



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

MARIA ISABEL LINHARES

**EFEITO DO METILFENIDATO EM RATOS JOVENS SUBMETIDOS AO MODELO
DE EPILEPSIA COM PILOCARPINA**

FORTALEZA - CE

2017

MARIA ISABEL LINHARES

**EFEITO DO METILFENIDATO EM RATOS JOVENS SUBMETIDOS AO MODELO
DE EPILEPSIA COM PILOCARPINA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia, do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Orientador (a): Prof^a Dra Marta Maria de França Fonteles

Co-orientador (a): Prof^a Dra Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar

FORTALEZA-CE

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Federal do Ceará

Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

L728e Linhares, Maria Isabel.

EFEITO DO METILFENIDATO EM RATOS JOVENS SUBMETIDOS AO MODELO DE
EPILEPSIA COM PILOCARPINA / Maria Isabel

Linhares. – 2017.

162 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de
Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2017.

Orientação: Profa. Dra. Marta Maria de França

Fonteles. Coorientação: Profa. Dra. Lissiana

Magna Vasconcelos Aguiar.

1. Metilfenidato. 2. Epilepsia. 3. Inflamação. 4. Pilocarpina. I. Título.

CDD 615.1

MARIA ISABEL LINHARES

EFEITO DO METILFENIDATO EM RATOS JOVENS SUBMETIDOS AO MODELO DE EPILEPSIA COM PILOCARPINA

Tese apresentada à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Farmacologia para obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

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

Prof^a. Dra. Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar (Co-orientadora)
Universidade Federal do Ceará- UFC Sobral

Prof^a. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa
Universidade Federal do Ceará- UFC

Prof^a. Dra. Silvânia Maria Mendes de Vasconcelos
Universidade Federal do Ceará- UFC

Prof^a. Dr. Tiago Sousa de Melo
Faculdades INTA

Dedicatória

À **Deus** por me dar a vida e permitir que todos os meus sonhos se tornem realidade.

"A fé em Deus nos faz crer no incrível, ver o invisível e realizar o impossível."

Sarah Westphal

Aos meus pais e também minhas maiores inspirações, **Maria de Jesus e Bartolomeu (Bertinho)**, que me deram o primeiro impulso para a vida e me ensinaram o verdadeiro significado do amor e da integridade. Obrigada pelo incansável apoio, amor, carinho, respeito e por sempre me incentivarem a alcançar os meus objetivos. Tudo que eu sou hoje devo a vocês. Vocês são o alicerce imprescindível para o meu crescimento pessoal e profissional.

AGRADECIMENTOS

Ao meu marido e maior companheiro que eu poderia ter, **Moacyr Amaral**. Deus sabe que eu não conseguiria sem toda sua força e apoio. Obrigada pela paciência, por estar ao meu lado em todas as horas (ajudando até nos experimentos e ficando comigo até altas horas no laboratório, abdicando de viagens e passeios enquanto eu estava estudando e escrevendo a tese), por acreditar em mim quando nem eu mesma acreditava. Eu não poderia ser mais abençoada, pois um grande homem caminha ao meu lado. Te amo!

Aos meus irmãos, **José Henrique, José Juvenal e José Inácio**, pelo carinho, pela proteção, pelo companheirismo e pelo apoio incondicional. Vocês são um exemplo de amor e força. Só tenho a agradecer a Deus os irmãos maravilhosos que ele me deu.

Aos meus sobrinhos, **Henry, João Pedro, Anna Lara, Maria Clara, Maria Cecília** e agora o príncipe e afilhado **José Caio**. Amo esses “seres humanozinhos” como se fossem meus. Trouxeram mais alegria a minha vida e são meu estímulo para sempre continuar na luta.

Às minhas cunhadas, **Ana Eugênia (Gênia), Carlinha e Manu** por sempre estarem ao meu lado, apoiando e acreditando no meu potencial, sem falar que trouxeram ao mundo minhas jóias. Vocês são minhas irmãs que a vida me deu de presente. Família, essa vitória é nossa. Amo vocês!

À **profa. Dra Marta Maria de França Fonteles**, a quem tenho muita gratidão. Sempre acompanhou meus passos desde a graduação (iniciação científica) e a quem devo a minha continuação na pesquisa, pois sem seu apoio eu nem teria finalizado. Durante o doutorado foi mais que uma orientadora, foi um mãe, ao permitir que eu realizasse os experimentos em casa (Sobral). Obrigada pelo incentivo, pelos conselhos, pela paciência, pela amizade e cumplicidade.

À **prof. Dra Lissiana Vasconcelos Aguiar**, minha eterna co-orientadora (minha Lili), por quem tenho grande admiração e não terei palavras para agradê-la por tudo que tem feito por mim, por me acolher tão bem e de braços abertos, sempre solícita e com a idéia certa e rápida para tudo. Você é merecedora de toda a minha gratidão e carinho.

Aos **membros da banca examinadora**, pela imensurável contribuição dada para a versão final desta tese. Muito obrigada por aceitarem participar desta defesa.

À minha nova família, Amaral, na pessoa do meu sogro (**Beto Amaral**) e **Isabel Guimarães**, por sempre demonstrar carinho por mim. À minha sogra, **Glícia Rangel** e aos meus cunhados, **Henry, Louise** e, em especial, **Joyce** (cunhada amada e amiga de infância, que sempre fica na torcida e nos acolhe com todo carinho na sua casa). Não poderia deixar de agradecer a **Ana Cláudia**, uma pessoa que sempre alegra meus dias em Fortaleza e que sempre está de braços abertos para nos receber na sua casa, sem falar que tem paciência e interesse nos meus experimentos e pesquisa.

À minha grande amiga, irmã e também um pouco filha, **Julliana Catharina**, a quem posso contar e confiar sempre. É uma das pessoas que mais me conhece e que já dividiu momentos maravilhosos ao meu lado, sem falar que muito contribuiu com esse trabalho. Agora a amo mais, pois me deu um sobrinho lindo e abençoado, Benjamin, para alegrar mais ainda nossas vidas.

À **Suélli Maria Carneiro Prado** e **Ana Bruna de Araújo** (Bruninha), pela grandiosa ajuda, desde o início, nos experimentos. E a amiga **Debora Patrícia** que chegou no final dos experimentos, mas ainda contribuiu bastante. Essa tese não teria sido tão prazerosa como foi ao lado de vocês, sempre com diversão, risadas e muita cumplicidade. Obrigada pela ajuda e amizade de vocês.

Aos IC (iniciação científica) maravilhosos do laboratório, em especial a **Luziana** (Lulu), que muito me ajudou nos experimentos, divertindo os meus finais de semana e se tornando uma amiga. Ao **Tarcízio** e **Jonatas** que ajudaram nos tratamentos e dosagens neuroquímicas.

À técnica **Jordânia** e à veterinária **Alana**, que muito ajudaram com a difícil tarefa de obter os animais com exato 21 dias. Meninas, obrigada por sempre estarem disponível a ajudar e por realizarem o trabalho com tanto amor e cuidado aos animais.

À **Kelly Rose (Cabeça)**, responsável pelas imunohistoquímicas, sempre mostrando disponibilidade pra ajudar. Sua contribuição foi muito importante.

À **Daniele do Val (Dani)**, responsável pelas dosagens de citocinas. A quem agradeço toda a ajuda e disponibilidade (mesmo sendo 5hs da manhã), demonstrando sempre senso de humor e divertindo os experimentos.

Ao laboratório de Farmacologia da UFC- Sobral, na pessoa da **Profa. Dra Mirna e Profa. Dra Helíada**, que compartilhamos o laboratório por um tempo, depois houve a separação do espaço físico, mas nunca deixe de frequentar e precisar dos equipamentos e materiais da “farmaco”.

À prof. **Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa, Silvânia Maria Mendes Vasconcelos e Danielle Macêdo**, muito obrigada pela receptividade no laboratório de Neurofarmacologia.

Aos grandes amigos e que completam os meus dias, família INTA, em especial, a **Patricinha** (minha grande e admirável coordenadora, amiga que gosto e admiro muito), **Paty Fofinha** (convivemos desde a faculdade, mas os laços de amizade foram intensificados depois de trabalharmos juntas), **Tiago** (pessoa que admiro pela inteligência e discernimento), **Fernando** (meu gestor pedagógico), **Debora** (amiga de INTA, de laboratório e da vida), **Renatinha** (pessoa admirável pela ética, inteligência e por sempre estar pronta para ajudar. Obrigada pela ajuda nas correções finais dessa tese), **Magda, Olindina** e às secretarias “princesas” (**Natércia e Karlinha**). Vocês tornam meus dias mais alegres e, sem perceber, são responsáveis pela minha superação diária.

Aos outros professores e companheiros de trabalho do INTA, obrigada pela boa convivência diária. Em especial à **Paulinha**, que ajudou bastante na elaboração dos slides para apresentação.

Ao meu eterno orientando **Feliphy Custódio**, que agora é mestrando da biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, que ajudou na elaboração final das figuras do delineamento experimental, deixando o trabalho lindo.

Às minhas amigas da época de graduação e que permanecem até hoje, **Analu, Livinha, Cecília, Anaiara** e, especialmente, a **Juliana Pereirinha** (madrinha de casamento, pessoa que gosto e admiro muito, que sempre está pronta para ajudar e que está sendo essencial nessa etapa final do doutora). Que nossa amizade, apesar da distância, permaneça sempre verdadeira.

Aos amigos do grupo da prof. Marta, **Camila, Alana, Klistenes, Emiliano, Michele, Mariana** e, em especial a **Edith** que é uma grande amiga e que sempre diverti meus dias no laboratório.

À querida **Vilani**, técnica do Laboratório de Neurofarmacologia pela inestimável ajuda.

Aos colegas do Laboratório de Neurociências e Comportamento, que sempre disponibilizaram o laboratório para parceria. **Prof. Geanne, Ana Paula, Marta, Arnaldo, Kelly Rose**, obrigada por toda a contribuição.

À Universidade Federal do Ceará (UFC- Sobral), pela disposição da infraestrutura para realização dos experimentos.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

Aos funcionários da Faculdade de medicina *campus*-Sobral, pela dedicação ao trabalho.

Meu sincero respeito a todos os animais utilizados durante os experimentos, sem os quais esse trabalho não poderia ser realizado.

RESUMO

EFEITO DO METILFENIDATO EM RATOS JOVENS SUBMETIDOS AO MODELO DE EPILEPSIA COM PILOCARPINA

O metilfenidato (MFD) é o medicamento utilizado para Transtorno do Déficit de Atenção/ Hiperatividade (TDAH). Na clínica, há uma prevalência de TDAH em pacientes com epilepsia, sendo identificada como uma comorbidade comum. O FDA adverte contra o uso do MFD em pacientes com epilepsia. Desta forma, resolve-se investigar de forma mais aprofundada a possível atividade do MFD em um modelo pré-clínico de epilepsia. O objetivo é avaliar o efeito do MFD em ratos jovens submetidos ao modelo de epilepsia com pilocarpina. A pilocarpina (PILO) foi administrada nos animais jovens, com 21 dias de vida, na dose de 320 mg/Kg (P320), intraperitoneal (i.p.), para indução do modelo de epilepsia. As crises comportamentais foram classificadas de acordo com a escala de Racine e a duração do *status epilepticus* (SE) foi controlada com diazepam (DZ, 4mg/Kg, i.p., 60 minutos após a indução). Durante 21 dias, os animais receberam o MFD nas doses de 2,5; 5 e 10mg/Kg e salina (SAL), 10 mL/Kg. Em seguida, foram realizados os testes comportamentais, a avaliação do estresse oxidativo, a dosagem de TNF- α e análise da expressão de COX-2 e iNOS. Os resultados analisados no teste do labirinto em cruz elevado, mostraram que o MFD aumentou os parâmetros, NEBA, nas doses de 2,5, 5 e 10 mg/Kg e, PEBA e PTBA nas doses de 5 e 10mg/Kg nos animais epiléticos. No teste do campo aberto, foi observado aumento na atividade locomotora em todas as doses analisadas dos animais epiléticos. Não alterou o número de *rearing*. No teste do nado forçado, o MFD diminuiu o tempo de imobilidade em todas as doses analisadas nos animais epiléticos e não epiléticos. No teste do Y-maze (memória de curta duração) houve uma diminuição nas alternâncias espontâneas nas doses de 2,5; 5 e 10 mg/Kg dos animais epiléticos. No teste do Reconhecimento de Objetos (memória de longa duração) não houve alteração em nenhuma dose do MFD. A avaliação da atividade oxidante mostrou que o MFD aumentou os níveis de peroxidação lipídica e nitrito/nitrato, e diminuiu a atividade da GSH e da catalase. Houve uma diminuição na atividade da AChE no hipocampo e córtex pré-frontal. Houve um aumento da atividade da mieloperoxidase (um biomarcador de inflamação) no tratamento com MFD. O MFD aumentou os níveis de TNF- α induzido por P320 no hipocampo, corpo estriado e córtex pré-frontal, reforçado pelos efeitos observados através da atividade da COX-2 e iNOS que apresentou aumento na marcação para essas enzimas no corpo estriado. A determinação dos níveis de monoaminas mostrou que o MFD aumentou os níveis de dopamina (DA) e diminuiu os níveis de DOPAC nos animais epiléticos. Os experimentos *in vitro* mostraram que o MFD causou aumento da viabilidade celular no teste do MTT. O MFD demonstrou um potencial para a atividade ansiolítica e antidepressiva e apresentou uma ação pró-oxidante e pró-inflamatória visto através do modelo de epilepsia induzido por pilocarpina em ratos jovens.

Palavras-chave: Metilfenidato. Epilepsia. Inflamação. Pilocarpina.

ABSTRACT

EFECCCT OF METHYLPHENIDATE IN YOUNG RATS SUBMITTED TO THE MODEL OF EPILEPSY WITH PILOCARPINE

Methylphenidate (MFD) is the drug used for Attention Deficit/Hiperactivity Disorder (ADHD). In the clinic, there is a prevalence of ADHD in patients with epilepsy, being identified as a common comorbidity. The FDA warns against the use of MFD in patients with epilepsy. In this way, it is resolved to investigate in more depth the possible activity of MFD in patients with epilepsy. The objective is to evaluate the effect of MFD on young rats submitted to the pilocarpine epilepsy model. Pilocarpine (PILO) was administered in young animals, at 21 days of age, at a dose of 320 mg/Kg (P320), intraperitoneal (i.p.) for induction of the epilepsy model. Behavioral crises were classified according to the Racine scale and the duration of SE (*status epilepticus*) was controlled with diazepam (DZ, 4mg / Kg, i.p., 60 minutes post induction). During 21 days, the animals received the MFD at doses of 2,5; 5 and 10mg/Kg and saline (SAL), 10 mL/Kg. Behavioral tests, oxidative stress assessment, TNF- α dosing, and expression analysis of COX-2 and iNOS were performed. In the open field test, an increase in locomotor activity was observed in all analyzed doses of epileptic animals. Did not change the number of rearing. The results analyzed in the high cross maze test showed that MFD increased the parameters, NEOA, at doses of 2,5; 5 and 10 mg/Kg and PEOA and PTOA at doses of 5 and 10 mg/Kg in epileptic animals. In the forced swim test, MFD decreased immobility time at all doses analyzed in epileptic and non epileptic animals. In the Y-maze test (short-term memory) there was a decrease in spontaneous alternations at doses of 2,5; 5 and 10 mg/Kg epileptic animals. In the Object Recognition test (long-term memory) there was no change in any dose of MFD. The evaluation of the oxidant activity showed that MFD increased levels of lipid peroxidation and nitrite / nitrate, and decreased the activity of GSH and catalase. There was a decrease in AChE activity in the hippocampus and prefrontal cortex. There was an increase in myeloperoxidase activity (a biomarker of inflammation) in MFD treatment. MFD increased the levels of TNF- α induced by P320 in the hippocampus, striatum and prefrontal cortex, reinforced by the effects observed through the activity of COX-2 and iNOS, which showed increased labeling for these enzymes in the striatum. Determination of monoamine levels showed that MFD increased dopamine (DA) levels and decreased DOPAC levels in epileptic animals. In vitro experiments showed that MFD caused increased cell viability in the MTT test. The MFD presented possible pro-oxidant and pro-inflammatory actions, as well as a neuroinflammation. The MFD demonstrated a potential for anxiolytic and antidepressant activity and presented a pro-oxidant and pro-inflammatory action seen through the model of epilepsy induced by pilocarpine in young rats.

Keywords: Methylphenidate. Epilepsy. Inflammation. Pilocarpine.

LISTA DE SIGLAS

5-HT	5-hidroxitriptamina; serotonina
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
ALE	Atividade locomotora espontânea
ANOVA	Análise de Variância
APA	Associação Psiquiátrica Americana
ATC	Acetilcolina
CAT	Catalase
CE	Corpo Estriado
CER	Crises espontâneas recorrentes
CEUA	Comitê de Ética em Uso de Animais
ChAT	Colina Acetiltransferase
COX	Ciclooxigenase
CPF	Córtex pré-frontal
CTRL	Controle
DA	Dopamina
DAEs	Drogas antiepilépticas
DAT	Transportador de dopamina
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DOPAC	Ácido dihidroxifenilacético
DSM	Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais
DTNB	5, 5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico)
DZ	Diazepam
ELT	Epilepsia do Lobo Temporal
EME	Estado do mal epiléptico
EPM	Erro padrão da média
ERO	Espécies reativas de oxigênio
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
FDA	Food and Drug Administration
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GSH	Glutathiona redutase

GPx	Glutathione peroxidase
HC	Hipocampo
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IC50	Concentração necessária para matar 50% da população
IL	Interleucina
IMAO	Inibidor da Monoamina oxidase
iNOS	Óxido nítrico sintase indutível
i.p	Intraperitoneal
LCC	Laboratório de Cultivo de Células
LCE	Labirinto em Cruz Elevado
L-DOPA	L-3,4-dihidroxifenilalanina
MFD	Metilfenidato
MPO	Mieloperoxidase
MS	Metil-escopolamina
MTT	Brometo de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazólio
NA	Noradrenalina
NEBA	Número de entrada nos braços abertos
NFκB	Fator de transcrição nuclear Kappa B
NO	Óxido nítrico
NOSi	Óxido nítrico sintase induzível
OI	Objeto igual
OMS	Organização Mundial de Saúde
ON	Objeto novo
BS	Tampão Fosfato Salino
PILO	Pilocarpina
PEBA	Percentagem de entrada nos braços abertos
PTBA	Percentagem do tempo de permanência nos braços abertos
PTZ	Pentilenotetrazol
RCN	Receptores colinérgicos nicotínicos
SAL	Salina
SARA	Sistema Ativador Reticular Ascendente
SE	<i>Status epilepticus</i>
SNc	Substância Nigra pars compacta

SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Superóxido desmutase
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TC	Transtorno de Conduta
TOC	Transtorno Obsessivo Compulsivo
TOD	Transtorno Opositor Desafiador
TLR	Receptores tipo <i>Toll</i>
TDAH	Transtorno do Déficit de Atenção e Hiperatividade
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TPBA	Tempo de permanência nos braços abertos
UFC	Universidade Federal do Ceará
V.O.	via oral
Vs	Versus

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura química do metilfenidato	20
Figura 2	Mecanismo de ação do metilfenidato	22
Figura 3	Neurotransmissão colinérgica com ativação de receptores M1 e cascata de sinalização excitatória	33
Figura 4	Potencialização da formação de espécies reativas decorrentes de convulsão e dos danos causado pelo estresse oxidativo	38
Figura 5	Principais mecanismos de inativação de espécies reativas de oxigênio	39
Figura 6	Interação entre respostas inflamatórias e a neuroinflamação	40
Figura 7	Estrutura da sinapse tripartite composta pelos neurônios pré e pós-sináptico (em azul) e a células astrocitária (em verde)	45
Figura 8	Delineamento Experimental do Modelo da Pilocarpina no grupo epiléptico	53
Figura 9	Delineamento Experimental do Modelo da Pilocarpina no grupo epiléptico com tratamento crônico de metilfenidato	53
Figura 10	Delineamento Experimental do grupo controle	54
Figura 11	Teste do Campo Aberto	55
Figura 12	Teste do labirinto em cruz elevado	56
Figura 13	Teste do nado forçado	57
Figura 14	Teste do labirinto em Y	58
Figura 15	Teste do Reconhecimento de Objetos	59
Figura 16	Esquema das etapas de tratamento dos astrócitos em Placa de Elisa para obtenção da viabilidade celular	67
Figura 17	Efeito do metilfenidato no teste do campo aberto em animais jovens. (A) ALE (B) <i>rearing</i> .	69
Figura 18	Efeito do metilfenidato no teste do Labirinto em cruz elevado em animais jovens. (A) NEBA (B) TPBA (C) PEBA (D) PTBA.	72
Figura 19	Efeito do metilfenidato sobre o tempo de imobilidade no teste do nado forçado em animais jovens	73
Figura 20	Avaliação da memória de trabalho (memória de curta duração) de ratos	74

epilépticos tratados ou não com metilfenidato

- Figura 21 Avaliação do índice de reconhecimento de objetos em ratos jovens 75 submetidos à epilepsia tratados ou não com metilfenidato
- Figura 22 Determinação da ocorrência de peroxidação lipídica de ratos jovens 76 submetidos à epilepsia tratados ou não com metilfenidato. (A) Hipocampo (B) Corpo estriado (C) Córtex pré-frontal.
- Figura 23 Determinação da formação de nitrato/ nitrito de ratos jovens submetidos à 78 epilepsia tratados ou não com metilfenidato. (A) Hipocampo (B) Corpo estriado (C) Córtex pré-frontal
- Figura 24 Avaliação da concentração de GSH de ratos jovens submetidos à epilepsia 80 tratados ou não com metilfenidato. (A) Hipocampo (B) Corpo estriado (C) Córtex pré-frontal.
- Figura 25 Avaliação da atividade da catalase de ratos jovens submetidos à epilepsia 82 tratados ou não com metilfenidato. (A) Hipocampo (B) Corpo estriado (C) Córtex pré-frontal
- Figura 26 Efeito do MFD sobre a atividade da AChE de ratos jovens submetidos à 84 epilepsia tratados ou não com metilfenidato. (A) Hipocampo (B) Corpo estriado (C) Córtex pré-frontal
- Figura 27 Efeito do MFD sobre as concentrações de (A) Dopamina e (B) DOPAC em 86 corpo estriado de ratos jovens submetidos à epilepsia tratados ou não com metilfenidato
- Figura 28 Avaliação dos níveis de mieloperoxidase de ratos jovens submetidos à 88 epilepsia tratados ou não com metilfenidato. (A) Hipocampo (B) Corpo estriado (C) Córtex pré-frontal
- Figura 29 Níveis de TNF- α de ratos jovens submetidos à epilepsia tratados ou não 89 com metilfenidato. (A) Hipocampo (B) Corpo estriado (C) Córtex pré-frontal
- Figura 30 A. Quantificação da imunomarcagem para COX-2 no corpo estriado de 91 animais jovens submetidos ou não à epilepsia.
- Figura 30 B. Imagens representativas do efeito do metilfenidato (5mg/Kg) sobre a 91 imunorreatividade da COX-2 no corpo estriado de ratos jovens submetidos à epilepsia.
- Figura 31 A. Quantificação da imunomarcagem para iNOS no corpo estriado de 92 animais jovens submetidos ou não à epilepsia

- Figura 31 B. Imagens representativas do efeito do metilfenidato (5mg/Kg) sobre a 93 imunorreatividade da iNOS no corpo estriado de ratos jovens submetidos à epilepsia
- Figura 32 Efeito de MFD sobre a viabilidade astrócitos pelo método do MTT após (A) 94 12 horas e (B) 24 horas de incubação
- Figura 33 Percentual de viabilidade celular de astrócitos corticais expostos a 95 diferentes concentrações de Pilocarpina
- Figura 34 Percentual de viabilidade celular de astrócitos corticais expostos a 96 diferentes concentrações da combinação de MFD+PILO IC50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Número de animais que foram submetidos ao <i>status epilepticus</i>	68
Tabela 2	Teste do Campo aberto	157
Tabela 3	Teste do Labirinto em Cruz Elevado	157
Tabela 4	Teste do Nado Forçado	158
Tabela 5	Teste do Labirinto em Y	158
Tabela 6	Teste do Reconhecimento de Objetos	158
Tabela 7	Dosagem de TBARS	159
Tabela 8	Dosagem de Nitrito/Nitrato	159
Tabela 9	Determinação sobre a concentração de Glutathiona reduzida (GSH)	160
Tabela 10	Determinação da atividade da catalase	160
Tabela 11	Determinação da atividade da Acetilcolinesterase	161
Tabela 12	Determinação das concentrações de Monoaminas e do metabólito DOPAC em corpo estriado	161
Tabela 13	Determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO)	161
Tabela 14	Determinação sobre a concentração de TNF- α	162
Tabela 15	Determinação da atividade da COX-2 em corpo estriado	162
Tabela 16	Determinação da atividade da iNOS em corpo estriado	162

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	Metilfenidato	19
1.2	Transtorno do Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH)	23
1.2.1	Etiologia do TDAH	25
1.2.2	Neurobiologia do TDAH	26
1.2.3	Comorbidades do TDAH	27
1.3	Epilepsia	29
1.3.1	Epilepsia e Neurotransmissão Colinérgica	32
1.3.2	Epilepsia do Lobo Temporal	34
1.3.3	Epilepsia e Distúrbios Neuropsiquiátricos	35
1.3.4	Epilepsia e Estresse Oxidativo	36
1.3.5	Epilepsia e Inflamação	39
1.4	Modelo experimental de epilepsia induzida por pilocarpina	40
1.5	Astrócitos no SNC e seu envolvimento na epilepsia	44
2	RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA	47
3	OBJETIVOS	48
3.1	Gerais	48
3.2	Específicos	48
4	MATERIAIS E MÉTODOS	49
4.1	Animais	49
4.2	Drogas	49
4.3	Descrição geral do estudo: da administração das drogas ao estudo comportamental e neuroquímico	50
4.4	Indução de <i>Status Epilepticus</i> (SE) por meio da Pilocarpina	51
4.5	PROTOCOLO 1: Testes Comportamentais	54
4.5.1	Teste do Campo Aberto	54
4.5.2	Teste do Labirinto em Cruz Elevado " <i>Plus Maze</i> "	55
4.5.3	Teste do Nado Forçado	56
4.5.4	Teste do Labirinto em Y (<i>Y-maze</i>)	57
4.5.5	Teste do Reconhecimento de Objetos	58
4.6	PROTOCOLO 2: Avaliação do estresse oxidativo, Dosagem de TNF-α e Análise da expressão de COX-2 e iNOS.	59
4.6.1	Determinação do Índice de Lipídio Peroxidação (dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico - TBARS)	59

4.6.2	Determinação do Conteúdo de Nitrito	60
4.6.3	Determinação da Concentração da Glutathiona Reduzida (GSH)	60
4.6.4	Determinação da Atividade da Catalase	61
4.6.5	Determinação de proteínas	61
4.6.6	Determinação da Atividade da Acetilcolinesterase (AChE)	62
4.6.7	Determinação da concentração de Dopamina (DA) e seu metabólito (Ácido Dihidroxfenilacético-DOPAC) com HPLC em corpo estriado	63
4.6.8	Ensaio para Mileoperoxidase (MPO)	63
4.6.9	Dosagem de TNF- α no córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado	64
4.6.10	Análise da expressão de COX-2 e iNOS	65
4.7	PROTOCOLO 3: Ensaios <i>in vitro</i> de Viabilidade Celular	66
4.7.1	Linhagem e cultivo celular	66
4.7.2	Ensaio com MTT	66
4.8	Análise estatística	67
4.9	Aspectos éticos em pesquisa animal	67
5	RESULTADOS	68
5.1	Alterações Comportamentais após a indução do <i>status epilepticus</i>, por Pilocarpina (320 mg/kg; P320), em ratos jovens com 21 dias de vida	68
5.2	PROTOCOLO 1: Testes Comportamentais	69
5.2.1	Teste do Campo Aberto	69
5.2.2	Teste do Labirinto em Cruz Elevado	70
5.2.3	Teste do Nado Forçado	72
5.2.4	Teste do Labirinto em Y (<i>Y-maze</i>)	73
5.2.5	Teste do Reconhecimento de Objetos	74
5.3	PROTOCOLO 2: Avaliação do estresse oxidativo, Dosagem de TNF- α e Análise da expressão de COX-2 e iNOS	75
5.3.1	Efeito do tratamento com metilfenidato sobre a produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em áreas cerebrais de animais jovens submetidos ou não à indução da epilepsia com pilocarpina (P320).	75
5.3.2	Efeito do tratamento com metilfenidato sobre a produção de nitrito/nitrato em áreas cerebrais de animais jovens submetidos ou não à indução da epilepsia com pilocarpina (P320).	77
5.3.3	Efeito do tratamento com metilfenidato sobre a concentração de glutathiona reduzida (GSH) em áreas cerebrais de animais jovens submetidos ou não à indução da epilepsia com pilocarpina (P320).	79
5.3.4	Efeito do tratamento com metilfenidato sobre a atividade da Catalase em	81

	áreas cerebrais de animais jovens submetidos ou não à indução da epilepsia com pilocarpina (P320).	
5.3.5	Efeito do tratamento com metilfenidato sobre a atividade da Acetilcolinesterase em Hipocampo (HC), corpo estriado (CE) e córtex pré-frontal (CPF) de animais jovens submetidos ou não à indução da epilepsia com pilocarpina (P320).	83
5.3.6	Efeito do tratamento com metilfenidato sobre a determinação das concentrações de dopamina e seu metabólito DOPAC em corpo estriado de animais jovens submetidos ou não à indução da epilepsia com pilocarpina (P320).	85
5.3.7	Efeito do tratamento com metilfenidato sobre a atividade da mieloperoxidase (MPO) em áreas cerebrais de animais jovens submetidos ou não à indução da epilepsia com pilocarpina (P320).	87
5.3.8	Efeito do tratamento com metilfenidato sobre a concentração de TNF- α em áreas cerebrais de animais jovens submetidos ou não à indução da epilepsia com pilocarpina (P320).	89
5.3.9	Efeito do tratamento com metilfenidato sobre a atividade da enzima COX-2 em corpo estriado (CE) de animais jovens submetidos ou não à indução da epilepsia com pilocarpina (P320).	90
5.3.10	Efeito do tratamento com metilfenidato sobre a atividade da enzima iNOS em corpo estriado (CE) de animais jovens submetidos ou não à indução da epilepsia com pilocarpina (P320).	92
5.4	PROTOCOLO 3: Ensaios <i>in vitro</i> de Viabilidade Celular	93
6	DISCUSSÃO	97
6.1	PROTOCOLO 1: Testes Comportamentais	97
6.2	PROTOCOLO 2: Avaliação do estresse oxidativo, Dosagem de TNF-α e Análise da expressão de COX-2 e iNOS	103
6.3	PROTOCOLO 3: Ensaios <i>in vitro</i> de Viabilidade Celular	107
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	116
8	CONCLUSÃO	118
	REFERÊNCIAS	119
	ANEXO A	156
	APENDICE A	157

1 INTRODUÇÃO

1.1 Metilfenidato

O metilfenidato (MFD) foi sintetizado pela primeira vez em 1944 por Leandro Panizzonem. Em 1954 teve início os testes em humanos e foi comercializado somente em 1955 pela Ciba-Geigy com o nome comercial de Ritalina®. Indicado inicialmente para o tratamento da narcolepsia, um raro transtorno do sono e somente a partir dos anos 60, estudos começaram a ressaltar os benefícios do MFD para tratamento de crianças hiperativas e distraídas (SHIRAKAWA, 2012).

O MFD é considerado a terapêutica de primeira linha no tratamento do Transtorno do Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH) (MALDONADO, 2013) e de segunda linha no tratamento da narcolepsia onde é dada preferência ao modafinil ou oxibato sódico (THORPY; DAUVILLIERS, 2015). No TDAH, o MFD diminui a inquietação motora, aumenta a concentração, atenção e memória enquanto que na narcolepsia produz estimulação do Sistema Nervoso Central (SNC), aumento da vigília, diminuição da sensação de fadiga e elevação do estado de ânimo, entendido como alegria e ligeira euforia (BRANT; CARVALHO, 2012).

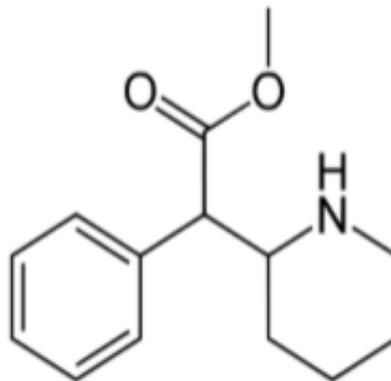
Na literatura relata-se a sua utilização para melhorar o estado de alerta, no tratamento de depressões, terapêutica da narcolepsia e mudança de comportamento das crianças agitadas, inquietas e desatentas (BRANT; CARVALHO, 2012; WEDGE, 2015). Poucos trabalhos avaliam a atenção e a memória em indivíduos saudáveis após o uso do medicamento (MACHADO; TOMA, 2016).

O uso não terapêutico do MFD faz-se, em grande parte, por estudantes e trabalhadores (designadamente profissionais da área da saúde), como forma de potenciarem os seus desempenhos escolares e laborais conseguindo assim alcançar elevados níveis de produtividade, e não para fins recreativos ou por simples curiosidade, como acontece com outras substâncias psicoativas (BRANT; CARVALHO, 2012; GAHR et al., 2014). É comum o consumo de MFD entre motoristas, executivos, profissionais de saúde, atletas e estudantes (sobretudo em vésperas de provas) como forma de prolongar o estado de vigília, melhorar o rendimento físico e intelectual (BRANT; CARVALHO, 2012).

O MFD é um derivado da benzilpiperidina e fenetilamina (Figura 1) cuja fórmula química é $C_{14}H_{19}NO_2$ e o nome químico é metil 2- fenil- 2-(2-piperidil)

acetato e está relacionado estruturalmente à anfetamina (FRATI, et al., 2015; KIMKO et al., 2012). É uma substância quiral cuja farmacologia específica está situada totalmente no enantiômero D. No cérebro humano, o enantiômero D se liga aos transportadores de dopamina, enquanto o enantiômero L não apresenta essa capacidade de ligação (VOLKOW et al., 2005).

Figura 1- Estrutura química do metilfenidato



Fonte: SMITH, 2012

O MFD foi aprovado para comercialização no Brasil em 1998 (ANVISA, 2012) e atualmente é comercializado sob os nomes: Ritalina®, disponível em comprimido em doses de 10 mg (ação rápida) e de 10, 20, 30 e 40 mg LA (liberação modificada) e Concerta®, disponível em doses de 18, 36 e 54 mg em comprimidos com liberação prolongada (BULA VENVANSE, 2016).

O MFD de liberação lenta inicia sua ação somente 1 hora após a administração, porém age durante todo o dia, sem oscilações. As doses utilizadas variam de 18 até 120 mg e o pico plasmático ocorre em 8 horas. No caso do MFD de liberação rápida, as dosagens recomendadas são de 10 até 100 mg. Sua meia-vida tem duração de 2 a 4 horas, acarretando oscilação da dose efetiva plasmática ao longo do dia e o metabolismo é hepático (ALÓE, 2010).

A absorção do MFD é completa e rápida, atravessando a barreira hematoencefálica facilmente, devido a sua lipossolubilidade. Após a absorção, em um período de 48 a 96 horas, o MFD é metabolizado através do sistema

microsomal hepático. O principal metabólico urinário é um produto desesterificado, o ácido ritalínico (AURIEL et al., 2009).

As doses diárias necessárias para alcançar os benefícios clínicos variam amplamente em crianças e adultos devido à variabilidade na absorção pelo trato gastrointestinal, permeabilidade da barreira hematoencefálica e resposta ao tratamento. A dose clínica pode variar de 0,1 a 1,6 mg/Kg/dia, normalmente dividida em 3 a 4 doses (SWANSON et al., 2003). Para a obtenção de melhor resposta terapêutica, a dose deve ser ajustada individualmente (SWANSON et al., 1991).

Os efeitos adversos remetidos ao uso de MFD incluem anorexia, náuseas e vômitos; dores abdominais, cefaleias, inibição do crescimento quando usado por períodos prolongados nas crianças, palpitações, hipertensão e psicose. O MFD está contraindicado na gravidez e aleitamento; glaucoma, tiques, doença cardíaca e epilepsia (INFARMED, 2016).

A bula do medicamento Ritalina® (2016) adverte sobre os riscos de desenvolver dependência física e psíquica, fato que justifica sua prescrição cautelosa em pacientes com história de uso de dependência de drogas ou emocionalmente instáveis, por risco de aumentarem a dose do tratamento por iniciativa própria.

A preocupação acerca da segurança do metilfenidato tem aumentado, principalmente, no que diz respeito à possibilidade de desenvolvimento de doenças cardio e cerebrovasculares. É importante que sejam feitos exames antes do início do tratamento e monitorizações regulares dos parâmetros cardiovasculares durante o mesmo (BERMAN, 2009).

O perfil de eficácia e dos eventos adversos é similar aos efeitos produzidos pelos estimulantes. Porém, seu mecanismo de ação ainda não está completamente conhecido. Sabe-se que o mecanismo de ação do metilfenidato e das anfetaminas é exatamente o mesmo da cocaína: poderosos estimulantes que aumentam a atenção e a produtividade (BRATS, 2014).

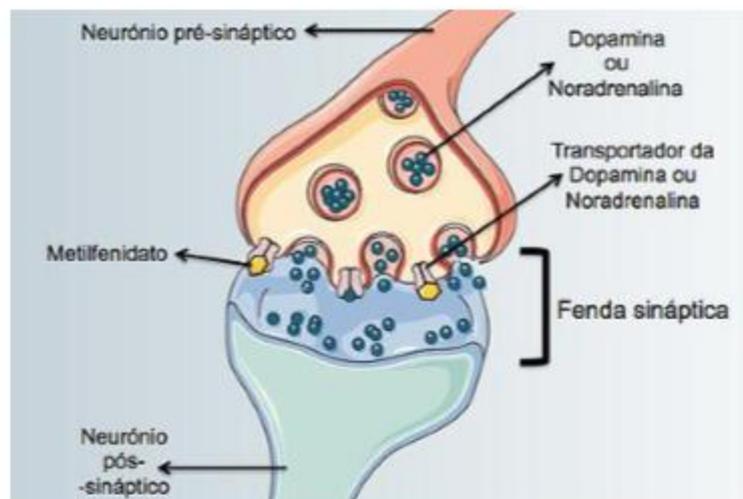
Com estrutura química semelhante, essas substâncias aumentam os níveis de dopamina no cérebro, pelo bloqueio de sua recaptação nas sinapses. Como consequência desse aumento, o cérebro torna-se dessensibilizado a situações comuns da vida que provocam prazer, como alimentos, emoções, interações sociais, afetos, o que leva à busca contínua do prazer artificial provocado pela droga, culminando na “drogadição”. Além disso, especula-se se os aumentos

desnecessários da dopamina durante a infância poderiam alterar o desenvolvimento do cérebro. Como a medicação costuma ser retirada em torno dos 18 anos, esses jovens podem se tornar áditos a cocaína na vida adulta, como modo de substituir a droga legal que tomaram por anos (MOYSES; COLARES, 2013).

O seu mecanismo de ação passa por inibir a recaptação de dopamina e noradrenalina provocando um aumento extracelular das catecolaminas na fenda sináptica (Figura 2), o que eleva o nível de alerta do SNC, incrementa os níveis excitatórios do cérebro, resultando numa melhor concentração, coordenação motora e controlo dos impulsos (RANG et al., 2015; GUZMAN, 2016).

Dessa forma, quanto ao mecanismo do MFD, a conclusão que se chega é a de que em indivíduos com TDAH, o tratamento com MFD induz um aumento na amplificação do sinal dopaminérgico estriatal, que poderia levar à melhora da atenção e diminuição da distração. Adicionalmente, a dopamina é um neurotransmissor que salienta o sinal do estímulo e dirige a motivação da *performance* na direção da meta do comportamento (KOOB, 1996; BERRIDGE; ROBINSON, 1998; HOLLERMAN; SCHULTZ, 1998).

Figura 2- Mecanismo de ação do metilfenidato



Fonte: SOUSA et al., 2015

Durante o tratamento com o MFD é importante ter em conta possíveis interações com outros estimulantes do SNC e IMAO (inibidor da Monoamina Oxidase), com álcool e cafeína. O MFD pode também aumentar o efeito dos

antidepressivos tricíclicos e dos inibidores seletivos da recaptção da serotonina. A sua prescrição é contra- indicada em casos em que crianas apresentem tiques, glaucoma, epilepsia ou doenas cardíacas (AFONSO, 2010).

Levando em consideração a relao do tratamento com MFD, o TDAH e a epilepsia, há propostas de uma análise cuidadosa quanto ao risco/ benefício ao se considerar o tratamento de TDAH com MFD em crianas com epilepsia, onde há fatores que devem ser levados em consideração como a frequência, gravidade e tipo de convulsão, bem como o curso longitudinal dos sintomas do TDAH (RAVI; ICKOWICZ, 2016).

No estudo de Gonzalez-Heydrich et al., 2004, realizado com 27 crianas entre 6 e 14 anos com epilepsia e TDAH, que tiveram pelo menos uma crise nos últimos cinco anos, mas que não apresentaram crises no último mês, e recebeu tratamento com MFD, foi observado que dois pacientes sofreram crise, e o maior número de pacientes melhoraram significativamente os sintomas de TDAH. Mais recentemente, estes autores apresentaram resultados de 33 crianas e adolescentes com TDAH e epilepsia e descobriram que um pequeno número de crises ocorreu tanto no grupo que recebeu o MFD (cinco casos) e no grupo de placebo (três casos) (GONZALEZ-HEYDRICH et al., 2010).

1.2 Transtorno do Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH)

O Transtorno do Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH) é um dos transtornos neurológicos do comportamento mais comum da infância e parecer haver fortes fatores biológicos, sociais, genéticos e fatores ambientais que contribuem para o desenvolvimento desse transtorno. É caracterizado por uma série de problemas, sinais claros e repetitivos de desatenção, inquietude e impulsividade, que resultam em um desenvolvimento não adequado no dia-a-dia (SOUZA; SOUZA, 2016).

O TDAH afeta entre 3,4% à 7,2% das crianas e dos adolescentes no mundo (POLANCZYK et al., 2015; THOMAS et al., 2015). Em 2007 foi estimado que aproximadamente 5,4 milhões de crianas e adolescentes entre 4 a 17 anos tinham TDAH nos Estados Unidos da América (VIRTUOSO, 2016). Estimativas de prevalência de TDAH em crianas (0,9%) e adolescentes (26,8%) bastante discordantes foram encontradas no Brasil (ANVISA, 2012). Não foi evidenciado um

aumento da prevalência da doença na última três décadas, sugerindo que o aumento observado nas taxas de diagnóstico é reflexo da melhor conscientização da população aliada à melhora da prática clínica e do maior acesso aos medicamentos (POLANCZYK et al., 2014).

Há algum tempo, pensava-se que os sintomas do TDAH diminuían com a adolescência, mas os sintomas nascem com o indivíduo, aparecem já na infância e acompanha-o durante sua vida. Pesquisas mostraram que a maioria das crianças com TDAH chega à maturidade com um padrão de problemas muito similar aos da infância e que quando adultos, experimentam dificuldades no trabalho, na sociedade e no ambiente familiar (SOUZA; SOUZA, 2016).

Na população mundial, o TDAH é mais frequente em meninos do que meninas com uma proporção de 2:1 em crianças e 1,6:1 nos adultos. Nas meninas predomina a apresentação desatenta, com menos sintomas de distúrbios de conduta com comorbidades (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DO DEFICIT DE ATENÇÃO, 2015).

Atualmente, a quinta edição do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DMS-5) subdivide o TDAH em três subtipos, de acordo com a sintomatologia: Predominantemente desatenta (não presta atenção em detalhes ou comete erros por descuido em tarefas escolares e de trabalho; dificuldade de manter a atenção em tarefas ou atividades lúcidas; perder coisas necessárias para tarefas ou atividades, etc); Predominantemente hiperativa/ impulsiva (remexer ou batucar as mãos ou pés ou se contorcer na cadeira; correr ou subir nas coisas em situações em que isto é inapropriado, deixar escapar uma resposta antes que a pergunta seja concluída, interromper ou se intrometer nas conversas, etc) e, Combinada (caracteriza-se pela combinação dos dois subtipos) (ASSOCIAÇÃO PSIQUIÁTRICA AMERICANA, 2014).

A taxa de diagnóstico de TDAH aumentou em cerca de 41% durante os últimos 10 anos, com um aumento principalmente entre os adolescentes do sexo masculino com idade entre 14 a 17 anos (JORDAN et al., 2014). O diagnóstico do TDAH é realizado a partir de exame clínico, no qual são analisadas características comportamentais, relacionadas à presença ou não de hiperatividade, impulsividade e distratibilidade. Não se conhecem marcadores biológicos ou testes laboratoriais que podem confirmar a sua presença e assim esse transtorno é identificado,

principalmente, através das observações das características comportamentais (TRIPP; WICKENS, 2009).

Para o diagnóstico do TDAH é necessário a presença de seis ou mais sintomas de desatenção e/ou de hiperatividade/impulsividade por pelo menos seis meses, com prejuízo nas atividades acadêmicas e sociais. Além disso, eles devem iniciar antes dos 12 anos de idade e estarem evidentes em mais de um contexto da vida do indivíduo (na escola e em casa, por exemplo) (ASSOCIAÇÃO PSIQUIÁTRICA AMERICANA, 2014).

Esse diagnóstico é um processo de múltiplas facetas: ele é multi-profissional e requer participação de professores, psicólogos, médicos e se, necessário, outros profissionais da área da saúde e da educação. A participação desses profissionais, além da família, é essencial para registrar, adequadamente, um histórico detalhado e para a correta avaliação do quadro (SOUZA; SOUZA, 2016).

1.2.1 Etiologia do TDAH

Não há ainda completo entendimento da etiologia do TDAH, sabe-se que é um transtorno heterogêneo e que se desenvolve de uma interação entre fatores ambientais e genéticos. Crianças de pais com TDAH tem de 2 a 8 vezes mais risco de serem portadores do transtorno do que a população em geral (GENRO et al., 2012; MALIN; TILL, 2015).

A Associação Americana de Psiquiatria (APA) lista em seu manual, DSM-5, como fatores de risco: fatores ambientais (baixo peso ao nascer, criminalidade dos pais, colocação em lar adotivo, negligência, abuso infantil, exposição a agentes tóxicos como o chumbo, ao cigarro, aos medicamentos (paracetamol), uso de substâncias ilícitas, infecções como encefalite e exposição ao álcool na vida uterina), causas genéticas e fisiológicas (onde o TDAH é mais comum em parentes de primeiro grau, anormalidades metabólicas, deficiência nutricional e epilepsia tem influência nos sintomas do TDAH) (APA, 2013; THAPAR; COOPER, 2015). Estudos têm afirmado que as dificuldades no contexto familiar são as consequências e não o agente etiológico do TDAH (SOUZA; SOUZA, 2016).

Em crianças e adolescentes com desenvolvimento típico, sabe-se que o nível socioeconômico pode produzir diferenças no desenvolvimento cognitivo em

atividades que envolvam atenção, funções executivas, linguagem, leitura e raciocínio espacial (NOBLE et al., 2015).

Segundo Furukawa et al. (2014), os fatores genéticos, provavelmente, envolvem múltiplos genes de efeito moderado, não de único gene. Identificou-se uma contribuição genética significativa no transtorno, que apresenta uma taxa de herdabilidade estimada em 76% (POLANCZYK et al., 2012), entretanto, não há clareza sobre quais são os principais genes envolvidos. As pesquisas têm indicado alterações anatômicas e fisiológicas nas áreas frontoparietais e frontoestriatais. Indivíduos com TDAH apresentam redução bilateral no volume pré-frontal e na substância branca das regiões occipitais e parietais, bem como aumento da massa cinzenta na área parietal inferior. Já que há alterações da morfometria cerebral, há reduções no volume do cerebelo, do núcleo caudado e do putâmen. Há também alterações no funcionamento do cíngulo dorsal anterior, do circuito frontoestriatal, do córtex pré-frontal e do lobo parietal direito (JOHNSON et al., 2007; POLANCZYK et al., 2012).

1.2.2 Neurobiologia do TDAH

A atividade cognitiva humana é cada vez mais caracterizada como uma propriedade de interações de redes cerebrais funcionalmente especializadas (SPRENG et al., 2013). Uma complexa química cerebral interliga regiões corticais e subcorticais, núcleos vegetativos, motores e sensoriais a fim de realizar operações cognitivas elementares, como atenção, percepção, linguagem e memória (STILES; JERNIGAN, 2010; GUARDIOLA, 2015).

Sabe-se que os mecanismos atencionais são desempenhados pela interconexão de algumas estruturas neuroanatômicas, como o Sistema Ativador Reticular Ascendente (SARA), áreas subcorticais constituintes do sistema límbico mesotemporais, córtex pré-frontal (CPF), giro cingulado anterior, colículo superior, núcleo pulvinar do tálamo, cerebelo e lobo parietal posterior (LURIA, 1981; POSNER et al., 2014). O circuito formado pelo CPF do hemisfério direito e o tronco encefálico, mais especificamente no *locus coeruleus*, sistema colinérgico, núcleos da base e núcleo talâmico intralaminar parecem relacionar-se com o sistema de vigília cerebral, a manutenção da sustentação atencional e do estado geral de alerta (HOFMEISTER; STERPENICH, 2015).

O sistema atencional anterior, desenvolvido pelo córtex frontal exerce atividade regulatória ao estabelecer conectividade global inibitória do CPF com outras regiões, e participa conjuntamente do núcleo estriado do planejamento das respostas motoras. Já o sistema atencional posterior, formado pelo córtex parietal, núcleos talâmicos e estruturas mesencefálicas, associa-se com o controle do processamento perceptual automático e a atenção explícita ou voluntária (BOLFER et al., 2010; FARRANT; UDDIN, 2015).

Outra hipótese de grande impacto científico relaciona o TDAH às catecolaminas, sendo o principal neurotransmissor a dopamina (GUARDIOLA, 2015). Entre os possíveis marcadores genéticos relacionados com o TDAH encontram-se os genes transportadores de dopamina – DAT1, DRD4 e DRD5 (MICK; FARAONE, 2008). O circuito dopaminérgico cerebral envolve projeções do neurotransmissor dopamina do mesencéfalo para diversas áreas cerebrais: colículo superior, tálamo, gânglios da base, lobo parietal, lobo frontal e giro cingular anterior, que são apontadas na literatura como regiões intimamente associadas ao TDAH (GUARDIOLA, 2015).

As rotas dopaminérgicas mesocorticais e nigrostriatal são responsáveis pelos déficits cognitivos na modulação da atenção visual e nas funções executivas. O excesso de dopamina em áreas estriatais (núcleo caudado e putâmen) resulta nos sintomas de hiperatividade e impulsividade (JUCAITE et al., 2005).

1.2.3 Comorbidades do TDAH

As principais dificuldades relatadas pelos médicos em relação ao TDAH são relacionadas às comorbidades na adolescência, sendo também muito referido por vários autores (SOUZA et al., 2001; ROHDE et al., 2004; MACHADO et al., 2014; PAULA et al., 2015). O alto índice de comorbidades que podem estar envolvidas no diagnóstico do TDAH, em aproximadamente 50% dos casos, representa riscos tanto para o diagnóstico diferencial quanto para o tratamento e, a co-ocorrência do TDAH com outros transtornos deve ser investigada (MACHADO et al., 2014; MATTOS, 2015).

Sabe-se que crianças com TDAH podem apresentar dificuldades de aprendizado em 16 a 26% dos casos. Entre esses, são observados transtornos específicos, como dislexia, disgrafia e discalculia, sendo a dislexia a comorbidade

mais frequente. Em muitos casos, os transtornos da linguagem estão presentes, seja por distúrbios da fala, como dificuldades articulatórias, alterações do ritmo da fala e da qualidade da vocalização, seja por distúrbios da linguagem, tanto na percepção quanto na elaboração, como falhas no acesso lexical, dificuldades de estruturação sintático-semântico e falhas no processamento da informação (ROTTA; OHLWEILER; RIESGO, 2016).

Existem várias pesquisas investigando o TDAH em crianças e adolescentes, mas poucos estudos conseguem obter participantes portadores exclusivos de TDAH, ou seja, desvinculados de outras comorbidades. Nos contextos clínicos e ambulatoriais observa-se a alta frequência de comorbidades do TDAH com outros transtornos mentais (APA, 2013; PAULA et al., 2015).

A comorbidade é significativa em pacientes com TDAH, e sugere a necessidade de entrevistas diagnósticas que abordem outros sintomas psíquicos e comportamentais além daqueles específicos do TDAH (SOUZA et al., 2001). Uma importante distinção entre TDAH e as comorbidades é a precocidade dos sintomas, o curso contínuo e sem remissões e a piora dos sintomas em ambientes de maior demanda, como a escola (ANDRADE et al., 2011).

As comorbidades associadas ao TDAH e que podem ocorrer na adolescência ou na idade adulta são: Transtorno Depressivo Maior, Transtorno do Humor, Transtorno de Ansiedade, Transtornos Psiquiátricos e Neurológicos da Infância, Transtorno Obsessivo Compulsivo (TOC) e Tiques, Transtorno de Aprendizado, sendo observada uma elevada prevalência de comorbidade do TDAH com o Transtorno de Conduta (TC) e Transtorno Opositor Desafiante (TOD), situada em torno de 30 a 50% dos casos (ROHDE et al., 2000; GÜNTHER et al., 2011).

Estima-se que quase 50% dos casos de TDAH, em adultos, levam a um ou mais transtornos de ansiedade, com maior prevalência em mulheres que em homens. Em 25 a 40% dos casos que são relatados, a criança apresenta muito medo, preocupa-se exageradamente com problemas familiares e com atividades escolares (MATTOS, 2010; ROTTA, OHLWEILER; RIESGO, 2016).

O transtorno do humor pode ocorrer em 50% dos casos, caracterizado tanto por um quadro comportamental bipolar, com alternância de depressão e mania, como também por uma depressão grave e duradoura (ROTTA, OHLWEILER; RIESGO, 2016). A depressão em crianças pode acarretar em sintomas físicos,

como: dores de cabeça e dores de barriga (somatização), além da acentuada queda no rendimento escolar (MATTOS, 2010).

O TDAH é citado como a principal comorbidade em pacientes com epilepsia (FASTENAU et al., 2008; FASTENAU et al., 2009; DAVIS et al., 2010). A presença do TDAH em crianças e adolescentes com epilepsia é amplamente descrita na literatura. É relatado que crianças com epilepsia e TDAH apresentam uma maior propensão ao *status epilepticus* do que aquelas com apenas epilepsia (BARBOSA; RIBEIRO; CYSNEIROS, 2013).

Apesar da elevada taxa de TDAH em jovens com epilepsia e sua relevância potencial para o bem-estar das crianças, apenas algumas investigações de neuroimagem desta comorbidade foram publicadas. Não está bem estabelecida ainda se os mecanismos e substratos neurobiológicos desta doença em crianças com epilepsia são semelhantes aos de crianças sem epilepsia (COHEN et al., 2012).

Estudos colocam a prevalência de TDAH em 21- 31,5% dos pacientes com epilepsia, sendo identificada como uma comorbidade comum, aproximadamente 5 vezes maior do que a prevalência do TDAH na população em geral (HERMANN et al., 2007; BERG, CAPLAN; HESDORFFER, 2011; RUSS, LARSON; HALFON, 2012; COHEN et al., 2012). Loutif et al. (2010), em crianças com epilepsia idiopática, relataram que 53% obtiveram o diagnóstico para TDAH. O tipo combinado foi o mais prevalente (43,7%), seguindo pelo tipo hiperativo-impulsivo (37,5%) e pelo tipo desatento (18,7%).

1.3 Epilepsia

A epilepsia é uma doença neurológica associada a uma significativa taxa de morbidade e mortalidade (OTTE et al., 2012). É caracterizada pela interrupção paroxística do funcionamento normal do cérebro causada por crises epiléticas que ocorrem de maneira recorrente e imprevisível ou por uma única convulsão na presença de outros fatores que denota um elevado risco de recorrência (FISHER et al., 2005; FISHER et al., 2014).

A visão deturpada que muitas pessoas têm acerca da epilepsia decorre do alarde produzido pelas convulsões tônico-clônicas generalizadas. O indivíduo apresenta perda de consciência, antes do início das crises, além da possibilidade de outras manifestações como gritos, perda do controle da bexiga ou intestino e, ao

recuperar a consciência, ficam no estado de confusão e amnésia. O fato de ser uma doença episódica também contribuiu para o estabelecimento do estigma de que a pessoa estava possuída, o que traz, para esse indivíduo, o sentimento de vergonha por não controlar esta situação (GRAVITZ, 2014).

Denomina-se crise epiléptica aguda a disfunção neurológica que gera distúrbios de cognição, consciência, movimentos involuntários, manifestações psíquicas, sensoriais, autonômicas e de comportamento, podendo envolver diferentes áreas cerebrais (CHAUDHARY; DUNCAN; LEMIEUX, 2011). No desenvolvimento de alguns tipos de crises, vê-se o evento conhecido como convulsão, que consiste em uma alteração do comportamento resultante da atividade hipersincrônica, excessiva e repetitiva de neurônios do córtex cerebral. A natureza da crise pode ser apontada de acordo com a duração do evento e localização cerebral do mesmo (STEFAN et al., 2009; RAO; LOWENSTEIN, 2015).

A epilepsia é um dos principais transtornos neurológicos com ampla distribuição, desconhecendo idade, raça, padrão social ou limites geográficos (SILVA et al., 2014). Estima-se que entre 60 e 100 milhões de pessoas sejam acometidos pela epilepsia o que a torna a condição neurológica crônica grave mais comum no mundo (SONG et al., 2002; FISHER et al., 2014; WHO, 2015). No mundo, há cerca de 2,4 milhões de novos pacientes epiléticos a cada ano, dos quais, pelo menos, 50% começam na infância e adolescência (TUTANC et al., 2015). No Brasil, a epilepsia, na infância, apresenta uma variação na prevalência de 11,9 a 21 casos em cada 100 crianças (LONGATO, 2015).

A fisiopatologia da epilepsia configura-se como um desequilíbrio, ou alterações da atividade elétrica neural, ainda vagamente compreendido, entre excitação e inibição do sistema nervoso central. No entanto, há fortes indícios da participação de neurotransmissores envolvidos com a inibição, como o GABA (ácido γ -aminobutírico) (BRIGGS; GALANOPOULOU, 2011).

Neurônios excitatórios e interneurônios inibitórios estão no centro da discussão sobre epilepsia. Participando da neurotransmissão excitatória, o glutamato é liberado e liga-se a receptores em outros neurônios promovendo o disparo da crise convulsiva. Por outro lado, a inibição desta via ocorre através da liberação do GABA por interneurônios inibitórios, o qual se liga a receptores presentes em neurônios, impedindo o disparo da crise. Esses neurotransmissores atuam nos espaços entre os neurônios (sinapses), havendo, porém, receptores para

o GABA localizados em outras regiões neuronais, que não as sinapses. Esta seria uma forma do organismo garantir a neurotransmissão inibitória (EISENSTEIN, 2014).

Além do desequilíbrio entre a transmissão excitatória glutamatérgica e a transmissão inibitória GABAérgica com aumento do estresse oxidativo, a gênese das convulsões também pode estar relacionada com outros sistemas de neurotransmissão, tais como serotoninérgico, adrenérgico e dopaminérgico, com relações e mecanismos não bem elucidados e muitas vezes controversos, e que podem estar relacionados com as comorbidades psiquiátricas da epilepsia (MARES; KUBOVÁ, 2008).

Em 2014, uma definição operacional de epilepsia para aplicação na prática clínica foi proposta, sendo a epilepsia definida por qualquer uma das condições como: 1. Pelo menos duas crises epilépticas espontâneas não provocadas (ou duas crises reflexas) ocorrendo em um intervalo superior a 24 horas; 2. uma crise não provocada (ou uma crise reflexa) e uma probabilidade de novas crises semelhantes ao risco geral de recorrência após duas crises espontâneas (cerca de 60%) e 3. pelo menos duas crises num contexto de epilepsia reflexa (FISHER et al., 2014).

Em 2011, a ILAE (Liga Internacional Contra a Epilepsia), por meio da sua Comissão de Classificação e Terminologia publicou novos conceitos, onde a classificação por localização, como focal e generalizada, deve ser mantida apenas para a definição de crises epilépticas e não mais ser utilizada para classificação de epilepsias, uma vez que muitas síndromes apresentam os dois tipos de crises. Esses termos poderiam ser usados em algumas instâncias, mas não em todas (BERG; SCHEFFER, 2011).

Dependendo da localização, as crises podem ser focais, ou seja, com início em uma região restrita do encéfalo, ou generalizada, quando as descargas se originam concomitantemente nos dois hemisférios. As crises generalizadas acometem a área cerebral como um todo e podem ser do tipo: clônica, tônica, tônico-clônica, mioclônica, atônica e de ausência, conforme as manifestações motoras evidenciadas (BERG et al., 2010). As crises focais apresentam descarga neuronal restrita a um hemisfério cerebral e o indivíduo pode ter ou não alterações motoras e de consciência. Podem ser simples, quando há preservação da consciência durante o ictus (crise epiléptica), ou complexas, quando há perda de consciência (BERG et al., 2010; FERNANDES, 2013).

As categorias etiológicas para o possível desenvolvimento da epilepsia são o distúrbio epileptogênico e fatores precipitantes. Os distúrbios epileptogênicos podem ser lesões, neoplasia, infecções, malformação vascular e congênita e anomalias genéticas. Já como fatores precipitantes, nos países em desenvolvimento, as infecções endêmicas são os principais fatores de risco, além do consumo de álcool, privação do sono e febre que podem ocasionar crises em pacientes com epilepsia (CALVANO et al., 2010).

Estimativas sugerem que cerca de 80% dos casos de epilepsia ocorrem em países em desenvolvimento, onde se encontra um número maior de pessoas desnutridas, com doenças infecciosas e com deficiência no atendimento médico, sabendo-se que um grande número de pacientes permanece sem o tratamento adequado. Cerca de 80% dos 50 milhões de pessoas no mundo, que têm epilepsia, vivem em baixa e média renda (MEGIDDO et al., 2016).

Pesquisadores buscam descobrir substâncias que sejam capazes de diminuir as frequências e propagação das manifestações epilépticas. Muitos fármacos já foram descobertos com essa finalidade, mas 30% dos pacientes não apresentam boa resposta ou apresentam efeito adverso severo aos medicamentos disponíveis (WAHAB, 2010).

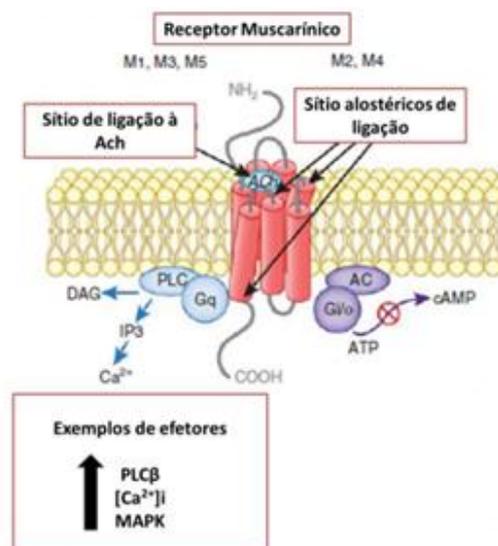
1.3.1 Epilepsia e Neurotransmissão Colinérgica

Vários estudos sugerem o envolvimento do sistema colinérgico na epilepsia humana (TURSKI et al., 1983a; JOPE; MORRISETT; SNEAD, 1986; HIRSCH et al., 1992; NATHANSON et al., 1999; MICHOTTE et al., 2000; PERSINGER; LEUNG; STEWART, 2001). Este sistema tem como neurotransmissor a acetilcolina (ACh). A figura 3 apresenta, esquematicamente, a neurotransmissão colinérgica, com ativação de receptores e a cascata de sinalização excitatória. A ACh é um mediador químico de sinapses no sistema nervoso central (SNC), no sistema nervoso periférico e também na junção neuromuscular. Seus receptores e o aparato enzimático responsável por sua síntese e degradação constituem o sistema de neurotransmissão colinérgica (BRUNEAU; AKAABOUNE, 2006). A estimulação da ACh promove uma ativação majoritária de receptores muscarínicos no SNC, em detrimento de uma ativação minoritária de receptores colinérgicos nicotínicos (EGLIN, 2006).

Experimentos em roedores para indução de convulsões utilizam o agonista muscarínico pilocarpina, que ativa receptores metabotrópicos muscarínicos do tipo M1, promovendo uma cascata de sinalização intracelular excitatória com ativação da fosfolipase C β e consequentes lesões cerebrais e mudanças de comportamento (TURSKI et al., 1989; MARINHO et al., 1997; NATHANSON, 2000; BRUNEAU; AKAABOUNE, 2006; ABDUL-RIDHA et al., 2014; KRUSE et al., 2014). No cérebro, processos como aprendizagem, memória, nocicepção e controle da temperatura são modulados por receptores muscarínicos, e o subtipo M1, pela predominância que tem em regiões do cérebro como hipocampo, córtex e estriado, estão intimamente envolvidos com a indução das convulsões, uma vez ativados por agonistas muscarínicos (HAMILTON et al., 1997; OKI et al., 2005; EGLIN, 2006; BUBSER et al., 2012; NEWMAN et al., 2012).

A ativação do receptor colinérgico muscarínico (PERSINGER et al., 1993; MARINHO et al., 1998) foi apontado como não sendo o único evento responsável pelas convulsões produzidas pela pilocarpina, sugerindo que após ativação do sistema colinérgico haveria uma interação direta e/ou indireta com outros sistemas, a saber: dopaminérgicos (AL-TAJIR; STARR; STARR, 1990a), glutamatérgico (FUJIKAWA et al., 1994 e 1995) e GABAérgico (FRITSCHY et al., 1999; ERAKOVIC et al., 2000; COSTA-LOTUFO et al., 2002), que podem estar envolvidos na manutenção e/ou propagação das convulsões (FREITAS et al., 2003).

Figura 3- Neurotransmissão colinérgica com ativação de receptores M1 e cascata de sinalização excitatória.



Fonte: Adaptado de Jones (2012)

1.3.2 Epilepsia do Lobo Temporal

A epilepsia do lobo temporal (ELT) é a forma mais comum de epilepsia em adultos, sendo responsável por 40% dos casos de epilepsia nesta população e 2/3 dessa população apresentam crises de difícil tratamento com antiepilépticos orais, havendo indicação cirúrgica (BLAIR et al., 2012). Pacientes com ELT podem apresentar crises focais com comprometimento ou não da consciência, geralmente precedidas por “auras”. Estas correspondem a manifestações sensitivo-sensoriais ou psíquicas puramente subjetivas e que ocorrem em 20% a 90% dos pacientes com ELT (KOTAGAL, 1991; ENGEL, 1996; GUILHOTO, 2011; ILAE, 2011; FERNANDES, 2013).

O lobo temporal é o mais epileptogênico dos lobos cerebrais e as funções relacionadas a memória, comportamento e aprendizado encontram-se distribuídas em circuitos temporais. Há evidências clínicas que indicam tratar-se de uma desordem progressiva em grande parte dos pacientes, havendo degeneração de tecido cerebral e comprometimento cognitivo gradual. A ELT costuma ser dividida em Epilepsia do Lobo Temporal Lateral (ELTL) e Epilepsia do Lobo Temporal Mesial (ELTM) e tem como manifestação patológica mais comum a esclerose hipocampal (TORRES, 2015).

O mecanismo patológico está normalmente associado à esclerose hipocampal e alterações na rede neuronal do hipocampo (ENGEL, 1996; JIANG et al., 2015). A hiperexcitabilidade neuronal provoca a desregulação na função amigdaló-hipocampal envolvida nesse tipo de epilepsia (GRAEBENITZ et al., 2011; MONTI; MELETTI, 2015).

Em adultos, a ELT é usualmente acompanhada de déficits de memória. Na infância, a ELT apresenta ampla diversidade clínica, eletroencefalográfica e etiológica. Por isso, muitos aspectos não estão definidos, especialmente os tipos de alterações cognitivas e comportamentais que as crianças podem apresentar. Crianças com ELT sintomáticas podem apresentar distúrbios de comportamento e problemas de aprendizagem, mesmo na ausência de déficit cognitivo global; há alta frequência de TDAH; além de déficits de memória, há comprometimentos de outras funções neuropsicológicas como atenção, linguagem, praxia construtiva e funções executivas. Quanto mais cedo o início da epilepsia, pior o armazenamento da

informação verbal, onde as lesões mesiais correlacionam-se a prejuízos de memória no processo de armazenamento das informações, enquanto lesões neocorticais correlacionam-se a problemas na recuperação das informações (GUIMARÃES, 2006).

1.3.3 Epilepsia e Distúrbios Neuropsiquiátricos

As comorbidades neuropsicológicas são um tópico bastante importante, mas de difícil abordagem pois a relação entre epilepsia e neuropsicologia parece ser multifatorial. Inúmeras variáveis clínicas relativas à epilepsia parecem influenciar os déficits neurocognitivos nas crianças com epilepsia, com destaque para etiologia, o tipo de epilepsia, a idade de início da epilepsia, a duração ativa da epilepsia, a frequência das crises, as descargas epiléticas subclínicas e o tratamento farmacológico (LOPES, 2013).

Muitos pacientes com epilepsia sofrem transtornos psiquiátricos, incluindo depressão, ansiedade, TDAH, psicose, distúrbios cognitivos e alterações de personalidade, mas os mecanismos subjacentes à associação entre epilepsia e as psicopatologias são ainda pouco compreendidas (BARBOSA, 2012).

Muitos estudos tem estabelecido uma forte conexão entre depressão e epilepsia, tendo em vista que estas desordens muitas vezes podem ser encontradas em um mesmo paciente. A depressão é o sintoma psiquiátrico mais frequente em pacientes que apresentam o distúrbio epilético, atingindo 20 a 55% dos pacientes com crises recorrentes, e 3 a 9% dos pacientes controlados (COELHO, 2014). Além disso, pacientes portadores de ELT apresentam os índices mais altos de depressão entre todos os tipos de epilepsia (KWON; PARK, 2014).

O mesmo comportamento se percebe com os transtornos de ansiedade, com prevalência entre 11 e 25% em portadores de epilepsia, acima daquela encontrada na população em geral, de 7 a 11%. Tais distúrbios têm sido identificados como fatores de risco de epilepsia refratária em pacientes com diagnóstico recente, além de estarem associados a um aumento de efeitos adversos de drogas antiepiléticas (DAE) (TELLEZ-ZENTENO et al., 2007; DALMAGRO et al., 2012; ALSAADI et al., 2015).

Muitas das comorbidades neurocomportamentais nas crianças com epilepsia, previamente consideradas efeitos secundários da medicação anti-epilética, estão

na verdade presentes em um número considerável de crianças cuja epilepsia acaba de ser diagnosticada e que ainda não iniciaram o tratamento medicamentoso (HERMANN et al., 2006, 2007a, 2008; JACKSON et al., 2013). Isto significa que estes problemas parecem estar presentes mesmo antes da primeira convulsão, sugerindo que os déficits cognitivos são um primeiro sintoma da perturbação fisiológica que dará origem a epilepsia, e não apenas um efeito secundário das convulsões ou dos fármacos (LOPES, 2013).

1.3.4 Epilepsia e Estresse Oxidativo

A mitocôndria é a principal fonte de geração de radicais livres, uma vez que o metabolismo de respiração celular normal gera espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs). As EROs e ERNs são definidas como moléculas que possuem elétrons desemparelhados no seu orbital mais externo. Assim, a geração de radicais livres em baixas ou moderadas concentrações é uma característica fisiológica importante para a célula (HOVATTA et al., 2010). As EROs são o radical ânion superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH), e as principais ERNs são o óxido nítrico (NO) e o peroxinitrito ($ONOO^-$) (APRIOKU, 2013).

O estresse oxidativo pode ser definido como o desequilíbrio entre os níveis de compostos pró-oxidantes (produção de espécies reativas de oxigênio - ERO e espécies reativas de nitrogênio – ERN) e antioxidantes (eliminação de radicais livres), com predomínio dos primeiros, ocasionando elevada produção de espécies reativas (VELLOSA et al., 2013).

A epilepsia consiste numa doença neurodegenerativa, e sabe-se que o estresse oxidativo está envolvido (MEHVARI et al., 2016). Vários estudos experimentais relacionam a epilepsia ao estresse oxidativo, apesar de não termos conhecimento ainda se o estresse oxidativo é uma causa ou consequência desta patologia, tem sido amplamente mencionado que o aumento da geração de radicais livres pode levar convulsões prolongadas podendo resultar em disfunção mitocondrial no hipocampo precedendo morte de células neuronal e causando subsequente epileptogênese (ARMENTA et al., 2014).

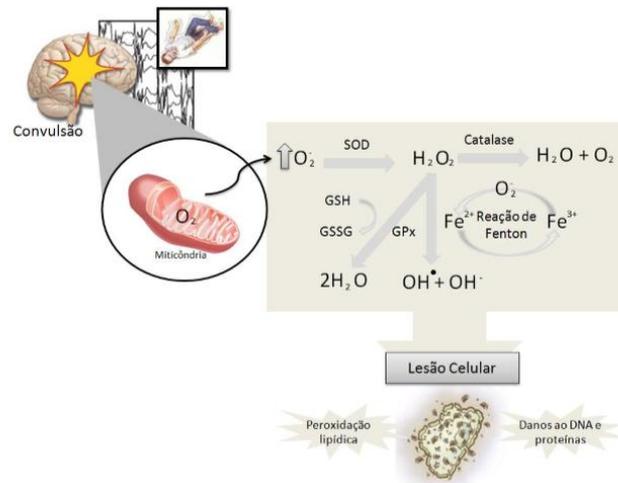
Sabemos que a formação de EROs ocorre quando elétrons desemparelhados fogem da cadeia transportadora de elétrons e reagem com o oxigênio molecular,

gerando assim superóxido, peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil (OH^\cdot). Os aumentos prolongados de EROs induzem um risco inerente de aumento na neurodegeneração, tais como o observado na epilepsia (ARMENTA et al., 2014; SHIN et al., 2011). O peroxinitrito (ONOOH) que consiste em uma ERNs é um oxidante potente e é altamente reativo, induz a nitração da tirosina, peroxidação lipídica, e citotoxicidade, incluindo a morte celular (ARMENTA et al., 2014).

Os radicais livres resultantes do desequilíbrio redox endógeno podem desempenhar um papel importante na determinação do estresse oxidativo, morte celular e, conseqüentemente, dano tecidual. O oxigênio reativo ocasiona a oxidação dos lipídeos de membrana promovendo conseqüentemente um processo denominado de peroxidação lipídica. A função e estrutura das membranas celulares são perturbadas e destruídas pela peroxidação lipídica. Esse processo gera subprodutos como aldeídos reativos que podem alterar ainda mais a sua função e, subseqüentemente, provocar danos celulares. O malonildialdeído (MDA) é um dos aldeídos reativos mais amplamente estudado como marcador laboratorial de peroxidação lipídica (MARTINC; GRABNAR; VOVK, 2014).

O nível de peroxidação lipídica decorrente da ação das espécies reativas tem sido utilizado como um meio de avaliação do papel do estresse oxidativo na atividade de substâncias anticonvulsivante. Estudos demonstraram em modelos experimentais que após convulsões existe uma elevação no nível de peroxidação lipídica no córtex de roedores (Figura 4) (JUNIOR et al., 2009). Após a administração de substâncias anticonvulsivantes esse aumento de peroxidação lipídica induzido pela convulsão é prevenido (ALDARMAA et al., 2010; GOEL et al., 2011; HUANG et al., 2012).

Figura 4- Potencialização da formação de espécies reativas decorrentes da convulsão e dos danos causado pelo estresse oxidativo.

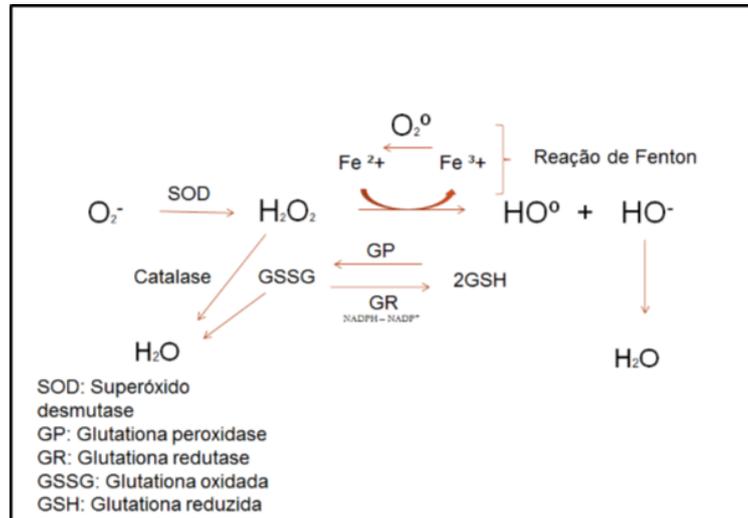


Fonte: COELHO, 2014.

O óxido nítrico (NO) também tem um papel importante no estresse oxidativo. O NO reage com o ânion superóxido dando origem ao peroxinitrito, que posteriormente pode se decompor dando origem ao radical hidroxila (OH^\bullet) (MEHTA et al., 2013). Essa predisposição do NO a formar radicais livres e espécies reativas faz com que ele seja uma fonte de estresse oxidativo. Portanto, pode ter um importante papel em desordens como a epilepsia (BANACH et al., 2011). O envolvimento do NO na epilepsia tem sido demonstrado em vários estudos de forma contraditória. O NO modula tanto as convulsões (JELENKOVIC et al., 2002) como a ação anticonvulsivante de certas substâncias (BOROWICZ et al., 1997; LUSZCZKI et al., 2007; SHAFAROODI et al., 2012; RAHMATI et al., 2013).

Da mesma forma que as EROs e ERNs são produzidas, o organismo possui maneiras de diminuir o dano causado por elas através de mecanismos enzimáticos e não enzimáticos. Entre as enzimas antioxidantes, as principais são: a superóxido desmutase (SOD), catalase (CAT) e a glutathiona peroxidase (GPx) (Figura 5). Entre estas, a SOD e CAT são as mais importantes por formarem as primeiras linhas de defesa antioxidante enzimática do organismo (BORRELI et al., 2014). Em certas situações patológicas, como as convulsões, a produção de EROs é muito alta, o que ocasiona uma diminuição da atividade de enzimas antioxidantes, por um mecanismo ainda não bem definido (RODRIGUES et al., 2012; BRANCO et al., 2013).

Figura 5- Principais mecanismos de inativação de espécies reativas de oxigênio



Fonte: PAES, 2017. A Superóxido desmutase (SOD) transforma o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O H_2O_2 pode ser convertido em água (H_2O) pela enzima catalase ou se transformar em radical hidroxil (HO^{\cdot}) e radical hidroxila (OH^{\cdot}) devido a reação de Fenton. A hidroxila pode se complexar com H^+ presentes na célula e se transformar em H_2O . A glutatona reduzida (GSH), catalisada pela enzima glutatona peroxidase (GP), capta o HO^{\cdot} ou H_2O_2 , levando a formação de glutatona oxidada (GSSG) que libera uma molécula de H_2O .

O estresse oxidativo pode ser consequência e/ou causa do processo inflamatório. São dois fatores que estão intimamente relacionados e, os astrócitos são as células-chave em ambos os processos (JENSEN et al., 2013). O estresse oxidativo contribui para a excitotoxicidade do glutamato, a qual é responsável por aumentar a expressão de genes pró-inflamatórios, inibir a expressão de fatores neurotróficos e levar a célula a apoptose, comprometendo a plasticidade neuronal, condição comum na depressão e epilepsia (MILLER et al., 2009; SANTELLO, VOLTERRA, 2012; KANDRATAVICIUS et al., 2012; NUNES et al., 2013; RÉUS et al., 2015).

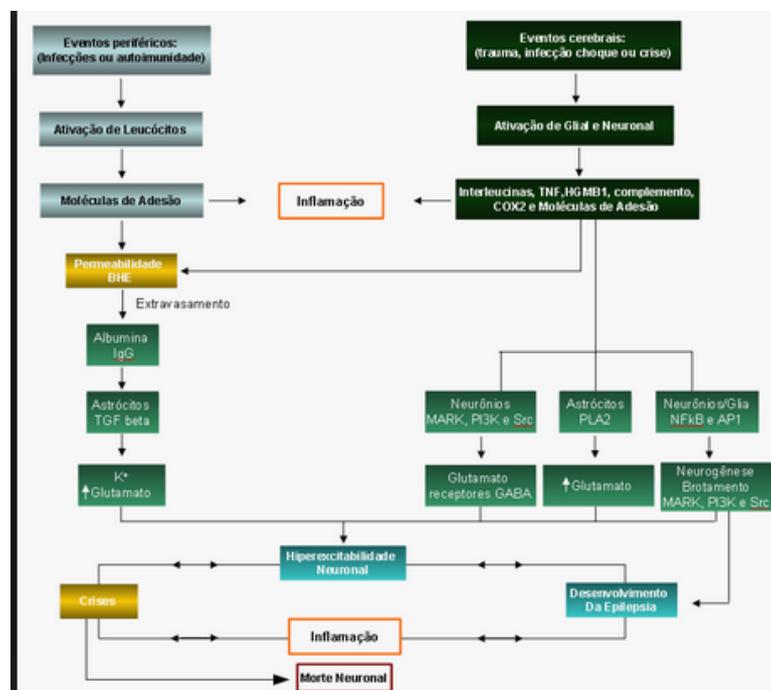
1.3.5 Epilepsia e Inflamação

Apesar da epilepsia ser uma doença neurológica, sabe-se que o sistema imunológico possui estreita relação com a mesma. O estudo dos processos inflamatórios e suas relações com as patologias do SNC têm apresentado uma grande importância nas pesquisas da última década. Achados em modelo

experimental de epilepsia demonstram que induções utilizando agentes convulsivantes ou estímulos elétricos promovem a liberação de uma onda de mediadores inflamatórios, tais como as citocinas, quimiocinas, receptores tipo *Toll* (TLR), prostaglandinas, fatores do sistema complemento, moléculas de adesão celular, e transdutores de sinal que ativam o fator de transcrição nuclear kappa B (NFkB) (VEZZANI et al., 2011).

Esta produção de mediadores é iniciada pelas células do endotélio cerebral e induzida na presença de crises epilépticas. A presença desta inflamação, por sua vez, pode promover o recrutamento periférico de células inflamatórias, corroborado pelo expressivo encontro de infiltrado de granulócitos durante o período da epileptogênese, juntamente ao reduzido número de linfócitos T na epilepsia crônica em modelos experimentais e humanos (Figura 6) (FABENE et al., 2008; RAVIZZA et al, 2008). Esse processo pode também ativar a síntese de glutamato em células da glia, proporcionando o aumento da excitabilidade neuronal, necessário para o estabelecimento das crises (VEZZANI et al., 2011).

Figura 6- Interação entre respostas inflamatórias e a neuroinflamação.



Fonte: Modificado de VEZANNI et al., 2011.

Kan e colaboradores (2012) observaram o aumento da expressão de mais de vinte parâmetros inflamatórios em cérebro de pacientes com ELT, sugerindo que

ocorre a coativação de múltiplos mediadores inflamatórios nessa condição patológica.

O papel da neuroinflamação na etiopatogenia da epilepsia também foi evidenciado através de estudos em animais, sendo que em diferentes modelos experimentais, as convulsões agudas levaram à ativação das células da glia e aumentaram a produção de citocinas (VIEIRA, 2015).

As citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e Fator de Necrose Tumoral (TNF- α) produzem efeitos benéficos e deletérios na função cerebral e os efeitos são dependentes de inúmeros fatores que incluem a concentração local de citocina no sítio de síntese, o tipo de célula alvo, a quantidade de tempo que o tecido fica exposto a essas citocinas e qual subtipo de receptores que estão envolvidos. A micróglia e os astrócitos são as principais células a produzirem citocinas durante a atividade epiléptica e representam a principal fonte de sua produção no cérebro. Uma fonte de produção adicional dessas citocinas são os monócitos do sangue que invadem o cérebro algumas horas depois dos eventos epilépticos agudos (GOUVEIA, 2011).

Os níveis de TNF- α aumentam rapidamente em várias doenças do SNC, tais como isquemia cerebral e epilepsia. O TNF- α regula a transmissão sináptica, especificamente o TNF- α libertado pelas células gliais. A transmissão sináptica pode ser acelerada através de receptores AMPA nos neurônios. Através de sua ligação a diferentes receptores e do ajuste da interação com o sistema ácido glutâmico, a excitabilidade nervosa pode ser alterada, afetando a sensibilidade da ocorrência de epilepsia (MAO et al., 2017).

O TNF- α está elevado em várias situações neuropatológicas associadas a déficit de memória e aprendizado, levando a procurar seu possível papel na plasticidade. Ele também contribui para a lesão neuronal por aumentar a superfície de expressão de receptores AMPA levando a excitotoxicidade por excesso de glutamato (PICKERING; CUMISKEY; CONNOR, 2005). Além da atuação em receptores glutamatérgicos, o TNF α causa uma endocitose dos receptores GABA A o que diminui a força inibitória (STELLWAGEM et al., 2005).

A óxido nítrico sintase indutível (iNOS) não é normalmente expressa nas células, sendo utilizada e modulada por citocinas inflamatórias como TNF- α , IL-1 β , IFN- γ , endotoxinas, hipóxia e estresse oxidativo (FUKUMURA; KASHIWAGI; JAIN, 2006; PAUTZ et al., 2010). A iNOS participa da formação de grandes quantidades

de NO, principalmente em processos inflamatórios. Ao se combinar com ânions superóxido, o NO torna-se precursor de um potente agente oxidante: o peroxinitrito, o qual tem sido amplamente associado à danos ao DNA, proteínas e lipídios (BENTZ et al., 2012; HALL; WANG; MILLER, 2012).

A enzima ciclooxygenase-2, codificada pelo gene COX-2, é uma das principais enzimas envolvidas no processo inflamatório, atuando na catálise da formação de prostaglandina a partir do ácido araquidônico (CERELLA et al., 2010). Apesar da isoforma da enzima ciclooxygenase-1 (COX-1) ser constitutivamente expressa na maioria dos tecidos, a COX-2 é induzida em eventos fisiopatológicos como na inflamação e na carcinogênese (ROUZER; MARNETT, 2009).

A enzima COX-2 é induzida rapidamente durante as convulsões. Os inibidores da COX-2 podem ser agentes terapêuticos da epilepsia, inflamação e doenças neurodegenerativas. Pode ser uma estratégia terapêutica adjuvante junto a terapia com drogas antiepilépticos usadas para o tratamento da epilepsia (ROJAS et al., 2013). A ativação da COX-2 no cérebro tem sido utilizada para promover dano neuronal em modelos animais da ELT (POLASCHECK et al., 2010; SERRANO et al., 2011).

1.4 Modelo experimental de epilepsia induzida por pilocarpina

Diferentes modelos de crises epiléticas em animais são bastante utilizados para estudar a fisiopatologia do processo convulsivo, uma vez que reproduzem alterações comportamentais, eletroencefalográficas e neuroquímicas que são semelhantes à epilepsia do lobo temporal em humanos (FREITAS, 2011a).

A pilocarpina é um alcalóide extraído das folhas do jaborandi (*Pilocarpus microphyllus*) e trata-se de um agonista muscarínico, sem efeitos nicotínicos. Na clínica é usada como miótico e no tratamento do glaucoma, empregada na forma de colírio (GUARNIERE, 2013). Ao administrar este alcalóide ocorrerá a promoção da ativação dos receptores colinérgicos muscarínicos do subtipo M1 (SANABRIA; CAVALHEIRO, 2000), ampliando o influxo de cálcio, causando uma despolarização da membrana e o disparo repetitivo dos neurônios, acompanhado de atividade pós-sináptica (KLINK; ALONSO, 1997).

A pilocarpina, administrada sistemicamente, em doses acima de 300 mg/Kg (única ou fragmentada), é capaz de induzir *status epilepticus* (SE), culminando com

lesões encefálicas específicas e movimentos estereotipados convulsivantes. As crises convulsivas motoras e límbicas iniciam-se cerca de 20 minutos após a administração e os animais evoluem para um estado de crises contínuas (clônicas), que caracterizam o estado epilético (SANABRIA; CAVALHEIRO, 2000).

O modelo de ELT induzida por pilocarpina mostrou um perfil crônico, sendo que os animais que recebem essa droga passam a apresentar os sintomas até o final da vida. Desse modo, os comportamentos causados pela administração de pilocarpina foram classificados em três fases. A primeira fase, denominada de fase aguda, com duração de 1 a 2 dias, corresponde ao período em que o animal apresenta convulsões comportamentais somadas a descargas eletroencefalográficas (EEG) que tendem a aumentar em duração e complexidade, gerando o SE; a segunda fase, ou período silencioso, é caracterizado pelo retorno gradativo do EEG e comportamento normal sem que sejam observadas crises convulsivas, essa fase dura uma média de 15 dias nos animais. Após esse período, tem início a terceira fase ou fase crônica em que surgem as crises convulsivas recorrentes espontâneas, sendo que essa fase permanecerá durante toda a vida do animal (CAVALHEIRO et al., 1991).

Na Epilepsia, o hipocampo, o corpo estriado e o córtex fronto-parietal são as áreas em que ocorre dano neuronal, além de serem as áreas mais atacadas, podem estar relacionadas de forma importante com os mecanismos de instalação da propagação e/ou manutenção (epileptogênese) das convulsões límbicas (MARINHO et al., 1998). Em geral, as convulsões induzidas por pilocarpina parecem depender da ativação do receptor muscarínico, da alteração da atividade enzimática de alguns sistemas, entre eles os sistemas de defesa antioxidante, do metabolismo dos fosfoinosítídeos (MARINHO et al., 1998), como também da participação de outros sistemas de neurotransmissão noradrenérgico, dopaminérgico, serotonérgico, GABAérgico e glutamatérgico (CAVALHEIRO et al., 1994; CAVALHEIRO et al., 1995).

BARONE et al. (1991) demonstraram que, através da administração intracerebral em corpo estriado de agonista dopaminérgico D₂, havia proteção com relação ao desenvolvimento de convulsões em ratos adultos, sugerindo também a participação dessa área cerebral nas convulsões límbicas.

Segundo Silva e Cavalheiro (2004) os modelos experimentais permitiram ao longo da história um grande progresso no conhecimento dos mecanismos básicos

das epilepsias e muitas DAEs foram criadas a partir de tais modelos. Atualmente qualquer nova droga deve ser obrigatoriamente testada em modelos animais antes de sua utilização em seres humanos.

1.5 Astrócitos no SNC e seu envolvimento na epilepsia

O SNC é composto por dois tipos de células: neurônios e células glia. As células da glia, que compõem 85% das células no SNC, diferentemente dos neurônios, não geram impulsos elétricos. O termo glia refere-se a cinco tipos celulares que são: oligodendrócitos, astrócitos, células de Schwann, células endimárias e micróglia (TEIXEIRA, 2012).

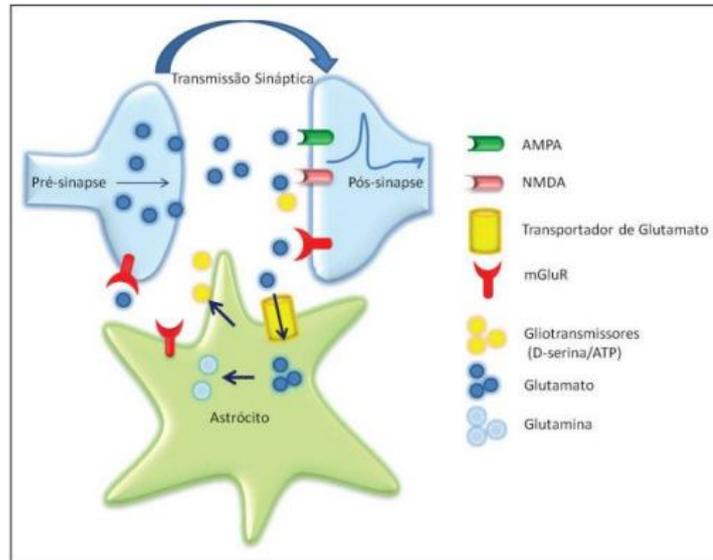
Os astrócitos são células caracterizadas morfologicamente por apresentarem prolongamentos que irradiam a partir de seu corpo celular, daí então a origem de sua denominação (astro=estrela e cito= célula). Durante muito tempo essas células foram vistas como meras coadjuvantes nas redes neuronais, porém, com o avanço da neurociências, houve um estreitamento da sua relação com os neurônios, onde passou a ser considerado regulador chave do funcionamento cerebral (HALASSA et al., 2007; SIDORYK-WEGRZYNOWICZ; ASCHNER, 2013).

Dentre algumas das muitas funções dessas células estreladas estão a sustentação, nutrição e controle da atividade sináptica dos neurônios. Ao redor do seu domínio de ocupação, seus numerosos prolongamentos celulares podem entrar em contato com milhares de sinapses, dendritos e também a microvasculatura cerebral, e, deste modo, tem sido proposto que essas células proporcionam suporte metabólico aos neurônios. Astrócitos são também capazes de realizar a modulação das vias de sinalização de transmissores, incluindo glutamato, GABA e adenosina, e, conseqüentemente apresentam potencial para modular a transmissão sináptica e excitabilidade neuronal (CLASADONTE; HAYDON, 2010; HALASSA et al., 2007).

Nos últimos anos foi caracterizada a participação dos astrócitos nas sinapses compondo o que é chamado de sinapse tripartida. A sinapse tripartida é constituída de três elementos, elementos pré-sinápticos e pós-sinápticos neuronais e os astrócitos, a partir de seus processos celulares (Figura 7). A sinapse tripartida constitui-se um dos sítios de atuação dos gliotransmissores, os quais atuam sobre o processo sináptico através de mecanismos capazes de regular a função pré-

sináptica e modular a resposta pós-sináptica (HALASSA et al., 2007, 2010; PANANASCH et al., 2012).

Figura 7- Estrutura da sinapse tripartite composta pelos neurônios pré e pós - sinápticos (em azul) e a célula astrocitária (em verde).



Fonte: GOMES; TORTELLI; DINIZ, 2013

Os astrócitos estão envolvidos em muitos processos fisiológicos e realizam suas funções graças ao posicionamento estratégico, chegando até os vasos sanguíneos, com suas porções terminais, ao mesmo tempo em que também se aproximam das sinapses, por meios de prolongamentos (BATASSINI, 2015). Têm também um papel importante no SNC durante situações patológicas, quando apresentam alterações morfológicas e funcionais (PAPA et al., 2014).

Os astrócitos estão envolvidos com a modulação neuronal sendo alvo de estudos de doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer, isquemia, doença de Parkinson e epilepsia. Na isquemia cerebral, os astrócitos têm um papel bastante significativo na fase crônica após a injúria, controlando a homeostasia iônica e secretando fatores neuroprotetores (WEGRZYNOWICZ et al., 2010).

Na epilepsia, existe a ocorrência de astrócitos reativos tanto em síndromes que causam epilepsia, como em modelos em animais. Nesses casos, os astrócitos apresentam não só redução da expressão de transportadores de glutamato, o que causa excitotoxicidade, mas redução da expressão dos canais de potássio retificadores de influxo, que são responsáveis pela remoção de íons K^+ que ficam acumulados durante intensa atividade sináptica (BORDEY; SONTHEIMER, 1998;

BEDNER; STEINHÄUSER, 2013). Isso causa um desbalanço osmótico e aumento local de íons K^+ , ocasionando crises epiléticas e enfatizando a importância do estudo desta célula como possível alvo farmacológico em casos de epilepsia (DEVINSKY et al., 2013; CRUNELLI, CARMIGNOTO, STEINHAUSER, 2015) .

2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

Apesar da taxa elevada de TDAH em jovens com epilepsia ainda não está bem estabelecido se os mecanismos e manifestações neurobiológicos deste transtorno em crianças com epilepsia são semelhantes aos de crianças sem epilepsia (SAUTE et al., 2014).

Estima-se que o transtorno afete ao redor de 12 a 39% dos indivíduos epiléticos. Deve-se, portanto, manter um alto grau de suspeita de TDAH em crianças portadoras de epilepsia (LOUTF, 2010).

O metilfenidato é o fármaco utilizado no tratamento do TDAH em crianças e adolescentes e, o FDA já adverte contra o uso desse medicamento em pacientes com epilepsia (RAVI; ICKOWICZ, 2016). O MFD, em estudos experimentais, apresentou um efeito neurotóxico, onde as convulsões dos animais foram intensificadas, visto na avaliação comportamental, utilizando o modelo de convulsão induzido por pilocarpina através do tratamento agudo com MFD (LINHARES, 2014).

Não é sabido ainda se as crises convulsivas são intensificadas, nos pacientes, pela comorbidade do TDAH e epilepsia ou se é devido à utilização do MFD. Portanto, resolve-se investigar de forma mais aprofundada a possível atividade do MFD em animais com epilepsia, com a finalidade de consolidar as informações que auxiliem no conhecimento para o processo de decisão da escolha terapêutica mais segura e adequada para os pacientes epiléticos e que necessitem da utilização do MFD, fazendo-se, então, uma avaliação de risco-benefício e contribuindo para o uso racional desse medicamento.

3 OBJETIVOS

3.1 Gerais

Avaliar o efeito do metilfenidato em ratos jovens submetidos ao modelo experimental de epilepsia com pilocarpina.

3.2 Específicos

Depois da administração do MFD por 21 dias após o *status epilepticus* em ratos jovens (21 dias de vida), objetivou-se:

- Investigar os efeitos comportamentais do metilfenidato através dos testes de ansiedade, depressão e memória;
- Determinar os efeitos desse fármaco, nessas condições, sobre o estresse oxidativo e sobre a atividade da acetilcolinesterase em córtex pré-frontal (CPF), hipocampo (HC) e corpo estriado (CE) de ratos jovens;
- Avaliar a concentração de dopamina e do metabólito (DOPAC) em corpo estriado dos animais jovens;
- Verificar o efeito do metilfenidato sobre a resposta inflamatória através da atividade da enzima mieloperoxidase e da determinação da concentração de TNF- α nas três áreas cerebrais estudadas;
- Analisar a expressão quali- quantitativa dos mediadores inflamatórios (COX-2 e iNOS) no corpo estriado (CE);
- Avaliar a viabilidade celular *in vitro* de astrócitos corticais após incubação com metilfenidato e pilocarpina.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar, jovens, com 21 dias, de ambos os sexos, pesando entre 35-45g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (UFC), e mantidos no Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia dos *Campus* Sobral, acondicionados em caixas de propileno $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$, com ciclos claro/escuro de 12 horas, recebendo ração padrão (Nuvilab) e água *ad libitum*.

A utilização de ambos os sexos é assegurado, pois nos ratos com 21 dias de vida não há taxa hormonal para influenciar os resultados comportamentais. Os ratos desenvolvem-se rapidamente durante a infância e tornam-se sexualmente maduros com cerca de seis semanas de idade (ANDRE OLLO et al., 2012).

4.2 Drogas

O desenvolvimento da presente pesquisa utilizou o cloridrato de Metilfenidato (Laboratório- Novartis) nas doses de 2,5; 5 e 10 mg/Kg. A compra da substância foi devidamente realizada para fins de pesquisa, onde a notificação de receita foi cedida gentilmente por uma médica Neurologista da cidade de Sobral.

As doses escolhidas foram baseadas em dados da literatura, sugerindo que doses inferiores a 5mg/Kg refletem o uso clínico e a dose de 10 mg/Kg mimetiza o uso recreacional (SCHERER, 2010).

Para o preparo da droga teste, a substância foi dissolvida em solução salina para a obtenção de doses finais anteriormente citadas. Os controles receberam veículo (solução salina, 10 mL/Kg). A droga teste e o veículo foram administrados por via intraperitoneal (i.p) conforme cada protocolo experimental descrito adiante.

Foram utilizados, ainda, a Metil-escopolamina 1mg/Kg (Sigma- Aldrich); Pilocarpina 320mg/Kg (Sigma- Aldrich); Diazepam 4mg/Kg (Laboratório- EMS). Essas drogas também foram dissolvidas em solução salina para a obtenção das doses finais e administradas por via intraperitoneal. O volume total de solução administrada por via intraperitoneal, foi de 10 mL/Kg.

4.3 Descrição geral do estudo: da administração das drogas ao estudo comportamental e neuroquímico

Os animais com 21 dias de vida, foram divididos, e três grupos desses animais foram tratados apenas com MFD (2,5; 5 e 10 mg/Kg) e um grupo controle recebeu solução salina (10mL/Kg), durante 21 dias consecutivos. Quatro grupos de animais foram previamente submetidos à indução do *status epilepticus* (administração de pilocarpina de 320 mg/Kg) e, os sobreviventes foram tratados por 21 dias subseqüentes com MFD (2,5; 5 e 10 mg/Kg) e com solução salina (grupo controle epiléptico). Desta forma, temos constituído os grupos de estudo com a única diferença de alguns grupos serem “epiléptico” e os outros grupos serem “não epiléptico” (Quadro 1).

Após 30 minutos da última administração (21 de tratamento) da droga teste ou controle, os animais foram submetidos aos testes do Campo Aberto, Labirinto em Cruz Elevado (*Plus Maze*), Nado Forçado, Y- maze e Reconhecimento de Objetos.

Para os testes do campo aberto e Labirinto em Cruz Elevado foram utilizados os mesmos animais. Para os testes do nado forçado, Y-maze e Reconhecimento de objetos, os animais utilizados foram diferentes para cada teste, onde os animais só foram submetidos a um teste comportamental.

Logo após ao estudo comportamental, os ratos jovens foram sacrificados e, em seguida, os encéfalos foram retirados e colocados sobre papel alumínio numa placa de Petri com gelo. O córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado foram dissecados, rapidamente congelados e armazenados a -80°C até o ensaio. As áreas cerebrais foram usadas para determinações neuroquímicas.

A descrição de cada teste realizado foi organizada por protocolos, onde Protocolo 1, refere-se aos estudos comportamentais; Protocolo 2, ao estudo do estresse oxidativo, dosagem de citocinas e imunohistoquímica e o Protocolo 3, se refere aos ensaios *in vitro* de Viabilidade Celular.

Quadro 1- Determinação dos grupos experimentais

GRUPO	TRATAMENTO
Não epiléptico	Salina
Não epiléptico	Metilfenidato 2,5 mg/Kg
Não epiléptico	Metilfenidato 5 mg/Kg
Não epiléptico	Metilfenidato 10 mg/Kg
Epiléptico	Salina
Epiléptico	Metilfenidato 2,5 mg/Kg
Epiléptico	Metilfenidato 5 mg/Kg
Epiléptico	Metilfenidato 10 mg/Kg

4.4 Indução do *Status Epilepticus* (SE) por meio da Pilocarpina

Para a indução do *Status Epilepticus* (SE) no presente estudo foi utilizado o protocolo desenvolvido por Cavalheiro e colaboradores (1991).

Os ratos jovens Wistar, com 21 dias de vida, foram mantidos em um ambiente isolado por 24 horas, separados por grupos, para se ambientarem, e então foram submetidos à indução da epilepsia.

Visando o SE, foi injetado nos grupos experimentais, via intraperitoneal, cloridrato de pilocarpina (PILO, 320 mg/Kg) (TURSKI et al., 1983). Previamente à administração de pilocarpina (30 minutos antes), os animais receberam uma injeção intraperitoneal de metil-escopolamina (MS, 1mg/Kg). Este fármaco é um antagonista colinérgico que não ultrapassa a barreira hematoencefálica e, por isso atenua a ativação colinérgica periférica produzida pela alta dose da pilocarpina (FARIAS, 2012).

Em seguida da injeção da pilocarpina, os animais foram colocados em uma caixa de acrílico, individualmente, e então teve início a chamada fase aguda do protocolo, onde os animais tiveram seu comportamento analisado por pelo menos três observadores treinados, durante 60 minutos.

Durante este período de fase aguda, a intensidade das alterações comportamentais decorrentes do distúrbio epiléptico, logo após a injeção de pilocarpina, foi classificada de acordo com a escala de Racine (Quadro 2). Foi

classificado como critério para SE, a persistência de crises contínuas por no mínimo 30 minutos (CAVALHEIRO et al., 1991).

Quadro 2- Escala de Racine (RACINE, 1972) para intensidade de respostas motoras dos animais à injeção de pilocarpina.

Estágio	Comportamento
0	Imobilidade
1	Automatismos Faciais
2	Mioclonias de Cabeça e Pescoço
3	Clonias de Patas Anteriores
4	Cloniais de Patas Posteriores
5	Elevação e Queda

Uma hora após a administração da pilocarpina e a observação das crises durante a fase aguda, foi injetado intraperitonealmente o diazepam (DZ), na dose de 4mg/Kg. Este fármaco atua como antiepilético, com rápido início de ação, que foi utilizado com o objetivo de parar as crises convulsivas e evitar possíveis complicações decorrentes de um SE prolongado (como por exemplo, a broncoaspiração e a desidratação). Dessa forma, todos os animais tiveram um período para desenvolver SE limitado pelo mesmo tempo (60 minutos), o que nos levou a uma padronização do grupo experimental.

Depois de abortadas as crises, os animais foram transferidos para as gaiolas, que foram aquecidas durante o primeiro dia, onde as 24 horas subsequente a administração da pilocarpina foi crucial para a observação dos animais, principalmente, quanto à morte. Os animais passaram a receber auxílio em sua alimentação e hidratação. Foi realizada reposição hidroeletrólítica e nutritiva através de água via oral e injeção intraperitoneal de solução salina, bem como alimentação padrão acrescida de banana amassada como repositores de potássio. Tais cuidados foram realizados durante um período de três dias.

À fase aguda do modelo prosseguiu, após a injeção de diazepam, um período de ausência de crises comportamentais, conhecida na literatura como período silencioso (CAVALHEIRO et al., 1991), que pode variar entre 10 e 15 dias. Passado esse período os animais iniciaram as crises parciais límbicas ou generalizadas, de

caráter espontâneo e recorrente (em uma média de três a cinco crises por semana). A partir desse momento, o animal foi considerado como epilético crônico.

Um grupo de animais, após 24 horas da indução do SE, iniciou o tratamento apenas solução salina 0,9%, por 21 dias, o que caracteriza esse grupo como controle epilético (Figura 8).

Figura 8- Delineamento Experimental do Modelo da Pilocarpina no grupo epilético



MS: Metilescopolamina; PILO: Pilocarpina; DZ: Diazepam; CER: crises espontâneas repetitivas

Decorridos 24 horas após a administração da pilocarpina, os animais iniciaram o tratamento crônico com metilfenidato que foi administrado intraperitonealmente, nas doses de 2,5; 5 e 10 mg/Kg, uma vez ao dia, durante 21 dias (Figura 9).

Figura 9- Delineamento Experimental do Modelo da Pilocarpina no grupo epilético com tratamento crônico de metilfenidato.



MS: Metilescopolamina; PILO: Pilocarpina; DZ: Diazepam; MFD: Metilfenidato; CER: crises espontâneas repetitivas.

Foram realizados todos os passos citados anteriormente no grupo controle, com a diferença que a injeção de pilocarpina foi substituída por solução salina (soro

fisiológico 0,9%) de mesmo volume injetado intraperitonealmente. Após 24 horas, os animais iniciaram o tratamento com solução salina e o MFD nas dose de 2,5; 5 e 10 mg/Kg (Figura 10).

Com exceção do grupo controle, os animais que não convulsionaram, não entraram em *status epilepticus* (baseado no grau 5 da escala de Racine) ou que morreram foram excluídos do estudo. Os parâmetros observados foram: Latência para primeira convulsão, latência para o *status epilepticus* e percentagem de sobrevivência dos animais.

Figura 10- Delineamento Experimental do grupo controle



MS: Metilescopolamina; DZ: Diazepam; MFD: Metilfenidato

4.5 PROTOCOLO 1: Testes Comportamentais

4.5.1 Teste do Campo Aberto

No 21 dia de tratamento, 30 minutos após a última administração do MFD ou da solução salina (grupo controle), os animais foram submetidos ao teste do campo aberto.

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

11). A arena foi higienizado com álcool 10% após cada animal ser retirado, para evitar que o cheiro de urina e fezes interfira no teste.

Figura 11- Teste do Campo aberto



Fonte: Arquivo pessoal

4.5.2 Teste do Labirinto em Cruz Elevado “*Plus Maze*”

No 21^o dia de tratamento, 30 minutos após a última administração do MFD ou da solução salina (grupo controle), os animais foram submetidos ao teste do *Plus Maze*.

Este teste (LISTER, 1987) visa avaliar a atividade ansiolítica do animal. Consiste de um aparato com dois braços abertos opostos (30 x 5 cm) e dois fechados (30 x 5 x 25cm), também opostos, em forma de cruz, conectados por uma plataforma central (5 x 5cm). A plataforma e as paredes laterais dos braços fechados são confeccionadas em acrílico transparente e o chão em acrílico preto. O aparelho está elevado a uma altura de 45 cm do nível do chão e localizado em uma sala com luz vermelha (15 W) (Figura 12). Após 30 minutos do tratamento i.p (intraperitoneal), os animais foram colocados no centro do aparelho com a cabeça voltada para um dos braços fechados e o seu comportamento foi observado por 5 minutos. O aparelho foi limpo após o teste de cada animal, com solução de etanol a 10%.

As medidas comportamentais observadas foram: número de entradas e o tempo despendido nos braços abertos e fechados, respectivamente. A frequência total de entradas é obtida pela soma simples das frequências de entradas nos braços abertos e fechados. Para análise estatística dos dados e confecção dos gráficos, a percentagem de entradas nos braços abertos foi calculada dividindo-se a frequência de entradas nos braços abertos pela frequência total de entradas, e esse índice multiplicado por 100. De maneira semelhante foi calculada a percentagem de

tempo em que os animais permaneceram nos braços abertos. Dessa forma, os parâmetros utilizados para a análise estatística foram: número de entradas no braço aberto (NEBA), tempo de permanência no braço aberto (TPBA), percentagem de entrada nos braços abertos (PEBA) e percentagem de tempo nos braços abertos (PTBA).

Neste modelo, os roedores evitam os braços abertos do labirinto, restringindo a maioria de suas atividades aos braços fechados. Um aumento seletivo nos parâmetros correspondentes aos braços abertos (entradas e tempo) revela um efeito ansiolítico, e o inverso é verdade para compostos ansiogênicos (PELLOW et al., 1985; PELLOW; FILE, 1986).

Figura 12- Teste do labirinto em cruz elevado



Fonte: Arquivo pessoal

4.5.3 Teste do Nado Forçado

Este experimento avalia a atividade antidepressiva ou depressora da substância- teste. No protocolo de PORSOLT et al., (1987) foram utilizados tanques de 22 cm de diâmetro e 40 cm de altura contendo água fresca a $23 \pm 1^{\circ}$ C até a metade do tanque (Figura 13). Após 30 minutos do tratamento i.p, os animais foram colocados, um por vez, no tanque onde o tempo de imobilidade, em segundos, foi registrado durante cinco minutos. O animal foi considerado imóvel quando permaneceu flutuando na água, fazendo apenas movimentos suaves necessários para manter a cabeça acima da água. Os antidepressivos devem reduzir o tempo de imobilidade apresentado pelos animais.

Figura 13- Teste do nado forçado



4.5.4 Teste do Labirinto em Y (Y-maze)

A memória operacional ou de trabalho (memória de curta duração) foi avaliada através do teste do labirinto em Y, que permite avaliar o comportamento cognitivo exploratório. Nesse teste o animal é colocado em um labirinto em forma de Y com três braços iguais (SARTER et al., 1988). Os animais apresentam forte tendência de alternar a entrada nos diferentes ambientes. O labirinto em Y é composto por 3 braços de madeira com 16 cm de altura, 5 cm de largura e 40 cm de comprimento (Figura 14). Para a avaliação da memória os braços foram numerados. O animal foi colocado no aparelho e durante 8 minutos o número de cada braço que o animal entrou foi anotado. Foi considerado acerto cada vez que o animal entrou em 3 diferentes braços sem repetição. O resultado foi expresso em porcentagem e obtido através da seguinte fórmula matemática:

$$\text{Alternações Espontâneas (\%)} = \frac{\text{Número de acertos}}{\text{Número total de entradas} - 2} \times 100$$

O sucesso do teste é indicado pela alta taxa de alternância nos grupos controle, indicando que os animais podem se lembrar em qual braço entraram por último (STONE et al., 1991). Entre cada sessão, o labirinto foi higienizado com uma solução de álcool a 20% e secado com toalhas de papel.

Figura 14- Teste do labirinto em Y



Fonte: Arquivo pessoal

4.5.5 Teste do Reconhecimento de Objetos

A memória de reconhecimentos de objetos (memória de longa duração) é a capacidade de discriminar entre os objetos que tenham sido previamente encontrados e objetos que não tenham. Roedores possuem uma tendência natural para gastar mais tempo explorando novos objetos que aqueles conhecidos. Durante o treino, o animal foi colocado numa arena quadrada (30 x 30 x 15 cm) de acrílico preto contendo dois objetos iguais (OI) e, durante 10 min, ele pode explorar o ambiente e os objetos. Após 1h, um dos objetos iguais foi substituído pelo objeto novo (ON) e o animal foi colocado novamente na arena (teste) (Figura 15). Durante 5 min o tempo que o animal gastou explorando cada um dos objetos foi anotado. O resultado foi expresso como índice de reconhecimento e foi obtido através da seguinte fórmula matemática: $(\text{tempo ON} - \text{tempo OI}) / (\text{tempo ON} + \text{tempo OI})$. Entre cada sessão, a arena e os objetos foram higienizados com uma solução de álcool a 20% e secados com toalhas de papel (ENNACEUR; DELACOUR, 1988).

Figura 15- Teste do reconhecimento de objetos



Fonte: Arquivo pessoal

4.6 PROTOCOLO 2: Análise do estresse oxidativo, Dosagem de TNF- α e Análise da expressão de COX-2 e iNOS.

4.6.1 Determinação do Índice de Peroxidação lipídica (dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico - TBARS)

O grau de lipoperoxidação nas áreas cerebrais (córtex pré-frontal, hipocampo e núcleos da base) foi medido através da determinação dos níveis de TBARS. Esse ensaio avalia o produto final malondialdeído (MDA) formado devido a peroxidação lipídica da membrana.

Conforme o método de HUONG et al. (1998), foi preparado o homogenato das áreas cerebrais a 10% em tampão fosfato 150mM. Foram adicionados 63 μ L do homogenato a 100 μ L de ácido perclórico 35% e centrifugado a 5000 rpm por 10 min e a 4°C. À 150 μ L do sobrenadante resultante foi adicionado 50 μ L de ácido tiobarbitúrico 1,2%. Essa mistura foi levada para banho-maria (\pm 95°C/ 30 minutos). Após, resfriou-se e transferiu-se 150 μ L para placa de Elisa, a fim de realizar a leitura dos níveis de MDA a 535 nm. Previamente, uma curva padrão de MDA foi feita utilizando-se as concentrações 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,12, 1,56, 0,78, 0,39, 0,195 e 0,97 μ L/ mL.

Os resultados da análise da produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foram expressos em μ g de MDA/mg de tecido.

4.6.2 Determinação do Conteúdo de Nitrito

A mensuração do conteúdo de nitrito foi feita de acordo com o método descrito por Green et al. (1981). Este método é utilizado para determinação da formação de radicais derivados de nitrogênio, sendo um modo indireto de se determinar a síntese de óxido nítrico (NO). Em uma placa de Elisa foi adicionado 100 μ L do reagente de Griess (Partes iguais de: Sulfanilamida 0,1% em ácido fosfórico 5%, NEED 1%, ácido fosfórico 5% e água destilada) juntamente com 100 μ L do homogenato de tecido a 10% em tampão fosfato. A absorbância foi medida em leitor de microplacas, a 560 nm. Previamente, uma curva padrão de nitrito foi gerada utilizando as concentrações de 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,12 e 1,56 nmol/mL.

4.6.3 Determinação da Concentração da Glutathiona Reduzida (GSH)

A determinação da concentração da GSH baseia-se na reação do reagente de Ellman, o 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB) com o tiol livre originando um dissulfeto misto mais ácido 2-nitro-5-tiobenzóico (MORI et al., 1992). A medida do produto de reação formado foi feita por leitura da absorbância a 412 nm. Foram preparados homogenatos a 10% das áreas cerebrais a serem estudadas, em EDTA 0,02 M, em seguida foram retirados 400 μ L desse homogenato e adicionados 320 μ L de água destilada e mais 80 μ L de ácido tricloroacético a 50%. O material foi agitado e centrifugado a 3000 rpm por 15 min. Em seguida foi recolhido 400 μ L do sobrenadante e acrescido 800 μ L de tampão Tris-HCl 0,4M, pH 8,9 e mais 20 μ L de DTNB 0,01M e após 1 minuto da reação foi feita a leitura da coloração em 412 nm. A concentração da glutathiona reduzida foi expressa em ng de GSH / g de tecido.

- Curva padrão de Glutathiona Reduzida (GSH)

A partir da solução padrão de GSH (1mg/mL), foi preparado 4mL (em triplicata) de soluções a 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 μ g/mL. O branco foi feito com água destilada (4 mL) e a cada tudo das soluções de GSH foi acrescentado de 4 mL de tampão Tris HCl 0,4M (pH 8,9). Foi adicionado ainda a cada tubo 0,1 mL de DTNB (0,01M) e feita a leitura da absorbância a 412 nm após 1 min da adição do DTNB, e foi determinada a equação da curva padrão de GSH.

4.6.4 Determinação da Atividade da Catalase

A atividade da catalase tem como princípio a medida da velocidade de produção de O_2 e H_2O à proporção que a H_2O_2 , utilizado como substrato é hidrolisado, de acordo com MAEHLY e CHANCE (1954).

O meio de reação fo preparado contendo (H_2O_2 , Tampão Tris HCl 1M EDTA 5mM pH = 8,0, H_2O Mimmi-Q). Adicionar 15 μ L da amostra (sobrenadante do homogenato tecidual a 10% com tampão fosfato) + 985 μ L do meio de reação preparada anteriormente. A atividade da enzima é medida em 230nm, através de um espectrofotômetro Beckman DU, acoplado a um sistema de modernização da Gilford, USA, o que permitirá leituras automáticas em sistema digital e fornecerá maior sensibilidade. A atividade enzimática é medida em 230 nm, através de um espectrofotômetro Beckman DU, pela leitura da variação da absorbância por minuto, durante 6 minutos e os resultados expressos em μ M/ min/ mg de proteína. A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford (1976).

4.6.5 Determinação de proteínas

O método é baseado na interação do corante *Coomassie Blue G250* (BG250) e macromoléculas de proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. No pH de reação a interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante BG250 provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica que absorve fortemente em 595nm.

- Procedimento Experimental

Foram preparados homogenatos da áreas cerebral (córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado) a 10% em tampão fosfato de sódio. Após a centrifugação (10000 rpm/10min/4°C), os sobrenadantes foram coletados e adicionados aos poços contendo 39 μ L de tampão fosfato de sódio (utilizado no preparo as amostra). Em seguida, foram adicionados 200 μ L da solução de Bradford (diluída 5x). A absorbância foi medida, após 5 minutos, no comprimento de onda de 595 nm (BRADFORD, 1976). A proteína é expressa em mg de proteína/ g de tecido.

- Soluções de Bradford (concentrada)

Sob agitação constante, misturou-se Coomassie (90,1g) com etanol (50 mL), em seguida adicionou-se ácido orto-fosfórico (100mL). Adicionou-se água destilada até completar 200 mL. Após homogeneizado foi acondicionado em frasco âmbar.

-Solução de Bradford (diluída 5x)

Em 1 mL da solução de Bradford, acrescentou-se 4 mL de água destilada.

- Curva-padrão

Foram pesados 8mg de albumina e diluído em 40 mL de água destilada. Em seguida, foi adicionado em poços volumes crescentes de albumina associados com volumes decrescentes de água destilada.

4.6.6 Determinação da Atividade da Acetilcolinesterase (AChE)

-Método

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

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

4.6.7 Determinação das concentrações de Dopamina (DA) e seu metabólito (Ácido Dihidroxifenilacético- DOPAC) com HPLC em Corpo Estriado

Os animais foram decapitados 30 minutos após a administração do metilfenidato (2,5; 5; 10 mg/Kg) e solução salina (controle) e tiveram seus cérebros dissecados sobre gelo. Os tecidos cerebrais foram homogeneizados em ácido perclórico (HClO₄) e centrifugados por 15 minutos em centrífuga refrigerada (4°C) a 15.000 rpm. Uma alíquota de 20 µL do sobrenadante foi, então, injetada no equipamento de HPLC, para a análise química.

Para a análise das catecolaminas, uma coluna BDS HYPERSIL C18 com comprimento de 250 mm, calibre 4,6 mm e de partícula de 5 µm, da Thermo Scientific, foi utilizada. A fase móvel utilizada foi composta por tampão ácido cítrico 0,163 M, pH 3,0, contendo ácido octanosulfônico sódico(SOS) 0,69 M, como reagente formador do par iônico, acetonitrila 4 % v/v e tetrahidrofurano 1,7 % v/v. DA e DOPAC foram eletronicamente detectados usando um detector amperométrico (Modelo L-ECD-6A da Shimadzu, Japão) pela oxidação em um eletrodo de carbono vítreo fixado em 0,85V relativo a um eletrodo de referência de Ag-AgCl (HALLMAN; JOSSON, 1984).

As concentrações de monoaminas nos tecidos foram calculadas no programa *Microsoft Excell* em um computador e os resultados expressos em ng/g de tecido.

4.6.8 Ensaio para Mieloperoxidase (MPO)

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima presente nos grânulos de neutrófilos. Essa enzima é utilizada como indicador de processo inflamatório, mais especificamente, como marcador de migração de neutrófilos dos tecidos. Neste ensaio, a H₂O₂ é clivada por meio da MPO presente nas amostras de tecido. O radical oxigênio (O°) resultante se combina com diidrocloreto de O-dianisidina que é convertido a um composto colorido. O aparecimento deste composto, ao longo do tempo, é medido por espectrofotômetro para determinar o conteúdo de MPO do ensaio.

A atividade de MPO foi determinada de acordo com Bradley et al., (1982). Após os testes comportamentais, 21 dias após o tratamento com MFD ou salina, os animais foram eutanasiados, seus cérebros rapidamente removidos e amostras do

córtex pré-frontal, corpo estriado e hipocampo foram dissecadas e pesadas. As áreas foram homogeneizadas (50mg/mL) em uma solução de brometo de hexadeciltrimetilamônio 0,5 % (HTAB) em tampão fosfato 50 mM, pH 6,0. Em seguida, os homogenatos foram centrifugadas (14000 rpm, 4°C) por 2 minutos. Adicionou-se 30µL do sobrenadante da amostra e 200µL da solução contendo 0,167 mg/mL de hidrocloreto de θ -dianisidina e 0,0005 % de peróxido de hidrogênio. A absorbância foi medida nos tempos 0,1 e 3 minutos no comprimento de onda 460nm. Os resultados foram dados como unidades de MPO por mg de tecido, sendo uma unidade de MPO equivalente à quantidade que degrada 1µmol/min de peróxido de hidrogênio.

4.6.9 Dosagem de TNF- α no córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado

Amostras do córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado foram obtidas e homogeneizadas em solução RIPA (Santa Cruz, USA). Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas (10.000 rpm/ 10 min / 4 °C), e o sobrenadante foi utilizado para avaliar a expressão do mediador TNF- α . Brevemente, placas de 96 poços foram incubadas “overnight” em temperatura de 4 °C com anticorpos contra TNF α de rato (10pg/mL). No dia seguinte, as placas foram lavadas e incubadas por uma hora com uma solução a 1 % de albumina bovina sérica (BSA) no intuito de evitar ligações inespecíficas. Após esse bloqueio e lavagem das placas, as curvas-padrão em várias diluições ou as amostras foram adicionadas e incubadas durante duas horas. As placas então foram lavadas três vezes com tampão, e os anticorpos policlonais biotinilados específico para cada mediador testado, diluídos foram adicionados (100 µL/poço). Após incubação em temperatura ambiente por 2 horas, as placas foram lavadas e 100µl de estreptavidina-HRP diluídas 1:200 foram adicionados.

Em seguida (quinze minutos após) as placas foram lavadas e 100µl de reagente colorido (o-fenilenodiamina-2HCl; OPD, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO-USA) foram adicionados. As placas foram mantidas no escuro, em temperatura ambiente, por 15-20 min. A reação enzimática foi interrompida com H₂SO₄1M, e as absorbâncias foram determinadas em 450nm. Os resultados foram expressos como ng / mL de TNF- α .

4.6.10 Análise da expressão de COX-2 e iNOS

A expressão dessas enzimas foi realizada através de imunohistoquímica. Os animais foram sacrificados por decapitação 21 dias após a indução da epilepsia e feitos cortes do estriado (para COX-2 e iNOS) para confecções das lâminas.

Todo o material selecionado foi fixado em formol a 10% durante 24 h, seguido por uma solução de álcool a 70% e, posteriormente, emblocado em parafina, sendo feitos cortes histológicos de 5 µm de espessura colocados sobre lâminas de vidro própria para imunohistoquímica. Para iniciar o processo, as lâminas contendo os cortes histológicos foram deixados em estufa histológica a 58°C por 10 minutos, em seguida o protocolo seguiu as etapas abaixo:

- a) desparafinação em xilol e reidratados em uma série de álcool de concentrações diferentes (absoluto, 90%, 70% e 50%) até a água e lavados duas vezes em águas destiladas por cinco minutos cada;
- b) recuperação antigênica com Tampão citrato pH 6.0 no microondas em potência máxima por 10 minutos, com intervalo na metade no período;
- c) bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio 0,3%;
- d) incubação com anticorpos respectivos, diluídos em BSA overnight a 4 °C. (Anticorpo Anti-COX-2 na diluição 1:200 e o Anti-iNOS na diluição 1:200);
- e) no dia seguinte após a retirada do anticorpo primário, os cortes foram incubados com o anticorpo secundário (kit DAKO) por 2 horas;
- f) em seguida foi feita a incubação com o Complexo Avidina-Biotina do kit DAKO por 30 minutos;
- g) para revelação foi utilizada a solução cromógena de diaminobenzidina do mesmo kit, diluída em TRIS-HCL adicionada de peróxido de hidrogênio 20 volumes em câmara escura;
- h) finalizando o processo, fez-se a desidratação em álcool e a diafanização em xilol para montagem da lamínula com Entelan e análise utilizando o Microscópio Óptico BX-41 com câmera acoplada.

Os dados imunohistoquímicos (fotomicrografias) foram quantificados através do software Image J (National Institute of Health, USA). Posteriormente, esses dados foram analisados através do Graph Pad Prism 5.0.

4.7 PROTOCOLO 3: Ensaios *in vitro* de Viabilidade Celular

4.7.1 Linhagem e cultivo celular

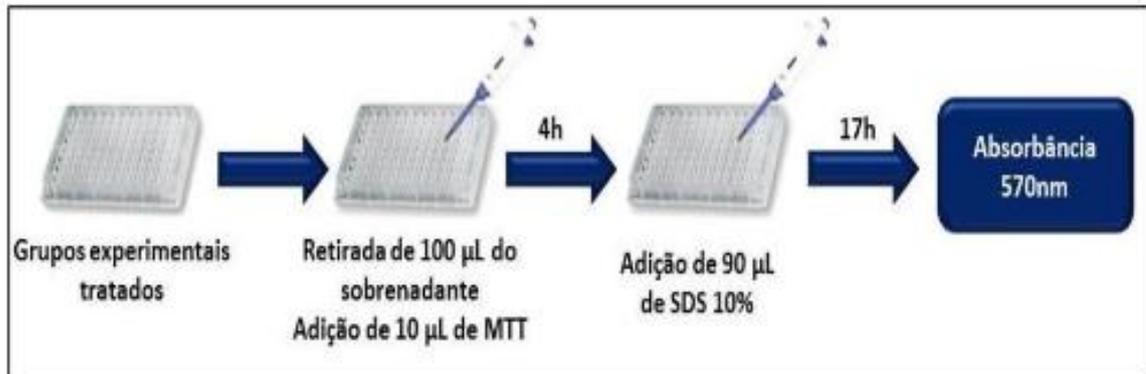
As células astrocitárias corticais imortalizadas foram gentilmente cedidas por uma professora do Laboratório de Sinalização de Cálcio e Morte Celular- Universidade Federal de São Paulo. A linhagem de células astrocitárias transformadas foi mantida e tratada no Laboratório de Cultivo Celular (LCC) do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal do Ceará.

As células foram cultivadas em Meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suplementado com soro bovino fetal (10%), antibióticos (100.000 U/mL de penicilina, 10 mg/mL de estreptomicina). Foram incubadas em estufa a 37°C, atmosfera de 95% de umidade e 5% de CO₂. A cada três dias a metade do meio de cultura foi trocada por um novo meio.

4.7.2 Ensaio com MTT

A viabilidade celular foi determinada após tratamento com o metilfenidato e com a pilocarpina. Este método baseia-se na atividade metabólica de células viáveis, as quais são capazes de converter o MTT em sal de formazan, um produto colorido e insolúvel em água. As células foram plaqueadas em placas de 96 poços a uma densidade celular de 1×10^5 céls/mL e tratadas com o MFD (200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,125 µg/mL), por 12 e 24 horas. Posteriormente, foi realizado tratamento com concentrações de Pilocarpina (10, 20, 40 e 80 mM/ mL) ou com uma combinação entre metilfenidato e Pilocarpina por 24 hs (CARVALHO, 2016). Após o tratamento das células, o substrato da cultura foi retirado e então adicionado 10µL de 3-(4,5-dimetilazil-2-il)-2,5 difenil tetrazólico (MTT) dissolvido em PBS (500µg/mL). Após incubação por 4 horas à 37°C em estufa com 5% de CO₂, o sobrenadante foi removido e adicionado SDS (10%) em HCl 0,01N para solubilizar os cristais de formazan. As placas foram incubadas por 17h e, em seguida, uma leitura espectrofotométrica foi realizada em um comprimento de onda de 570 nm (Figura 16) (MOSMANN, 1983).

Figura 16- Esquema das etapas de tratamento dos astrócitos em Placa de Elisa para obtenção da viabilidade celular.



Fonte: DE MENEZES, 2013.

4.8 Análise estatística

A análise dos dados foi realizada através do *software GraphPad Prism*, versão 5.0 para *Windows*, expressos como média \pm erro padrão da média (EPM).

Para os ensaios comportamentais e neuroquímicos foi utilizado o One-way ANOVA seguido de Student Newman Keuls. Para a análise do teste de MTT, utilizou-se ANOVA seguido do teste de Bonferroni. Os dados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

4.9 Aspectos éticos em pesquisa animal

Em relação às questões éticas, o projeto foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Ceará, Campus Sobral, sendo aprovado e registrado sob o número de protocolo 10/15 (Anexo A).

5 RESULTADOS

5.1 Alterações Comportamentais após a indução do *status epilepticus*, por Pilocarpina (320 mg/Kg; P320), em ratos jovens com 21 dias de vida

Após a administração de P320, os animais mostraram sinais colinérgicos (miose, piloereção, cromodacriorréia, diarreia e tremores), e movimentos estereotipados mesmo com a administração da escopolamina. Dos 113 animais injetados com P320, 32 animais (28,32%) evoluíram ao óbito na primeira uma hora após a administração, ou nos dias subsequentes, apresentando momento crítico até o 3^o dia. Mesmo tendo recebido uma dosagem consideravelmente alta de pilocarpina (320 mg/kg), 8 animais (7,08%) não atingiram a pontuação de 5 na escala de Racine (elevação e queda), sendo, portanto, excluídos dos grupos experimentais e 73 animais (64,6%) que atingiram o *status epilepticus* (SE) (Tabela 1).

Os animais receberam o tratamento por 21 dias, sendo divididos em grupos, onde 18 animais receberam salina (P320+SAL), 18 animais receberam MFD 2,5 (P320+MFD2,5), 18 animais receberam MFD 5 (P320+MFD5) e, 19 animais receberam MFD 10 (P320+MFD10).

Tabela 1- Número de animais que foram submetidos ao *status epilepticus*.

Número de animais induzidos ao <i>status epilepticus</i>	Número de mortes	Número de animais excluídos (não atingiu grau 5 na Escala de Racine)	Números de sobreviventes epilépticos
113	32 (28,32%)	8 (7,08%)	73 (64,6%)

5.2 PROTOCOLO 1: Testes Comportamentais

5.2.1 Teste do Campo Aberto

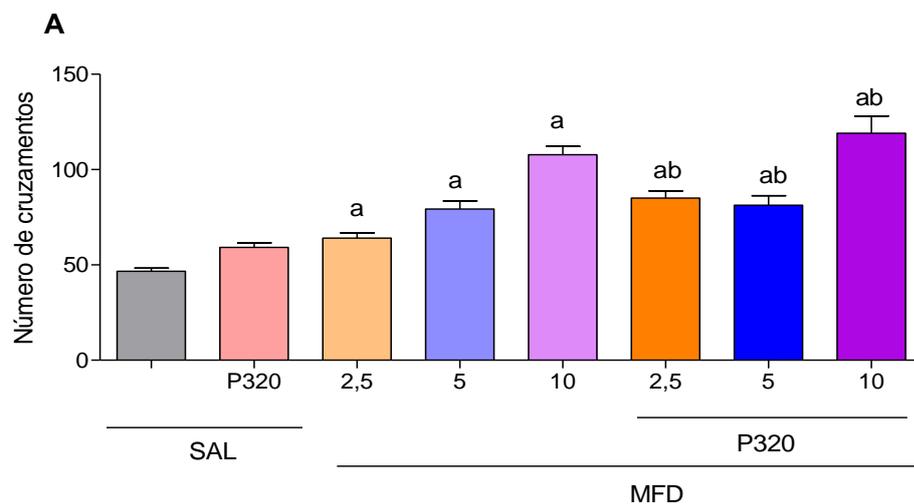
Os parâmetros avaliados nesse teste foram: atividade locomotora espontânea (ALE) e atividade exploratória vertical (*rearing*).

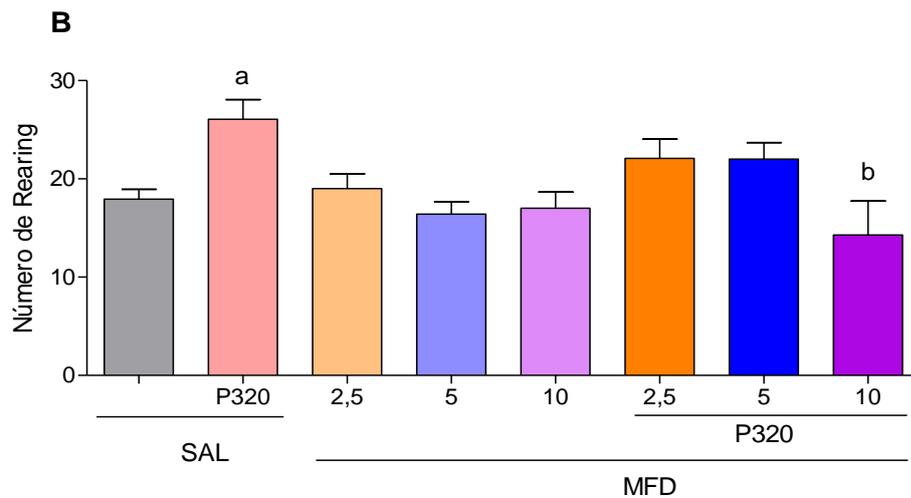
O tratamento com MFD em animais não epilépticos, nas doses de 2,5; 5 e 10 mg/Kg e os grupos epilépticos nas doses de 2,5; 5 e 10 mg/Kg aumentaram a atividade locomotora espontânea quando comparado ao tratamento do grupo controle não epiléptico. Os grupos epilépticos nas doses de 2,5; 5 e 10mg/Kg aumentaram também em relação ao grupo controle epiléptico (Figura 17A).

Houve um aumento significativo no número de *rearing* nos animais do grupo controle epiléptico em relação ao grupo controle não epiléptico. O tratamento com MFD na dose de 10mg/Kg dos animais epilépticos diminuíram significativamente o número de *rearing* em relação ao grupo controle epiléptico (Figura 17B).

Os valores da média \pm erro padrão da média (EPM) estão representados na Tabela 2 (Apêndice A).

Figura 17- Efeito do metilfenidato no teste do campo aberto em animais jovens. (A) ALE (B) *rearing*.





Os valores representam a média \pm EPM. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguida por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. a $p < 0,05$ vs SAL e b $p < 0,01$ vs P320.

5.2.2 Teste do Labirinto em Cruz Elevado

O número de entradas nos braços abertos (NEBA), o tempo de permanência nos braços abertos (TPBA), a percentagem de entrada nos braços abertos (PEBA) e a percentagem do tempo de permanência nos braços abertos (PTBA) foram os parâmetros avaliados nos animais.

O tratamento com MFD, em animais não epiléticos, nas doses de 5 e 10 mg/Kg e, os grupos de animais epiléticos nas doses de 2,5, 5 e 10 mg/Kg aumentaram o número de entrada nos braços abertos (NEBA) em relação ao grupo controle não epilético. Houve também um aumento significativo no NEBA dos grupos epiléticos nas doses de 2,5; 5 e 10 mg/Kg em relação ao controle epilético (Figura 18A).

Os animais tratados com MFD, grupos epiléticos e não epiléticos, não alteraram o tempo de permanência nos braços abertos (TPBA) em relação ao grupo controle não epilético, porém os animais epiléticos tratados com MFD nas doses de 2,5; 5 e 10 mg/Kg aumentaram significativamente o TPBA em relação ao grupo controle epilético (Figura 18B).

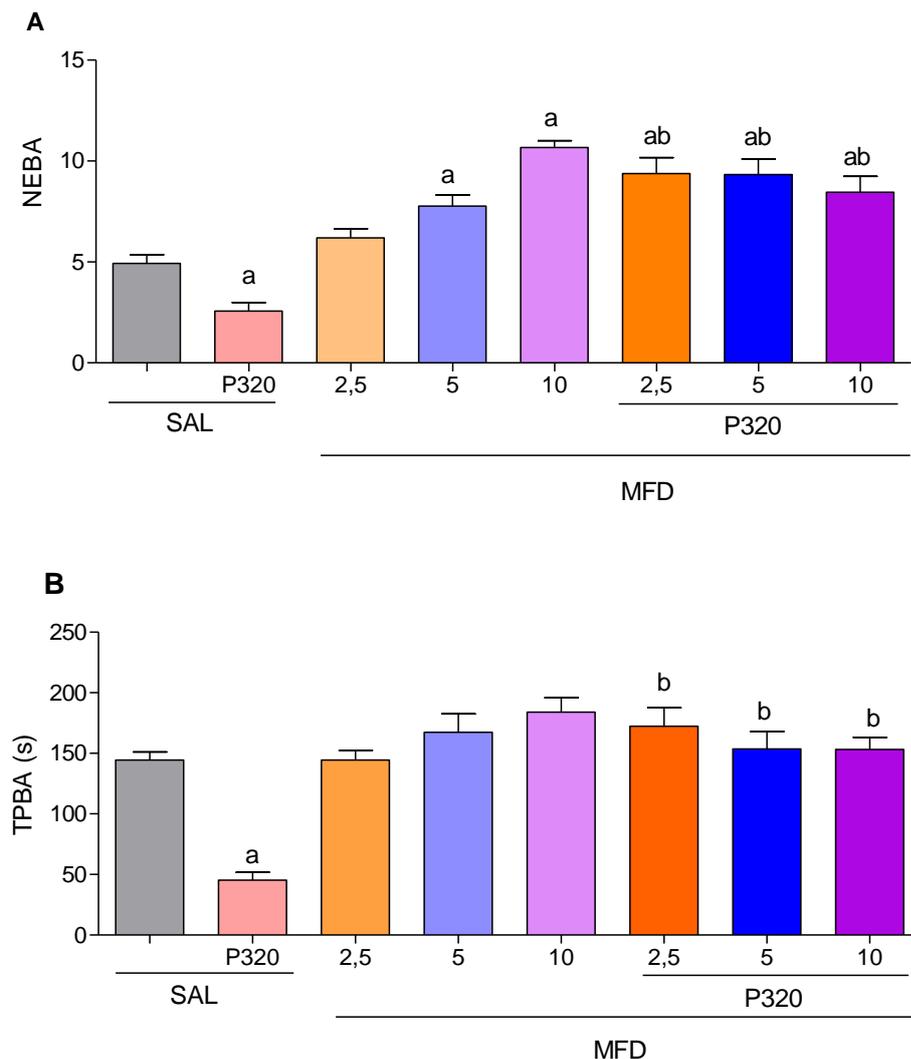
O grupo de MFD não epiléticos na dose de 10 mg/Kg e, os grupos de animais epiléticos nas doses de 5 e 10 mg/Kg aumentaram o percentual de entradas nos braços abertos (PEBA) em relação ao grupo controle não epilético.

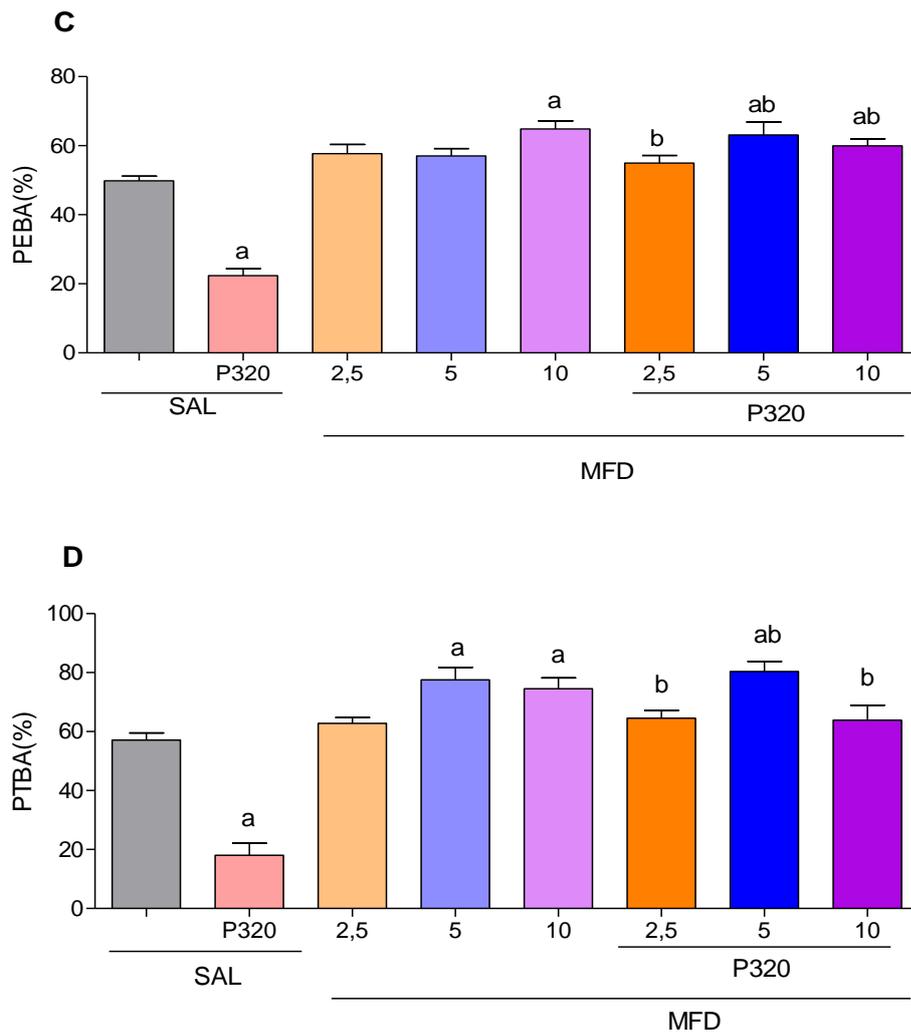
Os grupos de animais epiléticos nas doses de 2,5; 5 e 10mg/Kg aumentaram significativamente o PEBA em relação ao grupo controle epilético (Figura 18C).

Os grupos de MFD em animais não epiléticos nas doses de 5 e 10 mg/Kg e, os grupos de animais epiléticos na dose de 5 mg/Kg aumentaram o percentual de entradas nos braços abertos (PTBA) em relação ao grupo controle não epilético. Os animais epiléticos tratados com MFD nas doses de 2,5; 5 e 10 mg/Kg aumentaram significativamente em relação ao grupo controle epilético (Figura 18D).

Os valores da média \pm erro padrão da média (EPM) estão representados na Tabela 3 (Apêndice A).

Figura 18- Efeito do metilfenidato no teste do Labirinto em cruz elevado em animais jovens. (A) NEBA (B) TPBA (C) PEBA (D) PTBA.





Os valores representam a média \pm EPM. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguida por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. a $p < 0,05$ vs SAL e b $p < 0,001$ vs P320.

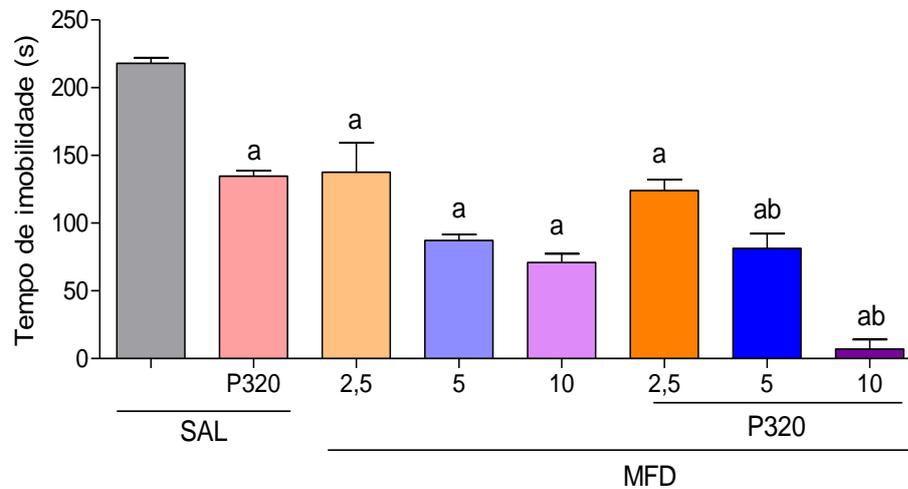
5.2.3 Teste do Nado Forçado

Houve uma diminuição significativa no tempo de imobilidade nos animais do grupo controle epiléptico em relação ao grupo controle não epiléptico.

O tratamento com MFD em animais não epilépticos, na dose de 2,5; 5 e 10 mg/Kg e os grupos epilépticos nas doses de 2,5; 5 e 10 mg/Kg diminuíram significativamente o tempo de imobilidade em relação ao grupo controle não epiléptico. Os animais epilépticos tratados com MFD nas doses de 5 e 10 mg/Kg diminuíram significativamente em relação ao grupo controle epiléptico (Figura 19).

Os valores da média \pm erro padrão da média (EPM) estão representados na Tabela 4 (Apêndice A).

Figura 19- Efeito do metilfenidato sobre o tempo de imobilidade no teste do nado forçado em animais jovens.



Os valores representam a média \pm EPM. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguida por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. a $p < 0,05$ vs SAL e b $p < 0,001$ vs P320.

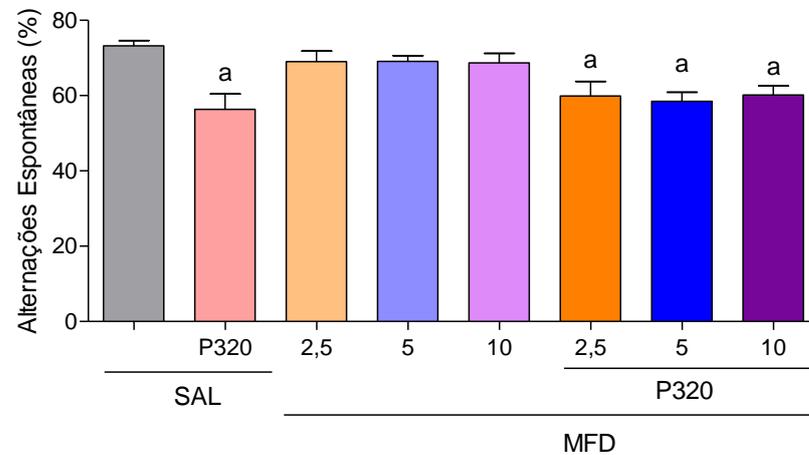
5.2.4 Teste do Labirinto em Y (Y-maze)

Os animais controle epilépticos apresentaram déficit na memória de trabalho (memória de curta duração) em relação ao controle não epiléptico.

Houve uma diminuição significativa no percentual de alterações espontâneas nos grupos tratados com MFD nas doses de 2,5, 5 e 10 mg/Kg dos animais epilépticos em relação ao grupo controle não epiléptico, porém em relação ao grupo controle epiléptico não houve alterações significativas no percentual de alterações espontâneas (Figura 20).

Os valores da média \pm erro padrão da média (EPM) estão representados na Tabela 5 (Apêndice A).

Figura 20- Avaliação da memória de trabalho (memória de curta duração) de ratos epiléticos tratados ou não com metilfenidato.



Os valores representam a média \pm EPM. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguida por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. $p < 0,05$ vs SAL.

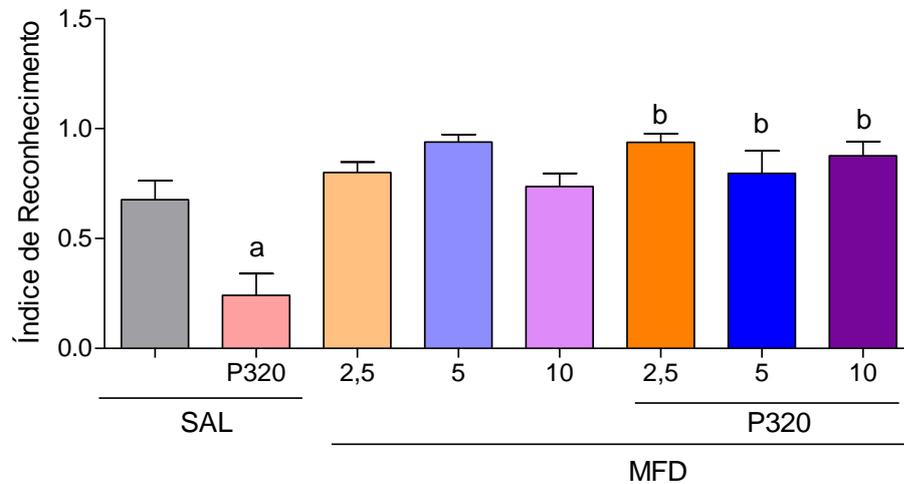
5.2.5 Teste do Reconhecimento de Objetos

Os animais do grupo do controle epilético apresentaram déficit na habilidade de reconhecer um novo objeto (memória de longa duração) em relação aos animais do grupo controle não epilético.

Não houve alteração significativa no índice de reconhecimento dos grupos tratados com MFD não epiléticos e epiléticos em relação ao grupo controle não epilético, porém os animais epiléticos tratados com MFD nas doses de 2,5; 5 e 10mg/Kg aumentaram o índice de reconhecimento de novos objetos quando comparados ao grupo controle epilético (Figura 21).

Os valores da média \pm erro padrão da média (EPM) estão representados na Tabela 6 (Apêndice A).

Figura 21- Avaliação do índice de reconhecimento de objetos em ratos jovens submetidos à epilepsia tratados ou não com metilfenidato.



Os valores representam a média ± EPM. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguida por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. a $p < 0,05$ vs SAL e b $p < 0,001$ vs P320.

5.3 PROTOCOLO 2: Avaliação do Estresse Oxidativo, Dosagem de TNF- α e Análise da expressão de COX-2 e iNOS

5.3.1 Efeito do tratamento com metilfenidato sobre a produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em áreas cerebrais de animais jovens submetidos ou não à indução da epilepsia com pilocarpina (P320).

Foi observado um aumento significativo na concentração de malonildialdeído (MDA) no hipocampo (HC), corpo estriado (CE) e córtex pré-frontal (CPF) dos animais do grupo controle epiléptico em relação ao grupo controle não epiléptico.

No HC, os grupos de animais não epilépticos tratados com MFD nas doses de 2,5; 5 e 10 mg/Kg e, os grupos de animais epilépticos nas doses de 2,5; 5 e 10 mg/Kg apresentaram um aumento significativo na concentração de MDA em relação ao controle não epiléptico. Os animais tratados com MFD na dose de 5mg/Kg apresentaram um aumento significativo em relação ao controle epiléptico. Os animais epilépticos tratados com MFD na dose de 10mg/Kg diminuiu os níveis de MDA quando comparado ao grupo MFD 10, não epiléptico (Figura 22A).

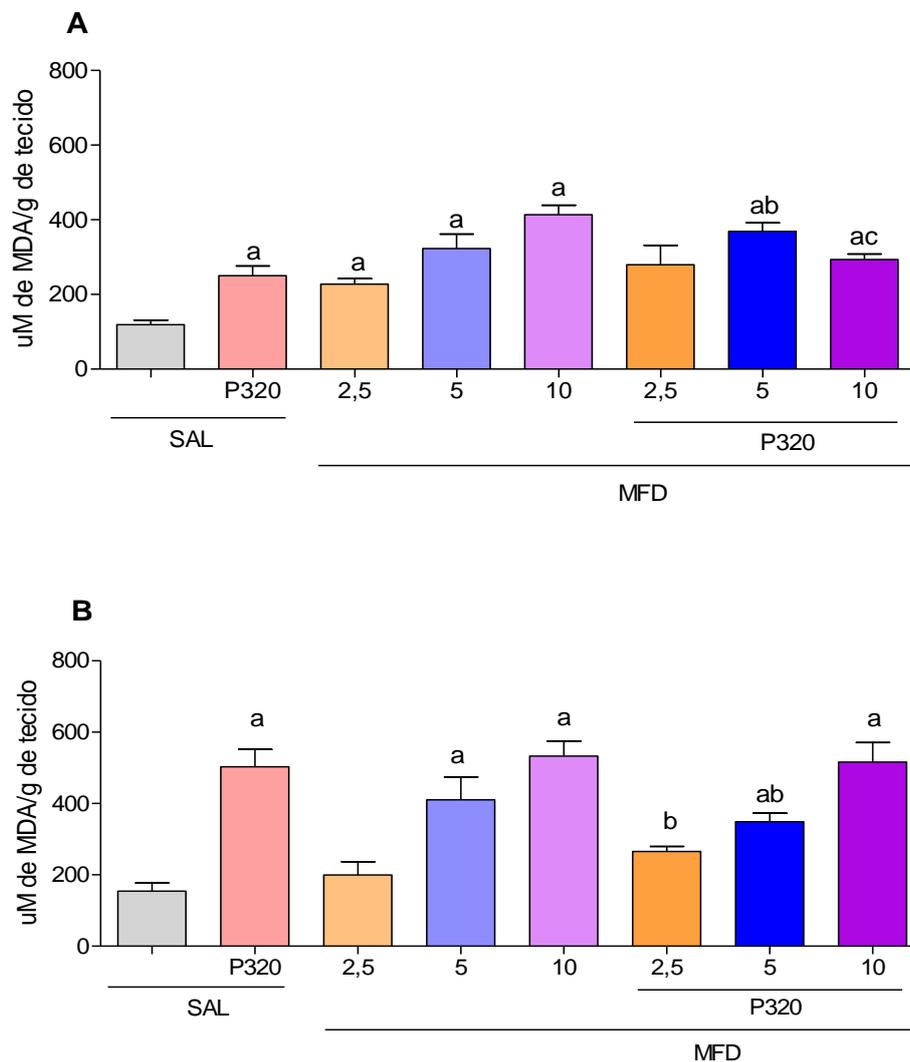
No CE, os grupos de animais não epilépticos tratados com MFD nas doses de 5 e 10 mg/Kg e os grupos de animais epilépticos nas doses de 5 e 10 mg/Kg

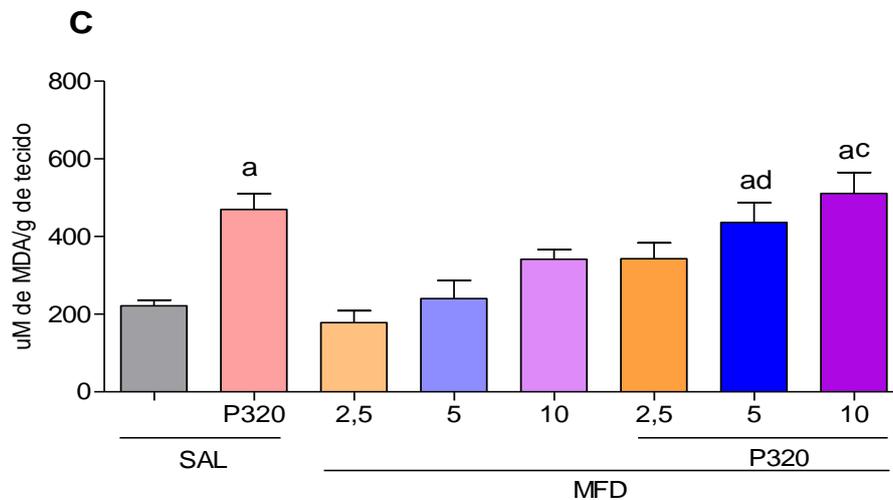
apresentaram um aumento significativo na concentração de MDA em relação ao controle não epiléptico. Os animais epilépticos tratados com MFD nas doses de 2,5 e 5 mg/Kg diminuíram os níveis de MDA quando comparados ao controle epiléptico (Figura 22B).

No CPF, os grupos de animais epilépticos tratados com MFD nas doses de 5 e 10 mg/Kg apresentaram um aumento significativo na concentração de MDA em relação ao controle não epiléptico. Os animais epilépticos tratados com MFD na dose de 5 e 10mg/Kg diminuíram os níveis de MDA quando comparado ao grupo do MFD5 e MFD 10, não epiléptico, respectivamente (Figura 22C).

Os valores da média \pm erro padrão da média (EPM) estão representados na Tabela 7 (Apêndice A).

Figura 22- Determinação da ocorrência de peroxidação lipídica de ratos jovens submetidos à epilepsia tratados ou não com metilfenidato. (A) Hipocampo (B) Corpo estriado (C) Córtex pré-frontal.





Os valores representam a média \pm EPM. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguida por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. a $p < 0,05$ vs SAL; b $p < 0,05$ vs P320; c $p < 0,05$ vs MFD10; d $p < 0,05$ vs MFD5.

5.3.2 Efeito do tratamento com metilfenidato sobre a produção de nitrito/nitrato em áreas cerebrais de animais jovens submetidos ou não à indução da epilepsia com pilocarpina (P320).

Foi observado um aumento significativo na concentração de nitrito/nitrato no HC, CE e CPF dos animais do grupo controle epiléticos em relação ao grupo controle não epilético.

No HC, os grupos de animais epiléticos tratados com MFD nas doses de 2,5; 5 e 10 mg/Kg apresentaram uma elevação dos níveis de nitrito/nitrato em relação ao controle não epilético. Os animais epiléticos nas doses de 5 e 10 mg/Kg aumentaram significativamente em relação ao grupo controle epilético. Os animais epiléticos, nas doses de 5 e 10 mg/Kg, aumentaram os níveis de nitrito/nitrato quando comparado as mesmas doses dos animais não epiléticos (Figura 23A).

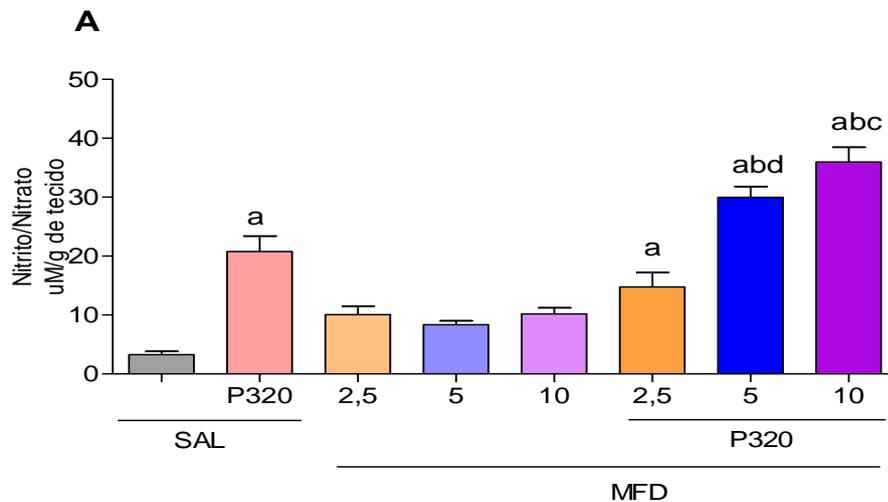
No CE, os grupos de animais não epiléticos tratados com MFD na dose 2,5mg/Kg e, os grupos de animais epiléticos nas doses de 2,5; 5 e 10 mg/Kg apresentaram um aumento significativo nos níveis de nitrito/nitrato em relação ao controle não epilético. O grupo epilético tratados com MFD na dose de 10 mg/Kg aumentou significativamente em relação ao grupo controle epilético. Os animais

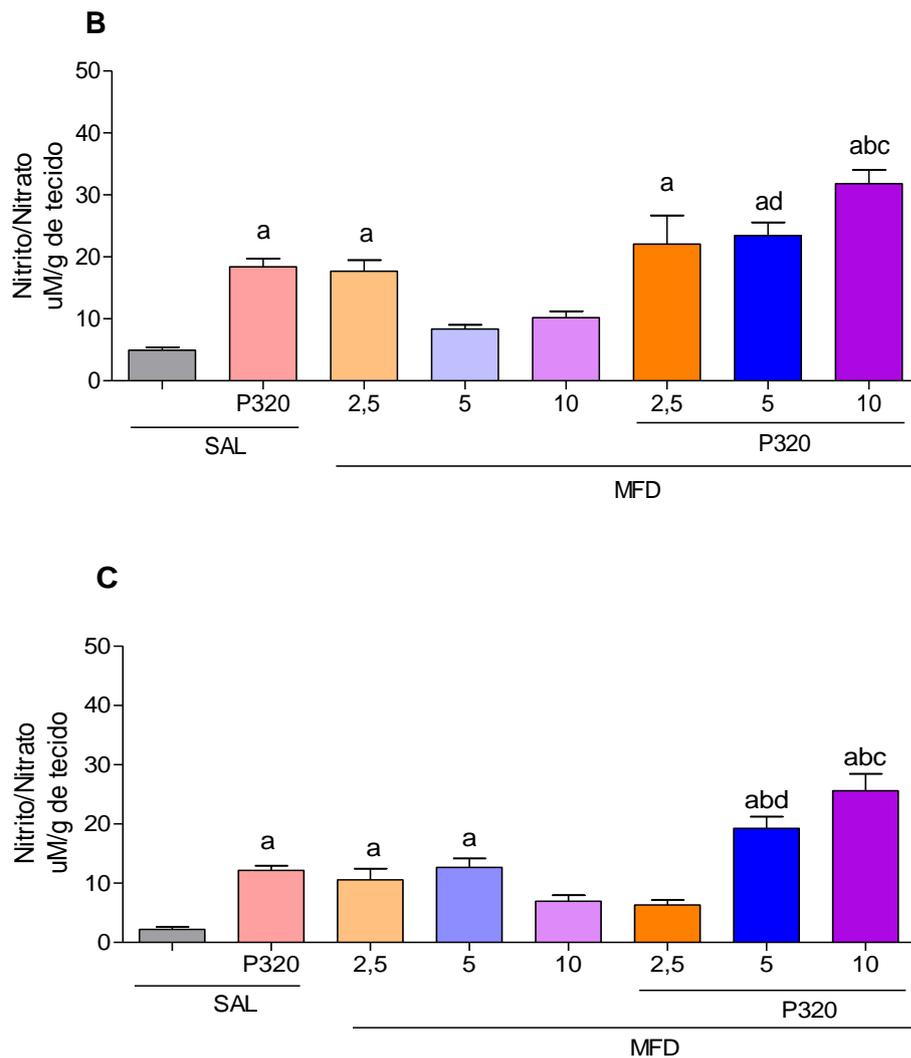
epilépticos, nas doses de 5 e 10 mg/Kg, aumentaram os níveis de nitrito/nitrato quando comparado as mesmas doses dos animais não epiléticos (Figura 23B).

No CPF, os grupos de animais não epiléticos tratados com MFD nas doses de 2,5 e 5 mg/Kg e, os animais epiléticos nas doses de 5 e 10 mg/Kg aumentaram significativamente os níveis de nitrito/ nitrato em relação ao grupo controle não epilético. Os animais epiléticos tratados com MFD nas doses de 5 e 10 mg/Kg apresentaram um aumento significativo em relação ao grupo controle epilético. Os animais epiléticos, nas doses de 5 e 10 mg/Kg, aumentaram os níveis de nitrito/nitrato quando comparado as mesmas doses dos animais não epiléticos (Figura 23C).

Os valores da média \pm erro padrão da média (EPM) estão representados na Tabela 8 (Apêndice A).

Figura 23- Determinação da formação de nitrato/ nitrito de ratos jovens submetidos à epilepsia tratados ou não com metilfenidato. (A) Hipocampo (B) Corpo estriado (C) Córtex pré-frontal





Os valores representam a média \pm EPM. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguida por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. a $p < 0,05$ vs SAL; b $p < 0,05$ vs P320; c $p < 0,001$ vs MFD10 e d $p < 0,05$ vs MFD5.

5.3.3 Efeito do tratamento com metilfenidato sobre a concentração de glutathiona reduzida (GSH) em áreas cerebrais de animais jovens submetidos ou não à indução da epilepsia com pilocarpina (P320).

Foi observada uma diminuição significativa sobre a concentração de GSH no HC, CE e CPF dos animais do grupo controle epiléptico em relação ao grupo controle não epiléptico.

No HC, os grupos de animais não epilépticos tratados com MFD nas doses de 2,5; 5 e 10mg/Kg e, os grupos de animais epilépticos nas doses de 2,5; 5 e 10mg/Kg diminuíram a concentração de GSH em relação ao controle não epiléptico.

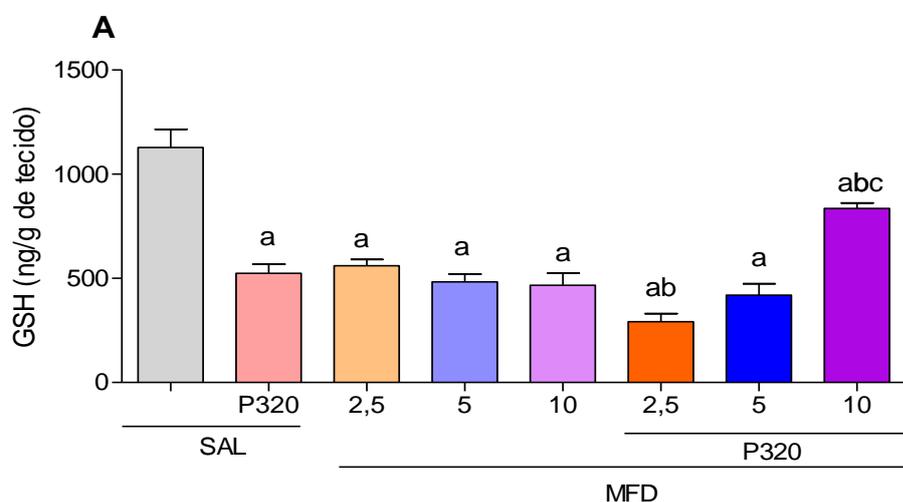
Os animais epilépticos tratados com MFD na dose de 2,5mg/Kg apresentou uma diminuição, mas na dose de 10mg/Kg apresentou um aumento na concentração de GSH quando comparado ao grupo controle epiléptico. Os animais epilépticos tratados com MFD 10 apresentou um aumento significativo nos níveis de GSH quando comparado a mesma dose dos animais não epilépticos (Figura 24A).

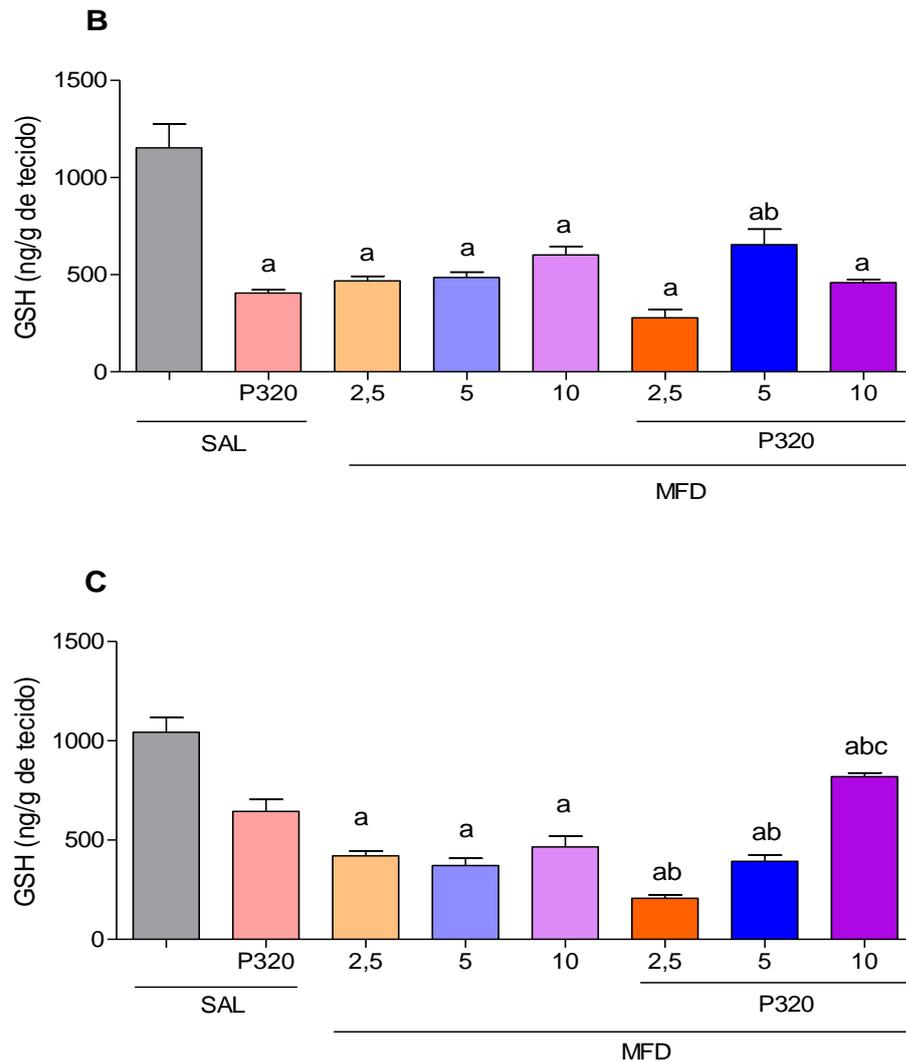
No CE, os grupos de animais não epilépticos tratados com MFD nas doses de 2,5; 5 e 10 mg/Kg e, os grupos de animais epilépticos nas doses de 2,5; 5 e 10mg/Kg apresentaram uma diminuição na concentração de GSH em relação ao controle não epiléptico. Os animais do grupo epiléptico tratados com MFD na dose de 5mg/Kg aumentaram significativamente em relação ao grupo controle epiléptico (Figura 24B).

No CPF, os grupos de animais não epilépticos tratados com MFD nas doses de 2,5; 5 e 10 mg/Kg e, os grupos de animais epilépticos nas doses de 2,5; 5 e 10 mg/Kg apresentaram uma diminuição significativa na concentração de GSH em relação ao controle não epiléptico. Os animais epilépticos tratados com MFD nas doses de 2,5 e 5 mg/Kg diminuíram e a dose de 10mg/Kg aumentou os níveis de GSH em relação ao grupo controle epiléptico. Os animais epilépticos tratados com MFD 10 apresentou um aumento significativo nos níveis de GSH quando comparado a mesma dose dos animais não epilépticos (Figura 24C).

Os valores da média \pm erro padrão da média (EPM) estão representados na Tabela 9 (Apêndice A).

Figura 24- Avaliação da concentração de GSH de ratos jovens submetidos à epilepsia tratados ou não com metilfenidato. (A) Hipocampo (B) Corpo estriado (C) Córtex pré-frontal.





Os valores representam a média \pm EPM. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguida por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. a $p < 0,05$ vs SAL; b $p < 0,05$ vs P320; c $p < 0,05$ vs MFD 10.

5.3.4 Efeito do tratamento com metilfenidato sobre a atividade da Catalase em áreas cerebrais de animais jovens submetidos ou não à indução da epilepsia com pilocarpina (P320).

Foi observada uma diminuição significativa na atividade da catalase no HC, CE e CPF dos animais do grupo controle epiléptico em relação ao grupo controle não epiléptico.

No HC, os grupos de animais não epilépticos tratados com MFD nas doses de 2,5; 5 e 10 mg/Kg e os grupos de animais epilépticos nas doses de 2,5; 5 e 10

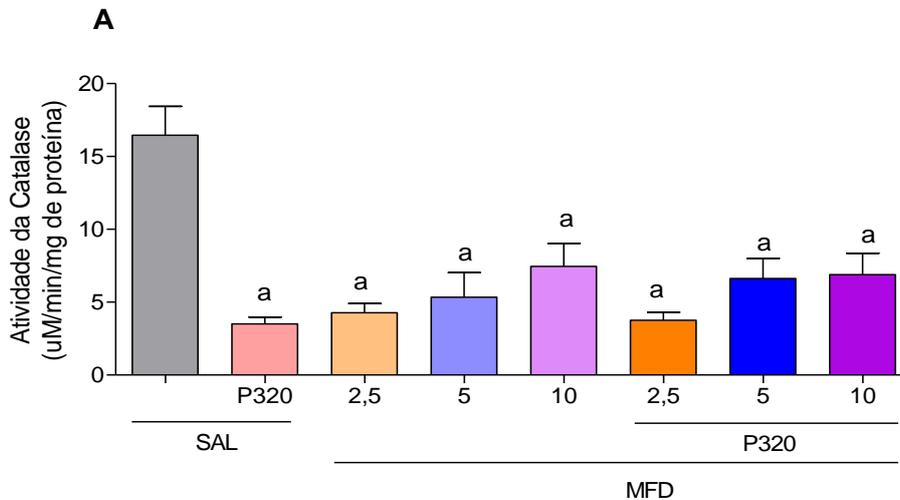
mg/Kg diminuíram a atividade da catalase em relação ao controle não epiléptico (Figura 25A).

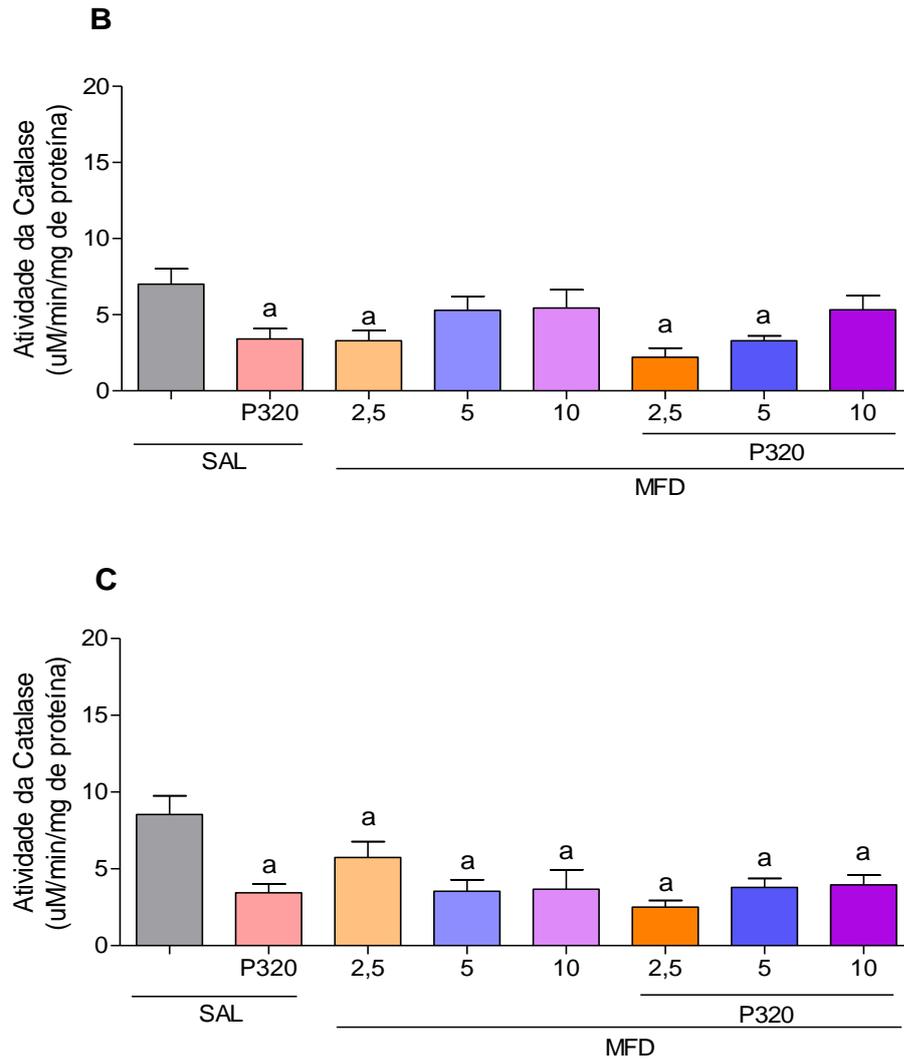
No CE, os grupos de animais não epilépticos tratados com MFD nas doses de 2,5 mg/Kg e, os grupos de animais epilépticos nas doses de 2,5 e 5 apresentaram uma diminuição significativa na atividade da catalase em relação ao controle não epiléptico (Figura 25B).

No CPF, os grupos de animais não epilépticos tratados com MFD nas doses de 2,5; 5 e 10mg/Kg e os animais epilépticos nas doses de 2,5; 5 e 10mg/Kg apresentaram uma diminuição na atividade da catalase em relação ao grupo controle não epiléptico (Figura 25C).

Os valores da média \pm erro padrão da média (EPM) estão representados na Tabela 10 (Apêndice A).

Figura 25- Avaliação da atividade da catalase de ratos jovens submetidos à epilepsia tratados ou não com metilfenidato. (A) Hipocampo (B) Corpo estriado (C) Córtex pré-frontal.





Os valores representam a média \pm EPM. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguida por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. a $p < 0,05$ vs SAL.

5.3.5 Efeito do tratamento com metilfenidato sobre a atividade da Acetilcolinesterase em áreas cerebrais de animais jovens submetidos ou não à indução da epilepsia com pilocarpina (P320).

O grupo controle dos animais epiléticos foi capaz de reduzir significativamente a atividade da AChE no HC e CPF em relação ao grupo controle não epilético.

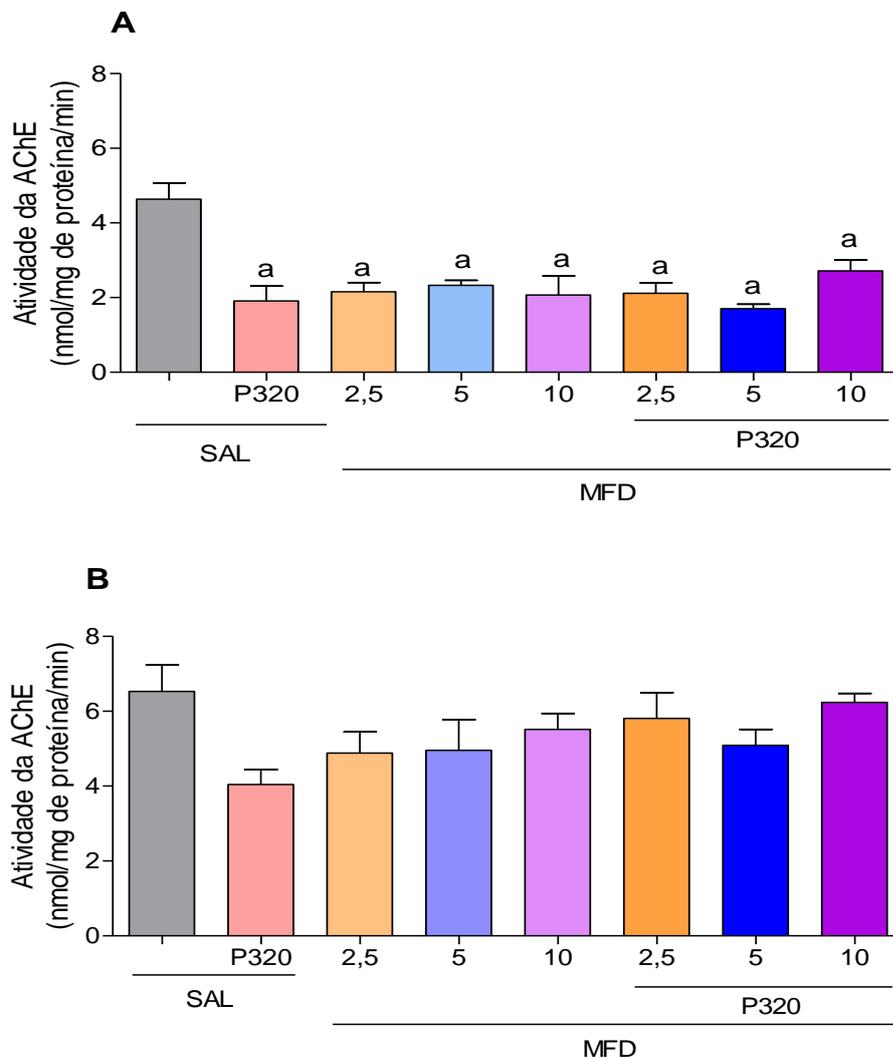
No HC, houve diminuição significativa nos animais não epiléticos e nos animais epiléticos tratados com MFD nas doses de 2,5; 5 e 10 mg/Kg em relação ao grupo controle não epilético (Figura 26A).

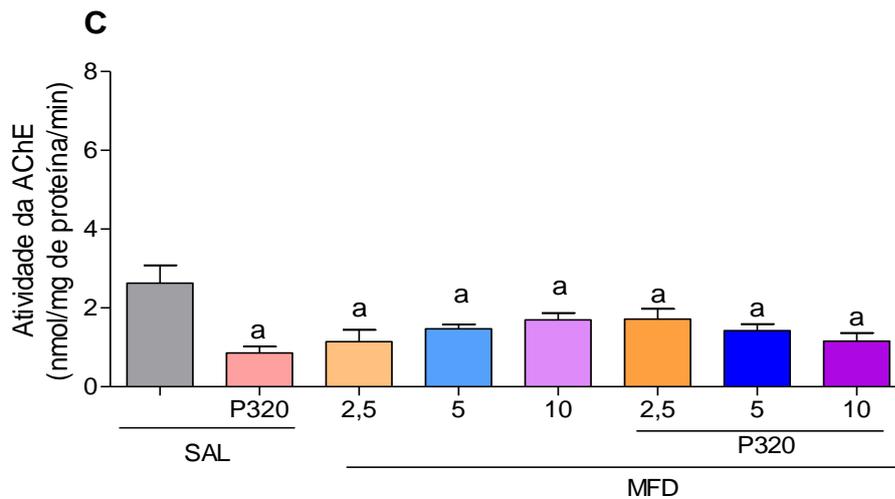
No CE, não foi observada nenhuma diferença significativa dos animais pertencentes aos diferentes grupos tratados com MFD em comparação aos grupos controles não epiléticos e epiléticos (Figura 26B).

No CPF, foi observado uma diminuição significativa nos animais não epiléticos tratados com MFD nas doses de 2,5; 5 e 10 mg/Kg e nos animais epiléticos nas doses de 2,5; 5 e 10mg/Kg em relação ao grupo controle não epilético (Figura 26C).

Os valores da média \pm erro padrão da média (EPM) estão representados na Tabela 11 (Apêndice A).

Figura 26- Efeito do MFD sobre a atividade da AChE de ratos jovens submetidos à epilepsia tratados ou não com metilfenidato. (A) Hipocampo (B) Corpo estriado (C) Córtex pré-frontal.





Os valores representam a média \pm EPM. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguida por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. $p < 0,05$ vs SAL.

5.3.6 Efeito do tratamento com metilfenidato sobre a determinação das concentrações de Dopamina e do metabólito DOPAC em corpo estriado de animais jovens submetidos ou não à indução da epilepsia com pilocarpina (P320).

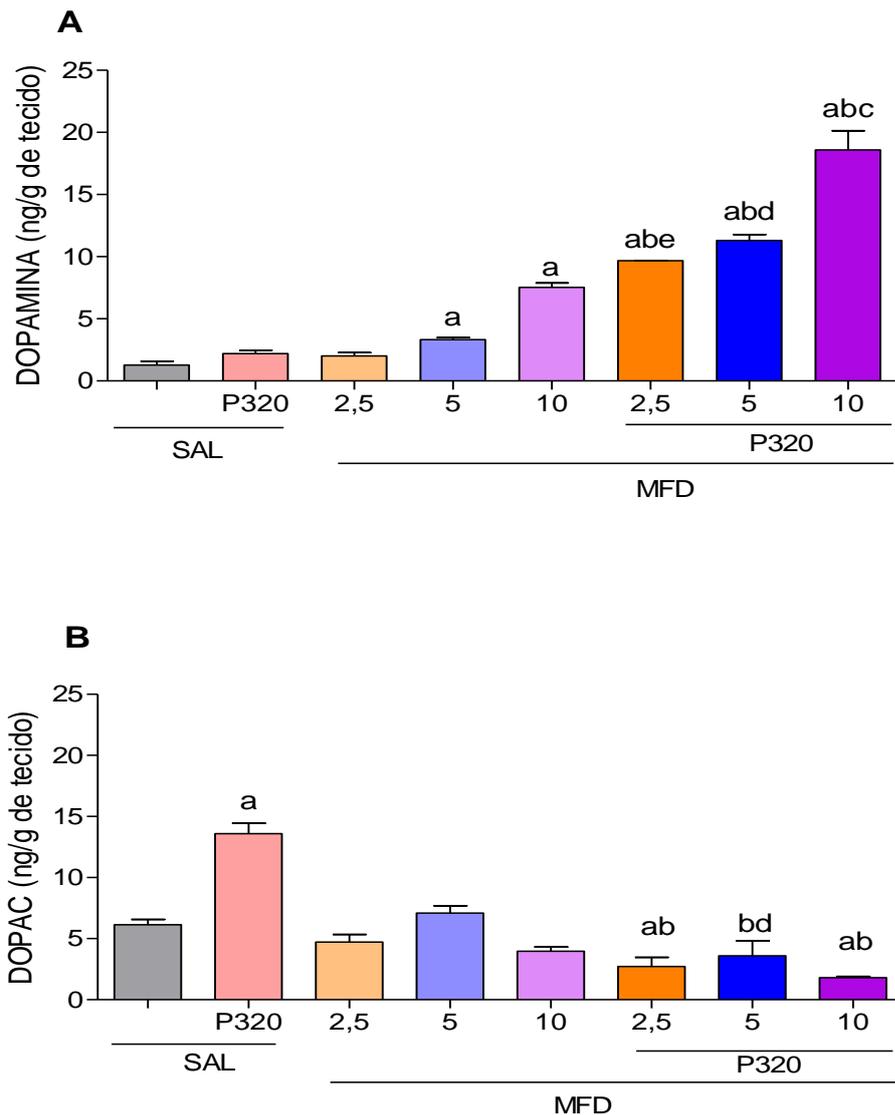
A Figura 27A mostra que não houve alteração nos níveis de dopamina no corpo estriado do grupo controle epiléptico quando comparado ao grupo controle não epiléptico. Houve um aumento significativo nos níveis de dopamina (DA) nos grupos não epilépticos tratados com MFD nas doses de 5 e 10 mg/Kg quando comparado ao grupo não epiléptico. Os animais epilépticos nas doses de 2,5; 5 e 10 mg/Kg também apresentaram um aumento dos níveis de DA quando comparados aos grupos controle não epilépticos e epilépticos. Os animais epilépticos tratados com MFD nas doses de 2,5; 5 e 10 mg/Kg apresentaram um aumento significativo nos níveis de DA quando comparado as mesmas doses dos animais não epilépticos.

A Figura 27B mostra que houve um aumento significativo nos níveis de DOPAC no corpo estriado do grupo controle epiléptico quando comparado ao grupo controle não epiléptico. Não houve alteração significativa nos níveis de DOPAC do MFD nos animais não epilépticos. Nos animais epilépticos, nas doses de 2,5 e 10mg/Kg, houve uma diminuição dos níveis de DOPAC quando comparado ao grupo controle não epiléptico e, nas doses de 2,5; 5 e 10 mg/Kg quando comparado ao

grupo controle epiléptico. Os animais do grupo epiléptico tratados com MFD na dose de 5mg/Kg aumentaram significativamente em relação ao grupo controle epiléptico.

Os valores da média \pm erro padrão da média (EPM) estão representados na Tabela 12 (Apêndice A).

Figura 27- Efeito do MFD sobre as concentrações de (A) Dopamina e (B) DOPAC em corpo estriado de ratos jovens submetidos à epilepsia tratados ou não com metilfenidato.



Os valores representam a média \pm EPM. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguida por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. a $p < 0,05$ vs SAL; b $p < 0,001$ vs P320; c $p < 0,001$ vs MFD10; d $p < 0,05$ vs MFD5; e $p < 0,01$ vs MFD2,5.

5.3.7 Efeito do tratamento com metilfenidato sobre a atividade da mieloperoxidase (MPO) em áreas cerebrais de animais jovens submetidos ou não à indução da epilepsia com pilocarpina (P320).

Na avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), os animais epiléticos apresentaram aumento significativo da MPO no HC, CE e CPF em relação ao grupo controle não epilético.

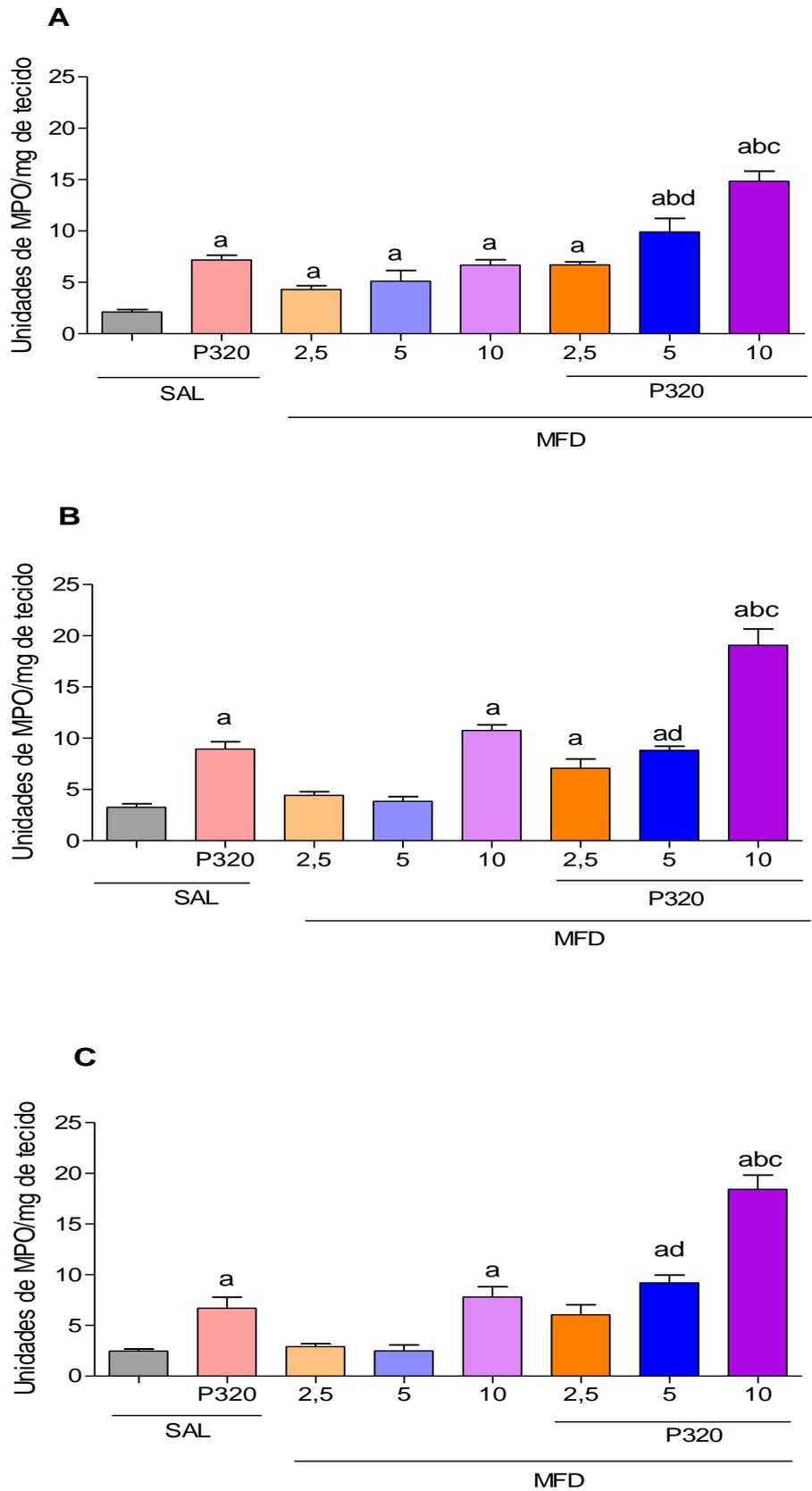
No HC, os grupos de animais não epiléticos e epiléticos tratados com MFD nas doses de 2,5; 5 e 10 mg/Kg aumentaram a MPO em relação ao controle não epilético. Já o grupo de animais epiléticos tratados com MFD nas doses de 5 e 10 mg/Kg apresentaram aumento significativo em relação ao grupo controle epilético. Os animais epiléticos tratados com MFD nas doses de 5 e 10 mg/Kg apresentaram um aumento significativo na atividade da MPO quando comparado as mesmas doses dos animais não epiléticos (Figura 28A).

No CE, os grupos de animais não epiléticos tratados com MFD na dose de 10mg/Kg e, os grupos de animais epiléticos nas doses de 2,5; 5 e 10 mg/Kg apresentaram um aumento significativo na atividade da MPO em relação ao controle não epilético. O grupo epilético tratados com MFD na dose de 10mg/Kg também aumentou a atividade da MPO quando comparado ao grupo controle epilético. Os animais epiléticos tratados com MFD nas doses de 5 e 10 mg/Kg apresentaram um aumento significativo na atividade da MPO quando comparado as mesmas doses dos animais não epiléticos (Figura 28B).

No CPF, os grupos de animais não epiléticos tratados com MFD na dose de 10mg/Kg aumentou a atividade da MPO. Os animais epiléticos tratados com MFD nas doses de 5 e 10 mg/Kg apresentaram um aumento da MPO em relação ao grupo controle não epilético e, na dose de 10 mg/Kg em relação ao controle epilético. Já os animais epiléticos tratados com MFD nas doses de 5 e 10 mg/Kg apresentaram um aumento significativo na atividade dessa enzima quando comparado as mesmas doses dos animais não epiléticos (Figura 28C).

Os valores da média \pm erro padrão da média (EPM) estão representados na tabela 13 (Apêndice A).

Figura 28- Avaliação dos níveis de mieloperoxidase de ratos jovens submetidos à epilepsia tratados ou não com metilfenidato. (A) Hipocampo (B) Corpo estriado (C) Córtex pré-frontal.



Os valores representam a média \pm EPM. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguida por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. a $p < 0,05$ vs SAL; b $p < 0,05$ vs P320; c $p < 0,05$ vs MFD10; d $p < 0,05$ vs MFD5.

5.3.8 Efeito do tratamento com metilfenidato sobre a concentração de TNF- α em áreas cerebrais de animais jovens submetidos ou não à indução da epilepsia com pilocarpina (P320).

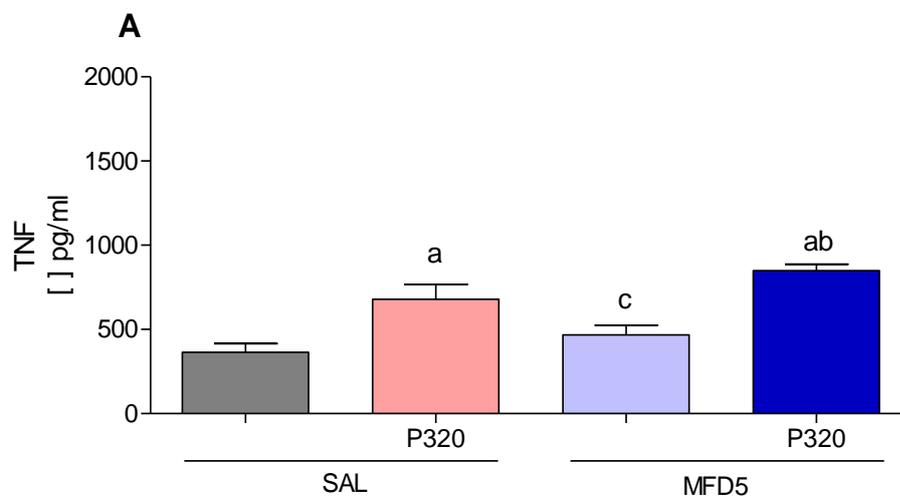
Com relação às concentrações de TNF- α foi constatado aumento significativo em todas as áreas cerebrais analisadas (HC, CE e CPF) nos animais epiléticos quando comparado ao grupo controle não epilético.

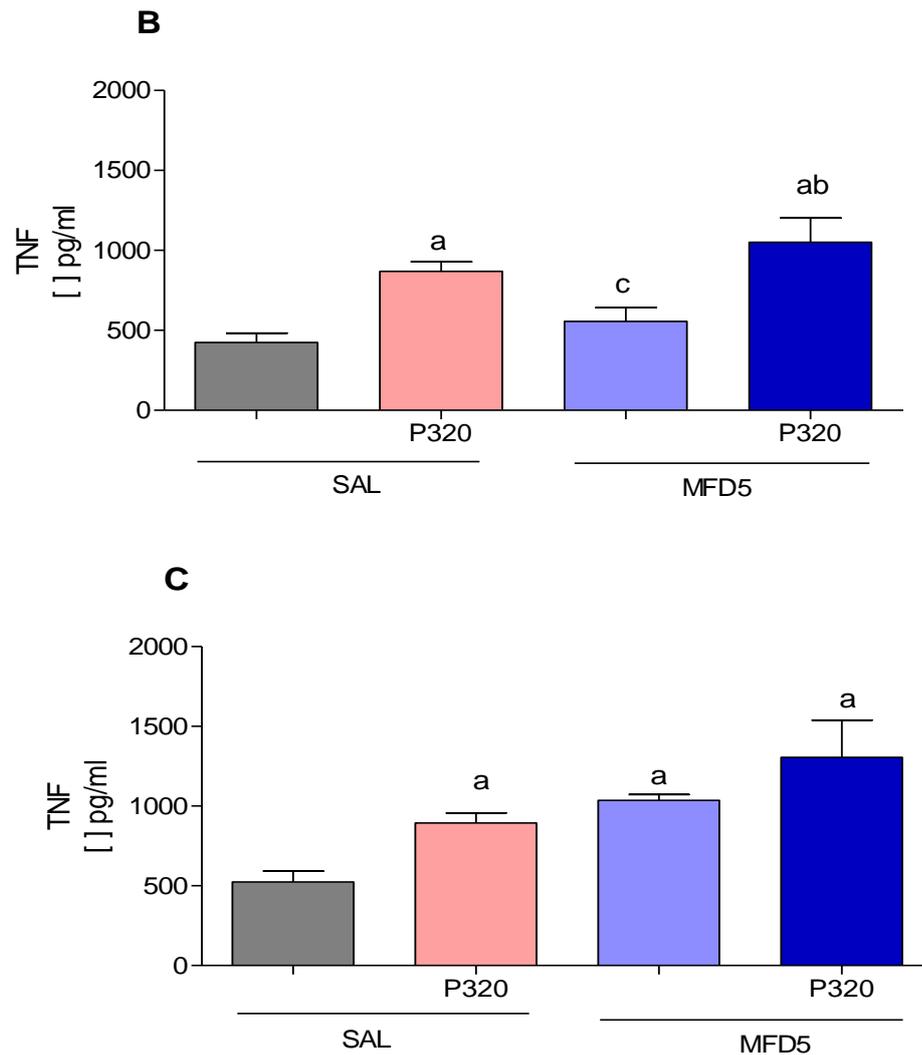
No HC, CE e CPF, o grupo de animais epiléticos tratados com MFD na dose de 5mg/Kg aumentou a concentração de TNF- α em relação ao grupo controle não epilético (Figura 29A, 29B e 29C).

NO CPF, o grupo de animais não epilético tratados com MFD na dose de 5mg/Kg aumentaram às concentrações de TNF- α em relação ao controle não epilético (Figura 29C).

Os valores da média \pm erro padrão da média (EPM) estão representados na tabela 14 (Apêndice A).

Figura 29- Níveis de TNF- α de ratos jovens submetidos à epilepsia tratados ou não com metilfenidato. (A) Hipocampo (B) Corpo estriado (C) Córtex pré-frontal.





Os valores representam a média \pm EPM. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguida por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. a $p < 0,05$ vs SAL; b $p < 0,01$ vs MFD5; c $p < 0,05$ vs P320.

5.3.9 Efeito do tratamento com metilfenidato sobre a atividade da enzima COX-2 em corpo estriado (CE) de animais jovens submetidos ou não à indução da epilepsia com pilocarpina (P320).

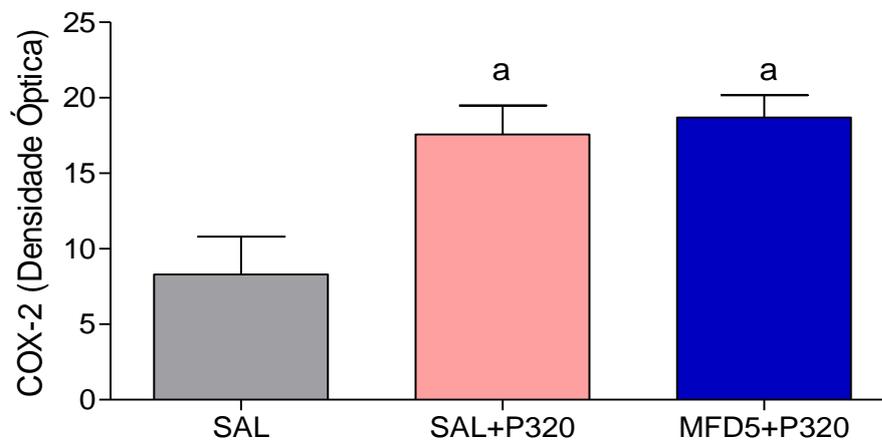
Sabendo da importância da COX-2 para a neuroinflamação e epilepsia, avaliamos quali-quantitativamente a imunomarcagem para esta enzima no corpo estriado de ratos jovens controle não epilético (SAL) e dos ratos submetidos à epilepsia por pilocarpina (SAL+P320 e MFD5+P320).

Através das imagens obtidas a partir da técnica de imunohistoquímica para COX-2 pode-se verificar que os animais controle epilético tiveram uma maior imunomarcagem para COX-2 em relação ao grupo controle não epilético. O

tratamento com MFD5 nos animais epiléticos aumentaram a marcação para a enzima COX-2 em comparação com o grupo controle não epilético (Figura 30A e 30B).

Os valores da média \pm erro padrão da média (EPM) estão representados na tabela 15 (Apêndice A).

Figura 30- A. Quantificação da imunomarcção para COX-2 no corpo estriado de animais jovens submetidos ou não à epilepsia.



Essa quantificação foi feita utilizando o programa Image J através da densidade óptica. Os valores representam a média \pm EPM. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguida por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. $p < 0,01$ em relação ao grupo controle (SAL).

Figura 30- B. Imagens representativas do efeito do metilfenidato (5mg/Kg) sobre a imunorreatividade da COX-2 no corpo estriado de ratos jovens submetidos à epilepsia.



A coloração marrom representa células imunorreativas para COX-2 no corpo estriado. Escala de 200 μ m e aumento de 20x.

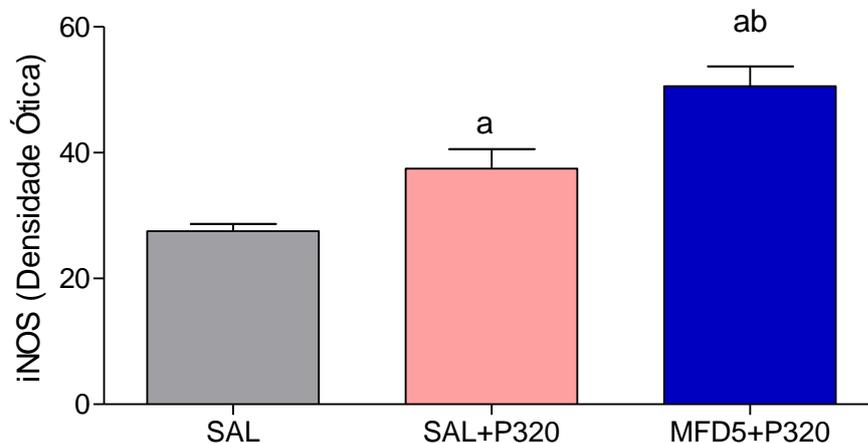
5.3.10 Efeito do tratamento com metilfenidato sobre a atividade da enzima iNOS em corpo estriado (CE) de animais jovens submetidos ou não à indução da epilepsia com pilocarpina (P320).

Avaliamos quali- quantitativamente a imunomarcção para iNOS no corpo estriado de ratos jovens não epiléticos (SAL) e dos ratos submetidos à epilepsia por pilocarpina (SAL+P320 e MFD5+P320).

Através das imagens obtidas a partir da técnica de imunohistoquímica para iNOS pode-se verificar que os animais controle epilético tiveram uma maior imunomarcção para iNOS em relação ao grupo controle não epilético. Os animais epiléticos tratados com MFD na dose de 5mg/Kg aumentaram a marcação para a enzima iNOS em comparação com o grupo controle não epilético e epilético (Figura 31A e 31B).

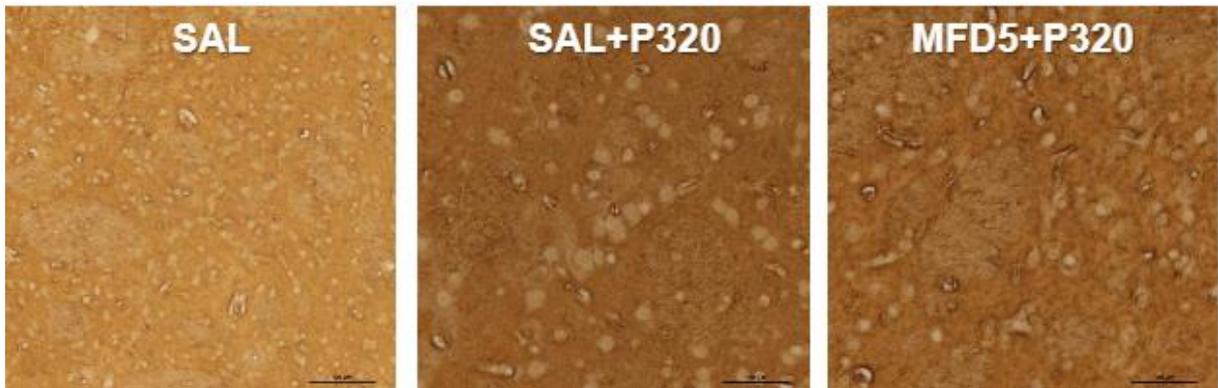
Os valores da média \pm erro padrão da média (EPM) estão representados na tabela 16 (Apêndice A).

Figura 31- A. Quantificação da imunomarcção para iNOS no corpo estriado de animais jovens submetidos ou não à epilepsia.



Essa quantificação foi feita utilizando o programa Image J através da densidade óptica. Os valores representam a média \pm EPM. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguida por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. a $p < 0,05$ vs SAL e b $p < 0,05$ vs SAL+P320.

Figura 31- B. Imagens representativas do efeito do metilfenidato (5mg/Kg) sobre a imunorreatividade da iNOS no corpo estriado de ratos jovens submetidos à epilepsia.



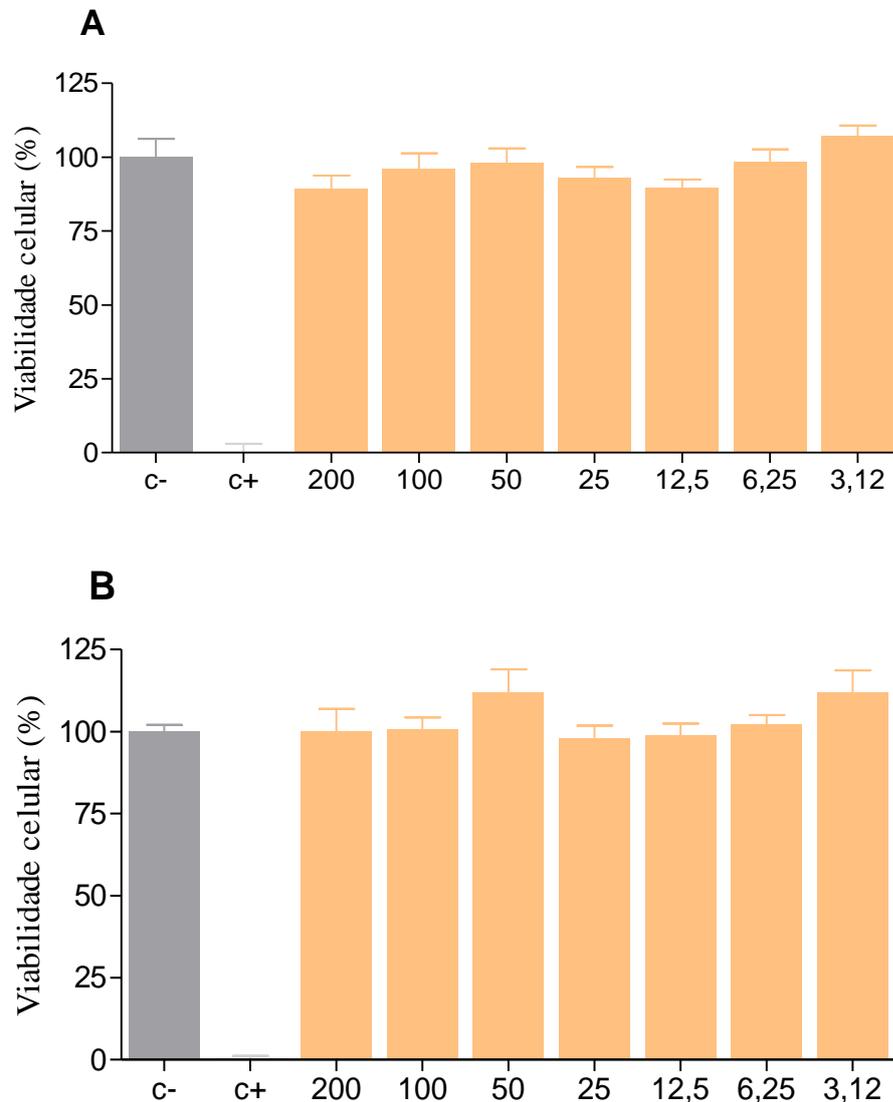
A coloração marrom representa células imunorreativas para iNOS no corpo estriado. Escala de 200 μ m e aumento de 10x.

5.4 PROTOCOLO 3: Ensaios *in vitro* de Viabilidade Celular

Com o intuito de estudar o efeito de MFD sobre os astrócitos, a substância foi incubada em diferentes concentrações com as células por um período de 12 ou 24 horas. Em seguida foi realizado o ensaio de redução do MTT, que determina indiretamente a capacidade oxirredutora das células.

Após 12 e 24 horas de incubação, todas as concentrações de MFD (200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,12 μ g/mL) não foram capazes de exercer, estatisticamente, qualquer efeito sobre a viabilidade desse tipo celular (Figura 32).

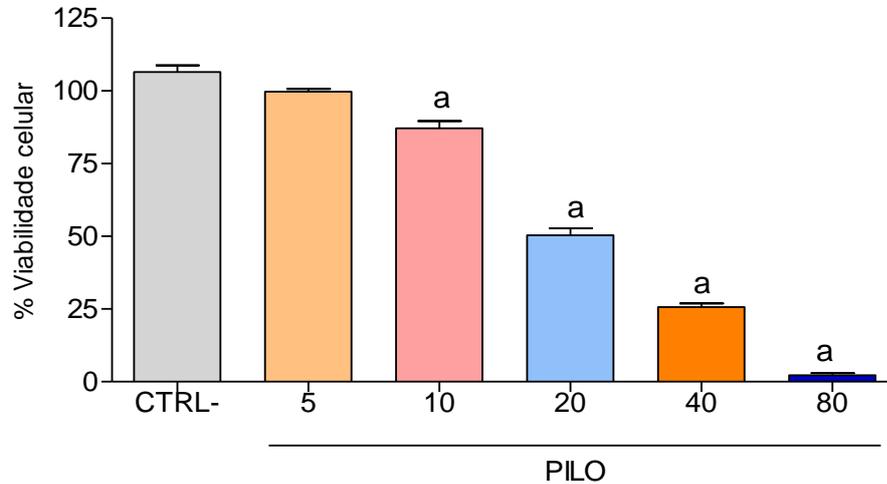
Figura 32- Efeito de MFD sobre a viabilidade astrócitos pelo método do MTT após (A) 12 horas e (B) 24 horas de incubação.



Os experimentos foram realizados em triplicata e os dados expressos como média \pm EPM. Para análise estatística utilizou-se ANOVA seguida pela pós-teste de Bonferroni.

Quanto ao efeito da pilocarpina sobre a viabilidade da linhagem celular em teste, em nossas análises observamos que a pilocarpina foi citotóxico a essas células nas doses de 10, 20, 40 e 80 mM/mL (10mM/mL: $87,12 \pm 2,57\%$; 20mM/mL: $50,37 \pm 2,34\%$; 40mM/mL: $25,69 \pm 1,27\%$; 80mM/mL: $2,29 \pm 0,68\%$ de células viáveis comparados com $106,5 \pm 2,24\%$ de células viáveis no grupo não tratado), de modo dose-dependente, e apresentando uma IC 50 (índice de citotoxicidade para 50% da população celular em estudo) correspondente a 20,35mM (Figura 33).

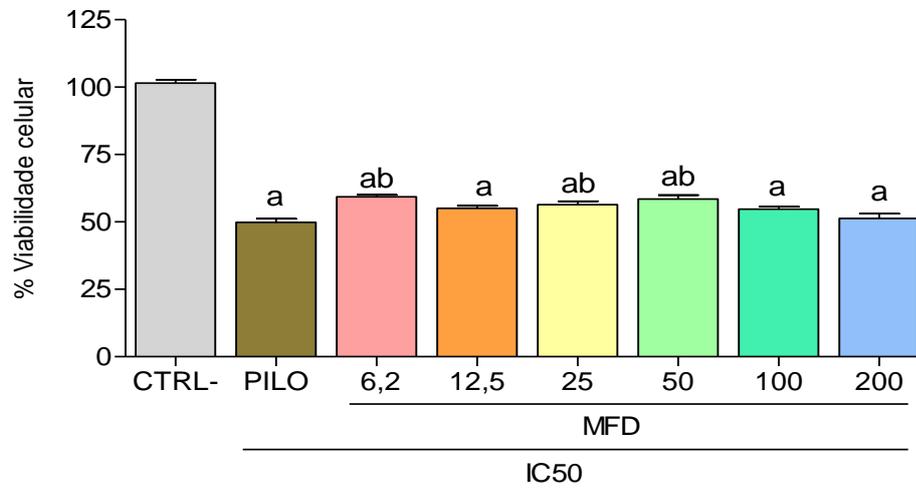
Figura 33- Percentual de viabilidade celular de astrócitos corticais expostos a diferentes concentrações de Pilocarpina.



Resultados expressos como média \pm EPM. Para análise estatística utilizou-se ANOVA seguida pela pós-teste de Bonferroni. a ($p < 0,001$) comparado com o grupo controle não tratado (CTRL-).

De posse do conhecimento gerado sobre a citotoxicidade da pilocarpina, e conhecendo sua IC 50 correspondente a 20,35 mM, então decidimos analisar se o pré-tratamento com MFD (6,25, 12,5, 25, 50, 100 e 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) era capaz de exercer alguma influência sobre a cultura de astrócitos exposta à IC50 da pilocarpina. Como resultado, foi observado que houve um aumento da viabilidade celular envolvendo o pré-tratamento com MFD nas concentrações de 6,2; 25 e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e subsequente exposição a dose correspondente a IC 50 da pilocarpina (6,2: $59,37 \pm 0,74$; 25: $56,37 \pm 1,34$; 50: $58,44 \pm 1,46$ % de células viáveis comparado com $49,82 \pm 1,35$ de células viáveis no grupo tratado com IC 50 da PILO) (Figura 34).

Figura 34- Percentual de viabilidade celular de astrócitos corticais expostos a diferentes concentrações da combinação de MFD+PILO IC50



Resultados expressos como média \pm EPM. Para análise estatística utilizou-se ANOVA seguida pela pós-teste de Bonferroni. a $p < 0,05$ vs controle não tratado (CTRL-) e b $p < 0,05$ comparado com o grupo controle PILO IC50.

6 DISCUSSÃO

6.1 PROTOCOLO 1: Testes Comportamentais

Nossos resultados mostraram que, a maioria (64,6%) dos animais utilizados nos experimentos convulsionaram e chegaram ao *status epilepticus*, mas alguns animais (7,08%) não convulsionaram mesmo com a dose de 320 mg/kg de pilocarpina administrada. Em um estudo realizado com a administração de pilocarpina na dose de 400 mg/Kg (P400) demonstrou que nesse grupo, 75% dos animais apresentaram convulsões e progrediram para o *status epilepticus* (CAMPÊLO et al., 2011). Estudos anteriores também mostram que a maior dose empregada de pilocarpina (350 mg/kg) não promoveu atividade convulsiva em 35 % dos animais tratados (CAVALHEIRO et al., 1991; COVOLAN; MELLO, 2000; DEMELLO et al., 2005), mas foi possível observar alterações comportamentais como imobilidade, marcha atáxica, automatismos e salivação excessiva nos primeiros minutos após a injeção sistêmica, havendo persistência desses sintomas por aproximadamente 1 h.

No presente estudo, particularmente no teste do campo aberto, não houve alteração nos animais do grupo controle epilético quanto ao número de cruzamentos, mas houve um aumento no número de *rearing* em relação ao grupo controle não epilético. Um estudo mostrou evidências que animais jovens, submetidos ao *status epilepticus*, apresentam aumento moderado da atividade locomotora e exploratória sem alteração da emocionalidade. A hiperatividade foi observada ao longo do tempo, quando os animais foram reapresentados a um ambiente com contexto neutro (exemplo: no campo aberto) ou imediatamente, quando expostos a um ambiente ameaçador (exemplo: no LCE) (BARBOSA; RIBEIRO; CYSNEIROS, 2013). Vale a pena ressaltar que esse teste tem o objetivo de analisar a atividade locomotora dos animais (YOUSUF et al., 2011), visto que a atividade locomotora e o *rearing* são indicativos de excitabilidade do SNC e que uma diminuição destes parâmetros sugere uma atividade sedativa (CHINDO et al., 2003).

Estudos comportamentais, tendo início logo após o *status epilepticus*, são escassos na literatura, principalmente se for induzido conforme o modelo de pilocarpina, em animais jovens. Tais características dificultaram a comparação com os nossos resultados para uma pronta discussão, visto que no nosso estudo a

pilocarpina não alterou a atividade locomotora dos animais. Segundo Müller et al., (2009) que estudaram as alterações comportamentais e cognitivas de camundongos adultos nocautes (C57BL/6) que foram submetidos ao modelo de ELT com pilocarpina aos 25 dias pós-natal, os animais que desenvolveram epilepsia apresentaram comportamento ansioso, aumento da atividade locomotora no campo aberto, no labirinto em cruz elevado, na placa perfurada, no teste de exploração de objetos, e adicionalmente, déficit de aprendizagem no labirinto aquático de Morris. Estes resultados alertam para busca de intervenções precoces que possam minimizar os danos ocasionados pelas crises convulsivas.

Psicoestimulantes como as anfetaminas e metilfenidato, aumentam a atividade locomotora no teste de campo aberto (BARBOSA et al., 2011; PEREIRA et al., 2011). Nesse teste, o MFD aumentou a atividade locomotora dos animais jovens em todas as doses estudadas do MFD tanto dos animais não epiléticos como dos animais epiléticos em comparação ao grupo controle não epilético.

Um trabalho realizado por Burton e colaboradores (2010) sugere que alguns aspectos da função dopaminérgica mesocorticolímbica são alterados pela administração de psicoestimulantes durante a adolescência. Esses autores observaram que ratos jovens (32-47 semanas) que receberam a administração de metilfenidato apresentam na vida adulta maior resposta locomotora e ativação neuronal diferencial, induzidas por anfetamina.

Quanto aos grupos tratados com MFD e que foram induzidos ao *status epilepticus*, pode-se observar uma potencialização na atividade locomotora quando associado o MFD e a pilocarpina (MFD +P320) em todas as doses estudadas, visto através do aumento do número de cruzamentos desses animais quando comparados ao grupo controle epilético (SAL+P320).

Em nosso estudo não houve alteração no número de *rearing* nos animais tratados com MFD no campo aberto quando comparado ao grupo controle não epilético, mas houve uma diminuição no número de *rearing* nos animais tratados com MFD na dose de 10 mg/Kg comparados ao grupo controle epilético. Alguns autores relatam que drogas ansiolíticas diminuem o número de *rearing* (HUGHES, 1972; STOUT; WEISS, 1994).

No presente estudo, no teste do Labirinto em Cruz Elevada (LCE), houve uma significativa diminuição em todos os parâmetros analisados dos animais controle epiléticos em relação ao grupo controle não epilético, indicando uma atividade

ansiolítica da pilocarpina, uma vez que o tratamento aumentou a aversão natural dos animais aos espaços desprotegidos e elevados.

Hoeller (2013) observou que os ratos tratados com uma única injeção sistêmica de pilocarpina (150 ou 350 mg/Kg) reduziram significativamente o tempo gasto e o número de entradas nos braços abertos no LCE quando comparado aos animais controle, apresentando um perfil ansiolítico, quando avaliados 24 horas ou 1 mês após o tratamento. Esses achados corroboram com outro estudo do mesmo grupo de pesquisa que relataram um efeito ansiolítico promovido pela administração de pilocarpina (150 mg/Kg) em ratos (DUARTE et al., 2010). As alterações indicam que a administração de uma única dose sistêmica subconvulsivante de pilocarpina leva a alterações neurofisiológicas e comportamentais que podem ser utilizadas como um modelo para o estudo da ansiedade em roedores (INOSTROZA et al., 2012).

Houve um aumento dos parâmetros NEBA, PEBA e PTBA com MFD na dose de 10 mg/kg do grupo não epilético e, MFD nas doses de 2,5; 5 e 10 mg/Kg dos animais epiléticos em relação ao grupo controle não epilético. Alguns autores realizaram estudo com ratos jovens expostos ao MFD, utilizando o teste do LCE e verificaram que os animais passaram mais tempo sobre os braços abertos, e apresentaram comportamentos de avaliação de risco alterados sugerindo um efeito ansiolítico do MFD (ZHU; WEEDON; DOW-EDWARDS, 2010).

Quando avaliamos os tratados com MFD por 21 dias e que foram induzidos o SE, observou-se que houve um aumento de todos os parâmetros (NEBA, TPBA, PEBA e PTBA) nas doses de 2,5; 5 e 10 mg/Kg quando comparado ao grupo controle epilético. O MFD apresentou um possível comportamento ansiolítico, mesmo sendo administrado P320, que já foi previamente relatado efeito ansiolítico. Isso sugere que o MFD foi capaz de evitar o efeito ansiolítico causado pela pilocarpina.

Lopes (2016), observou no teste do LCE que a administração de pilocarpina (300 mg/kg, i.p.) promoveu na fase de maturação epilética um aumento do comportamento ansiolítico, fato evidenciado pela diminuição de exploração dos braços abertos. Curiosamente, os animais tratados com pilocarpina, que se encontravam na fase crônica, não apresentaram diferenças significativas quando comparados ao seu respectivo grupo controle.

Os estudos conduzidos por Britton e Bethancourt (2009), avaliaram os efeitos em longo prazo em animais expostos cronicamente ao MFD, indicando que um período mais prolongado de exposição diminuiu a ansiedade em relação ao período de exposição mais curto do fármaco, o que pode sugerir que é importante considerar o tempo de exposição de drogas em estudos pré-clínicos que visam investigar os efeitos da exposição do MFD em populações de crianças diagnosticadas com TDAH.

Em seguida, investigamos o possível efeito antidepressivo do MFD no teste do nado forçado. Essa investigação foi impulsionada devido a alta comorbidade entre epilepsia e depressão, pela heterogeneidade da resposta clínica às drogas antidepressivas e estabilizadores do humor atualmente disponíveis e devido à susceptibilidade aos efeitos adversos (LERER; MACCIARDI, 2002).

O teste do nado forçado, apesar de não refletir adequadamente a sintomatologia da depressão em humanos, ele tem um alto valor preditivo na investigação de drogas antidepressivas (WILLNER, 1984, CRYAN et al., 2002). Os antidepressivos aumentam a latência para a imobilidade e reduzem o tempo de imobilidade apresentado pelos animais (LAPA, 2008).

Drogas antidepressivas com envolvimento noradrenérgico parecem ter um duplo papel nas crises convulsivas, podendo apresentar atividade moduladora com efeitos anti ou pró-convulsivantes em pacientes com epilepsia (GIORGI et al., 2004; CLINCKERS et al., 2010).

Em nossos achados, pode-se observar que a pilocarpina, na dose de 320 mg/Kg, apresentou uma diminuição no tempo de imobilidade dos animais. Um estudo recente observou também um decréscimo no tempo de imobilidade dos ratos submetidos ao modelo de pilocarpina (300 mg/kg) na fase crônica, dados estes compatíveis com uma ação antidepressiva da pilocarpina (LOPES, 2016). A explicação para este achado é complexa, já que pacientes portadores de ELT apresentam altos índices de transtornos do humor, como a depressão. Uma possibilidade é que a diminuição do tempo de imobilidade observada no teste poderia estar associada com um aumento do medo nestes animais, como observado em outros trabalhos (MULLER et al., 2009).

O MFD diminuiu o tempo de imobilidade em todas as doses testadas em relação ao grupo controle não epiléptico, tanto nos animais não epilépticos como nos grupos em que a epilepsia foi induzida. Houve uma diminuição bastante significativa,

sendo bem mais acentuada na dose de 10mg/Kg, no tempo de imobilidade nos animais epiléticos tratados com MFD em comparação ao grupo controle epilético, visto que o MFD potencializa a ação antidepressiva já vista pela pilocarpina.

Salviano (2015) observou que o tratamento agudo com MFD, em animais adultos, apresentou um efeito antidepressivo, uma vez que houve uma diminuição no tempo de imobilidade no teste do nado forçado. Estudos apontam que a exposição ao MFD diminui a latência para a imobilidade (BOLÑANOS et al., 2003; CARLEZON et al., 2003; BRITTON et al., 2007).

Correlacionando esses resultados à clínica, em um trabalho realizado com pacientes em tratamento de TDAH na infância, adolescência e na fase adulta, observou-se que para os pacientes que apresentavam sintomas depressivos foi sugerido a utilização de estimulantes (MFD) juntamente com a fluoxetina, pois os antidepressivos tricíclicos parecem ser ineficazes em caso de crianças e adolescentes com depressão maior (KLEIN; SCHNEIDER; COLET, 2017).

Embora permaneça controversa a relação entre a imobilidade animal desencadeada nos modelos e a depressão humana, uma grande variedade de compostos antidepressivos e com potencial antidepressivo reduzem o tempo de imobilidade no teste do nado forçado (GOMES et al., 2010; MELO et al., 2011; TEIXEIRA et al., 2011).

A memória de trabalho ou operacional (memória de curta duração) pode ser definida como a habilidade cognitiva que permite reter e manipular informações por um curto período de tempo para estímulos ou localizações espaciais, sem a obrigatoriedade de formar uma memória de longa duração (PARK et al., 2012). É considerada na literatura como uma das funções executivas mais afetadas nas crianças com TDAH (SONUGA-BARKE, 2005; WILLCUTT, et al., 2005; BROWN; PERRIN, 2007; SJÖWAL et al., 2013), tal como uma das responsáveis pelo insucesso escolar presente com frequência nesta população e constitui um dos alvos principais do efeito da medicação, pois a literatura tem apontado para um efeito benéfico do MFD (GATHERCOLE; ALLOWAY, 2006; ALLOWAY et al., 2010; KARALUNAS; HUANG-POLLOCK, 2011; MCGRATH et al., 2011; ROGERS et al., 2011; VANCE et al., 2013).

A literatura refere que a memória de trabalho ou memória operacional não está localizada em uma única região cerebral. Ela envolve interações funcionais entre o córtex pré-frontal (CPF) e diversas regiões cerebrais (BADDELEY, 1986;

DESPOSITO, 2007), incluindo também o hipocampo (YOON et al., 2008). Em termos experimentais, o modelo de labirinto em Y é baseado na tendência dos animais em explorar o novo e nesse teste influências como componente emocional ou motivação são minimizadas. As alterações espontâneas no Labirinto em Y são consideradas ainda a reflexão de uma forma primitiva de memória de trabalho espacial (MALM et al., 2006).

No nosso trabalho, os ratos jovens epiléticos apresentaram um déficit de memória de trabalho no teste do *Y-maze* quando comparado ao grupo controle. Verificamos que o MFD nas 2,5; 5 e 10 mg/kg dos animais epiléticos reduziram o percentual de sequências corretas em relação ao grupo controle não epilético, o que representa déficit na memória de trabalho espacial (memória de curto prazo) nos animais epiléticos, onde o MFD não foi capaz de reverter esse déficit causado pela pilocarpina.

O teste de reconhecimento de objetos (memória de longa duração) é baseado na tendência natural dos animais buscarem o novo, não havendo necessidade de estímulo aversivo ou privação de comida e água. A tarefa é útil para avaliar em regiões específicas do cérebro as alterações neuroquímicas produzidas após lesões (BEVINS; BESHEER, 2006). A formação hipocampal é a principal região envolvida na memória de reconhecimento de objetos, particularmente o córtex perirrinal (WINSHWE; FUJIMAKI; 2011). A integridade do hipocampo é essencial para o reconhecimento de objetos. Assim como a ação do córtex perirrinal especificamente contribui na codificação, consolidação e recuperação da memória relacionada a objetos (WINTERS et al., 2008).

No nossos achados, verificamos que os animais jovens avaliados pelo teste de reconhecimento de objetos têm afetada a sua capacidade de reconhecer o objeto novo, visto pela diminuição no índice de reconhecimento do grupo epilético em comparação ao grupo controle não epilético. Já nos animais epiléticos tratados com MFD nas doses de 2,5; 5 e 10 mg/Kg houve um aumento no índice de reconhecimento quando comparado ao grupo controle epilético, o que significa que o MFD foi capaz de reverter o déficit do reconhecimento de novos objetos causado pela pilocarpina nesse animais.

Segundo De Oliveira et al., 2008, os animais submetidos ao SE apresentaram déficit significativo na memória de longa duração na tarefa de reconhecimento de objetos, indicando que convulsões prolongadas em períodos

iniciais do desenvolvimento podem causar prejuízos cognitivos a longo prazo. Segundo Córdova (2011), a neurodegeneração observada no grupo dos animais epiléticos pode estar relacionada com o déficit cognitivo observado nos animais submetidos ao SE, considerando que estudos demonstram que a integridade do córtex perirrinial é crítica para a memória de reconhecimento em ratos.

Em desacordo com os nossos achados, onde os animais não epiléticos tratados com MFD não alteraram o índice de reconhecimento de objetos e que acabaram protegendo do déficit de reconhecimento nos animais epiléticos, Schmitz et al., (2016), em seus resultados, observou que os ratos tratados cronicamente com MFD apresentaram menos interesse em explorar novos ambientes e objetos. Além disso, não descartaram a possibilidade de que MFD afetou a motivação, atenção e função sensório-motora uma vez que o tempo total de exploração foi afetado pelo tratamento com MFD.

É importante ressaltar que, em geral, nosso estudo avaliou um conjunto de fatores importantes (comportamentos, idade e tratamento MFD) para ansiedade, depressão, atividade locomotora e memória em ratos jovens e gostaríamos de reforçar a ideia de que a idade do rato, bem como a hora do dia que os experimentos são realizados, podem alterar os resultados dos testes comportamentais.

Fez-se necessário continuar as investigações através dos estudos neuroquímicos para investigar a relação do MFD com o estresse oxidativo e a atividade antioxidante bem como o envolvimento na neuroinflamação através do tratamento com o MFD em pacientes epiléticos.

6.2 PROTOCOLO 2: Avaliação do Estresse Oxidativo, Dosagem de TNF- α e Análise da expressão de COX-2 e iNOS

As convulsões recorrentes, características da epilepsia, podem levar a danos e perdas neuronais devido, principalmente, à alta produção de espécies reativas durante as crises, o que predispõe os pacientes a uma maior incidência de doenças associadas ao estresse oxidativo (WU et al., 2009; DILLIOGLUGIL et al., 2010).

A pilocarpina, em altas doses, pode produzir lesões neuronais em diversas áreas e, especialmente, nas estruturas límbicas, causando perda neuronal no hipocampo, amígdala, córtex entorrinal e piriforme, indicando o envolvimento de

diferentes áreas no estabelecimento do processo epiléptico (LEITE et al., 1990; TURSKI et al., 1983; CAVALHEIRO, 1995; FERNANDES, 2013).

Estudos realizados sugerem o hipocampo como sítio de origem da atividade convulsiva induzida por pilocarpina (TURSKI et al., 1983a,b). O corpo estriado, além de ser uma das áreas mais acometidas, pode estar relacionado de forma importante aos mecanismos de propagação e manutenção (epileptogênese) da convulsão (MARINHO et al., 1998).

A formação de radicais livres é comum em modelos de convulsão induzida por pilocarpina (NEJM et al., 2015). No nosso estudo, investigando o estresse oxidativo nas áreas cerebrais (hipocampo, corpo estriado e córtex pré-frontal) dos animais, foi observado que a indução de epilepsia aumentou a peroxidação lipídica e as concentrações de nitrito/nitrato nas três áreas cerebrais, uma vez que observamos um aumento na produção de MDA e nitrito/nitrato desses animais, respectivamente. Já está bem documentado que o estresse oxidativo verdadeiramente aumenta durante as convulsões induzidas por pilocarpina, sinalizando que o dano cerebral induzido pelo processo oxidativo desempenha um papel crucial na fisiopatologia das convulsões (NEJM et al., 2015). Além disso, crises induzidas por pilocarpina levam a mudanças no metabolismo de óxido nítrico e aumento na produção de seus metabólitos (nitrito e nitrato) (GOMES et al., 2011).

Há estudos que mostram que o MFD provoca várias alterações no SNC, incluindo o estresse oxidativo (GOMES et al., 2009; SCHERER et al., 2009). Avaliando o tratamento com MFD, em animais jovens, pode-se observar que houve um aumento nos níveis de MDA quando comparado ao grupo controle não epiléptico, ressaltando que esse aumento depende da dose e da área cerebral estudada. Martins e colaboradores (2006) identificaram lesão oxidativa com administração do metilfenidato, aguda ou cronicamente, em ratos jovens (até o 60^o dia pós-natal), e não quando administrado a ratos adultos, no entanto, os ratos jovens são mais sensíveis do que os adultos, visto que nesse período o cérebro ainda encontra-se em maturação (FAGUNDES, 2006; MARTINS et al., 2006).

Estudos demonstraram que no cerebelo, corpo estriado, hipocampo e córtex pré-frontal, de ratos tratados cronicamente com MFD (2,0 mg /kg) a partir do 25^o dia de idade, os níveis de TBARS foram aumentados (MARTINS et al., 2006). Nossos resultados mostram que o MFD induziu a peroxidação lipídica em córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado. Corroborando com nossos achados, vários trabalhos

demonstram que o tratamento crônico com várias doses de MFD induz a peroxidação de lípidios, promovendo o aumento dos níveis de MDA no hipocampo (FAGUNDES et al., 2007; GOMES et al., 2008; SCHMITZ et al., 2012).

Observamos, ainda, um aumento do estresse oxidativo demonstrado através da elevação de nitrito/ nitrato nos animais epiléticos tratados com MFD em relação ao grupo controle não epilético, bem como um aumento em relação ao controle epilético, visto que o MFD não conseguiu reverter o estresse oxidativo causado pela pilocarpina e acabou intensificando esse estresse observado pelo aumento dos níveis de nitrito/ nitrato nesses grupos.

Alterações nas concentrações de nitrito e nitrato têm sido implicadas em muitos dos mecanismos envolvidos durante o processo convulsivo. Dessa forma, podem modular uma cascata de efeitos excitotóxicos no SNC e finalmente participar do subsequente dano neuronal e ativar outros mecanismos que potencializam os danos e a propagação do foco epilético (GASPAR; CASES; MAROTEAUX, 2003). Em nossos achados, o tratamento com MFD aumentou o conteúdo de nitrito/nitrato no HC, CE e CPF demonstrando um efeito neurotóxico dessa substância.

Além de investigar os efeitos sobre os radicais livres produzidos durante as crises epiléticas, neste estudo foi identificado o efeito do MFD sobre a atividade da glutathiona reduzida (GSH) e da catalase (CAT). Além de defesas antioxidantes enzimáticas, a exemplo da catalase, após as crises epiléticas, existem outros mecanismos responsáveis pela defesa antioxidante endógena, como, por exemplo, a glutathiona (GSH), que é a principal responsável pela defesa antioxidante intracelular não enzimática no corpo (GOMES et al., 2011). O papel protetor da GSH contra o estresse oxidativo é bem evidente na literatura. A GSH pode também manter a integridade da membrana e promover a desintoxicação não-enzimática de radicais hidroxila (GONÇALVES et al., 2010; UYS; MULHOLLAND; TOWNSEND; 2014).

Em nossos resultados da concentração de GSH, foi observado uma diminuição desse parâmetro no HC, CE e CPF dos animais controle epiléticos em relação ao grupo controle não epilético. Baixos níveis de GSH também foram detectados em hipocampo de ratos submetidos às convulsões induzidas por P400 (LIN et al., 2010; DE FREITAS et al., 2010). Diminuição dos níveis de GSH no cérebro pode indicar um aumento do estresse oxidativo (JAVED et al., 2016).

Observamos que os animais tratados com MFD dos grupos não epiléticos e dos grupos epiléticos, apresentaram uma diminuição nos níveis de GSH em todas as áreas estudadas em relação ao grupo controle não epilético. Podemos comparar esses resultados com estudos anteriores que mostraram que o MFD e outros compostos semelhantes às anfetaminas influenciam a sua neurotoxicidade por conversão de glutatona na forma reduzida de proteção (GSH) para forma prejudicial oxidada (GSSG) (UYS; MULHOLLAND; TOWNSEND, 2014). Da mesma forma, em um outro estudo, utilizando doses mais altas do que as utilizadas no nosso estudo, mostrou que a administração crônica de MFD reduziu a formação de GSH, especialmente nas doses de 10 e 20 mg/Kg (MOTAGHINEJAD; MOTEVALIAN; SHABAB, 2015).

Comparando os grupos epiléticos tratados com MFD ao grupo controle epilético, pode-se observar que em algumas doses, especialmente a dose de 10 mg/Kg, no HC e CPF produziu um aumento na formação de GSH, demonstrando que o MFD conseguiu reverter a diminuição dessa enzima em relação à diminuição da pilocarpina.

Foi verificada uma diminuição na atividade da catalase no HC, CE e CPF dos animais controle epilético em relação ao controle não epilético. De acordo com Freitas e colaboradores (2005), 24 horas após o SE induzido por pilocarpina, a atividade da catalase encontrava-se reduzida no hipocampo, sugerindo que esta região do cérebro utiliza a CAT e/ou a GSH como maior sistema de limpeza contra EROs. Observou-se que a convulsão induzida por Pentilenotetrazol (PTZ) diminuiu a atividade da catalase no hipocampo, cerebelo e no córtex cerebral (RODRIGUES, 2012).

Verificamos uma diminuição da atividade da catalase nos animais não epiléticos e epiléticos tratados com MFD nas doses de 2,5; 5 e 10 mg/Kg no HC e CPF. Já no CE, a diminuição ocorreu nos animais dos grupos epiléticos tratados com MFD nas doses de 2,5 e 5 mg/Kg quando comparados ao grupo controle não epilético. Com a diminuição da atividade da catalase, pode-se observar que houve um aumento no dano oxidativo, observado também pelo aumento da peroxidação lipídica.

Diferente do nosso estudo por utilizar animais adultos e dose menor do que a nossa, o estudo realizado em animais adultos tratados durante 28 dias com MFD (2 mg/Kg; i.p) apresentou também aumento do TBARS e diminuição da atividade da

catalase no córtex pré-frontal, hipocampo, corpo estriado e córtex cerebral (COMIN et al., 2013). Em outro estudo, a atividade da catalase foi menos afetada após a administração aguda com MFD, mas apresentou uma diminuição da enzima no hipocampo após o tratamento crônico. No cerebelo, corpo estriado e córtex pré-frontal, a atividade da catalase não foi alterada após o tratamento com MFD em ratos jovens ou adultos (GOMES et al., 2008).

Para melhor compreender o papel da transmissão colinérgica em convulsões, a atividade AChE cerebral dos animais foi determinada. A ativação colinérgica é essencial para o início do processo convulsivo em modelos de ELT, visto que estas convulsões podem ser bloqueadas pelo pré-tratamento com o antagonista muscarínico atropina (MARINHO et al., 1998; DE BRUIN et al., 2000). A pilocarpina exacerba a atividade colinérgica, provavelmente por influência direta, aumentando a ação da ACh circulante, modificando o *binding* dos receptores muscarínicos (HRUSKA et al., 1984) e diminuindo a atividade acetilcolinesterásica (IMPERATO et al., 1998).

Nossos resultados mostraram um diminuição da atividade da AChE no grupo controle epiléptico em relação ao grupo controle não epiléptico no HC e CPF dos ratos jovens. A inibição da atividade da AChE, induzida pela administração de pilocarpina na dose de 400 mg/Kg (FREITAS et al., 2006; SALES et al., 2010). O aumento da atividade colinérgica no cérebro está provavelmente relacionado com a fase inicial do estado epiléptico (MCDONOUGH; SHIH, 1997; FERNANDES, 2013).

O tratamento com MFD, tanto nos animais não epilépticos como nos animais epilépticos, não foi capaz de reverter a inibição da atividade da AChE induzida por pilocarpina em HC e CPF, sendo capaz de permanecer diminuída em relação ao grupo controle não epiléptico. Já no corpo estriado não houve alteração significativa quanto a atividade da AChE.

Tzavara e colaboradores (2006) mostraram que a administração aguda de MFD (1 e 3 mg/Kg) aumentou a liberação hipocampal de ACh em ratos. Scherer et al. (2010), através de sua pesquisa, mostra que a atividade do MFD aumenta a atividade da AChE no córtex pré-frontal e é concebível que ocorra a diminuição nos níveis de acetilcolina, o que poderia ser associada com a perda de memória observada. Nossos resultados, que utilizam doses mais elevadas e tratamento crônico, mostraram que o MFD diminuiu a AChE no córtex pré-frontal e diminuiu a memória de trabalho observada. Correlacionando com os dados comportamentais,

há evidências que a ACh está envolvida nos efeitos comportamentais de drogas estimulantes, tais como anfetaminas, cocaína e MFD.

Dando continuidade ao nosso estudo, investigou-se o efeito do tratamento com o inibidor da recaptação de dopamina (DA), o metilfenidato, nos níveis extracelulares de monoaminas no corpo estriado de ratos jovens.

A pilocarpina altera os níveis do neurotransmissor colinérgico e pode produzir alterações em outros sistemas de neurotransmissores como a dopamina (DA), embora pouco se saiba sobre essas alterações (FREITAS, 2011a). Existe um consenso de que durante a fase aguda das crises epiléticas pode ocorrer um efeito quase que imediato entre a acetilcolina com outros sistemas de neurotransmissão (adrenérgico, dopaminérgico e serotoninérgico), uma vez que foram observados efeitos rápidos nas concentrações de noradrenalina, dopamina e serotonina (EL-ETRI et al., 1993; FREITAS et al., 2006).

Em nosso estudo, analisando o corpo estriado, foi observado que não houve alterações dos níveis de DA, mas houve um aumento do seu metabólito (DOPAC) no grupo dos animais epiléticos em comparação ao grupo controle não epilético. Ao contrário dos nossos achados quanto os níveis de DA, mas corroborando com os níveis do metabólito (DOPAC), o estudo de Cruz (2012), feito em camundongos, no grupo de animais tratados com pilocarpina na dose de 350 mg/kg, foram encontrados menores níveis estriatais de DA e aumento no nível do seu metabólito DOPAC, com relação ao grupo controle.

Nascimento e colaboradores (2005) observaram no corpo estriado de animais com 21 dias submetidos ao SE pela pilocarpina, uma redução do conteúdo da dopamina. Estas análises foram realizadas agudamente, ou seja, 60 minutos após a indução do SE. Os estudos neuroquímicos, ainda que escassos do modelo de ELT, apontam a existência de uma alteração neuroquímica dopaminérgica que contribuiu para as algumas alterações nos testes comportamentais observadas no nosso estudo.

No presente estudo, no tratamento somente com MFD foi encontrado um aumento dos níveis estriatais da DA, sem alterações nos de DOPAC em relação ao controle não epilético, indicando um possível aumento da metabolização dessa monoamina. Além disso, quando aplicada aos animais epiléticos, o MFD foi capaz de aumentar os níveis estriatais de DA e diminuir os de DOPAC em relação tanto aos animais controle não epilético como ao controle epilético.

A hiperatividade do sistema dopaminérgico, especialmente nas vias mesolímbica e mesocortical, aumenta de forma significativa a concentração de DA nas sinapses e corrobora com o efeito hiperlocomotor induzido pelo MFD (BARBOSA et al., 2011). Nosso estudo corrobora com o citado, visto que o MFD aumentou os níveis de DA no corpo estriado e aumentou a atividade locomotora em todas as doses estudadas no teste do campo aberto.

Sadasivan et al. (2012) mostraram um aumento significativo nos níveis de dopamina no corpo estriado dos animais tratados com MFD na dose de 1mg/kg, mas não observou alteração na dose de 10 mg/kg. Os resultados desse autor relata contrário ao nosso, pois a dose menor (2,5 mg/Kg) não apresentou e as maiores doses (5 e 10 mg/Kg) apresentaram o aumento significativo nesses níveis estriatais de DA.

É concebível que o aumento induzido por MFD nos níveis de DA seja devido a uma inibição do transportador de DA no estriado. Uma possibilidade alternativa é que o aumento de DA ative os neurônios de NA resultando num aumento dos níveis de NA extracelular (KODA et al., 2010). Genro et al. (2010) mostraram em uma revisão, evidências de modelos animais, farmacologia, neuroimagens e estudos genéticos que apóiam a idéia de que o TDAH é uma doença do sistema dopaminérgico.

Resumindo, o tratamento com MFD na dose clinicamente relevante (5 mg/Kg) produziu efeitos nas concentrações de DA. Esses resultados complementam e estendem nossos estudos comportamentais já citados anteriormente.

O aumento da susceptibilidade do cérebro para danos oxidativos e inflamatórios durante a epilepsia destaca a necessidade urgente de compreender o papel da mieloperoxidase e seu dano oxidativo induzido no início e na progressão da epilepsia. Recentes estudos de epilepsia refratária experimentais e em humanos demonstram presença significativa de MPO nas células cerebrais inatas como macrófagos / microglia e células inflamatórias infiltrantes que refletem a propriedade da MPO em provocar a epileptogênese (ZHANG et al., 2015).

Nesse contexto, este estudo, ao analisar a concentração de MPO, buscou verificar possíveis alterações inflamatórias associadas à indução de epilepsia pela administração de pilocarpina e o tratamento com metilfenidato durante 21 dias. De fato, encontrou-se significativa elevação na concentração de MPO após a indução de epilepsia, ou seja, houve um aumento na atividade desta enzima no HC, CE e

CPF dos animais epiléticos quando comparados ao controle não epilético. Zhang et al. (2016) realizaram estudos em humanos e modelos experimentais e mostraram que a MPO foi aumentada no cérebro de um paciente humano com epilepsia refratária e, em modelos de epilepsia em animais observaram que o número de leucócitos contendo MPO no cérebro aumentou acentuadamente durante a epileptogênese.

O aumento de MPO foi observado em todas as doses do MFD nos animais não epiléticos, assim como nos animais epiléticos tratados com MFD, no HC. No CE e no CPF, o aumento de MPO foi observado apenas na maior dose, 10 mg/kg do MFD, nos animais não epiléticos e em todas as doses do MFD nos animais epiléticos. Comparando os animais epiléticos tratados com MFD, pode-se observar que na dose de 10 mg/Kg, em todas as áreas, houve um aumento de MPO quando comparado ao grupo controle epilético, visto que o MFD intensificou significativamente o aumento causado pela pilocarpina.

Diversos estudos apontam o envolvimento de níveis elevados da atividade de MPO à alterações inflamatórias e de espécies reativas de oxigênio em doenças (VELLOSA et al., 2013). As alterações inflamatórias indicadas pelo aumento de MPO com o tratamento com MFD permaneceram em todas as áreas cerebrais, visto que o MFD é um potente indutor de MPO exercendo um possível efeito pró-oxidante e intensificador das doenças inflamatórias crônicas.

Há uma relação intrínseca entre epilepsia, estresse oxidativo, neuroinflamação, excitotoxicidade e morte neuronal (VRIES et al., 2016; SWIADER et al., 2016). Sabe-se que um excesso na produção de radicais livres e a liberação de citocinas pró-inflamatórias mediadas por células gliais, podem levar a convulsões prolongadas. Esse processo resultaria numa disfunção mitocondrial em tecidos cerebrais que procedem à morte neuronal e subsequente epileptogênese (DEVINSKY et al., 2013; CARMONA-APARICIO et al., 2015).

Tem sido relatado que a ocorrência de convulsões pode causar um aumento na expressão gênica de várias proteínas pró-inflamatórias, que contribui para o dano neurológico. Por isso, alguns autores têm sugerido que os níveis plasmáticos de citocinas estão associados com a frequência e a gravidade das crises. As citocinas IL-1 β , IL -6 e TNF- α tem recebido uma grande atenção a este respeito (ALAPIRTTI et al., 2009; NOWAK et al., 2011; GOUVEIA et al., 2015).

O TNF- α produz efeitos benéficos e deletérios na função cerebral e os efeitos são dependentes de inúmeros fatores que incluem: a concentração local da citocina no sítio de síntese, o tipo de célula alvo, quantidade de tempo que o tecido fica exposto a essas citocinas e qual subtipo de receptores que estão envolvidos (GOUVEIA, 2011).

No presente trabalho as alterações observadas nos animais que foram submetidos à indução da epilepsia são acompanhadas do aumento da concentração do TNF- α quando comparado ao grupo não epilético. Estudos anteriores demonstraram que o aumento dos níveis de TNF- α pode estar relacionado com a fisiopatologia da epilepsia visto que a indução de convulsões pode causar aumento dos níveis de TNF- α em diferentes áreas cerebrais associadas à neurodegeneração (VEZZANI et al., 2011; KIM et al., 2013). No estudo de Leal (2011), o grupo de animais submetidos ao SE mediante aplicação de pilocarpina, apresentou uma expressiva elevação dos títulos de TNF- α após 12 e 24 horas da indução do SE.

Os animais epiléticos tratados com MFD na dose de 5mg/Kg, dose clinicamente relevante, apresentaram o aumento dos níveis de TNF- α em todas as áreas cerebrais quanto a comparação do grupo controle não epilético. Esse efeito pode estar relacionado com o aumento do dano oxidativo e consequente aumento da indução do processo inflamatório desencadeado pelo SE.

Corroborando com os nossos achados, mas utilizando uma dose maior (dose recreacional), Motaghinejad; Motevalian; Shabab, (2016) verificaram que a administração crônica do MFD na dose de 10mg/Kg aumentou a peroxidação lipídica e os níveis de TNF- α em hipocampo e corpo estriado de ratos. Esse estudo sugeriu que o aumento de marcadores pró-inflamatórios está relacionado ao efeito neurodegenerativo do MFD. Outros estudos anteriores demonstraram que a metanfetamina e compostos semelhantes podem ativar as vias neuroinflamatórias e aumentar os níveis de TNF- α (YAMAMOTO; RAUDENSKY, 2008; WELLS et al., 2016).

A epilepsia promove um aumento na expressão de COX-2, iNOS e citocinas (TNF- α e IL-1 β), bem como induz a produção de ERO e PG's. Por isso resolvemos avaliar a expressão de iNOS e COX-2 no corpo estriado de ratos jovens submetidos a epilepsia por pilocarpina através da técnica de imunohistoquímica.

A COX-2 é conhecida por desempenhar um papel chave na resposta inflamatória precoce a um insulto e, consequentemente, um papel significativo na

inflamação pós-convulsão e hiperexcitabilidade do cérebro (ROJAS et al., 2015). Os níveis de COX-2 são aumentados no cérebro de pacientes com epilepsia, especialmente na ELT e em animais que sofrem convulsões prolongadas (DESJARDINS et al., 2003; SERRANO et al., 2011).

Nossos resultados confirmaram esses achados, onde foi demonstrado o aumento na expressão de COX-2 no corpo estriado dos animais jovens controle epilético em comparação ao grupo controle não epilético. Observou-se também um aumento significativo na imunomarcagem para COX-2, no corpo estriado dos animais epiléticos tratados com MFD na dose de 5mg/Kg. Apesar de resultados conflitantes usando uma variedade de inibidores seletivos de COX-2 em diferentes modelos de epilepsia, há ampla evidência para sugerir que a convulsão induzida por COX-2 desempenha um papel na neurodegeneração relacionada com a epilepsia (ROJAS et al., 2013).

Segundo Kita e colaboradores (2014), o MFD é uma substância química estruturalmente relacionada com as anfetaminas. A anfetamina induz a expressão da COX-2 coincidindo com a ativação microglial em corpo estriado de camundongos. Contudo, a compreensão do envolvimento preciso da COX-2 na neurotoxicidade induzida por anfetamina continua controversa. Nesse estudo, os camundongos eram resistentes à neurotoxicidade induzida por anfetamina, enquanto que os inibidores de COX-2 não protegem contra a neurotoxicidade. Estes achados sugerem que os efeitos protetores de alguns antiinflamatórios contra a toxicidade da anfetamina são baseados não apenas nos seus efeitos inibidores da COX mas também de outras propriedades.

Em circunstâncias patológicas, a produção de NO é mediada pela ativação da iNOS, que não está presente em cérebros saudáveis. Uma vez induzida, a iNOS produz níveis altos e sustentados de NO que leva a neurotoxicidade via produção de radicais livres (peroxinitrito) (LI et al., 2012).

Está claro a participação do NO na fisiopatologia da epilepsia pois estudos tem mostrado que os inibidores da NOS (principalmente iNOS) produzem neuroproteção em modelo animal de epilepsia, mas as isoformas da NOS responsáveis pela sua produção são diferentemente afetadas pelo SE (PELAGIO, 2006). Após as crises convulsivas ocorre ativação microglial e aumento das citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6, TNF- α e enzimas como COX e iNOS (EYO et al., 2016; DEY et al., 2016).

Dentro desse contexto, resolvemos avaliar a expressão de iNOS no corpo estriado de ratos jovens submetidos à epilepsia com pilocarpina. Observamos que os animais epiléticos apresentaram um aumento na imunomarcção para a iNOS em relação ao grupo dos animais não epiléticos. Os animais epiléticos que receberam o tratamento com MFD na dose de 5mg/Kg também aumentaram esta marcação para iNOS em relação tanto ao grupo controle não epilético como ao grupo controle epilético, demonstrando que o MFD intensificou a expressão na iNOS no corpo estriado.

Outros estudos em seres humanos são necessários para avaliar as implicações clínicas dos nossos achados. Dada as respostas inflamatórias em geral, e à elevada prevalência de epilepsia, dependendo do modelo experimental utilizado, mais estudos são necessários para determinar os tipos específicos de crises e, o interesse sobre o conhecimento da prescrição de um fármaco que aumenta a iNOS e a COX-2 quanto a medida terapêutica mais segura para o uso do mesmo em pacientes epiléticos.

6.3 PROTOCOLO 3: Ensaios *in vitro* de Viabilidade Celular

Com o objetivo de investigar mais intensamente o efeito do MFD no SNC, realizou-se testes de toxicidade *in vitro* em astrócitos. A escolha de estudar essa célula glial vem do fato da mesma participar de uma variedade de mecanismos moleculares (exocitose, transportadores de membrana ou difusão de canais) através de secreção de numerosos neurotransmissores, neurohormônios e fatores tróficos (MALARKEY; PARPURA, 2008; PARPURA; GRUBISIC; VERKHRATSKY, 2011) que regulam a formação e manutenção das transmissões sinápticas, sincronização das redes neuronais e de sinais para outras células (micróglia, oligodentrócitos, células endoteliais, entre outras) (RANSOM, 2012; VERKHRATSKI; BUTT, 2013).

As atribuições desempenhadas pelas células da glia são essenciais para a sobrevivência neuronal e, conseqüentemente, à vida do organismo. Sendo assim, o dado referente à ausência de atividade do MFD sobre os astrócitos, quando exposto isoladamente, pode ser bastante importante, uma vez que um composto capaz de influenciar negativamente na viabilidade dessas células poderia vir a comprometer indiretamente o funcionamento normal da rede neuronal.

Expor culturas de astrócitos à agentes conhecidos por afetar neurônios e registrar suas respostas celulares em um ambiente controlado é o primeiro passo em direção a uma melhor compreensão de como essas células gliais podem participar em processos neuropatológicos específicos (PAVONE; CARDILE, 2003).

Em nossa experimentação, foi evidenciada uma redução da viabilidade celular de astrócitos expostos a pilocarpina (PILO) nas doses de 10, 20, 40 e 80 nM, de modo dose dependente, isso nos faz supor que provavelmente os astrócitos corticais são sensíveis aos efeitos tóxicos da PILO. Foi evidenciado o aumento da viabilidade celular envolvendo o pré-tratamento com MFD nas concentrações de 6,25, 25 e 50 µg/mL e subsequente exposição a dose correspondente a IC 50 da PILO. Estudos têm enfatizado o papel dos astrócitos na neurotransmissão colinérgica (via receptores nicotínicos e muscarínicos) e na potencialização a longo prazo (NAVARRETE et al., 2012; SHEN; YAKEL, 2012).

Diante do resultado exposto acima, nós sugerimos que provavelmente os astrócitos são um dos tipos celulares envolvidos na neurotoxicidade evidenciada nos ensaios *in vivo*, relacionados aos efeitos quanto aos danos oxidativos observados através da indução à epilepsia.

Modelos experimentais forneceram evidências adicionais de participação astrocitária na epileptogênese (XU et al., 2011; DO NASCIMENTO et al., 2012; ESTRADA et al., 2012). No entanto, a perda de astrócitos após crises epiléticas graves também foi encontrada (BORGES et al., 2006; KIM et al., 2008; GUALTIERI et al., 2012), o que sugere que o mau funcionamento astrocitário poderia também induzir a perda neuronal secundária (NEDERGAARD; DIRNAGL, 2005).

Curiosamente, substâncias antiepiléticas utilizadas como tratamento para epilepsia foram capazes de diminuir a viabilidade celular de astrócitos corticais *in vitro*, quando os mesmos eram incubados com concentrações proporcionais as utilizadas para o tratamento da epilepsia. Não se sabe o impacto desse resultado no tratamento, porém, diante de novas descobertas sobre a importância dessa célula glial, novos fármacos que não apresentam efeito tóxico em astrócitos e que o possuem como possível alvo terapêutico podem, futuramente, desempenhar papel promissor para o tratamento dessa doença (CRUNELLI; CARMIGNOTO; STEINHAUSER, 2015).

É sabido que em alguns concentrações o MFD (6,25; 25 e 50 µg/ mL) foi capaz de exercer influência, mas ainda não se pode predizer se o efeito do MFD

sobre a viabilidade de astrócitos, em resposta ao dano propiciado pela pilocarpina, é uma característica que venha a contribuir de modo positivo sobre o evento convulsivo.

Futuras pesquisas sobre o impacto do MFD em outras linhagens celulares envolvidas no processo convulsivo, como o teste diretamente sobre os neurônios, aliado com os resultados pró-oxidantes e pró-inflamatórios revelados pelos testes *in vivo*, podem sugerir melhor os mecanismos envolvidos com esse medicamento que já está inserido no mercado e com bastante uso na clínica médica.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em resumo, esse trabalho avaliou os efeitos do metilfenidato, nos animais submetidos ao *status epilepticus*, através de experimentos comportamentais, avaliação de estresse oxidativo, dosagem de dopamina e seu metabólito (DOPAC), dosagem de TNF- α , COX-2 e iNOS. Além disso, verificou-se seu potencial em cultura de astrócitos corticais. Os achados foram:

Testes Comportamentais	MFD 2,5	MFD 5	MFD10
Campo aberto	(↑) ALE e (-) <i>rearing</i>	(↑) ALE e (-) <i>rearing</i>	(↑) ALE e (-) <i>rearing</i>
Labirinto em cruz elevado	(↑) NEBA; (-)TPBA; (-) PEBA; (-) PTBA	(↑) NEBA; (-)TPBA; (↑) PEBA;(↑) PTBA	(↑) NEBA; (-)TPBA; (↑) PEBA;(-) PTBA
Nado forçado	(↓) tempo de imobilidade	(↓) tempo de imobilidade	(↓) tempo de imobilidade
Labirinto em Y	(↓) alterações espontâneas	(↓) alterações espontâneas	(↓) alterações espontâneas
Reconhecimento de objetos	(-) índice de reconhecimento	(-) índice de reconhecimento	(-) índice de reconhecimento

Legenda: (↑): aumentou; (↓): diminuiu; (-): não alterou

Dosagem Neuroquímicas	MFD 2,5	MFD 5	MFD10
TBARS	(-) HC; (-) CE e (-) CPF	(↑) HC; (↑) CE e (↑) CPF	(↑) HC; (↑) CE e (↑) CPF
Nitrito/Nitrato	(↑) HC; (↑) CE e (-) CPF	(↑) HC; (↑) CE e (↑) CPF	(↑) HC; (↑) CE e (↑) CPF
GSH	(↓) HC; (↓) CE e (↓) CPF	(↓) HC; (↓) CE e (↓) CPF	(↓) HC; (↓) CE e (↓) CPF
Catalase	(↓) HC; (↓) CE e (↓) CPF	(↓) HC; (↓) CE e (↓) CPF	(↓) HC; (-) CE e (↓) CPF
AChE	(↓) HC; (-) CE e (↓) CPF	(↓) HC; (-) CE e (↓) CPF	(↓) HC; (-) CE e (↓) CPF

Legenda: (↑): aumentou; (↓): diminuiu; (-): não alterou, (HC): hipocampo, (CE): corpo estriado, (CPF): córtex pré-frontal

Dosagem de dopamina e DOPAC	MFD 2,5	MFD 5	MFD10
Dopamina	(↑) CE	(↑) CE	(↑) CE
DOPAC	(↓) CE	(-) CE	(↓) CE

Legenda: (↑): aumentou; (↓): diminuiu; (-): não alterou

Dosagem de MPO	MFD 2,5	MFD 5	MFD10
	(↑) HC; (↑) CE e (-) CPF	(↑) HC; (↑) CE e (↑) CPF	(↑) HC; (↑) CE e (↑) CPF

Legenda: (↑): aumentou; (↓): diminuiu; (-): não alterou

Dosagem de TNF- α ; COX-2 e iNOS	MFD 5
TNF- α	(↑) HC; (↑) CE e (↑) CPF
COX-2	(↑) CE
iNOS	(↑) CE

Legenda: (↑): aumentou

Teste <i>in vitro</i>	MFD
MTT	(↑) viabilidade celular

Legenda: (↑): aumentou

8 CONCLUSÃO

O metilfenidato demonstrou um potencial para a atividade ansiolítica e antidepressiva e apresentou uma ação pró-oxidante e pró-inflamatória visto através do modelo de epilepsia induzida por pilocarpina em ratos jovens. Portanto, deve-se investigar com maior profundidade para tentar minimizar os riscos sendo necessária uma maior advertência na bula desse medicamento enfatizando o risco do uso em pacientes com história de convulsão.

REFERÊNCIAS

- ABDUL- RIDHA, A. et al. Mechanistic insights into allosteric structurefunction relationships at the M1 muscarinic acetylcholine receptor. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n.48, p. 33701-11, 2014.
- AFONSO, S. Perturbação da hiperatividade e déficit de atenção. **Cadernos de otorrinolaringologia**, 2010.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. Prescrição e consumo de metilfenidato no Brasil: identificando riscos para o monitoramento e controle sanitário. **Boletim de Farmacoepidemiologia do SNGPC**, v. 2, n. 2, 2012.
- ALAPIRTTI, T. et al. Interleukin-6, interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1beta production in patients with focal epilepsy: a video-EEG study. **J. Neurol. Sci.**, v. 280, p. 94–97, 2009.
- ALDARMMA, J. et al. Anti-convulsant effect and mechanism of Astragalus mongholicus extract in vitro and in vivo: Protection against oxidative damage and mitochondrial dysfunction. **Neurochem Research**, v. 35, n.1, p. 33-41, 2010.
- ALLOWAY, T. P. et al. Investigating the relationship Between Attention And Working memory In Clinical And Community Samples. **Child Neuropsychology**, n. 16, p.242-254, 2010.
- ALSAADI, T. et al. Prevalence of depression and anxiety among patients with epilepsy attending the epilepsy clinic at Sheikh Khalifa Medical City, UAE: A cross-sectional study. **Epilepsy Behav**, v. 52, n. Pt A, p. 194-9, 2015.
- AL-TAJIR, G.; STARR, B.S.; STARR, M.S. – Proconvulsant Effect of SKF 38393 Mediated by Nigral D1 Receptors. **Eur J Pharmacol**, v. 162, p. 245-251, 1990a.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION (APA). **Diagnostic and statistical manual of mental disorders**. 5th ed. Arlington/VA. American Psychiatric Publishing, 2013.

ANDRADE, C.R.M. et al. Transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH). **Rev Med Minas Gerais**, v. 21, n.4, p.455-64, 2011.

ANDREOLLO, N.A. et al. Idade dos ratos versus idade humana: Qual é a relação? **ABCD Arq Bras Cir Dig**, v.25, n.1, p.49-51, 2012.

APRIOKU, J. S. Pharmacology of free radicals and impact of reactive oxygen species on the testis. **Journal Reprod infertile**, v.14, n.4, p.158-172, 2013.

ARMENTA, M. M. et al. Oxidative Stress Associated with Neuronal Apoptosis in Experimental Models of Epilepsy, **Revista**, p.1-12, 2014.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DO DEFICIT DE ATENÇÃO (ABDA). TDAH, 2015. Disponível em: <<http://www.tdah.org.br/sobre-tdah/tratamento.html>>. Acesso em 01/02/2016.

ASSOCIAÇÃO PSIQUIÁTRICA AMERICANA. **Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais - DSM-5**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

AURIEL, E. et al. Methylphenidate for treatment of Parkinson disease and other neurological disorder. **Clin Neuropharmacol**, v.32, p.75-81, 2009.

BADDELEY, A.D. **Working memory**. Clarendon, Oxford, 1986.

BANACH, M. et al. Polish Lipid Association – a strong response to the problem of lipid disorders in Poland, Central and Eastern Europe. **J Clin Lipidol**, 2011.

BARBOSA, F. J. et al. Magnesium sulfate and sodium valproate block methylphenidate induced hyperlocomotion, an animal model of mania. **Pharmacol Rep.**, v. 63, n. 1, p. 64-70, 2011.

BARBOSA, G.H.L. **Avaliação do repertório comportamental TDAH- LIKE de ratos injetados com pilocarpina que desenvolveram *status epilepticus***. 2012. 50f. Dissertação (Mestrado em distúrbios do desenvolvimento)- Universidade Presbiteriana Mackenzie, São Paulo, 2012.

BARBOSA, G.H.L; RIBEIRO, M.O.; CYSNEIROS, R.M. **Aumento da atividade locomotora e exploratória em ratos adolescentes machos submetidos ao *status epilepticus***. Cadernos de Pós-Graduação em Distúrbios do Desenvolvimento, São Paulo, v.13, n.2, p. 35-47, 2013.

BARONE, F.C. et al Tumor necrosis factor- α - a mediator of focal ischemic brain injury. **Stroke**, v. 28, p. 1233-1244, 1991.

BATASSINI, C. **Avaliação de parâmetros astrogliais em modelos *in vivo* e *in vitro* da doença de Parkinson**. Tese (Doutorado)- Programa de Pós- Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

BEDNER, P.; STEINHÄUSER, C. Altered Kir and gap junction channels in temporal lobe epilepsy. **Neurochem. int.**, v.S0197-0186, n.13, 000144, 2013.

BENTZ, M. et al. Inhibition of inducible nitric oxide synthase prevents lipid peroxidation in osteoarthritic chondrocytes. **Journal of cellular biochemistry**, v. 113, n.7, p.2256-2267, 2012.

BERG A.T. et al. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: Report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005–2009. **Epilepsia**, v. 51, n.4, p. 676-685, 2010.

BERG, A. T.; SCHEFFER, I. E. New concepts in classification of the epilepsies: entering the 21st century. **Epilepsia**, v. 52, n. 6, p. 1058-62, 2011.

BERG, A.T.; CAPLAN, R.; HESDORFFER, D.C. Psychiatric and neurodevelopmental disorders in childhood-onset epilepsy. **Epilepsy Behav**, v. 20, p. 550–555, 2011.

BERMAN, S.M. et al. Potential adverse effects of amphetamine treatment on brain and behavior: a review. **Molecular Psychiatry**, v.14, p.123-142, 2009.

BERRIDGE, K.C.; ROBINSON, T.E. GAT is the role of dopamine in reward: Hedonic impact, reward learning, or incentive salience? **Brain Res Rev.**, v.28, p. 309-69, 1998.

BETHANCOURT, J.A. et al. Exposure to oral methylphenidate from adolescence through young adulthood produces transient effects on hippocampal-sensitive memory in rats. **Behav Brain Res.**, v. 202, p.50-57, 2009.

BEVINS, R.A.; BESHEER, J. Object recognition in rats and mice: a one-trial non matching to sample learning task to study 'recognition memory'. **Nat Protoc.**, v. 1, p.1306-11, 2006.

BIALER, M.; WHITE, H.S. Key factors in the discovery and development of new antiepileptic drugs. **Nature ver. Drug discov.**, v.9, n.1, p.68-82, 2010.

BLAIR, R. et al. Impact evaluation findings after one year of the productive and business services activity of the productive development project. El Salvador. Princeton, USA: **Mathematica Policy Research**. 2012.

BOLANOS, C.A. et al. Methylphenidate treatment during pre-and periadolescence alters behavioral responses to emotional stimuli at adulthood. **Biol Psychiatry**, v.54, p.1317-1329, 2003.

BOLFER, C. et al. Reaction time assessment in children with ADHD. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 68, n. 2, p. 282-86, 2010.

BORDEY, A.; SONTHEIMER, H. Properties of human glial cells associated with epileptic seizure foci. **Epilepsy res.**, v.32, n.1-2, p.286-303, 1998.

BORGES, K. et al. Degeneration and proliferation of astrocytes in the mouse dentate gyrus after pilocarpine-induced status epilepticus. **Exp Neurol**, v.201, p. 416-427, 2006.

BOROWICZ, K.K. et al. Influence of 7-nitroindazole on the anticonvulsive action of conventional antiepileptic drugs. **European journal of Pharmacology**, v.331, p.127-132, 1997.

BRADFORD, M.M. Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRANCO, C.S. et al. Anticonvulsant, neuroprotective and behavioral effects of organic and conventional yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) on pentylenetetrazol- induced seizure in Wistar rats. **Brain Research Bulletin**, v. 92, p. 60-68, 2013.

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

BRATS. Boletim Brasileiro de Avaliação de Tecnologias em Saúde Ano VIII no 231 março de 2014 Disponível em:
<<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/f9021b8047aad12aa094af917d786298brats23.pdf?MOD=AJPERES> Acesso em: 01/02/2017.

BRIGGS, S.W.; GALANOPOULOU, A.S. Altered GABA signaling in early life epilepsies. **Neural Plasticity**, v. 2011, p. 16, 2011.

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

BRITTON, R.A. et al. Maturation of the 5' end of *Bacillus subtilis* 16S rRNA by the essential ribonuclease YkqC/RNase J1. **Molecular Microbiology**, v. 63, p. 127-38, 2007.

BROWN, R. T.; PERRIN, J. Temple University Health Sciences Centre, Philadelphia. Measuring Outcomes in Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder; **Journal of Paediatric Psychology**, v. 32, n.6, p. 627- 630, 2007.

BRUNEAU, E.G.; AKAABOUNE, M. Running to stand still: ionotropic receptor dynamics at central and peripheral synapses. **Mol Neurobiol.** v. 34, p.137-51, 2006.

BUBSER, M. et al. Muscarinic receptor pharmacology and circuitry for the modulation of cognition. In: Fryer A.D., Christopoulos A., Nathanson N.M, editors. Handbook of Experimental Pharmacology, Berlin: **Springer Berlin Heidelberg**, p.121-166, 2012.

BURTON, C.L.; NOBREGA, J.N.; FLETCHER, P.J. The effects of adolescent methylphenidate self-administration on responding for a conditioned reward, amphetamine-induced locomotor activity, and neuronal activation. **Psychopharmacology**, v.208, p. 455–468, 2010.

CALVANO, L. A. et al. Epidemiologia das Epilepsias na População da Cidade de Maceió-Alagoas. **Neurobiologia**, v. 73, n. 1, 2010.

CAMPELO, L.M. et al. Avaliação do potencial neuroprotetor do óleo essencial de Citrus limon em hipocampo e corpo estriado de camundongos após convulsões induzidas pela pilocarpina. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v.10, n.2, p.116-126, 2011.

CARLEZON, J.R. et al. Enduring behavioral effects of early exposure to methylphenidate in rats. **Biol. Psychiatry**, v.54, p.1330-37, 2003.

CARMONA-APARICIO, L. et al. Overview of Nrf2 as Therapeutic Target in Epilepsy. **Int. J. Mol. Sci.**, v.16, p. 18348-67, 2015.

CARVALHO, M.A.J. **Efeito do sildenafil em modelo de colinérgico de convulsão em camundongos e de estresse in vitro: acordagem comportamental e neuroquímica**.101f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.

CAVALHEIRO, E. A. et al. Spontaneous recurrent seizures in rats: amino acid and monoamine determination in the hippocampus. **Epilepsia**, p.1-11, 1994.

CAVALHEIRO, E. A. The pilocarpine model of epilepsy. **Ital J Neurol Sci**, v.16, n.1-2, p.33- 7, 1995.

CAVALHEIRO, E.A. et al. Long-term effects of pilocarpine in rats: structural damage of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures. **Epilepsia**, v. 32, p. 778-82, 1991.

CERELLA, C. et al. Targeting COX-2 expression by natural compounds: a promising alternative strategy to synthetic COX-2 inhibitors for cancer chemoprevention and therapy. **Biochemical pharmacology**, v.80, n.12, p.1801-15, 2010.

CHAUDHARY, U.J.; DUNCAN, J.S.; LEMIEUX, L. A dialogue with historical concepts of epilepsy from the babylonians to hughlings Jackson: persistent beliefs. **Epilepsy & Behavior**, v.21, p.109-114, 2011.

CHINDO, B.A. et al. Central nervous system activity of the methanol extract of *Ficus platyphylla* stem bark. **J. Ethnopharmacol.**, v.85, p.131-137, 2003.

CHOLERIS, E. et al. A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.25, p.235-60, 2001.

CLASADONT, J.; HAYDON, P.G. Astrocytes and epilepsy. **Epilepsia**, v.51, n.5, p.53, 2010.

CLINCKERS, R. et al. Pharmacological and neurochemical characterization of the involvement of hippocampal adrenoceptor subtypes in the modulation of acute limbic seizures. **J. Neurochem.**, v. 115, p. 1595–1607, 2010.

COHEN, R. et al. Prevalence of Epilepsy and Attention-Deficit Hyperactivity (ADHD) Disorder: A Population- Based Study. **J Child Neurol.**, 2012.

COMIM, C.M. et al. Methylphenidate treatment causes oxidative stress and alters energetic metabolism in an animal model of attention-deficit hyperactivity disorder. **Scandinavian College of Neuropsychopharmacology**, v. 26, p. 96-103, 2013.

CONCERTA®. Bula. Janssen. Disponível em: http://www.janssen.com/brasil/sites/www_janssen_com_brazil/files/product/pdf/concerta_ub02_vps_0.pdf>. Acesso em 01/02/2016.

COELHO, D.S. **Avaliação pré-clínica da duloxetina em modelo de convulsão: análise comportamental, eletroencefalográfica e influência no estresse**

oxidativo. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular, Universidade Federal do Pará, Belém, 2014.

CÓRDOVA, S.D. **Efeito do treinamento físico aeróbico sobre parâmetros comportamentais em ratos jovens submetidos ao modelo experimental de *status epilepticus*.** Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Ciências biológicas: Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

COSTA-LOTUFO, L.V. et al. Attenuating Effects of Melatonin on Pilocarpine-induced Seizures in Rats. **Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol**, v. 131, p. 521-9, 2002.

COVOLAN, L., MELLO, L.E. Temporal profile of neuronal injury following pilocarpine or kainic acid-induced status epilepticus. **Epilepsy Res.**, v.39, p.133-52, 2000.

CRUNELLI, V.; CARMIGNOTO, G.; STEINHAUSER, C. Novel astrocyte targets: new avenues for the therapeutic treatment of epilepsy. **Neuroscientist.**, v. 21, p.62-83, 2015.

CRYAN, J.F. et al. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 23, p. 238-245, 2002.

DALMAGRO, C. L. et al. Psychiatric comorbidity in refractory focal epilepsy: a study of 490 patients. **Epilepsy Behav.**, v. 25, n. 4, p. 593-7, 2012.

DAVIS, S.M. et al. Epilepsy in children with attention deficit hyperactivity disorder. **Pediatr Neurol**, v.42, n.325, p.30, 2010.

DE BRUIN, V.M.S. et al. Behavioural and neurochemical alterations after lithium-pilocarpine administration in Young and adult rats: a comparative study. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.65, p.547-551, 2000.

DE FREITAS, R.M. Lipoic acid alters delta-aminolevulinic dehydratase, glutathione peroxidase and Na⁺, K⁺-ATPase activities and glutathione-reduced levels in rat hippocampus after pilocarpine-induced seizures. **Cell. Mol. Neurobiol.**, v.30, p.381-387, 2010.

DE OLIVEIRA, D.L. et al. Effects of early-life LiCl- pilocarpine-induced status epilepticus on memory and anxiety in adult rats are associated with mossy fiber sprouting and elevated CSF S100B protein. **Epilepsia**, v. 49, p.842-52, 2008.

DE-MELLO, N., SOUZA-JUNIOR, I.Q., CAROBREZ, A.P. Pilocarpine prevents age related spatial learning impairments in rats. **Behav Brain Res.**, v. 158, p.263-8, 2005.

DESJARDINS, P. et al. Induction of astrocytic cyclooxygenase-2 in epileptic patients with hippocampal sclerosis. **Neurochem Int.**, v.42, p.299-303, 2003.

DEVINSKY, O. et al. Glia and epilepsy: excitability and inflammation. **Trends neurosci.**, v. 12, S0166-2236, 2013.

DEY, A. et al. Anti-Inflammatory Small Molecules To Treat Seizures and Epilepsy: From Bench to Bedside. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 37, n. 6, 2016.

DO NASCIMENTO, A.L. et al. Neuronal degeneration and gliosis time- course in the mouse hippocampal formation after pilocarpine-induced status epilepticus. **Brain Res**, v. 1470, p. 98–110, 2012.

DUARTE, F.S. et al. Short- and long-term anxiogenic effects induced by a single injection of subconvulsant doses of pilocarpine in rats: investigation of the putative role of hippocampal pathways. **Psychopharmacology**, v. 212, p. 653-61, 2010.

EGLIN, R.M. Muscarinic receptor subtypes in neuronal and non-neuronal cholinergic function. **Autonomic and Autacoid Pharmacology**, v.26, p. 219-233, 2006.

EISENSTEIN, M. Unrestrained excitement. **Nature**, v. 511, p.4-6, 2014.

EL-ETRI, M.M. Pilocarpine- induced convulsions in rats: evidence for muscarinic receptor-mediated activation of locus coeruleus and norepinephrine release in cholinolytic seizure development. **Exper Neurol.**, v. 121, p.24-39,1993.

ELLMAN, G. L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem. Pharmacol.**, v.7, 88-95, 1961.

ENGEL, J. Surgery for seizures. **N Engl J Med**, v.334, p.647-653, 1996.

ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. A New One-Trial Test for Neurobiological Studies of Memory in Rats.1: Behavioral Data. **Behavioural Brain Research**, v. 37, p. 47-59, 1988.

ERAKOVIC, V. et al. Lithium plus Pilocarpine Induced Status Epilepticus – Biochemical Changes. **Neurosc Res**, v. 36, p.157-66, 2000.

ESTRADA, F.S. et al. Glial activation in a pilocarpine rat model for epileptogenesis: a morphometric and quantitative analysis. **Neurosci Lett**, v. 514, p.51–56, 2012.

EYO, U.B. et al. Microglia-Neuron Communication in Epilepsy. **Glia**, v.18, 2016.

FABENE, P.F. et al. A role for leukocyte-endothelial adhesion mechanism in epilepsy. **Nat. Med.**, 14, p.1377-1383, 2008.

FAGUNDES, A. O. N. **Efeito da administração de metilfenidato sobre a Cadeia respiratória mitocondrial em cérebro de ratos jovens.** Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma(SC), 2006.

FAGUNDES, A.O. Chronic administration of methylphenidate activates mitochondrial respiratory chain in brain of young rats. **Int. J. Dev. Neurosci**, v.25, p.47-51, 2007.

FARRANT, K.; UDDIN, L. Q. Asymmetric development of dorsal and ventral attention networks in the human brain. **Developmental cognitive neuroscience**, v.12, p.165-174, 2015.

FARIAS, K.S. **Interferindo com oscilações de alta frequência no hipocampo epiléptico: consequências para as crises espontâneas.** Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Programa de Pós-Graduação em Neurociências, 2012.

FASTENAU, P.S. et al. Neuropsychological status at seizure onset in children. **Neurology**, v.73, p.526-34, 2009.

FASTENAU,P.S. et al. Academic underachievement among children with epilepsy. Proportion exceeding psychometric criteria for learning disability and associated risk factors. **J Learn Disabil**, v,41, p.195-207, 2008.

FERNANDES, M.J.S.Temporal lobe epilepsy: mechanisms and prospects. **Estud Av.**, v.27, n.77, p. 85-6, 2013.

FISHER, R. S. et al. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). **Epilepsia**, v. 46, n. 4, p. 470-2, 2005.

FISHER, R.S. et al. ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. **Epilepsia**, v. 55, n. 4, p. 475-82, 2014.

FRATI, P. et al. Smart drugs and Synthetic Androgens for Cognitive and Physical Enhancement: Revolving Doors of Cosmetic Neurology. **Current Neuropharmacology**, v. 13, p. 5-11, 2015.

FREITAS, R.M et al. Alterações agudas dos níveis de neurotransmissores em corpo estriado de ratos jovens após estado epiléptico induzido por pilocarpina. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 61, n. 2B, p. 430-433, 2003.

FREITAS, R.M. et al. Acetylcholinesterase activities in hippocampus, frontal cortex and striatum of Wistar rats after pilocarpine- induced status epilepticus. **Neurosci. Lett.**, v.399, p. 76-79, 2006.

FREITAS, R.M. Sistemas de Neurotransmissão Envolvidos no Modelo de Epilepsia: Uma revisão de Literatura. **Rev Neurocienc.**, v. 19, p.128-38, 2011a.

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

FREITAS, R.M.; VIANA, G.S.B.; FONTELES, M.M.F. Striatal monoamines levels during status epilepticus. **Ver. Psiq. Clin.**, v. 30, n. 3, p.76-79, 2003.

FRITSCHY, J.M. et al. GABAergic Neurons and GABA_A-receptors in Temporal Lobe Epilepsy. **Neurochem Int**, v.34, p. 435-45, 1999.

FUJIKAWA, D.G. Neuroprotective Effect of Ketamine Administered After Status Epilepticus Onset. **Epilepsia**, v. 36, p. 186-95, 1995.

FUJIKAWA, D.G.; DANIELS, A.H.; KIM, J.S. – The Competitive NMDA Receptor Antagonist CGP 40116 Protects Against Status Epilepticus- Induced Neuronal Damage. **Epilepsy Res** , v.17, p. 207-19, 1994.

FUKUMURA, D.; KASHIWAGI, S.; JAIN, R.K. The role of nitric oxide in tumour progression. **Neture Reviews Cancer**, London, v. 6, n.7, p.521-534, 2006.

FURUKAWA, M. F. et al. Despite substantial progress In: EHR adoption, health information exchange and patient engagement remain low in office settings. **Health Aff**, v. 33, n. 9, p. 1672-9, 2014.

GAHR, M. et al. Abuse of Methylphenidate in Germany: Data from spontaneous reports of adverse drug reactions. **Psychiatry Research**,v. 215, p. 252-254, 2014.

GASPAR, P.; CASES, O.; MAROTEAUX, L. The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics. **Nat Rev Neurosci.**, v.4, p.1002-12, 2003.

GATHERCOLE, S. E.; ALLOWAY, T. P. Working memory and classroom learning. **Dyslexia Review**, v. 15, p. 4-9, 2004.

GATLEY, S.J. et al. Affinities of methylphenidate derivatives for dopamine, norepinephrine and serotonin transporters. **Life Sci**, v.58, p.231-239, 1996.

GENRO, J. P. et al. The brazilian contribution to attention-deficit/hyperactivity disorder molecular genetics in children and adolescents. **Genetics and Molecular Biology**, v. 35, p. 4, p. 932-938, 2012.

GENRO, J.P. et al. Attention-deficit/hyperactivity disorder and the dopaminergic hypotheses. **Expert Rev Neurother**, v.10, n. 4, p. 587-601, 2010.

GIORGI, F. S. et al. The role of norepinephrine in epilepsy: from the bench to the bedside. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 28, p. 507–524, 2004.

GOEL, R.; GOEL, A.; KUMAR, Y. Influence of carvedilol on anticonvulsant effect of gabapentin. **Acte Neurol Belg.**, v. 111, n.4, p. 296-305, 2011.

GOMES, B. et al. Anxiolytic-like effect of the monoterpene 1,4-cineole in mice. **Pharmacol Biochem Behav.**, 2010.

GOMES, F.C.A.; TORTELLI, V.P.; DINIZ, L. Glia: dos velhos conceitos às novas funções de hoje e as que ainda virão. **Estudos Avançados**, v.27, p. 77, 2013.

GOMES, K.M. et al. Antioxidant enzyme activities following acute or chronic methylphenidate treatment in young rats. **Neurochem. Res.**, v.33, p.1024-1027, 2008.

GOMES, K.M. et al. Superoxide production after acute and chronic treatment with methylphenidate in young and adult rats. **Neurosci Lett**, v.465, p.95–98, 2009.

GOMES, T.K.C. et al. O Papel da Dieta Cetogênica no Estresse Oxidativo Presente na Epilepsia Experimental. **J Epilepsy Clin Neurophysiol.**, v. 17, n.2, p. 54-64, 2011.

GONÇALVES, J. et al. Methamphetamine induced neuroinflammation and neuronal dysfunction in the mice hippocampus: preventine effect of indomethacin, **Eur. J. Neurosci**, v.31, p.315-326, 2010.

GONZALEZ-HEYDRICH, J. et al. Adaptive phase-I study of OROS-methyl-phenidate treatment of ADHD with epilepsy. **Epilepsy Behav**, v. 18, p.229-37, 2010.

GONZALEZ-HEYDRICH, J. et al. Comparisons of response to stimulant preparations in pediatric epilepsy. Meeting of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry. **Washington DC**, 2004.

GOUVEIA, T. L. et al. Lovastatin decreases the synthesis of inflammatory mediators during epileptogenesis in the hippocampus of rats submitted to pilocarpine-induced epilepsy. **Epilepsy Behav.**, v. 51, p. 300-305, 2015.

GOUVEIA, T.L.F. **Estudo da ação da Lovastatina no desenvolvimento do modelo experimental de epilepsia induzido pela pilocarpina em ratos**. 2011. 127f. Tese (Doutorado). Departamento de Neurologia e Neurocirurgia, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo (SP), 2011.

GRAEBENITZ, S. et al. Interictal-like network activity and receptor expression in the epileptic human lateral amygdala. **Brain**, v. 134, n. 10, p. 2929-47, 2011.

GRAVITZ, L. Shedding the shame. **Nature**, v.511, p. 10-11, 2014.

GREEN, L.C.; TANNENBAUM, S.R.; GOLDMAN, P. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. **Science**, v. 212, p. 56- 58, 1981.

GUALTIERI, F. et al. Increased perivascular laminin predicts damage to astrocytes in CA3 and piriform cortex following chemoconvulsive treatments. **Neuroscience**, v. 218, p. 278–294, 2012.

GUARDIOLA, A. **Transtorno de atenção: aspectos neurobiológicos**. In N.T. Rotta, L. Ohlweiler, & R.S. Riesgo (Orgs.). *Transtornos da aprendizagem: abordagem neurobiológica e multidisciplinar* [recurso eletrônico]. 2 ed. Artmed: Porto Alegre – RS., 2015.

GUARNIERE, L. O. **Estudo farmacológico, fisiológico e comportamental de ratos tratados com dose subconvulsivante de pilocarpina**. 2013. 101f. Dissertação (mestrado) - Programa de Pós- Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

GUILHOTO, L.M.F.F. Revisão Terminológica e Conceitual para Organização de Crises e Epilepsias: Relato da Comissão da ILAE de classificação e Terminologia, 2005-2009. Novos Paradigmas. **J Epilepsy Clin Neurophysiol.** v.17, n.3, p.100-105, 2011.

GUIMARÃES, C. A. **Epilepsia de lobo temporal na infância : avaliação neuropsicológica.** Tese (Doutorado). Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas, Campinas, SP, 2006.

GÜNTHER, T. et al. Attentional functions in children and adolescents with ADHD, depressive disorders, and the comorbid condition. **Journal of Child Psychology and Psychiatry**, v. 52, n.3, p. 324-331, 2011.

GUZMAN, F. (2016) **Methylphenidate for ADHD: Mechanism of Action: and Formulations** [Em linha]. Disponível em <http://psychopharmacologyinstitute.com/stimulants/methylphenidate-adhd-mechanism-of-action-and-formulations/#Download_this_PDF>. [Consultado em 20-10- 2016].

HALASSA, M.M.; FELLIN, T.; HAYDON, P.G. The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease. **Trends in molecular medicine**, v.13, n.2, p.54-63, 2007.

HALASSA, M.M.; HAYDON, P.G. Integrated brain circuits: astrocytic networks modulate neuronal activity and behavior. **Annu. Rev. Physiol.**, v.72, p. 335–355, 2010.

HALL, E.D.; WANG, J.A.; MILLER, D.M. Relation ship of nitric oxide synthase induction to peroxynitrite-mediated oxidative damage during the first week after experimental traumatic brain injury. **Experimental neurology**, Orlando, v.238, n.2, p.176-182, 2012.

HAMILTON, S.E. et al. Disruption of the m1 receptor gene ablates muscarinic receptor- dependent M current regulation and seizure activity in mice. **Proceeding of the National Academy os Sciences**, v.94, p.13311-16, 1997.

HERMANN, B. et al. The frequency, complications and aetiology of ADHD in new onset paediatric epilepsy. **Brain**, v.130, p. 3135–48, 2007.

HERMANN, B.P. et al. Children with new-onset epilepsy: Neuropsychological status and brain structure. **Brain**, v.129, p. 2609-19, 2006.

HERMANN, B.P. et al. The frequency, complications and etiology of ADHD in new-onset pediatric epilepsy. **Brain**, v. 130, p.3135-48, 2007a.

HIRSCH, E.C. et al. Dopamine, tremor, and Parkinson's disease. **Lancet**, v. 340, p. 125-126; 1992.

HOFMEISTER, J., & STERPENICH, V. A Role for the Locus Ceruleus in Reward Processing: Encoding Behavioral Energy Required for Goal-Directed Actions. **The Journal of Neuroscience**, v. 35, n.29, p. 10387-89, 2015.

HOELLER, A.A. **Um novo modelo para o estudo de ansiedade: investigação das respostas emocionais em ratos tratados com pilocarpina**. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Florianópolis, SC, 2013.

HOLLERMAN, J.R.; SCHULTZ, W. Dopamine neurons report an error in the temporal prediction of reward during learning. **Nat Neurosci.**, v.1, p. 304-09, 1998.

HOVATTA, I. et al. Oxidative stress in anxiety and comorbid disorders. **Neurosci Res**, v. 68, n.4, p. 261-275, 2010.

HRUSKA, R.E. et al. Effects of lithium on [3H] quinuclidinyl benzilate binding to rat brain muscarinic cholinergic receptors. **J Neurosci Res.**, v.11, p.171-180, 1984.

HUANG, H.L. et al. Fresh green tea and gallic acid ameliorate oxidative stress in kainic-induced status epilepticus. **J Agric Food Chem.**, v. 60, p. 2328-39, 2012.

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

HUANG, L. et al. Structural basis for the interaction of Ras with RalGDS. **Nat Struct Biol.**, v.5, n.6, p.422-6, 1998.

INFARMED (2016). **Prontuário Terapêutico 2016** [Em linha]. Disponível em <<http://app10.infarmed.pt/prontuario/framepesactivos.php?palavra=metilfenidato&rb1=0&x=9&y=12>>. [Consultado em 17-10-2016].

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

INOSTROZA, M. et al. Different emotional disturbances in two experimental models of temporal lobe epilepsy in rats. **PLoS One**, v.7, n.6, 2012.

INTERNATIONAL LEAGUE AGAINST EPILEPSY. Quick Overview of the 2010 proposal for organization of the epilepsies. 2011. Disponível em: <http://www.ilae-epilepsy.org/Visitors/Centre/ctf/documents/ILAEHandoutV10_000.pdf>. Acesso em 05 de julho de 2016.

JACKSON, D.C. et al. The Neuropsychological and academic substrate of new recent onset epilepsies. **The Journal Pediatrics**, v. 162, p. 1047-53, 2013.

JAVED, H. et al. Neuroprotective effect of nerolidol against neuroinflammation and oxidative stress induced by rotenone. **BMC Neuroscience**, v.17, n.58, p.2-12, 2016.

JELENKOVIC, A. et al. Nitric oxide (NO) and convulsions induced by pentylunetrazol. **Ann. Ny. Acad. Sci**, v. 962, p.296-305, 2002.

JENSEN, C.L. et al. Immune players in the CNS: the astrocyte. **J Neuroimmune Pharmacol.**, v. 8, p. 824-839, 2013.

JIANG, Z. et al. Protection against cognitive impairment and modification of epileptogenesis with curcumin in a post-status epilepticus model of temporal lobe epilepsy. **Neuroscience**, v. 310, p. 362-71, 2015.

JOHNSON, K. et al. Dissociation in performance of children with ADHD and high functioning autism on a task of sustained attention. **Neuropsychologia**, v. 45, n. 10, p. 2234–45, 2007.

JOPE, R.S.; MORRISETT, R.A.; SNEAD, O.C. Characterization of lithium potentiation of pilorcapine- induced status epilepticus in rats. **Experimental Neurology**, v. 91, p.471-480, 1986.

JORDAN, C.J. et al. Cocaine-seeking behavior in a genetic model of attention-deficit/hyperactivity disorder following adolescent methylphenidate or atomoxetine treatments. **Drug Alcohol Depend.**, v.140, p.25-32, 2014.

JUCAITE, A. et al. Reduced midbrain dopamine transporter binding in male adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder: association between striatal dopamine markers and motor hyperactivity. **Biol Psychiatry**, v. 57, n.3, p. 229-238, 2005.

JUNIOR, H.V.N. et al. Acute seizure activity promotes lipid peroxidation, increased nitrite levels and adaptative pathways against oxidative stress in the frontal cortex and striatum. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2, n.3, p.130-137, 2009.

KAN, A. A. et al. Protein expression profiling of inflammatory mediators in human temporal lobe epilepsy reveals co-activation of multiple chemokines and cytokines. **J. Neuroinflam.**, v. 30, p.9- 207, 2012.

KANDRATAVICIUS, L. et al. Fisiopatologia dos transtornos de humor na epilepsia do lobo temporal. **Official Journal of the Brazilian Psychiatric Association**, v. 34, 2012.

KARALUNAS, S.L., HUANG-POLLOCK, C.L. Examining Relationships Between Executive Functioning and Delay Aversion in Attention Deficit Hyperactivity Disorder. **Journal of Clinical Child & Adolescent Psychology**, v.40, n.6, p. 837–847, 2011.

KHAZIPOV, R. et al. Developmental changes in gabaergic actions and seizure susceptibility in the rat hippocampus. **Eur J Neurosci**, v.19, p. 590-600, 2004.

KIM, J. E. et al. Status epilepticus induces vasogenic edema via tumor necrosis factor- α / endothelin-1-mediated two different pathways. **PloS One.**, v. 8, p. 74458, 2013.

KITA, T. et al. Protective Effects of Phytochemical Antioxidants Against Neurotoxin-Induced Degeneration of Dopaminergic Neurons. **J Pharmacol Sci**, v.124, p. 313 – 319, 2014.

KLEIN, D; SCHNEIDER, A.; COLET, C. F. Uso de cloridrato de metilfenidato por pacientes pediátricos. **Biomotriz**, v. 11, n. 1, p. 81-100, 2017.

KLINK, R.; ALONSO, A. Ionic mechanisms of muscarinic depolarization in entorhinal cortex layer II neurons. **J. Neurophysiology**, v. 77, p.1829-1843, 1997.

KIMKO, H. et al. Population pharmacodynamic modeling of various extended-release formulations of methylphenidate in children with attention deficit hyperactivity disorder via meta-analysis. **Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics**, v. 39, n. 2, p. 161-176, 2012.

KODA, K. et al. Effects of acute and chronic administration of atomoxetine and methylphenidate on extracellular levels of noradrenaline, dopamine and serotonin in the prefrontal cortex and striatum of mice. **J Neurochem**, v.114, p. 259- 70, 2010.

KOOB, G.F. Hedonic valence, dopamine and motivation. **Mol Psychiatry.**,v. 1, p.186-89, 1996.

KOTAGAL, P. Seizure symptomatology of temporal lobe epilepsy. In: LÜDERS, H. (Ed.) epilepsy surgery. New York: **Raven Press**, p.143-156, 1991.

KRUSE, A.C. et al. Muscarinic acetylcholine receptors: novel opportunities for drug development. **Nature Reviews Drug discovery**, v.13, n.7, p.549- 560, 2014.

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

KWON, O. Y.; PARK, S. P. Depression and anxiety in people with epilepsy. **J Clin Neurol**, v. 10, n. 3, p. 175-88, 2014.

LAPA, A.J et al. Plantas medicinais- métodos de avaliação da atividade farmacológica. **SBPC**. Campinas-SP, SP, 2008.

LEAL, M.M.T. **Avaliação do potencial antiinflamatório das células mononucleares de medula óssea em camundongos com epilepsia induzida por cloreto de pilocarpina**. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, Salvador, 2011.

LEITE, J.P. et al. Spontaneous recurrent seizures in rats: an experimental model of partial epilepsy. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 14, p. 511-517, 1990.

LERER, B.; MACCIARDI, F. Pharmacogenetics of antidepressant and mood-stabilizing drugs: a review of candidate-gene studies and future research directions. **Int. J. Neuropsychopharmacol**, v.5, n.3, p.255-75, 2002.

LI, F. et al. Osthole attenuates focal inflammatory reaction following permanent middle cerebral artery occlusion in rats. **Biol Pharm Bull.**, v. 35, p. 1686-1690, 2012.

LI, G. et al. Cytokines and epilepsy. **Seizure**, v.20, p. 249-256, 2011.

LIN, Y. et al. Mitochondrial DNA Damage and the Involvement of Antioxidant Defense and Repair System in Hippocamp of Rats Chronic Seizures, **Cell. Mol. Neurobiol.**, 2010.

LINHARES, M.I. et al. Methylphenidate: Proconvulsant effect and action on acetyl cholinesterase activity in Young and adult mice. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 6, p. 7, 2014.

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

LONGATO, C. R. **Avaliação neuropsicológica e afetiva de crianças e adolescentes com epilepsia**. Dissertação de mestrado apresentado ao programa de pós-graduação em Psicologia. 2015.

LOPES, A. F. D. **O impacto de diferentes tipos de epilepsia no funcionamento neurocognitivo e nos resultados escolares de crianças e adolescentes**. 2013. 206 f. Dissertação (Doutoramento em Psicologia) - Faculdade de Psicologia e de Ciências da Educação, Universidade de Coimbra, Coimbra, 2013.

LOPES, M.W. **Investigação de aspectos neuroquímicos e comportamentais em modelos animais e pacientes com epilepsia**. Tese (Doutorado)- Pós-graduação em Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2016.

LOUTFI, K.S. et al. Possíveis interfaces entre TDAH e epilepsia. **J. bras. Psiquiatr.**, v.59, n.2, p.146-155. ISSN 0047-2085, 2010.

LURIA, A. R. **Fundamentos de neuropsicologia**. São Paulo: EDUSP, p. 346, 1981.

LUSZCKI, J. et al. Influence of 7- nitroindazole and N- nitro- L- arginine on the anticonvulsant activity of loreclezole in maximal electroshock- induced seizures in mice. **Journal o pre-clinical and clinical research.**, v.11, n. 2, p.146-149, 2007.

MACHADO, C. M. et al. Ambulatório de psiquiatria infantil: Prevalência de transtornos mentais em crianças e adolescentes. **Psicologia: teoria e prática**, v.16, n.2, p. 53-62, 2014.

MACHADO, L.C.; TOMA, M. A. Qual a verdadeira função do metilfenidato na memória de indivíduos saudáveis?. **Revista UNILUS Ensino e Pesquisa**, v. 13, n. 30, jan./mar. 2016.

MAEHLY, A. C.; CHANCE, B. The assay of catalase and peroxidases. *Methods of Biochemical Analysis*. **New York: Interscience**, p.315, 1954.

MALARKEY, E.B.; PARPURA, V. Mechanisms of glutamate release from astrocytes. **Neurochemistry International**, v.52, n. 1-2, p. 142-54, 2008.

MALDONADO, R. Comparison of the pharmacokinetics and clinical efficacy of new extended-release formulations of methylphenidate. **Expert opinion on drug metabolism and toxicology**, v.9, p. 1001-14, 2013.

MALLIN, A. J.; TILL, A. Exposure to fluoridated water and attention deficit hyperactivity disorder prevalence among children and adolescents in the United States: na ecological association. **Environmental Health**, v.14, n. 17, 2015.

MAO, K. et al. Anticonvulsant effect of piperine ameliorates memory impairment, inflammation and oxidative stress in a rat model of pilocarpine-induced epilepsy. **Experimental and therapeutic medicine**, v.13, p. 695-700, 2017.

MARES, P., KUBOVÁ, H. What is the role of neurotransmitter systems in cortical seizures? **Physiol Res.**, v.57, p. 111-120, 2008.

MARINHO, M.M.F. et al. Inhibitory action of a calcium channel blocker (nimodipine) on seizures and brain damage induced by pilocarpine and lithium- pilocarpine in rats. **Neuroscience Letters**, v.235, p.13-16, 1997.

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

MARTINC, B.; GRABNAR, I.; VOVK, T. Antioxidants as a Preventive Treatment for Epileptic Process: A Review of the Current Status. **Current Neuropharmacology**, p.527-550, 2014.

MARTINS, M.R. et al. Methylphenidate treatment induces oxidative stress in young rat brain. **Brain Research**, v. 1078, p.189-97, 2006.

MATTOS, P. **No mundo da lua: Perguntas e respostas sobre Transtorno do Déficit de Atenção com Hiperatividade em Crianças, Adolescentes e Adultos**. (16 ed.) ABDA, 2015.

MATTOS, P. **No mundo da lua: perguntas e respostas sobre transtorno do déficit de atenção com hiperatividade em crianças, adolescentes e adultos**. São Paulo: Casa Leitura Médica, 2010.

MCDONOUGH, J.H.; SHIH, T.M. Neuropharmacological mechanisms of nerve agent-induced seizure and neuropathology. **Neurosci Biobehav Ver.**, v.21, p.559-79, 1997.

MCGRATH, L.M. et al. A multiple deficit model of reading disability and attention deficit/hyperactivity disorder: searching for shared cognitive deficits; **Neuropsychology Review**, n.5, p.203-221, 2011.

MEGIDDO, I. et al. Health and economic benefits of public financing of epilepsy treatment in India: An agent-based simulation model. **Epilepsia. Full-Length Original Research**, p. 1–11, 2016.

MEHTA, T.K. et al. Evidence for at least six Hox clusters in the Japanese lamprey (*Lethenteron japonicum*). **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.110, n.40, p. 16044- 49, 2013.

MEHVARI, J. et al. **Effects of Vitamin E on seizure frequency, electroencephalogram findings, and oxidative stress status of refractory epileptic patients**, p.1-36, 2016.

MELO, C.T.V. et al. Evidence for the involvement of the serotonergic, noradrenergic, and dopaminergic systems in the antidepressant-like action of riparin III obtained from *Aniba riparia* (Ness) Mez (Lauraceae) in mice. **Fundam Clini Pharma**, 2011.

MENSAH, S. A. et al. A community study of the presence of anxiety disorder in people with epilepsy. **Epilepsy Behav**, v. 11, n. 1, p. 118-24, 2007.

MICHOTTE, Y. et al. Anticonvulsant effect and neurotransmitter modulation of focal and systemic 2-chloroadenosine against the development of pilocarpine-induced seizures. **Neuropharmacology**, v. 39, p.2418-2432, 2000.

MICK, E.; FARAONE, S.V. Genetics of attention deficit hyperactivity disorder. **Child and Adolescent Psychiatric Clinics of North America**, v. 17, n.2, p.261-284, 2008.

MILLER, A. H. et al. Inflammation and Its Discontents: The Role of Cytokines in the Pathophysiology of Major Depression. **Biological Psychiatry**, v. 65, n.9, p. 732–741, 2009.

MONTI, G.; MELETTI, S. Emotion recognition in temporal lobe epilepsy: A systematic review. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 55, p. 280-93, 2015.

MORI, H. et al. Determination of Hydroperoxides with the use of immobilized Glutathione Peroxidase in a Flow System. **Journal Analytical Letters**, v. 25, p.1643, 1992.

MOTAGHINEJAD, M.; MOTEVALIAN, M.; SHABAB, B. Effects of chronic treatment with methylphenidate on oxidative stress and inflammation in hippocampus of adult rats. **Neuroscience Letters**, v. 619, p.106-113, 2015.

MOTAGHINEJAD, M.; MOTEVALIAN, M.; SHABAB, B. Neuroprotective effects of various doses of topiramate against methylphenidate induced oxidative stress and inflammation in rat isolated hippocampus. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v.43, p. 360-371, 2016.

MOYSES, M.A.A; COLLARES, C.A.L. Inteligência abstraída, crianças silenciadas: as avaliações de inteligência. **Psicol.**, v.8, n.1, p. 63-89, 2013.

MULLER, C.J. et al. Pilocarpine vs. Lithium-pilocarpine for induction of status epilepticus in mice: development of spontaneous seizures, behavioral alterations and neuronal damage. **Eur J Pharmacol**, v.619, n.1-3, p.15-24, 2009.

NASCIMENTO, V.S. et al. Pilocarpine-induced status epilepticus: Monoamine level, muscarinic and dopaminergic receptors in striatum of young rats. **Neuroscience Letters**., v.383, p.165-170, 2005.

NATHANSON, N.M. et al. Molecular analysis of the regulation of muscarinic receptor expression and fuction. **Life Sciences**, v. 64, p.375-379, 2000.

NAVARRETE, M. et al. Astrocytes mediate in vivo cholinergic-induced synaptic plasticity. **Plos Biol**, v.10, e1001259, 2012.

NEDERGAARD, M.; DIRNAGL, U. Role of glial cells in cerebral ischemia. **Glia**, v.50, p. 281–286, 2005.

NEJM, M.B. et al. Fish oil provides protection against the oxidative stress in pilocarpine model of epilepsy. **Metabolic Brain Disease**, p. 903-9, 2015.

NEWMAN, E.L. et al. Cholinergic modulation of cognitive processing: insights draw from computational models. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v.6, n.24, p.1-19, 2012.

NOBLE, K. G. et al. Family income, parental education and brain structure in children and adolescents. **Nat Neurosci**, v.18, n.5, p. 773-778, 2015.

NOWAK, M. et al. Interictal alterations of cytokines and leukocytes in patients with active epilepsy. **Brain Behav. Immun.**, v. 25, p. 423–428. 2011.

NUNES, S.O.V. et al. The shared role of oxidative stress and inflammation in major depressive disorder and nicotine dependence. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 37, n. 8, p. 1336– 45, 2013.

OKI, T. et al. Quantitative analysis of binding parameters of [3H]N- methylscopolamine in central nervous system of muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. **Molecular Brain Research**, v. 133, p.6-11, 2005.

OTTE, W.M. et al. A meta-analysis of white matter changes in temporal lobe epilepsy as studied with diffusion tensor imaging. **Epilepsia**, v. 53, n. 4, p. 659-667, 2012.

PAES, L.C.F. **Efeito anticonvulsivante e antioxidante do peptídeo sintético LS9 em modelo de convulsão induzido pelo pentilenotetrazol**. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós- Graduação em Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

PANANASCH, U. et al. Astroglial gap junctions shape neuronal network activity. **Commun. Integr. Biol.**, v.3, p. 248-54, 2012.

PAPA, M. et al. Astrocyte- neuron interplay in maladaptive plasticity. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.42, p. 35-54, 2014.

PARK, S. J. et al. The ameliorating effects of stigmasterol on scopolamine-induced memory impairments in mice. **Eur J Pharmacol**, v. 676, p. 64-70, 2012.

PARPURA, V.; GRUBISIC, V.; VERKHATSKY, A. Ca²⁺ sources for the exocytotic release of glutamate from astrocytes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1813, n.5, p.984-991, 2011.

PAULA, C.S. et al. Prevalence of psychiatric disorders among children and adolescents from four Brazilian regions. **Rev Bras Psiquiatr**, v.37, n. 2, p. 178-179, 2015.

PAUTZ, A. et al. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. **Nitric oxide: biology and chemistry/ official journal of the Nitric Oxide Society**, v. 23, n.2, p-75-93, 2010.

PAVONE, A.; CARDILE, V. An in vitro study of new antiepileptic drugs and astrocytes. **Epilepsia**, v. 44, n.10, p. 34-39, 2003.

PELAGIO, F.C. **Participação do óxido nítrico no modelo experimental de epilepsia induzida por pilocarpina e sua relação com o efeito da atividade física voluntária sobre a memória espacial de camundongos**. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Campinas, 2006.

PELLOW, S. et al. Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **J. Neurosci. Methods**, v.14, p. 149–167, 1985.

PELLOW, S.; FILE, S. E. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in elevated plus-maze: A novel test of anxiety in the rat. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 24, p.525-529, 1986.

PEREIRA, M. et al. Antimanic-like effect of tamoxifen is not reproduced by acute or chronic administration of medroxyprogesterone or clomiphene. **Neurosci Lett.**, v. 500, n. 2, p. 95-98, 2011.

PERINI, G. I. et al. Interictal mood and personality disorders in temporal lobe epilepsy and juvenile myoclonic epilepsy. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 61, n. 6, p. 601-5, 1996.

PERSINGER, M.A. et al. Behaviours of Rats with Insidious Multifocal Brain Damage Induced by Seizures Following Single Peripheral Injections of Lithium and Pilocarpine. **Physiol Behav**, v. 53, p. 849-66, 1993.

PERSINGER, M.A.; LEUNG, L.S.; STEWART, L.S. Diurnal variation in pilocarpine-induced generalized tonicclonic seizure activity. **Epilepsy Research**, v.44, p.207-212, 2001.

PICKERING, M.; CUMISKEY, D.; O'CONNOR, J.J. Actions of $\text{tnf-}\alpha$ on glutamatergic synaptic transmission in the central nervous system. **Exp Physiol**, v. 90, p.663-670, 2005.

POLANCZYK, G. et al. Transtorno de déficit de Atenção/Hiperatividade: uma perspectiva científica. **Clinics**, v. 67, n.10, p.1125–1126, 2012.

POLANCZYK, G. V. et al. ADHD prevalence estimates across three decades: an updated systematic review and meta regression analysis. **International Journal of Epidemiology**, v. 43, n. 2, p. 434– 442, 2014.

POLANCZYK, G.V. et al. 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.

POLASCHECK, N. et al. The COX-2 inhibitor parecoxib is neuroprotective but not antiepileptogenic in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. **Exp Neurol**, v. 224, p. 219– 233, 2010.

PORSOLT, R.D.R. et al. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. **Eur J Pharmacol.**, v.47, n.4, p.379-91, 1987.

POSNER, M. I. et al. Developing attention: Behavioral and brain mechanisms. **Advances in Neuroscience**, 2014.

RACINE, R.J. Modification of seizure activity by electrical stimulation: motor seizure. **Electroenceph Clin Neurophysiol**, v.32, p.281-92, 1972.

RANG, H. et al. CNS Stimulants and Psychomimetic Drugs. In: Rang, H. et al (Ed.). *Rang and Dale's Pharmacology*. 8ª edição. Elsevier Health. p. 591-592, 2015.

RAHMATI, B. et al. Anti-epileptogenic and antioxidant effect of *Lavandula officinalis* aerial part extract against pentylentetrazole- induced kindling in male mice. **J Ethnopharmacol**. v.148, n.1, p.152-7, 2013.

RANSOM, B.R. Neuroglia. **Oxford University Press**, 2012.

RAO, V.R.; LOWENSTEIN, D.H. Epilepsy. **Current Biology**, v.25, n.17, p.42-46, 2015.

RAVI, M; ICKOWICZ, A. Epilepsy, Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder and Methylphenidate: Critical Examination of Guiding Evidence. **J Can Acad Child Adolesc Psychiatry**, v. 25, n.1, 2016.

RAVIZZA, T. et al. Interleukin Converting Enzyme inhibition impairs kindling epileptogenesis in rats by blocking astrocytic IL-1beta production. **Neurobiol Dis.**, v. 31, n. 3, p.327-33, 2008.

RÉUS, G. Z. et al. The role of inflammation and microglial activation in the pathophysiology of psychiatric disorders. **Neuroscience**, v. 300, n. 6, p. 141–154, 2015.

RODRIGUES, A.D. **Atividade antioxidante e anticonvulsivante de suco de uva bordô e seu efeito no comportamento de ratos Wistar**. Dissertação (Mestrado). Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Caxias do Sul, 2012.

RODRIGUES, A.D. et al. Neuroprotective and anticonvulsant effects of organic and conventional purple grape juices on seizures in Wistar rats induced by pentylene-tetrazol. **Neurochemistry International**, v.60, p.799-805, 2012.

ROGERS, M. et al. Inattention, working memory, and academic achievement in adolescents referred for attention deficit/hyperactivity disorder (ADHD). **Child Neuropsychology**, v.17, n.5, p. 444-458, 2011.

ROHDE, L. A.; HALPERN, R. Transtorno de déficit de atenção/hiperatividade: atualização. **Journal Pediatría**, v. 80, n.2, p. 61-70, 2004.

ROHDE, L.A. et al. Exploring ADHD age-of-onset criterion in Brazilian adolescents. **European Child Adolesc. Psychiatry**, v. 9, p. 212-218, 2000.

ROJAS, A. et al. Cyclooxygenase-2 in epilepsy. **Epilepsia**, p. 1-9, 2013.

ROJAS, A. et al. Cyclooxygenase-2 in epilepsy. **Epilepsia**, v.55, n. 1, p. 17-25, 2015.

ROTTA, N.T.; OHLWEILER, L.; RIESGO, R.S. **Transtornos da Aprendizagem: Abordagem Neurobiológica e Multidisciplinar**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

ROUZER, C.A.; MARNETT, L.J. Cyclooxygenases: structural and functional insights. **Journal of Lipid Research**, v.50, p. S29-S34, 2009.

RUSS, S.A.; LARSON, K.; HALFON, N. A national profile of childhood epilepsy and seizure disorder. **Pediatrics**, v.129, p. 256–264, 2012.

SADASIVAN, S. et al. Methylphenidate exposure induces dopamine neuron loss and activation of microglia in the basal ganglia of mice. **Plos One**, v. 7, n.3, 2012.

SALES, I.M. et al. Choline acetyltransferase and acetylcholinesterase activities are reduced in rats striatum and frontal cortex after pilocarpine-induced seizures. **Neurosci. Lett.**, v.469, p.81-83, 2010.

SALVIANO, L.H.M. **Estudo de segurança da Ritalina® (Cloridrato de Metilfenidato) em animais adultos: aspectos de neurotoxicidade e nefrotoxicidade**. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos (PPGDITM), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015.

SANABRIA, E. R. G.; CAVALHEIRO, E. A. **Epileptogênese: Contribuição dos modelos experimentais**. In EPILEPSIA. GM.M. Guerreiro C A M, Cendes F, Lopes-Cendes. São Paulo, Lemos editorial & Gráficos Ltda, p.29-57,2000.

SANTELLLO, M.; VOLTERRA, A. TNF α in synaptic function: switching gears. **Trends Neurosci**, v.35, n.10, p. 638–647, 2012.

SARTER, M.; BODEWITZ, G.; STEPHENS, D.N. Attenuation of scopolamine-induced impairment of spontaneous alternation behavior by antagonist but not inverse agonist and antagonist β -carboline. **Psychopharmacology**, v.94, p.491-495, 1988.

SAUTE, R. et al. Brain Morphology in Children with Epilepsy and ADHD. **Plos One**, v. 9, n.4, e95269, 2014.

SCHERER, E.B. S. **Metilfenidato causa alterações neuroquímicas e comportamentais em ratos**. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas- Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

SCHERER, E.B. et al. Methylphenidate affects memory, brain-derived neurotrophic factor immunocontent and brain acetylcholinesterase activity in the rat. **Neurobiol Learn Mem**, v.94, p. 247–253, 2010.

SCHERER, E.B. et al. Methylphenidate treatment increases Na(?), K(?)-ATPase activity in the cerebrum of young and adult rats. **J Neural Transm**, v. 116, p.1681–1687, 2009.

SCHMITZ, F. et al. Chronic methylphenidate administration alters antioxidant defenses and butyrylcholinesterase activity in blood of juvenile rats. **Mol Cell Biochem**, v. 361, p.281–288, 2012.

SCHMITZ, F. et al. Methylphenidate Causes Behavioral Impairments and Neuron and Astrocyte Loss in the Hippocampus of Juvenile Rats. **Mol Neurobiol**, v. 53, p. 1-16, 2016.

SCHMITZ, F. et al. Methylphenidate induces lipid and protein damage in prefrontal cortex, but not in cerebellum, striatum and hippocampus of juvenile rats. **Metab. Brain Dis**, v. 27, p. 605-612, 2012.

SERRANO, G.E. et al. Ablation of cyclooxygenase-2 in forebrain neurons is neuroprotective and dampens brain inflammation after status epilepticus. **J Neurosci.**, v.31, p.14850-60, 2011.

SHAFAROODI, H. et al. The involvement of nitric oxide in the anti-seizure effect of acute atorvastatin treatment in mice. **Neurol Res.**, v. 34, n.9, p. 847-53. 2012.

SHEN, J.X.; YAKEL, J.L. Functional alpha 7 nicotinic ACh receptors on astrocytes in rat hippocampal CA1 Slices. **J Mol Neurosci**. 2012.

SHIMADA, T. et al. Role of inflammatory mediators in the pathogenesis of epilepsy. **Mediators of Inflammation**, p. 1-8, 2014.

SHIN, E. J. et al. Role of oxidative stress in epileptic seizures. **Neurochemistry International**, v.59, p. 122-137, 2011.

SHIRAKAWA, D.M. et al. Questões atuais no uso indiscriminado do metilfenidato. **Revista Ominia Saúde**, v. 9, n. 1, p. 46-53, 2012.

SHORVON, S. The evolution of epilepsy theory and practice at the National Hospital for the Relief and Cure of Epilepsy, Queen Square between 1860 and 1910. **Epilepsy & Behavior**, v.31, p.228-242, 2014.

SIDORYK- WEGRZYNOWICZ, M.; ASCHNER, M. Role of astrocytes in manganese mediated neurotoxicity. **BMC Pharmacology ad Toxicology**, v. 14, n.23, 2013.

SILVA, A. P.S.C.L. et al. Utilização de plantas medicinais no tratamento e/ou prevenção da epilepsia: uma prospecção tecnológica, **Revista GEINTEC**, v. 4, n.2, p. 876-883, 2014.

SILVA, A. V.; CAVALHEIRO, E. A. Epilepsia: uma janela para o cérebro. **A mente humana**, 2004.

SJÖWAL, D. et al. Multiple deficits in ADHD: Executive dysfunction, delay aversion, reaction time variability, and emotional deficits. **Journal of Child Psychology and Psychiatry**, 2013.

SONG, S.K. et al. Dysmyelination revealed through MRI as Increased radial (but unchanged axial) diffusion of water. **NeuroImage**, v. 17, n. 3, p. 1429- 1436, 2002.

SONUGA-BARKE, E. J. S. Causal Models of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder: From Common Simple Deficits to Multiple Developmental Pathways. **Biological Psychiatry**, n.57, p. 1231-1238, 2005.

SOUSA, P. et al. (2015). **Ritalina**. [Em linha]. Disponível em < <http://sofiasoso251.wixsite.com/ffup-ritalina> > [Consultado em 10-10-2016].

SOUZA, I. et al. Comorbidade em crianças e adolescentes com transtorno do déficit de atenção: resultados preliminares. **Arq Neuro-Psiquiatr.**, v. 59, n.2B, p.401-6, 2001.

SOUZA, P.; SOUZA, G.A.D.B. Aspectos sobre crianças com transtorno do deficit de atenção com hiperatividade (TDAH). **Revista da Universidade Vale do Rio Verde, Três Corações**, v. 14, n. 1, p. 569-578, 2016.

SPRENG, R. N. et al. Intrinsic architecture underlying the relations among the default, dorsal attention, and frontoparietal control networks of the human brain. **Journal of cognitive neuroscience**, v.25, n.1, p.74-86, 2013.

STEFAN, H. et al. Network characteristics of idiopathic generalized epilepsies in combined MEG/EEG. **Epilepsy Research**, v.85., p.187-198, 2009.

STELLWAGEN, D., et al. Differential regulation of ampa receptor and gaba receptor trafficking by tumor necrosis factor- α . **J Neurosc**, v. 25, n.12, p. 3219-3228, 2005.

STILES, J., & JERNIGAN, T. L. The basics of brain development. **Neuropsychology review**, v. 20, n.4, 327-348, 2010.

STIPURSKY, J. et al. Neuron-astroglial interactions in cell-fate commitment and maturation in the central nervous system. **Neurochem res.**, v.37, n.11, p.2402-18, 2012.

STONE, E.M. et al. The SIR1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* and its role as an extragenic suppressor of several mating-defective mutants. **Mol Cell Biol.**, v.11, n.4, p.2253-62, 1991.

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

SWANSON, J.M. et al. Development of a new once-a-day formulation of methylphenidate for the treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder: Proof-of concept and proof-of-product studies. **Archives of General Psychiatry**, v.60, p.204-211, 2003.

SWANSON, M.S. et al. SPT5, an essential gene important for normal transcription in *Saccharomyces cerevisiae*, encodes an acidic nuclear protein with a carboxy-terminal repeat. **Mol Cell Biol**, v.11, n.6, p.3009-19, 1991.

SWIADER, M.J. et al. Protective action of nicotinic acid benzylamide in a variety of chemically-induced seizures in mice. **Pharmacological Reports**, v.68, p. 297–300, 2016.

TAN, C. C. et al. NLRP1 inflammasome is activated in patients with medial temporal lobe epilepsy and contributes to neuronal pyroptosis in amygdala kindling-induced rat model. **J. Neuroinflam.**, v. 28, p. 12-18, 2015.

TEIXEIRA, C.P.L. et al. Antidepressant-like effect of riparin II from *Aniba ripariain* mice: evidence for the involvement of the monoaminergic system. **Fundam Clin Pharma**, 2011.

TEIXEIRA, J.P. **Efeitos das neurotoxinas Mlx-8 e Mlx-9 isoladas do veneno da serpente *Micrurus lemniscatus* sobre astrócitos em cultura**. 2012. Dissertação (Pós-graduação em Toxicologia)- Instituto Butantan, São Paulo, 2012.

TELLEZ-ZENTENO, J. F. et al. Psychiatric comorbidity in epilepsy: a population-based analysis. **Epilepsia**, v. 48, n. 12, p. 2336-44, 2007.

THAPAR, A., COOPER, M. Attention deficit hyperactivity disorder. **The Lancet.**, v. 17, 2015.

THOMAS, R. et al. Prevalence of attention-deficit/hyperactivity disorder: a systematic review and meta-analysis. **Pediatrics**, v. 135, n. 4, p. 994-1001, 2015.

THORPY, M.; DAUVILLIERS, Y. Clinical and practical considerations in the pharmacologic management of narcolepsy. **Sleep Medicine**, v.16, n.1, p. 9-18, 2015.

TORRES, C.M. **Estudo de alelos variantes do gene da Tirosina Kinase B (NTRK2) na Epilepsia do Lobo Temporal**. 122f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas)- Faculdade de Medicina. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2015.

TRIPP, G.; WICKENS, J.R. Neurobiology of ADHD. **Neuropharmacology**. v. 57, p. 579-89, 2009.

TURSKI, W. A. et al. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study, **Behav. Brain Res.**, v.9, n.3, p.315-335, 1983a.

TUTANC, M. et al. Oxidative Status in Epileptic Children Using Carbamazepine, **Iranian Journal of Pediatrics**, p. 1-4, 2015.

UYS, J.D.; MULHOLLAND, P.J.; TOWNSEND, D.M. Glutathione and redox signaling in substance abuse, **Biomed. Pharmacother.**, v. 68, p.799-807, 2004.

VANCE, A. L., FERRIN, M., et al. Examination of Spatial Working Memory Performance in Children and Adolescents with Attention Deficit Hyperactivity Disorder, Combined Type (ADHD-CT) and Anxiety. **Journal of Abnormal Child Psychology**, v. 41, p. 891– 900, 2013.

VELLOSA, J. C. R. Alterações metabólicas e inflamatórias em condições de estresse oxidativo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n. 3, p. 305 - 312, 2013.

VENVANSE®. Bula. Disponível em:

<http://www.shire.com.br/PDF/Venvanse_20120523_Bula%20do%20Paciente.pdf. Acesso em 01/02/2016.

VERKHRATSKII, A. N.; BUTT, L.M. Glial physiology and pathophysiology. [s.l.] **John Wiley & Sons**, 2013.

VEZZANI, A, et al. The role of inflammation in epilepsy. **Nat. Rev Neurol.**, v.7, p. 31-42, 2011.

VIEIRA, V. **Efeito do Diclofenaco de sódio na severidade das crises convulsivas e marcadores inflamatórios no modelo animal de *kindling* induzido por Pentilenotetrazol.** Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Fisiologia)- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

VIRTUOSO, S. **Avaliação do tratamento do transtorno do deficit de atenção com hiperatividade e de dados de prescrição.** 2016. 155f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde)- Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2016.

VOLKOW, N.D. et al. Imaging the effects of methylphenidate on brain dopamine: new model on its therapeutic action for attention-deficit/hyperactivity disorder. **Biol Psychiatry**, v.57, p.1410-1415, 2005.

VRIES, E.E. et al. Inflammatory mediators in human epilepsy: A systematic review and meta-analysis. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.63, p.177–190, 2016.

WAHAB, A. Difficulties in treatment and management of epilepsy and Challenges in new drug development. **Pharmaceutical**, p. 2090-2110, 2010.

WEDGE, M. **A Disease Called Childhood: Why ADHD became an American Epidemic**. USA. Avery Publishing Group Inc. 2015.

WGRZYNOWICZ, S.M. et al. Role of Astrocytes in Brain Function and Disease. **Toxicol. Pathol.**, v.1, p.1-9, 2010.

WELLS, P.G. et al. Fetal oxidative stress mechanisms of neurodevelopmental deficits and exacerbation by ethanol and methamphetamine. **Birth Defects Res C Embryo Today: Reviews**, v. 10, n. 2, p. 108–130, 2016.

WHO. Epilepsy. CENTRE, M. Geneva: WHO - **Media centre**, 2015.

WILLCUTT, E.G. et al. Validity of the Executive Function Theory of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder: A Meta-analytic Review. **Journal of Biological Psychiatry**, v. 57, 1336-1346, 2005.

WILLNER, P. The validity of animal models of depression. **Psychopharmacology**, v. 83, p. 116,1984.

WIN-SHWE, T.T.; FUJIMAKI, H. Acute administration of toluene affects memory retention in novel object recognition test and memory function-related gene expression in mice. **J Appl Toxicol.**, v. 32, p. 300-4, 2011.

WINTERS, B. D. et al. Object recognition memory: neurobiological mechanisms of encoding, consolidation and retrieval. **Neurosci. Biobehav.**, v. 32, p. 1055–1070, 2008.

XU, Z. et al. Role of signal transducer and activator of transcription-3 in up-regulation of GFAP after epilepsy. **Neurochem Res**, v.36, p. 2208–2215, 2011.

YAMAMOTO, B.K.; RAUDENSKY, J. The role of oxidative stress, metabolic compromise, and inflammation in neuronal injury produced by amphetamine-related drugs of abuse. **J Neuro Immune Pharmacol**, v. 3, n. 4, p. 203–217, 2008.

YOON, T. et al. Prefrontal cortex and hippocampus subserve different components of working memory in rats. **Learning & Memory**, v. 15, p. 97-115, 2008.

YOUSUF, S. et al. Neuroprotection Offered by Majun Khadar. A Traditional Unani Medicine, during Cerebral Ischemic Damage in Rats. **Evid Based Complement Alternat Med.**, 2011.

ZHANG, H. et al. Inhibition of myeloperoxidase at the peak of experimental autoimmune encephalomyelitis restores blood-brain barrier integrity and ameliorates disease severity. **J. Neurochem.**, v.136. n.4, p. 826-836, 2015.

ZHANG, Y. et al. Myeloperoxidase nuclear imaging for epileptogenesis. **Radiology**, v. 278, n.3, 2016.

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

ANEXO A

Universidade Federal do Ceará – Campus Sobral
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA
Rua: Av. Comte. Maurício Rocha Penteo, 100, Derby
CEP: 62.042-280 Sobral-CE
Fone/Fax: (88) 3611.8000

DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº 10/15, sobre o projeto intitulado: **Estudo da ritalina (Cloridrato de metilfenidato) no modelo de epilepsia induzida por pilocarpina em ratos jovens: abordagem comportamental, histológica e neuroquímica**, de responsabilidade do (a) Prof.(a) Dr.(a) **Marta Maria de França Fonteles**, e co-orientação da Profa. Dra. Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Conselho Nacional na Ciência e Experimentação Animal (CONCEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais(CEUA), em reunião realizada em 08 de setembro de 2015.

Sobral, 09 de setembro de 2015

Profa. Dra. Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA

APÊNDICE A

Tabela 2–Teste do Campo aberto

Animais	Grupos	Número de cruzamentos	Rearing
Não-epiléptico	SAL	46,64±1,62(14)	17,93±0,99(14)
	MFD2,5	64,00±2,87(15)	-
	MFD5	79,2±4,35(15)	-
	MFD10	107,8±4,45(17)	-
Epiléptico	SAL + P320	-	26,07±2,00(15)
	MFD2,5 + P320	85,07±3,73(15)	-
	MFD5 + P320	81,31±5,06(13)	-
	MFD10 + P320	119,0±9,02(15)	-

*-: sem significância em relação ao controle não epiléptico. (): número de animais. SAL: Salina. MFD: metilfenidato. P: pilocarpina.

Tabela 3–Teste do Labirinto em Cruz Elevado

Animais	Grupos	NEBA	TPBA	PEBA	PTBA
Não-epiléptico	SAL	4,93±0,41(15)	144,56,72(13)	49,84±1,31(10)	57,12±2,41(11)
	MFD2,5	-	-	-	-
	MFD5	7,77±0,55(13)	-	-	77,50±4,32(10)
	MFD10	10,67±0,33(12)	-	64,84±2,36(11)	74,57±3,63(9)
Epiléptico	SAL + P320	2,56±0,43(16)	45,27±6,39(11)	22,38±2,07(9)	18,02±4,13(9)
	MFD2,5 + P320	9,38±0,78(13)	-	-	-
	MFD5 + P320	9,33±0,77(12)	-	63,08±3,72(9)	80,36±3,42(11)
	MFD10 + P320	8,45±0,79(11)	-	59,95±2,02(9)	-

*-: sem significância em relação ao controle não epiléptico. (): número de animais. SAL: Salina. MFD: metilfenidato. P: pilocarpina. NEBA: número de entrada nos braços abertos. TPBA: tempo de permanência nos braços abertos PEBA: percentual de entrada nos braços abertos PTBA: percentual de tempo nos braços abertos.

Tabela 4–Teste do Nado Forçado

Animais	Grupos	Tempo de imobilidade
Não-epiléptico	SAL	218±4,13(8)
	MFD2,5	137,6±21,58(6)
	MFD5	87,17±4,35(6)
	MFD10	71,0±6,49(6)
Epiléptico	SAL + P320	134,8±4,03(9)
	MFD2,5 + P320	124,2±8,07(6)
	MFD5 + P320	81,25±10,86(8)
	MFD10 + P320	7±7(8)

(): número de animais. SAL: Salina. MFD: metilfenidato. P: pilocarpina.

Tabela 5–Teste do Labirinto em Y

Animais	Grupos	Alterações espontâneas (%)
Não-epiléptico	SAL	72,56±1,52(9)
	MFD2,5	-
	MFD5	-
	MFD10	-
Epiléptico	SAL + P320	56,37±4,09(7)
	MFD2,5 + P320	62,97±3,61(7)
	MFD5 + P320	62,56±1,52(9)
	MFD10 + P320	64,68±0,51(7)

*-: sem significância em relação ao controle não epiléptico. (): número de animais. SAL: S Salina. MFD: metilfenidato. P: pilocarpina.

Tabela 6– Teste do Reconhecimento de Objetos

Animais	Grupos	Alterações espontâneas (%)
Não-epiléptico	SAL	0,67±0,09(6)
	MFD2,5	-
	MFD5	-
	MFD10	-
Epiléptico	SAL + P320	0,24±0,09(6)
	MFD2,5 + P320	-
	MFD5 + P320	-
	MFD10 + P320	-

*-: sem significância em relação ao controle não epiléptico. (): número de animais. SAL: Salina. MFD: metilfenidato. P: pilocarpina.

Tabela 7- Dosagem de TBARS

Animais	Grupos	HC	CE	CPF
Não-epiléptico	SAL	119,0±11,79(7)	154,5± 22,64(7)	221,5±14,54(7)
	MFD2,5	227,5±15,07(7)	-	178,5±30,39(6)
	MFD5	322,8±38,78(6)	410,2±64,26(6)	-
	MFD10	413,5±25,48(6)	532,8±42,42(6)	-
Epiléptico	SAL + P320	250,6±25,91(7)	502,9±48,72(7)	469,8±40,62(7)
	MFD2,5 + P320	279,3±52,06(6)	-	-
	MFD5 + P320	368,8±22,71(8)	348,9±24,16(7)	436,4±50,47(8)
	MFD10 + P320	293,7±14,79(7)	516,6±54,57(7)	511,2±53,99(8)

*-: sem significância em relação ao controle não epiléptico. (): número de animais. SAL: Salina. MFD: metilfenidato. P: pilocarpina. HC: hipocampo CE: corpo estriado CPF: córtex pré-frontal

Tabela 8- Dosagem de Nitrito/nitrato

Animais	Grupos	HC	CE	CPF
Não-epiléptico	SAL	3,26±0,54(9)	4,94± 0,44(6)	2,19±0,44(6)
	MFD2,5	-	17,68 ± 1,82 (6)	10,58±1,88 (6)
	MFD5	-	-	12,64±1,55 (5)
	MFD10	-	-	-
Epiléptico	SAL + P320	20,76±2,64(7)	18,40±1,33(7)	12,17±0,77(6)
	MFD2,5 + P320	14,79±2,45(6)	22,05±4,64(6)	-
	MFD5 + P320	29,97±1,84 (7)	23,46±2,12 (6)	19,27±1,95 (6)
	MFD10 + P320	35,99±2,49 (6)	31,81±2,25 (7)	25,59±2,85 (5)

*-: sem significância em relação ao controle não epiléptico. (): número de animais. SAL: Salina. MFD: metilfenidato. P: pilocarpina. HC: hipocampo CE: corpo estriado CPF: córtex pré-frontal

Tabela 9- Determinação sobre a concentração de Glutathiona reduzida (GSH)

Animais	Grupos	HC	CE	CPF
Não-epiléptico	SAL	1128±87,99 (7)	1154±120,3 (6)	1043±73,73 (6)
	MFD2,5	560,0±31,07 (6)	467,7±24,79 (6)	420,4±23,43 (6)
	MFD5	482,9±38,01 (7)	485,5±28,03 (6)	372,3±35,55 (6)
	MFD10	467,1±59,09 (7)	601,4±44,59 (7)	465,6±54,30 (7)
Epiléptico	SAL + P320	524,3±44,16 (6)	405,6±16,80 (6)	-
	MFD2,5 + P320	292,0±38,72 (7)	277,6±43,50 (6)	206,9±17,72 (7)
	MFD5 + P320	419,6±54,28 (6)	654,7±80,29 (6)	393,2±31,33 (6)
	MFD10 + P320	835,5±25,89 (6)	459,2±15,33 (6)	819,9±18,17 (6)

*-: sem significância em relação ao controle não epiléptico. (): número de animais. SAL: Salina. MFD: metilfenidato. P: pilocarpina. HC: hipocampo CE: corpo estriado CPF: córtex pré-frontal

Tabela 10- Determinação da atividade da catalase

Animais	Grupos	HC	CE	CPF
Não-epiléptico	SAL	16,46±1,98 (6)	7,01±1,00 (6)	8,54±1,22 (6)
	MFD2,5	4,28±0,62 (6)	3,29±0,65 (6)	5,78±1,02 (6)
	MFD5	5,35±1,68 (6)	-	3,54±0,75 (6)
	MFD10	7,46±1,58 (6)	-	3,68±1,26 (5)
Epiléptico	SAL + P320	3,51±0,45 (7)	3,48±0,68 (6)	3,43±0,57 (8)
	MFD2,5 + P320	3,76±0,54 (7)	2,22±0,59 (5)	2,72±0,59 (7)
	MFD5 + P320	6,62±1,84 (7)	3,29±0,31 (6)	3,79±0,57 (8)
	MFD10 + P320	6,89±1,46 (7)	-	3,90±0,62 (8)

*-: sem significância em relação ao controle não epiléptico. (): número de animais. SAL: Salina. MFD: metilfenidato. P: pilocarpina. HC: hipocampo CE: corpo estriado CPF: córtex pré-frontal

Tabela 11- Determinação da atividade da Acetilcolinesterase

Animais	Grupos	HC	CE	CPF
Não-epiléptico	SAL	4,63±0,43 (5)	6,53±0,70 (6)	2,63±0,45 (6)
	MFD2,5	2,15±0,24 (6)	-	1,14±0,30 (5)
	MFD5	2,33±0,13 (7)	-	1,46±0,11 (6)
	MFD10	2,06±0,51 (6)	-	1,70±0,17 (7)
Epiléptico	SAL + P320	1,90±0,39 (5)	-	0,86±0,15 (5)
	MFD2,5 + P320	2,11±0,27 (5)	-	1,71±0,26 (6)
	MFD5 + P320	1,70±0,11 (8)	-	1,43±0,16 (8)
	MFD10 + P320	2,71±0,29 (5)	-	1,15±0,20 (6)

*-: sem significância em relação ao controle não epiléptico. (): número de animais. SAL: Salina. MFD: metilfenidato. P: pilocarpina. HC: hipocampo CE: corpo estriado CPF: córtex pré-frontal

Tabela 12- Determinação das concentrações de Monoaminas e do metabólito DOPAC em corpo estriado

Animais	Grupos	DA	DOPAC
Não-epiléptico	SAL	1,28±0,32 (5)	6,14±0,42 (4)
	MFD2,5	-	-
	MFD5	3,32±0,16 (5)	-
	MFD10	7,52±0,37 (5)	-
Epiléptico	SAL + P320	-	13,59±0,85 (5)
	MFD2,5 + P320	9,67±0,03 (4)	2,72±0,74 (4)
	MFD5 + P320	11,31±0,46 (4)	-
	MFD10 + P320	18,59±1,54 (3)	1,89±0,00 (4)

*-: sem significância em relação ao controle não epiléptico. (): número de animais. SAL: Salina. MFD: metilfenidato. P: pilocarpina. DA: dopamina

Tabela 13- Determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO)

Animais	Grupos	HC	CE	CPF
Não-epiléptico	SAL	2,10±0,23 (6)	3,26±0,35 (6)	2,47±0,18 (8)
	MFD2,5	4,29±0,37 (6)	-	-
	MFD5	5,10±1,04 (5)	-	-
	MFD10	6,66±0,53 (7)	10,76±0,52 (7)	7,82±0,99 (7)
Epiléptico	SAL + P320	7,18±0,46 (6)	8,95±0,71 (7)	6,69±1,10 (7)
	MFD2,5 + P320	6,69±0,30 (5)	7,08±0,90 (5)	-
	MFD5 + P320	9,91±1,33 (5)	8,83±0,39 (5)	9,18±0,75 (5)

MFD10 + P320	14,83±1,00 (7)	19,07±1,59 (7)	18,42±1,41 (8)
--------------	----------------	----------------	----------------

*-: sem significância em relação ao controle não epilético. (): número de animais. SAL: Salina. MFD: metilfenidato. P: pilocarpina. HC: hipocampo CE: corpo estriado CPF: córtex pré-frontal

Tabela 14- Determinação sobre a concentração de TNF- α

Animais	Grupos	HC	CE	CPF
Não epilético	SAL	364,4 ± 52,16 (5)	424,0±58,99 (5)	524,0±68,85 (5)
	MFD5	-	-	1037 ± 35,68 (4)
Epilético	SAL + P320	750,3±69,44 (4)	869,8±59,58 (4)	894,0±63,77 (4)
	MFD5 + P320	849,5 ± 37,91 (4)	1052 ± 150,7 (4)	1307 ± 233 (4)

*-: sem significância em relação ao controle não epilético. (): número de animais. SAL: Salina. MFD: metilfenidato. P: pilocarpina. HC: hipocampo CE: corpo estriado CPF: córtex pré-frontal

Tabela 15- Determinação da atividade da COX-2 em corpo estriado

Animais	Grupos	CE
Não epilético	SAL	8,31 ± 2,51 (7)
Epilético	SAL + P320	17,57 ± 1,91 (9)
	MFD5 + P320	18,69 ± 1,488 (9)

*-: sem significância em relação ao controle não epilético. (): número de animais. SAL: Salina. MFD: metilfenidato. P: pilocarpina. CE: corpo estriado

Tabela 16- Determinação da atividade da iNOS em corpo estriado

Animais	Grupos	CE
Não epilético	SAL	27,53 ± 1,15 (8)
Epilético	SAL + P320	37,47 ± 3,13 (7)
	MFD5 + P320	50,57 ± 3,17 (9)

*-: sem significância em relação ao controle não epilético. (): número de animais. SAL: Salina. MFD: metilfenidato. P: pilocarpina. CE: corpo estriado