $185 \mu\text{g/mL}$ e $85 \pm 5 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. As frações e substâncias isoladas da FAE (samarangenina A, samarangenina B e epigalocatequina-3-O-galato) também foram avaliadas, sendo que a epigalocatequina-3-O-galato apresentou o maior valor de CC_{50} , de $66,67 \pm 15,28 \mu\text{g/mL}$ (ISOLANI, 2018).

Na literatura, apenas um estudo utilizou células neuronais (neuroblastoma SH-SY5Y) como modelo *in vitro* para avaliação dos efeitos da fração acetato de etila (FAE) de *L. brasiliense*. A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina (MTT) e não foi relatada citotoxicidade após 24 h de tratamento nas concentrações de 7,81, 15,62, 31,25 e 62,5 $\mu\text{g/mL}$ da FAE. Além disso, foi realizado ensaio de citoproteção, sendo que o pré-tratamento nas concentrações 7,81 a 31,25 $\mu\text{g/mL}$ da FAE foi capaz de proteger as células contra o dano induzido pelo fragmento βA_{25-35} , um biomarcador estrutural relacionado à doença de Alzheimer (SEREIA et al., 2019).

Assim, considera-se o *L. brasiliense* uma espécie ainda pouco avaliada, principalmente em cultura de células neuronais, com amplo potencial a ser explorado. Neste contexto, elaborou-se um protocolo laboratorial para avaliação dos efeitos do EB, FAE, FAQ e substâncias isoladas dos rizomas de *L. brasiliense* sobre a viabilidade de células neuroblastoma SH-SY5Y, cujos resultados e discussões estão apresentados na forma de artigo no Capítulo 2.

3 OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

Fornecer uma visão geral dos aspectos metodológicos do uso de culturas de células na investigação de possíveis opções terapêuticas para o tratamento do Transtorno de Déficit da Atenção com Hiperatividade (TDAH) e avaliar o impacto de extratos da espécie vegetal *Limonium brasiliense* na viabilidade de células neuroblastoma SH-SY5Y.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar revisão sistemática de estudos experimentais *in vitro* para avaliar o uso de cultura de células como modelo de pesquisa para a investigação de possíveis opções terapêuticas para o TDAH;
- Identificar os aspectos metodológicos dos estudos incluídos na revisão sistemática, de acordo com o tipo de cultura de células e seus objetivos;
- Elaborar fluxograma de processo com os principais passos metodológicos para pesquisas *in vitro* de investigação de opções terapêuticas para o TDAH;
- Elaborar *checklist* com itens que devem ser reportados na escrita de um estudo experimental com culturas de células;
- Avaliar os efeitos do extrato bruto, fração acetato de etila, fração aquosa e substâncias isoladas (samarangeninas A e B e epicagalocatequina-3-O-galato) dos rizomas de *L. brasiliense* sobre a viabilidade de células neuroblastoma SH-SY5Y.

Dessa forma, esta tese foi organizada em dois capítulos na forma de artigos, a saber:

Capítulo 1. Revisão Sistemática: “Uso de cultura de células para investigação de tratamentos para o Transtorno de Déficit da Atenção com Hiperatividade: uma revisão sistemática”;

Capítulo 2. Avaliação da viabilidade celular: “Impacto da espécie vegetal *Limonium brasiliense* na viabilidade de células neuroblastoma humano SH-SY5Y.

4 CAPÍTULO 1 - USO DE CULTURA DE CÉLULAS PARA INVESTIGAÇÃO DE TRATAMENTOS PARA O TRANSTORNO DE DÉFICIT DA ATENÇÃO COM HIPERATIVIDADE: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA

Using cell cultures for the investigation of treatments for Attention Deficit Hyperactivity Disorder: A Systematic review


Chierrito, D.^a, Villas-Boas, C. B.¹, Tonin, F. S.², Fernandez-Llimos, F.³, Sanches, A. C. C.¹; Mello, J. C. P.^{*a}

^aDepartment of Pharmacy, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Brazil; ¹Department of Medical and Pharmaceutical Sciences, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, Brazil; ²Department of Pharmacy, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil; ³iMed.Ulisboa, Department of Social Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Universidade de Lisboa, Lisbon, Portugal.

*Address correspondence to this author at the Department of Pharmacy, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Brazil; Tel/Fax: +55 44 30114627; e-mail: mello@uem.br

Journal Name: Current Neuropharmacology (IF: 4.568)

DOI: 10.2174/1570159X17666190409143155



[Download](#)
[Download Supplement](#)

Systemic Review Article

Using Cell Cultures for the Investigation of Treatments for Attention Deficit Hyperactivity Disorder: A Systematic Review

Author(s): Danielly Chierrito, Camilla B. Villas-Boas, Fernanda S. Tonin, Fernando Fernandez-Llimos, Andréia C.C. Sanches, João C.P. de Mello*

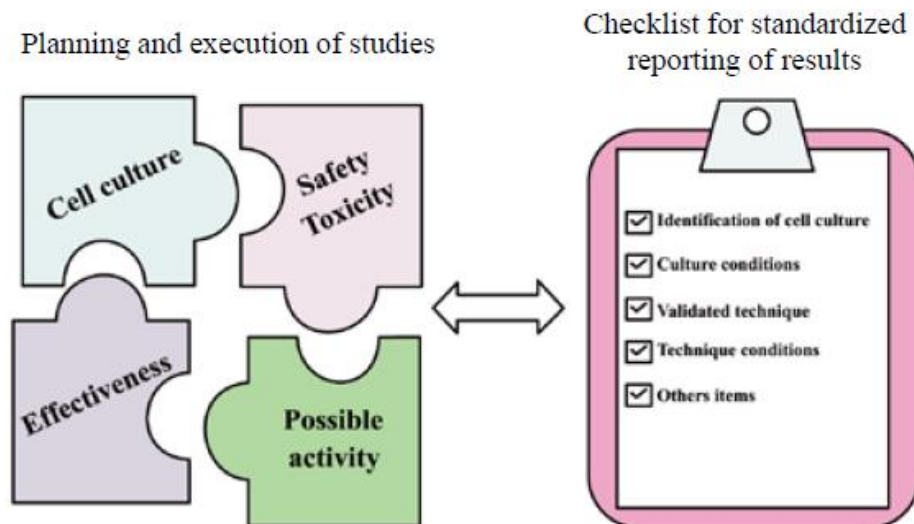
Journal Name: Current Neuropharmacology

Volume 17 , Issue 10 , 2019 **DOI :** 10.2174/1570159X17666190409143155

[🏠 Journal Home](#)

Abstract: Background: Advances in basic and molecular biology have promoted the use of cell cultures in a wide range of areas, including the evaluation of drug efficacy, safety and toxicity. **Objective:** This article aims to provide a general overview of the methodological parameters of cell cultures used to investigate therapeutic options for Attention Deficit Hyperactivity Disorder. **Method:** A systematic search was performed in the electronic databases PubMed, Scopus, and DOAJ. *In vitro* experimental studies using cell cultures were included. **Results:** A total of 328 studies were initially identified, with 16 included for qualitative synthesis. Seven studies used neuronal cells (SH-SY5Y neuroblastoma and PC12 cell line) and nine used nonneuronal cells. All the studies described the culture conditions, but most studies were inconsistent with regard to reporting results and raw data. Only one-third of the studies performed cell viability assays, while a further 30% conducted gene expression analysis. Other additional tests included electrophysiological evaluation and transporter activity. More than 50% of the studies evaluated the effects of drugs such as methylphenidate and atomoxetine, while plant extracts were assessed in four studies and polyunsaturated fatty acids in one. **Conclusion:** We suggested a flowchart to guide the planning and execution of studies, and a checklist to be completed by authors to allow the standardized reporting of results. This may guide the elaboration of laboratory protocols and further *in vitro* studies.

Keywords: cell model, neuronal cell, ADHD, ADHD treatment, methodological aspect, flowchart, checklist.



1 INTRODUCTION

Advances in basic and molecular biology have promoted the use of cell cultures in a wide range of areas, including for the evaluation of drug efficacy, safety and toxicity as well as for the production of vaccines and biopharmaceuticals [1]. This methodology allows the use of immortalized cell lines, primary cell cultures and stem cells-derived cell models in experiments, according to the research objective [2].

In the field of Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD), a neurological disorder that affects up to 7.2% of children and adolescents and 2.5% of adults [3-6], cell cultures have been used to investigate new therapeutic alternatives or to test the safety and toxicity of the available drugs [7-10]. Current therapeutic alternatives include psychostimulant drugs (methylphenidate, dexamphetamine), noradrenergic agents (atomoxetine), antidepressants and others [11, 12].

The most commonly used cell lines to investigate ADHD include neuronal cell lines (neuroblastoma SH-SY5Y) and non-neuronal cell lines such as HEK293rtTA, HEK-293, TsA201 and JAR, cells isolated from patients, and cells isolated from animals [9, 10, 13-21]. However, the effective use of cell cultures requires some fundamental aspects to be met. These include knowledge of the culture conditions (appropriate growth medium, micronutrients, temperature and pH), cell differentiation methods to allow the induction of neuronal dopaminergic and cholinergic phenotypes, cell viability methods to demonstrate cell survival or death in response to exposure to substances, and the evaluation of gene expression for possible cellular reactions due to pharmacological treatments [22-25]. The optimization and standardization of these parameters are essential to develop laboratory protocols, in order to obtain higher quality results and guide further *in vitro* and *in vivo* research.

Currently, only a few studies exist about the standardization of cell culture models in the neurological field. Some recent systematic reviews have synthesized information on *in vitro* research for Parkinson's disease and Bipolar Disorder, but there is still no synthesis for cell culture models in ADHD [26, 27]. Thus, our objective was to perform a systematic review to provide a broader overview of the methodological aspects to the use of cell cultures in the investigation of therapeutic options to ADHD.

2 METHODS

This research was designed according to the recommendations from the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) [28], Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions [29], and the Joanna Briggs Institute [30]. The steps of screening article titles and abstracts, full-text reading, and data extraction were

conducted by two independent reviewers, with a third reviewer consulted in case of discrepancies.

2.1 Systematic Literature Search and Eligibility

A systematic search was performed in the electronic databases PubMed, Scopus, and Directory of Open Access Journals (DOAJ) (September 2017). A manual search was also conducted of the bibliographic references of the included articles. The inclusion criteria were *in vitro* experimental studies that used cell culture (any type of cell line) to investigate possible therapeutic options (any form, dosage or regimen) for the treatment of ADHD. Other types of studies (e.g. only *in vivo* evaluations, studies with humans), and studies not reporting data on cell culture or ADHD were excluded.

2.2 Data Extraction and Reporting Evaluation

A standardized form was used to extract data on the culture conditions and methodological aspects, the differentiation process, cell viability and proliferation methods, other additional tests of gene expression, electrophysiological evaluation and transporter activity. Additionally, to better visualize the information provided by the studies on the methods used and the result reported, we applied an adapted version of the SYstematic Review Center for Laboratory Animal Experimentation tool (SYRCLE's) to the included studies [31].

3 RESULTS

A total of 328 studies were screened (titles and abstracts were read), after duplicate removal, of which 83 were included for full-text appraisal. Finally, 16 studies were eligible for qualitative synthesis, as shown in Fig. 1 [7-10, 13-21,32-34].

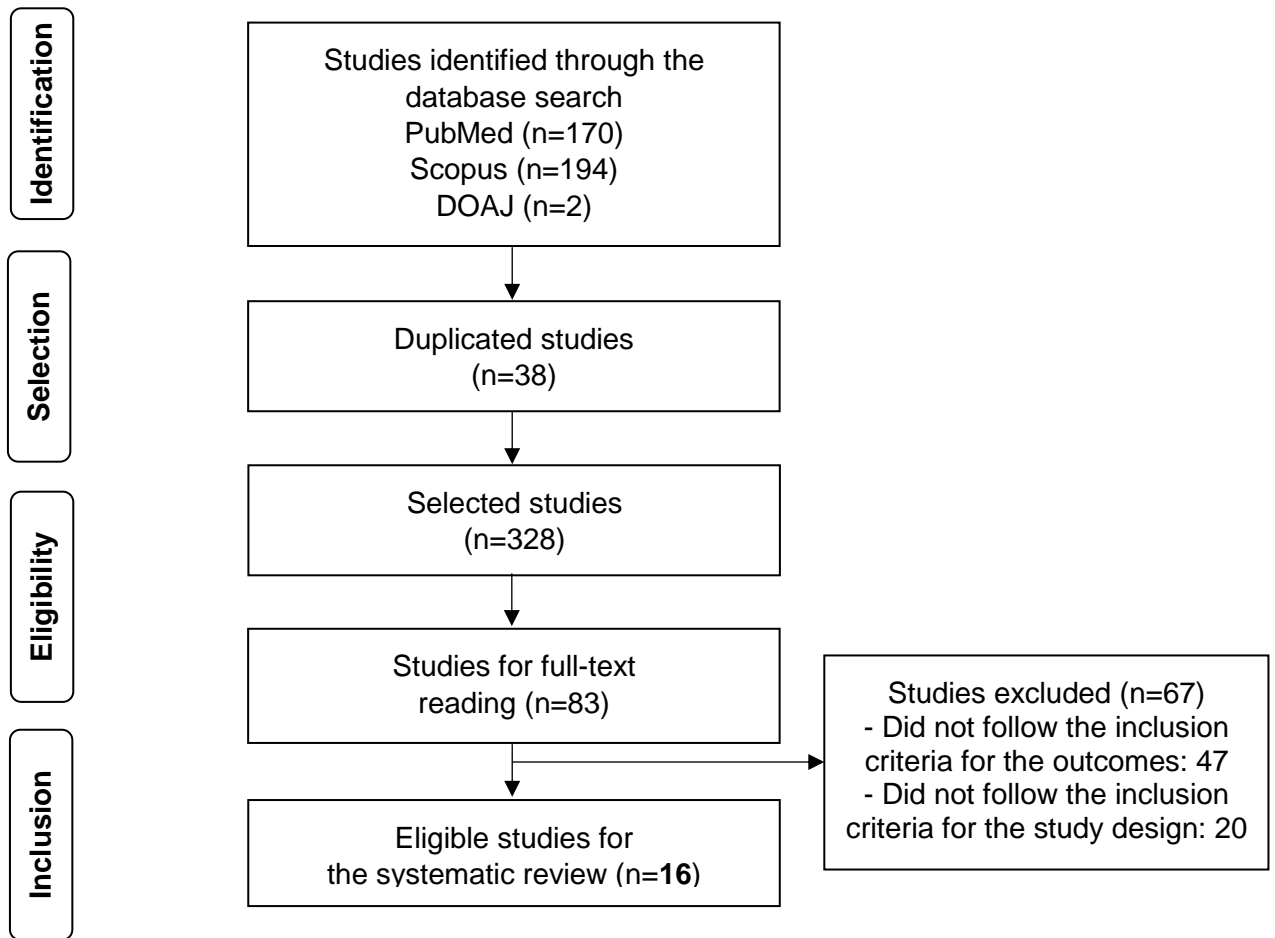


Figure 1. Flowchart of systematic review process.

The main characteristics of the included studies are presented in Table 1. Studies were conducted in different countries, mostly in Germany (50%), and published between 2007 and 2017. Neuronal cell lines (neuroblastoma SH-SY5Y and PC12) and non-neuronal cell lines such as HEK293rtTA, HEK-293, TsA201, and JAR, cells isolated from patients such as human lymphocytes, lymphoblastoid cell lines, peripheral blood mononuclear cells, and cells isolated from animals (L929sA, CHO, MDCK) were reported. The evaluated therapeutic options included drugs (e.g. amphetamine, atomoxetine, methylphenidate, pipamperone), extracts of different plants and polyunsaturated fatty acids. All the studies presented data on the cell culture conditions, while 5 also evaluated cell viability, and assessed gene expression. The results for the conduct and reporting of studies with the SYRCLE's tool showed that all the studies described the conditions of cell culture at least. However, studies were imprecise or failed to present complete results for all of the tests. It is unclear whether studies were free of

selective data reporting. Half of the studies were also 'unclear' about the acknowledgments or conflicts of interest related to the pharmaceutical industry.

Table 1. Main characteristics of all the studies included in the systematic review.

| Study | Cell culture | Substance tested | Parameters evaluated |
|-------------------------------|------------------------------------|--|----------------------|
| Schmidt et al, 2010 | SH-SY5Y, U-937 | Amphetamine, Atomoxetine, Methylphenidate | A, C |
| Schmidt et al., 2010a | SH-SY5Y, U-937 | Amphetamine, Atomoxetine, Methylphenidate | A, B |
| Schmidt et al., 2010b | SH-SY5Y | <i>Hypericum perforatum</i> L., <i>Pinus radiata</i> D. Don, <i>Pinus pinaster</i> Aiton | A, B |
| Nam et al, 2014 | SH-SY5Y | YY162* | A |
| Feio-Azevedo et al., 2017 | SH-SY5Y | Amphetamine e metabolites** | A, C |
| Bartl et al., 2010 | PC12 | Methylphenidate | A, B, C |
| Bart et al., 2014 | PC12 | Polyunsaturated fatty acids | A, B |
| Craenenbroeck et al., 2006 | HEK293rtTA, L929sA, CHO | Pipamperone | A, C |
| Wakamatsu et al., 2009 | HEK-293 | Methylphenidate | A |
| Ludolph et al., 2010 | TsA201 | Atomoxetine | A |
| Knorle et al., 2012 | JAR | <i>Sideritis scardica</i> Griseb. | A, B |
| Suter et al., 2006 | Human lymphocytes | Methylphenidate | A |
| Schwarz et al., 2014 | Lymphoblastoid cell lines | Methylphenidate | A, C |
| Kittel-Schneider et al., 2016 | Peripheral blood mononuclear cells | Methylphenidate | A |
| Zhao et al., 2007 | CHO | <i>Fructus Psoraleae</i> | A |
| Salviano et al., 2015 | MDCK | Methylphenidate | A, B |

SH-SY5Y: neuroblastoma SH-SY5Y; U-937: Human monocytic U-927; PC12: Rat pheochromocytoma; HEK293rtTA cells: Human embryonic kidney cells expressing the tetracycline transactivator; HEK-293: Human embryonic kidney 293; TsA201: Transformed human embryonic kidney; JAR: Human choriocarcinoma; L929sA: pMx5-HT2AR cells mouse fibrosarcoma; CHO: Chinese hamster ovary;; MDCK: Madin-darby canine kidney; *YY162: Mixture of "terpenoid-strengthened *Ginkgo biloba*" and "ginsenoside Rg3"; **4-hydroxyamphetamine e 4-hydroxynorephedrine; A: culture conditions; B: cell viability; C: gene expression.

3.1 Neuronal Cell Culture

From the 16 studies selected in our systematic search, five (31.3%) used the SH-SY5Y neuroblastoma [7, 8, 10, 33, 34] and two (12.5%) used the PC12 cell line [18, 32]. This first strain is a sub-line of the SK-N-SH cell, which was established in culture in 1970 from human metastatic neuroblastoma tissue [35]. One study acquired these cells from the European Collection of Cell Cultures (ECACC) - United Kingdom (UK), and other used the Korean Cell Line Bank - Seoul as a source of cells [10, 34]. The other studies did not report this information. The PC12 cell is a clonal cell line derived from a pheochromocytoma of the rat adrenal medulla [36]. Bartl et al. [18] acquired these cells through donation by researchers from the Technion Faculty of Medicine, Israel.

3.1.1 Culture conditions for Neuronal Cell

In the seven included studies, the media used for cell growth was Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) or Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI), with compositions that varied the concentration and condition of Fetal Bovine Serum (FBS) (varying from 3% heatinactivated FBS to 15% FBS), the concentration of antibiotics (penicillin, streptomycin or gentamycin), and other supplements (e.g. amino acids). Other information, such as confluence, the use of trypsin to collect the cells, cell density and number of passages was reported only by Feio-Azevedo [10]. In all the studies, cells were maintained in a 5% CO₂ incubator. Four studies reported an incubation temperature of 37 °C [10, 18, 32, 34].

3.1.2 Phenotype and Cell Differentiation for Neuronal Cells

The SH-SY5Y cell line of neuroblasts can be differentiated into mature human neurons from methods based on the use of substances that trigger biochemical changes and may induce different neuronal phenotypes. One of the substances used is retinoic acid (RA), which is capable of inducing a cholinergic phenotype when applied in isolation or a dopaminergic phenotype when associated with phorbol ester 2-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) [24, 37]. Only one study [10] reported the process of cell differentiation in the dopaminergic phenotype, using the method previously described by Ferreira et al. [38] in which the cells were exposed to RA and TPA in DMEM medium for 6 days. The PC12 cell line can differentiate to resemble sympathetic neurons when cultured in the presence of nerve growth factor (NGF) or several other compounds [36]. Bartl et al. [32] differentiated these cells with 50 ng/mL human NGF-b for 7 days according to the protocol used. The remaining studies did not report this information.

3.1.3 Cell Viability for Neuronal Cell

Three studies [7, 8, 10] quantitatively evaluated cellular viability the neuroblastoma SH-SY5Y using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazoline bromide (MTT) assay, measuring lactate dehydrogenase (LDH) activity, or evaluating the adenosine triphosphate (ATP) content. In the studies that performed the MTT test, neuronal cells were exposed to amphetamine, atomoxetine, methylphenidate or *Pinus radiata* D. Don, and *Pinus pinaster* Aiton extracts, and then incubated at 37 °C (overnight/24 h). Mitochondrial activity was evaluated at different times of exposure and substance concentrations. The final results revealed that none of the substances reduced neuronal cell survival compared with control cells [7, 8, 10]. The activity of LDH enzyme was measured by only one study [10] in which cell death was induced by concentrations of amphetamine (3.50 mM and 5.00 mM). The results showed no correlation between cell death and the exposed substance at the concentration and time analyzed (24 h and 48 h) [10, 38]. Two studies [7, 8] measured the cellular content of ATP, which was performed with a scintillation microplate counter. The cells were exposed to different substances (amphetamine, atomoxetine, methylphenidate and extracts of *Hypericum perforatum* L, *P. radiata* and *P. pinaster*) at different concentrations (500 and 5000 ng/mL) for 24 h at 37 °C. There was a significant increase in ATP content only when exposed to the *H. perforatum* extract at a concentration of 5000 ng/mL.

The studies that evaluated cellular viability with the cells PC12 used XCELLigence and BrdU incorporation tests. Bartl et al. [18] non-invasively evaluated cell viability using an xCELLigence Real-Time Cell Analyzer. In this case, the culture medium of PC12 cells was changed to DMEM containing 4.5 mg/mL glucose, supplemented with FBS and 150 µM fatty acid-free bovine serum albumin (BSA). The results demonstrated that the combination of polyunsaturated fatty acids significantly increased cell viability. The assay of 5-bromo-2-deoxyuridine (bromodeoxyuridine or BrdU) performed by Bartl et al. [32] showed that concentrations of 1, 10, and 100 nM of methylphenidate activated DNA synthesis in PC12 cells compared to the controls, whereas higher concentrations of the drug (1-100 µM) did not influence cell proliferation.

3.1.4 Gene Expression for Neuronal Cells

Among the existing methods to evaluate gene expression, reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) is a widely used tool to amplify and detect mRNA [39]. This was the technique used by Schmidt et al. [33] to verify the effect of amphetamine, atomoxetine and methylphenidate in different concentrations (50, 500 and 5000 ng/mL) on the expression of the 8-hydroxyguanine glycosylase 1 (hOGG1). The results revealed that the evaluated drugs decreased the expression of this enzyme, which is directly related to the level

of oxidative products of the DNA, suggesting a neuronal protective effect of psychostimulants and atomoxetine. One study [32] evaluated the effect of methylphenidate on gene expression in PC12 cells. Total RNA was extracted by the RNeasy kit and quality was evaluated on an agarose gel.

3.2 Non-neuronal Cell Culture

Among the 16 studies, nine (56.25%) used non-neuronal cultures or cells isolated from animals. These cell lines were accessed through Cytomyx Ltd. (Cambridge, UK), the Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) (Braunschweig, Germany [9]), and from the Biochemistry Institute of São Paulo University, Brazil [21].

3.2.1 Culture conditions for Non-neuronal Cell

All of the studies described culture conditions. The media used for cell growth were Minimum Essential Medium (MEM) in 3 of the studies, DMEM in one study or RPMI- 1640 in 5 studies, their compositions varied in relation to supplementation of the medium, represented by the addition of FBS (varying from 10 to 20%), different antibiotics and other supplements (e.g. amino acids). Incubation was performed at 37 °C and 5% CO₂.

3.2.2 Main Methodologies for Non-neuronal Cells

The studies were methodologically designed according to the type of cells and their objectives. Most of the studies were carried out to verify the cytotoxic potential of test substances tested or their influence on gene expression, electrophysiological test, levels of transporters and others tests (see Table 2). Cell viability and gene expression were evaluated by two (22.2%) and two (22.2%) studies, respectively.

Table 2. Main tests reported in the studies with non-neuronal cells cultures.

| Authors, year | Cell culture | Study objectives | Cell viability | Gene expression | Others |
|-------------------------------|------------------------------------|--|----------------|--------------------|--------------------------|
| Craenenbroeck et al., 2006 | HEK293rtTA | Evaluate the effect of pipamperone on D4 receptor expression | - | qPCR | Radioligant Western blot |
| Wakamatsu et al., 2009 | HEK 293 | Evaluate the effect of methylphenidate on the cardiovascular system | - | - | Electro-physiological |
| Ludolph et al., 2010 | TsA201 | Evaluate the effect of atomoxetine on glutamate receptors | - | - | Electro-physiological |
| Knorle et al., 2012 | JAR | Evaluate the effect of <i>Sideritis scardica</i> on monoamine transporters | LDH | - | Effect on transporters |
| Suter et al., 2006 | Human lymphocytes | Evaluate the clastogenic effect of methylphenidate | - | - | Chromosome aberration |
| Schwarz et al., 2014 | Lymphoblastoid Cell Lines | Evaluate the effect of methylphenidate on gene expression regulation | - | qRT-PCR Microarray | - |
| Kittel-Schneider et al., 2016 | Peripheral blood mononuclear cells | Evaluate the cytogenetic effects of long-term treatment with methylphenidate | - | - | Micronucleus |
| Craenenbroeck et al., 2006 | L929sA | Evaluate the effect of pipamperone on D4 receptor expression | - | qPCR | Radioligant Western blot |
| Craenenbroeck et al., 2006 | CHO | Evaluate the effect of pipamperone on D4 receptor expression | - | qPCR | Radioligant Western blot |
| Zhao et al., 2007 | CHO | Evaluate the effect of <i>Fructus Psoraleae</i> on noradrenaline and dopamine transporters | - | - | Effect on transporters |
| Salviano et al., 2015 | MDCK | Evaluate the effect of methylphenidate on the renal system | MTT | - | - |

HEK293rtTA cells: Human embryonic kidney cells expressing the tetracycline transactivator HEK-293: Human Embryonic Kidney; TsA201: Transformed human embryonic kidney; JAR: Human choriocarcinoma; L929sA: Cells mouse fibrosarcoma; CHO: Chinese Hamster Ovary; MDCK: Madin-Darby Canine Kidney; Receptor D4: Receptor de dopamine 4; 6-OHDA: 6-hydroxydopamine; qRT-PCR: quantitative Real Time PCR; *Eicosapentaenoic acid e docosahexanoic acid e gamma-linolenic acid.

3.2.3 Cell Viability for Non-neuronal Cell

Two studies performed viability and cell proliferation tests using LDH and MTT. Knorle et al. [9] measured the LDH activity from the exposure of JAR cells to extracts of *S. scardica* at concentrations of 50 and 500 µg/mL. The cells were incubated at 20 °C (3 h). There was no significant difference between the cells treated with the extracts and control cells. The studies performing the MTT assay [21] also observed no reduction in cell viability when MDCK cells were treated with methylphenidate at concentrations of 80 to 1.25 µL/mL.

3.2.4 Gene Expression for Non-neuronal Cells

Two studies [13, 19] evaluated the effect of methylphenidate on gene expression in LCL and CHO cells. Total RNA was extracted by the RNeasy kit and evaluated for quality on an agarose gel. In addition, Schwarz et al. [19] performed microarray hybridization.

The results showed that the effects of long-term methylphenidate treatment were observed on the expression of the ATXN1, HEY1, MAP3K8 and GLUT3 genes, while the effects of acute treatment were observed on the expression of NAV2 and ATXN1 in patients with ADHD, confirmed by quantitative Real-Time PCR (qRT PCR) analysis [19]. Craenenbroeck et al. [13] used qPCR to verify that the drug pipamperone does not increase the expression of dopamine 4 receptor mRNA in the CHO FLAGDRD4 cell line.

3.2.5 Other Tests for Non-neuronal Cells

The electrophysiological tests evaluated the effect of methylphenidate and atomoxetine on cells [16, 17]. The first drug was tested to verify its effect on the cardiovascular system from the delayed rectification potassium current (IKr) analysis in human ether-a-go-related (hERG) human HEK 293 cells. Methylphenidate was applied to the cell culture at different concentrations (0.1, 0.3 and 1 µg/mL) but none of them inhibited IKr, which suggests that this drug does not alter the ventricular repolarization process (prolongation of QT interval) at the recommended therapeutic dosage levels [16].

The effects of atomoxetine on glutaminergic receptors on TsA201 cells transfected with cDNAs, which encode Nmethyl-D-aspartate (NMDA) receptors, were also evaluated. Atomoxetine exerted a dose-dependent antagonistic effect on NMDA receptors at lower concentrations, which suggests a relationship between glutaminergic transmission and the development of ADHD [17].

The extracts of the plant species *Sideritis scardica* Griseb. and *Fructus Psoraleae* inhibited the monoamine transporters in tests performed with human (JAR) and animal (CHO) cells, respectively [9, 15]. According to the authors, JAR cells were chosen due to the expression of human serotonin transporter (hSERT), while CHO cells were chosen due to the

expression of rat dopamine transporter (rDAT), rat serotonin transport (rSERT), mice γ -aminobutyric acid or GABA transporter (mGAT-1) and human noradrenaline transporter (hNET).

Other tests were also performed. Craenenbroeck et al. [13] used radioligand, western blot and tests in HEK293rtTA, L929sA and CHO cells to evaluate that pipamperone acts as a pharmacological chaperone and increases the expression level of the dopamine D4 receptor. This receptor may be involved with the development the ADHD. Chromosomal aberration and micronucleus tests on isolated human lymphocytes were performed to evaluate possible cytotoxic effects of the drug methylphenidate. The results demonstrated the absence of a clastogenic effect in these cells after treatment with D, L-methylphenidate in concentration up to 10 mM [14]. Long-term treatment did not lead to cytogenetic effects [20].

4. DISCUSSION

This is the first systematic review to synthesize information on cell cultures as research models for assessing therapeutic options in ADHD. In addition to contributing further evidence on the safety and toxicity profile of well-established drugs (methylphenidate, amphetamine and atomoxetine), it was possible to verify the use of these models for the investigation of potential therapeutic substances, such as plant extracts and polyunsaturated acids.

The choice of pharmacological treatments for ADHD is mostly based on physiopathological aspects of the disease, such as alterations in the dopaminergic, noradrenergic and serotonergic neurotransmission [40]. Currently, psychostimulants (e.g. amphetamine and methylphenidate) and noradrenaline reuptake inhibitors (e.g. atomoxetine) are considered first and second line treatments, respectively [11]. Although the therapeutic effect (efficacy and safety) of these drugs has been proven in *in vivo* studies and clinical trials [11], the *in vitro* studies included in our review also show that these drugs did not interfere with cell viability or gene expression, nor present significant toxicity. Moreover, cell culture assays suggest that psychostimulants and atomoxetine can protect DNA against oxidative stress, because they decrease the expression of the hOGG1 enzyme in cell lines, which has a positive correlation with the level of products of oxidative lesions to the DNA [33]. This is important to guide further investigation into the neuropathophysiology of ADHD, which has still not been fully elucidated.

Our review also found other substances that act at the level of monoamine transporters, making them possible therapeutic options for neurological disorders. Among the extracts of plants and polyunsaturated fatty acids, two substances presented promising results: the extracts *S. scardica* and *Fructus Psoraleae*. The results showed that these substances did not alter cell viability, but inhibited dopamine, norepinephrine and serotonin transporters, which

are usually altered in patients with ADHD. However, studies to better characterize and isolate the potentially active compounds of the extracts are needed [9, 15]. Moreover, additional tests such as *in vitro* electrophysiological studies should be performed to investigate cellular mechanisms of action, together with *in vivo* tests for safety assessment [41].

To obtain reliable results, *in vitro* studies with cell cultures should be appropriately conducted and reported. Several studies have documented concerns about the lack of reproducibility in scientific studies, particularly preclinical studies involving cells and animals [42-44]. Quality standards and good practices are generally not well defined for *in vitro* methods and *in vivo* models, and have not been integrated into preclinical research laboratories [45]. Several factors are commonly attributed to reduce methodological quality, including the poor design of experiments, the lack of training of investigators, and insufficient reporting of results or the withholding of technical details. As a consequence, the literature becomes irreproducible and unreliable, the bench-to-bedside time for new drugs is negatively affected, and the resources needed for clinical development significantly increase [45, 46].

Considering how the *in vitro* studies included in our review were conducted, and the most appropriate methodological aspects to perform cell cultures for ADHD, we propose the research process depicted in Fig. 2. This flowchart presents the main steps that should be considered by researchers when performing a study aiming to evaluate the effects and toxicity of substances exposed to neuronal and non-neuronal cells, including the selection of the cell culture and test to be performed based on the study's goals.

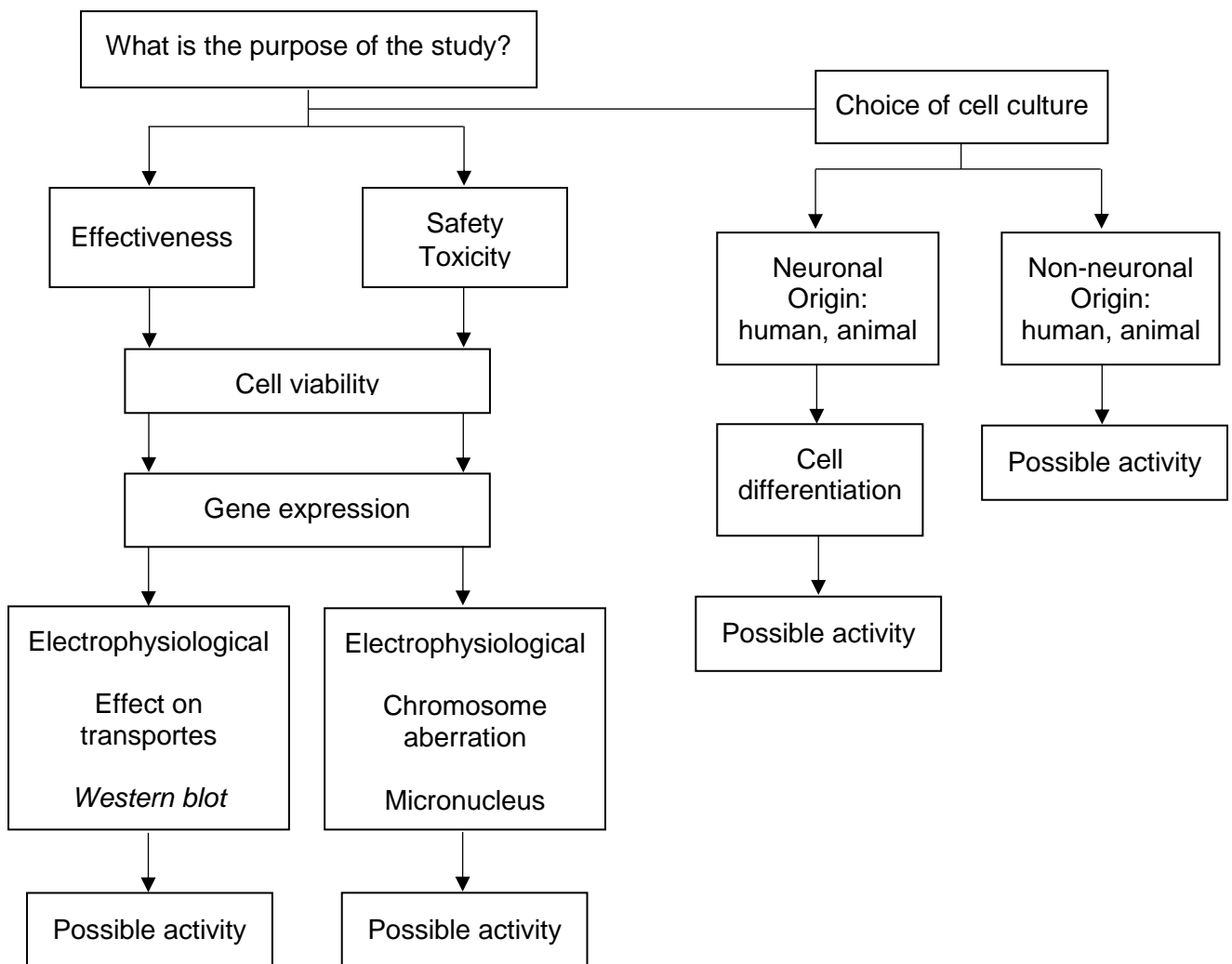


Figure 2. Flowchart with the main methodological steps for *in vitro* research investigating therapeutic options for ADHD.

The selection and maintenance of cells is an important first step. Often, cells used in the cultures are acquired by collections of cell biology or donated by research laboratories. Laboratory conditions, including the choice of medium and the type and serum concentrations, should be optimized for each type of cell, since these factors promote cell survival and proliferation, and modulate the biological behavior of cells, influencing the ability of differentiation and metabolic profile [1, 47, 48]. The composition of the growth medium is established differently according to the sources of access [27]. Bovine, adult, newborn or fetal (FBS) serum are the most commonly used [49]. Other substances may be added for the maintenance of culture media. Antibiotics (penicillin, streptomycin, gentamicin, and tylosin) are added to prevent bacterial and fungal contaminants [50], while non-essential amino acid supplementation, as observed in DMEM and RPMI-1640, is used to promote growth and

increase cell viability [22]. Moreover, the addition of sodium pyruvate may exhibit a cytoprotective activity against oxidative stress, preventing cell death induced by hydrogen peroxide [51, 52].

As sources of energy for cellular media, glucose is often added in the form of carbohydrates (primary source), and the essential amino acid glutamine (secondary energy source for cellular metabolism). Attention should be paid, however, to the maximum permissible concentrations of these components to maintain normal cell activities [22, 53].

For SH-SY5Y neuroblastoma cells, the process of differentiation into mature human neurons involves the addition of neurotrophic factors, factors secreted by human stem cells (hNSC), extracellular matrix proteins, and the gradual withdrawal of serum, as well as the use of retinoic acid [37]. This combination results in rapid and effective differentiation, with a higher percentage of neurons obtained [54]. The advantage of this methodology is the possibility of obtaining more robust results for comparison with *in vivo* models [37]. Both neuronal cells and non-neuronal cells can also be tested for cell activity. The substances to be tested, as well as their concentration and time of exposure should also be defined in the study's protocol. Another critical step in *in vitro* research is the determination and optimization of methods for cell viability. This enables one or more cellular functions such as mitochondrial activity (MTT), membrane integrity and cellular metabolism (LDH), DNA replication (BrdU incorporation), and ATP production, among others, to be evaluated [25], which may guide the elucidation of molecular pathways. Additionally, gene expression tests may broadly show cellular reactions due to a pathological condition or the effect of pharmacological treatments [23, 54-56]. Since many factors may affect these assays, standardized conditions are needed to obtain accurate results [55-57].

Besides optimized practices for planning and conducting *in vitro* studies, the reporting of results should also be standardized. In the healthcare area, the concept 'core outcome sets' represents a standardized collection of outcomes that should be measured and reported, which facilitate interpretation and generate consistent outcomes across studies [58,59]. Moreover, well-established checklists and recommendations with a minimum set of items for reporting are required for the publication of clinical and observational studies [28,29]. For preclinical studies, only a few recommendations such as the Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments (MIQE) checklist exist to guide study planning, execution, data analysis and reporting [56]. Thus, we suggest a minimum checklist (see Table 3) that should be completed by researchers using cell cultures prior to publication. This checklist was built based on the information reported in the studies included in our review and complemented with published literature on cell lineage and cell culture methods (Guidance on Good Cell Culture Practice - GCCP) [60]. Together with the flowchart of the research

process, the checklist aims to improve laboratory protocols, guide further standardized *in vitro* and *in vivo* research, facilitate the interpretation of data by the readers and allow result reproducibility.

Table 3. Checklist for conduct and reporting experimental *in vitro* studies.

| Checklist item | Reported on page N° |
|---|----------------------------|
| CELL CULTURE | |
| Identification of culture type and cell type | |
| Origin of cells (human, animal) | |
| In case of cells isolated from tissues, report isolation technique and variables involved | |
| Source of access of cells (collection of cell biology, donation by laboratories) | |
| In case of collection of cell biology, report the product/catalog number | |
| Growth medium used and supplementation components (serum, antibiotics, micronutrients, others). Report name, concentration, percentage used and brand | |
| Frequency of change of growth medium | |
| pH of the growth medium | |
| Confluence | |
| Use of trypsin or other substance to collect the cells. Report name, concentration, percentage | |
| Cellular density | |
| Number of passages | |
| Incubation temperature (exact 0.0 °C) | |
| Atmosphere conditions (exact 0.0% CO ₂) | |
| METHODS | |
| Technique name | |
| Report whether the technique has been developed and validated or reproduced | |
| In case of reproduced technique, report if there were adaptations and what were they | |
| In case of use of substance that promotes cellular alteration, report name, function, concentration, percentage, exposure time | |
| Time period of each step | |
| Temperature (exact 0.0 °C) | |
| Atmosphere conditions (exact 0.0% CO ₂) | |
| Equipment used | |
| Type of statistical analysis and level of significance | |
| Software for statistical analysis | |

Our research has some limitations. Few studies were included in the review, which may limit the generalization of the results to other fields. However, no further studies were added by manual searches. Given the nature of the data and the moderate methodological quality of the studies, other quantitative analyses were not possible.

CONCLUSION

This is the first systematic review to describe the methodological aspects for planning, performing and reporting *in vitro* studies with cell cultures in ADHD. To date, the SHSY5Y neuroblastoma cell line is the most widely used for the evaluation of cell proliferation and viability and gene expression. However, non-neuronal cells were shown to be useful for evaluation of the safety and toxicity of drugs and extracts of plants. Given the heterogeneity in the conduct of preclinical studies, we proposed a flowchart of the main methodological steps that should be followed by researchers during the development of laboratory protocols and further *in vitro* investigation. Additionally, we created a checklist with minimum reporting items that should be used by authors prior to publication.

Consent for publication

Not applicable.

Funding

None.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest, financial or otherwise.

Acknowledgements

This work was supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

1 Complete search strategies

| | |
|--|---|
| <p>PUBMED</p> | <p>#1: ("attention deficit hyperactivity with disorder"[MH] OR "attention deficit hyperactivity with disorder"[TW] OR "attention deficit hyperactivity disorder"[TW] OR "attention deficit-hyperactivity disorder"[TW] OR "attention deficit disorder"[TW] OR "adhd"[TW])</p> <p>#2: ("cell line"[ALL] OR "cell culture"[TIAB] OR "Cells, Cultured"[MH] OR "cell model"[TIAB] OR "neuronal cell" OR "ADHD model" OR "neuroblastoma"[ALL] OR "Cell Survival"[MH] OR "Neural Stem Cells"[MH])</p> <p>#3: (#1 AND #2)</p> |
| <p>SCOPUS</p> | <p>"attention deficit disorder" OR ADHD AND "Cell viability" OR "cell survival" OR "tumor cell line" OR "neuroblastoma cell" OR "<i>in vitro</i> study"</p> |
| <p>DIRECTORY OF OPEN ACCESS JOURNALS (DOAJ)</p> | <p>("Cell viability" OR "cell survival" OR "cell line" OR "cell culture") AND ("attention deficit disorder" OR "adhd")</p> |

2 Evaluation of the risk of bias by the adapted SYRCLEs tool

| Authors, year | 1. Was the allocation sequence adequately and applied? | 2. Were the groups similar at baseline or were they adjusted for confounders in the analysis? | 3. Was the allocation to the different groups adequately concealed during? | 4. Were the cell culture housed during the experiment? | 5. Were the caregivers and/or investigators blinded from knowledge which intervention each cell culture received during the experiment? | 6. Were culture cell selected for outcome assessment? | 7. Was the outcome assessor blinded? | 8. Were incomplete outcome data adequately addressed? | 9. Are reports of the study free of selective outcome reporting? | 10. Was the study apparently free of other problems that could result in high risk of bias? |
|----------------------------|--|---|--|--|---|---|--------------------------------------|---|--|---|
| Schmidt et al., 2010 | Yes | Unclear | Unclear | Yes | No | Yes | No | Unclear | Unclear | Unclear |
| Schmidt et al., 2010a | Yes | Unclear | Unclear | Yes | No | Yes | No | Unclear | Unclear | No |
| Schmidt et al., 2010b | Yes | Unclear | Unclear | Yes | No | Yes | No | Unclear | Unclear | Unclear |
| Nam et al., 2014 | Yes | Unclear | Unclear | Yes | No | Yes | No | Unclear | Unclear | Yes |
| Feio-Azevedo et al., 2017 | Yes | Unclear | Unclear | Yes | No | Yes | No | Unclear | Unclear | Yes |
| Bartl et al., 2010 | Yes | Unclear | Unclear | Yes | No | Yes | No | Unclear | Unclear | Yes |
| Bartl et al., 2014 | Yes | Unclear | Unclear | Yes | No | Yes | No | Unclear | Unclear | Unclear |
| Craenenbroeck et al., 2006 | Yes | Unclear | Unclear | Yes | No | Yes | No | Unclear | Unclear | Unclear |

| | | | | | | | | | | |
|-------------------------------|-----|---------|---------|-----|----|-----|----|---------|---------|---------|
| Wakamatsu et al., 2009 | Yes | Unclear | Unclear | Yes | No | Yes | No | Unclear | Unclear | No |
| Ludolph et al., 2010 | Yes | Unclear | Unclear | Yes | No | Yes | No | Unclear | Unclear | Unclear |
| Knorle et al., 2012 | Yes | Unclear | Unclear | Yes | No | Yes | No | Unclear | Unclear | Yes |
| Suter et al., 2006 | Yes | Unclear | Unclear | Yes | No | Yes | No | Unclear | Unclear | Unclear |
| Schwarz et al., 2014 | Yes | Unclear | Unclear | Yes | No | Yes | No | Unclear | Unclear | No |
| Kittel-Schneider et al., 2016 | Yes | Unclear | Unclear | Yes | No | Yes | No | Unclear | Unclear | Unclear |
| Zhao et al., 2007 | Yes | Unclear | Unclear | Yes | No | Yes | No | Unclear | Unclear | Unclear |
| Salviano et al., 2015 | Yes | Unclear | Unclear | Yes | No | Yes | No | Unclear | Unclear | Yes |

Notes: Evaluation of the risk of bias by the SYSystematic Review Centre for Laboratory animal Experimentation (SYRCLEs) Tool. The evaluation is done for each study and estimates the possibility of the existence of low or high risk of bias in their results.

3 Studies excluded after full reading

| Study (Authors, year) | Title | Reason for exclusion |
|-----------------------|---|--|
| Turano, 2017 | Activation of neonatal microglia can be influenced by other neural cells | Outcomes (not evaluate therapeutic option for ADHD) |
| Verma, 2016 | Attention Deficit-Hyperactivity Disorder suffers from mitochondrial dysfunction | Outcomes (not evaluate therapeutic option for ADHD) |
| Martinez, 2016 | An ultraconserved brain-specific enhancer within ADGRL3 (LPHN3) underpins Attention Deficit/Hyperactivity Disorder susceptibility | Outcomes (not evaluate therapeutic option for ADHD) |
| Haspula, 2016 | Heterologous regulation of the cannabinoid type 1 receptor by angiotensin II in astrocytes of spontaneously hypertensive rats | Outcomes (not evaluate therapeutic option for ADHD) |
| Lai, 2016 | Agonist-induced activation of histamine H3 receptor signals to extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 through PKC-, PLD-, and EGFR-dependent mechanisms | Outcomes (not evaluate therapeutic option for ADHD) |
| Wu, 2010 | Novel function of microRNA Let-7d in regulation of galectin-3 expression in Attention Deficit Hyperactivity Disorder rat brain | Outcomes (not evaluate therapeutic option for ADHD) |
| Zhong, 2016 | Aberrant regulation of synchronous network activity by the Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder-associated human dopamine D4 receptor variant D4.7 in the prefrontal cortex | Outcomes (not evaluate therapeutic option for ADHD) |
| Aoyama, 2016 | Prenatal nicotine exposure impairs the proliferation of neuronal progenitors, leading to fewer glutamatergic neurons in the medial prefrontal cortex | Outcomes (not evaluate therapeutic option for ADHD) |
| Tong, 2015 | Identification and functional characterisation of a novel dopamine beta hydroxylase gene variant associated with Attention Deficit Hyperactivity Disorder | Outcomes (not evaluate therapeutic option for ADHD) |
| Xia, 2015 | GRM7 regulates embryonic neurogenesis via CREB and YAP | Outcomes (not evaluate therapeutic option for ADHD) |
| Taniguchi, 2014 | Neural differentiation of pluripotent stem cells and application for metal-induced neural toxicity study | Outcomes (not evaluate therapeutic option for ADHD) |
| Glerup, 2014 | SorCS2 regulates dopaminergic wiring and is processed into an apoptotic two-chain receptor in peripheral glia | Outcomes (not evaluate therapeutic option for ADHD) |

| | | |
|----------------------|---|--|
| Addae, 2013 | Effect of the environmental pollutant hexachlorobenzene (HCB) on the neuronal differentiation of mouse embryonic stem cells | Outcomes (not evaluate therapeutic option for ADHD) |
| Mavroconstanti, 2013 | Functional properties of rare missense variants of human CDH13 found in adult Attention Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD) patients | Outcomes (not evaluate therapeutic option for ADHD) |
| Jolly, 2013 | The UPF3B gene, implicated in intellectual disability, autism, ADHD and childhood onset schizophrenia regulates neural progenitor cell behaviour and neuronal outgrowth | Outcomes (not evaluate therapeutic option for ADHD) |
| Johansson, 2013 | Decreased binding capacity (Bmax) of muscarinic acetylcholine receptors in fibroblasts from boys with Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD) | Outcomes (not evaluate therapeutic option for ADHD) |
| Hu, 2012 | Does developmental exposure to perfluorooctanoic acid (PFOA) induce immunopathologies commonly observed in neurodevelopmental disorders? | Outcomes (not evaluate therapeutic option for ADHD) |
| Wallis, 2012 | Initial characterization of mice null for Lphn3, a gene implicated in ADHD and addiction | Outcomes (not evaluate therapeutic option for ADHD) |
| O'Sullivan, 2012 | Postsynaptic FLRT proteins are endogenous ligands for the black widow spider venom receptor Latrophilin and regulate excitatory synapse development | Outcomes (not evaluate therapeutic option for ADHD) |
| Bymaster, 2012 | Pharmacological characterization of the norepinephrine and dopamine reuptake inhibitor EB-1020: implications for treatment of Attention-Deficit Hyperactivity Disorder | Outcomes (not evaluate therapeutic option for ADHD) |
| Johansson, 2011 | Altered tryptophan and alanine transport in fibroblasts from boys with Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD): an <i>in vitro</i> study | Outcomes (not evaluate therapeutic option for ADHD) |
| Yuen, 2011 | Cellular mechanisms for dopamine D4 receptor-induced homeostatic regulation of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptors | Outcomes (not evaluate therapeutic option for ADHD) |
| Dinklo, 2011 | Characterization of 2-[[4-Fluoro-3-(trifluoromethyl)phenyl]amino]-4-(4-pyridinyl)-5-thiazolemethanol (JNJ-1930942), a novel positive allosteric modulator of the alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor | Outcomes (not evaluate therapeutic option for ADHD) |
| Wu, 2017 | Nr3C1-Bhlhb2 axis dysregulation is involved in the development of Attention Deficit Hyperactivity | Outcomes (not evaluate therapeutic option for ADHD) |
| Akazawa, 2010 | Proteomic characterization of the striatum and midbrain treated with 6-hydroxydopamine: alteration of 58-kDa glucose-regulated protein and C/EBP homologous protein | Outcomes (not evaluate therapeutic option for ADHD) |

| | | |
|---------------------|--|--|
| Wu, 2009 | Regulation of monoamine oxidase A by the SRY gene on the Y chromosome | Outcomes (not evaluate therapeutic option for ADHD) |
| Akahoshi, 2009 | Effect of dioxins on regulation of tyrosine hydroxylase gene expression by aryl hydrocarbon receptor: a neurotoxicology study | Outcomes (not evaluate therapeutic option for ADHD) |
| Hu, 2009 | Norepinephrine transport-mediated gene expression in noradrenergic neurogenesis | Outcomes (not evaluate therapeutic option for ADHD) |
| McKinney, 2009 | Functional properties of missense variants of human tryptophan hydroxylase 2 | Outcomes (not evaluate therapeutic option for ADHD) |
| Scherer, 2009 | Selective noradrenaline reuptake inhibitor atomoxetine directly blocks hERG currents | Outcomes (not evaluate therapeutic option for ADHD) |
| Ferrari, 2009 | Gene expression profiling of cultured cells from brainstem of newborn spontaneously hypertensive and wistar kyoto rats | Outcomes (not evaluate therapeutic option for ADHD) |
| Cai, 2008 | SP1 regulates a human SNAP-25 gene expression | Outcomes (not evaluate therapeutic option for ADHD) |
| Jones, 2008 | Lead exposure during development results in increased neurofilament phosphorylation, neuritic beading, and temporal processing deficits within the murine auditory brainstem | Outcomes (not evaluate therapeutic option for ADHD) |
| Zhu, 2008 | Interactions of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder therapeutic agents with the efflux transporter P-glycoprotein | Outcomes (not evaluate therapeutic option for ADHD) |
| Kimura-Kuroda, 2007 | Disrupting effects of hydroxy-polychlorinated biphenyl (PCB) congeners on neuronal development of cerebellar Purkinje cells: a possible causal factor for developmental brain disorders? | Outcomes (not evaluate therapeutic option for ADHD) |
| Ciccone, 2006 | Potential interactions of methylphenidate and atomoxetine with dextromethorphan | Outcomes (not evaluate therapeutic option for ADHD) |
| Lau, 2006 | Synergistic interactions between commonly used food additives in a developmental neurotoxicity test | Outcomes (not evaluate therapeutic option for ADHD) |
| VanNess, 2005 | The variable number of tandem repeats element in DAT1 regulates <i>in vitro</i> dopamine transporter density | Outcomes (not evaluate therapeutic option for ADHD) |

| | | |
|-----------------|--|--|
| Smith, 2005 | Identification and characterization of human NR4A2 polymorphisms in Attention Deficit Hyperactivity Disorder | Outcomes (not evaluate therapeutic option for ADHD) |
| D'Souza, 2004 | Functional effects of a tandem duplication polymorphism in the 5'-flanking region of the DRD4 gene | Outcomes (not evaluate therapeutic option for ADHD) |
| Hazelwood, 2004 | His452Tyr polymorphism in the human 5-HT _{2A} receptor destabilizes the signaling conformation | Outcomes (not evaluate therapeutic option for ADHD) |
| Sun, 2004 | Methylphenidate is stereoselectively hydrolyzed by human carboxylesterase CES1A1 | Outcomes (not evaluate therapeutic option for ADHD) |
| Cowart, 2007 | A new family of histamine H ₃ receptor antagonists based on a natural product: discovery, SAR, and properties of the series | Outcomes (not evaluate therapeutic option for ADHD) |
| Gillis, 2011 | An <i>in vitro</i> evaluation of guanfacine as a substrate for P-glycoprotein | Outcomes (not evaluate therapeutic option for ADHD) |
| Ji, 2008 | Stimulation of α_2 -adrenoceptors suppresses excitatory synaptic transmission in the medial prefrontal cortex of rat | Outcomes (not evaluate therapeutic option for ADHD) |
| Dabe, 2013 | Chronic d-amphetamine administered from childhood to adulthood dose-dependently increases the survival of new neurons in the hippocampus of male C57BL/6J mice | Outcomes (data not extracted) |
| Sadasivan, 2012 | Methylphenidate exposure induces dopamine neuron loss and activation of microglia in the basal ganglia of mice | Outcomes (data not extracted) |
| McKinney, 2008 | A loss-of-function mutation in tryptophan hydroxylase 2 segregating with Attention Deficit/Hyperactivity Disorder | Study design (Letter to editor) |
| Hegvik, 2014 | Autoantibodies targeting neurotransmitter biosynthetic enzymes in Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD) | Study design (Letter to editor) |
| Lagace, 2007 | Hippocampal neurogenesis: a matter of survival | Study design (Letter to editor) |
| Manzi, 2002 | Methylphenidate produces a false-positive urine amphetamine screen | Study design (Letter to editor) |
| Mashour, 2011 | Focusing on Attention Deficit | Study design (Letter to editor) |
| Mossner, 2005 | Brain-derived neurotrophic factor V66M polymorphism in childhood-onset obsessive-compulsive disorder | Study design (Letter to editor) |

| | | |
|-------------------|---|-----------------------------|
| Arnsten, 2006 | Staying in touch with methylphenidate: ADHD and sensory processing. Focus on "Methylphenidate enhances noradrenergic transmission and suppresses mid- and long-latency sensory responses in the primary somatosensory cortex of awake rats" | Study design (Editorial) |
| Holdaway, 2001 | Elevated thyroid hormone levels with normal or raised thyroid-stimulating hormone: a diagnostic and therapeutic dilemma | Study design (Editorial) |
| Kasper, 2011 | The World Journal of Biological Psychiatry: vol 12 issue 2. Editorial. | Study design (Editorial) |
| Schmitt, 2012 | Post-mortem findings in mood disorders, nightmares and therapeutic approaches of psychiatric diseases | Study design (Editorial) |
| Rensburg, 2009 | Editorial | Study design (Editorial) |
| Benarroch, 2013 | Monoamine transporters: Structure, regulation, and clinical implications | Study design (Review) |
| Muldoon, 2013 | Immunologic privilege in the central nervous system and the blood-brain barrier | Study design (Review) |
| Kamibayashi, 2000 | Clinical uses of α 2-adrenergic agonists | Study design (Review) |
| Wonnacott, 1999 | Nicotine: not just for cigarettes anymore | Study design (Review) |
| Rotella, 2005 | American Chemical Society - 230th National Meeting Medicinal Chemistry. 28 August - 1 September 2005 | Study design (Abstract) |
| Silva, 2010 | Psychopharmacology news and views | Study design (Column) |
| Sora, 2007 | Monoamine transporter as a target molecule for psychostimulants | Study design (Chapter) |
| Steele, 2003 | Patent news | Study design (News) |
| Tracy, 2016 | Kaleidoscope | Study design |

4 Compositions of the media for culture of neuronal cells

| Authors, year | Cell culture | Media | Serum | Antibiotics | Others |
|--|--------------|-------|---------------------------|--|--|
| Feio-Azevedo et al., 2017 | SH-SY5Y | DMEM | 10% FBS | 1% penicillin and streptomycin (10.000 Units) | 1% non-essential amino acids |
| Nam et al., 2014 | | | 3% FBS | 100 IU/mL penicillin 100 µg/mL streptomycin | 1% L-glutamine (200mM) 1% sodium pyruvate (100mM) |
| Schmidt et al., 2010 Schmidt et al., 2010a Schmidt et al., 2010b | | RPMI | 15% FBS | 1% penicillin-streptomycin | 1% glutamine |
| Bartl et al., 2010 | PC12 | DMEM | 10% FBS 5% horse serum | 0,3% gentamycin (50mg/mL) | - |
| Bartl; Walitza; Grunblatt, 2014 | | | 10% FBS 5% horse serum | 0,3% gentamycin (50mg/mL) | 4,5mg/mL glucose |

SH-SY5Y: neuroblastoma SH-SY5Y; PC12: Rat pheochromocytoma; DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium; RPMI: Roswell Park Memorial Institute médium; FBS: Foetal bovine serum.

5 Main characteristics of the non-neuronal cell culture conditions

| Authors, year | Cell culture | Media | Supplementation | Temperature/ Atmosphere |
|-------------------------------|--------------|-----------|--|-----------------------------|
| Craenenbroeck et al., 2006 | HEK293rtTA | DMEM | 10% FBS 100 U/mL penicillin 0,1 mg/mL streptomycin 2nM Lglutamine | 37 °C 5% CO ₂ |
| Wakamatsu et al., 2009 | HEK-293 | MEM | - | - |
| Ludolph et al., 2010 | TsA201 | MEM | 10% FBS 50 U.mL ⁻¹ penicillin 50 µg.mL ⁻¹ streptomycin 2mM L-glutamine | 37 °C 5% CO ₂ |
| Knorle et al., 2012 | JAR | RPMI-1640 | 10% FBS 100 U/mL penicillin 100 mg/mL streptomycin L-glutamine | 37 °C 5% CO ₂ |
| Suter; Martus; Elhajouji 2006 | HL | RPMI | 20% FBS 100 Units/mL penicillin, 100 µL/mL streptomycin 37,5 µL/mL phytohaemagglutinin | 37 °C |
| Schwarz et al., 2014 | LCL | RPMI-1640 | 17,5 mL FBS 1,1 mL glutamine/100mL | 37 °C 5% CO ₂ |
| Kittel-Schneider et al., 2016 | PBMC | RPMI-1640 | 75 mL FBS 50U/mL penicillin 50µg/mL streptomycin 5 mL L-glutamine (200mM) 5 mL sodium pyruvate 5 mL nonessential aminoacids 0,5 mL tylosin | 37 °C 5% CO ₂ |
| Craenenbroeck et al., 2006 | L929sA | DMEM | 5% fetal calf serum- 5% newborn calf serum 100 U/mL penicillin 0,1 mg/mL streptomycin 2nM Lglutamine | 37 °C 5% CO ₂ |
| Craenenbroeck et al., 2006 | CHO | MEM | 10% fetal calf sérum 100 U/mL penicillin 0,1 mg/mL streptomycin 2nM Lglutamine | 37 °C 5% CO ₂ |
| Zhao et al., 2007 | CHO | RPMI-1640 | 10% FBS | - |
| Salviano et al., 2015 | MDCK | RPMI-1640 | 10% FBS 1% penicillin/streptomycin | 37 °C 5% CO ₂ |

HEK293rtTA cells: Human embryonic kidney cells expressing the tetracycline transactivator HEK-293: Human Embryonic Kidney; TsA201: Transformed human embryonic kidney; JAR: Human choriocarcinoma; HL: Human lymphocytes; LCL: Lymphoblastoid Cell Lines; PBMC: Peripheral blood mononuclear cells; L929sA: Cells mouse fibrosarcoma; CHO: Chinese Hamster Ovary; MDCK: Madin-Darby Canine Kidney; MEM: Minimum Essential Medium; DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium, RPMI: Roswell Park Memorial Institute médium; DEM/F-12: Minimim Essencial Media/Nutrient mixture; FBS: Foetal bovine serum.

6 Methods of evaluating cell viability

Different methods can be used to evaluate cell viability, which evaluate one or more cellular function, such as (ADAN; KIRAZ; BARAN, 2016):

(1) Mitochondrial activity (MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina], XTT [2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino) carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide], MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium], WST [2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium]).

(2) Cell membrane integrity (azul de trypan, atividade da lactato desidrogenase [LDH], G6PD Release).

(3) Cell metabolism (alamar blue, calcein-acetomethoxy [calcein AM], atividade da lactato desidrogenase [LDH], G6PD Release).

(4) ATP production (ATP content).

(5) DNA replication (H3 thymidine uptake, BrdU, Ki-67 antigen, PCNA detection).

(6) Cellular protein content (sulforhodamine B).

(7) Differential protease activity (protease viability marker).

(8) Proliferation ability of the cell (clonogenic cell survival).

(9) DNA replication and cell division (Ki-67 Antigen, phospho-histone H3 detection).

(10) Interaction of electromagnetic radiation with the sample molecule (raman microspectrometry).

7 Characteristics of cell viability and proliferation assays performed in the studies included in the systematic review

| | MTT | LDH | Conteúdo de ATP | BrdU |
|--|--|---|---|---|
| Principle of action (Adan; Kiraz; Baran, 2016) | Mitochondrial activity | Cell membrane integrity and metabolism | ATP production | DNA replication |
| Advantages (Crouch et al., 1993; Berridge; Herst; Tan, 2005; Taupin, 2007; Sumantran, 2011; Adan; Kiraz; Baran, 2016) | <ul style="list-style-type: none"> - Widely used - Detect cytotoxic effects - Detect IC50 value* | <ul style="list-style-type: none"> - Widely used - Detect the cytotoxic effects | <ul style="list-style-type: none"> - Short time protocol - High sensitivity - Detect the cytotoxic effects | <ul style="list-style-type: none"> - Reduced time and equipment - Use of several simultaneous techniques and processes |
| Disadvantages (Scudiero et al., 1998; Berridge; Herst; Tan, 2005; Wolterbeek; van deer Meer, 2005; Bopp; Lettieri, 2008; Cavanagh et al., 2011; Sumantran, 2011; Adan; Kiraz; Baran, 2016) | <ul style="list-style-type: none"> - Not convenient for follow-up studies - Not possible to distinguish cytotoxic and cytostatic | <ul style="list-style-type: none"> - LDH half-life in the culture medium and the sensitivity are limited - The endogenous LDH activity can interfere with LDH level in the culture medium and generate false positive results | <ul style="list-style-type: none"> - Not possible to distinguish cytotoxic and cytostatic | <ul style="list-style-type: none"> - Conditions for detection of BRdU can cell disruption and degrade proteins and nucleic acids |

*IC50 value: 50% half maximal inhibitory concentration.

REFERENCES

- [1] Yao, T.; Asayama, Y. Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues. *Reprod. Med. Biol.*, **2017**, *16*(2), 99-117. [<http://dx.doi.org/10.1002/rmb2.12024>] [PMID: 29259457]
- [2] Carter, M.; Shieh, J.C. Guide to Research Techniques in Neuroscience. *Cell culture techniques.*, **2010**, 281-296.
- [3] Simon, V.; Czobor, P.; Bálint, S.; Mészáros, A.; Bitter, I. Prevalence and correlates of adult attention-deficit hyperactivity disorder: meta-analysis. *Br. J. Psychiatry*, **2009**, *194*(3), 204-211. [<http://dx.doi.org/10.1192/bjp.bp.107.048827>] [PMID: 19252145]
- [4] American Psychiatry Association (APA). Diagnostic and statistical manual of mental disorders. *Fifth Edition. American Psychiatric Publishing.*, (5th ed.), **2013**.
- [5] Polanczyk, G.V.; Salum, G.A.; Sugaya, L.S.; Caye, A.; Rohde, L.A. Annual research review: A meta-analysis of the worldwide prevalence of mental disorders in children and adolescents. *J. Child Psychol. Psychiatry*, **2015**, *56*(3), 345-365. [<http://dx.doi.org/10.1111/jcpp.12381>] [PMID: 25649325]
- [6] Thomas, R.; Sanders, S.; Doust, J.; Beller, E.; Glasziou, P. Prevalence of attention-deficit/hyperactivity disorder: a systematic review and meta-analysis. *Pediatrics*, **2015**, *135*(4), e994-e1001. [<http://dx.doi.org/10.1542/peds.2014-3482>] [PMID: 25733754]
- [7] Schmidt, A.J.; Krieg, J.C.; Clement, H.W.; Gebhardt, S.; Schulz, E.; Heiser, P. Impact of drugs approved for treating ADHD on the cell survival and energy metabolism: an *in-vitro* study in human neuronal and immune cells. *J. Psychopharmacol. (Oxford)*, **2010a**, *24*(12), 1829-1833. [<http://dx.doi.org/10.1177/0269881109105563>] [PMID: 19605603]
- [8] Schmidt, A.J.; Krieg, J.C.; Hemmeter, U.M.; Kircher, T.; Schulz, E.; Clement, H.W.; Heiser, P. Impact of plant extracts tested in attention-deficit/hyperactivity disorder treatment on cell survival and energy metabolism in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Phytother. Res.*, **2010b**, *24*(10), 1549-1553. [<http://dx.doi.org/10.1002/ptr.3198>] [PMID: 20878709]
- [9] Knorle, R. Extracts of *Sideritis scardica* as triple monoamine reuptake inhibitors. *J. Neural Transm. (Vienna)*, **2012**, *119*(12), 1477-1482. [<http://dx.doi.org/10.1007/s00702-012-0824-9>] [PMID:22622367]
- [10] Feio-Azevedo, R.; Costa, V.M.; Ferreira, L.M.; Branco, P.S.; Pereira, F.C.; Bastos, M.L.; Carvalho, F.; Capela, J.P. Toxicity of the amphetamine metabolites 4-hydroxyamphetamine and 4-hydroxynorephedrine in human dopaminergic differentiated SHSY5Y cells. *Toxicol. Lett.*, **2017**, *269*, 65-76. [<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.01.012>] [PMID: 28115274]
- [11] Thapar, A.; Cooper, M. Attention deficit hyperactivity disorder. *Lancet*, **2016**, *387*(10024), 1240-1250. [[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00238-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00238-X)] [PMID: 26386541]
- [12] Li, Y.; Gao, J.; He, S.; Zhang, Y.; Wang, Q. An evaluation on the efficacy and safety of treatments for Attention Deficit Hyperactivity Disorder in children and adolescents: a comparison of multiple treatments. *Mol. Neurobiol.*, **2017**, *54*(9), 6655-6669. [<http://dx.doi.org/10.1007/s12035-016-0179-6>] [PMID: 27738872]
- [13] Van Craenenbroeck, K.; Gellynck, E.; Lintermans, B.; Leysen, J.E.; Van Tol, H.H.; Haegeman, G.; Vanhoenacker, P. Influence of the antipsychotic drug pipamperone on the

expression of the dopamine D4 receptor. *Life Sci.*, **2006**, *80*(1), 74-81. [http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2006.08.024] [PMID: 16978659]

[14] Suter, W.; Martus, H-J.; Elhajouji, A. Methylphenidate is not clastogenic in cultured human lymphocytes and in the mouse bone-marrow micronucleus test. *Mutat. Res.*, **2006**, *607*(2), 153-159. [http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2006.02.004] [PMID: 16829163]

[15] Zhao, G.; Li, S.; Qin, G-W.; Fei, J.; Guo, L-H. Inhibitive effects of *Fructus Psoraleae* extract on dopamine transporter and noradrenaline transporter. *J. Ethnopharmacol.*, **2007**, *112*(3), 498-506. [http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2007.04.013] [PMID: 17555897]

[16] Wakamatsu, A.; Nomura, S.; Tate, Y.; Shimizu, S.; Harada, Y. Effects of methylphenidate hydrochloride on the cardiovascular system *in vivo* and *in vitro*: a safety pharmacology study. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, **2009**, *59*(3), 128-134. [http://dx.doi.org/10.1016/j.vascn.2009.01.003] [PMID: 19281853]

[17] Ludolph, A.G.; Udvardi, P.T.; Schaz, U.; Henes, C.; Adolph, O.; Weigt, H.U.; Fegert, J.M.; Boeckers, T.M.; Föhr, K.J. Atomoxetine acts as an NMDA receptor blocker in clinically relevant concentrations. *Br. J. Pharmacol.*, **2010**, *160*(2), 283-291. [http://dx.doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00707.x] [PMID: 20423340]

[18] Bartl, J.; Walitza, S.; Grünblatt, E. Enhancement of cell viability after treatment with polyunsaturated fatty acids. *Neurosci. Lett.*, **2014**, *559*, 56-60. [http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2013.11.023] [PMID: 24269370]

[19] Schwarz, R.; Reif, A.; Scholz, C-J.; Weissflog, L.; Schmidt, B.; Lesch, K-P.; Jacob, C.; Reichert, S.; Heupel, J.; Volkert, J.; Kopf, J.; Hilscher, M.; Weber, H.; Kittel-Schneider, S. A preliminary study on methylphenidate-regulated gene expression in lymphoblastoid cells of ADHD patients. *World J. Biol. Psychiatry*, **2014**, *16*(3), 180-189. [http://dx.doi.org/10.3109/15622975.2014.948064] [PMID: 25162476]

[20] Kittel-Schneider, S.; Spiegel, S.; Renner, T.; Romanos, M.; Reif, A.; Reichert, S.; Heupel, J.; Schnetzler, L.; Stopper, H.; Jacob, C. Cytogenetic effects of chronic methylphenidate treatment and chronic social stress in adults with Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *Pharmacopsychiatry*, **2016**, *49*(4), 146-154. [http://dx.doi.org/10.1055/s-0035-1569361] [PMID: 26926233]

[21] Salviano, L.H.M.S.; Linhares, M.I.; de Lima, K.A.; de Souza, A.G.; Lima, D.B.; Jorge, A.R.C.; da Costa, M.F.; Filho, A.J.M.C.; Martins, A.M.C.; Monteiro, H.S.A.; de Jesus Ponte Carvalho, T.M.; de França Fonteles, M.M. Study of the safety of methylphenidate: Focus on nephrotoxicity aspects. *Life Sci.*, **2015**, *141*, 137-142. [http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2015.09.014] [PMID: 26407472]

[22] Arora, M. Cell culture media: a review. **2013**. <https://www.labome.com/method/Cell-Culture-Media-AReview.html> [http://dx.doi.org/10.13070/mm.en.3.175]

[23] Larson, D.R.; Singer, R.H.; Zenklusen, D. A single molecule view of gene expression. *Trends Cell Biol.*, **2009**, *19*(11), 630-637. [http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2009.08.008] [PMID: 19819144]

[24] Xie, H.R.; Hu, L.S.; Li, G.Y. SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: *in vitro* cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Chin. Med. J. (Engl.)*, **2010**, *123*(8), 1086-1092. [PMID: 20497720]

- [25] Adan, A.; Kiraz, Y.; Baran, Y. Cell proliferation and cytotoxicity assays. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, **2016**, *17*(14), 1213-1221. [<http://dx.doi.org/10.2174/1389201017666160808160513>] [PMID: 27604355]
- [26] Viswanath, B.; Jose, S.P.; Squassina, A.; Thirthalli, J.; Purushottam, M.; Mukherjee, O.; Vladimirov, V.; Patrinos, G.P.; Del Zompo, M.; Jain, S. Cellular models to study bipolar disorder: A systematic review. *J. Affect. Disord.*, **2015**, *184*, 36-50. [<http://dx.doi.org/10.1016/j.jad.2015.05.037>] [PMID: 26070045]
- [27] Xicoy, H.; Wieringa, B.; Martens, G.J.M. The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review. *Mol. Neurodegener.*, **2017**, *12*(1), 10. [<http://dx.doi.org/10.1186/s13024-017-0149-0>] [PMID: 28118852]
- [28] Liberati, A.; Altman, D.G.; Tetzlaff, J.; Mulrow, C.; Gotzsche, P.C.; Ioannidis, J.P.A.; Clarke, M.; Devereaux, P.J.; Kleijnen, J.; Moher, D. The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate health care interventions: Explanation and elaboration. *BMJ*, **2007**, , 339.
- [29] Higgins, J.P.T.; Green, S. Cochrane handbook for systematic reviews of interventions *The Cochrane Collaboration.*, **2010**.<http://handbook.cochrane.org/>
- [30] Joanna Briggs Institute. Methodology for JBI scoping reviews *Joanna Briggs Institute. Joanna Briggs Institute Reviewers' Manual: 2015 edition*, <https://joannabriggs.org/assets/docs/sumari/Reviewers-Manual_Methodology-for-JBI-Scoping-Reviews_2015_v2.pdf>. **2018**.
- [31] Hooijmans, C.R.; Rovers, M.M.; de Vries, R.B.; Leenaars, M.; Ritskes-Hoitinga, M.; Langendam, M.W. SYRCLE's risk of bias tool for animal studies. *BMC Med. Res. Methodol.*, **2014**, *14*, 43. [<http://dx.doi.org/10.1186/1471-2288-14-43>] [PMID: 24667063]
- [32] Bartl, J.; Link, P.; Schlosser, C.; Gerlach, M.; Schmitt, A.; Walitza, S.; Riederer, P.; Grünblatt, E. Effects of methylphenidate: the cellular point of view. *Atten. Defic. Hyperact. Disord.*, **2010**, *2*(4), 225-232. [<http://dx.doi.org/10.1007/s12402-010-0039-6>] [PMID: 21432609]
- [33] Schmidt, A.J.; Clement, H-W.; Gebhardt, S.; Hemmeter, U.M.; Schulz, E.; Krieg, J-C.; Kircher, T.; Heiser, P. Impact of psychostimulants and atomoxetine on the expression of 8-hydroxyguanine glycosylase 1 in human cells. *J. Neural Transm. (Vienna)*, **2010**, *117*(6), 793-797. [<http://dx.doi.org/10.1007/s00702-010-0408-5>] [PMID: 20467764]
- [34] Nam, Y.; Shin, E-J.; Shin, S.W.; Lim, Y.K.; Jung, J.H.; Lee, J.H.; Ha, J.R.; Chae, J.S.; Ko, S.K.; Jeong, J.H.; Jang, C-G.; Kim, H-C. YY162 prevents ADHD-like behavioral side effects and cytotoxicity induced by Aroclor1254 *via* interactive signaling between antioxidant potential, BDNF/TrkB, DAT and NET. *Food Chem. Toxicol.*, **2014**, *65*, 280-292. [<http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2013.12.046>] [PMID: 24394491]
- [35] Biedler, J.L.; Helson, L.; Spengler, B.A. Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res.*, **1973**, *33*(11), 2643-2652. [PMID: 4748425]
- [36] Shafer, T.J.; Atchison, W.D. Transmitter, ion channel and receptor properties of pheochromocytoma (PC12) cells: a model for neurotoxicological studies. *Neurotoxicology*, **1991**, *12*(3), 473-492. [PMID: 1720882]

- [37] Shipley, M.M.; Mangold, C.A.; Szpara, M.L. Differentiation of the SH-SY5Y human neuroblastoma cell line. *J. Vis. Exp.*, **2016**, *108*(108), 53193. [PMID: 26967710]
- [38] Ferreira, P.S.; Nogueira, T.B.; Costa, V.M.; Branco, P.S.; Ferreira, L.M.; Fernandes, E.; Bastos, M.L.; Meisel, A.; Carvalho, F.; Capela, J.P. Neurotoxicity of "ecstasy" and its metabolites in human dopaminergic differentiated SH-SY5Y cells. *Toxicol. Lett.*, **2013**, *216*(2-3), 159-170. [<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2012.11.015>] [PMID: 23194825]
- [39] Bustin, S.A.; Nolan, T. Pitfalls of quantitative real-time reversetranscription polymerase chain reaction. *J. Biomol. Tech.*, **2004**, *15*(3), 155-166. [PMID: 15331581]
- [40] Sharp, S.I.; McQuillin, A.; Gurling, H.M.D. Genetics of attentiondeficit hyperactivity disorder (ADHD). *Neuropharmacology*, **2009**, *57*(7-8), 590-600. [<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2009.08.011>] [PMID: 19715710]
- [41] Food and Drug Administration (FDA). S7B Nonclinical evaluation of the potential for delayed ventricular repolarization (QT interval prolongation) by Human Pharmaceuticals *Guidance for Industry*, **2005**.
- [42] Ioannidis, J.P. Why most published research findings are false. *PLoS Med.*, **2005**, *2*(8), e124. [<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pmed.0020124>] [PMID: 16060722]
- [43] Collins, F.S.; Tabak, L.A. Policy: NIH plans to enhance reproducibility. *Nature*, **2014**, *505*(7485), 612-613. [<http://dx.doi.org/10.1038/505612a>] [PMID: 24482835]
- [44] Fiala, C.; Diamandis, E.P. How to reduce scientific irreproducibility: the 5-year reflection. *Clin. Chem. Lab. Med.*, **2017**, *55*(12), 1845-1848. [<http://dx.doi.org/10.1515/cclm-2017-0759>] [PMID: 29031017]
- [45] Begley, C.G.; Ioannidis, J.P. Reproducibility in science: improving the standard for basic and preclinical research. *Circ. Res.*, **2015**, *116*(1), 116-126. [<http://dx.doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.303819>] [PMID: 25552691]
- [46] Lieu, C.H.; Tan, A.C.; Leong, S.; Diamond, J.R.; Eckhardt, S.G. From bench to bedside: lessons learned in translating preclinical studies in cancer drug development. *J. Natl. Cancer Inst.*, **2013**, *105*(19), 1441-1456. [<http://dx.doi.org/10.1093/jnci/djt209>] [PMID: 24052618]
- [47] Wu, X.; Lin, M.; Li, Y.; Zhao, X.; Yan, F. Effects of DMEM and RPMI 1640 on the biological behavior of dog periosteum-derived cells. *Cytotechnology*, **2009**, *59*(2), 103-111. [<http://dx.doi.org/10.1007/s10616-009-9200-5>] [PMID: 19496017]
- [48] Huang, Z.; Shao, W.; Gu, J.; Hu, X.; Shi, Y.; Xu, W.; Huang, C.; Lin, D. Effects of culture media on metabolic profiling of the human gastric cancer cell line SGC7901. *Mol. Biosyst.*, **2015**, *11*(7), 1832-1840. [<http://dx.doi.org/10.1039/C5MB00019J>] [PMID: 25925870]
- [49] Brunner, D.; Frank, J.; Appl, H.; Schöffl, H.; Pfaller, W.; Gstraunthaler, G. Serum-free cell culture: the serum-free media interactive online database. *ALTEX*, **2010**, *27*(1), 53-62. [<http://dx.doi.org/10.14573/altex.2010.1.53>] [PMID: 20390239]
- [50] Perlman, D. Use of antibiotics in cell culture media. *Methods Enzymol.*, **1979**, *58*, 110-116. [[http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879\(79\)58128-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879(79)58128-2)] [PMID: 423753]

- [51] Mazzio, E.; Soliman, K.F.A. Pyruvic acid cytoprotection against 1-methyl-4 phenylpyridinium, 6-hydroxydopamine and hydrogen peroxide toxicities *in vitro*. *Neurosci. Lett.*, **2003**, 337(2), 77-80. [[http://dx.doi.org/10.1016/S0304-3940\(02\)01327-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-3940(02)01327-7)] [PMID: 12527392]
- [52] Wang, X.; Perez, E.; Liu, R.; Yan, L-J.; Mallet, R.T.; Yang, S-H. Pyruvate protects mitochondria from oxidative stress in human neuroblastoma SK-N-SH cells. *Brain Res.*, **2007**, 1132(1), 1-9. [<http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2006.11.032>] [PMID: 17174285]
- [53] Pasieka, A.E.; Morgan, J.F. Glutamine metabolism of normal and malignant cells cultivated in synthetic media. *Nature*, **1959**, 183(4669), 1201-1202. [<http://dx.doi.org/10.1038/1831201a0>] [PMID: 13657053]
- [54] Yang, H.; Wang, J.; Sun, J.; Liu, X.; Duan, W-M.; Qu, T. A new method to effectively and rapidly generate neurons from SH-SY5Y cells. *Neurosci. Lett.*, **2016**, 610(610), 43-47. [<http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2015.10.047>] [PMID: 26497914]
- [55] Bustin, S.A. Real-time reverse transcription PCR. *Encyclopedia of Diagnostic Genomics and Proteomics*, **2005**.
- [56] Bustin, S.A.; Benes, V.; Garson, J.A.; Hellems, J.; Huggett, J.; Kubista, M.; Mueller, R.; Nolan, T.; Pfaffl, M.W.; Shipley, G.L.; Vandesompele, J.; Wittwer, C.T. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.*, **2009**, 55(4), 611-622. [<http://dx.doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>] [PMID: 19246619]
- [57] Taylor, S.; Wakem, M.; Dijkman, G.; Alsarraj, M.; Nguyen, M. A practical approach to RT-qPCR-Publishing data that conform to the MIQE guidelines. *Methods*, **2010**, 50(4), S1-S5. [<http://dx.doi.org/10.1016/j.ymeth.2010.01.005>] [PMID: 20215014]
- [58] Chiarotto, A.; Ostelo, R.W.; Turk, D.C.; Buchbinder, R.; Boers, M. Core outcome sets for research and clinical practice. *Braz. J. Phys. Ther.*, **2017**, 21(2), 77-84. [<http://dx.doi.org/10.1016/j.bjpt.2017.03.001>] [PMID: 28460714]
- [59] Clarke, M.; Williamson, P.R. Core outcome sets and systematic reviews. *Syst. Rev.*, **2016**, 5, 11. [<http://dx.doi.org/10.1186/s13643-016-0188-6>] [PMID: 26792080]
- [60] Coecke, S.; Balls, M.; Bowe, G.; Davis, J.; Gstraunthaler, G.; Hartung, T.; Hay, R.; Merten, O-W.; Price, A.; Schechtman, L.; Stacey, G.; Stokes, W. Guidance on good cell culture practice. a report of the second ECVAM task force on good cell culture practice. *Altern. Lab. Anim.*, **2005**, 33(3), 261-287. [PMID: 16180980].

5 CAPÍTULO 2 - IMPACTO DA ESPÉCIE VEGETAL *Limonium brasiliense* NA VIABILIDADE DE CÉLULAS NEUROBLASTOMA HUMANO SH-SY5Y

Impact of plant species *Limonium brasiliense* on neuroblastoma SH-SY5Y human cells viability

1 INTRODUCTION

Species of plants rich in phenolic substances have been investigated in the field of neurological disorders such as Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD), Alzheimer's and Parkinson's disease due to the antioxidant, anti-inflammatory, and neuroprotective activity (KIM, 2010; SCHMIDT et al., 2010; KUMAR; KHANUM, 2012; SEREIA et al., 2019; SHARIFI-RAD et al., 2020).

A plant species representative of Brazilian biodiversity is the *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze, popularly known as “baicuru, guaicuru, guaicurá”, a native and non-endemic terrestrial herb from Brazil, occurring in the Atlantic Rainforest and Pampa phytogeographic domains, present in the states of Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, and Rio de Janeiro (DIAS DA SILVA, 1920; FUNEZ, 2021). This is the only specie of the genus in the country, which rhizomes are rich in phenolic compounds, responsible for various biological activities, including antioxidant capacity (MURRAY et al., 2004; SEREIA et al., 2019), antimicrobial (ROSITO, 1975; FARAL-TELLO et al., 2012; BLAINSKI et al., 2017; CALEARE et al., 2017; CORDEIRO, 2017; ISOLANI, 2018), anti-inflammatory (MOURA et al., 1985; RODRIGUES et al., 2011), and hormonal activity (BLAINSKI, 2010; ANTONELLI-USHIROBIRA et al., 2015a, 2015b).

Assays with cell lines have been widely used for screening new compounds. The primary pharmacological evaluation, using *in vitro* assays, provides informative data through the colorimetric methods, with the advantage to decrease the number of substances for animal testing, directing the compounds with more promising biological activity (HENRIQUES; SAMPAIO, 2002; ARORA, 2016; ADAN; KIRAZ; BARAB, 2016). In the neurological field, we highlight the use of the human neuroblastoma (NB) cell culture SH-SY5Y, a subclone derived from the SK-N-SH cell line, established in 1970 from a bone marrow biopsy of a metastatic tumor. Cultures can grow in multilayers and form dense cell clusters and include adherent and floating cells, with the discard the floating cells during culture media changes (BIEDLER; HELSON; SPENGLER, 1973; KOVALEVICH; LANGFORD, 2013; XICOY; WIERINGA; MARTENS, 2017; CHIERRITO, 2019; SEREIA et al., 2019).

In the literature, only one study used neuroblastoma SH-SY5Y cells as an *in vitro* model for the evaluation of the effects of the ethyl acetate fraction (EAF) of the rhizomes of *L.*

brasiliense. Cell viability was assessed using MTT assay and was not reported cytotoxicity after 24 h of treatment at concentrations 7.81, 15.62, 31.25 and 62.5 µg/mL. In addition, a cytoprotection assay was performed, with pretreatment in concentrations 7.81 to 31.25 µg/mL of EAF, able to protect the cells against the damage induced by the βA_{25-35} fragment, a structural biomarker related to the disease of Alzheimer's (SEREIA et al., 2019). It is noted that this species has ample potential to be explored.

According to a systematic review that synthesized information on cell cultures as research models for assessing options with therapeutic potential, after choosing the cell line and defining laboratory cultivation conditions, the first methodology that can be performed is cell viability (CHIERRITO et al., 2019). Thus, the aim of this study was to evaluate *in vitro* the impact of semi-purified extracts and isolated substances of *L. brasiliense* rhizome on the viability of human NB SH-SY5Y cells.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Chemicals

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin-streptomycin solution and trypsin were obtained from Gibco® by Life Technologies Inc. MTT was obtained from Sigma-Aldrich®. Sodium bicarbonate (NaHCO₃), potassium chloride (KCl), potassium monobasic phosphate (KH₂PO₄), sodium chloride (NaCl), anhydrous sodium dibasic phosphate (Na₂HPO₄), and dimethyl sulfoxide (DMSO) was obtained from Synth® (Labsynth, São Paulo, Brazil). Samarangenin A, samarangenin B, and epigallocatechin-3-O-gallate were isolated from ethyl acetate fraction (EAF) of *L. brasiliense* by our research group (ISOLANI, 2018). All other chemicals used were of the highest commercially available grade.

2.2 Plant materials

Rhizomes of *L. brasiliense* were collected in February 2013 on the Ilha dos Marinheiros, in the city of Rio Grande, Rio Grande do Sul State, Brazil (31°59'33" S; 52°10'43" W), with permission from IBAMA-SISBIO (nº. 11995-3, November 2, 2010, authentication code 46367613 under the responsibility of J. C. P. Mello). Identification at the specific level was performed by Prof. Dr. Lilian Auler Mentz from the Universidade Federal do Rio Grande do Sul. A voucher specimen was deposited in the Herbarium of the Universidade Estadual de Maringá (HUEM) (nº. 27725). Access to the botanical material was authorized and licensed by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), registered under nº. 010252/2015-0.

2.3 Preparation of crude extract and semipurified fractions

The crude extract (CE), ethyl acetate fraction (EAF), and aqueous fraction (AF) of *L. brasiliense* were prepared as previously described (MELLO; PETEREIT; NAHRSTEDT, 1996; BLAINSKI; LOPES; MELLO, 2013). The CE and fractions were concentrated in a rotary evaporator (Büchi® R-200) under reduced pressure, frozen in liquid nitrogen, and lyophilized.

2.4 Isolated of majority substances

The majority substances samarangenin A (SA), samarangenin B (SB), and epigallocatechin-3-O-gallate (EGCG) were isolated from the EAF of *L. brasiliense* as previously described (ISOLANI, 2018). The purity of all substances was analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC), as described by Isolani (2018).

2.5 Culture conditions

Human neuroblastoma SH-SY5Y cell line (ATCC® CRL-2266™) were kindly provided by Prof. Dr. Catarina Satie Takahashi from Universidade de São Paulo (Ribeirão Preto, Brazil). The cells were grown in 25 cm² or 75 cm² culture flasks with 6.0 mL or 11.0 mL of DMEM medium in pH 7.2, respectively, supplemented with 10.0% FBS, 1.0% penicillin-streptomycin solution, and 3.7 g sodium bicarbonate under incubation conditions of 37.0 °C in a humid atmosphere with 5.0% CO₂. The cells were detached with 0.1% trypsin-EDTA after ≥ 90% confluent. The medium's renewal was accomplished twice a week. All experiments were done using cells from passage 32-39. The cells were frozen with FBS plus 10.0% DMSO.

2.5.1 Determination of cell viability

The cell viability was evaluated by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) described by Mosmann (1983) with adaptations. This methodology allows evaluating the metabolic activity of viable cells. Some oxidoreductase enzymes may, under defined conditions, reflect the number of viable cells present in the sample. These enzymes are capable of reducing colorless tetrazolium salts to insoluble crystals, known as formazan {(E, Z)-5-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-1,3-diphenylformazan} crystals, that give the sample purple coloration due to the metabolization of mitochondrial dehydrogenases (MOSMANN, 1983).

An aliquot of 100 µL of a cell suspension in culture medium DMEM supplemented with 10.0% FBS and a density of 5.0 x 10⁵ cells/mL were placed in each well of a 96-well culture plate. After 24 h of grown and confluent monolayer formation at 37.0 °C and 5.0% CO₂, the culture medium was replaced by the treatments: CE, EAF, and AF at serial concentrations of 7.81, 15.63, 31.25, 62.5, 125.0, 250.0, 500.0, and 1000.0 µg/mL, and isolated substances at

concentrations of 5.0, 10.0, 20.0, 30.0, 40.0 and 50.0 μM , all solubilized in DMEM (0.5% DMSO). Control conditions were DMEM and DMEM plus 0.5% DMSO. The plates were incubated for 24 and 48 h. The treatments were removed, each well was washed with PBS. 100 μL of MTT (500.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in DMEM FBS free), after were added to all wells and the plates were incubated for 4 h, at 37.0 $^{\circ}\text{C}$ and 5.0% CO_2 , light protected. MTT solution was removed and 100 μL of DMSO were added to dissolve the purple crystals. The plates were shaken for 1.5 min and absorbance in 570 nm was determined in Epoch 2 (microplates spectrophotometer, BioTek[®]). The cytotoxicity was calculated according to the following equation [1]:

$$\text{Cell viability (\%)} = (\text{absorbance of sample}/\text{absorbance of control sample}) \times 100 \text{ [1]}$$

Negative control values were considered as 100.0% cell viability. Three independent assays were performed for each sample. Analytical concentrations were tested at least in triplicate.

2.6 Statistical analysis

Data were presented as the mean \pm standard deviation (SD) of three replicates for each experiment. Two-way analysis of variance (ANOVA) was performed to detect significant differences between samples. Statistically significant differences were defined as a p -value $<$ 0.05, conducted in GraphPad Prism[®] 6 software.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Determination of cell viability

The effects of the CE, EAF, AF, and isolated substances of *L. brasiliense* on cell viability in neuroblastoma SH-SY5Y cells were evaluated in an *in vitro* model.

The assays showed a concentration-dependent activity of CE, EAF, and AF of *L. brasiliense* on neuroblastoma SH-SY5Y human cells viability at 24 h and 48 h (Figure 1A and 1B). The reduction in viability occurred as the concentration of each tested sample increased, most evident in 62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Regarding the control, there was a significant statistical difference in all samples in each concentration. The same was found when comparing samples at each concentration. The maximum DMSO concentration used (0.5%) did not affect cell growth.

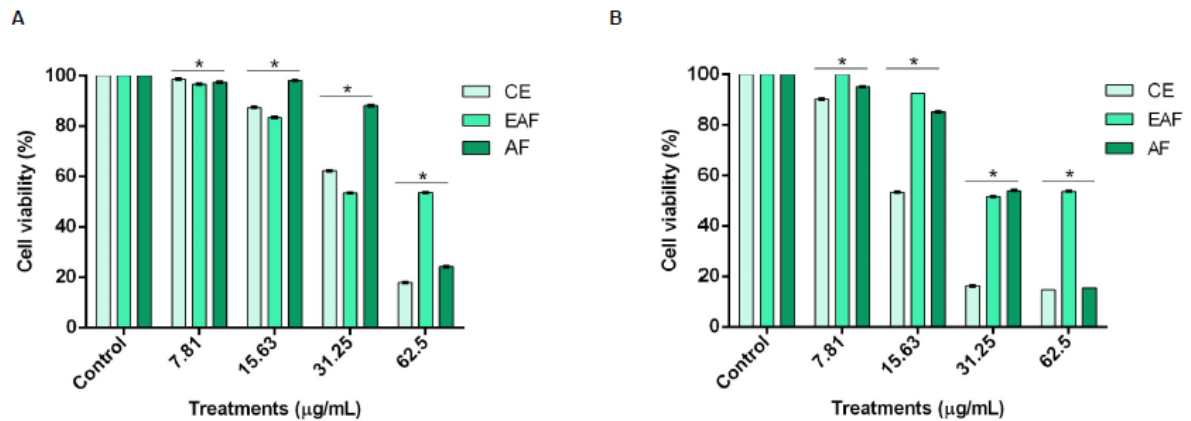


Figure 1. Effects of crude extract (CE), ethyl acetate fraction (EAF), and aqueous fraction (AF) of *L. brasiliense* in neuroblastoma SH-SY5Y cells treated with different concentrations (7.81, 15.63, 31.25, and 62.5 $\mu\text{g/mL}$) at 24 h (A) and 48 h (B). Control corresponds to 100% cell viability. Cell viability was measured by MTT colorimetric assay. Data are presented as mean \pm SD of three replicates. *Statistically significant difference between treatments and the control and between treatments at the same concentration by ANOVA ($p < 0.05$), conducted in GraphPad Prism[®] 6 software.

Regarding the concentration of samples that was cytotoxic for 50% of cells (CC_{50}), the values corresponding to the treatment were presented in Table 1. The CC_{50} ranged from 33.00 ± 3.00 to 47.45 ± 1.97 $\mu\text{g/mL}$ for the treatment of 24 h, and 19.46 ± 1.52 to 39.66 ± 3.49 $\mu\text{g/mL}$ at 48 h of treatment (Table 1).

Table 1 - Cytotoxicity of crude extract and fractions of *L. brasiliense* in neuroblastoma SH-SY5Y cells

| Treatments | 24 h | 48 h |
|------------------------|---|---|
| | $\text{CC}_{50} \pm \text{SD}$ ($\mu\text{g/mL}$) | $\text{CC}_{50} \pm \text{SD}$ ($\mu\text{g/mL}$) |
| Crude extract | 41.05 ± 1.81 | 19.46 ± 1.52 |
| Ethyl acetate fraction | 33.00 ± 3.00 | 35.25 ± 2.72 |
| Aqueous fraction | 47.45 ± 1.97 | 39.66 ± 3.49 |

CC_{50} : cytotoxic concentration for 50% of cells.

The AF was less impact in viability cell than the other samples at the treatment of 24 and 48 h. We observed a reduction in the CC_{50} from 24 to 48 h, this difference was statistically significant for CE to AF, with concentration and time-dependent activity on cell viability. There was no statistically significant difference between the EAF CC_{50} , with concentration-dependent activity (Table 1).

Cell viability is defined as the number of healthy cells in a sample (ADAN; KIRAZ; BARAN, 2016). At the moment, only one study has evaluated the effect of EAF of *L. brasiliense* in neuronal cells. Cell viability was not reduced at concentrations 7.81 to 62.5 µg/mL after 24 h of treatment in relation to the control. Despite this study also evaluating cell viability by the MTT assay, differences were observed in the laboratory protocol employed, such as cell density (2.0×10^4) and fraction solubilization (alcohol/cell medium mixture), that can justify the difference between the results found (SEREIA et al., 2019).

Studies were evaluated the effect of CE and fractions of *L. brasiliense* on non-neuronal cell cultures (CORDEIRO, 2017; ISOLANI, 2018). Cordeiro (2017) evaluated the cytotoxicity of CE, EAF, and AF at non-transformed cells (splenocytes from Balb/c mice and PBMCs) in concentrations 10.0, 50.0, 100.0 and 200.0 µg/mL. The results demonstrated toxicity in splenocytes from a concentration of 200.0 µg/mL. In PBMCs cells it was observed that the CE, EAF, and AF of *L. brasiliense* presented CC_{50} of 96.78 ± 3.75 , 75.82 ± 10.81 , and greater than 200.0 µg/mL, respectively. Another cell culture used to evaluate the effect of CE and fractions was epithelial cells (Vero). In this study, a higher effect in viability cell was also reported with EAF treatment, with CC_{50} values of 41.67 ± 12.58 , followed by 56.67 ± 11.55 for AF and 85.0 ± 5 µg/mL for CE (ISOLANI, 2018).

The isolated substances SA, SB, and EGCG at concentrations of 5.0 and 10.0 µM did not cause cytotoxicity after 24 h of treatment (except EGCG in 5.0 µM). After 48 h treatment the substances did not present cytotoxicity at 5.0 µM concentration when compared to the control. Thus, a statistically significant difference was observed in cell viability from the 20.0 to 50.0 µM concentration at 24 h, and 10.0 to 50.0 µM at 48 h, between treatments and the control and between treatments at the same concentration (Figure 2A, 2B).

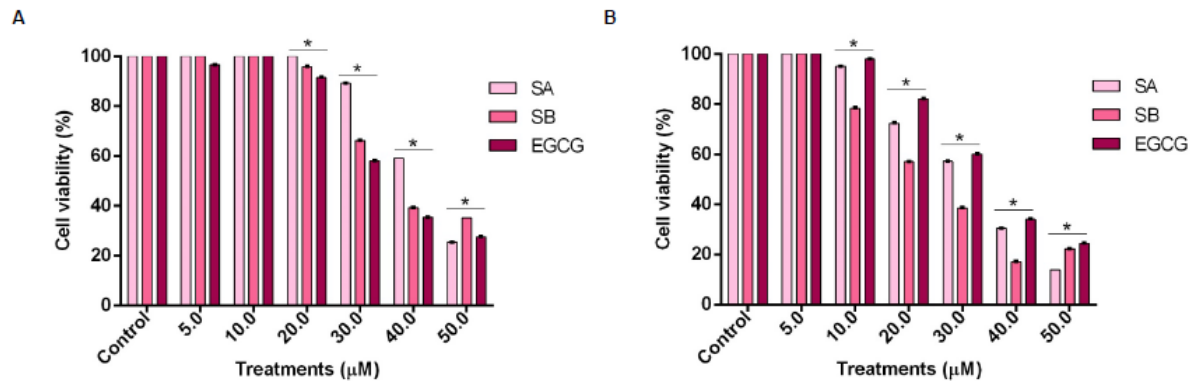


Figure 2. Effects of the samarangenin A (SA), samarangenin B (SB), and epigallocatechin-3-O-gallate (EGCG) of *L. brasiliense* in neuroblastoma SH-SY5Y cells treated with different concentrations (5.0 to 50.0 μM) at 24 h (A) and 48 h (B). Control corresponds to 100% cell viability. Cell viability was measured by MTT colorimetric assay. Data are presented as mean ± SD of three replicates. *Statistically significant difference between treatments and the control and between treatments at the same concentration by ANOVA ($p < 0.05$), conducted in GraphPad Prism® 6 software.

The CC_{50} corresponding to isolated substances are presented in Table 2, with a ranged from $33,92 \pm 1,53$ to $42,42 \pm 0,52$ μM for the treatment of 24 h and $25,83 \pm 2,29$ to $33,86 \pm 6,49$ μg/mL at 48 h of treatment.

Table 2 - Cytotoxicity of isolated substances of *L. brasiliense* in neuroblastoma SH-SY5Y cells

| Treatments | 24 h | 48 h |
|------------------------------|-----------------------|-----------------------|
| | $CC_{50} \pm SD$ (μM) | $CC_{50} \pm SD$ (μM) |
| Samarangenin A | $42,42 \pm 0,52$ | $32,26 \pm 0,70$ |
| Samarangenin B | $37,00 \pm 3,32$ | $25,83 \pm 2,29$ |
| Epigallocatechin-3-O-gallate | $33,92 \pm 1,53$ | $33,86 \pm 6,49$ |

CC_{50} : cytotoxic concentration for 50% of cells.

The SA had the highest CC_{50} at 24 h, demonstrated lower impact for the cellular model employed, followed by SB and EGCG. However, there was no statistically significant difference between CC_{50} SB and EGCG in this exposure time. After 48 h of treatment, EGCG showed a higher CC_{50} . However, there was no statistically significant difference in relation to the CC_{50} of SA. Thus, we observed a greater reduction in cell viability with SB (Table 2).

In addition, it was possible to observe similarity in the CC_{50} of EGCG found at 24 and 48 h, and there was no statistically significant difference between them (Table 2). Regarding samarangenins A and B, there was a statistically significant difference between the CC_{50} values in 24 and 48 h, with a greater reduction in cell viability in 48 h (Table 2).

No studies have been found that evaluated the cytotoxicity of the SA and SB in neuroblastoma SH-SY5Y cells. In the literature, studies only evaluated the effect of these isolated substances of *L. brasiliense* on the viability of Vero cells (CORDEIRO, 2017; ISOLANI, 2018). The CC_{50} values found at 24 h for SA were $33.0 \pm 7 \mu\text{g/mL}$, equivalent to $43.0 \mu\text{M}$ and for SB were $45.0 \pm 5,77 \mu\text{g/mL}$ ($49 \mu\text{M}$) (ISOLANI, 2018), and greater than $100.0 \mu\text{g/mL}$, reported by CORDEIRO (2017).

Studies describe biological activities of these isolated substances from the genus *Limonium* (LIN et al., 1999; KUO et al., 2002). Lin et al. (1999) were related absence of cytotoxicity cells treated with $100.0 \mu\text{M}$ of the substances SB *Limonium sinense* (Girard) Kuntze root in Vero cell lineage for 5 days, by the Trypan blue method. Kuo et al. (2002) also report that the viability in Vero cells was not significantly decreased when treated with 25.0 , 50.0 , and $100.0 \mu\text{M}$ of SB, by the Trypan blue method. For the lactate dehydrogenase (LDH) method was found that in the $200.0 \mu\text{M}$ concentration there was not decrease in the viability. In comparison with the results presented, it is noteworthy that the cell line was the epithelial Vero cell, derived from the kidney of an African green monkey (*Cercopithecus aethiops*) (AMMERMAN; BEIER-SEXTON; AZAD, 2008; ATCC, 2019), and cell viability was determined by different methodologies.

Regarding EGCG, studies show that this substance significantly decreases the viability of SH-SY5Y neuroblastoma cells in concentrations of 10.0 to $50.0 \mu\text{M}$. These studies report that the reduction in viability occurs according to the concentration increase, which corroborates with the results of this study. In addition, they demonstrate that EGCG has a neuroprotective effect in *in vitro* models of neurodegenerative diseases (LEVITES et al., 2002; DAS; BANIK; RAS, 2006; WANG, et al., 2009).

4 CONCLUSION

This is the first study to evaluate the impact of semi-purified extracts and isolated substances of *L. brasiliense* rhizome on the viability of human neuroblastoma SH-SY5Y cells. Regarding the CE and its fractions, AF showed less impact on cell viability. Between isolated substances, SA showed less reduction in cellular viability, with the greatest potential for future investigations. Thus, this study expands on the investigation of *in vitro* effects of *L. brasiliense* in viability on neuronal cell culture and direct future studies that can explore biological activities related to the tested samples, as cytoprotection and gene expression tests.

REFERENCES

- ADAN, A.; KIRAZ, Y.; BARAN, Y. Cell proliferation and cytotoxicity assays. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 17, n. 14, p. 1213-1221, 2016.
- AMMERMAN, N. C.; BEIER-SEXTON, M.; AZAD, A. F. Growth and maintenance of Vero cell lines. **Current Protocols in Microbiology**, 2008.
- AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION (ATCC). Vero (ATCC® CCL-81™). Disponível em: <<https://www.atcc.org/products/all/CCL-81.aspx>>. Acesso em: 07 jan. 2021.
- ANTONELLI-USHIROBIRA, T. M.; BLAINSKI, A.; FERNANDES, H. G.; MOURA-COSTA, G. F.; COSTA, M. A.; CAMPOS-SHIMADA, L. B.; et al. Acute toxicity and long-safety evaluation of the crude extract from rhizomes of *Limonium brasiliense* in mice and rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.174, 293-298, 2015a.
- ANTONELLI-USHIROBIRA, T. M.; BLAINSKI, A., GANCEDO, N. C.; GABURO, F., CARDOSO, K. A. K.; LEITE MELO, E. V. S.; et al. Morpho-anatomical study of rhizome of *Limonium brasiliense*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, p. 320-327, 2015b.
- ARORA, M. Cell culture media: a review. 2016. Disponível em: <<https://www.labome.com/method/Cell-Culture-Media-A-Review.html>>. Acesso em: 06.jan.2021.
- BIEDLER, J. L.; HELSON, L.; SPENGLER, B. A. Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. **Cancer Research**, v. 33, n. 11, p. 2643-2652, 1973.
- BLAINSKI, A. Estudos farmacognóstico, desenvolvimento de metodologia analítica, atividade hormonal, toxicidade aguda e mutagenicidade *in vivo* de *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze (Plumbaginaceae) - Baicuru. Dissertação de mestrado (Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas), Universidade Estadual de Maringá, 2010.
- BLAINSKI, A.; LOPES, G. C.; DE MELLO, J. C. P. Application and analysis of the Folin Ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium Brasiliense* L. **Molecules**, v. 18, n. 6, p. 6852-6865, 2013.
- BLAINSKI, A.; GIONCO, B.; OLIVEIRA, A. G.; ANDRADE, G.; SCARMINIO, I. S.; SILVA, B. D.; et al. Antibacterial activity of *Limonium brasiliense* (Baicuru) against multidrugresistant bacteria using a statistical mixture design. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 198, p. 313-323, 2017.
- CALEARE, A. O.; HENSEL, A.; MELLO, J. C. P.; PINHA, A. B.; PANIZZON, G. P.; LECHTENBERG, M.; et al. Flavan-3-ols and proanthocyanidins from *Limonium brasiliense* inhibit the adhesion of *Porphyromonas gingivalis* to epithelial host cells by interaction with gingipains. **Fitoterapia**, n. 1, v. 18, p. 87-93, 2017.
- CHIERRITO, D.; VILLAS-BOAS, C. B.; TONIN, F. S.; FERNANDEZ-LLIMOS, F.; SANCHES, A. C. C.; MELLO, J. C. P. Using cell cultures for the investigation of treatments for Attention Deficit Hyperactivity Disorder: systematic review. **Current Neuropharmacology**, v. 17, p. 916-925, 2019.

CORDEIRO, M. F. Avaliação das atividades imunomoduladora, antineoplásica e antibacteriana de rizomas de *Limonium brasiliense*, sementes de *Paullinia cupana* e cascas do caule de *Trichilia catigua*. Tese de Doutorado (Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica), Universidade Federal de Pernambuco, 2017.

DAS, A.; BANIK, N. L.; RAY, S. K. Mechanism of apoptosis with the involvement of calpain and caspase cascades in human malignant neuroblastoma SH-SY5Y cells exposed to flavonoids. **International Journal of Cancer**, v. 119, n. 11, p. 2575-2585, 2006.

DIAS DA SILVA, R. A. Plantas Medicinaes do Brasil, O Guaycurú. Boletim da Associação Brasileira dos Pharmaceuticos, v. 1, n. 1, p. 4-14, 1920.

FARAL-TELLO, P.; MIRAZO, S.; DUTRA, C.; PÉREZ, A.; GEIS-ASTEGGIANTE, L.; FRABASILE, S.; et al. Cytotoxic, virucidal, and antiviral activity of South American plant and algae extracts. **Scientific World Journal**, v. 2012, p. 1-5, 2012.

FUNEZ, L. A. Plumbaginaceae. *In*: Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB12938>>. Acesso em: 07 jan. 2021.

HENRIQUES, M. G. M. O.; SAMPAIO, A. L. F. Alternativas para animais de laboratório: sistemas *in vitro*. *In*: ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. Animais de Laboratório: criação e experimentação [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, p. 339-343, 2002.

ISOLANI, R. G. Identificação e avaliação da atividade antiviral de extratos e substâncias isoladas de *Limonium brasiliense* contra Herpes simplex vírus tipo I. Dissertação de mestrado (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas), Universidade Estadual de Maringá, 2018.

KIM, Y. C. Neuroprotective phenolics in medicinal plants. **Archives of Pharmacal Research**, v. 33, n. 10, p. 1611-1632, 2010.

KOVALEVICH, J.; LANGFORD, D. Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology. **Methods in Molecular Biology**, v. 1078, p. 9-21, 2013.

KUMAR, G. P.; KHANUM, F. Neuroprotective potential of phytochemicals. **Pharmacognosy Reviews**, v. 6, n. 12, p. 81-90, 2012.

KUO, Y. C.; Lin, L. C.; Tsai, W. J.; Chou, C. J.; Kung, S. H.; Ho, Y. H. Samarangenin B from *Limonium sinense* suppresses herpes simplex virus type 1 replication in vero cells by regulation of viral macromolecular synthesis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 9, p. 2854-2864, 2002.

LEVITES, Y.; AMIT, T.; YOUDIM, M. B.; MANDEL, S. Involvement of protein kinase C activation and cell survival/cell cycle genes in green tea polyphenol (-)-epigallocatechin 3-gallate neuroprotective action. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 34, p. 30574-30580, 2002.

LIN, L.-C.; KUO, Y.-C.; CHOU, C.-J. Anti-herpes simplex virus type-1 flavonoids and a new flavanone from the root of *Limonium sinense*. **Planta Medica**, v. 66, n. 04, p. 333-336, 2000.

MELLO, J.P.; PETEREIT, F.; NAHRSTEDT, A. Flavan-3-ols and prodelfinidins from *Tryphnodendron adstringens*. **Phytochemistry**, v.41, p.807-813, 1996.

MOURA, T. F. A. L.; SCHENKEL, E. P.; SCHAPOVAL, E. E. S.; SIMÕES, C. M. O.; SANTOS, R. I. D. Estudos farmacológicos preliminares das raízes do *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze - Plumbaginaceae (Baicuru). **Caderno de Farmácia**, v. 1, p. 45-54, 1985.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MURRAY, A. P.; RODRIGUEZ, S.; FRONTERA, M. A.; TOMAS, M. A.; MULET, M. C. Antioxidant metabolites from *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 59, 477-480, 2004.

RODRIGUEZ, S. A.; VINA, M. D.; MURRAY, A. P.; LEIRO, J. M. Antiflammatory activity from *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze. **Planta Medica**, v. 77, p. 1323–3, 2011.

ROSITO, J. F. Contribuição à análise das raízes de *Limonium brasiliense* (Boiss.). 1975. In: MOURA, T. F. A. L.; SCHENKEL, E. P.; SCHAPOVAL, E. E. S.; SIMÕES, C. M. O.; SANTOS, R. I. (Eds.). Estudos farmacológicos preliminares das raízes de *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze - Plumbaginaceae (Baicuru). Dissertação de mestrado (Programa de Pós-Graduação em Farmácia), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1985.

SCHMIDT, A. J.; KRIEG, J.-C.; HEMMETER, U. M.; KIRCHER, T.; SCHULZ, E.; CLEMENT, H.-W.; et al. Impact of plant extracts tested in attention-deficit/hyperactivity disorder treatment on cell survival and energy metabolism in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. **Phytotherapy Research**, v. 24, n. 10, p. 1549-1553, 2010.

SEREIA, A. L.; DE OLIVEIRA, M.T.; BARANOSKI, A.; MARQUES, L. L. M.; RIBEIRO, F. M.; ISOLANI, R. G.; et al. *In vitro* evaluation of the protective effects of plant extracts against amyloid-beta peptide induced toxicity in human neuroblastoma SHSY5Y cells. **PLoS One**, p. 1-24, 2019.

SHARIFI-RAD, M.; LANKATILLAKE, C.; DIAS, D. A.; DOCEA, A. O.; MAHOMOODALLY, M. F.; LOBINE, D. Impact of natural compounds on neurodegenerative disorders: from preclinical to pharmacotherapeutics. **Journal of Clinical Medicine**, v. 9, n. 4, 2020.

WANG, L.; XU, S.; XU, X.; CHAN, P. (-)-Epigallocatechin-3-Gallate protects SH-SY5Y cells against 6-OHDA-induced cell death through STAT3 activation. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 17, n. 2, p. 295-304, 2009.

XICOY, H.; WIERINGA, B.; MARTENS, G. J. M. The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review. **Molecular Neurodegeneration**, v. 12, 2017.

6 DISCUSSÃO GERAL

O uso de culturas celulares tem sido destaque em pesquisas para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas para o tratamento do Transtorno de Déficit da Atenção com Hiperatividade (TDAH) e na investigação da segurança e toxicidade de terapias já disponíveis (SCHMIDT et al., 2010a; SCHMIDT et al., 2010b; KNORLE, 2012; FEIO-AZEVEDO et al., 2017).

Para que essa metodologia seja empregada de maneira adequada, é importante definir os aspectos metodológicos necessários de acordo com o objetivo do estudo a ser desenvolvido. Assim, o primeiro capítulo deste refere-se à primeira revisão sistemática a reunir informações sobre culturas de células como modelos de pesquisa para avaliação de opções terapêuticas para o TDAH (CHIERRITO et al., 2019).

A partir desta revisão sistemática foi possível construir um fluxograma de processo (Figura 2), que auxilia a compreender as principais etapas metodológicas de estudos com culturas celulares e embasar a elaboração de protocolos de pesquisas laboratoriais e delineamento de futuros estudos *in vitro*. De acordo com este fluxograma, após definição do objetivo do estudo, a cultura de células deve ser escolhida. As células utilizadas para avaliação de possíveis opções terapêuticas para o TDAH foram as neuronais (principalmente neuroblastoma SH-SY5Y), e não neuronais, adquiridas por coleções de biologia celular ou doadas por laboratórios de pesquisa. A *American Type Culture Collection* (ATCC) é a fonte mais utilizada entre os estudos que avaliaram as células neuroblastoma SH-SY5Y como modelo para Doença de Parkinson. Outras fontes que podem ser utilizadas incluem *German collection of Microorganisms and Cell Culture* e doação por pesquisadores, conforme reportado anteriormente (XICOY; WIERINGA; MARTENS, 2017).

Após a aquisição das células, é necessário conhecer as condições laboratoriais ideais, o que inclui a escolha do meio de cultura, tipo e concentração do soro utilizado para sua manutenção, uma vez que estes fatores promovem a sobrevivência e proliferação celular, e modulam o comportamento biológico das células, influenciando a capacidade de diferenciação, adesão, e perfil metabólico (WU et al., 2009; HUANG et al., 2015; YAO; ASAYAMA, 2017). Os soros mais usados são os de origem bovina, de animais adultos, recém-nascidos ou fetal, sendo que soros de outras espécies animais, como cavalo, porco, cabra também podem ser empregados (GSTRAUNTHALER, 2003; BRUNNER et al., 2010). Outras substâncias podem ser adicionadas para manutenção dos meios de cultura, como os antibióticos (penicilina, estreptomicina, gentamicina, tilosina), aminoácidos não essenciais e piruvato de sódio. Como fontes de energia para os meios celulares, em geral, são adicionados glicose como fonte primária e o aminoácido essencial glutamina como fonte secundária (PERLMAN, 1979; MAZZIO; SOLIMAN, 2003, WANG et al., 2007; ARORA, 2013).

As células neuroblastoma SH-SY5Y podem passar por processo de diferenciação em neurônios humanos maduros, o qual envolve, além da adição do ácido retinoico, a presença de fatores neurotróficos, fatores secretados pelas células tronco humanas, proteínas da matriz extracelular, e retirada gradual de soro. A diferenciação celular permite alcançar resultados mais robustos para comparação com modelos *in vivo* (SHIPLEY; MANGOLD; SZPARA, 2016).

Os estudos avaliaram as possíveis atividades biológicas de substâncias em modelos *in vitro*, por meio de ensaios de viabilidade celular, expressão gênica e outros testes específicos. A viabilidade celular é definida como o número de células vivas em uma determinada população, e a quantidade de células em estado proliferativo é um indicador de sobrevivência celular ou morte em resposta a alguma substância, como medicamentos ou agentes químicos, o que torna estes processos essenciais para pesquisas e desenvolvimento de novas opções terapêuticas. Para a escolha do método mais apropriado, devem ser avaliados e otimizados fatores como tipo de célula, condições de cultura, concentração da substância teste, tempo de incubação, complexidade do equipamento e custo (ADAN; KIRAZ; BARAN, 2016).

Neste contexto, diferentes métodos podem ser utilizados (Apêndice 6, em material suplementar do capítulo 1), os quais avaliam uma ou mais funções celulares, como: atividade mitocondrial pelo método 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina (MTT), integridade da membrana e metabolismo celular pela atividade da lactato desidrogenase (LDH), produção de adenosina trifosfato (ATP), replicação de DNA pela incorporação de BrdU. Além de outras funções, como: conteúdo de proteína celular, proliferação celular, divisão celular e interação da radiação eletromagnética com a molécula de amostra (ADAN; KIRAZ; BARAN, 2016). Os princípios, vantagens e desvantagens dos testes de viabilidade celular realizados nos estudos analisados estão expostos no apêndice 7, em material suplementar do capítulo 1. Em geral, são testes que permitem avaliar *in vitro* efeitos citotóxicos de opções terapêuticas, como pela determinação da concentração citotóxica de 50% das células (ADAN; KIRAZ; BARAN, 2016).

Os testes de expressão gênica são importantes para avaliar possíveis reações celulares devido a um quadro patológico ou pelo efeito de tratamento farmacológico, auxiliando na elucidação de vias moleculares (BUSTIN; NOLAN, 2004; BUSTIN, 2005; LARSON; SINGER; ZENKLUSEN, 2009). Protocolos e revisões vem sendo publicados com a descrição das etapas envolvidas nesta metodologia, incluindo cuidados no planejamento e análise dos testes (BUSTIN, 2005; BUSTIN et al., 2009; DERVEAUX; VANDESOMPELE; HELLEMANS, 2010; TAYLOR et al., 2010). O *Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments* (MIQE) é um *checklist* composto por informações

mínimas necessárias relacionadas ao desenho experimental, amostra, extração do RNA, transcrição reversa e resultados da análise. Estas recomendações auxiliam no planejamento e execução das análises e reporte de dados (BUSTIN et al., 2009).

Com o intuito de auxiliar o desenvolvimento metodológico em laboratório e gerar resultados reprodutíveis e confiáveis, sugerimos um *checklist* (Tabela 3 do capítulo 1), baseado no *guideline Guidance on Good Cell Culture Practice* (GCCP) (Coecke et al., 2005). Esta ferramenta é composta por itens relacionados a linhagem celular e aspectos metodológicos, que devem ser reportados na escrita de um estudo experimental com culturas de células. Assim, em conjunto com o fluxograma proposto na revisão sistemática realizada, é uma ferramenta que facilita a interpretação dos dados pelos leitores e permite comparar as evidências geradas com as já existentes ou futuras.

Desta forma, de acordo com as evidências geradas, a linhagem celular neuroblastoma SH-SY5Y é a mais utilizada para avaliação da proliferação e viabilidade celular e alterações na expressão gênica frente a diferentes substâncias. Assim, esta linhagem foi escolhida como modelo *in vitro* para avaliação do impacto do EB, FAE, FAQ e substâncias isoladas dos rizomas de *Limonium brasiliense* na viabilidade celular.

Essa espécie vegetal têm sido alvo de estudos em nosso laboratório de pesquisa (PALAFITO). Ensaios de citotoxicidade foram realizados em células epiteliais Vero (CORDEIRO, 2017; ISOLANI, 2018). Porém, até o momento, em células neuroblastoma SH-SY5Y, o efeito da FAE de *L. brasiliense* foi avaliado por apenas um estudo (SEREIA et al., 2019). Assim, o foco do capítulo 2 desta tese, foi realizar uma triagem do EB, frações e substâncias isoladas da FAE (samarangenina A - SA, samarangenina B - SB e epigallocatequina-3-O-galato - EGCG) nesta cultura de células. O fluxograma elaborado na revisão sistemática auxiliou na elaboração de protocolos laboratoriais e delineamento dos experimentos apresentados no capítulo 2, assim como o *checklist*, o qual foi utilizado para padronização do reporte dos resultados (Apêndice A).

De modo geral, os resultados demonstraram que nas concentrações testadas (3.81 a 1000 µg/mL), de EB, FAE e FAQ, o tratamento com a FAQ foi o que resultou em maior concentração citotóxica para 50% das células (CC₅₀), sendo associado a um menor efeito na redução da viabilidade celular, em 24 e 48 h. Quando comparadas ao controle, todas as amostras reduziram a viabilidade celular de acordo com o aumento da concentração, demonstrando atividade concentração-dependente. O estudo realizado por Sereia et al. (2019), relatou que a viabilidade de células neuroblastoma SH-SY5Y não foi alterada nas concentrações de 7,81 a 62,5 µg/mL após 24 h de tratamento com a FAE de *L. brasiliense*, em relação ao controle. Porém, quando comparado os protocolos laboratoriais empregados, nota-se aspectos metodológicos diferentes, como densidade celular e solubilização da fração

testada, que podem justificar a diferença entre os resultados encontrados. Não foram encontrados estudos que avaliaram o efeito do EB e FAQ de *L. brasiliense* em células neuroblastoma SH-SY5Y.

Em relação as substâncias isoladas, em 24 h não houve redução da viabilidade celular nas concentrações de 5,0 e 10,0 μM , exceto para EGCG em 5.0 μM . A SA demonstrou menor efeito na viabilidade das células avaliadas, seguido da SB e EGCG (sem diferença estatisticamente significativa entre os CC_{50}). Em 48 h, o menor potencial de redução da viabilidade celular foi demonstrado pela EGCG. Porém, quando comparadas as CC_{50} , não houve diferença estatisticamente significativa com a concentração encontrada para SA. Desta forma, a SA foi considerada a substância isolada associada a menor redução da viabilidade de células neuroblastoma SH-SY5Y.

Apesar de não encontrado estudos na literatura que avaliaram o impacto das samarangeninas A e B em células neuronais, dois avaliaram seus efeitos em células epiteliais Vero, com valores de CC_{50} de 43 μM e 49 μM , respectivamente (ISOLANI, 2018) e de maior que 100 $\mu\text{g/mL}$ para as duas substâncias (CORDEIRO, 2017). Na literatura, estudos que avaliaram a EGCG em células neuroblastoma SH-SY5Y demonstram redução significativa da viabilidade celular a partir de 10 a 50 μM , o que condiz com os resultados apresentados (LEVITES et al., 2002; DAS; BANIK; RAS, 2006; WANG, et al., 2009).

Assim, com este estudo foi possível verificar a aplicação de modelos *in vitro* para a investigação de potenciais substâncias, como extratos de drogas vegetais. As evidências geradas no capítulo 1 foram consideradas para a elaboração de protocolos em nosso laboratório, que resultaram em mais informações da investigação dos efeitos de *L. brasiliense* na viabilidade de células neuronais.

7 CONCLUSÃO GERAL

Este estudo apresenta a primeira revisão sistemática que descreve os aspectos metodológicos que devem ser considerados no planejamento e condução de um estudo *in vitro* com culturas celulares para avaliação de possíveis alternativas terapêuticas para o TDAH. As evidências encontradas apontam que células neuronais são as mais utilizadas, principalmente a neuroblastoma humano SH-5YSY. Desta forma, essa linhagem celular foi utilizada como modelo *in vitro* para a avaliação dos efeitos na viabilidade celular do EB, FAE, FAQ e substâncias isoladas da FAE de *L. brasiliense*, uma espécie vegetal que representa a biodiversidade brasileira.

A avaliação da viabilidade celular demonstrou que a FAQ exerceu menor efeito na redução da viabilidade celular (maior concentração citotóxica ára 50% das células - CC₅₀) na linhagem neuroblastoma SH-SY5Y, em comparação ao EB e FAE, em 24 e 48 h de exposição. Em relação as substâncias isoladas, a samarangenina A foi associada ao menor impacto na viabilidade celular, sendo uma substância promissora para continuidade das investigações dos efeitos de *L. brasiliense* em células neuronais.

Assim, este estudo demonstra a aplicação de modelos *in vitro* para a investigação de potenciais substâncias, como extratos de drogas vegetais. Nota-se a importância e aplicabilidade das evidências geradas no capítulo 1, que podem resultar em otimização de parâmetros laboratoriais e tempo, economia de recursos financeiros, e aperfeiçoamento de recursos humanos. Além disso, o capítulo 2 amplia a investigação dos efeitos de *L. brasiliense* na viabilidade de células neuronais e direciona o desenvolvimento de futuros estudos, que podem explorar atividades biológicas relacionadas as amostras testadas, por meio de ensaios de citoproteção e expressão gênica.

ANEXO A - Checklist PRISMA

| SECTION/TOPIC | ITEM N° | CHECKLIST ITEM | REPORTED ON PAGE N° |
|------------------------------------|---------|--|---------------------|
| Title | | | |
| Title | 1 | Identify the report as a systematic review, meta-analysis, or both | 42 |
| Abstract | | | |
| Structured summary | 2 | Provide a structured summary including, as applicable: background; objectives; data sources; study eligibility criteria, participants, and interventions; study appraisal and synthesis methods; results; limitations; conclusions and implications of key findings; systematic review registration number | 43 |
| Introduction | | | |
| Rationale | 3 | Describe the rationale for the review in the context of what is already known | 44 |
| Objectives | 4 | Provide an explicit statement of questions being addressed with reference to participants, interventions, comparisons, outcomes, and study design (PICOS) | 44 |
| Methods | | | |
| Protocol and registration | 5 | Indicate if a review protocol exists, if and where it can be accessed (e.g., Web address), and, if available, provide registration information including registration number | - |
| Eligibility criteria | 6 | Specify study characteristics (e.g., PICOS, length of follow-up) and report characteristics (e.g., years considered, language, publication status) used as criteria for eligibility, giving rationale | 45 |
| Information sources | 7 | Describe all information sources (e.g., databases with dates of coverage, contact with study authors to identify additional studies) in the search and date last searched | 45 |
| Search | 8 | Present full electronic search strategy for at least one database, including any limits used, such that it could be repeated | 45 (SM 1) |
| Study selection | 9 | State the process for selecting studies (i.e., screening, eligibility, included in systematic review, and, if applicable, included in the meta-analysis) | 44, 45 |
| Data collection process | 10 | Describe method of data extraction from reports (e.g., piloted forms, independently, in duplicate) and any processes for obtaining and confirming data from investigators | 44, 45 |
| Data items | 11 | List and define all variables for which data were sought (e.g., PICOS, funding sources) and any assumptions and simplifications made | 45 |
| Risk of bias in individual studies | 12 | Describe methods used for assessing risk of bias of individual studies (including specification of whether this was done at the study or outcome level), and how this information is to be used in any data synthesis | 45 |
| Summary measures | 13 | State the principal summary measures (e.g., risk ratio, difference in means) | - |

| | | | |
|-------------------------------|----|---|--------------------------------|
| Synthesis of results | 14 | Describe the methods of handling data and combining results of studies, if done, including measures of consistency (e.g., I^2) for each meta-analysis | - |
| Risk of bias across studies | 15 | Specify any assessment of risk of bias that may affect the cumulative evidence (e.g., publication bias, selective reporting within studies) | 45 |
| Additional analyses | 16 | Describe methods of additional analyses (e.g., sensitivity or subgroup analyses, meta-regression), if done, indicating which were pre-specified | - |
| Results | | | |
| Study selection | 17 | Give numbers of studies screened, assessed for eligibility, and included in the review, with reasons for exclusions at each stage, ideally with a flow diagram | 45, 46 (Figure 1, SM 3) |
| Study characteristics | 18 | For each study, present characteristics for which data were extracted (e.g., study size, PICOS, follow-up period) and provide the citations | 46, 48 (Table 1) |
| Risk of bias within studies | 19 | Present data on risk of bias of each study and, if available, any outcome level assessment (see item 12) | 46, 47 (SM 2) |
| Results of individual studies | 20 | For all outcomes considered (benefits or harms), present, for each study: (a) simple summary data for each intervention group (b) effect estimates and confidence intervals, ideally with a forest plot | - |
| Synthesis of results | 21 | Present results of each meta-analysis done, including confidence intervals and measures of consistency | - |
| Risk of bias across studies | 22 | Present results of any assessment of risk of bias across studies (see Item 15) | 46, 47 (SM2) |
| Additional analysis | 23 | Give results of additional analyses, if done (e.g., sensitivity or subgroup analyses, meta-regression [see Item 16]) | - |
| Discussion | | | |
| Summary of evidence | 24 | Summarize the main findings including the strength of evidence for each main outcome; consider their relevance to key groups (e.g., healthcare providers, users, and policy makers) | 54, 56, 58 (Figure 2, Table 3) |
| Limitations | 25 | Discuss limitations at study and outcome level (e.g., risk of bias), and at review-level (e.g., incomplete retrieval of identified research, reporting bias) | 58 |
| Conclusions | 26 | Provide a general interpretation of the results in the context of other evidence, and implications for future research | 59 |
| Funding | | | |
| Funding | 27 | Describe sources of funding for the systematic review and other support (e.g., supply of data); role of funders for the systematic review | 59 |

SM: Supplementary material. **Fonte:** adaptado de Liberati et al., 2009.

LIBERATI, A.; ALTMAN, D. G.; TETZLAFF, J.; MULROW, C.; GOTZSCHE, P. C.; IOANNIDIS, J. P. A., et al. The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate health care interventions: Explanation and elaboration. *BMJ*, v. 339, jul., 2009.

APÊNDICE A - Checklist para condução e relato de estudos experimentais *in vitro*

| Checklist item | Reported on page N° |
|--|----------------------------|
| CELL CULTURE | |
| Identification of culture type | 79 |
| Identification of cell type | 79 |
| Origin of cells (human, animal) | 79 |
| In case of cells isolated from tissues, report isolation technique and variables involved | - |
| Source of access of cells (collection of cell biology, donation by laboratories) | 79 |
| In case of collection of cell biology, report the product/catalog number | - |
| Growth medium used | 79 |
| Growth medium supplementation components (serum, antibiotics, micronutrients, others). Report name, concentration, percentage used and brand | 78, 79 |
| Frequency of change of growth medium | 79 |
| pH of the growth medium | 79 |
| Confluence | 79 |
| Use of trypsin or other substance to collect the cells. Report name, concentration, percentage | 78, 79 |
| Cellular density | 79 |
| Number of passages | 79 |
| Incubation temperature (exact 0.0 °C) | 79 |
| Atmosphere conditions (exact 0.0% CO ₂) | 79 |
| METHODS | |
| Technique name | 79 |
| Report whether the technique has been developed and validated or reproduced | 79 |
| In case of reproduced technique, report if there were adaptations and what were they | 79 |
| In case of use of substance that promotes cellular alteration, report name, function, concentration, percentage, exposure time | - |
| Time period of each step | 79, 80 |
| Temperature (exact 0.0 °C) | 79, 80 |
| Atmosphere conditions (exact 0.0% CO ₂) | 79, 80 |
| Equipment used | 80 |
| Type of statistical analysis and level of significance | 80 |
| Software for statistical analysis | 80 |

Fonte: Chierrito et al., 2019.

CHIERRITO, D.; VILLAS-BOAS, C. B.; TONIN, F. S.; FERNANDEZ-LLIMOS, F.; SANCHES, A. C. C.; MELLO, J. C. P. Using cell cultures for the investigation of treatments for Attention Deficit Hyperactivity Disorder: a systematic review. *Current Neuropharmacology*, 17: 916-925, 2019.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAN, A.; KIRAZ, Y.; BARAN, Y. Cell proliferation and cytotoxicity assays. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 17, n. 14, p. 1213-1221, 2016.
- AHMADZAI, N; NEWBERRY, S. J.; MAGLIONE, M. A.; TSERTSVADZE, A.; ANSARI, M. T.; HEMPEL, S., et al. A surveillance system to assess the need for updating systematic reviews. **Systematic Reviews**, v. 2, n. 104, 2013.
- AKHONDZADEH, S.; MOHAMMADI, M. R.; MOMENI, F. *Passiflora incarnata* in the treatment of Attention-deficit hyperactivity disorder in children and adolescents. **Therapy**, v. 2, n. 4, p. 609-614, 2005.
- AKOBENG, A. K. Principles of evidence based medicine. **Archives of Disease in Childhood**, v. 90, p. 837-840, 2005.
- AMERICAN PSYCHIATRY ASSOCIATION (APA). Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. Fifth Edition. **American Psychiatric Publishing**, 2013.
- ANGELONI, C.; MARALDI, T.; MILENKOVIC, D.; VAUZOUR, D. Dietary polyphenols and their effects on cell biochemistry and pathophysiology. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2014.
- ANHEYER, D.; LAUCHE, R.; SCHUMANN, D.; DOBOS, G.; CRAMER, H. Herbal medicines in children with Attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): a systematic review. **Complementary Therapies in Medicine**, v. 30, p. 14-23, 2017.
- ANTONELLI-USHIROBIRA, T. M.; BLAINSKI, A., GANCEDO, N. C.; GABURO, F., CARDOSO, K. A. K.; LEITE MELO, E. V. S.; et al. Morpho-anatomical study of rhizome of *Limonium brasiliense*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, p. 320-327, 2015a.
- ANTONELLI-USHIROBIRA, T. M.; BLAINSKI, A.; FERNANDES, H. G.; MOURA-COSTA, G. F.; COSTA, M. A.; CAMPOS-SHIMADA, L. B.; et al. Acute toxicity and long-safety evaluation of the crude extract from rhizomes of *Limonium brasiliense* in mice and rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.174, 293-298, 2015b.
- ARORA, M. Cell culture media: a review. 2016. Disponível em: <<https://www.labome.com/method/Cell-Culture-Media-A-Review.html>>. Acesso em: 04 de jan. 2021.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DO DÉFICIT DE ATENÇÃO (ABDA). Sobre TDAH. Tratamento. 2017. Disponível em: <<https://tdah.org.br/tratamento/>>. Acesso em: 04 de jan. 2021.
- ATALLAH, A. N; CASTRO, A. A. Revisão sistemática e da literatura médica e metanálise: a melhor forma de evidência para tomada de decisão em saúde e a maneira mais rápida de atualização terapêutica, 1997.
- BARBOSA, B. S.; SANTOS, F. A.; PIMENTEL, M. M. L.; FERNANDES, D. P.; PREXEDES, E. A.; BEZERR, M. B. Histórico do desenvolvimento do cultivo de células animais. Uma Revisão. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 9, n. 2, p. 334-347, 2015.

BARKLEY, R. A.; GRODZINSKY G.; DUPAUL, G. J. Frontal lobe functions in attention deficit disorder with and without hyperactivity: a review and research report. **Journal of Abnormal Child Psychology**, v. 20, n. 2, 1992.

BARTL, J.; WALITZA, S.; GRÜNBLATT, E. Enhancement of cell viability after treatment with polyunsaturated fatty acids. **Neuroscience Letters**, v. 559, p. 56-60, 2014.

BLAINSKI, A. Estudos farmacognóstico, desenvolvimento de metodologia analítica, atividade hormonal, toxicidade aguda e mutagenicidade *in vivo* de *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze (Plumbaginaceae) - Baicuru. Dissertação de mestrado (Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas), Universidade Estadual de Maringá, 2010.

BLAINSK, A. Controle de qualidade farmacognóstico com análise cromatográfica quantitativa, planejamento estatístico de misturas com avaliação antibacteriana e estudos fitoquímicos de *Limonium brasiliense* (Baicuru). Tese de doutorado (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas), Universidade Estadual de Maringá, 152 f., 2016.

BLAINSK, A.; GIONCO, B.; OLIVEIRA, A. G.; ANDRADE, G.; SCARMINIO, I. S.; SILVA, B. D.; et al. Antibacterial activity of *Limonium brasiliense* (Baicuru) against multidrugresistant bacteria using a statistical mixture design. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 198, p. 313-323, 2017.

BIEDERMAN, J.; MICK, E.; FARAONE, S. V. Age-dependent decline of symptoms of Attention Deficit Hyperactivity Disorder: impact of remission definition and symptom type. **American Journal of Psychiatry**, v. 157, p. 816–818, 2000.

BIEDERMAN, J.; SPENCER, T.; WILENS, T. Evidence-based pharmacotherapy for attention-deficit hyperactivity disorder. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 7, n. 1, p. 77-97, 2004.

BOLEA-ALAMAÑAC, B.; NUTT, D. J.; ADAMOU, M.; ASHERSON, P.; BAZIRE, S.; COGHILL, D.; et al. Evidence-based guidelines for the pharmacological management of Attention Deficit Hyperactivity Disorder: update on recommendations from the British Association for Psychopharmacology. **Journal of Psychopharmacology**, p. 1-25, 2014.

BRASIL. Diretrizes metodológicas. Elaboração de revisão sistemática e metanálise de estudos observacionais comparativos. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Gestão e Incorporação de Tecnologias em Saúde, 2014.

BRASIL. Diretrizes metodológicas. Elaboração de diretrizes clínicas. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Gestão e Incorporação de Tecnologias em Saúde, 2016.

BRUNNER, D.; FRANK, J.; APPL, H.; SCHÖFFL, H.; PFALLER, W.; GSTRAUNTHALER, G. Serum-free cell culture: the serum-free media interactive online database. **Altex**, v. 27, n. 1, p. 53-62, 2010.

BUSSALB, A.; CONGEDO, M.; BARTHÉLEMY, Q.; OJEDA, D.; ACQUAVIVA, E.; DELORME, R., et al. Clinical and experimental factors influencing the efficacy of neurofeedback in ADHD: a meta-analysis. **Frontiers in Psychiatry**, 2019.

BUSTIN, S.A.; NOLAN, T. Pitfalls of quantitative real-time reversetranscription polymerase chain reaction. **Journal of Biomolecular Techniques**, v. 15, n. 3, p. 155-166, 2004.

BUSTIN, S.A. Real-time reverse transcription PCR. **Encyclopedia of Diagnostic Genomics and Proteomics**, 2005.

BUSTIN, S.A.; BENES, V.; GARSON, J.A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M. et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611-622, 2009.

CALEARE, A. O.; HENSEL, A.; MELLO, J. C. P.; PINHA, A. B.; PANIZZON, G. P.; LECHTENBERG, M.; et al. Flavan-3-ols and proanthocyanidins from *Limonium brasiliense* inhibit the adhesion of *Porphyromonas gingivalis* to epithelial host cells by interaction with gingipains. **Fitoterapia**, n. 1, v. 18, p. 87-93, 2017.

CANADIAN ATTENTION DEFICIT HYPERACTIVITY DISORDER RESOURCE ALLIANCE (CADDRA). Canadian ADHD Practice Guidelines. Fourth Edition, 2018.

CHIERRITO, D.; VILLAS-BOAS, C. B.; TONIN, F. S.; FERNANDEZ-LLIMOS, F.; SANCHES, A. C. C.; MELLO, J. C. P. Using cell cultures for the investigation of treatments for Attention Deficit Hyperactivity Disorder: systematic review. **Current Neuropharmacology**, v. 17, p. 916-925, 2019.

COCHRANE - Centro Cochrane do Brasil. Disponível em: <<http://www.centrocochranedobrasil.org.br/colaboracao.html>>. Acesso em: 04 jan. 2021.

COECKE, S.; BALLS, M.; BOWE, G.; DAVIS, J.; GSTRAUNTHALER, G.; HARTUNG, T., et al. Guidance on good cell culture practice. A report of the second ECVAM task force on good cell culture practice. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 33, n. 3, p. 261-287, 2005.

CONITEC - Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS. Proposta de elaboração. Escopo. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Transtorno do Déficit de Atenção e Hiperatividade. 2019.

CORDEIRO, M. F. Avaliação das atividades imunomoduladora, antineoplásica e antibacteriana de rizomas de *Limonium brasiliense*, sementes de *Paullinia cupana* e cascas do caule de *Trichilia catigua*. Tese de doutorado (Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica), Universidade Federal de Pernambuco, 2017.

COOK, D. J.; MULROW, C. D.; HAYNES, R. B. Systematic reviews: Synthesis of best evidence for clinical decisions. **Annals of Internal Medicine**, v. 126, n. 5, p. 376-380, 1997.

CORTESE, S.; KELLY, C.; CHABERNAUD, C.; PROAL, E.; DI MARTINO, A.; MILHAM, M. P.; CASTELLANOS, F. X. Toward systems neuroscience of ADHD: a meta-analysis of 55 fMRI studies. **American Journal of Psychiatry**, v. 169, n. 10, p. 1038-1055, 2012.

CRAENENBROECK, V. K.; GELLYNCK, E.; LINTERMANS, B.; LEYSEN, J. E.; VAN TOL, H. H.; HAEGEMAN, G., et al. Influence of the antipsychotic drug pipamperone on the expression of the dopamine D4 receptor. **Life Sciences**, v. 80, n. 1, p. 74-81, 2006.

DAS, A.; BANIK, N. L.; RAY, S. K. Mechanism of apoptosis with the involvement of calpain and caspase cascades in human malignant neuroblastoma SH-SY5Y cells exposed to flavonoids. **International Journal of Cancer**, v. 119, n. 11, p. 2575-2585, 2006.

DEMONTIS, D.; WALTERS, R. K.; MARTIN, J.; MATTHEISEN, M.; ALS, T. D.; AGERBO, E., et al. Discovery of the first genome-wide significant risk loci for attention deficit/hyperactivity disorder. **Nature Genetics**, v. 51, p. 63-75, 2019.

DERVEAUX S, VANDESOMPELE J, HELLEMANS J. How to do successful gene expression analysis using real-time PCR. **Methods**, v. 50, n. 4, p. 227-30, 2010.

DIAS DA SILVA, R. A. Plantas Medicinaes do Brasil, O Guaycurú. Boletim da Associação Brasileira dos Pharmaceuticos, v. 1, n. 1, p. 4-14, 1920.

FARAL-TELLO, P.; MIRAZO, S.; DUTRA, C.; PÉREZ, A.; GEIS-ASTEGGIANTE, L.; FRABASILE, S.; et al. Cytotoxic, virucidal, and antiviral activity of South American plant and algae extracts. **Scientific World Journal**, v. 2012, p. 1-5, 2012.

FARAONE, S. V.; ASHERSON, P.; BANASCHEWSKI, T.; BIEDERMAN, J.; BUITELAAR, J. K.; RAMOS QUIROGA, J. A.; et al. Attention- deficit/hyperactivity disorder. **Nature Reviews**, v. 1, 2015.

FEIO-AZEVEDO, R.; COSTA, V. M.; FERREIRA, L. M.; BRANCO, P. S.; PEREIRA, F. C.; BASTOS, M. L., et al. Toxicity of the amphetamine metabolites 4-hydroxyamphetamine and 4-hydroxynorephedrine in human dopaminergic differentiated SHSY5Y cells. **Toxicology Letters**, v. 269, p. 65-76, 2017.

FUNEZ, L. A. Plumbaginaceae. In: Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB12937>>. Acesso em: 04 de jan, 2021.

FURUKAWA, E.; BADO, P.; TRIPP, G.; MATTOS, P.; WICKENS, J. R.; BRAMATI, I. E., et al. Abnormal striatal BOLD responses to reward anticipation and reward delivery in ADHD. **PLoS One**, v. 9, n. 2, 2014.

GARRITTY, C.; TSERTSVADZE, A.; TRICCO, A. C.; SAMPSON, M.; DAVID MOHER, S. Updating systematic reviews: an international survey. **PLoS One**, v. 5, n. 4, 2010.

GU, X.; YUAN, F. F.; HUANG, X.; HOU, Y.; WANG, M.; LIN, J., et al. Association of PIK3CG gene polymorphisms with attention-deficit/hyperactivity disorder: a case-control study. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 81, p. 169-177, 2018.

GUAUDARD, A. M. Y. S. Medicina baseada em evidência, uma reflexão. **Comunicação em Ciências da Saúde**, v. 19, n. 4, p. 297-398, 2008.

GSTRAUNTHALER, G. Alternatives to the use of fetal bovine serum: serum-free cell culture. **Altex**, v. 20, n. 4, p. 275-81, 2003.

HARTLING, L.; VANDERMEER, B.; FERNANDES, R. M. Systematic reviews, overviews of reviews and comparative effectiveness reviews: a discussion of approaches to knowledge synthesis. **Evidence-Based Child Health**, v. 9, n. 2, p.486-494, 2014.

HIGGINS, J. P. T.; GREEN, S. Cochrane handbook for systematic reviews of interventions. Versão 6.1, 2020. Disponível em: < <https://training.cochrane.org/handbook/current/part-2>>. Acesso em: 04 de jan. 2021.

HOOIJMANS, C. R.; ROVERS, M. M.; DE VRIES, R. B.; LEENAARS, M.; RITSKES-HOITINGA, M.; LANGENDAM, M. W. SYRCLE's risk of bias tool for animal studies. **BMC Medical Research Methodology**, v. 14, n. 43, 2014.

HUANG, Z.; SHAO, W.; GU, J.; HU, X.; SHI, Y.; XU, W., et al. Effects of culture media on metabolic profiling of the human gastric cancer cell line SGC7901. **Molecular BioSystems**, v. 11, n. 7, p. 1832-1840, 2015.

HUANG, X.; ZHANG, Q.; GU, X.; HOU, Y.; WANG, M.; CHEN, X., et al. LPHN3 gene variations and susceptibility to ADHD in Chinese Han population: a two-stage case-control association study and gene-environment interactions. **European Child & Adolescent Psychiatry**, v. 28, n. 6, p. 861-873, 2019.

ISOLANI, R. G. Identificação e avaliação da atividade antiviral de extratos e substâncias isoladas de *Limonium brasiliense* contra Herpes simplex vírus tipo I. Dissertação de mestrado (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas), Universidade Estadual de Maringá, 2018.

JADAD, A. R.; MOORE, R. A.; CARROLL, D.; JENKINSON, C.; REYNOLDS, D. J.; GAVAGHAN, D. J.; et al. Assessing the quality of reports of randomized clinical trials: is blinding necessary? **Controlled Clinical Trials**, v. 17, n. 1, p. 1-12, 1996.

KITTEL-SCHNEIDER, S.; SPIEGEL, S.; RENNER, T.; ROMANOS, M.; REIF, A.; REICHERT, S., et al. Cytogenetic effects of chronic methylphenidate treatment and chronic social stress in adults with Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. **Pharmacopsychiatry**, v. 49, n. 4, p. 146-154, 2016.

KNORLE, R. Extracts of *Sideritis scardica* as triple monoamine reuptake inhibitors. **Journal of Neural Transmission**, v. 119, n. 12, p. 1477-1482, 2012.

KO, H-J.; KIM, I.; KIM, J-B.; MOON, Y.; WHANG, M-C.; LEE, K-M., et al. Effects of Korean red ginseng extract on behavior in children with symptoms of inattention and hyperactivity/impulsivity: a double-blind randomized placebo-controlled trial. **Journal of Child and Adolescent Psychopharmacology**, v. 24, n. 9, p. 501-508, 2014.

LARSON, D.R.; SINGER, R.H.; ZENKLUSEN, D. A single molecule view of gene expression. **Trends in Cell Biology**, v. 19, n. 11, p. 630-637, 2009.

LEVITES, Y.; AMIT, T.; YOUDIM, M. B.; MANDEL, S. Involvement of protein kinase C activation and cell survival/cell cycle genes in green tea polyphenol (-)-epigallocatechin 3-gallate neuroprotective action. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 34, p. 30574-30580, 2002.

LEVY, F.; DADDS, M. R. Stimulant side effects: prefrontal/basal ganglia circuit control at dopamine D1/D2 receptors. *Australas Psychiatry*, v. 22, n. 2, p. 179-182, 2014.

LIBERATI, A.; ALTMAN, D.G.; TETZLAFF, J.; MULROW, C.; GOTZSCHE, P.C.; IOANNIDIS, J.P.; et al. The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate health care interventions: explanation and elaboration. **BMJ**, v. 339, 2009.

LUDOLPH, A. G.; UDVARDI, P. T.; SCHAZ, U.; HENES, C.; ADOLPH, O.; WEIGT, H. U., et al. Atomoxetine acts as an NMDA receptor blocker in clinically relevant concentrations concentrations. **British Journal of Pharmacology**, v. 160, n. 2, p. 283-291, 2010.

MATTOS, P.; PALMINI, A.; SALGADO, C. A.; SEGENREICH, D.; GREVET, E.; OLIVEIRA, I. R., et al. Painel brasileiro de especialistas sobre diagnóstico do transtorno de déficit de atenção/hiperatividade (TDAH) em adultos. **Revista de Psiquiatria do Rio Grande do Sul**, v. 28, n. 1, p. 50-60, 2006.

MAZZIO, E.; SOLIMAN, K. F. A. Pyruvic acid cytoprotection against 1-methyl-4 phenylpyridinium, 6-hydroxydopamine and hydrogen peroxide toxicities *in vitro*. **Neuroscience Letters**, v. 337, n. 2, v. 77-80, 2003.

MEERPOHL, J. J.; HERRLE, F.; ANTES, G.; VON ELM, E. Scientific value of systematic reviews: survey of editors of core clinical journals. **PLoS One**, v. 7, n. 5, 2012.

MILLSTEIN, R.B.; WILENS, T. E.; BIEDERMAN, J.; SPENCER, T. J. Presenting ADHD symptoms and subtypes in clinically referred adults with ADHD. **Journal of Attention Disorders**, v. 2, n. 3, p. 159-166, 1997.

MOHER, D. TSERTSVADZE, A.; TRICCO, A.; ECCLES, M.; GRIMSHAW, J.; SAMPSON, M.; et al. When and how to update systematic reviews. **The Cochrane Database of Systematic Reviews**, v.23. n. 1, 2008.

MOURA, T. F. A. L.; SCHENKEL, E. P.; SCHAPOVAL, E. E. S.; SIMÕES, C. M. O.; SANTOS, R. I. D. Estudos farmacológicos preliminares das raízes do *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze - Plumbaginaceae (Baicuru). **Caderno de Farmácia**, v. 1, p. 45-54, 1985.

MURAD, M. H.; ASI, N.; ALSAWAS, M.; ALAHDAB, F. New evidence pyramid. **Evidence-Based Medicine**, v. 21, n. 4, p.125-127, 2016.

MURRAY, A. P.; RODRIGUEZ, S.; FRONTERA, M. A.; TOMAS, M. A.; MULET, M. C. Antioxidant metabolites from *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 59, 477-480, 2004.

NATIONAL INSTITUTE FOR HEALTH AND CARE EXCELLENCE (NICE). Attention deficit hyperactivity disorder (uptade). Evidence reviews for pharmacological efficacy and sequencing pharmacological treatment. NICE guideline NG87, 2018.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde - CID-11. 11ª Revisão. 2018. Disponível em: <<https://icd.who.int/browse11/l-m/en#/http%3a%2f%2fid.who.int%2fcd%2fentity%2f821852937>>. Acesso em: 04 jan. 2021.

PERLMAN, D. Use of antibiotics in cell culture media. **Methods in Enzymology**, v. 58, p. 110-116, 1979.

POLANCZYK, G. V.; SALUM, G. A.; SUGAYA, L. S.; CAYE, A.; ROHDE, L. A. Annual research review: a meta analysis of the worldwide prevalence of mental disorders in children and adolescents. **Journal of Child Psychology and Psychiatry**, v. 56, n. 3, p. 345-365, 2015.

PROSPERO. International prospective register of systematic reviews. Centre for Reviews and Dissemination. Disponível em: <<https://www.crd.york.ac.uk/prospero/>>. Acesso em: 04 de jan. 2021.

RODRIGUEZ, S. A.; VINA, M. D.; MURRAY, A. P.; LEIRO, J. M. Antiflammatory activity from *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze. **Planta Medica**, v. 77, p. 1323–3, 2011.

ROSITO, J. F. Contribuição à análise das raízes de *Limonium brasiliense* (Boiss.). In: MOURA, T. F. A. L.; SCHENKEL, E. P.; SCHAPOVAL, E. E. S.; SIMÕES, C. M. O.; SANTOS, R. I. (Eds.). Estudos farmacológicos preliminares das raízes de *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze - Plumbaginaceae (Baicuru). Dissertação de mestrado (Programa de Pós-Graduação em Farmácia), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1985.

SALEHI, B.; IMANI, R.; MOHAMMADI, M. R.; FALLAH, J.; MOHAMMADI, M.; GHANIZADEH, A., et al. *Ginkgo biloba* for Attention-deficit/hyperactivity disorder in children and adolescents: a double blind, randomized controlled trial. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 34, n. 1, p. 76-80, 2010.

SALVIANO, L. H. M. S.; LINHARES, M. I.; DE LIMA, K. A.; DE SOUZA, A. G.; LIMA, D. B.; JORGE, A. R. C., et al. Study of the safety of methylphenidate: focus on nephrotoxicity aspects. **Life Sciences**, v. 141, p. 137-142, 2015.

SARRIS, J.; KEAN, J.; SCHWEITZER, I.; LAKE, J. Complementary medicines (herbal and nutritional products) in the treatment of Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD): a systematic review of the evidence. **Complementary Therapies in Medicine**, v. 19, n. 4, p. 216-27, 2011.

SATTERFIELD, J. M.; SPRING, B.; BROWNSON, R. C.; MULLEN, E. J.; NEWHOUSE, R. P.; WALKER, B. B., et al. Toward a transdisciplinary model of evidence-based practice. **The Milbank Quarterly**, v. 87, n. 2, p. 368-390, 2009.

SCHAFFER, S.; HALLIWELL, B. Do polyphenols enter the brain and does it matter? Some theoretical and practical considerations. **Genes and Nutrition**, v. 7, n. 2, p. 99-109, 2012.

SCHMIDT, A. J.; KRIEG, J. C.; CLEMENT, H. W.; GEBHARDT, S.; SCHULZ, E.; HEISER, P. Impact of drugs approved for treating ADHD on the cell survival and energy metabolism: an *in-vitro* study in human neuronal and immune cells. **Journal of Psychopharmacology**, v. 24, n. 12, p. 1829-1833, 2010a.

SCHMIDT, A. J.; CLEMENT, H-W.; GEBHARDT, S.; HEMMETER, U. M.; SCHULZ, E.; KRIEG, J-C., et al. Impact of psychostimulants and atomoxetine on the expression of 8-hydroxyguanine glycosylase 1 in human cells. **Journal of Neural Transmission**, v. 117, n. 6, p. 793-797, 2010b.

SCHWARZ, R.; REIF, A.; SCHOLZ, C-J.; WEISSFLOG, L.; SCHMIDT, B.; LESCH, K-P., et al. A preliminary study on methylphenidate-regulated gene expression in lymphoblastoid cells of ADHD patients. **The World Journal of Biological Psychiatry**, v. 16, n. 3, p. 180-189, 2014.

SEREIA, A. L.; DE OLIVEIRA, M.T.; BARANOSKI, A.; MARQUES, L. L. M.; RIBEIRO, F. M.; ISOLANI, R. G.; et al. *In vitro* evaluation of the protective effects of plant extracts against amyloid-beta peptide induced toxicity in human neuroblastoma SHSY5Y cells. **PLoS One**, p. 1-24, 2019.

SHEA, B. J.; REEVES, B. C.; WELLS, G.; THUKU, M.; HAMEL, C.; MORAN, J., et al. AMSTAR 2: a critical appraisal tool for systematic reviews that include randomised or non-randomised studies of healthcare interventions, or both **BMJ**, v. 358, 2017.

SHIPLEY, M.M.; MANGOLD, C.A.; SZPARA, M.L. Differentiation of the SH-SY5Y human neuroblastoma cell line. **Journal of Visualized Experiments**, v. 108, n. 108, 2016.

SIMON, V.; CZOBOR, P.; BÁLINT, S.; MÉSZÁROS, A.; BITTER, I. Prevalence and correlates of adult attention-deficit hyperactivity disorder: meta-analysis. **The British Journal of Psychiatry**, v. 194, 204-211, 2009.

SPENCER, J. P. E. Interactions of flavonoids and their metabolites with cell signaling cascades. **Nutrigenomics**, p. 353-378, 2005.

SUTER, W.; MARTUS, H-J.; ELHAJOUJI, A. Methylphenidate is not clastogenic in cultured human lymphocytes and in the mouse bone marrow micronucleus test. **Mutation Research**, v. 607, n. 2, p. 153-159, 2006.

TAYLOR, S.; WAKEM, M.; DIJKMAN, G.; ALSARRAJ, M.; NGUYEN, M. A practical approach to RT-qPCR-Publishing data that conform to the MIQE guidelines. **Methods**, v. 50, n. 4, S1-S5, 2010.

THAPAR, A.; COOPER, M. Attention deficit hyperactivity disorder. **Lancet**, v. 387, p. 1240-1250, 2016.

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, 2015.

TREBATICÁ, J.; DURACKOVÁ, Z. Psychiatric disorders and polyphenols: can they be helpful in therapy? **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2015.

TREBATICÁ, J.; KOPASOVÁ, S.; HRADECNÁ, Z.; CINOVSÝ, K.; SKODÁČEK, I.; SUBA, J., et al. Treatment of ADHD with French maritime *pine bark* extract, Pycnogenol. **European Child & Adolescent Psychiatry**, v. 15, p. 329-335, 2006.

TRUSTEES OF DARTMOUTH COLLEGE AND YALE UNIVERSITY. Hierarchy of evidence. Disponível em: <<https://oxfordmedicine.com/oxford/fullsizeimage?imageUri=%2F10.1093%2Fmed%2F9780199689903.001.0001%2Fmed-9780199689903-graphic-011-full.gif&uriChapter=%2F10.1093%2Fmed%2F9780199689903.001.0001%2Fmed-9780199689903-chapter-1>>. Acesso em: 04 de jan. 2021.

VISWANATH, B.; JOSE, S. P.; SQUASSINA, A.; THIRTHALLI, J.; PURUSHOTTAM, M.; MUKHERJEE, O.; et al. Cellular models to study bipolar disorder: A systematic review. **Journal of Affective Disorders**, v. 184, p. 36-50, 2015.

WAKAMATSU, A.; NOMURA, S.; TATE, Y.; SHIMIZU, S.; HARADA, Y. Effects of methylphenidate hydrochloride on the cardiovascular system *in vivo* and *in vitro*: a safety pharmacology study. **Journal of Pharmacology and Toxicology Methods**, v. 59, n. 3, p. 128-134, 2009.

WANG, X.; PEREZ, E.; LIU, R.; YAN, L.-J.; MALLET, R.T.; YANG, S.-H. Pyruvate protects mitochondria from oxidative stress in human neuroblastoma SK-N-SH cells. **Brain Research**, v. 1132, n. 1, p. 1-9, 2007.

WANG, L.; XU, S.; XU, X.; CHAN, P. (-)-Epigallocatechin-3-Gallate protects SH-SY5Y cells against 6-OHDA-induced cell death through STAT3 activation. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 17, n. 2, p. 295-304, 2009.

WANG, M.; GU, X.; HUANG, X.; ZHANG, Q.; CHEN, X.; WU, J. STX1A gene variations contribute to the susceptibility of children attention-deficit/hyperactivity disorder: a case-control association study. **European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience**, 2019.

WELLS, G.A.; SHEA, B.; O'CONNELL, D.; PETERSON, J.; WELCH, V.; LOSOS, M.; et al. The Newcastle-Ottawa Scale (NOS) for assessing the quality of nonrandomized studies in meta-analyses. The Ottawa Health Research Institute: Ottawa, Canada, 2019. Disponível em: <http://www.ohri.ca/programs/clinical_epidemiology/oxford.asp>. Acesso em: 04 de jan. 2021.

WILENS, T. E.; BIEDERMAN, J.; FARAONE, S. V.; MARTELON, M.; WESTERBERG, D.; SPENCER, T. J. Presenting ADHD symptoms, subtypes, and comorbid disorders in clinically referred adults with ADHD. **Journal of Clinical Psychiatry**, v. 70, n. 11, p. 1557-1562, 2009.

WOLRAICH, M. L.; HAGAN, J. F.; ALLAN, C.; CHAN, E.; DAVISON, D., EARLS, M., et al. Clinical practice guideline for the diagnosis, evaluation, and treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder in children and adolescents. **Pediatrics**, v. 144, n. 4, 2019.

WU, X.; LIN, M.; LI, Y.; ZHAO, X.; YAN, F. Effects of DMEM and RPMI 1640 on the biological behavior of dog periosteum-derived cells. **Cytotechnology**, v. 59, n. 2, p. 103-111, 2009.

YAO, T.; ASAYAMA, Y. Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues. **Reproductive Medicine and Biology**, v. 16, n. 2, p. 99-117, 2017.

YUAN, F. F.; GU, X.; HUANG, X.; ZHONG, Y.; WU, J. SLC6A1 gene involvement in susceptibility to attention-deficit/hyperactivity disorder: A case-control study and gene-environment interaction. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 77, p. 202-208, 2017.

XICOY, H.; WIERINGA, B.; MARTENS, G. J. M. The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review. **Molecular Neurodegeneration**, v. 12, 2017.

ZHAO, G.; LI, S.; QIN, G.-W.; FEI, J.; GUO, L.-H. Inhibitive effects of Fructus Psoraleae extract on dopamine transporter and noradrenaline transporter. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, n. 3, p. 498-506, 2007.

ZIEGLER, G. C.; RÖSER, C.; RENNER, T.; HAHN, T.; EHLIS, A.-C., WEBER, H. KCNJ6 variants modulate reward-related brain processes and impact executive functions in attention-deficit/hyperactivity disorder. **American Journal of Medical Genetics**, p. 1-11, 2019.