



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

MARIA ISABEL LINHARES

**ESTUDO DA RITALINA® (CLORIDRATO DE METILFENIDATO) SOBRE O
SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE ANIMAIS JOVENS E ADULTOS: ASPECTOS
COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICOS**

FORTALEZA – CE

2012

MARIA ISABEL LINHARES

**ESTUDO DA RITALINA® (CLORIDRATO DE METILFENIDATO) SOBRE O
SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE ANIMAIS JOVENS E ADULTOS: ASPECTOS
COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICOS**

**Dissertação apresentada ao programa de Pós-
Graduação em Farmacologia da Universidade
Federal do Ceará, como requisito parcial para
Obtenção do Título de Mestre em
Farmacologia. Área de Concentração:
Farmacologia**

**Orientador (a): Profa. Dra. Marta Maria de
França Fonteles**

FORTALEZA- CE

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Federal do Ceará

Biblioteca de Ciências da Saúde

L728e Linhares, Maria Isabel.

Estudo da ritalina® (cloridrato de metilfenidato) sobre o sistema nervoso central de animais jovens e adultos: aspectos comportamentais e neuroquímicos. / Maria Isabel Linhares. – 2012.

142 f. : il. color., enc. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências da Saúde, Faculdade de Medicina, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Mestrado em Farmacologia, Fortaleza, 2012.

Área de concentração: Farmacologia.

Orientação: Profa. Dra. Marta Maria de França Fonteles.

1. Transtorno do Déficit de Atenção com Hiperatividade. 2. Metilfenidato. 3. Ansiedade. 4. Depressão. 5. Epilepsia. 6. Acetilcolinesterase. I. Título.

CDD 616.8589

MARIA ISABEL LINHARES

ESTUDO DA RITALINA® (CLORIDRATO DE METILFENIDATO) SOBRE O SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE ANIMAIS JOVENS E ADULTOS: ASPECTOS COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICOS

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Aprovada em ___/___/_____

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dra. Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dra. Teresa Maria de Jesus Ponte Carvalho
Universidade Federal do Ceará – UFC

**"São fúteis e cheias de erros as ciências que não nasceram da
experimentação, mãe de todo conhecimento."
(Leonardo da Vinci)**

AGRADECIMENTOS

Aos meus irmãos, *José Henrique, José Juvenal e José Inácio*, pelo carinho, pela proteção e pelo apoio incondicional. Vocês são um exemplo de amor e força. Hoje quero que essa vitória também seja de vocês.

Aos meus sobrinhos, *Henry, João Pedro, Anna Lara, Maria Clara e Maria Cecília*, que trouxeram mais alegria a minha vida e são meu estímulo para sempre continuar na luta.

Às minhas cunhadas, *Ana Eugênia e Carla* por sempre estarem ao meu lado, apoiando e acreditando no meu potencial. Vocês são para mim como irmãs.

À minha cunhada *Emmanuelle*, que me apresentou o laboratório e, conseqüentemente, o amor à pesquisa. Você contribuiu por mais essa etapa da minha vida.

À minha tia, *Conceição* e ao meu primo, *Henrique Neto*, pela ajuda e apoio pessoal.

Ao meu namorado, *Moacyr Neto*, pelo compartilhamento de todos os momentos da minha vida, além do seu apoio, amor e carinho. Obrigada por estar ao meu lado!

À *profa. Dra. Marta Maria de França Fonteles*, minha grande e estimada orientadora, que sempre acompanhou meus passos desde a graduação e a quem devo a minha continuação na pesquisa pelo fato de confiar em mim e me fazer acreditar que eu posso conseguir. Obrigada pelo incentivo, pelos conselhos, pela paciência, pela amizade e cumplicidade.

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

À *prof. Dra. Aline de Albuquerque Oliveira*, por quem tenho grande estima, a quem devo tudo que aprendi no laboratório.

À *prof. Dra. Lissiana Vasconcelos Aguiar*, por quem tenho grande admiração, e à *prof. Dra. Teresa Maria de Jesus Ponte Carvalho*, por terem aceitado o convite de integrar a banca examinadora desta Dissertação de Mestrado, contribuindo substancialmente para melhoria deste trabalho.

A todos os professores da pós-graduação, o meu muito obrigada. A todos os colegas do Laboratório de Neurofarmacologia: *Alyne Mara* (que tenho grande estima, obrigada pela ajuda constante), *Léo, Emiliano (Mimi), Marília, Nayrton, Thici, Fernando, Márcia Calheiros, Cacá, Mariana (lourinha), Íris, Helvira, Gersilene, Fernanda, Patrícia Gomes, Patrícia Xavier, Taciana, Vlândia, Rafaelly* outros... mesma luta, sempre vencedores...

À minha amiga *Edith Teles*, a pessoa mais presente na realização desse estudo. Como nós dizemos “Minha dissertação é sua e sua tese é minha”, então não poderia faltar um agradecimento especial a você, que além de companheira de experimento é uma amiga que sei que posso contar, que nos momentos de angústia sempre teve uma palavra de incentivo, ou melhor, de descontração, que acabava fazendo o momento virar uma “comédia”. Obrigada por tudo, amiga.

À *Mariana Lima* (Mari Morena), que nesses últimos momentos foi bastante importante na ajuda das estatísticas e da discussão do estudo e por se fazer presente no dia-a-dia com dedicação e amizade. Sua ajuda foi de grande valia.

À *Camila Nayane*, por estar presente em muitos dos experimentos e nesses últimos momentos ajudando nos gráficos (obrigada também ao Uebim). Obrigada pela amizade, pontualidade e companheirismo.

À *Giuliana* (Giu) que sempre esteve disposta a ajudar e por fazer do nosso grupo de estudo da profa. Marta mais alegre e completo.

À *Herbene*, companheira de projeto, que apesar de distante, sempre se mostrou presente no desenvolver desse estudo.

Às amigas da graduação em Farmácia, por sempre estarem presentes em tantos momentos, bons ou difíceis, durante esses 7 anos de amizade, tornando minha vida mais feliz. Obrigada *Julliana Catharina* (amiga-irmã e companheira de todas as horas e de pós-graduação), *Juliana Pereirinha*, *Analu*, *Cecys*, *Anaiara* e *Livinha*.

A todos dos Laboratórios adjacentes: *Profa. Dra Geanne*, *Profa. Dra Flávia*, *Kelly Rosy*, *Marta*, *Ana Paula*, *Ana Carla*, *Carol*, *Diego*, *Synara*, *Talita* que contribuíram de forma direta ou indiretamente para realização deste estudo.

Às técnicas do laboratório, *Vilani (Vilinha)* e *Lena*, pela ajuda nos experimentos e por terem se tornado pessoas importantes nessa jornada, pela amizade e companheirismo tornando o dia de trabalho mais divertido.

Ao *Arnaldo*, farmacêutico, responsável por passar as amostras no HPLC e, que sempre estar disposto a ajudar.

Às secretárias da Pós-Graduação: *Aurinha* e *Márcia* por terem paciência e dedicação com os alunos da pós-graduação.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, em especial, *Alana*, *Paulinha*, *Haroldo*, *Cícera*, *Haroldo (biotério)*, *Fernando*, pela dedicação ao trabalho.

Aos *camundongos*, pois sem ele não existiria este trabalho.

A *CAPES* pelo apoio financeiro.

Enfim, a todos que são parte daquilo que eu sou hoje. Obrigada!!!!

RESUMO

O Transtorno de Déficit de Atenção/ Hiperatividade (TDAH) é um transtorno prevalente e debilitante, diagnosticado com base em persistentes níveis de hiperatividade, desatenção e impulsividade. Fármacos estimulantes têm sido eficazes no tratamento desse transtorno, sendo que o metilfenidato (MFD) é o agente terapêutico mais prescrito e seu uso aumentou significativamente nos últimos anos, entretanto, as conseqüências da sua utilização ainda são pouco conhecidas. O MFD foi avaliado em modelos animais clássicos para *screening* de drogas com atividade em ansiedade, depressão e convulsão, tais como, labirinto em cruz elevado (LCE), campo aberto, rota rod, nado forçado e convulsão induzida por pilocarpina, e em estudo neuroquímico, através da concentração de monoaminas, tais como dopamina (DA), noradrenalina (NE) e 5-hidroxitriptamina (5-HT), além da atividade da enzima Acetilcolinesterase (AChE). O MFD foi administrado de forma aguda em todos os testes, nas doses de 2,5; 5; 10 e 20 mg/Kg, através da via oral (v.o.) em camundongos jovens (21 dias) e adultos. Os resultados mostraram que o MFD apresentou efeito ansiolítico nos modelos LCE, pois aumentou todos os parâmetros analisados no LCE, como NEBA, PEBA, TPBA e PTBA nas doses de 10 e 20mg/Kg nos animais jovens e apenas na de 20mg/Kg nos animais adultos. No teste do campo aberto, foi observado aumento na atividade locomotora em todas as doses nos animais jovens e apenas nas doses maiores (10 e 20mg/Kg) nos animais adultos. Não alterou o número de *grooming* e *rearing*. O MFD apresentou efeito antidepressivo no Sistema Nervoso Central (SNC), pois no teste do nado forçado diminuiu o tempo de imobilidade nas doses de 10 e 20 mg/Kg nos animais jovens e apenas na dose de 20mg/Kg nos animais adultos. A avaliação neuroquímica comprovou o efeito antidepressivo do MFD, pois se verificou um aumento da concentração das monoaminas. No teste da convulsão induzida por pilocarpina, o metilfenidato diminuiu a latência de convulsão, bem como a latência de morte nos animais jovens e adultos, sugerindo que o MFD apresenta atividade proconvulsivante. O estudo sobre os efeitos sobre o sistema de neurotransmissão colinérgica demonstrou que o pré-tratamento com MFD reduziu a atividade da AChE apenas no corpo estriado. Em conclusão, esses efeitos mostraram que o MFD apresenta efeito ansiolítico, efeito antidepressivo e atividade proconvulsivante.

Palavras-chave: Transtorno do Déficit de Atenção/Hiperatividade. Metilfenidato. Ansiedade. Depressão. Convulsão. Acetilcolinesterase. Monoaminas

ABSTRACT

Attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD) is a prevalent and debilitating disorder diagnosed on the basis in persistent levels of overactivity, inattention and impulsivity. Stimulant drugs have been effective in treating this disorder, and methylphenidate (MPH) is the most widely prescribed therapeutic agent and its use has increased significantly in recent years, however, the consequences of its use are still poorly known. The MFD was assessed in classical animal models to the screening of drugs with activity in anxiety, depression and convulsion, such as elevated plus maze (EPM), open field, rota rod, forced swimming and pilocarpine-induced seizures and a neurochemistry study, through the level of monoamines, such as dopamine (DA), norepinephrine (NE) and 5-hydroxytryptamine (5-HT) but the activity of the enzyme acetylcholinesterase (AChE). The MPH was administered acutely in all tests at doses of 2,5; 5; 10 e 20 mg/Kg, through the oral via (p.o.) in young mice (21 days) and adults. Results showed that the MPH presented an anxiolytic effects in the models of EPM, since increased all the parameters analyzed in the EPM, such as NEOA, PEOA, TPOA, PTOA, at doses of 10 and 20 mg/Kg in young animals, and only in animals of 20 mg/Kg in adults. In the open field, we observed an increase in locomotor activity at all doses in young animals and only at higher doses (10 e 20 mg/Kg) in adult animals. Not was observed no alteration the number of rearing and grooming. MPH presented antidepressant effect of Central Nervous System (CNS), since in the forced swimming, decreases the time of immobility in doses of 10 and 20 mg/Kg in young animals and only at a dose of 20 mg/Kg in adult animals. The neurochemistry evaluation comproved the antidepressant effect do MPH, because there was an increased concentration of monoamines. The test of the seizure by pilocarpine, MPH did decrease the latency of convulsion and latency of death in young and adult animals, suggesting that the MPH has proconvulsivante activity. The study of the effects of the cholinergic neurotransmission system has show that pretreatment with MPH reduced AChE activity only in the striatum. In conclusion, these effects showed that MPH presented anxiolytic effect, antidepressant effect and proconvulsivante activity.

KeyWords: Attention-deficit hyperactivity disorder. Methylphenidate. Anxiety. Depression. Convulsion. Acetylcholinesterase. Monoamines.

LISTA DE SIGLAS

5-HIAA	ácido 5-hidroxiindolacético
5-HT	5-hidroxitriptamina; serotonina
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
ANOVA	Análise de Variância
ATC	Acetiltiocolina
CEPA	Comitê de Ética em Pesquisa Animal
CID	Classificação Internacional de Doenças
COMT	Catecol o-metil transferase
CSTC	Córtico- estriatais-talâmico-corticais
CTRL	Controle
DA	Dopamina
DAT	Transportador de dopamina
DLPFC	Córtex pré-frontal dorso-lateral
DOPAC	Ácido dihidroxifenilacético
DSM	Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais
DZP	Diazepam
EPM	Erro padrão da média
EUA	Estados Unidos da América
FDA	Food and Drug Administration
GABA	Ácido γ -aminobutírico
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
HVA	Ácido homovalínico
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IMP	Imipramina
i.p	Intraperitoneal
LCE	Labirinto em Cruz Elevado
L-DOPA	L-3,4-dihidroxifenilalanina
LH	Hormônio Luteinizante
MAO	Monoamina oxidase

MFD	Metilfenidato
Mg	Miligrama
Min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
NA	Noradrenalina
Nac	Núcleo Accumbes
NEBA	Número de entrada nos braços abertos
Nm	Nanômetro
nM	Nanomolar
NMDA	N-metil-D-aspartato
OMS	Organização Mundial de Saúde
P400	Pilocarpina
PEBA	Porcentagem de entrada nos braços abertos
PFC	Córtex pré-frontal
PTBA	Porcentagem do tempo de permanência nos braços abertos
RCM	Receptores colinérgicos muscarínicos
Seg	Segundos
SNC	Substância Nigra pars compacta
SNC	Sistema Nervoso Central
TC	Transtorno de Conduta
TOD	Transtorno Opositor Desafiador
TDAH	Transtorno do Déficit de Atenção e Hiperatividade
TH	Tirosina hidroxilase
TPBA	Tempo de permanência nos braços abertos
V.O.	via oral
Vs	Versus
VTA	Área ventral tegmental

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Vias dopaminérgicas no cérebro	25
Figura 1.2. Esquema simplificado dos eventos envolvidos na síntese e recaptção da dopamina (DA)	28
Figura 1.3. Síntese da 5-hidroxitriptamina (serotonina)	29
Figura 1.4. Estrutura química do Metilfenidato	39
Figura 4.1. Ilustração do Instrumento utilizado no Teste Labirinto em Cruz Elevado	52
Figura 4.2. Teste do Campo Aberto	53
Figura 4.3. Ilustração do Instrumento utilizado no Teste do Rota <i>Rod</i>	54
Figura 4.4. Teste do Nado Forçado	55
Figura 4.5. Áreas cerebrais dissecadas	57
Figura 4.6. Aparelho de HPLC (High Performance Liquid Cromatography)	60
Figura 5.1. Efeito do MFD e diazepam sobre o número de entrada nos braços abertos (NEBA) no teste do Labirinto em Cruz Elevado em animais jovens	64
Figura 5.2. Efeito do MFD e diazepam sobre a percentagem de entrada nos braços abertos (PEBA) no teste do Labirinto em Cruz Elevado em animais jovens	65
Figura 5.3. Efeito do MFD e diazepam sobre o tempo de permanência nos braços abertos (TPBA) no teste Labirinto em Cruz Elevado em animais jovens	66
Figura 5.4. Efeito do MFD e diazepam sobre a percentagem do tempo de permanência nos braços abertos (PTBA) no teste Labirinto em Cruz Elevado em animais jovens	67
Figura 5.5. Efeito do MFD e diazepam sobre o número de entrada nos braços abertos (NEBA) no teste do Labirinto em Cruz Elevado em animais adultos	68
Figura 5.6. Efeito do MFD e diazepam sobre a percentagem de entrada nos braços abertos (PEBA) no teste do Labirinto em Cruz Elevado em animais adultos	69
Figura 5.7. Efeito do MFD e diazepam sobre o tempo de permanência nos braços abertos (TPBA) no teste Labirinto em Cruz Elevado em animais adultos	70

Figura 5.8. Efeito do MFD e diazepam sobre a porcentagem do tempo de permanência nos braços abertos (PTBA) no teste Labirinto em Cruz Elevado em animais adultos	71
Figura 6. Efeito do MFD e diazepam sobre a atividade locomotora espontânea no teste do Campo Aberto em animais jovens	74
Figura 7. Efeito do MFD e diazepam sobre a atividade locomotora espontânea no teste do Campo Aberto em animais adultos	75
Figura 8. Efeito do MFD e diazepam sobre número de <i>rearing</i> no teste do Campo Aberto em animais jovens	76
Figura 9. Efeito do MFD e diazepam sobre número de <i>rearing</i> no teste do Campo Aberto em animais adultos	77
Figura 10. Efeito do MFD e diazepam sobre número de <i>grooming</i> no teste do Campo Aberto em animais jovens	78
Figura 11. Efeito do MFD e diazepam sobre número de <i>grooming</i> no teste do Campo Aberto em animais adultos	79
Figura 12. Efeito do MFD e imipramina sobre o tempo de imobilidade no teste do Nado Forçado em animais jovens	86
Figura 13. Efeito do MFD e imipramina sobre o tempo de imobilidade no teste do Nado Forçado em animais adultos	87
Figura 14. Concentração de monoaminas no corpo estriado de animais jovens submetidos ao tratamento agudo com MFD	91
Figura 15. Concentração de monoaminas no corpo estriado de animais adultos submetidos ao tratamento agudo com MFD	92
Figura 16. Concentração de serotonina no corpo estriado de animais adultos submetidos ao tratamento agudo com MFD	93
Figura 17. Efeito do MFD sobre a latência de convulsão no teste de Convulsão Induzida por Pilocarpina em animais jovens	96
Figura 18. Efeito do MFD sobre a latência de convulsão no teste de Convulsão Induzida por Pilocarpina em animais adultos	97
Figura 19. Efeito do MFD sobre a sobrevida no teste de Convulsão Induzida por Pilocarpina em animais jovens	98

- Figura 20.** Efeito do MFD sobre a sobrevivência no teste de Convulsão Induzida por Pilocarpina em animais adultos **99**
- Figura 21.** Efeito do MFD sobre a atividade da AChE em hipocampo de animais jovens durante as convulsões induzidas por P400 **102**
- Figura 22.** Efeito do MFD sobre a atividade da AChE em corpo estriado de animais jovens durante as convulsões induzidas por P400 **103**
- Figura 23.** Efeito do MFD sobre a atividade da AChE em hipocampo de animais adultos durante as convulsões induzidas por P400 **104**
- Figura 24.** Efeito do MFD sobre a atividade da AChE em corpo estriado de animais adultos durante as convulsões induzidas por P400 **105**

LISTA DE QUADROS

Quadro 4.1. Drogas e Reagentes utilizados e suas origens	46
Quadro 4.2. Materiais utilizados	47
Quadro 4.3. Concentração final, via de administração e abreviatura das drogas utilizadas	48
Quadro 5.1- Efeito do MFD e diazepam sobre o número de quedas e tempo de permanência na barra no teste de Rota <i>Rod</i> em animais jovens	82
Quadro 5.2- Efeito do MFD e diazepam sobre o número de quedas e tempo de permanência na barra no teste de Rota <i>Rod</i> em animais adultos	83

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	Transtorno do Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH)	18
1.2	Fisiopatologia do TDAH	20
1.3	Neurotransmissores envolvidos com o TDAH	23
1.3.1	Dopamina	23
1.3.2	Noradrenalina	25
1.3.3	Serotonina	28
1.4	Ansiedade	30
1.5	Depressão	31
1.6	Epilepsia	32
1.7	Neurotransmissão Colinérgica	34
1.8	Correlação das áreas cerebrais	36
1.8.1	Hipocampo	36
1.8.2	Corpo Estriado	37
1.9	Metilfenidato	37
2	RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA	41
3	OBJETIVOS	43
3.1	Objetivo geral	44
3.2	Objetivos específicos	44
4	MATERIAIS E MÉTODOS	45
4.1	Drogas e Reagentes	46
4.2	Preparo das drogas	48
4.3	Animais	49
4.3.1	Tratamento farmacológico dos grupos experimentais	49
4.3.1	Protocolo experimental	50
4.4	Avaliação da Atividade Ansiolítica	51
4.4.1	Labirinto em Cruz Elevado	51
4.5	Avaliação da Atividade Locomotora	53
4.5.1	Teste do Campo Aberto	53
4.5.2	Teste do Rota <i>Rod</i>	54
4.6	Avaliação da Atividade Antidepressiva	55
4.6.1	Teste do Nado Forçado	55

4.7	Avaliação da Atividade Convulsivante	56
4.7.1	Teste da Convulsão Induzida por Pilocarpina	56
4.8	Dissecação das Áreas Cerebrais (Hipocampo e Corpo Estriado)	56
4.9	Determinação das Concentrações de Monoaminas	57
4.9.1	Método	57
4.9.2	Procedimento Experimental	58
4.9.3	Soluções Reagentes	58
4.10	Determinação da atividade da Acetilcolinesterase (AChE)	60
4.10.1	Método	60
4.10.2	Soluções Reagentes	60
4.11	Análise Estatística	60
5	Resultados	62
5.1	Avaliação da Atividade Ansiolítica	63
5.1.1	Teste do Labirinto em Cruz Elevado	63
5.2	Avaliação da Atividade Locomotora	72
5.2.1	Teste do Campo Aberto	72
5.2.2	Rota <i>Rod</i>	81
5.3	Avaliação da Atividade Antidepressiva	85
5.3.1	Teste do Nado Forçado	85
5.4	Determinação das Concentrações de Monoaminas	89
5.4.1	Animais jovens	89
5.4.2	Animais adultos	89
5.5	Avaliação da Atividade Convulsivante	95
5.5.1	Teste da Convulsão Induzida por Pilocarpina	95
5.6	Efeitos do MFD sobre a Atividade da Acetilcolinesterase em hipocampo e corpo estriado de animais jovens e adultos tratados ou não com P400	101
6	DISCUSSÃO	106
7	CONCLUSÃO	119
	REFERÊNCIAS	121

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Transtorno do Déficit de Atenção/Hiperatividade (TDAH)

O Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade (TDAH) é a primeira doença neuropsiquiátrica que surgiu no século 20 e está associada a prejuízo acadêmico e social sendo tipicamente diagnosticada nos primeiros anos escolares da criança; havendo estudos de tratamentos com estimulantes desde 1937, sendo que a regulamentação e a aprovação do tratamento com estimulantes para crianças deram-se no início de 1960 (DOYLE, 2004).

Conforme nos pontua Lopes (2010), o TDAH acomete 5% da população mundial, que é de sete bilhões de habitantes, segundo dados de 2011 do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) atualmente existem sete bilhões de habitante no planeta, o que significa que 35 milhões de pessoas sofrem deste transtorno, trazendo-nos um dado significativo e passível de estudo.

Segundo Diniz *et al.* (2008) o TDAH acomete 5,29% das crianças no mundo inteiro. Conforme Benczik (2010) em pesquisa realizada nos Estados Unidos, de 3% a 5% das crianças em idade escolar possuem o transtorno. O TDAH perdura pela adolescência em 70% dos casos e na adultidade prevalece em 4,4%, independente da faixa etária. No Brasil, a estimativa, segundo estudos realizados em alguns estados brasileiros como Rio Grande do Sul e Paraíba, esse número de crianças portadoras do TDAH, é equivalente aos dados internacionais (BENCZIK, 2010).

O TDAH é caracterizado por desatenção, hiperatividade e impulsividade, sendo que os sintomas frequentemente persistem na vida adulta. As consequências desse transtorno incluem prejuízo educacional, profissional e risco aumentado de desenvolvimento de outras desordens psiquiátricas (ROHDE *et al.*, 1999; BIEDERMAN, 2003).

Segundo Silva (2009), o TDAH apresenta-se de formas diferenciadas, podendo ser do tipo predominantemente desatento, predominantemente hiperativo-impulsivo ou do tipo combinado e abrange ambos os sexos independente de classe sócio-econômica ou cultural.

A etiologia do TDAH é desconhecida. É possível que não tenha uma única causa e seja a via final comum de vários fatores que interajam (FARAONE *et al.*, 1999). Estão inclusos fatores como baixo peso ao nascer, exposição pré-natal ao álcool ou cigarro (MICK *et al.*, 2002); idade e saúde materna, duração do parto, sofrimento fetal (SPENCER *et al.*, 2002) e componentes genéticos, com estimativa de herdabilidade entre 0,5-0,9% (THAPAR *et al.*, 1999) aumentando o risco de apresentar a doença entre parentes de primeiro grau (BIEDERMAN *et al.*, 1992a).

Dentre os fatores de risco demonstrados acima, a hereditariedade tem sido muito estudada, mostrando que o TDAH é transmitido entre familiares (FARAONE, 2004; FARAONE *et al.*, 2001). De acordo com estudos realizados com gêmeos e com crianças adotadas, os genes têm um papel importante na transmissão do TDAH em uma família (BIEDERMAN; FARAONE, 2005).

O impacto desse transtorno na sociedade é enorme, considerando-se seu custo financeiro, o estresse nas famílias, o prejuízo nas atividades acadêmicas e vocacionais, bem como efeitos negativos na auto-estima das crianças e adolescentes (BIERDERMAN *et al.*, 1991). Estudos têm demonstrado que as crianças com TDAH apresentam um risco de desenvolverem outras doenças psiquiátricas na infância, adolescência e idade adulta (BIEDERMAN *et al.*, 1991; 2003).

O diagnóstico para o TDAH consiste basicamente em critérios clínicos, uma vez que ainda não é possível dispor de um exame específico para o diagnóstico, existindo apenas testes neuropsicológicos que não são específicos para o TDAH e que servem como auxílio, mas não como teste específico de diagnóstico. Estes critérios clínicos são estabelecidos por classificações nosológicas internacionais como o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM) e a Classificação Internacional de Doenças (CID).

O DSM-IV caracteriza o TDAH de acordo com os seguintes critérios: O Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais Texto Revisado (DSM-IV-TR) contém os critérios clínicos consagrados para o diagnóstico do TDAH. Basicamente, o DSM-IV-TR usa como critérios, o número, frequência e severidade dos sintomas de hiperatividade, impulsividade e desatenção. É essencial que estejam presentes antes dos sete anos de idade, persistentes por no mínimo seis meses, observados em dois ou mais ambientes (escola e casa), e que principalmente causem um prejuízo significativo no funcionamento acadêmico, social e

ocupacional dos seus portadores. Presença dos sintomas somente em casa ou somente na escola não qualifica o diagnóstico do TDAH (FARIAS; CORDEIRO, 2011).

Já a CID-10 inclui o transtorno em uma categoria específica denominada de Transtornos Hiperkinéticos, com basicamente as mesmas características sintomáticas que o DSM-IV, dando, porém a informação de que estes sintomas surgem normalmente antes dos cinco anos e não dos sete como referenciado no DSM-IV (CID-10, 2008).

Conforme nos pontua Barckely (1987 *apud* Benczik 2010), os sintomas do TDAH surgem nos primeiros anos de vida, porém existem estudos atuais que levantam a possibilidade dos sintomas surgirem até os 12 anos de idade, ao contrário do que afirma o DSM-IV da obrigatoriedade dos sintomas surgirem antes dos sete anos para serem considerados como parte do diagnóstico do TDAH.

A desordem não é exclusiva da infância e, embora a hiperatividade diminua com o tempo, a maioria dos pacientes continua a sofrer com suas conseqüências na adolescência e vida adulta. Com a progressão da idade, os sintomas de hiperatividade tendem a diminuir, persistindo a desatenção, que se torna mais proeminentes (FARAONE *et al.*, 2000).

Adicionando mais dificuldades ao diagnóstico do transtorno, o TDAH está frequentemente presente junto a outros diagnósticos, como transtorno de conduta (TC) e opositor-desafiador (TOD), além das chamadas desordens internalizadoras como depressão, ansiedade, dependência química e transtorno de aprendizado (BIEDERMAN *et al.*, 1992). No geral, até 65% das crianças com TDAH terão uma ou mais comorbidades. Entre 10 e 20% tem transtorno de humor, 20% têm transtorno de conduta (BIEDERMAN; NEWCORN; SPRICH, 1991) e 30 a 45% tem TOD (WALLIS *et al.*, 2008).

1.2 Fisiopatologia do TDAH

A fisiopatologia do TDAH envolve o circuito regulatório neural, incluindo o córtex pré-frontal e os gânglios basais que são modulados pela função dopaminérgica do mesencéfalo. O *locus ceruleus* também desempenha importante papel na atenção, é constituído basicamente de neurônios adrenérgicos. Estudos recentes demonstram que não só

neurotransmissores dopaminérgicos, mas também noradrenérgicos são implicados na fisiopatologia do TDAH (SOLANTO, 1998; HAN; GU, 2006).

Uma das primeiras teorias anatomofuncionais propostas para explicar a neurobiologia do TDAH descreve disfunções nas áreas frontais e suas conexões subcorticais no sistema límbico. No princípio, só havia o entendimento do envolvimento do sistema atencional anterior, e o TDAH era entendido como um fraco controle inibitório frontal sobre as estruturas límbicas. Com isso, a teoria de um único centro atencional, apesar de bem comprovada por estudos neuropsicológicos, de neuroimagem funcional e neurotransmissores, só pode explicar alguns casos de TDAH (FAGUNDES, 2006).

A visão anatomofuncional mais abrangente e completa deve incluir um circuito neural com dois sistemas atencionais: um anterior que tende a ser dopaminérgico e envolve a região pré-frontal e suas conexões subcorticais (responsável pelo controle inibitório e funções executivas, como a memória de trabalho) e outro posterior, principalmente noradrenérgico (responsável pela regulação da atenção seletiva) (RIESGO; RODHE, 2004). O *locus ceruleus* também desempenha papel importante na atenção e é constituído basicamente de neurônios adrenérgicos e se torna muito ativo em resposta a estímulos específicos (PLISKA, 1996). Apesar da importância das funções dos dois sistemas atencionais na neurobiologia do TDAH, ainda são poucas as demonstrações diretas das suas relações recíprocas no transtorno. Levy e Farrow revisaram as conexões pré-frontoparietais, que ligam o sistema atencional anterior e posterior e são o suporte anatomofuncional para a memória de trabalho (LEVY; FARROW, 2001).

A teoria proeminente é que no TDAH existe uma disfunção da neurotransmissão dopaminérgica, com uma conseqüente desregulação dos circuitos dopaminérgicos. Isto inclui a área frontal (pré-frontal, frontal motora, giro do cíngulo); regiões subcorticais (estriado, tálamo mediodorsal) e a região límbica cerebral (núcleo acumbens (NAc), amígdala e hipocampo) (CASTELLANOS, 1997; DINN *et al.*, 2001). Alguns trabalhos indicam uma evidente alteração destas regiões cerebrais resultando na impulsividade do paciente (RUBIA *et al.*, 2001).

Os sintomas relacionados a hiperatividade e impulsividade nesse transtorno parecem ser controlados pela via dopaminérgica nigroestriatal. Os sintomas de hiperatividade estão ligados ao córtex motor suplementar/ córtex pré-frontal motor e também ao estriado (núcleos

caudado e putâmen) que apresentam volume diminuído (ALEXANDER *et al.*, 1986) e anormalidades nos transportadores de dopamina (SPENCER *et al.*, 2005), enquanto os sintomas de impulsividade e desinibição social estariam ligados ao córtex frontal orbital (HESSILINGER *et al.*, 2002).

O córtex frontal orbital é parte do sistema límbico e está ligada a outra área importante deste sistema, o núcleo accumbens, via circuitos CSTC. Este circuito específico parece ser responsável por ligar um estímulo ascendente a emoções e transformar emoções em ações. Estas ações ocorrem através de liberação do neurotransmissor dopamina. Os estímulos capazes de desencadear tal resposta são usualmente poderosos, carregando o potencial de serem imediatamente transformados em ação, antes que sejam aplicados análise cognitiva, reflexão e julgamento. Esta é a essência da impulsividade, e pode ajudar a entender porque pessoas impulsivas agem de maneira auto-destrutiva e pouco racional (STAHL, 2008).

Portadores de TDAH apresentam uma ativação diminuída em neurônios pré-frontais. Em resposta a tarefas cognitivas que exijam atenção e memória de trabalho, estes indivíduos não apenas falham em ativar áreas como o córtex cingulado anterior, mas também recrutam áreas que, normalmente, não teriam esta função, resultando em resposta lenta, ineficiente e incorreta (STAHL, 2008). Acredita-se que o tônus de neurônios dopaminérgicos e noradrenérgicos esteja disfuncional em portadores do distúrbio (ARNSTEN; DUDLEY, 2005). Em consequência disto, neurônios piramidais no córtex pré-frontal não seriam capazes de distinguir entre estímulos importantes e distrações, levando à dificuldade em manter o foco de atenção. Estes déficits são revertidos por agonistas de receptores dopaminérgicos D1 e noradrenérgicos $\alpha 2$ (ARNSTEN; DUDLEY, 2005), que aumentam o tônus “aminérgico” nestes neurônios, diminuindo a interferência de estímulos distrativos. Ao contrário, a ativação excessiva dos circuitos de vigília também pode estar presente no TDAH (ARNSTEN; DUDLEY, 2005). Tão deletéria quanto a ativação diminuída, esta parece estar ligada à presença de estresse crônico e comorbidades como ansiedade, dependência de substâncias e estados de humor excessivamente elevados (mania) (STAHL, 2008).

1.3 Neurotransmissores envolvidos com o TDAH

Há duas hipóteses que envolvem o TDAH e as vias centrais, uma está relacionada ao funcionamento de um sistema de substâncias químicas, os neurotransmissores, (principalmente dopamina e noradrenalina), que passam informação entre as células nervosas (neurônios). Outra hipótese é de que o TDAH poderia advir de uma imaturidade dos sistemas de neurotransmissão e mais concretamente dos sistemas monoaminérgicos (GARCIA- MEDIAVILLA, 2003).

No Sistema Nervoso Central, monoaminas como Dopamina (DA), Serotonina (5-HT) e Noradrenalina (NA) tem papel modulatório na neurotransmissão e estão envolvidas em inúmeras funções fisiológicas e condições patológicas (GREENGARD, 2001; GAINTDINOV *et al.*, 2002).

1.3.1 Dopamina

A catecolamina dopamina parece ter um papel fundamental na etiologia do déficit de atenção. Essa definição foi baseada na neurofarmacologia dos psicoestimulantes utilizados no tratamento, em estudos de genética molecular e neuroimagem, além do comportamento e bioquímica de modelos animais (KYRLEY *et al.*, 2002).

O TDAH resulta, em parte, de déficits no sistema Dopaminérgico em estruturas corticais, como córtex pré-frontal (SULLIVAN; BRAKE, 2003) e áreas subcorticais, como o Núcleo Accumbens (Nac) e o estriado (RUSSEL *et al.*, 1995).

Estudos indicam a existência de ligação entre o TDAH e as alterações dos sistemas dopaminérgicos, tendo em vista (SOLANTO, 2002):

1. a ação da dopamina no comportamento motor;
2. a observação das técnicas de neuroimagem que relacionam a distribuição anatômica da dopamina com as regiões cerebrais alteradas no transtorno;
3. que alguns fármacos eficazes no tratamento do TDAH possuem atividades dopaminérgicas.

Ao contrário de neurotransmissores excitatórios, como o Glutamato, ou inibitórios, como o ácido γ - amino- butírico (GABA), a Dopamina pode ser excitatória ou inibitória, dependendo do tipo de receptor a que está ligada (NEVE; NEVE, 1997). A ativação dos receptores D1 e D5 estimula a Adenilato-Ciclase, enquanto sua ligação a receptores D2, D3 e D4 provoca inibição da Adenilato-Ciclase. A noradrenalina também age em receptores dopaminérgicos, possuindo alta afinidade por D4 (ARNSTEN, 2005). A interpretação das mudanças dopaminérgicas na patologia do TDAH é, assim, complicada por seu perfil de ação dual, excitatório e inibitório (VAN DER KOOJI; GLENNON, 2007).

Inicialmente, a dopamina foi considerada apenas um precursor da noradrenalina, mas estudos posteriores demonstraram que a distribuição da dopamina e da noradrenalina é significativamente diferente. Na verdade, mais da metade de catecolaminas presentes no cérebro é de dopamina (MISSALE *et al.*, 1998). A dopamina é de fundamental importância nas funções motora, motivacional e relacionadas à memorização.

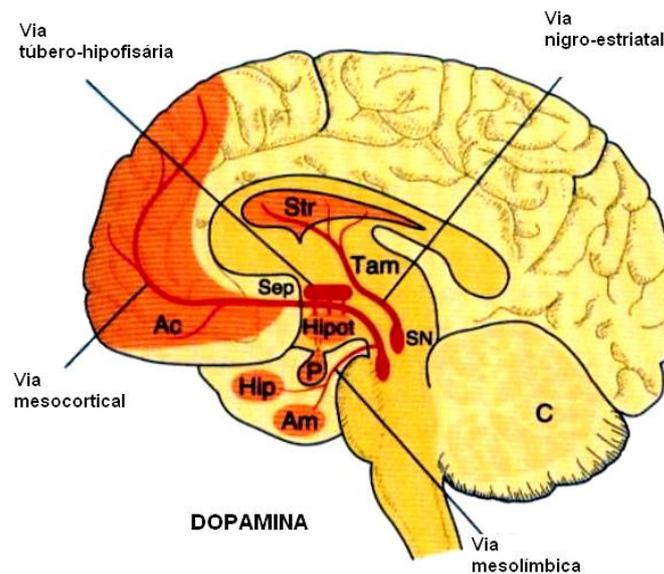
Existem quatro grandes vias dopaminérgicas no cérebro: mesolímbica, mesocortical, nigroestriatal e hipotálamo-túbero infundibular (**Figura 1.1**). A via mesolímbica projeta-se da área ventral-tegmental (VTA) para o núcleo accumbens e está envolvida na dependência a substâncias, recompensa (CALLAHAN *et al.*, 1997), depressão (causada pela depleção de dopamina) (KLIMEK *et al.*, 2002) e psicose (WATANABE *et al.*, 1998). A via mesocortical projeta-se da VTA para o córtex pré-frontal (PFC), e regula o processamento de informações, atenção seletiva, memória do trabalho (habilidade de reter informações na memória e utilizá-la para guiar ações futuras), linguagem e planejamento (GOLDMAN-RAKIE, 1996). O sistema nigro-estriatal inicia-se na substância nigra pars compacta (SNc) e regula funções motoras, dentre outras (MALER *et al.*, 1973). A via hipotálamo-túbero infundibular origina-se no núcleo arqueado do hipotálamo e projeta-se primariamente para a hipófise, regulando a secreção de prolactina e hormônio luteinizante (LH) (WIESEL *et al.*, 1978).

As vias mesolímbica e mesocortical (juntas chamadas de via mesolímbocortical) parecem ser as mais envolvidas na gênese do déficit de atenção (SULLIVAN; BRAKE, 2003). A dopamina mesolímbica parece estar desregulada nos portadores do transtorno, uma vez que recompensas menores e imediatas são preferidas quando comparadas a maiores, mas tardias (SONUGA-BARKE *et al.*, 1992). Esta “impaciência maladaptativa” para esperar por recompensas maiores é um dos aspectos da impulsividade observados no transtorno e parece ser controlado pelo NAc (CARDINAL *et al.*, 2004). A dopamina mesocortical está ainda

envolvida na atenção seletiva e memória de trabalho e este sistema parece hipofuncionante em modelos animais de déficit de atenção (DAVIDS *et al.*, 2002).

A via nigro-estriatal também parece contribuir para a gênese do TDAH no que se refere à hiperatividade. Demonstrou-se que o transportador de dopamina (DAT), um regulador importante da neurotransmissão dopaminérgica, encontra-se diminuído em resposta à administração do metilfenidato (MFD) a pacientes portadores de TDAH (KRAUSE *et al.*, 2000).

Figura 1.1 – Vias dopaminérgicas no cérebro



Fonte: Rang *et al.*, 2003

1.3.2 Noradrenalina

O papel da noradrenalina na fisiopatologia do Déficit de Atenção há tempo vem sendo proposto. As implicações da noradrenalina no TDAH se assemelham às razões da dopamina (eficácia terapêutica de fármacos com ação noradrenérgica, distribuição anatômica da noradrenalina, etc), também seu papel modulador de funções corticais como a atenção, a vigilância e as funções executivas (GARCIA- MEDIAVILLA, 2003).

KORNETSKY (1970), após observar os efeitos das anfetaminas no comportamento, foi o primeiro a formular uma hipótese noradrenérgica do TDAH (que propôs que a hiperatividade seria resultante de transmissão noradrenérgica aumentada) que coincidiu como o momento em que se propõe a desatenção como o sintoma determinante do transtorno (NARBONA-GARCIA *et al.*, 1999). Uma década depois, ZAMETKIN e RAPOPORT (1987) propuseram que o TDAH parece estar associado com um déficit nas conexões inibidoras fronto-estriatais, mediada, por sua vez, por neurônios noradrenérgicos e atuam sobre estruturas estriatais baixas que são predominantemente compostas de neurônios dopaminérgicos. Neste sentido, existem dados que confirmam que se necessita de níveis adequados de noradrenalina para o funcionamento do córtex pré-frontal e que níveis altos de liberação de catecolaminas (por exemplo, durante o estresse) interrompem o funcionamento cognitivo do córtex pré-frontal (BIEDERMAN *et al.*, 1999; STAHL, 2000). Especula-se ainda sobre o papel dominante da adrenalina e seu efeito na atividade do *locus ceruleus* no TDAH (SOLANTO, 1998). Contudo, a hipótese noradrenérgica do TDAH não pode ser confirmada completamente, o que tem levado alguns autores a ressaltar a importância da interação de dopamina e noradrenalina e a sugerir que as condutas dependentes de dopamina se regulariza pela atividade noradrenérgica (SOLANTO, 1998; BIEDERMAN *et al.*, 1999).

A dopamina e noradrenalina possuem a mesma via de síntese, pois são sintetizadas a partir do aminoácido L-tirosina. Duas reações transformam a L-tirosina em dopamina: a primeira é catalisada pela enzima tirosina-hidroxilase (TH) a qual converte L-tirosina em L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA). A tirosina-hidroxilase é considerada a enzima limitante desta via. O segundo passo é a descarboxilação da L-DOPA, catalisada pela enzima DOPA-descarboxilase, a qual produz dopamina (DA) (**Figura 1.2**), que sofre ação da dopamina β -hidroxilase para tornar-se noradrenalina (NA) (FELDMAN *et al.*, 1997). Esse é o ponto-chave da síntese de dopamina, pois na ausência da enzima dopamina β -hidroxilase nos neurônios dopaminérgicos não há conversão de DA em NA, ocorrendo, assim, o acúmulo de DA nas vesículas sinápticas.

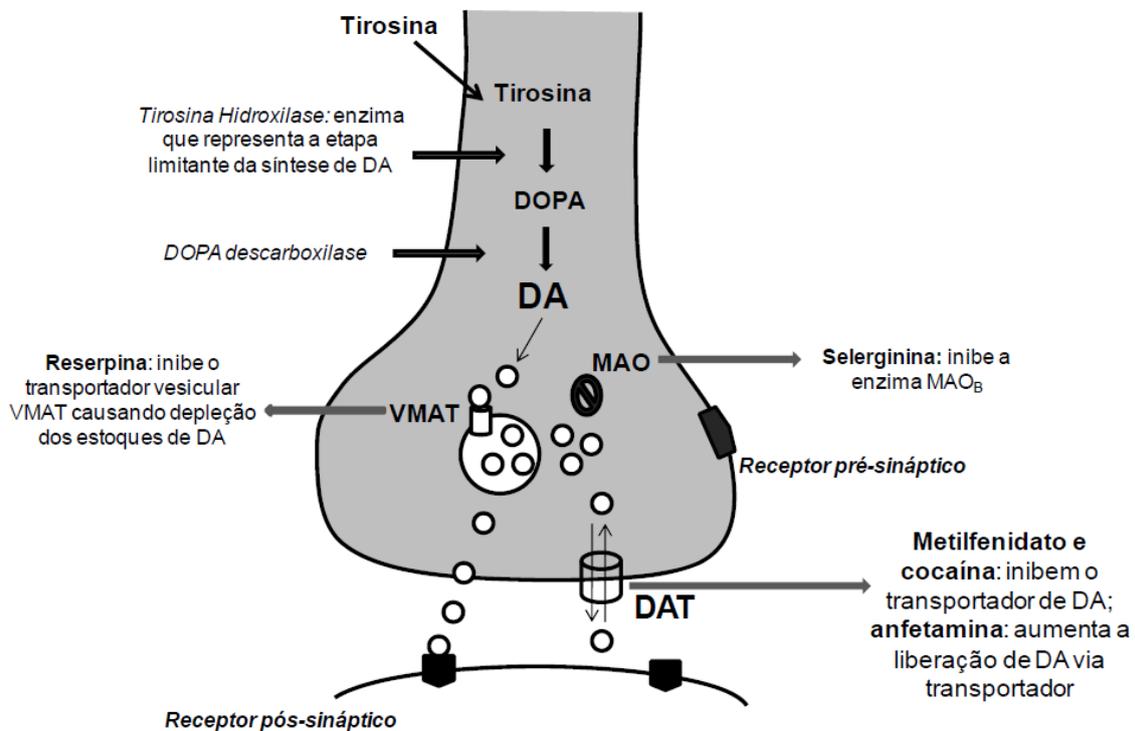
Após serem sintetizadas, as catecolaminas se difundem pela fenda sináptica e podem ser catabolizadas pelas enzimas monoamina oxidase (MAO) e catecol o-metil transferase (COMT) que estão amplamente distribuídas no corpo e no Sistema Nervoso Central (SNC). A MAO está localizada na parte externa da membrana mitocondrial (COSTA; SANDLER, 1972) e pela sua localização intracelular, tem um papel importante na inativação das

catecolaminas que estão livres na fenda sináptica. A COMT age nas catecolaminas extraneuronais. Os metabólitos produzidos pela ação dessas enzimas são: ácido diidrofenil acético (DOPAC) e ácido homovalínico (HVA).

O transportador de Noradrenalina (NAT) localiza-se na membrana plasmática de neurônios noradrenérgicos, onde é responsável pela recaptação de noradrenalina presente na fenda sináptica. O NAT serve como mecanismo primário de inativação da transmissão noradrenérgica. Este é um processo competitivo, onde uma variedade de amins naturais (como dopamina) e outras drogas podem ocupar o transportador e influenciar na captação do neurotransmissor. Drogas de abuso como cocaína e antidepressivos como desipramina, venlafaxina, bupropiona e reboxetina bloqueiam o transporte, causando assim uma elevação nas concentrações sinápticas de noradrenalina e potenciação da ativação de receptores pós-sinápticos (TELLIOGLU; ROBERTSON, 2001; TRENDELEMBURG, 1991; AMARA; SONDEERS, 1998).

A alteração no sistema noradrenérgico tem sido implicada em vários distúrbios como transtorno do déficit de atenção e hiperatividade, depressão e ansiedade (TIMMONS *et al.*, 2004). Certos componentes do sistema noradrenérgico podem estar envolvidos com excitação e medo. Assim, a ansiedade e a perda do prazer, características da melancolia e da depressão podem estar relacionadas à desregulação do sistema noradrenérgico (SCHILDKRAUT, 1965; KANDEL *et al.*, 2000; KALIA, 2005; HALES; YUDOFKY, 2006; YUDOFKY;HALES, 2006).

Figura 1.2 - Esquema simplificado dos eventos envolvidos na síntese e recaptação da dopamina (DA).



A síntese de DA inicia-se pela transformação do aminoácido Tirosina, que provém da dieta, em DOPA, pela ação da enzima tirosina hidroxilase, que representa a etapa limitante da síntese de dopamina. Na sequência, a DOPA é convertida em DA pela ação da enzima DOPA descarboxilase. A DA recém-sintetizada é armazenada em vesículas, onde permanece protegida da degradação enzimática via MAO, até ser liberada por excitação. Uma vez liberada a dopamina atua em receptores pré e pós-sinápticos tendo sua ação interrompida principalmente pela recaptação via transportador DAT. Esse transportador representa o principal alvo de atuação dos psicoestimulantes, dentre eles o metilfenidato. Modificado de Nestler *et al.*, 2009.

1.3.3 Serotonina

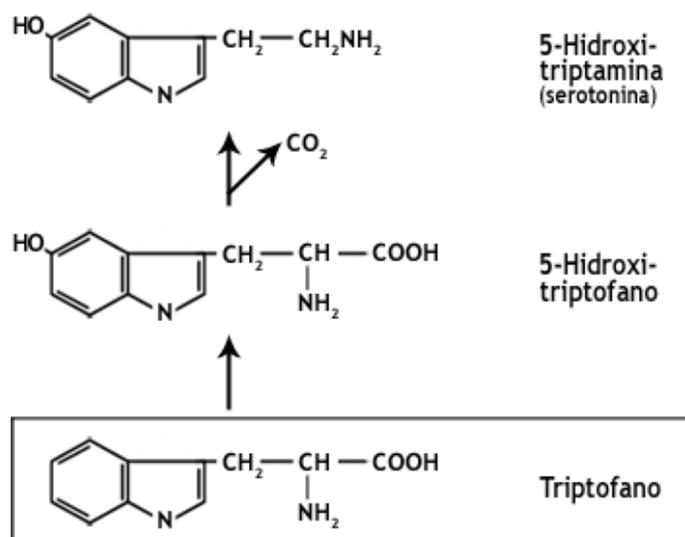
Alguns estudos, como o de RETZ *et al.* (2000), têm implicado também serotonina (5HT) na etiologia do déficit de atenção. A desordem é associada com o alelo 5HTR1B 861G (HAWI *et al.*, 2002) e com o alelo longo 5HTT (RETZ *et al.*, 2002). Demonstrou-se anteriormente que receptores 5HT modulam a função dopaminérgica. Assim, a eficácia

clínica de drogas que agem em sistemas serotoninérgicos se deveria em parte aos seus efeitos em sistemas dopaminérgicos (ALEX e PEHEC, 2007). A natureza e direção desta interação, no entanto, dependeria da atividade basal dos sistemas de DA e 5HT, ou seja, se estes sistemas estariam ativados ou não (ALEX e PEHEC, 2007).

GARCIA- MEDIAVILLA (2003) menciona estudos com ratos os quais mostram que os altos níveis de dopamina no estriado produzem uma conduta hiperativa e estado dopaminérgico alterado poderia determinar a potência dos efeitos inibidores serotoninérgicos; a serotonina, portanto poderia modular a hiperatividade sem produzir alterações nas concentrações de dopamina.

A 5-hidroxitriptamina (5-HT, serotonina) é sintetizada a partir do aminoácido essencial L-triptofano após sua captação do sangue para o cérebro. A fonte primária de triptofano é a dieta. O triptofano é convertido a 5-hidroxitriptofano pela ação da triptofano hidroxilase, etapa limitante da reação. O 5-hidroxitriptofano, por sua vez, é convertido a 5-hidroxitriptamina (serotonina) pela ação da enzima L-aminoácido aromático descarboxilase. Após a síntese, a serotonina é armazenada nos grânulos secretores e liberada dos neurônios serotoninérgicos por exocitose. A principal via de metabolismo da 5-HT envolve a desaminação oxidativa pela MAO, com formação de um intermediário acetaldeído (5-hidroxiindolacetaldeído), que, por fim, é convertido em ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), pela enzima aldeído desidrogenase (**Figura 1.3**).

Figura 1.3 - Síntese da 5-hidroxitriptamina (serotonina)



Fonte: <http://www.orgone.com.br/imagens/figura2.gif>

1.4 Ansiedade

Os transtornos da ansiedade estão entre as formas mais comuns de psicopatologia em todo o mundo (HELLION-IBARROLA *et al.*, 2006; ROSEN *et al.*, 2008), com uma prevalência estimada ao longo da vida de 28,8% e uma prevalência estimada em 12 meses de 18,1% na população geral (GARAKANI *et al.*, 2006).

A ansiedade normal pode ser definida como um difuso e desagradável sentimento de apreensão, muitas vezes acompanhada por sintomas autonômicos, tais como dores de cabeça, palpitações, aperto no peito, agitação e desconforto gástrico leve, que podem ser uma resposta a uma situação ou estímulo ameaçador. Enquanto o medo é específico, a ansiedade é considerada difusa e desfocada (KEELEY; STORCH, 2009).

Um agente ansiolítico deve reduzir a ansiedade e exercer um efeito calmante, com pouco ou nenhum efeito sobre as funções motoras ou mentais. Várias drogas ansiolíticas usadas rotineiramente, principalmente os benzodiazepínicos (diazepam, alprazolam, bromazepam, clonazepam) estão entre as classes de drogas que modulam alostericamente os receptores gabaérgicos do tipo A (OLSON, 2002).

Em termos biológicos, a ansiedade induz a uma forma particular de inibição de comportamento (PESTANA, 2010). Em animais, esta inibição comportamental pode tomar a forma de imobilidade ou de supressão de uma resposta comportamental, tal como pressionar uma alavanca para obter comida (RANG; DALE, 2007). O comportamento de medo ou ansiogênico em animais também pode ser expresso pela aversão espontânea ao ambiente aberto (TREIT *et al.*, 1993), iluminado e alto (BUSH *et al.*, 2007).

Alguns autores acreditam que a ansiedade pode modificar os sintomas do TDAH, principalmente diminuindo a impulsividade (LIVINGSTON *et al.*, 1990). Na avaliação neuropsicológica, crianças portadoras de TDAH e transtorno de ansiedade apresentam maiores dificuldades para executar tarefas mais complexas, que exigem maior demanda da memória de trabalho, do que crianças que apresentam apenas TDAH. Nessas tarefas, em que são exigidos processamento ativo e armazenamento de informações, crianças com a comorbidade apresentam desempenho inferior. Em contraste, em testes nos quais é avaliado o

tempo médio de reação, o desempenho é melhor do que em crianças só com TDAH (BADDELEY, 1986).

Estudo documenta que as crianças com essa comorbidade respondem igualmente bem ao tratamento comportamental e à utilização de medicamentos. Esse grupo de pacientes pode ser especialmente propício para intervenções psicoterápicas (JENSEN *et al.*, 2001).

1.5 Depressão

A depressão é uma doença de curso episódico ou crônico, debilitante e que apresenta uma alta incidência, sendo uma grande preocupação na saúde pública (HELLIÓN-IBARROLA *et al.*, 2006; GALDINO, 2009). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a depressão atualmente representa a segunda causa de incapacidade nos países desenvolvidos. Nos últimos anos, muito esforço tem sido dedicado visando melhorar o diagnóstico e tratamento dessa doença (ANSSEAU *et al.*, 2009).

Estima-se que em 2020 a depressão será a segunda maior causa de incapacidade no mundo (MARTIN *et al.*, 2007; CONKLIN *et al.*, 2009). Os indivíduos deprimidos apresentam anedonia (dificuldade em experimentar experiências prazerosas), irritabilidade, dificuldade de concentração, anormalidades do sono e do apetite. Além da mortalidade associada ao suicídio, pacientes depressivos são mais susceptíveis a desenvolver doenças coronárias e diabetes tipo 2 (KRISHNAN; NESTLER, 2008). É frequentemente associada com a ansiedade em um contexto clínico. A ansiedade pode predispor ou aumentar a vulnerabilidade dos indivíduos à depressão ou pode apresentar-se como uma comorbidade (BASSO *et al.*, 2009; DEMPSEY *et al.*, 2009).

Em animais, não há condição conhecida que corresponda à condição inata da depressão em seres humanos, mas vários procedimentos foram descritos, que produzem em animais estados comportamentais (retirada da interação social, perda de apetite, atividade motora reduzida, estresse, situações inescapáveis, entre outros), típicos da depressão humana (PORSOLT *et al.*, 1987).

A principal teoria bioquímica da depressão é a “hipótese das monoaminas”, que postula que a depressão é provocada por uma diminuição funcional de monoaminas no

cérebro. Esta hipótese foi originada a partir de observações clínicas, onde foi observado que a imipramina e a iproniazida, dois compostos não relacionados estruturalmente e que não tinham uso psiquiátrico, tinham potentes efeitos antidepressivos em humanos. Posteriormente, descobriu-se que essas substâncias aumentavam a transmissão central de serotonina, dopamina e noradrenalina. Outra evidência clínica foi o uso da reserpina, um antigo agente antihipertensivo que atua depletando os estoques de monoaminas e produz sintomas depressivos em humanos (KRISHNAN; NESTLER, 2008).

Crianças com TDAH costumam apresentar dificuldades sociais e acadêmicas. A presença de sintomatologia depressiva sobreposta aos sintomas de desatenção e/ou hiperatividade exacerba as dificuldades apresentadas por essas crianças, ocasionando menor capacidade atenta e mnemônica, baixo rendimento escolar, sensação de fracasso e agravamento da baixa auto-estima. A depressão pode aumentar também a agitação psicomotora e a impulsividade já apresentadas pelas crianças com TDAH, tornando-se mais exposta a acidentes e comportamentos disruptivos (BIEDERMAN *et al.*, 1998).

Estudo realizado na Universidade Federal do Rio de Janeiro (GEDA) foi encontrado prevalência de aproximadamente 14% na amostra clínica estudada, utilizando-se o questionário padronizado P-ChIPS (SOUZA *et al.*, 2001). A alta prevalência de depressão em crianças com TDAH foi documentada em um estudo de Biederman (1995) envolvendo 136 crianças referidas a um centro de tratamento. Nessa amostra, 76% apresentaram comorbidades de depressão com TDAH, sendo que, de 66 crianças com sintomatologia depressiva grave, 74% apresentavam diagnóstico de TDAH.

1.6 Epilepsia

O termo convulsão refere-se à alteração transitória do comportamento recorrente do disparo rítmico, sincrônico e desordenado de populações de neurônios cerebrais. Já o termo epilepsia refere-se a um distúrbio da função cerebral caracterizado pela ocorrência periódica e imprevisível de convulsões (BRUNTON, 2006).

A epilepsia é o segundo distúrbio neurológico mais comum depois do acidente vascular cerebral, afetando 0,5 a 1% da população (ALI *et al.*, 2004). Elas podem sofrer conseqüências profundas, inclusive morte súbita, ferimentos, problemas psicológicos e transtornos mentais. (MARCHETTI; DAMASCENO, 2000). Também à epilepsia se associam problemas sociais e econômicos. Pode ser considerado um problema significativo de saúde pública (GOMES, 1994; 1997).

As crises convulsivas podem se desenvolver com graus diferentes de envolvimento muscular. O evento motor consiste em aumento ou redução da contração muscular. O aumento da contração muscular pode ser do tipo tônico (significando contração muscular mantida durante segundos ou minutos), clônico (contrações musculares, seguidas de relaxamento gerando abalos musculares sucessivos) ou mioclônicos (contrações musculares muito breves, semelhantes a choques). A diminuição da contração muscular caracteriza as mioclonias negativas ou crises atônicas (ENGEL, 2001).

A comorbidade psiquiátrica mais prevalente nos pacientes com epilepsias, principalmente nos casos refratários é o TDAH, cujos sintomas podem estar presentes em mais de 60% dos pacientes que possuem epilepsias refratárias ao tratamento medicamentoso (THOME-SOUZA *et al.*, 2004; SHERMAN *et al.*, 2007). A prevalência do TDAH na população é em torno de 3 a 7% (ROHDE *et al.*, 2004; POLANCZYK *et al.*, 2007). Em pacientes portadores de epilepsia, o TDAH ocorre em cerca de 20 a 40%, portanto, muito acima da prevalência do TDAH na população em geral (DUNN *et al.*, 2003; SÁNCHEZ-CARPINTERO; NEVILLE, 2003; PALMINI, 2004; HAMODA *et al.*, 2009).

Muitos mecanismos relacionados à epilepsia tentam justificar esta alta prevalência, como os efeitos adversos das drogas antiepilépticas utilizadas, a cronicidade da epilepsia, a influência das descargas epileptiformes interictais na vigília, atenção, memória e linguagem dos pacientes portadores de epilepsia (PALMINI, 2004; HAMODA *et al.*, 2009). As evidências atuais apontam para uma relação bidirecional entre crises epiléticas, transtornos do humor e TDAH, de modo que não apenas pacientes com epilepsia apresentam um risco maior de desenvolver estes transtornos, mas também pacientes com transtorno do humor e com TDAH apresentam maior susceptibilidade para o desenvolvimento de crises epiléticas (KANNER, 2008; HAMODA *et al.*, 2009).

A fisiopatologia da convulsão ainda não está completamente definida. Os modelos de convulsão em animais reproduzem alterações comportamentais e eletroencefalográficas que são semelhantes à crise convulsiva em humanos (BEN-ARI *et al.*, 1980, 1981). Esses modelos são utilizados para estudar o envolvimento dos sistemas de neurotransmissores como moduladores da epileptogênese, como também permitem observar alterações comportamentais, histopatológicas, e outros dados neuroquímicos relacionados ao processo convulsivo (CAVALHEIRO *et al.*, 1994; MARINHO *et al.*, 1997, 1998, COSTA-LOTUFO *et al.*, 2002).

A epilepsia do lobo temporal humana é uma desordem crônica, freqüentemente associada a um estímulo inicial precipitante como estado epiléptico, trauma e convulsões febris prolongadas (ENGEL; PEDLEY, 1997). É um dos distúrbios neurológicos mais comuns, apresentando taxa de prevalência de 5% (DELORENZO *et al.*, 2001).

As convulsões induzidas por pilocarpina podem produzir danos neuronais em diversas áreas e, especialmente, nas estruturas límbicas, causando perda neuronal no hipocampo, amígdala, córtex piriforme, córtex entorrinal, septum lateral, tálamo, neocórtex e substância negra, sugerindo o envolvimento de diferentes áreas durante o estabelecimento do processo epiléptico (BORELLI *et al.*, 2002; CLIFFORD *et al.*, 1987; HONCHAR *et al.*, 1990; MARINHO *et al.*, 1997; TURSKI *et al.*, 1983).

1.7 Neurotransmissão colinérgica

Diversos estudos sugerem o envolvimento do sistema colinérgico na epilepsia humana (TURSKI *et al.*, 1983a; JOPE *et al.*, 1986; HIRSCH *et al.*, 1992; NATHANSON *et al.*, 1999; MICHOTTE *et al.*, 2000; PERSINGER *et al.*, 2001). Este sistema tem como neurotransmissor a acetilcolina (ACh). A acetilcolina (ACh) é um mediador químico de sinapses no sistema nervoso central (SNC), no sistema nervoso periférico e também na junção neuromuscular. A ACh, seus receptores e o aparato enzimático responsável por sua síntese e degradação constituem o sistema de neurotransmissão colinérgica (BRUNEAU; AKAABOUNE, 2006).

A ACh é um importante neurotransmissor excitatório no cérebro (NATHANSON *et al.*, 1999; OLNEY *et al.*, 1983 e 1986). A estimulação cerebral induzida pela ACh ocorre através da ativação dos receptores colinérgicos cerebrais, onde cerca de 99% destes são muscarínicos, e 1% são nicotínicos (ELGOYHEN *et al.*, 2000; PEPEU, 1983). Assim, a maioria dos efeitos de ativação colinérgica no cérebro é provavelmente devido à estimulação dos receptores colinérgicos muscarínicos (RCM).

Os RCM estão amplamente distribuídos em todo o corpo e exercem inúmeras funções vitais no cérebro e no sistema nervoso autônomo (JOPE, 1979; LEFKOWITZ *et al.*, 1996). No cérebro, são importantes na memória e na fisiopatologia das doenças afetivas e na esquizofrenia (DAVIS *et al.*, 1975; 1980). No fim de 1980, através de técnicas de biologia molecular, foram identificados 5 subtipos de RCM (M₁, M₂, M₃, M₄ e M₅) (BONNER *et al.*, 1987; LIAO *et al.*, 1989; NATHANSON *et al.*, 1999).

A administração periférica de altas doses do agonista muscarínico colinérgico pilocarpina produz convulsões em roedores (TURSKI *et al.*, 1989; MARINHO *et al.*, 1997). O início dessas convulsões pode ser bloqueado pela atropina e atenuado pela inibição da atividade colinérgica endógena (JOPE *et al.*, 1986; 1992; MORRISETT *et al.*, 1987a; MARINHO *et al.*, 1997). Assim, o processo convulsivo, decorrente do tratamento de ratos com pilocarpina em doses convulsivas, parece depender da ativação dos receptores muscarínicos, podendo envolver o metabolismo dos fosfoinosítídeos e sendo capaz de produzir lesões cerebrais e alterações comportamentais (MARINHO *et al.*, 1997; 1998).

A pilocarpina também altera os níveis do neurotransmissor colinérgico (associado às convulsões induzidas em ratos pela administração de agonistas colinérgicos, principalmente pilocarpina, está o intenso aumento observado na síntese e liberação da ACh), podendo, ainda, produzir alterações nos níveis de outros neurotransmissores (noradrenalina, dopamina, serotonina, glutamina e GABA), embora pouco se conheça sobre estas alterações (MICHOTTE *et al.*, 2000; DELORENZO *et al.*, 2000; RAOL *et al.*, 2001; COSTA-LOTUFO *et al.*, 2002).

1.8 Correlação das áreas cerebrais

Várias estruturas cerebrais estão envolvidas na organização do comportamento emocional, tais como hipocampo e corpo estriado. Estas estruturas possuem importante interação anatômica e estão envolvidas em modalidades funcionais interdependentes que coordenam o comportamento emocional e cognitivo.

1.8.1 Hipocampo

O hipocampo possui importantes conexões com o tálamo, hipotálamo e córtex entorrinal. Estas conexões lhe permitem atuar como conferidor das informações sensoriais provenientes do córtex entorrinal, e confrontá-las com as previsões geradas no sistema límbico, que, por sua vez, integra informações de outras partes do cérebro, incluindo o córtex pré-frontal. Quando há incompatibilidade entre os eventos ambientais e o que está armazenado, o hipocampo passa a funcionar como modalidade controle, que gera inibição comportamental, acompanhada por aumento de atenção ao meio e do aumento da vigilância aos estímulos potencialmente perigosos (McNAUGHTON; GRAY, 2000; BRANDÃO, 2001). Esta função hipocampal é de grande importância em situações em que se estabelece o conflito entre evitar o estímulo potencialmente perigoso e aproximar-se dele (McNAUGHTON; GRAY, 2000).

A literatura sugere o hipocampo como sítio de origem da atividade convulsiva induzida por pilocarpina (TURSKI *et al.*, 1983a,b). Outros achados sugerem como sítio inicial dessas convulsões o pálido ventral ou núcleo accumbens (CLIFFORD *et al.*, 1987). Estudos eletroencefalográficos e autoradiográficos, realizados posteriormente, sugeriram ambas as áreas como locais de início das convulsões (LABANDEIRA-GARCIA *et al.*, 1994; KULKARNI; GEORGE, 1995).

1.8.2 Corpo estriado

O corpo estriado é uma estrutura onde estímulos com valores afetivos e emocionais interagem com áreas motoras (MOGENSON *et al.*, 1980; PENNARTZ *et al.*, 1994). O corpo estriado é considerado uma importante área de produção de respostas emocionais, contudo, mudanças no seu conteúdo monoaminérgico podem implicar em várias desordens cerebrais, incluindo a ansiedade (SESACK; PICKEL, 1992).

O corpo estriado funciona como uma interface entre os sistemas motivacional e motor, de modo a servir de canal por onde o estímulo com valor afetivo e emocional acessa as vias eferotoras-motoras (MOGENSON *et al.*, 1980; PENNARTZ *et al.*, 1994).

Sabe-se que a exposição a um estresse moderado ativa o sistema dopaminérgico no córtex pré-frontal enquanto não afeta o metabolismo dopaminérgico no estriado. Por outro lado, a exposição a um estresse mais intenso resulta em um recrutamento do sistema dopaminérgico mesolímbico que inerva o corpo estriado (ROTH *et al.*, 1988; GOLDSTEIN *et al.*, 1996).

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). 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.

1.9 Metilfenidato

Existem inúmeras pesquisas acerca do TDAH, porém o tratamento ainda gira em torno de uma polêmica discussão acerca da terapia medicamentosa, que embora amenize os sintomas do TDAH, causam efeitos colaterais desastrosos (LOPES, 2010).

Há pelo menos três décadas foi descoberto que os psicoestimulantes, como as Anfetaminas e o Metilfenidato, foram capazes não só de diminuir a hiperatividade e a impulsividade, mas também de melhorar a atenção (FREDRIKSSON *et al.*, 2004). Suas propriedades farmacológicas têm sido bem caracterizadas, mas seu mecanismo de ação não está completamente estudado (SOLANTO, 1998).

O Metilfenidato (MFD, metil 2-fenil-2- (2-piperidil) acetato – nomenclatura IUPAC) (**Figura 1.4**) é um derivado da piperidina e está relacionado estruturalmente à anfetamina. 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).

Os medicamentos estimulantes utilizadas no tratamento do TDAH foram, em sua maioria, de ação curta, com meia-vida em torno de 3 a 4 horas, requerendo múltiplas tomadas diárias. Hoje, estão disponíveis em diferentes formulações de liberação prolongada, durando entre 8 e 12 horas (VAN DER KOOJI *et al.*, 2007).

O MFD no Brasil se apresenta em duas formas, uma de absorção imediata, conhecida como Ritalina® que tem duração de ação de três a quatro horas sendo ministrado de três a cinco vezes ao dia em dose disponível de 10 mg. A outra forma é de ação prolongada com os nomes comerciais de Ritalina LA® e Concerta LA®. A Ritalina LA® pode ser tomada de uma a duas vezes ao dia com dosagens de 20, 30 ou 40 mg, enquanto o Concerta LA® tem uma duração de ação de 12 horas, com apenas uma dose diária, e se apresenta em dosagens de 18, 36 e 54 mg, sendo também de liberação prolongada (LOUZÃ; MATTOS, 2007).

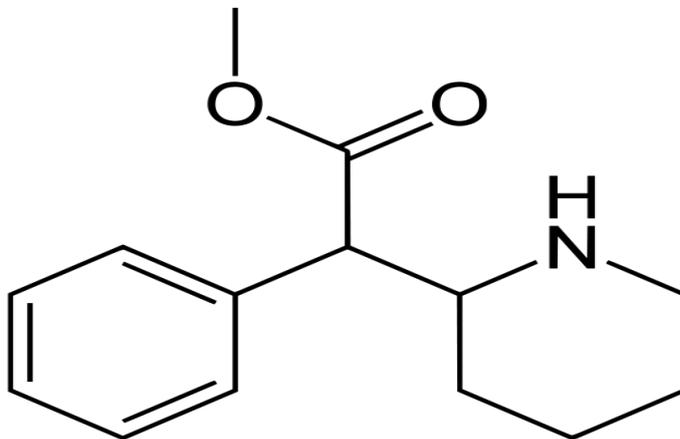
O MFD apresenta ação curta, com uma meia-vida de 2 a 3 horas. A concentração plasmática é aproximadamente 10 ng/ml 2 horas após a ingestão oral (CHAN *et al.*, 1983). Sua absorção é completa e rápida, atravessando a barreira hematoencefálica facilmente, devido a sua lipossolubilidade. Após a absorção, 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 (KIMKO *et al.*, 1999; SWANSON *et al.*, 2003). Para a obtenção de melhor resposta terapêutica, a dose deve ser ajustada individualmente (SWANSON *et al.*, 1991). Os efeitos colaterais mais comuns são agitação, diminuição do apetite, euforia, insônia e nervosismo. A intoxicação é caracterizada por um quadro de hiperatividade simpática, incluindo hipertensão, taquicardia e hipetermia (CORDIOLI *et al.*, 2005).

É considerado um modesto estimulante do SNC, mas com proeminentes efeitos em atividades mentais e motoras. Em grandes doses provoca sinais de estimulação generalizada do SNC, que podem levar a crises convulsivas e apresenta propriedades farmacológicas essenciais idênticas às anfetaminas. O MFD também compartilha o potencial de uso abusivo das anfetaminas, considerado como substância controlada da classe II nos EUA. O fármaco está envolvido no controle da atenção em nível de córtex cerebral. Além do TDAH, está indicado para o tratamento da narcolepsia (GOODMAN; GILMAN, 2006).

Figura 1.4 - Estrutura química do metilfenidato



Fonte: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Methylphenidate-2D-skeletal.svg>

Existe uma considerável quantidade de dados atestando a segurança e eficácia do MFD; entretanto, o seu mecanismo de ação ainda não está completamente elucidado (SOLANTO, 1998; CONNERS, 2002). Estudos mostram que o MFD bloqueia o

transportador de dopamina, resultando no aumento da disponibilidade desse neurotransmissor na fenda sináptica, principalmente em estriado e córtex pré-frontal. Embora o MFD tenha uma maior afinidade pelos transportadores de dopamina, ele também atua sobre os sistemas noradrenérgicos e serotoninérgicos, bloqueando seus transportadores (GATLEY *et al.*, 1996; KUZENSKI; SEGAL, 1997).

VOLKOW *et al.* (2005) relataram que o efeito do MFD tem duas hipóteses. A primeira considera que pelo bloqueio dos DAT, a dopamina extracelular ativa autoreceptores locais pré-sinápticos, levando a uma atenuação da dopamina liberada em resposta a fase celular dopaminérgica de gatilho (SEEMAN; MADRAS, 1998). A segunda hipótese sugere que os bloqueios dos DAT dominam os efeitos inibitórios da ativação de autoreceptores, o que leva a um efeito de rede acumulando dopamina na sinapse e amplificando o sinal dopaminérgico. A dopamina está envolvida em diversas doenças do SNC, como Doença de Parkinson, esquizofrenia e TDAH, em certos distúrbios endócrinos e na dependência de drogas (AZMITIA, 1995).

A disfunção nos sistemas dopaminérgicos e noradrenérgicos podem levar a auto-regulação como a atenção seletiva (neurônios noradrenérgicos) e a motivação (sistema dopaminérgicos), os quais estão implicados na patogênese do TDAH (DOUGHERTY *et al.*, 1999; SOLANTO, 1998). O efeito do metilfenidato pode envolver outros sistemas de neurotransmissores como noradrenalina (KUCZENSKI; SEGEL, 1997), serotonina (GAINETDINOV *et al.*, 1999) e glutamato (GAINETDINOV, 2001).

Mesmo sabendo do envolvimento de diversos fatores relacionados com a patologia do TDAH, há ainda a necessidade de mais estudos sobre a fisiopatologia do TDAH e do envolvimento dos sistemas de neurotransmissores e a descoberta mais elucidada do mecanismo de ação do metilfenidato e de outros medicamentos para o tratamento desse transtorno.

2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

O Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade é um distúrbio neuropsiquiátrico comum que causa transtornos sociais, acadêmicos e ocupacionais em crianças, adolescentes e adultos (TAN; APPETON, 2005; WIGAL, 2009). A prevalência desse transtorno nos Estados Unidos da América é 6-9 % nos jovens (isto é, crianças e adolescentes) e 3-5% nos adultos. A taxa de prevalência nos jovens é semelhante em todo o mundo (DUNN, 2003; DOPPHEIDE; PLISZKA, 2009).

Até recentemente, acreditava-se que havia uma remissão na adolescência ou no início da idade adulta. Entretanto, estudos longitudinais mostram que 75% das crianças mantêm sintomas durante a adolescência e aproximadamente 65% das crianças continuam a apresentar sintomas na idade adulta, resultando em uma prevalência de 3 a 5% na população adulta (KESSLER *et al.*, 2006).

A farmacoterapia disponível, até então, parece ser efetiva em todas as idades, mesmo nos pré-escolares e naqueles que têm a TDAH instalada na vida adulta. Estimulantes, tal como metilfenidato e anfetamina, são os mais efetivos e parecem ser seguros (DOPPHEIDE; PLISZKA, 2009; LEONARD, 2004). Contudo, casos de mortes súbitas em crianças e adolescentes, efeitos adversos sobre o Sistema Nervoso Central (SNC) e efeitos sobre o crescimento têm propiciado a introdução de novas substâncias e maiores investigações relacionadas à eficácia e segurança desses medicamentos na terapia e manejo da TDAH (WIGAL; CHAVEZ *et al.*; KUEHN, 2009).

O uso do MFD aumentou significativamente nos últimos anos, entretanto, as conseqüências da sua utilização ainda são pouco conhecidas. A maioria dos estudos foi conduzida em adultos, mas pouco é conhecido sobre a ação do MFD no cérebro jovem. Os sintomas do TDAH, nos pacientes com epilepsias graves, repercutem amplamente na qualidade de vida das crianças e dos seus familiares, levando a uma piora de até quatro vezes nos índices de qualidade de vida (SHERMAN *et al.*, 2007).

Há a necessidade de se investigar apropriadamente o MFD (fármaco largamente utilizado há mais de três décadas) sobre o SNC, em estudos animais e em humanos, associado ao fato do aumento do número de prescrições em crianças e adolescente (HIGGINS, 2009).

Tendo como parâmetro a relação risco-benefício, onde o efeito terapêutico supere qualquer efeito danoso e levando em consideração o uso demasiado do MFD, tornou-se de extrema relevância estudar os efeitos sobre o SNC, que com o presente estudo, almeja-se contribuir para o uso racional, através de vários modelos animais de comportamento com a finalidade de verificar seus efeitos na ansiedade, depressão, atividade locomotora e potencial para desencadear ou não convulsões.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo principal deste estudo foi investigar o provável mecanismo de ação do metilfenidato no sistema nervoso central, através da análise e das alterações comportamental em modelos padronizados de ansiedade, depressão e convulsão em camundongos jovens e adultos, e das concentrações neuroquímicas, no corpo estriado e hipocampo, relacionadas a estes comportamentos.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos do pré-tratamento com metilfenidato em modelos comportamentais de ansiedade, depressão, atividade locomotora e convulsão após os tratamentos agudo em animais jovens e adultos;
 - Identificar os efeitos do pré-tratamento com metilfenidato sobre os níveis de monoaminas no hipocampo e corpo estriado em animais jovens e adultos;
 - Investigar a atividade da acetilcolinesterase em hipocampo e corpo estriado de animais jovens e adultos pré-tratados ou não com metilfenidato e/ou Pilocarpina 400mg/Kg (modelo colinérgico de convulsão).
-
-

MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Drogas e Reagentes

Quadro 4.1 - Drogas e Reagentes utilizados e suas origens

Drogas/Reagentes	Origem
Água Destilada	Deionizador
Diazepam	União Química Brasil
Imipramina Imipra®	Cristália
Cloridrato de pilocarpina	(Sigma Chemical Co.,USA)
Metilfenidato-Ritalina®	Laboratório Novartis

Quadro 4.2 - Materiais utilizados

Equipamento	Origem
Balança Analítica Modelo H5	Mettler, Suíça
Balança para animais, ID 1500	Filizola, Brasil
Cubetas para leitura em espectrofômetro	Sarstedt, Alemanha Oriental
Espectrofotômetro, Beckman DU	Ohio, USA
Cronômetro	Incoterm, Brasil
Deionizador USF	Elga, USA
Pipetas Automáticas H.E.	Pedersen, Dinamarca
Sonicador Modelo PT 10-35	Brinkmann Instruments Inc., NY, USA
Equipamento de HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Performance – Detector eletroquímico	Detector eletroquímico (Modelo L-ECD-6 ^a) e Eletrodo de Carbono; Degaseificador (DGU-2 ^a); Integrador (C-R6A Chromatopac); Injetor/ Shimadzu Corp., Japão
Agitador de tubos Modelo 251	FANEN, SP, Brasil
Centrífuga refrigerada Marathon 26 KMR	Fisher Scientific
Equipamento para filtração a vácuo	Millipore Apparatus, Bedford, MA, EUA
Campo Aberto	Fabricado no próprio laboratório
Labirinto em Cruz Elevado	Fabricado no próprio laboratório
Recipiente do Nado Forçado	Fabricado no próprio laboratório
Medidor de pH, modelo B374	Micronal, SP, Brasil
Freezer -70° ULT 2586 – 3D14	Revco Scientific, Inc. Asheville, N.C.,EUA
Banho Maria, 102/1	Bellico, USA

4.2 Preparo das drogas

As drogas foram dissolvidas em água destilada e, a pilocarpina foi dissolvida e diluída em solução salina, obtendo-se as concentrações finais conforme **Quadro 4.3**

Quadro 4.3 - Concentração final, via de administração e abreviatura das drogas utilizadas.

Droga	Dose Final	Via de Administração	Abreviatura
Metilfenidato	2,5; 5;10 e 20 mg/kg	Via Oral (v.o.)	MFD
Diazepam	1 e 2 mg/kg	Via Intraperitoneal (i.p.)	DZP
Imipramina	10 mg/kg	Via Intraperitoneal (i.p.)	IMP
Pilocarpina	400 mg/kg	Via Intraperitoneal (i.p.)	P400

4.3 Animais

Camundongos albinos (*Mus musculus*), variedade *Swiss*, jovens (21 dias) e adultos (2 meses), machos, pesando entre 8-15g (animais jovens) e entre 25-30g (animais adultos), provenientes do Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC, foram acondicionados em caixas de polipropileno, à temperatura de $24 \pm 2^\circ\text{C}$, com ciclos de claro/escuro de 12 em 12 h, recebendo ração padrão (Purina Chow) e água *ad libitum*. Os animais foram colocados em jejum de sólidos de 5 horas, antes da realização de cada experimento em que a via oral foi utilizada para absorção das substâncias. Os protocolos experimentais utilizados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da UFC (Protocolo nº 09/12).

4.3.1 Tratamento farmacológico dos grupos experimentais

Os animais foram tratados com metilfenidato, animais jovens e animais adultos, de forma aguda, nas doses de 2,5, 5, 10 e 20 mg/kg através da via oral (v.o.). Os animais foram submetidos aos testes 60 minutos após os tratamentos. Para a avaliação da atividade antidepressiva, foi utilizada imipramina 10mg/kg, via intraperitoneal (i.p.) no teste do nado forçado, como padrão positivo. Como referência ansiolítica foi utilizado o diazepam 1mg/kg (i.p.), DZP 1, no teste do labirinto em cruz elevado, e diazepam 2mg/kg (i.p.), DZP-2, no teste do campo aberto. Diazepam 2mg/kg (i.p.), DZP 2, foi utilizado, também, no modelo rota *rod*, como padrão para atividade relaxante muscular. No teste de convulsão foi utilizado pilocarpina 400 mg/kg (i.p.)

4.3.2 Protocolo experimental

Antes dos experimentos, os animais foram colocados em ambiente fechado, desprovido de barulho externo, com a temperatura constante ($24 \pm 1^\circ \text{C}$) e iluminação de baixa intensidade (lâmpada vermelha de 15W), de modo que se adaptassem com o ambiente do experimento. Os testes do campo aberto e rota *rod* foram realizados com os mesmos grupos de animais da maneira descrita a seguir: primeiramente os animais, um por vez, foram colocados no campo aberto onde foram avaliados durante 5 minutos e, em seguida, foram transferidos para o rota *rod* onde a atividade foi observada por 1 minuto. Os outros testes comportamentais, como labirinto em cruz elevado, nado forçado e convulsão induzida por pilocarpina foram realizadas com grupos diferentes de animais. Em todos os testes, com exceção, apenas, do nado forçado, após cada observação animal, foi utilizado álcool 70% para remoção de resíduos e odor do animal.

4.4 Avaliação da Atividade Ansiolítica

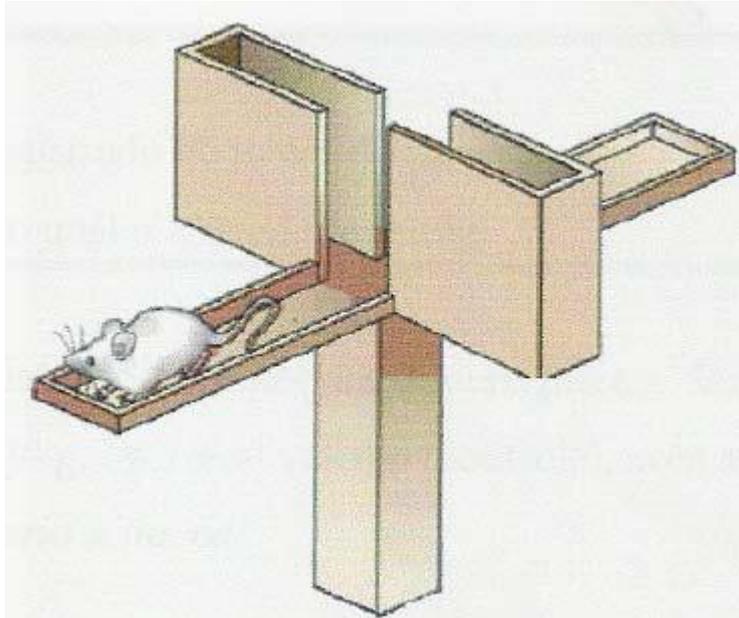
4.4.1 Labirinto em Cruz Elevado

Os camundongos foram divididos em 12 grupos (6 grupos de animais jovens e 6 grupos de animais adultos) de 8 animais, onde foram tratados com veículo (água destilada, v.o.), metilfenidato (2,5, 5, 10 e 20 mg/kg, v.o.) e diazepam (1mg/kg, i.p.). O labirinto em cruz elevado (LCE) é baseado no modelo proposto, em ratos, por (PELLOW *et al.*, 1985) e validado por (LISTER, 1987) para camundongos, e consiste de dois braços abertos opostos (30 x 5 x 25 cm) e dois fechados (30 x 5 x 25 cm), também opostos, em forma de cruz grega. Os braços abertos e fechados estão conectados por uma plataforma central (5 x 5 cm). A plataforma, as paredes laterais dos braços fechados e o chão são confeccionados em acrílico. O aparelho fica elevado a uma altura de 45 cm do nível do chão (**Figura 4.1**). Após 30 ou 60 minutos dos tratamentos i.p. ou v.o., respectivamente, os camundongos foram colocados no centro do aparelho com a cabeça voltada para um dos braços fechados e o seu comportamento observado por 5 min (PELLOW *et al.*, 1985). As medidas comportamentais registradas no LCE foram: frequência de entradas e o tempo despendido nos braços abertos e nos fechados.

A frequência total de entradas foi obtida pela soma simples das frequências de entradas nos braços abertos e nos 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 será calculada a percentagem de tempo em que os animais permanecem 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). Para a análise estatística todos os grupos foram comparados ao grupo controle. 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 (PELLOW *et al.*, 1985; PELLOW; FILE, 1986), e o inverso é verdade para

compostos ansiogênicos. O número de entradas nos braços fechados avalia a atividade motora dos animais (RODGERS *et al.*, 1997).

Figura 4.1 - Ilustração do instrumento utilizado no teste Labirinto em Cruz Elevado



4.5 Avaliação da Atividade Locomotora

4.5.1 Teste do Campo Aberto

Camundongos divididos em 12 grupos (6 grupos de animais jovens e 6 grupos de animais adultos) de 8 animais, onde foram tratados com veículo (água destilada), metilfenidato (2,5, 5, 10 e 20 mg/kg, v.o.) e diazepam (2 mg/kg, i.p.).

Um campo aberto, confeccionado em acrílico (paredes transparentes e piso preto, 30 x 30 x 15 cm) dividido em 9 quadrantes iguais foi utilizado para avaliar a atividade exploratória dos animais: sua movimentação espontânea (número de cruzamentos, com as quatro patas, entre as divisões do campo), o número de comportamentos de auto-limpeza (“*grooming*”) e de levantar (“*rearing*”) registrados durante um período de 4 minutos, após 1 minuto de habituação (ARCHER, 1973). A tendência natural do animal em um ambiente novo é a de explorá-lo, apesar do conflito com o medo provocado pela situação nova (MONTGOMERY, 1955). Assim, esse teste permite uma avaliação da atividade estimulante ou depressora de um dado composto, podendo ainda indicar atividades mais específicas como a ansiolítica (**Figura 4.2**).

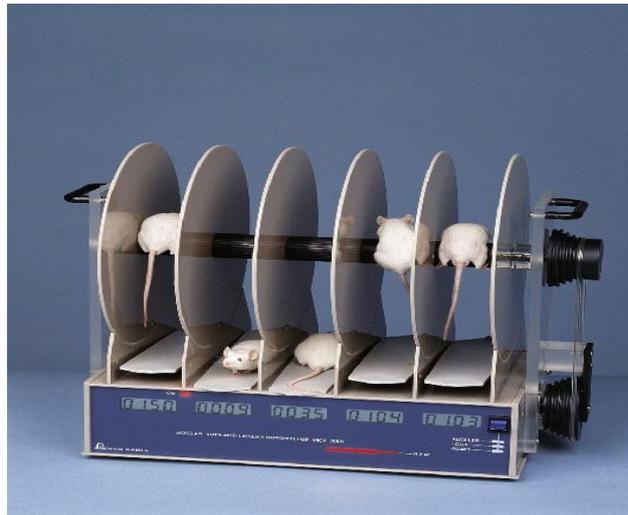
Figura 4.2 - Teste do Campo Aberto. A. Caixa em acrílico, com o piso dividido em nove partes. B. Grooming C. Rearing.



4.5.2 Teste do Rota Rod

O teste do rota *rod* mede o efeito do relaxamento muscular ou incoordenação motora produzidos por drogas nos animais (CARLINI; BURGOS, 1979). Para este teste, os camundongos foram divididos em 12 grupos (6 grupos de animais jovens e 6 grupos de animais adultos) e colocados com as quatro patas sobre uma barra de 2,5cm de diâmetro, elevada a 25 cm do piso, em uma rotação de 12 rpm, por um período de 1 minuto (**Figura 4.3**). Foram registrados o tempo de permanência na barra giratória, em segundos (s), e o número de quedas, com três reconduções, no máximo (DUNHAM; MIYA, 1957).

Figura 4.3 - Ilustração do instrumento utilizado no teste do Rota Rod



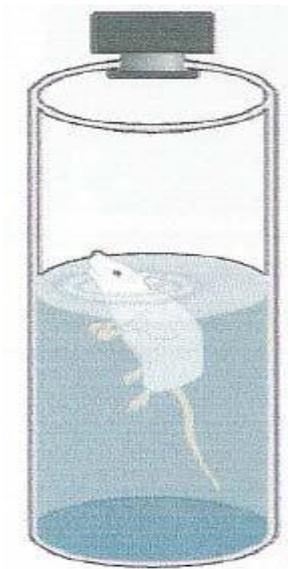
4.6 Avaliação da Atividade Antidepressiva

4.6.1 Teste do Nado Forçado

Para este experimento (PORSOLT, *et al.*, 1987) foram utilizados tanques de 22 cm de diâmetro e 40 cm de altura contendo água fresca a $23 \pm 1^\circ \text{C}$ até a metade do tanque. Os camundongos foram divididos em 12 grupos de animais (6 grupos de animais jovens e 6 grupos de animais adultos), onde foram tratados com veículo (água destilada), Metilfenidato (2,5, 5, 10 e 20 mg/kg, v.o.), imipramina (10 mg/Kg, i.p.).

Após 30 ou 60 minutos dos tratamentos i.p. ou v.o., respectivamente, os animais foram colocados, um por vez, no tanque onde o tempo de imobilidade, em segundos, foi registrado durante cinco minutos (**Figura 4.4**). O animal foi considerado imóvel quando permaneceu flutuando na água, fazendo apenas movimentos suaves necessários para manter a cabeça acima da água. O animal é colocado na água, em seguida, é observado por 5 minutos.

Figura 4.4 - Teste do Nado Forçado.



4.7 Avaliação da Atividade Convulsivante

4.7.1 Teste da Convulsão Induzida por Pilocarpina

Os animais foram divididos em grupos de animais jovens e de animais adultos que foram pré- tratados com metilfenidato (2,5, 5, 10 e 20 mg/kg, v.o.). Após 60 minutos do tratamento foi administrado Pilocarpina 400mg/kg (P400), i.p (TURSKI *et al.*, 1983). Logo após a administração de P400, os animais foram colocados em gaiolas individuais e observados por um período de 60 minutos. Os parâmetros analisados foram: latência da convulsão (tempo entre a administração de P400 até a primeira convulsão clônica ou tônico-clônica) e a latência de morte dos animais (tempo decorrido da administração de P400 e morte dos animais). Tempo em segundos.

4.8 Dissecção das Áreas Cerebrais (Hipocampo e Corpo Estriado)

Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, os encéfalos retirados e rapidamente colocados sobre papel alumínio em uma placa de Petri com gelo.

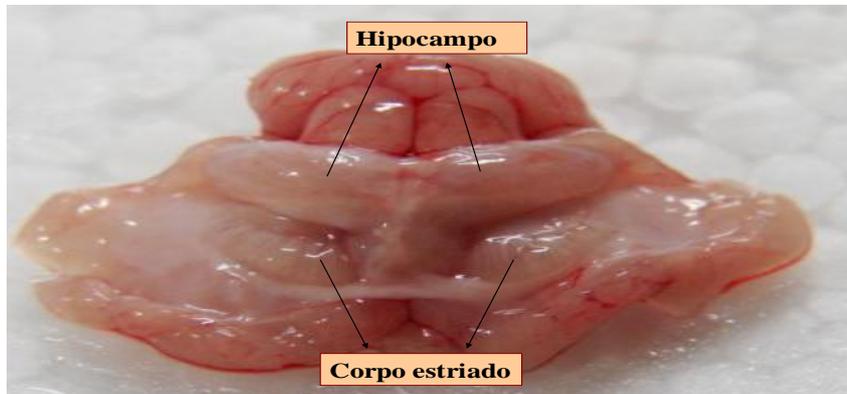
Acompanhando a fissura sagital mediana, a camada cortical cerebral foi retirada das leptomeninges com o auxílio de uma pinça reta de microdissecação, a qual, progredindo delicadamente e tangencialmente aos ventrículos laterais, divulsionou o córtex em toda a sua extensão fronto-occipital. O córtex já divulsionado foi rebatido para os lados, expondo parte do hipocampo que, com divulsionamento, foi deslocado e retirado. O hipocampo foi utilizado para a Determinação da Atividade da Acetilcolinesterase.

O corpo estriado foi isolado das estruturas circunjacentes por divulsionamento com uma tesoura de microdissecação, sendo a sua retirada orientada pelo diâmetro da porção tuberosa visível desses núcleos, após o rebatimento lateral do córtex. O corpo estriado foi utilizado para a Determinação da Atividade da Acetilcolinesterase e para a Determinação das Concentrações de Monoaminas.

Terminada a dissecção, cada área cerebral (hipocampo e corpo estriado) (**Figura 4.5**) foi acondicionada em papel alumínio devidamente identificado, pesado e conservado a -70 °C para uso posterior. Quando necessária a estocagem por um determinado período de tempo (no máximo 1 mês a -70 °C) os tecidos foram considerados como tendo a mesma viabilidade para

experimentação que os ensaiados imediatamente ou 24 h após a dissecação (BURKE; GREENBAUN, 1987).

Figura 4.5 – Áreas cerebrais dissecadas



4.9 Determinação das concentrações de Monoaminas

4.9.1 Método

Para a determinação das concentrações de monoaminas foi utilizado o equipamento de CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência). Na cromatografia líquida clássica, um adsorvente (alumina ou sílica) é empacotado em uma coluna e é eluído por um líquido ideal (fase móvel). Uma mistura para ser separada é introduzida na coluna e é carregada através da mesma por um líquido eluente (fase móvel). Se um composto da mistura (soluto) é adsorvido fracamente pela superfície da fase sólida estacionária, ele atravessará a coluna mais rapidamente que um outro soluto que seja mais fortemente adsorvido. Então, a separação dos solutos é possível se existem diferenças na adsorção pelo sólido. Os detectores eletroquímicos medem a condutância do eluente ou a corrente associada com a oxidação ou redução dos solutos. Para ser capaz de detectar no primeiro caso, os solutos devem ser iônicos e no segundo caso, os solutos devem ter a característica de serem relativamente fáceis de oxidarem ou reduzirem.

Detectores eletroquímicos que medem corrente associada com a redução ou oxidação de solutos são chamados detectores amperométricos ou coulométricos. Neste estudo foi utilizado o tipo amperométrico que reage com uma quantidade muito menor de soluto, em torno de 1 %. Todas as técnicas eletroquímicas envolvem a aplicação de um potencial para

um eletrodo (geralmente de carbono vítreo), oxidação da substância que está sendo estudada próximo à superfície do eletrodo seguindo a amplificação e medida da corrente produzida. As monoaminas são oxidadas nos grupos de anel hidroxil para produzir um derivado ortoquinona com a liberação de dois elétrons.

4.9.2 Procedimento Experimental

Os animais foram decapitados 60 minutos após a administração do metilfenidato (2,5; 5; 10 e 20 mg/kg) e água destilada (controle) e tiveram seus cérebros dissecados sobre gelo. O corpo estriado foi utilizado para preparar o homogenato a 10% (10 mg de área/100 μ L de tampão). 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 μ L do sobrenadante foi, então, injetada no equipamento de HPLC (**Figura 4.6**), para a análise química.

Para a análise das monoaminas, uma coluna BDS HYPERSIL C18 com comprimento de 250 mm, calibre 4,6 mm e de partícula de 5 μ m, da T'hermo Scientific, foi utilizada. A fase móvel utilizada era 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 tetrahydrofurano 1,7 % v/v. NA, DA, DOPAC, HVA, 5-HT e 5-HIAA 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).

4.9.3 Soluções Reagentes

Fase Móvel

Para preparar um volume de 500 mL de fase móvel foram pesados 15,75 g de ácido cítrico (Grupo Química, RJ., Brasil) e 0,292 g de Cloreto de Sódio (Grupo Química, RJ., Brasil) completado para um volume de 400 mL com água puríssima (Milli-Q). Esta solução foi ajustada para pH 3,0 com hidróxido de sódio 12,5 M (Reagen, RJ, Brasil). A esta solução foi adicionado o SOS 75 mg (Sigma, MO, USA) e completado o volume para 470 mL com água Milli-Q. Em seguida, foi procedida a filtração e degaseificação, e posteriormente adição de 20 mL de acetonitrila (Carlo Erba Reagenti, MI, Itália) e 10 mL de tetrahydrofurano (Sigma, MO, USA) para um volume final de 500 mL.

Ácido Perclórico 0,1 M

Adicionou-se 1,8 mL de ácido perclórico (Sigma, MO, USA) em um balão volumétrico e o volume ajustado para 300 mL.

Padrões

Os padrões foram preparados em uma concentração final de 4 ng/20 μ L de solução de NA, DA, 5-HT, DOPAC, HVA e 5-HIAA (Sigma, MO, EUA). A partir da área dos picos desses padrões, as concentrações das amostras foram calculadas utilizando o programa Microsoft Excel® e os resultados expressos em mol/g de tecido.

Figura 4.6 - Aparelho de HPLC (High Performance Liquid Chromatography).



4.10 Determinação da Atividade da Acetilcolinesterásica (AChE)

4.10.1 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-nitro-benzóico (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/min).

4.10.2 Soluções Reagentes

- ✓ Tampão fosfato de sódio - $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$ (Reagen, Rio de Janeiro, Brasil) 0,1 M em água bidestilada, pH 7,0.
- ✓ Solução de iodeto de acetiltiocolina ATC (Sigma, St. Louis, MO, EUA) 75 mM em água bidestilada.
- ✓ Solução de ácido 5:5-ditiobis-2-nitrobenzoato - DTNB (Sigma, St. Louis, MO, EUA) 10 mM em tampão fosfato de sódio.

4.11 Análise Estatística

A análise estatística dos dados foi realizada através do software GraphPad Prism versão 5.0 para Windows, GraphPad Software, San Diego, Califórnia EUA. Copyright (c) 1992- 2007 por GraphPad Software.

Os resultados que obedeciam a uma distribuição paramétrica foram analisados por Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste de Student Newman Keuls (post hoc). Os dados não-paramétricos foram analisados pelo mesmo programa utilizando o teste Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunns (post hoc) ou pelo Student *t* test.

Em todas as análises estatísticas, os valores foram representados pela Média \pm Erro Padrão da Média (EPM) com número de animais entre parênteses e foi considerado o nível crítico para a rejeição da hipótese de nulidade menor que 0,05 ($p < 0,05$). Os asteriscos (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0.001$) caracterizam o grau de significância.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação da Atividade Ansiolítica

5.1.1 Teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

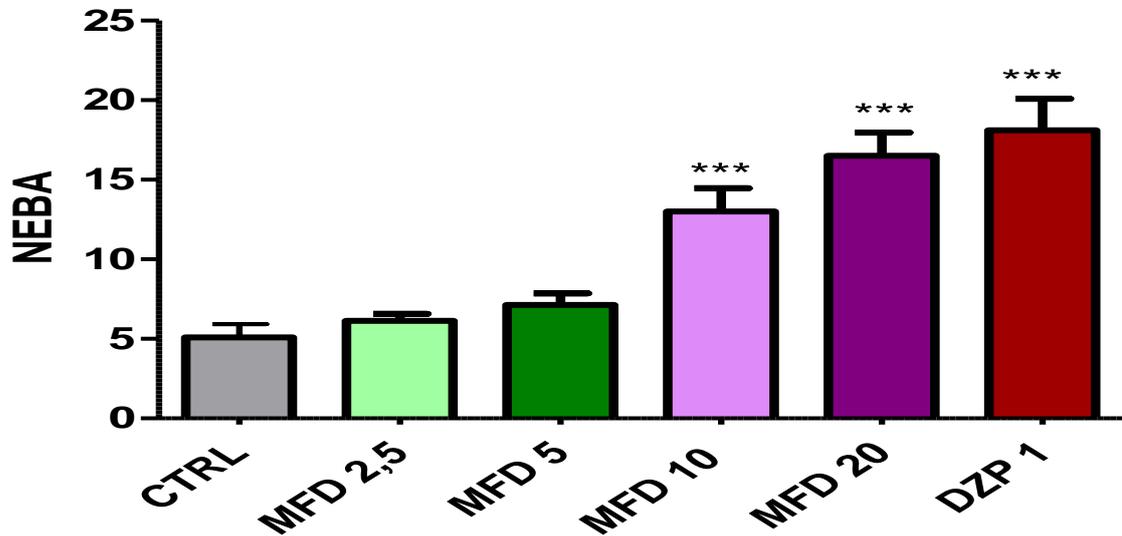
O número de entrada nos braços abertos (NEBA), a percentagem de entrada nos braços abertos (PEBA), o tempo de permanência nos braços abertos (TPBA) e a percentagem do tempo de permanência nos braços abertos (PTBA) foram os parâmetros avaliados nos animais jovens e adultos.

Os animais jovens submetidos ao tratamento agudo por via oral com MFD nas doses de 2,5, 5, 10 e 20 mg/Kg, no LCE mostrou que houve um aumento significativo nas maiores doses, 10 e 20 mg/Kg (MFD 10 e 20) nos seguintes parâmetros: NEBA (**Figura 5.1**) [MFD 10: $13,00 \pm 1,46$ (10); MFD 20: $16,50 \pm 1,47$ (10)]; PEBA (**Figura 5.2**) [MFD 20: $45,84 \pm 1,57$ (8)]; TPBA (**Figura 5.3**) [MFD 10: $121,5 \pm 14,37$ (13); MFD 20: $139,2 \pm 7,42$ (13)]; PTBA (**Figura 5.4**) [MFD 10: $41,35 \pm 3,28$ (10); MFD 20: $49,67 \pm 1,89$ (10)] quando comparados com os respectivos controles (CTRL): NEBA [$5,08 \pm 0,84$ (12)]; PEBA [$35,53 \pm 3,67$ (9)]; TPBA [$44,30 \pm 9,60$ (10)]; PTBA [$19,55 \pm 3,50$ (9)].

Os animais adultos submetidos ao tratamento agudo por via oral com MFD nas doses de 2,5, 5, 10 e 20 mg/Kg, no LCE mostrou que houve um aumento significativo apenas na dose de 20mg/Kg (MFD 20) nos seguintes parâmetros: NEBA (**Figura 5.5**) [MFD 20: $10,14 \pm 1,18$ (7)]; TPBA (**Figura 5.7**) [MFD 20: $113,3 \pm 9,02$ (7)]; PTBA (**Figura 5.8**) [MFD 20: $49,54 \pm 3,48$ (7)] quando comparados com os respectivos controles (CTRL): NEBA [$5,11 \pm 0,75$ (9)]; TPBA [$69,75 \pm 7,27$ (8)]; PTBA [$30,67 \pm 2,44$ (8)]. O parâmetro PEBA (**Figura 5.6**) não foi alterado em nenhuma das doses.

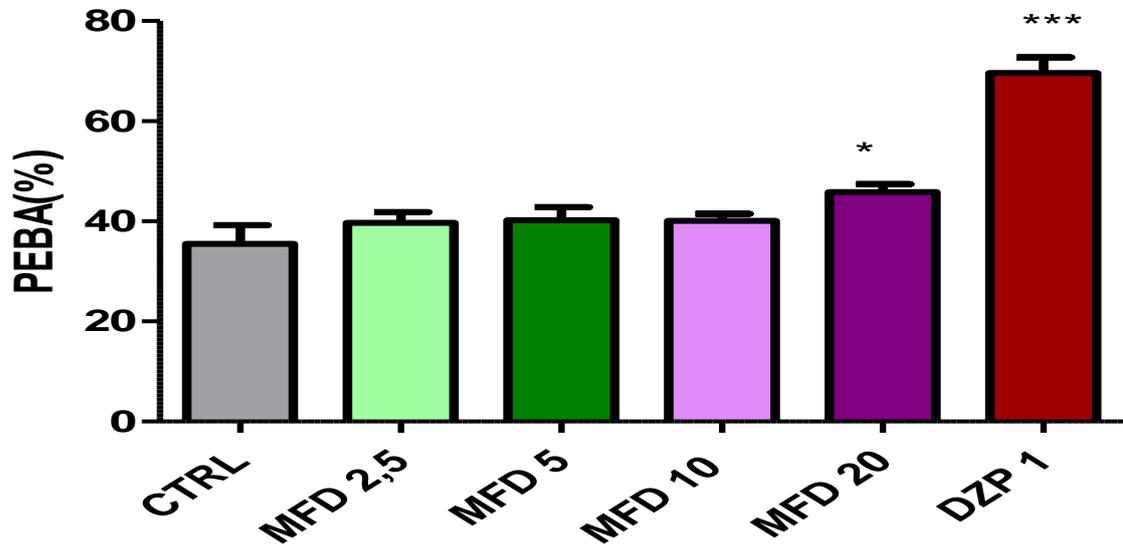
Nos animais jovens e nos animais adultos, o diazepam 1mg/kg aumentou todos os parâmetros: animais jovens: [NEBA: [$18,11 \pm 1,98$ (9)]; PEBA: [$69,62 \pm 3,15$ (8)]; TPBA: [$195,7 \pm 17,15$ (12)]; PTBA: [$76,99 \pm 4,03$ (10)]] em relação aos controles (CTRL) (**Figuras 5.1, 5.2, 5.3 e 5.4**); animais adultos: NEBA: [$14,43 \pm 1,86$ (7)]; TPBA: [$168,4 \pm 14,87$ (7)]; PTBA: [$61,41 \pm 5,98$ (7)]; PEBA: [$53,65 \pm 5,64$ (7)] em relação aos controles (CTRL) (**Figuras 5.5, 5.6, 5.7 e 5.8**).

Figura 5.1 - Efeito do MFD e diazepam sobre o número de entradas nos braços abertos (NEBA) no teste Labirinto em Cruz Elevado em animais jovens.



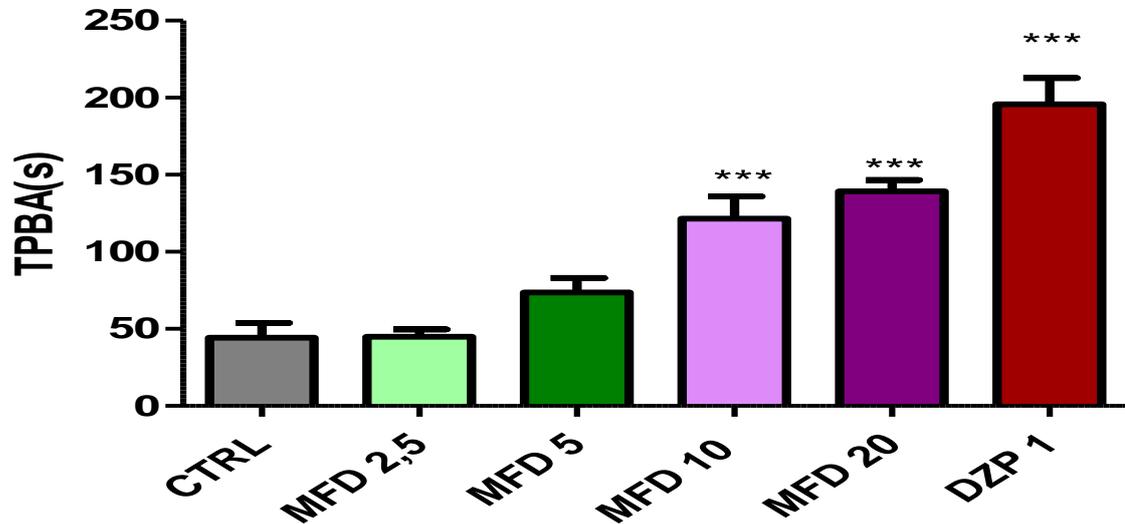
Controle (CTRL-veículo), MFD (v.o) e diazepam (DZP, i.p.) foram administrados 30 (i.p.) ou 60 min (v.o.) antes do experimento. Os valores representam a média \pm EPM do número de entradas nos braços abertos (NEBA) durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguida por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos:*** $p < 0,001$ vs controle.

Figura 5.2 - Efeito do MFD e diazepam sobre a percentagem de entradas nos braços abertos (PEBA) no teste Labirinto em Cruz Elevado em animais jovens.



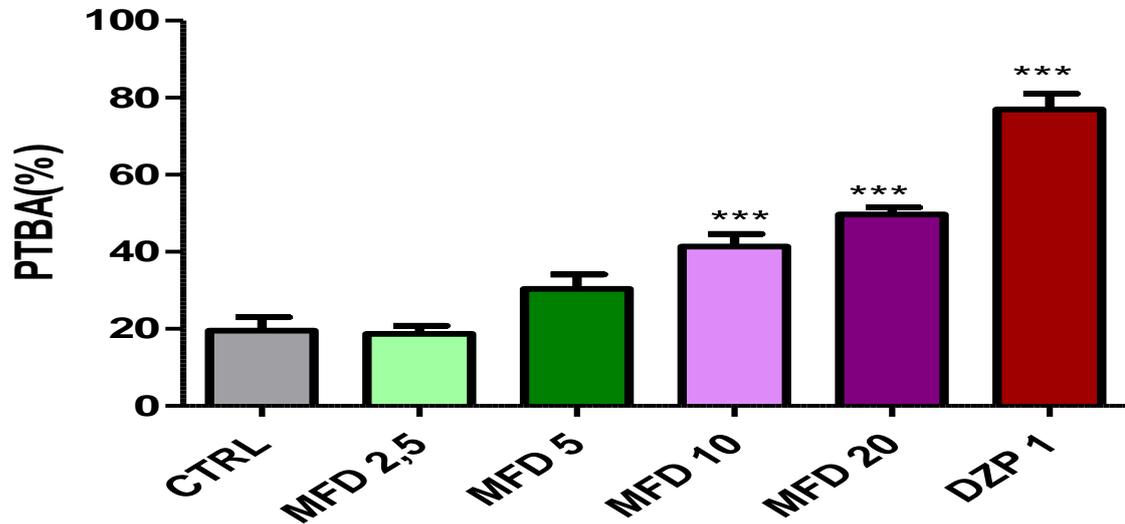
Controle (CTRL-veículo), MFD (v.o) e diazepam (DZP, i.p.) foram administrados 30 (i.p.) ou 60 min (v.o.) antes do experimento. Os valores representam a média \pm EPM do número de entradas nos braços abertos (NEBA) durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguida por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos: * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ vs controle.

Figura 5.3 - Efeito do MFD e diazepam sobre o tempo de permanência nos braços abertos (TPBA) no teste Labirinto em Cruz Elevado em animais jovens.



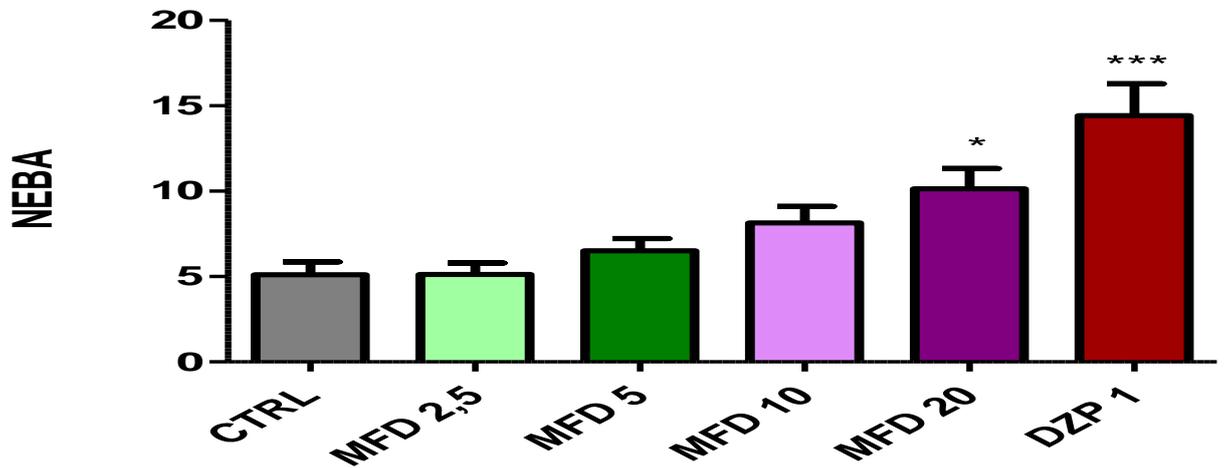
Controle (CTRL-veículo), MFD (v.o) e diazepam (DZP, i.p.) foram administrados 30 (i.p.) ou 60 min (v.o.) antes do experimento. Os valores representam a média \pm EPM do tempo de permanência nos braços abertos (TPBA) durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguida por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos: *** $p < 0,001$ vs controle.

Figura 5.4 - Efeito do MFD e diazepam sobre a percentagem do tempo de permanência nos braços abertos (PTBA) no teste Labirinto em Cruz Elevado em animais jovens.



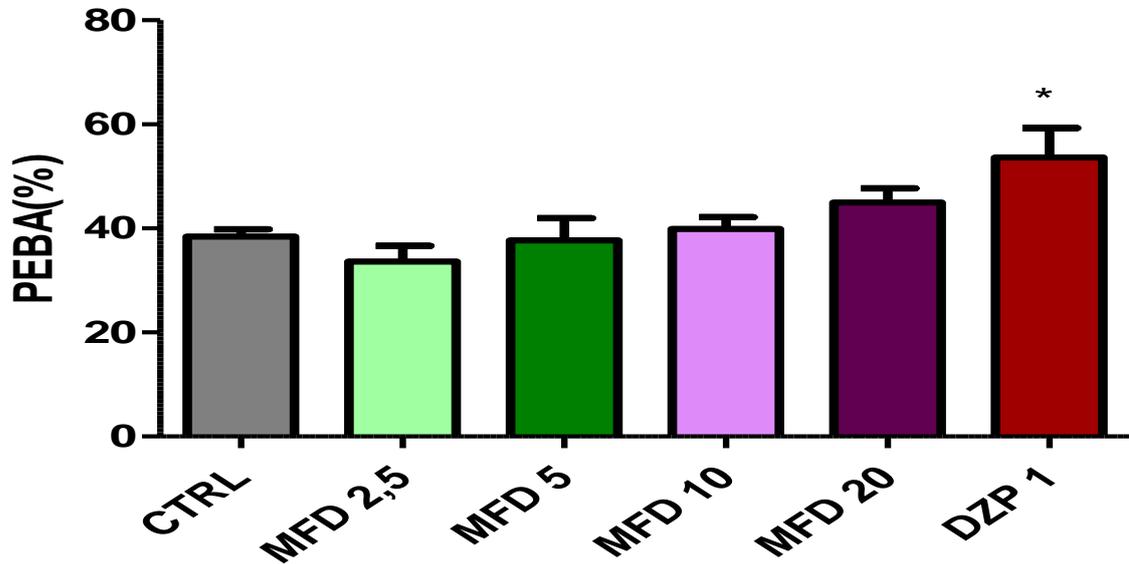
Controle (CTRL-veículo), MFD (v.o) e diazepam (DZP, i.p.) foram administrados 30 (i.p.) ou 60 min (v.o.) antes do experimento. Os valores representam a média \pm EPM da percentagem do tempo de permanência nos braços abertos (PTBA) durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguida por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos: *** $p < 0,001$ vs controle.

Figura 5.5 - Efeito do MFD e Diazepam sobre o número de entrada nos braços abertos (NEBA) no teste Labirinto em Cruz Elevado em animais adultos.



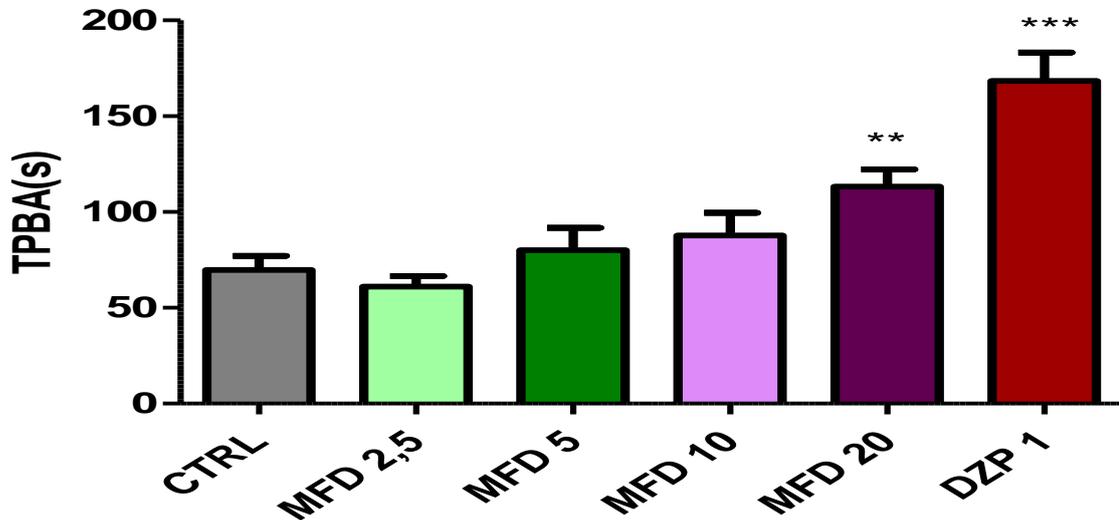
Controle (CTRL-veículo), MFD (v.o) e diazepam (DZP, i.p.) foram administrados 30 (i.p.) ou 60 min (v.o.) antes do experimento. Os valores representam a média \pm EPM do número de entradas nos braços abertos (NEBA) durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguida por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos: * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ vs controle.

Figura 5.6 - Efeito do MFD e diazepam sobre a percentagem de entradas nos braços abertos (PEBA) no teste Labirinto em Cruz Elevado em animais adultos.



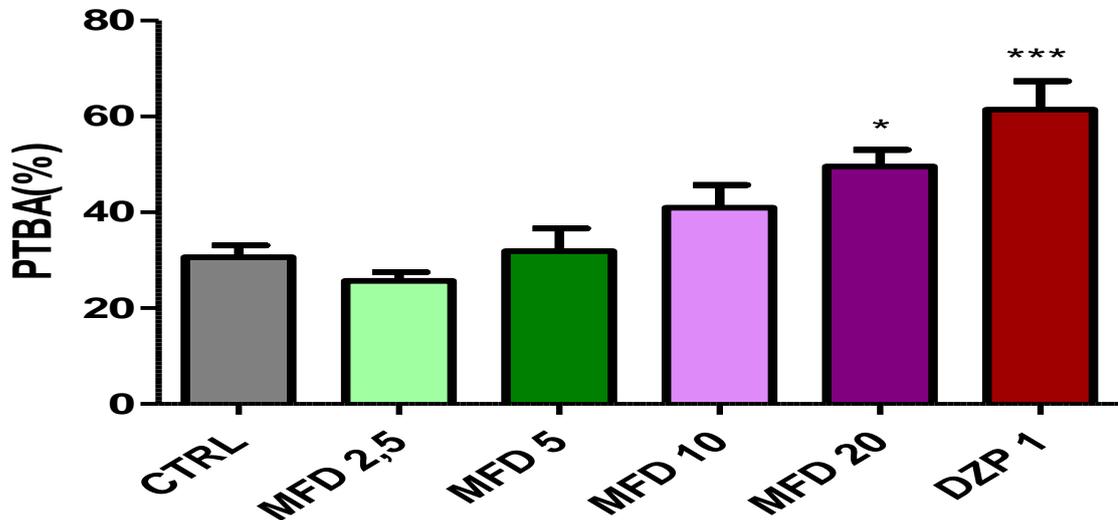
Controle (CTRL-veículo), MFD (v.o) e diazepam (DZP, i.p.) foram administrados 30 (i.p.) ou 60 min (v.o.) antes do experimento. Os valores representam a média \pm EPM da percentagem de entradas nos braços abertos (PEBA) durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguida por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos: * $p < 0,05$ vs controle.

Figura 5.7 - Efeito do MFD e diazepam sobre o tempo de permanência nos braços abertos (TPBA) no teste Labirinto em Cruz Elevado em animais adultos.



Controle (CTRL-veículo), MFD (v.o) e diazepam (DZP, i.p.) foram administrados 30 (i.p.) ou 60 min (v.o.) antes do experimento. Os valores representam a média \pm EPM do tempo de permanência nos braços abertos (TPBA) durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguida por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos: ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs controle.

Figura 5.8 - Efeito do MFD e diazepam sobre a percentagem do tempo de permanência nos braços abertos (PTBA) no teste Labirinto em Cruz Elevado em animais adultos.



Controle (CTRL-veículo), MFD (v.o) e diazepam (DZP, i.p.) foram administrados 30 (i.p.) ou 60 min (v.o.) antes do experimento. Os valores representam a média \pm EPM da percentagem de tempo de permanência nos braços abertos (NEBA) durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguida por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos: * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ vs controle.

5.2 Avaliação da Atividade Locomotora

5.2.1 Teste do Campo Aberto

A atividade locomotora espontânea (ALE), *rearing e grooming* foram os parâmetros analisados nos animais jovens e adultos, e os resultados foram expressos como número de cruzamentos, de *rearing e grooming*.

Nos animais jovens, o MFD administrado por via oral aumentou a atividade locomotora nas doses de 2,5, 5, 10 e 20 mg/Kg (**Figura 6**) [MFD2,5: 59,00±6,27 (8); MFD5: 59,88±6,17 (8); MFD10: 59,57±3,10 (7); MFD20: 98,71±4,49 (8)] quando comparado ao respectivo grupo controle [CTRL: 36,88±3,16 (8)].

Nos animais adultos, o MFD aumentou a atividade locomotora apenas nas doses de 10 e 20 mg/Kg (**Figura 7**) [MFD10: 92,75±3,41 (8); MFD20: 113,4±5,75 (8)] quando comparado ao respectivo grupo controle [CTRL: 51,75±2,85 (8)].

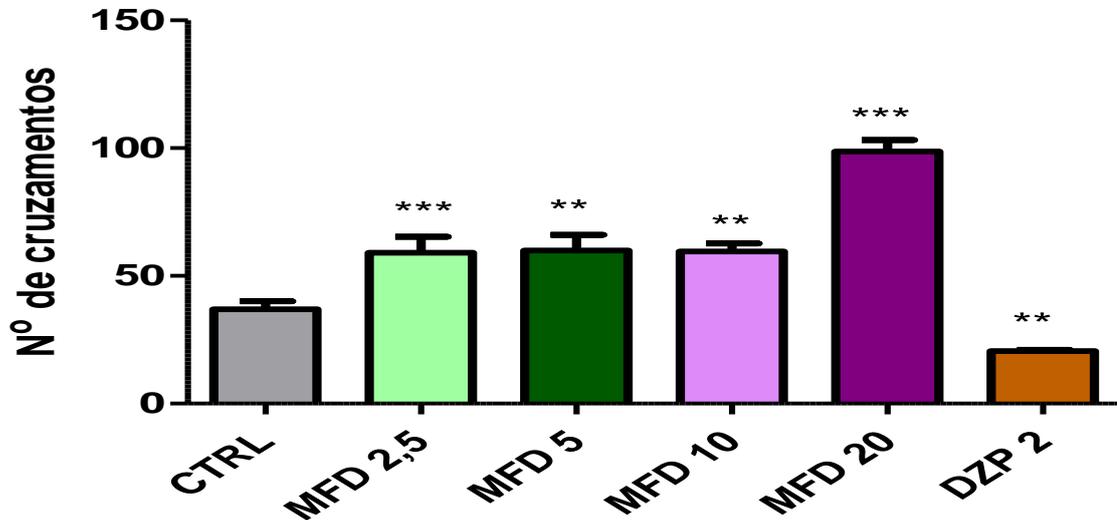
O diazepam 2mg/Kg, i.p., usado como droga padrão, reduziu a atividade locomotora tanto nos animais jovens [DZP2: 20,60±0,40 (8)] como nos adultos [DZP2: 21,63±1,35 (8)] em relação ao controle.

Não foi observada nenhuma alteração no parâmetro *rearing* nos grupos jovens e adultos tratados com MFD: animais jovens (**Figura 8**): [MFD2,5: 11,88±0,98 (8); MFD5: 10,56±2,14 (9); MFD10: 9,55±1,53 (9); MFD20: 10,56±1,83 (9)]; animais adultos (**Figura 9**): [[MFD2,5: 14,57±1,44 (7); MFD5: 15,88±0,91 (7); MFD10: 18,43±1,79 (7); MFD20: 19,67±2,68 (7)] quando comparado ao respectivo grupo controle [animais jovens: CTRL: 11,00±1,57 (8) e animais adultos: CTRL: 19,86±2,28 (8)]. O diazepam 2mg/Kg, i.p., usado como droga padrão, reduziu tanto nos animais jovens como nos animais adultos o *rearing* em relação ao controle [animais jovens: DZP2: 0,60±0,22 (10) e animais adultos: [DZP2: 0,60±0,22 (10)].

No *grooming*, os animais jovens e adultos, não apresentaram diferença significativa em nenhuma das doses observadas: animais jovens (**Figura 10**): [MFD2,5: 4,14±0,67 (7); MFD5: 2,43±0,81 (7); MFD10: 3,00±0,59 (8); MFD20: 2,00±0,21 (7)] e animais adultos (**Figura 11**): [MFD2,5: 3,75±0,41 (8); MFD5: 4,25±0,36 (8); MFD10: 4,28±0,42 (7); MFD20: 4,14±0,40 (7)] quando comparado ao controle: animais jovens: [CTRL: 2,63±0,26

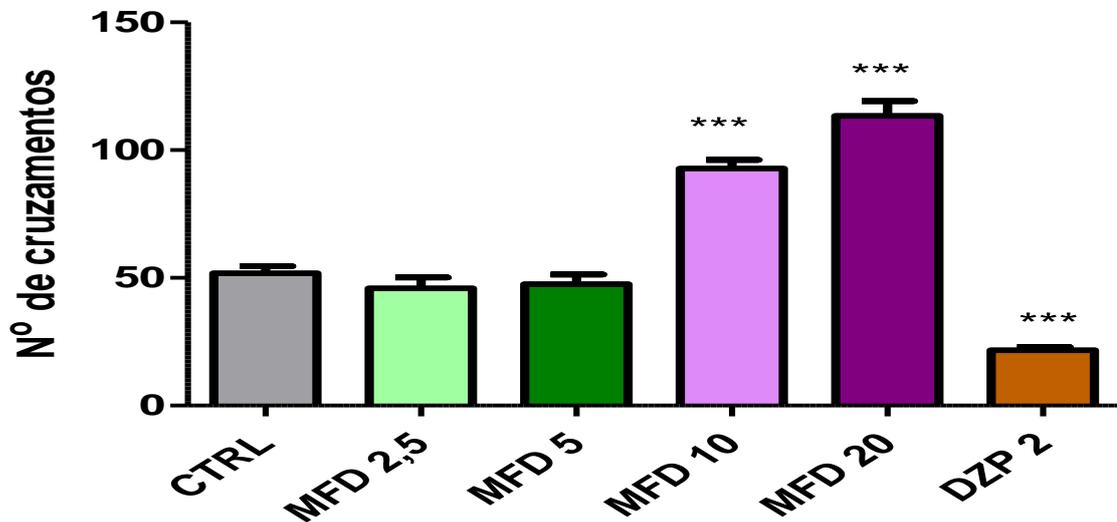
(8)] e animais adultos: [CTRL: $5,25 \pm 0,25$ (8)]. O diazepam 2mg/Kg, i.p., usado como droga padrão, reduziu o *grooming* em relação ao controle nos animais jovens e adultos [animais jovens: [DZP2: $0,80 \pm 0,24$ (8)] e animais adultos: [DZP2: $2,30 \pm 0,36$ (10)]].

Figura 6 - Efeito do MFD e diazepam sobre a atividade locomotora espontânea no teste do Campo Aberto em animais jovens.



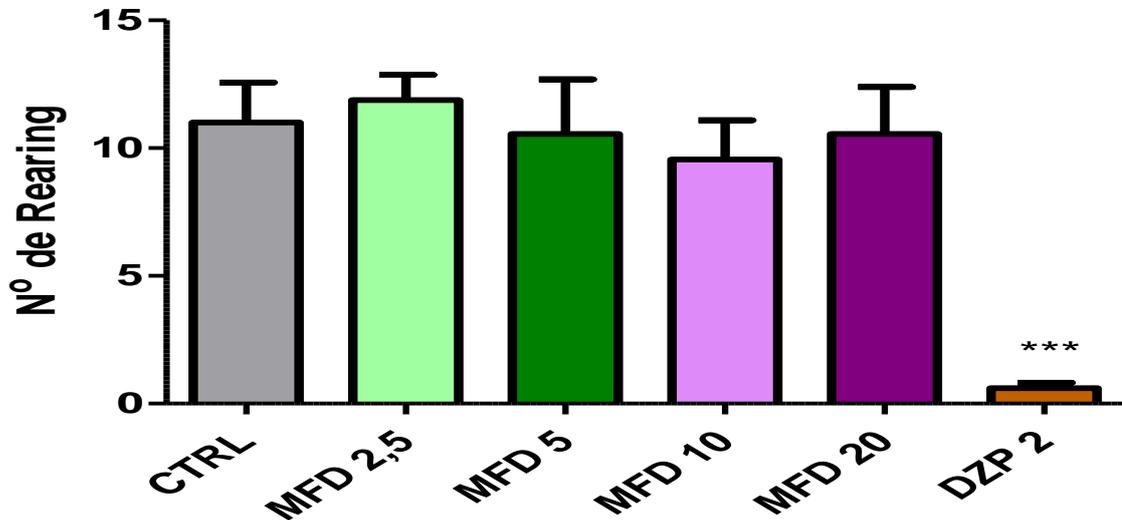
Controle (CTRL-veículo), MFD (v.o) e diazepam (DZP, i.p.) foram administrados 30 (i.p.) ou 60 min (v.o.) antes do experimento. Os valores representam a média \pm EPM do número de cruzamentos durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguida por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos: ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs controle.

Figura 7 - Efeito do MFD e diazepam sobre a atividade locomotora espontânea no teste do Campo Aberto em animais adultos.



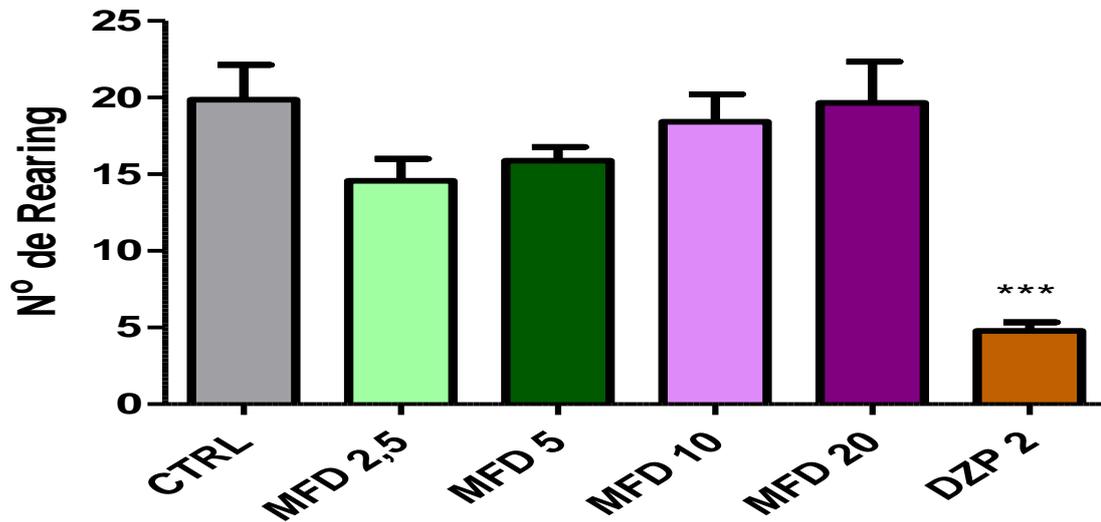
Controle (CTRL-veículo), MFD (v.o) e diazepam (DZP, i.p.) foram administrados 30 (i.p.) ou 60 min (v.o.) antes do experimento. Os valores representam a média \pm EPM do número de cruzamentos durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguida por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos: *** $p < 0,001$ vs controle.

Figura 8 - Efeito do MFD e diazepam sobre o número de *rearing* no teste do Campo Aberto em animais jovens.



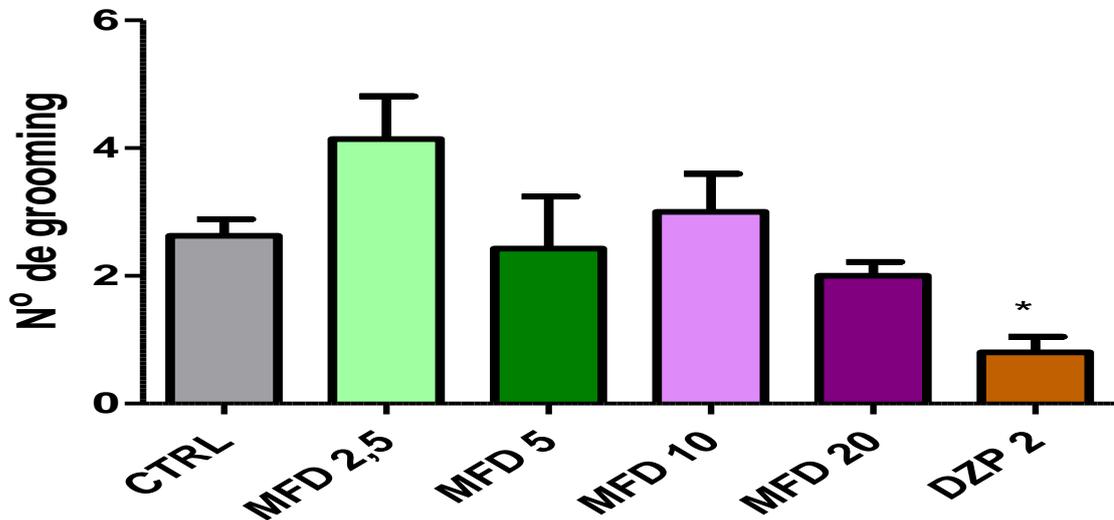
Controle (CTRL-veículo), MFD (v.o) e diazepam (DZP, i.p.) foram administrados 30 (i.p.) ou 60 min (v.o.) antes do experimento. Os valores representam a média \pm EPM do número de cruzamentos durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguida por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos: *** $p < 0,001$ vs controle.

Figura 9 - Efeito do MFD e diazepam sobre o número de *rearing* no teste do Campo Aberto em animais adultos.



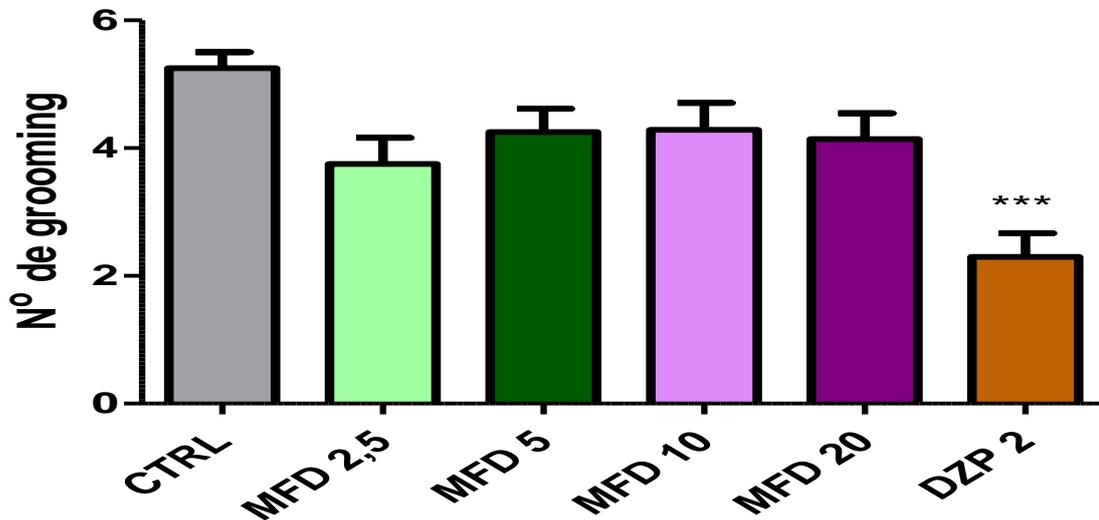
Controle (CTRL- veículo), MFD (v.o) e diazepam (DZP, i.p.) foram administrados 30 (i.p.) ou 60 min (v.o.) antes do experimento. Os valores representam a média \pm EPM do número de cruzamentos durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguida por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos: *** $p < 0,001$ vs controle.

Figura 10 - Efeito do MFD e diazepam sobre o número de *grooming* no teste do Campo Aberto em animais jovens.



Controle (CTRL-veículo), MFD (v.o) e diazepam (DZP, i.p.) foram administrados 30 (i.p.) ou 60 min (v.o.) antes do experimento. Os valores representam a média \pm EPM do número de rearing durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguida por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos: * $p < 0,05$ vs controle.

Figura 11 - Efeito do MFD e diazepam sobre o número de *grooming* no teste do Campo Aberto em animais adultos.



Controle (CTRL-veículo), MFD (v.o) e diazepam (DZP, i.p.) foram administrados 30 (i.p.) ou 60 min (v.o.) antes do experimento. Os valores representam a média \pm EPM do número de rearing durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguida por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos: *** p < 0,001 vs controle.

RESUMO DO TESTE DO CAMPO ABERTO

ANIMAIS JOVENS

	N ^o de Cruzamentos	Rearing	Grooming
MFD 2,5	↑	-	-
MFD 5	↑	-	-
MFD 10	↑	-	-
MFD 20	↑↑	-	-
DZP 2	↓	↓	↓

ANIMAIS ADULTOS

	N ^o de Cruzamentos	Rearing	Grooming
MFD 2,5	-	-	-
MFD 5	-	-	-
MFD 10	↑	-	-
MFD 20	↑	-	-
DZP 2	↓	↓	↓

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

5.2.2 Rota Rod

O número de quedas e o tempo de permanência na barra foram os parâmetros analisados nos animais jovens e adultos.

O tratamento agudo por via oral com o metilfenidato nas doses de 2,5, 5, 10 e 20 mg/Kg nos animais jovens e nos adultos, no teste Rota Rod mostrou que não houve diferença significativa no número de quedas [animais jovens: [MFD2,5: $0,12 \pm 0,12$ (8); MFD5: $0,37 \pm 0,18$ (8); MFD10: $0,50 \pm 0,18$ (8); MFD20: $0,25 \pm 0,16$ (8)] e animais adultos: [MFD2,5: $0,57 \pm 0,29$ (7); MFD5: $0,62 \pm 0,26$ (8); MFD10: $1,14 \pm 0,26$ (7); MFD20: $0,85 \pm 0,40$ (7)]] quando comparado ao controle [animais jovens: [CTRL: $0,37 \pm 0,18$ (10)] e animais adultos: [CTRL: $0,12 \pm 0,12$ (8)].

Também, nenhuma diferença significativa foi observada no tempo de permanência na barra com os animais tratados com metilfenidato nas mesmas doses descritas anteriormente [animais jovens (**Quadro 5.1**): [MFD2,5: $59,5 \pm 0,50$ (8); MFD5: $58,56 \pm 0,60$ (9); MFD10: $59,00 \pm 0,52$ (9); MFD20: $56,22 \pm 1,78$ (9)] e animais adultos (**Quadro 5.2**): [MFD2,5: $56,50 \pm 1,41$ (8); MFD5: $57,00 \pm 1,29$ (8); MFD10: $56,86 \pm 0,98$ (7); MFD20: $57,71 \pm 1,10$ (7)] quando comparado ao controle [animais jovens: [CTRL: $59,70 \pm 0,30$ (10)] e animais adultos [CTRL: $59,75 \pm 0,25$ (8)]]].

Por sua vez, Diazepam (2mg/Kg), utilizado como droga padrão, aumentou o número de quedas [animais jovens: DZP2: $2,25 \pm 0,25$ (8) e animais adultos: DZP2: $2,87 \pm 0,12$ (8)] e reduziu o tempo de permanência na barra [animais jovens: DZP2: $50,17 \pm 1,85$ (6) e animais adultos: DZP2: $41,67 \pm 4,21$ (6)] quando comparados aos grupos controle.

Quadro 5.1 - Efeito do MFD e DZP sobre o número de quedas e tempo de permanência na barra no teste Rota Rod em animais jovens

Tratamento	Parâmetros	
	Nº de Quedas	Tempo de Permanência(s)
CTRL	0,37±0,18	59,70±0,30
MFD 2,5mg/Kg, v.o.	0,12±0,12	59,5±0,50
MFD 5mg/Kg, v.o.	0,37±0,18	58,56±0,60
MFD 10 mg/Kg, v.o.	0,50±0,18	59,00±0,52
MFD 20mg/Kg, v.o.	0,25±0,16	56,22±1,78
DZP 2mg/Kg, i.p.	2,25±0,25 ***	50,17±1,85 ***

Os valores representam a média ± EPM do número de quedas e tempo de permanência na barra. Foram utilizados grupos de 6-10 animais. Para análise estatística do parâmetro número de quedas foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal –Wallis seguido por Dunns como teste *post hoc*. Para a análise do parâmetro tempo de permanência na barra foi realizado ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos comparados ao controle (***) $p < 0,001$.

Quadro 5.2 - Efeito do MFD e DZP sobre o número de quedas e tempo de permanência na barra no teste Rota Rod em animais adultos

Tratamento	Parâmetros	
	Nº de Quedas	Tempo de Permanência(s)
CTRL	0,12±0,12	59,75±0,25
MFD 2,5mg/Kg, v.o.	0,57±0,29	56,50±1,41
MFD 5mg/Kg, v.o.	0,62±0,26	57,00±1,29
MFD 10 mg/Kg, v.o.	1,14±0,26	56,86±0,98
MFD 20mg/Kg, v.o.	0,85±0,40	57,71±1,10
DZP 2mg/Kg, i.p.	2,87±0,12 ***	41,67±4,21 ***

Os valores representam a média ± EPM do número de quedas e tempo de permanência na barra. Foram utilizados grupos de 6-10 animais. Para análise estatística do parâmetro número de quedas foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal –Wallis seguido por Dunns como teste *post hoc*. Para a análise do parâmetro tempo de permanência na barra foi realizado ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos comparados ao controle (**p<0,001).

RESUMO DO TESTE DO ROTA ROD

ANIMAIS JOVENS

	N ^o de Quedas	Tempo de permanência
MFD 2,5	-	-
MFD 5	-	-
MFD 10	-	-
MFD 20	-	-
DZP 2	↑	↑

ANIMAIS ADULTOS

	N ^o de Quedas	Tempo de permanência
MFD 2,5	-	-
MFD 5	-	-
MFD 10	-	-
MFD 20	-	-
DZP 2	↑	↑

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

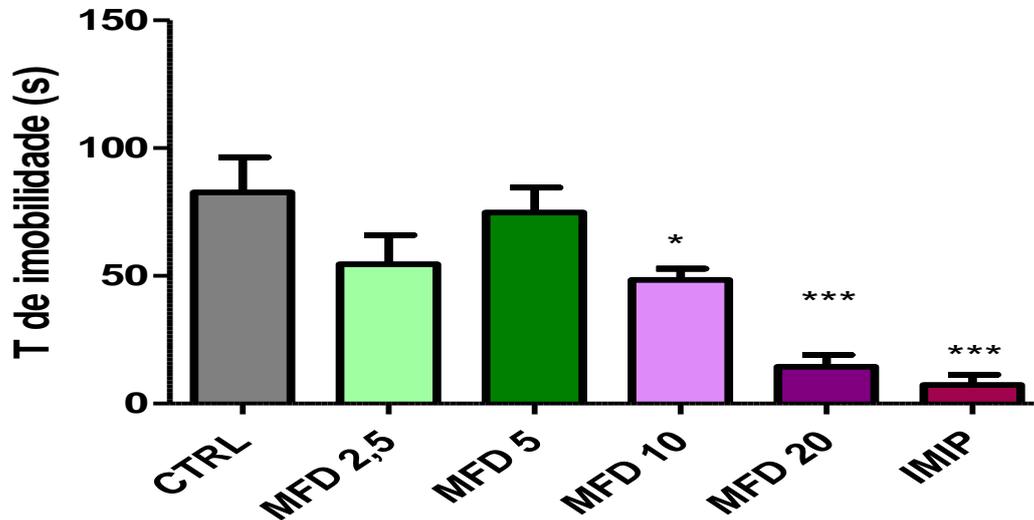
5.3 Avaliação da Atividade Antidepressiva

5.3.1 Teste do Nado Forçado

O tratamento agudo por via oral, nas doses de 2,5, 5, 10 e 20 mg/Kg, de MFD no teste do nado forçado mostrou que diminuiu o tempo de imobilidade nos animais jovens, nas doses de 10 e 20 mg/Kg [animais jovens (**Figura 12**):[MFD10: $48,43 \pm 4,42$ (7); MFD20: $14,38 \pm 4,71$ (8)] e animais adultos, na dose de 20 mg/Kg (**Figura 13**): [MFD20: $91,38 \pm 8,97$ (8)] quando comparado ao grupo controle [animais jovens: [CTRL: $82,71 \pm 13,75$ (7)] e animais adultos: [CTRL: $143,2 \pm 7,60$ (6)]].

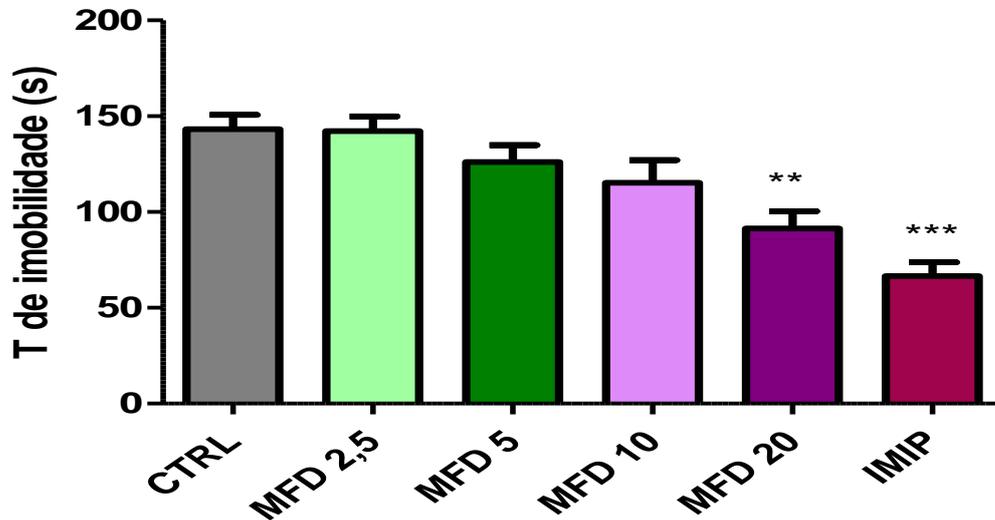
A Imipramina (10mg/Kg), utilizada como padrão positivo, reduziu o tempo de imobilidade nos animais jovens [IMIP-10: $7,25 \pm 4,01$ (12)] e nos animais adultos [IMIP-10: $66,67 \pm 7,15$ (6)] quando comparada ao grupo controle.

Figura 12 - Efeito do MFD e imipramina sobre o tempo de imobilidade no teste Nado Forçado em animais jovens.



Controle (CTRL-veículo), metilfenidato (v.o.) e imipramina (IMIP, i.p.) foram administrados 30 (i.p.) ou 60 min (v.o.) antes do experimento. Os valores representam a média \pm EPM do tempo de imobilidade durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos comparados ao controle (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Figura 13 - Efeito do MFD e imipramina sobre o tempo de imobilidade no teste Nado Forçado em animais adultos.



Controle (CTRL-veículo), metilfenidato (v.o.) e imipramina (IMIP, i.p.) foram administrados 30 (i.p.) ou 60 min (v.o.) antes do experimento. Os valores representam a média \pm EPM do tempo de imobilidade durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos comparados ao controle (**p < 0,01; ***p < 0,001).

RESUMO DO TESTE DO NADO FORÇADO

ANIMAIS JOVENS

	Tempo de Imobilidade
MFD 2,5	-
MFD 5	-
MFD 10	↓
MFD 20	↓↓
IMIP 10	↓

ANIMAIS ADULTOS

	Tempo de Imobilidade
MFD 2,5	-
MFD 5	-
MFD 10	-
MFD 20	↓
IMIP 10	↓

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

5.4 Determinação das Concentrações de Monoaminas

A análise química realizada pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em amostras de tecido cerebral (corpo estriado) mostrou que o tratamento agudo com o MFD nas doses de 2,5, 5, 10 e 20 mg/Kg promoveu alterações nas concentrações das monoaminas.

5.4.1 Animais jovens

O tratamento agudo por via oral do MFD apenas na dose de 2,5 mg/Kg aumentou significativamente a concentração de DA (**Figura 14**) no corpo estriado quando comparado ao controle [MFD2,5: $6,5 \pm 0,72(5)$; CTRL: $3,065 \pm 0,49(5)$].

O tratamento agudo por via oral do MFD aumentou significativamente a concentração de NA (**Figura 14**) em todas as doses observadas no corpo estriado [MFD2,5: $3,027 \pm 0,34(5)$; MFD5: $4,85 \pm 0,59(6)$; MFD 10: $4,69 \pm 1,13(5)$; MFD20: $7,97 \pm 0,67(5)$ quando comparado ao controle [CTRL: $0,98 \pm 0,19(5)$].

O tratamento agudo com MFD por via oral diminuiu significativamente a concentração de 5-HT (**Figura 14**) em todas as doses observadas no corpo estriado [MFD2,5: $4,17 \pm 0,53(6)$; MFD5: $2,38 \pm 0,58(5)$; MFD10: $1,39 \pm 0,14(5)$; MFD20: $1,20 \pm 0,18(5)$] quando comparado ao controle [CTRL: $8,08 \pm 0,98(5)$].

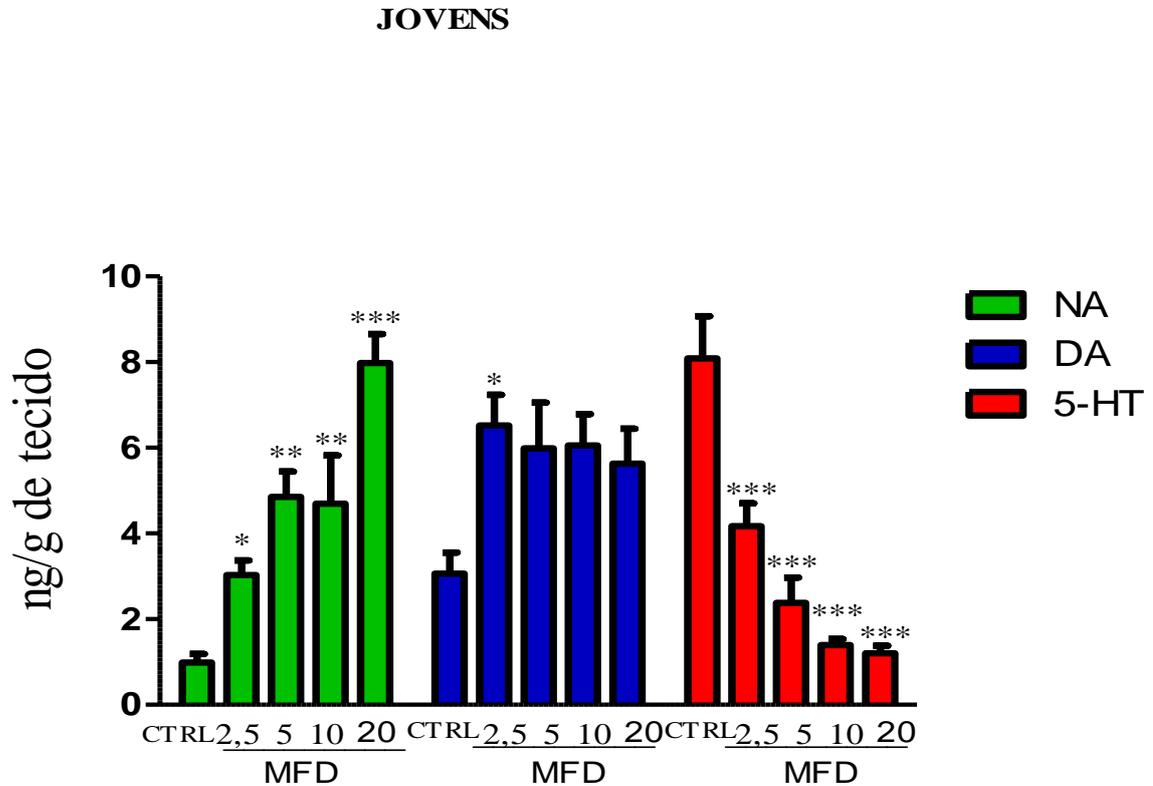
5.4.2 Animais adultos

O tratamento agudo por via oral do MFD não alterou significativamente a concentração de DA (**Figura 15**) em nenhuma das doses observadas [MFD2,5: $59,84 \pm 10,89(5)$; MFD5: $58,65 \pm 15,01(5)$; MFD10: $41,71 \pm 2,67(5)$; MFD20: $74,24 \pm 5,79(5)$] em relação ao controle [CTRL: $57,07 \pm 5,91(5)$].

O tratamento agudo por via oral do MFD aumentou significativamente a concentração de NA (**Figura 15**) nas doses de 5, 10 e 20 mg/Kg [MFD5: $63,14 \pm 3,96(4)$; MFD10: $69,90 \pm 7,50(6)$; MFD20: $61,99 \pm 8,81(5)$] em relação ao controle [CTRL: $8,46 \pm 0,63(5)$].

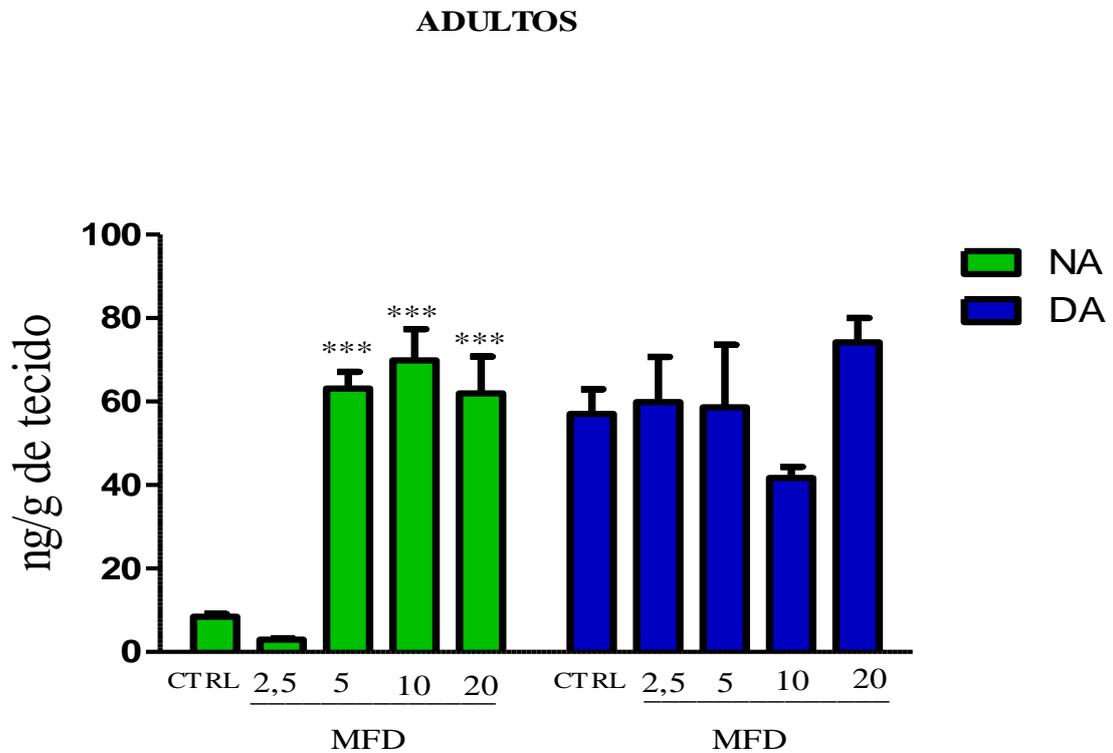
O tratamento agudo por via oral com MFD diminuiu significativamente a concentração de 5-HT (**Figura 16**) apenas nas doses de 10 e 20 mg/Kg [MFD10: $1,95 \pm 0,17$ (6); MFD20: $0,58 \pm 0,13$ (5)] em relação ao controle [CTRL: $5,03 \pm 0,60$ (5)].

Figura 14 - Concentração de monoaminas no corpo estriado de animais jovens submetidos ao tratamento agudo com MFD.



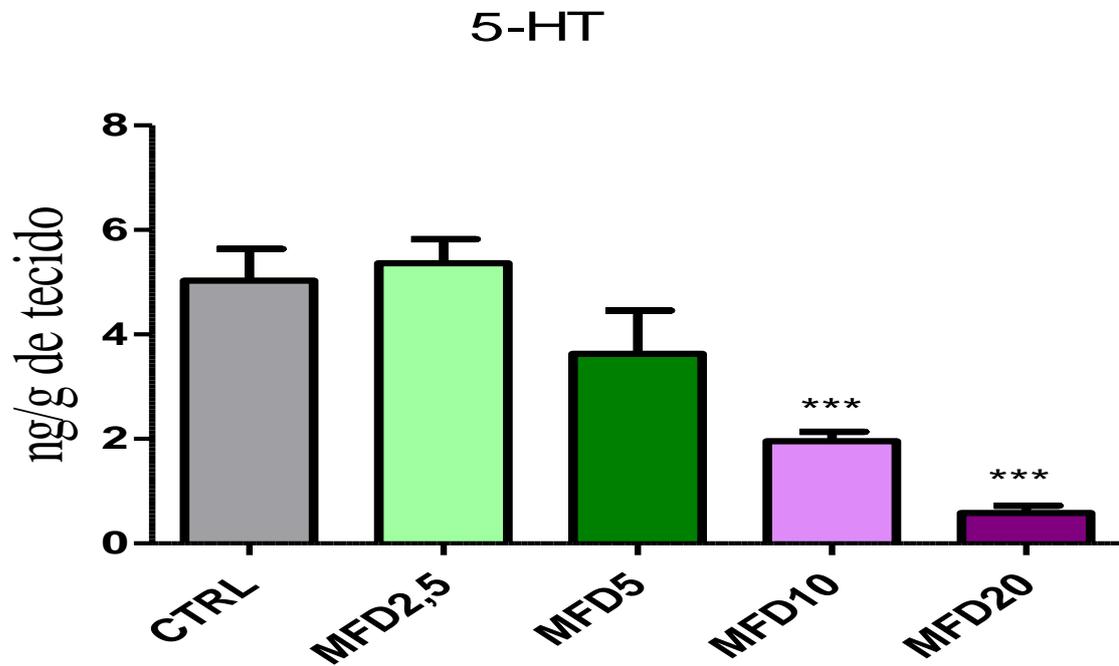
Após 60 minutos da administração do MFD ou veículo, os animais foram dissecados e o corpo estriado foi retirado. A determinação das monoaminas foi realizada pela técnica HPLC com detecção eletroquímica. As barras representam a média±EPM. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos comparados ao controle (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Figura 15 - Concentração de monoaminas no corpo estriado de animais adultos submetidos ao tratamento agudo com MFD.



Após 60 minutos da administração do MFD ou veículo, os animais foram dissecados e o corpo estriado foi retirado. A determinação das monoaminas foi realizada pela técnica HPLC com detecção eletroquímica. As barras representam a média±EPM. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos comparados ao controle (***) $p < 0,001$.

Figura 16 - Concentração de serotonina no corpo estriado de animais adultos submetidos ao tratamento agudo com MFD.



Após 60 minutos da administração do MFD ou veículo, os animais foram dissecados e o corpo estriado foi retirado. A determinação das monoaminas foi realizada pela técnica HPLC com detecção eletroquímica. As barras representam a média±EPM. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos comparados ao controle (***) $p < 0,001$).

RESUMO DA CONCENTRAÇÃO DE MONOAMINAS

ANIMAIS JOVENS

	DA	NA	5-HT
MFD 2,5	↑	↑	↓
MFD 5	-	↑	↓
MFD 10	-	↑	↓
MFD 20	-	↑	↓

ANIMAIS ADULTOS

	DA	NA	5-HT
MFD 2,5	-	-	-
MFD 5	-	↑	-
MFD 10	-	↑	↓
MFD 20	-	↑	↓

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

5.5 Avaliação da Atividade Convulsivante

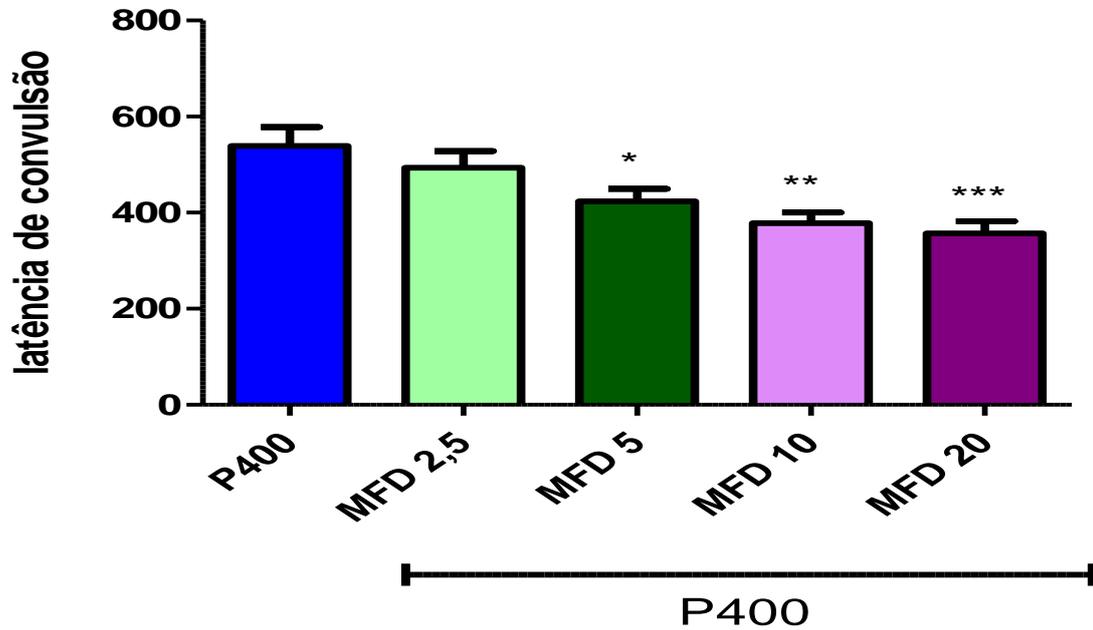
5.5.1 Teste da Convulsão Induzida por Pilocarpina

Após alguns minutos da administração da pilocarpina, 400 mg/Kg, i.p. (P400), tanto os animais jovens como os adultos apresentaram sinais colinérgicos periféricos (100%) (miose, piloereção, cromodacriorréia, salivação, diarreia, diurese e tremores) movimentos estereotipados (aumento da atividade de roer, coçar, mastigar e *wet-dog shakes* – ato de sacudir semelhante a um cachorro molhado), seguidos por convulsões motoras límbicas. Essas mudanças foram mais pronunciadas nos grupos pré-tratados com MFD.

Neste teste foram avaliados as latências de convulsão e o tempo de sobrevivência, em segundos. Os animais jovens tratados com MFD nas doses de 5, 10 e 20 mg/Kg diminuíu a latência de convulsão [MFD5: 423,8±25,63 (13); MFD10: 378,2±22,41 (15); MFD20: 357,2±25,28 (15)] quando comparado ao grupo da pilocarpina [P400: 538,7±39,63 (13)] (**Figura 17**). Por sua vez, os animais adultos tratados com MFD em todas as doses diminuíram a latência de convulsão [MFD2,5: 564,3±44,76 (8); MFD5: 632,3±46,90 (8); MFD10: 677,9±43,54 (14); MFD20: 696,0±25,99 (15)] quando comparado ao grupo da pilocarpina [P400: 875,7±42,80 (14)] (**Figura 18**).

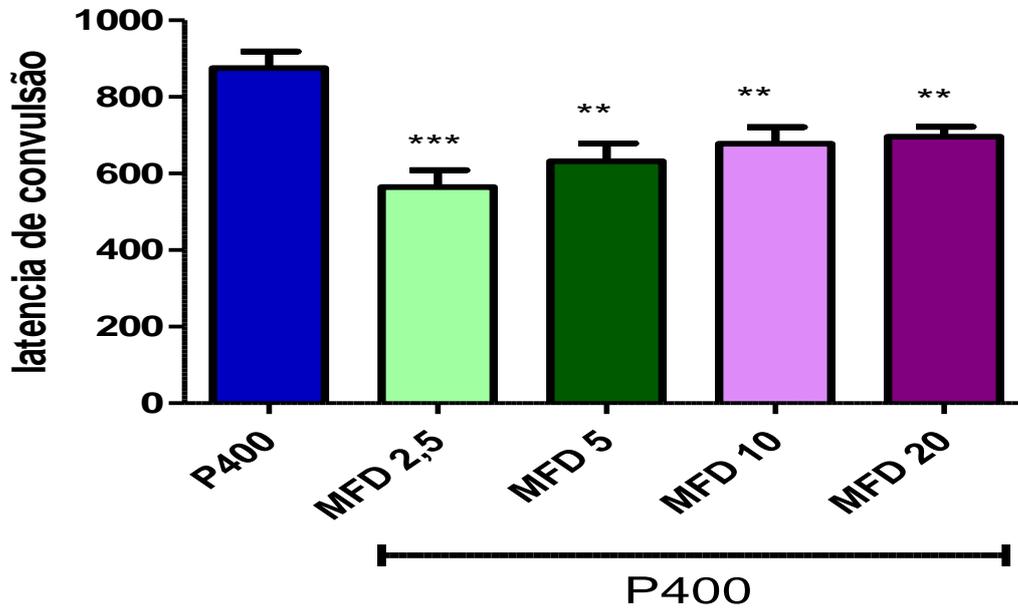
Nos animais jovens, houve uma diminuição no percentual de sobrevivência nos grupos pré-tratados com MFD em todas as doses, em que 100% (n=13) dos animais morreram quando comparado com o grupo de pilocarpina (76,9%: 10/13 dos animais morreram) (**Figura 19**). Nos animais adultos, também houve uma diminuição em todas as doses, onde 100% dos animais morreram [MFD 2,5 (n=8); MFD 5 (n=8); MFD 10 (n=14); MFD 20 (n=12)] quando comparado com o grupo de pilocarpina, onde 64,28% (9/14) dos animais morreram (**Figura 20**).

Figura 17 - Efeito do MFD sobre a latência de convulsão no teste de Convulsão Induzida por Pilocarpina em animais jovens.



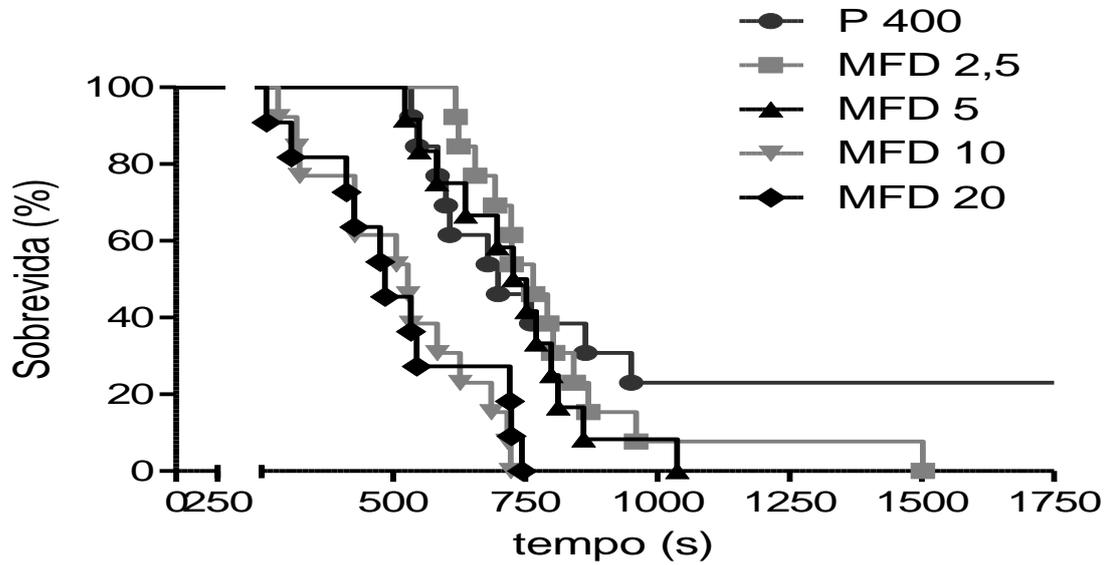
Grupo pré-tratados com metilfenidato (v.o.) e após 1 hora foi induzida a convulsão com P400 (400 mg/Kg; i.p.). Os valores representam a média \pm EPM da latência de convulsão. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos comparados ao controle (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Figura 18 - Efeito do MFD sobre a latência de convulsão no teste de Convulsão Induzida por Pilocarpina em animais adultos.



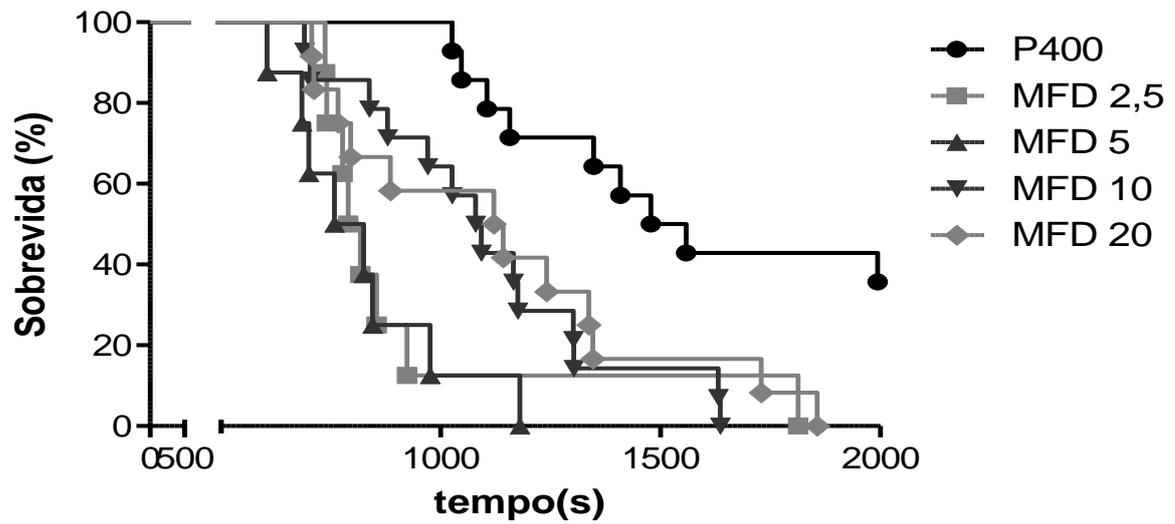
Grupo pré-tratados com metilfenidato (v.o.) e após 1 hora foi induzida a convulsão com P400 (400 mg/Kg; i.p.). Os valores representam a média \pm EPM da latência de convulsão. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos comparados ao controle (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Figura 19 - Efeito do MFD sobre a sobrevida no teste de Convulsão Induzida por Pilocarpina em animais jovens.



Grupo pré-tratados com metilfenidato (v.o.) e após 1 hora foi induzida a convulsão com P400 (400 mg/Kg; i.p.). Os valores representam a média \pm EPM da latência de convulsão.

Figura 20 - Efeito do MFD sobre a sobrevida no teste de Convulsão Induzida por Pilocarpina em animais adultos.



Grupo pré-tratados com metilfenidato (v.o.) e após 1 hora foi induzida a convulsão com P400 (400 mg/Kg; i.p.). Os valores representam a média \pm EPM da latência de convulsão.

RESUMO DO TESTE DE CONVULSÃO INDUZIDA POR PILOCARPINA

ANIMAIS JOVENS

	Latência de Convulsão	Percentagem de sobrevivida
MFD 2,5	-	↓
MFD 5	↓	↓
MFD 10	↓	↓
MFD 20	↓	↓

ANIMAIS ADULTOS

	Latência de Convulsão	Percentagem de sobrevivida
MFD 2,5	↑	↓
MFD 5	↓	↓
MFD 10	↓	↓
MFD 20	↓	↓

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

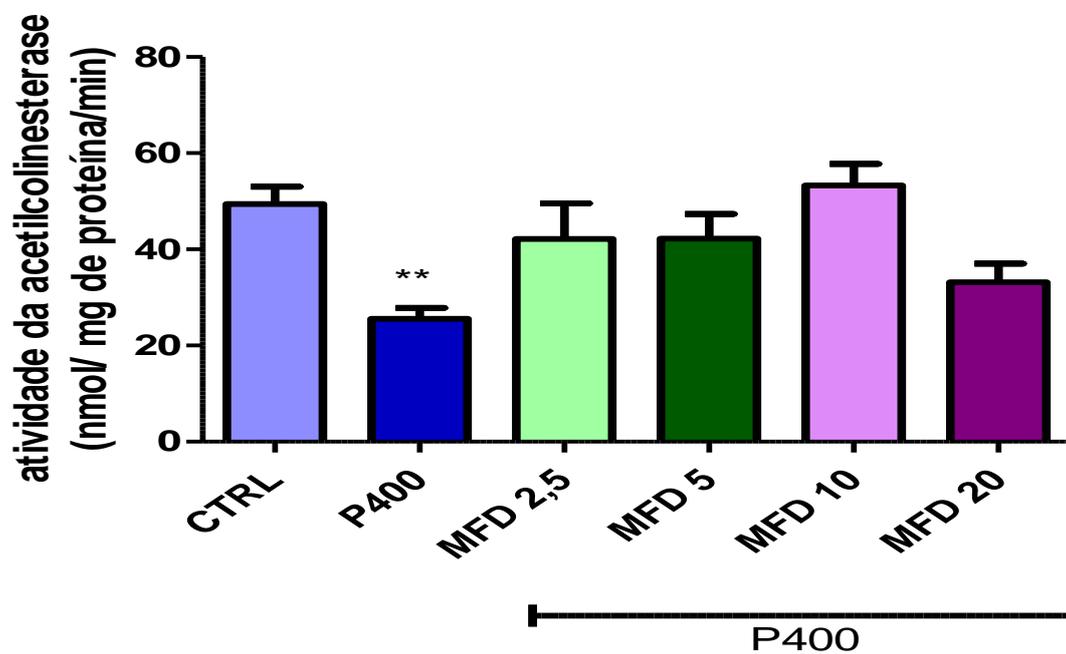
5.6 Efeitos do MFD sobre a atividade da acetilcolinesterase em hipocampo e corpo estriado de animais jovens e adultos tratados ou não com P400

A investigação da atividade enzimática da acetilcolinesterase (AChE) foi realizada em hipocampo e corpo estriado de animais jovens e adultos, pertencentes aos seguintes grupos de tratamento: Veículo (salina 0,9%); metilfenidato 2,5; 5; 10 e 20 mg/Kg, v.o e pilocarpina 400mg/Kg, i.p.. Os resultados foram expressos em nmoles/mg de proteína/ minuto.

Nos animais jovens, a administração de P400 foi capaz de reduzir significativamente ($p < 0,01$) a atividade da AChE no hipocampo e corpo estriado em relação ao controle. Não foi observada nenhuma diferença significativa no hipocampo dos animais pertencentes aos diferentes grupos tratados com MFD (**Figura 21**) [(CTRL= 49,41±3,64(n=6); P400= 25,55±2,31(n=8); MFD2,5+P400= 42,19±7,36(n=6); MFD5+P400= 42,25±5,11(n=6); MFD10+P400= 53,28±4,50(n=6); MFD20+P400= 33,16±3,86(n=6)]. Entretanto, o pré-tratamento com MFD 5, MFD 10 e MFD 20 reduziu significativamente o nível de atividade da enzima AChE no corpo estriado quando comparado ao grupo controle (**Figura 22**) [(CTRL= 83,54±5,14(n=7); P400= 42,75±9,00(n=6); MPH2,5+P400= 67,10±5,37(n=8); MPH5+P400= 57,40±6,43(n=7); MPH10+P400= 43,03±7,60(n=7); MPH20+P400= 59,38±5,54(n=6)].

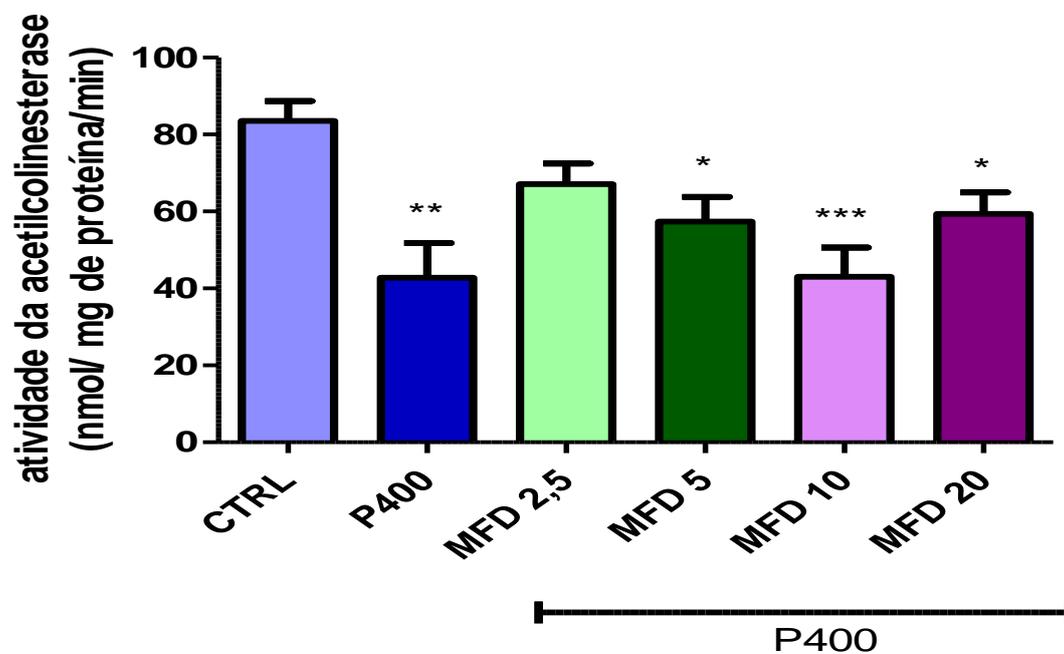
Nos animais adultos, a administração de P400 foi capaz de reduzir significativamente ($p < 0,001$) a atividade da AChE no hipocampo e corpo estriado em relação ao controle. Não foi observada nenhuma diferença significativa no hipocampo dos animais pertencentes aos diferentes grupos tratados com MFD (**Figura 23**) [(CTRL= 63,06±7,10(n=9); P400= 19,04±2,80(n=8); MFD2,5+P400= 45,40±4,02(n=9); MFD5+P400= 40,61±5,99(n=8); MFD10+P400= 69,84±5,23(n=8); MFD20+P400= 54,72±7,76(n=7)]. No corpo estriado, os grupos pré-tratados com MFD 2,5 e MFD 5 reduziu significativamente o nível de atividade da enzima AChE quando comparado ao grupo controle (**Figura 24**) (CTRL= 141,8±12,71(n=8); P400= 48,76±4,70(n=8); MFD2,5+P400= 64,48±4,34(n=9); MFD5+P400= 56,50±5,30(n=10); MFD10+P400= 136,7±17,70(n=6); MFD20+P400= 143,0±16,60(n=8)].

Figura 21 - Efeito do MFD sobre a atividade da AChE em hipocampo de animais jovens durante as convulsões induzidas por P400.



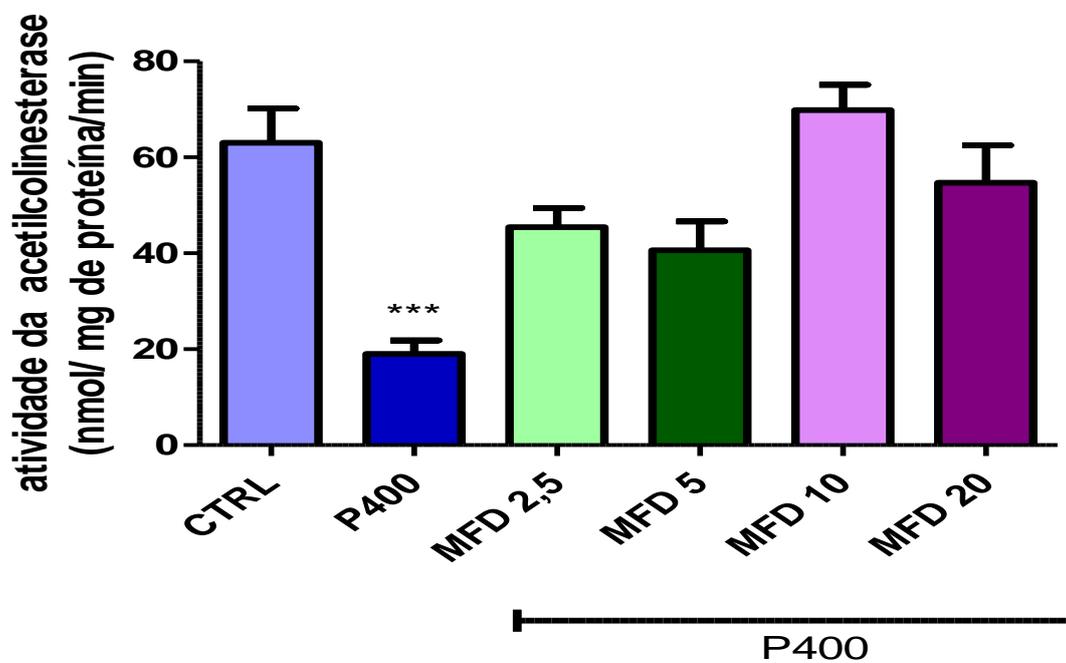
Os resultados representam $\text{media} \pm \text{EPM}$. ** $p < 0,01$ comparado com o controle. (ANOVA e Student-Newman-Keuls).

Figura 22 - Efeito do MFD sobre a atividade da AChE em corpo estriado de animais jovens durante as convulsões induzidas por P400.



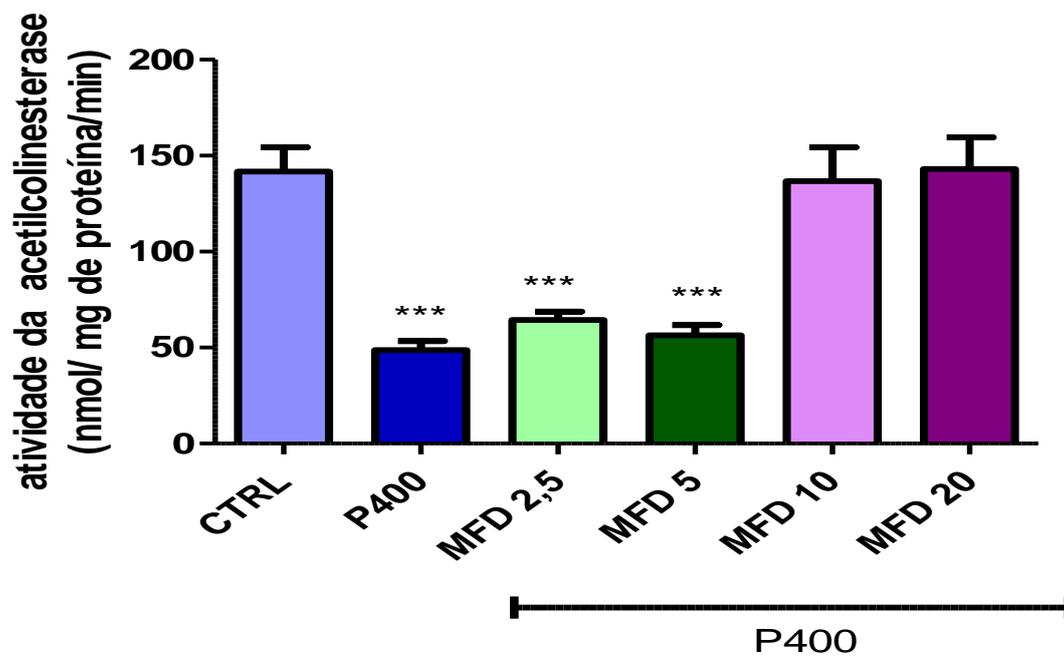
Os resultados representam $\text{media} \pm \text{EPM}$. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ comparado com o controle. (ANOVA e Student-Newman-Keuls).

Figura 23 - Efeito do MFD sobre a atividade da AChE em hipocampo de animais adultos durante as convulsões induzidas por P400.



Os resultados representam $\text{media} \pm \text{EPM}$. $**p < 0,01$ comparado com o controle. (ANOVA and Student-Newman-Keuls).

Figura 24 - Efeito do MFD sobre a atividade da AChE em corpo estriado de animais adultos durante as convulsões induzidas por P400.



Os resultados representam media \pm EPM. *** $p < 0,001$ comparado com o controle. (ANOVA and Student-Newman-Keuls).

5 DISCUSSÃO

O Transtorno do Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH) é um distúrbio neuropsiquiátrico comum que prejudica o funcionamento social, acadêmico e profissional, em crianças, adolescentes e adultos. A prevalência dessa doença nos Estados Unidos é de 6-9% nos jovens (ou seja, crianças e adolescentes) e 3-5% em adultos. As taxas de prevalência para a juventude em todo o mundo são semelhantes (DOPPHEIDE; PLISZKA, 2009).

O transtorno é caracterizado pela presença de sintomas como hiperatividade, dificuldades em manter o foco de atenção, distractibilidade e impulsividade (APA, 2000). A fisiopatologia da desordem permanece incompletamente esclarecida, com uma complexa interação de fatores genéticos, ambientais e neurofisiológicos (RAPPORT *et al.*, 2000; PALOMO *et al.*, 2003).

Estudos mostraram altas taxas de comorbidades neuropsiquiátricas associadas com TDAH (DUNN; AUSTIN, 2004; KUTCHER; AMAN; BROOKS *et al.*, 2004; SOUSA *et al.*, 2001). Um consenso de especialistas internacionais enfatizou a mensagem de que “comorbidades é a norma e não exceção (KUTCHER; AMAN; BROOKS *et al.*, 2004). SOUSA *et al.*, 2001 estudaram um grupo de crianças e adolescentes, e descobriram que mais de 85% tinham transtornos comórbidos. Um estudo também indicam a presença de transtornos de ansiedade, depressão, transtorno bipolar e tique motor (GHANIZADEH, 2009). Os sintomas de TDAH pode, muitas vezes, preceder as primeiras convulsões (AUSTIN; DUNN; CAFFREY *et al.*, 2002).

O psicoestimulante MFD tem um perfil neurofarmacológico semelhante à anfetamina e cocaína, sendo um dos mais prescritos tratamentos no sistema catecolaminérgico e anormalidades cerebrais (WILENS, 2008). Dados na literatura mostram que o MFD inibe a recaptação de noradrenalina e estimula receptores alfa e beta-adrenérgicos no neurônio pós-sináptico (BENNETT *et al.*, 1999). Evidências também sugerem que o MFD pode atuar sobre o sistema serotoninérgico (GATLEY *et al.*, 1996; KUZENSKI; SEGAL, 1997).

Os possíveis efeitos adversos produzidos pela intervenção psicofarmacológica e a falta de informações sobre os efeitos do MFD no neurodesenvolvimento têm gerado preocupações quanto às conseqüências da sua utilização (ACCARDO; BLONDIS, 2001; KLEIN-SCHWARTZ, 2003). Dessa forma, os estudos em animais são muito importantes para elucidar os mecanismos pelos quais o MFD altera o funcionamento do SNC.

Quando modelos animais são utilizados para reproduzir condições clínicas, eles devem ser capazes de mimetizar os sintomas fundamentais da condição estudada, confirmar o racional teórico implicado na gênese do problema e prever aspectos do comportamento, genética e neurobiologia da doença em questão (KOOJI; GLENNON, 2007).

Os efeitos do MFD foram estudados utilizando-se vários modelos de comportamento animal, tais como o labirinto em cruz elevado (LCE), campo aberto, Rota *rod*, nado forçado e convulsão induzida por pilocarpina. Estes testes são modelos clássicos para *screening* de atividades no sistema nervoso central, fornecendo informações sobre desempenho psicomotor, ansiolítico, antidepressivo, atividade miorreaxante e anticonvulsivante (de-PARIS et al., 2000; SOUSA et al., 2004).

É comumente aceito que o estresse, a ansiedade e a depressão são fenômenos relacionados. O estresse é tipicamente implicado na etiologia da depressão e ansiedade ou como consequência de tais desordens, levando em consideração o fato de que a maior fonte de estímulos estressantes em humanos é de natureza social (ANISMAN; ZACHARKO, 1982; BROWN, 1996; PALANZA, 2001). Devido a esta correlação entre transtornos de humor em humanos e estresse social, os modelos animais de ansiedade e depressão são baseados na exposição dos animais a condições estressantes (PALANZA, 2001).

O labirinto em cruz elevado (LCE) foi originalmente desenvolvido por Pellow e colaboradores (1985a) e se tornou um modelo para o estudo do comportamento de ansiedade em ratos e, subsequentemente, em camundongos (LISTER, 1987; CORNÉLIO; NUNES-DE-SOUSA, 2009; BUCKMAN et al., 2009; GRUNDMANN et al., 2009). É baseado na aversão natural que os roedores apresentam a áreas abertas e elevadas (CAROLA et al., 2002; RABBANI et al., 2008; RAUPP et al., 2008), sendo o teste mais utilizado para a procura de novos agentes semelhantes a benzodiazepínicos (PELLOW et al., 1985b; LAPIN, 1995; CHEN et al., 2004).

Durante o teste do LCE, os roedores são normalmente cautelosos ao explorar os espaços abertos. Após uma exploração inicial geral, os animais evitam os espaços abertos e tendem a permanecer nos dois braços fechados do labirinto (BERTOGLIO; CAROBREZ, 2000). Sabendo de tal fato, observa-se que a diminuição na ocupação dos braços abertos e a redução do número de entradas nos braços abertos, em relação ao número total de entradas, é indicativo de um estado de ansiedade. Esse comportamento é atenuado pelo uso de drogas

ansiolíticas e exacerbado pelo uso de drogas ansiogênicas (SONAVANE *et al.*, 2002; BUCKMAN *et al.*, 2009).

No presente estudo, o diazepam na dose de 1mg/Kg foi utilizado como padrão positivo e, como esperado, produziu significativo aumento em todos os parâmetros analisados. Estes parâmetros são o número de entradas nos braços abertos (NEBA), percentual do número de entradas nos braços abertos (PEBA), tempo de permanência nos braços abertos (TPBA) e percentual do tempo de permanência nos braços abertos (PTBA). Isto indica que o diazepam provocou um comportamento ansiolítico nos animais, pois diminuiu o medo natural a espaços desprotegidos e elevados.

O metilfenidato foi administrado por via oral nas doses de 2,5; 5; 10 e 20 mg/Kg tanto em animais jovens como em animais adultos. Foi observado que nos animais jovens, nas doses de 10 e 20 mg/Kg e, nos animais adultos apenas na dose de 20mg/Kg, assim como o diazepam, aumentou significativamente os parâmetros analisados, sugerindo um efeito ansiolítico similar ao diazepam. Consistente com nossos resultados, verificaram que quando administrado MFD em ratos durante a adolescência, estes gastam maior tempo nos braços abertos do LCE (BOLANOS *et al.*, 2003) sugerindo que reduziram o comportamento de ansiedade. Isto foi consistente também com estudos em humanos, demonstrando que o MFD reduz a ansiedade em pacientes com TDAH (BARRICKMAN *et al.*, 1995; BOUFFARD *et al.*, 2003).

Muitos modelos animais de ansiedade têm sido desenvolvidos com base na sua sensibilidade aos benzodiazepínicos. No entanto, altas doses podem induzir sedação, causar uma significativa redução dos parâmetros observados (CRAWLEY, 1981) e resultar em falso-positivo/negativo nos modelos de ansiedade. Portanto, para verificar a relação do efeito ansiolítico do metilfenidato com alteração da atividade locomotora foi realizado o teste campo aberto (TREIT; FUNDYTUS, 1989).

O teste do campo aberto é empregado para avaliar a atividade exploratória dos animais. A tendência natural do animal em um ambiente novo é a de explorá-lo, apesar do estresse e do conflito provocado por este ambiente (MONTGOMERY, 1958). Desta forma, a locomoção, *rearing* e *grooming* em roedores, observados no campo aberto, são os parâmetros comportamentais mais usados para descrever influências dos eventos da vida ou da administração de drogas (MONTGOMERY, 1958; ARAKAWA; IKEDA, 1991; REX *et al.*,

1996). O modelo de campo aberto possibilita discutir a especificidade do efeito de uma droga, caso ela seja estimulante, sedativa, ansiolítica ou ansiogênica (LISTER, 1987).

No presente estudo, o metilfenidato aumentou a atividade locomotora dos animais jovens em todas as doses observadas. Estudos anteriores mostram que o MFD muitas vezes aumenta a atividade locomotora em animais jovens (YANG *et al.*, 2003; YANG *et al.*, 2006). Nos animais adultos aumentou apenas nas doses maiores, 10 e 20 mg/Kg. Fredriksson e Archer, 2004, avaliando o mesmo modelo utilizado neste estudo, observaram que uma possibilidade é de que nos nossos animais adultos, por já serem adultos, teriam menos hiperatividade do que os animais jovens avaliados, onde foi observado aumento na locomoção em todas as doses. Já o diazepam, na dose de 2mg/Kg, diminuiu a atividade locomotora indicando efeito sedativo comum aos benzodiazepínicos.

Tem sido proposto que os psicoestimulantes (p.ex. d-anfetamina) induzem também um aumento da exploração das áreas centrais do campo aberto (EINAT *et al.*, 2007). Considerando que a ansiedade pode reduzir a atividade exploratória (PRUT, 2003), propomos que o MFD, na tarefa em questão, parece gerar um efeito ansiolítico e desinibitório.

O *rearing* está associado como um aspecto de comportamento exploratório (JOHANSSON; AHLENIUS, 1989), embora outros trabalhos relatem que agentes ansiolíticos diminuem o número de *rearing* (HUGHES, 1972; STOUT, 1994). Na literatura é referido que o aumento de *grooming* é observado em roedores apreensivos (ARCHER, 1973), e em vários estudos, pesquisadores observaram que drogas ansiolíticas reduzem o *grooming* no campo aberto (DUNN *et al.*, 1981; MOODY *et al.*, 1993; BARROS *et al.*, 1994). Não houve alteração no número de *rearing* nem no número de *grooming* nos animais tratados com MFD no campo aberto. O diazepam, na dose de 2 mg/kg, diminuiu o *rearing* e *grooming*.

Dando continuidade a investigação dos efeitos do metilfenidato que demonstrou no LCE atividade ansiolítica similar ao diazepam, nas doses mais altas, decidiu-se analisar os efeitos do MFD na coordenação motora, considerando que drogas como o diazepam apresentam efeito ansiolítico e em doses mais altas, alteram a coordenação motora.

Quando um roedor é colocado repetidamente em um cilindro em rotação constante, o animal rapidamente se adapta à rotação. Entretanto, após a administração de um depressor do SNC, o animal facilmente cai da haste giratória. Com a finalidade de avaliar uma possível

atividade miorrelaxante do metilfenidato, foi utilizado o teste do rota *rod*, um modelo animal clássico usado para determinar o efeito de drogas na coordenação motora de roedores (KURIBARA *et al.*, 1977; BOHLEN *et al.*, 2009).

Nossos resultados mostraram que o metilfenidato nas doses estudadas não alterou a coordenação motora, diferenciando-se do diazepam 2mg/Kg (droga ansiolítica que nesta dose apresenta efeito relaxante muscular), que aumentou o número de quedas e diminuiu o tempo de permanência na barra. Este resultado sugere que o MFD nas doses de 2,5; 5; 10 e 20 mg/Kg não apresenta bloqueio neuromuscular periférico mas, sim, um bloqueio em nível central (PEREZ *et al.*, 1998; AMOS *et al.*, 2001).

Assim como a ansiedade, a depressão também costuma estar presente em portadores de TDAH. O teste do nado forçado é um modelo animal amplamente empregado para a investigação de atividade antidepressiva (LUO *et al.*, 2000; YAN *et al.*, 2004; BASSO *et al.*, 2009; FRANKOWSKA *et al.*, 2007). É um teste que apresenta facilidade de uso, confiabilidade, especificidade e sensibilidade ao uso agudo de antidepressivos (CRYAN *et al.*, 2002; DUARTE *et al.*, 2007).

O estresse é considerado como um fator importante no desenvolvimento de transtornos do sistema nervoso central, tais como depressão. Estudos têm mostrado que experiências estressantes aumentam a vulnerabilidade a este distúrbio (KAROLEWICZ; PAUL, 2001; HENNINGSEN *et al.*, 2009).

O teste do nado forçado é baseado no “desespero comportamental”, onde os animais são forçados a nadar em um espaço confinado (MORA *et al.*, 2005; SAKI *et al.*, 2009). Neste teste, drogas antidepressivas diminuem o tempo de imobilidade, aumentando o tempo de nado e o comportamento de luta ante o estresse (PALANZA, 2001; WANG *et al.*, 2009).

Embora a relação entre a imobilidade observada neste teste e a depressão em humanos permaneça controversa, uma grande variedade de compostos antidepressivos e compostos que apresentam potenciais antidepressivos reduzem o tempo de imobilidade no teste do nado forçado (BILKEI-GORZO *et al.*, 2002; DHIR; KULKARNI, 2007; YAO *et al.*, 2009).

Foi observado que o MFD diminuiu o tempo de imobilidade nas doses de 10 e 20 mg/Kg nos animais jovens e apenas na de 20 mg/Kg nos animais adultos. Os resultados também mostraram que a imipramina (inibidor de recaptção de noradrenalina e serotonina)

usada como padrão positivo nos testes no nado forçado, também diminuiu o tempo de imobilidade dos animais, corroborando com os estudos que mostraram a sensibilidade deste teste às várias doses de drogas antidepressivas (KULKARNI; DHIR, 2007). Os resultados deste estudo forneceram evidências de que o MFD apresentou um efeito antidepressivo, uma vez que houve uma diminuição no tempo de imobilidade no teste do nado forçado.

De qualquer forma, embora o MFD melhore sintomas depressivos em crianças com TDAH (GADOW, 2002) tal fármaco não é utilizado como antidepressivo. Uma questão que permanece controversa é seu uso na clínica como estratégia de potencialização de fármacos antidepressivos. Apesar de alguns relatos de caso sugirem seu uso com essa finalidade (STOLL *et al.*, 1996), estudos recentes, de melhor desempenho experimental, não apresentaram resultados promissores (PATKAR, 2006; RAVINDRAN, 2008).

Para corroborar os resultados dos experimentos comportamentais, o presente estudo investigou o efeito agudo do tratamento com o inibidor da recaptção de noradrenalina (NA) e dopamina (DA), metilfenidato, nos níveis extracelulares de monoaminas no corpo estriado de camundongos jovens e adultos.

Em geral, a habilidade dos psicoestimulantes em aumentar a neurotransmissão dopaminérgica exerce papel crucial nos efeitos comportamentais dessas drogas, embora outros neurotransmissores como a NA e a 5-HT possam contribuir para o efeito estimulante desses compostos (KUCZENSKI *et al.*, 1995). Em roedores, foi demonstrado que o MFD aumenta a concentração extracelular de DA no estriado e de NA no hipocampo, mas diferente da anfetamina, o MFD apresentou uma ação pouco expressiva ou ausente sobre os níveis de 5-HT (KUCZENSKI *et al.*, 1997).

Acredita-se que as monoaminas estejam envolvidas na patogenia de muitas doenças mentais. Sabe-se da participação da dopamina na psicose, pois muitos fármacos antipsicóticos bloqueiam receptores dopaminérgicos (SEEMAN, 1987), já a 5-HT está envolvida em muitos distúrbios neuróticos, incluindo ansiedade, distúrbios do pânico (AGHAJANIAN, 1994) e depressão (COHEN, 1995) e, por fim, vários estudos experimentais e clínicos indicaram que o sistema noradrenérgico está envolvido na fisiopatologia da depressão (FRAZER, 2000; NUTT, 2006). O tratamento da depressão depende do entendimento da fisiopatologia e do mecanismo pelo qual os fármacos antidepressivos atuam. O distúrbio depressivo foi reconhecido, inicialmente, como um fenômeno bioquímico (SCHILDKRAUT, 1965) e desde

a aceitação da teoria monoaminérgica acredita-se que a depressão é devido a uma deficiência da atividade das monoaminas biógenas (SVENSSON, 2000; BRUNELLO *et al.*, 2002; HENSLER, 2003; BLIER; WARD, 2003).

Foi sugerido que a falta de NA e/ou 5-HT na fenda sináptica é a base neurológica para a depressão (PRANGE, 1964; BUNNEY; DAVIS, 1965; SCHILDKRAUT, 1965; COPPEN, 1967; LAPIN; OXENKRUG, 1969). Essa teoria sempre encontrou dificuldades para ser consolidada, pois o efeito das drogas antidepressivas somente é evidenciado após algumas semanas do início do tratamento. Após a realização dos trabalhos de Vetulani e Sulser (1975), pesquisadores desviaram a atenção sobre o efeito imediato dos antidepressivos com relação à concentração de monoaminas na fenda sináptica para alterações nas características e funções dos receptores (BAKER; GREENSHAW, 1989). Alterações em receptores dos neurotransmissores foram encontradas em suicidas vítimas de depressão, no entanto, isso é interpretado em termos de uma redução dos níveis de monoaminas (MANN *et al.*, 1986; LEONARD, 2000).

Em conjunto com estudos em humanos, os resultados sugerem que a neurotransmissão dopaminérgica é reduzida na depressão, e que essa alteração, possivelmente, serve como base para a redução da energia e motivação do paciente deprimido (HARRO; ORELAND, 2001). Analisando a concentração de DA, o MFD aumentou os níveis de DA nos animais jovens e apresentou uma tendência para aumento nos animais adultos, no corpo estriado. Há uma diferença na responsividade entre os animais jovens e adultos no modelo de depressão que pode estar relacionado com as alterações observadas nos níveis de DA.

De um modo geral, o corpo estriado ajuda a iniciar e a controlar ações corticais que incluem os movimentos voluntários, o comportamento e, em parte a cognição. Em modelos animais, a elevação da DA no corpo estriado promove aumento da área locomotora percorrida no campo aberto (CORRÊA *et al.*, 2009). Neste estudo, os animais tratados com MFD apresentaram aumento na atividade locomotora percorrida no campo aberto em todas as doses nos animais jovens e na doses de 10 e 20mg/Kg nos animais adultos.

O MFD aumenta a DA bloqueando o Transportador de Dopamina (DAT) (VOLKOW *et al.*, 2001; SPENCER *et al.*, 2006), que é o principal mecanismo para a remoção de DA a partir do espaço extracelular (GAINETDINOV; CARON, 2003), e, assim, a magnitude do

aumento DA é derivado pelo nível de bloqueio de DAT e da quantidade de DA liberado (VOLKOW *et al.*, 2002).

Foi demonstrado que drogas que afetam a transmissão noradrenérgica, como as que inibem a recaptação de NA nos terminais nervosos, ou seu metabolismo (inibidores da MAO), são efetivos na depressão (DENCKER, 2000). Um centro de pesquisa utilizando uma nova técnica de mensuração veno-arterial de concentração de gradientes para avaliar o nível de monoaminas observou que a liberação de NA estava marcadamente reduzida em pacientes depressivos (LAMBERT *et al.*, 2000). Nossos achados mostram um aumento da concentração de NA no corpo estriado dos animais jovens e adultos tratados com MFD.

A análise da concentração de DA e NA no corpo estriado dos animais tratados com MFD mostrou que, de maneira geral, o MFD alterou, resultando em aumento das concentrações dessas monoaminas. Esses resultados confirmam a atividade antidepressiva do MFD, determinada após a análise dos modelos animais comportamentais de depressão.

A ansiedade é uma desordem emocional geralmente associada à depressão. Os sintomas da ansiedade coexistem com a depressão (KRAVITZ *et al.*, 1990; BAKISH, 1999). A ansiedade generalizada e a social, assim como os ataques de pânico com depressão são comorbidades comuns na população geral (KESSLER; WITTCHEN, 1999). Van Praag *et al.*, (1998) propuseram que muitos casos de depressão são caracterizados por uma causalidade iniciada na ansiedade e, subseqüentemente, desencadeando um estado de depressão. A base biológica para esse desenvolvimento não está clara, mas a lógica é sustentada pela sequência finalizando com depressão. Por isso, o tratamento com antidepressivos reduz primeiro a ansiedade e depois o retardo motor e quadro depressivo (KATZ *et al.*, 1987; 1994).

A 5-HT no cérebro desempenha um papel importante em vários processos fisiológicos e condições patológicas. A neurotransmissão de 5-HT está envolvida na regulação do humor, controle de impulso, sono, vigília, fome, libido, e funções cognitivas, como memória e aprendizado. Além disso, a 5-HT é importante na modulação da ansiedade e do medo, como bem como impulsividade em suicidas e outros atos de violência (ARANGO *et al.*, 2001; LEMONDE *et al.*, 2003).

Os benzodiazepínicos exercem as suas ações ansiolíticas por interação com o sistema GABAérgico e parecem interagir diretamente com o sistema serotoninérgico para produzir

alguns de seus efeitos ansiolíticos (FÉRNANDEZ-GUASTI; LÓPEZ-RUBALCAVA, 1998). A diminuição dos níveis de 5-HT verificada nos indivíduos tratados com diazepam é consistente com a capacidade dos benzodiazepínicos em reduzir a neurotransmissão de 5-HT (GE *et al.*, 1997). Em concordância com nossos resultados, o MFD reduziu a concentração de 5-HT, no corpo estriado, dos animais jovens em todas as doses e, nos adultos apenas nas doses maiores, ou seja, de 10 e 20 mg/Kg, sugerindo que o MFD age como um ansiolítico, visto também pelo modelo comportamental de ansiedade.

Há uma advertência na bula aprovada pelo FDA aconselhando contra o uso de MFD em face das crises convulsivas (Physician's Desk Reference, 2007). No entanto, a informação que sustenta esta possibilidade é muito limitada e contrariada por outras linhas de evidência. Overdose de MFD pode conduzir a estimulação do sistema nervoso central ou do sistema simpaticomimético, causando manifestações graves, incluindo convulsões (KLEIN-SCHWARTZ, 2002).

O MFD foi testado num modelo de convulsão induzida por sensibilização com baixa intensidade de estimulação do cérebro (*kindling*). Neste modelo, o MFD prolongou a duração das convulsões, mas apenas fracamente (BABINGTON; WEDEKING, 1973).

Modelos de convulsões induzidos em animais reproduzem alterações comportamentais e eletroencefalográficas que são semelhantes à epilepsia do lobo temporal de humanos (BEM-ARI *et al.*, 1980; HONCHAR *et al.*, 1983; CAVALHEIRO *et al.*, 1991).

O modelo de convulsão induzido por pilocarpina em altas doses (400 mg/Kg) foi utilizado como instrumento para investigar a participação dos diferentes sistemas de neurotransmissão do SNC como possíveis moduladores da epileptogênese, como também para observar as alterações comportamentais, e outros aspectos neuroquímicos relacionados com a fase aguda do processo convulsivo (CAVALHEIRO *et al.*, 1994; MARINHO *et al.*, 1997 e 1998; COSTA-LOTUFO *et al.*, 2002; FREITAS *et al.*, 2004a).

A convulsão induzida por pilocarpina pode ser caracterizada por episódios de alteração no comportamento dos animais (TURSKI *et al.*, 2003a). Essas convulsões apresentam, ainda, uma temporária redução da consciência e contrações involuntárias do músculo esquelético em humanos (VANHATALO; RIIKONEN, 1999; JOBE, 2003). Assim, a atividade epiléptica

pode ser detectada pelas alterações eletroencefalográficas e comportamentais (TURSKI *et al.*, 1983 a,b; CAVALHEIRO *et al.*, 1991).

Imediatamente após a administração de pilocarpina, os ratos podem apresentar persistentes mudanças comportamentais, incluindo piloereção, cromodacriorréia, acinesia inicial, ataxia, tremores, automatismos mastigatórios como mioclonia dos músculos faciais, e movimentos de cachorro molhado, que persistem de 10 a 15 minutos (TURSKI *et al.*, 1983a). Nos nossos estudos comportamentais, essas alterações foram observadas de forma semelhantes tanto nos animais jovens como nos adultos, quando pré-tratados com MFD.

Os resultados deste estudo mostram que as convulsões dos animais pré-tratados com MFD foram potencializadas, sendo observados efeitos não só na redução do tempo para o início do aparecimento da primeira convulsão, mas também a redução na percentagem de sobrevivência dos animais após a administração de P400 quando comparados aos animais tratados apenas com P400. Tais efeitos foram observados em animais jovens e adultos.

A investigação do mecanismo via colinérgica, foi feita através do modelo da pilocarpina, um agonista muscarínico, que em doses elevadas induz alterações comportamentais, tais como convulsões e lesões cerebrais em roedores via superestimulação cortical (ALAM; STARR, 1993; FREITAS *et al.*, 2006). As análises comportamentais para a latência de convulsão e sobrevivência nos permitem sugerir que o MFD possui um mecanismo via colinérgica e parece não proteger contra convulsões em modelos colinérgicos.

Para melhor elucidar o papel da transmissão colinérgica em convulsões e morte observada por MFD, foi determinada a atividade da acetilcolinesterase em cérebro dos animais. 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). A AChE é considerada essencial para o funcionamento normal do sistema nervoso, à medida que limita a ação da acetilcolina, tão logo esta seja liberada das fendas sinápticas. Especula-se que a atividade dessa enzima poderia afetar o desenvolvimento das convulsões induzida por pilocarpina, além da sua importância como possível alvo terapêutico (GETOVA-SPASSOVA, 2006).

A inibição da atividade da AChE, induzida pela administração de pilocarpina, em modelo de convulsões, já foi previamente reportada (FREITAS *et al.*, 2006; SALES *et al.*, 2010). No nosso estudo, de acordo com a literatura disponível, P400 reduziu a atividade dessa enzima, na qual foi observado pela facilidade da incidência e da frequência da atividade epiléptica nos animais jovens e adultos.

O pré-tratamento com MFD em animais jovens reduziu a atividade da enzima significativamente nas doses de 5, 10 e 20 mg/Kg, em comparação ao grupo controle apenas no corpo estriado. Por sua vez, em animais adultos, o pré-tratamento reduziu significativamente a atividade da enzima nas doses de 2,5 e 5mg/Kg quando comparado ao grupo controle apenas no corpo estriado. Não houve diferenças significativas no hipocampo de animais jovens e adultos pré-tratados com MFD. Foi anteriormente descrito que o tratamento com MFD aumenta a atividade da AChE no córtex pré-frontal mas não no hipocampo de ratos (KOZAK *et al.*, 2007). As diferenças de resposta entre jovens e adultos em ratos após o tratamento do MFD têm sido relatadas, e alguns investigadores sugerem que estas diferenças dependem da área do cérebro estudada, da dose, bem como da idade da exposição ao fármaco (VOLKOW *et al.*, 1998; YANO; STEINER, 2005; CHASE *et al.*, 2007).

Fisiologicamente em cérebros de ratos, pode ser detectada uma alta concentração de AChE, principalmente em neurônios do striatum, do núcleo lateral do tálamo, do tubérculo olfatório e do núcleo accumbens; em outras áreas, o conteúdo dessa enzima apresenta-se em menor proporções. Isto pressupõe que, o conteúdo da enzima AChE pode variar entre as estruturas cerebrais, conferindo àquelas que apresentam maiores concentração, possivelmente uma maior metabolização da acetilcolina, podendo manter o equilíbrio entre os mecanismos excitatórios e inibitórios do SNC e impedir o desenvolvimento de descargas neuronais anormais que culminam na hiperexcitação neuronal (PALKOVITS; JACOBOWITZ, 1974).

A ativação colinérgica é essencial para o início do processo convulsivo em modelos de epilepsia do lobo temporal, visto que estas convulsões podem ser bloqueadas pelo pré-tratamento com antagonista muscarínico atropina (DE BRUIN *et al.*, 2000). Sabe-se que drogas anticolinesterásicas (colinérgicas indiretas) também podem exercer efeitos excitatórios similares a agonistas colinérgicos exógenos (pilocarpina, carbacol). Acredita-se que a diminuição do metabolismo da acetilcolina, pela redução ou bloqueio da atividade da AChE, pode facilitar a instalação da atividade epiléptica, em virtude do aumento da concentração da

acetilcolina endógena, que pode ativar diretamente o sistema colinérgico e, de forma direta ou indireta, induzir mudanças neuroquímicas em outros sistemas de neurotransmissão, dentre eles, glutamatérgico e GABAérgico, uma vez que estes podem estar implicados durante o estabelecimento e desenvolvimento das convulsões límbicas (IMPERATO *et al.*, 1998).

Nossos achados sugerem que o mecanismo de convulsões causadas pelo MFD pode envolver uma interação com o sistema gabaérgico e glutamatérgico, através de uma modulação no sistema colinérgico, com possível redução da atividade da enzima acetilcolinesterase, culminando com o aumento dos níveis de acetilcolina. Foi demonstrado uma interação entre os sistemas GABAérgico e muscarínico em que a acetilcolina bloqueia as correntes GABAérgicas inibitórias pós-sinápticas e a resposta ao GABA exógeno, mesmo na presença de tubocurarina (antagonista nicotínico) ou de atropina, em células ganglionares da retina de ratos. (SHIH *et al.*, 1991).

Isso sugere um efeito modulador, exercido pelo MFD sobre o funcionamento do sistema colinérgico muscarínico, em nível central, como mecanismo alternativo para potencialização das convulsões no modelo do P400, demonstrando um possível mecanismo colinérgico envolvido, visto que o fármaco reduziu a atividade da acetilcolinesterase.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÃO

A análise dos resultados apresentados neste trabalho nos permitiu concluir que:

- Nos testes do labirinto em cruz elevado, o metilfenidato aumentou todos os parâmetros analisados, comprovando seu efeito ansiolítico;
- No teste do campo aberto, o metilfenidato aumentou a atividade locomotora e não alterou o *grooming* e *rearing*, sugerindo um efeito ansiolítico e desinibitório;
- No teste do Rota *rod*, a coordenação motora dos animais não foi alterada, mostrando que os efeitos desta substância não estão relacionados com o bloqueio neuromuscular periférico, mas sim, ocasionados centralmente;
- Nos testes do nado forçado, o metilfenidato apresentou efeito antidepressivo, pois diminuiu o tempo de imobilidade dos animais, levando-nos a sugerir uma maior investigação nesse contexto, uma vez que o fármaco não é, tradicionalmente, usado como antidepressivo, na clínica;
- Após a análise das monoaminas, verificou-se que o metilfenidato aumentou a concentração das aminas biógenas estudadas, corroborando com o efeito antidepressivo observados nos modelos nado forçado.
- No teste da convulsão induzida por pilocarpina, o metilfenidato diminuiu as latências de convulsão e de morte, demonstrando apresentar uma atividade proconvulsivante.
- O pré-tratamento com metilfenidato foi capaz de reduzir o nível de atividade da enzima AChE no corpo estriado, induzida por P400, mas não no hipocampo. Isso sugere um possível mecanismo colinérgico como mecanismo alternativo para potencialização das convulsões no modelo do P400.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ACCARDO, P.; BLONDIS, T. A. What's all the fuss about Ritalin? **J Pediatr**, v. 138, p.6-9, 2001.
- AGHAJANIAN, G. K.; LAKOSKI, J. M. Hyperpolarization of serotonin neurons by serotonin and LSD: studies in brain slices showing increased K⁺ conductance. **Brain Res.**, v.305, p.181-185, 1994.
- ALAM, A. M.; STARR, M. S. Dopaminergic modulation of pilocarpine-induced motor seizure in the rat: The role of hippocampal D2 receptors. **Neuroscience**, v.53, p. 425-431, 1993
- ALEXANDER, G. E.; DELONG M. R., STRICK P. L. Parallel organization of functionally segregate circuits linking basal ganglia and cortex. *Annu. Rev. Neurosci.*, v. 9, p. 357-381, 1986.
- ALEX, K. D.; PEHEK, E. Pharmacologic mechanisms of serotoergic regulation of dopamine neurotransmission. **Pharmacology & Therapeutics**, v.113, p.296-320, 2007.
- ALI, A. et al. Evidence of the antiepileptic potential of amiloride with neuropharmacological benefits in rodent models of epilepsy and behavior. **Epilepsy Behav.**, v.5, p.322-328, 2004.
- AMARA, S. G.; SONNERS, M.S. Neurotransmitter transporters as molecular targets for addictive drugs. **Drug Alcohol Depend.**, v. 51, p.87-96, 1998.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION (APA). **Manual Diagnóstico e Estatístico dos Transtornos Mentais**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2002.
- AMOS, S. *et al.* Neuropharmacological effect of the aqueous extract of *Sphaeranthus senegalensis* in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 78, p. 33-37, 2001.
- ANISMAN, H.; ZACHARKO, R. M. Stimulus change influences escape performance: deficits induced by uncontrollable stress and by haloperidol. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 17, p.263-269, 1982.
- ANSSEAU, M. et al. Objective: remission of depression in primary care: The Oreon Study. **Eur. Neuropsychopharmacol.**, v.19, p.169-176, 2009.
- ARAKAWA, O.; IKEDA, T. Apomorphine effects on single and paired rat open-field behavior. **Physiology & Behavior**, v. 50, p. 189-194, 1991.
- ARANGO, V.; UNDERWOOD, M.D.; BOLDRINI, M.; TAMIR, H.; KASSIR, S.A.; HSIUNG, S. et al.: Serotonin 1A receptors, serotonin transporter binding and serotonin transporter mRNA expression in the brainstem of depressed suicide victims. **Neuropsychopharmacology**, v. 25, p. 892–903, 2001.

ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice. A review. **Anim. Behav.**, v. 21, p. 205-35, 1973.

ARNSTEN, A. F. T.; DUDLEY, A. G. Methylphenidate improves prefrontal cortical cognitive function through $\alpha 2$ adrenoceptor and dopamine D1 receptor actions: relevance to therapeutic effects in Attention Deficit Hyperactivity Disorder. **Behavioral Brain Functions**, v. 1, p.2, 2005.

ARNSTEN, A. F. T.; MING-LI, B. Neurobiology of executive functions: catecholamine influences of prefrontal cortical functions. **Society of Biological Psychiatry**, v. 57, p. 1377-1384, 2005.

ASCHER, J. A. *et al.* Bupropion: a review of its mechanism of antidepressant activity. **Journal of Clinical Psychiatry**, v. 56, p. 395-401, 1995.

AURIEL, E.; HAUSDORFF, J. M.; GILADE, N. Methylphenidate for treatment of Parkinson disease and other neurological disorder. **Clin Neuropharmacol**, v.32, p.75-81, 2009.

AUSTIN, J. K.; DUNN, D. W.; CAFFREY, H. M. *et al.* Recurrent seizures and behavior problems in children with first recognized seizures: a prospective study. **Epilepsia**, v. 43, p.1564-73, 2002.

BABINGTON, R. G.; WEDEKING, P. W. The pharmacology of seizures induced by sensitization with low intensity brain stimulation. **Pharmacol Biochem Behav**, v.1, p.461-467, 1973.

BADDELEY, A. D. **Working memory**. Oxford, UK: Clarendon Press, 1986.

BAKER, G. B.; GREENSHAW, A. J. Effects of long-term administration of antidepressants and neuroleptics on receptors in the central nervous system. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 9, p. 1-44, 1989.

BAKISH, D. The patient with comorbid depression and anxiety: the unmet need. **Journal of Clinical Psychiatry**, v. 60, p. 20-24, 1999.

BARONE, P.; PALMA, V.; DEBARTOLOMEIS, A.; TEDESCHI, E.; MUSCETTOLA, G.; CAMPANELLA, G. Dopamine D1 e D2 receptors mediate opposite functions in seizures induced by lithium-pilocarpine. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 195, p. 157-162, 1991.

BARRICKMAN, L. L.; PERRY, P. J.; ALLEN, A. J., KUPERMAN, S., ARNDT, S. V.; HERRMANN, K. J., SCHUMACHER, E. Bupropion versus methylphenidate in the treatment of attention-deficit hyperactivity disorder. **Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry**, v.34, P. 649-65, 1995.

BARROS, H. M. *et al.* The effects of GABAergic drugs on grooming behaviour in the open field. **Pharmacol. Toxicol.**, v.74, p.339-344, 1994.

BASSO, A. M. *et al.* Behavioral profile of P2X₇ receptor knockout mice in animal models of depression and anxiety: Relevance for neuropsychiatric disorders. **Behav. Brain Res.**, v.198, p.83-90, 2009.

BEN-ARI, Y.; TREMBLAY, E.; OTTERSEN, O. P. Injections of kainic acid into the amygdaloid complex of the rat: an electrographic, clinical and histological study in relation to the pathology of epilepsy. **Neuroscience**, v. 5, p. 515-528, 1980.

BEN-ARI, Y. *et al.* Eletrographic, clinical and pathological alterations following systemic administration of kainic acid, bicuculdeoxyglucose or pentylenetetrazole: metabolite mapping using the deoxyglucose method with special reference to the pathology of epilepsy. **Neuroscience**, v. 6, p. 1361-1391, 1981.

BENNETT, F. C.; BROWN, R. T.; CRAVER, J.; ANDERSON, D. Stimulant medication for the child with attention-deficit/hyperactivity disorder. **Pediatr Clin North Am.**, v. 46, p.929-944, 1999.

BERTOGLIO, L. J.; CAROBREZ, A. P. Previous maze experience required to increase open arms avoidance in rats submitted to the elevated plus-maze model of anxiety. **Behav. Brain Res.**, v. 108, p.197-203, 2000.

BLUM, D.; REED, M.; METZ, A. Prevalence of major affective disorders and maniac symptoms in persons with epilepsy: a community survey. **Neurology**, v. 58, (Suppl 4A): S175, 2002.

BIEDERMAN, J.; NEWCORN, J.; SPRICH, S. Comorbidity of attention deficit hyperactivity disorders. **American Journal of Psychiatry**, v. 148, p. 564-577, 1991.

BIEDERMAN, J.; FARAONE, S.; KEENAN, K.; BENJAMIN, J.; KRIFCHER, B.; MOORE, C. *et al.* Further evidence for family-genetic risk factors in attention deficit hyperactivity disorder. Patterns of comorbidity in probands and relatives psychiatrically and pediatrically referred samples. **Archives of General Psychiatry**, v.49, p. 728-738, 1992a.

BIEDERMAN, J. *et al.* Psychiatry comorbidity among referred juvenile with major depression fact or artifact? *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry*, p. 579-590, 1995.

BIEDERMAN, J.; MICK, E.; FARAONE, S. Depression in attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) children: "true depression or demoralization? **J. Affective disorder**, v.47, p.113-122, 1998.

BIEDERMAN, J. Phamacotherapy for Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD) Decreases the Risk for Substance Abuse: Findings Form a Longitudinal Follow-Up of Youths With and Without ADHD. **J Clin Psychiatry**. v. 64, Suppl. 11, p.3-8, 2003.

BIEDERMAN, J.; FARAONE, S. V. Attention-deficit hyperactivity disorder. **The Lancet**. v.366, 237-248, 2005.

BILKEI-GORZO, A. *et al.* Diminished anxiety- and depression-related behaviors in mice with selective deletion of the Tacl gene. **J. Neurosci.**, v.22, p.10046-10052, 2002.

BLIER, P.; WARD, N. M. Is there a role for 5-HT1A agonists in the treatment of depression ? **Biol. Psychiatry**, v.53 , n.3, p.193-203, 2003

BLUM, D.; REED, M.; METZ, A. Prevalence of major affective disorders and maniac symptoms in persons with epilepsy: a community survey. **Neurology**, v. 58, (Suppl 4A): S175, 2002.

BOHLEN, M. et al. Calibration of rotational acceleration for the rota rod test of rodent motor coordination. **J. Neurosci. Methods.**, v.178, p.10-14, 2009.

BOLANOS, C. A.; BARROT, M.; BERTON, O.; WALLACE-BLACK, D.; NESTLER, E. J. Methylphenidate treatment during pre-and periadolescence alters behavioral responses to emotional stimuli at adulthood. **Biol Psychiatry**, v.54, p.1317-1329, 2003.

BONNER, T. I.; BUCKLEY, N. J.; YOUNG, A.; BRANN, M. R. Identification of a family of muscarinic receptor genes. **Science**, v. 237, p.527-532, 1987.

BONNET, U.; BINGMANN, D.; WIEMANN, M. Intracellular pH modulates spontaneous and epileptiform bioelectric activity of hippocampal CA3- neuromes. **Eur. Neuropsychopharmacol.**, v.97, p.97-103, 2000.

BORELLI, E.; BOZZI, Y. Dopamine D2 receptor signaling controls neuronal cell death induced by muscarinic and glutamatergic drugs. **Molecular and Cellular Neuroscience**. v. 19, p. 263-271, 2002.

BOUFFARD, R.; HECHTMAN, L., Minde K, Iaboni-Kassab F. The efficacy of 2 different dosages of methylphenidate in treating adults with attention-deficit hyperactivity disorder. **Canadian Journal of Psychiatry**, v. 48, p. 546-554, 2003.

BRANDÃO, M. L. Comportamento emocional *In: Psicofisiologia: As bases fisiológicas do comportamento*. 2. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2001. cap.7. p.125-149.

BRASIL. Ministério da Saúde. DATASUS. **CID-10. Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados a Saúde**. Brasília,2008.

BROWN, G. W. The role of life events in the aetiology of depressive and anxiety disorders. *In: STANNFORD S., SAMON, P. Stress: from synapse to syndrome*. London: Academic Press, 1993. p. 23-50.

BROWN, G. W. Psychosocial factors and depression and anxiety disorders-some possible implications for biological research. **J. Psychopharmacol.**, v.10, p.23-30, 1996.

BRUNELLO, N *et al.* The role of noradrenaline and selective noradrenaline reuptake inhibition in depression. **Eur. Neuropsychopharmacol**, v. 12 , n.5, p.461-475, 2002.

BRUNTON, L. L. **Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica**. 11. ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 2006.

BUCKMAN, S. G. et al. Increased elevated plus maze open-arm time in mice during spontaneous morphine withdrawal. **Behav. Brain Res.**, v. 197, p.454-456, 2009.

BURKE, R. E; GREENBAUM, D. Effect of post-mortem factors on muscarinic receptor subtypes in rat brain. **Journal of Neurochemistry**, v. 49, p. 529-596, 1987.

BUNNEY, W. E.; DAVIS, J. M. Norepinephrine in depressive reactions. **Archives of General Psychiatry**, v. 13, p. 483-494, 1965.

BUSH, D. E. A.; FRANCO, J. V. Individual differences in elevated plus-maze exploration predicted progressive-ratio cocaine self-administration break points in Wistar rats. **Psychopharmacology**, v. 194, p. 211-219, 2007.

CALLAHAN, P. M.; DE LA GARZA, R.; CUNNINGHAM, K. A. Mediation of the discriminative stimulus properties of cocaine by mesocorticolimbic dopamine systems. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.57, p. 601-607, 1997.

CARDINAL, R. N.; WINSTANLEY, C. A.; ROBBINS, T. W.; EVERITT, B. J. Limbic corticostriatal systems and delayed reinforcement. *Annals of New York Academy of Scienc.*,v. 1021, p. 33-50, 2004.

CARLINI, E. A.; BURGOS, V. *Screening* farmacológico de ansiolíticos: metodologia laboratorial e comparação entre o diazepam e o clorobenzapam. **Revista da Associação Brasileira de Psiquiatria**, v. 1, p. 25-31, 1979.

CAROLA, V. et al. Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behavior in inbred mice. **Behav. Brain Res.**, v.21, p.49-57, 2002.

CASTELLANOS, F. X. Toward a pathophysiology of attention-deficit/ hyperactivity disorder. **Clin Pediatr**,v. 36, p.381-393, 1997.

CAVALHEIRO, E. A.; LEITE, J. P.; BORTOLOTO, Z. A.; TURSKI, W. A.; IKONOMIDOU, C.; TURSKI, L. Long-term effects of pilocarpine in rats: structural damage of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures. **Epilepsia**. v. 32, p. 778-782, 1991.

CAVALHEIRO, E. A. *et al.* Spontaneous recurrent seizures in rats: amino acid and monoamine determination in the hippocampus. **Epilepsia**, v. 35, p. 1-11, 1994.

CHAN, Y. P.; SWANSON, J. M.; SOLDIN, S. S.; THIESSEN, J. J.; MACLEOD, S. M.; LOGAN, W. Methylphenidate hydrochloride given with or before breakfast: II. Effects on plasma concentration of methylphenidate and ritalinic acid. **Pediatrics**, v.72, p.56-59, 1983.

CHASE, T.; CARREY, N.; SOO, E.; WILKINSON, M. Methylphenidate regulates activity regulated cytoskeletal associated but not brain-derived neurotrophic factor gene expression in the developing rat striatum. **Neuroscience**, v.144, p.969-984, 2007.

CHAVEZ, B.; SOPKO, M. A.; EHRET, M. J.; PAULINO, R. E.; GOLDBERG, K. R.; ANGSTADT, K.; BOGART, G. T. An update on central nervous system stimulant formulations in children and adolescents with attention-deficithyperactivity disorder. **Ann Pharmacother**, v.43, n.6, p.1084-1095, 2009.

CHEN, S. W. et al. Possible anxiolytic effects of taurine in the mouse elevates plus-maze. **Life Sci.**, v.75, p.1503-1511, 2004.

CLIFFORD, D. B.; OLNEY, J. W.; MANIOTIS, A.; COLLINS, R. C.; ZORUMSKI, C. F. The functional anatomy and pathology of lithium-pilocarpine and high-dose pilocarpine seizures. **Neuroscience**, v. 23, p.953-968, 1987.

CONKLIN, L. R.; STRUNK, D. R.; FAZIO, R. H. Attitude formation in depression: Evidence for deficits in forming positive attitudes. **J. Behav. Ther. Exp. Psychiatry**, v. 40, p. 120-126, 2009.

CONNERS, C. K. Forty years of methylphenidate treatment in Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. **J Atten Disord**, v.6 (Suppl 1), p. S17-S30, 2002.

COPPEN, A. The biochemistry of affective disorders. **British Journal of Psychiatry**, v. 113, p. 1237-1264, 1967.

CORDIOLO, A. V. et al.. **Psicofármacos**. 3 ed. Porto Alegre: ArtMed Editora S.A, 2005.

CORNÉLIO, A. M; NUNES-DE-SOUZA, R.L. Open elevated plus maze-induced antinociception in rats: A non-opioid type of pain inhibition? **Physiol. Behav.**, v.96, p. 440-447, 2009.

CORREIA, P. T. F. **Avaliação comportamental em modelo animal de esquizofrenia induzido por cetamina**. Dissertação (Mestrado). -- Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma(SC), 2009.

COSTA-LOTUFO, L. V. *et al.* Attenuating effects of melatonin on pilocarpine-induced seizures in rats. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 131, p. 521-529, 2002.

COSTA, E.; SANDLER, M. **Monoamine Oxidase**: New Vistas. New York: Raven, 1972.

CRAWLEY, J. N. Neuropharmacologic specificity of a simple model for the behavioural actions of benzodiazepines. **Pharmacology Biochemistry Behavior**, v. 15, p. 695-699, 1981.

DAVIS, K. L.; HOLLISTER, L. E; BERGER, P. A.; BARCHAS, J. D. Cholinergic imbalance hypotheses of psychoses and movement disorders: strategies for evaluation. **Psychopharmacologia Commun**, v.1, p.533-543, 1975.

DAVIS, W. M.; HATOUNG, N. S. Synergism of the toxicity of physostigmine and neostigmine by lithium or by a reserpinelike agent (R04-1284). **Toxicology**, v.17, p.1-7, 1980.

DE BRUIN, V. M. S.; MARINHO, M. M. F.; DE SOUSA, F. C. F.; VIANA, G. S. B. 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 LORENZO, R.J.; RAZA, M.; PAL, S.; RAFIQ, A. Long-term alteration of calcium homeostatic mechanisms in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. **Brain Research**. v. 903, p. 1-12, 2001.

DE-PARIS, F. et al. Psychopharmacological screening of *Pfaffia glomerata* Spreng (Amaranthaceae) in rodents. **J. Ethnopharmacol.**, v.73, p.261-269, 2000.

- DEMPSEY, J. P. et al. Treatment of social anxiety with paroxetine: mediation of changes in anxiety and depression symptoms. **Comprehensive Psychiatry**, v. 50, p. 135-141, 2009.
- DAVIDS, E.; ZHANG, K.; TARAZI, F. I.; BALDESSARINI, R. J. Animal models of attention-deficit hyperactivity disorder. **Behavioural Brain Research**, v. 4, p. 1-21, 2003.
- DINN, W. W. M.; ROBBINS, N. C.; HARRIS, C. L. Adult attention-deficit/hyperactivity disorder: neuropsychological and clinical presentation. **Brain Cogn**, v.46, p.114-121, 2001
- DINIZ, L. F. M.; CAPELLINI, G. M.; DINIZ, D. N. M. M.; LEITE, W. B.. Neuropsicologia no Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade. *In.*: FUENTES, D.**Neuropsicologia: Teoria e Prática**. Porto Alegre: Artmed, 2008.
- DHIR, A.; KULKARNI, S. K. Involvement of nitric oxide (NO) signaling pathway in the antidepressant action of bupropion, a dopamine reuptake inhibitor. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 568, p.177-185, 2007.
- DOPHEIDE, J. A.; PLISZKA, S. R. Attention-deficit-hyperactivity disorder: an update. **Pharmacotherapy**, v.29 , n.6, p.256-279, 2009.
- DOUGHERTY, D. D.; BONAB, A. A.; SPENCER, T. J.; RAUCH, S. L.; MADRAS, B. K.; FISCHMAN, A. J. Dopamine transporter density in patients with attention deficit hyperactivity disorder. **Lancet**, v. 354, p. 2132-2133, 1999.
- DOYLE, R. The history of adult attention-deficit/hyperactivity disorder. **Psychiatr. Clin. North Am**, v.27, p.203-214, 2004.
- DUNCAN, J.; OWEN, A. M. Common regions of the human frontal lobe recruited by diverse cognitive demands. **Trends Neurosci.**, v. 23, p.475-483, 2000.
- DUNHAM, N. W.; MIYA, T. S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficits in rats and mice. **Journal of the American Pharmaceutical Association**, v. 46, n. 3, p. 208, 1957.
- DUNN, A. J.; GUILD, A. L.; KRAMARCY, N. R.; WARE, M. D. Benzodiazepines decrease grooming in response to novelty but not ACTh or beta-endorphin. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 15, p. 605-608, 1981.
- DUNN, D.W.; AUSTIN, J.K.; HAREZLAK, J. et al. ADHD and epilepsy in childhood. **Dev Child Neurol**, 45, 50-54, 2003.
- DUNN, D. W.; AUSTIN, J. K. Differential diagnosis and treatment of psychiatric disorders in children and adolescents with epilepsy. **Epilepsy Behav**, Suppl 3, S10-S17, 2004.
- EINAT, H. Modeling facets of mania – new directions related to the notion of endophenotypes. **J Psychopharm**, v. 20, p.714-722, 2006.
- ELGOYHEN, A. B.; KATZ, E.; ROTHLIN, C. V.; VERBITSKY, M. Mixed nicotinicmuscarinic properties of the $\alpha 9$ nicotinic cholinergic receptor. **Neuropharmacology**, v. 39, p. 2515-2524, 2000.

ENGEL, J.; PEDLEY, T. **Epilepsy: A comprehensive the-book**. Lippincott-Raven, Philadelphia, 1997.

ENGEL, J. J. R.; ILAE Commission Report. A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology. **Epilepsia**, v. 42, n. 6, p. 796-800, 2001.

ENCZIK, E. B. **Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade, atualização diagnóstica e terapêutica: um guia de informações para profissionais**. São Paulo: Casa do psicólogo, 2010.

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.

FARAONE, S. V.; BIEDERMAN, J. The neurobiology of attention deficit hyperactivity disorder. In CHARNEY, D. S.; NESTLER, E. J.; BUNNEY, B. S. **Neurobiology of mental illness**. New York: Oxford University Press, 1999. p. 788-801.

FARAONE, S.; BIEDERMAN, J.; MONUTEAUX, M. Toward guidelines for pedigree selection in genetic studies of attention deficit hyperactivity disorder. **Genetic Epidemiology**, v.18, p.1-16, 2000.

FARAONE, S. V.; DYLE, A. E. The nature and heritability of attention deficit/hyperactivity disorder. **Child Adolesc. Psychiatr. Clin. North Am.**, v. 10, p.299-316, 2001.

FARAONE, S. V. Genetics of adult attention deficit hyperactivity disorder. In: SPENCER, T. (ed.). **Psychiatric clinics of North America**. Philadelphia, PA.: Saunders Press, 2004. p.3030-321.

FARIAS, A. C.; CORDEIRO, M. L. Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH): Diagnóstico, Etiologia, Tratamento, Prognóstico e Mitos. In: WEBER, L. (Org). **Familia e desenvolvimento visões interdisciplinares**. Curitiba: Juruá Editora, 2008. p. 132-144.

FELDMAN, R. S.; MEYER, J. S.; QUENZER, L. F. **Catecholamines: principles of neuropsychopharmacology**. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 1997.

FERNÁNDEZ-GUASTI, A.; LÓPEZ-RUBALCAVA, C. Modification of the Anxiolytic Action of 5-HT_{1A} Compounds by GABA-Benzodiazepine Agents in Rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.60, n.1, p. 27-32, 1998.

FRANKOWSKA, M.; FILIP, M.; PRZEGALINSKI, E. Effects of GABA_B receptor ligands in animal tests of depression and anxiety. **Pharmacol. Rep.**, v.59, p.645-655, 2007.

FREDRIKSSON, A.; ARCHER, T. Neurobehavioural deficits associated with apoptotic neurodegeneration and vulnerability for ADHA. **Neurotox. Res.**, v.6, n.6, p.435-456, 2004.

FREITAS, R. M.; SOUSA, F. C. F.; VASCONCELOS, S. M. M.; VIANA, G. S. B.; FONTELES, M. M. F. Pilocarpine-induced seizures in adult rats: lipid peroxidation level,

nitrite formation, GABAergic and glutamatergic receptor alterations in the hippocampus, striatum and frontal cortex. **Pharmacol. Biochem. Beh.**, v. 78, n.2, p.327-332, 2004a.

FREITAS, R. M.; SOUSA, F. C.; VIANA, G. S.; FONTELES, M. M. Acetylcholinesterase activities in hippocampus, frontal cortex and striatum of Wistar rats after pilocarpine-induced status epilepticus. **Neurosci. Lett**, v. 399, p. 76-79, 2006.

GADOW, K. D. et al. Anxiety and depression symptoms and response to methylphenidate in children with attention-deficit hyperactivity disorder and tic disorder. **Journal of Clinical Psychopharmacology**, v. 22, p. 267-274, 2002.

GAINETDINOV, R. R.; WETSEL, W. C.; JONES, S. R.; LEVIN, E. D.; JABER, M.; CARON, M. G. Role of serotonin in the paradoxical claming effect of psychostimulants on hyperactivity. **Science**, v. 283, p. 397-402, 1999.

GAINETDINOV, R. R.; WETSEL, S. R.; JONES, E. D.; LEVIN, M.; JABER, M. G. Role on serotonin in the paradoxical calming effect of psychostimulants on hyperactivity. **Science**, v. 98, p. 397-401, 2001.

GAINETDINOV, R. R.; SOTNIKOVA, T. D.; CARON, M. G. Monoamine transporter pharmacology and mutant mice. **Trends Pharmacol.**, v. 23, p. 367-373, 2002.

GAINETDINOV, R. R.; CARON, M. G. Monoamine transporters: from genes to behavior. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v.43, p. 261–284, 2003.

GALDINO, P. M. et al. Antidepressant-like effect of lafoensia pacari a. St-hil. Ethanolic extract and fractions in mice. **J. Ethnopharmacol.**, v. 124, p.581-585, 2009.

GARAKANI, A.; MATHEW, S. J.; CHARNEY, D. S. Neurobiology of anxiety disorders and implications for treatment. **Mt Sinai J. Med.**, v.73, n.7, p.941-949, 2006.

GARCIA- MEDIAVILLA, C. –Neurobiologia Del transtorno de hiperactividad- **Ver Neuro**, v.36, n.6, p.555-565, 2003.

GATLEY, S. J.; PAN, D.; CHEN, R.; CHATURVEDI, G.; DING, Y. S. Affinities of methylphenidate derivatives for dopamine, norepinephrine and serotonin transporters. **Life Sci**, v.58, p.231-239, 1996.

GETOVA-SPASSOVA, D. The role of brain cholinesterases and their inhibition in treatment of Alzheimer's disease: L6, **Autonom. Autacoid Pharmacol.** ,v. 26, p. 50-51, 2006.

GHANIZADEH, A. Psychiatric comorbidity differences in clinic-referred children and adolescents with ADHD according to the subtypes and gender. **J Child Neurol**, v.24, p.679-684, 2009.

GOLDMAN-RAKIC, P. S. Regional and cellular fractionation of working memory. **Proccedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 93, n.24, p.13473-13480, 1996.

GOLDSTEIN, L. E. *et al.* Role of the amygdale in the coordination of behavioral, neuroendocrine, and prefrontal cortical monoamine responses to psychological stress in the rat. **The Journal of Neuroscience**, v. 16, n. 15, p. 4787-4798, 1996.

GOMES, M. M. Epilepsias: uma prioridade nacional em cuidados de saúde. **Revista Brasileira de Neurologia**, v. 30, n. 5, p. 14-17, 1994.

GOMES, M. M. Frequência populacional de epilepsia. **Revista Brasileira de Neurologia**, v. 33, n. 1, p. 3-7, 1997

GREENGARD, P. The neurobiology of slow synaptic transmission. **Scienc**, v. 294, p. 1024-1030, 2001

GRUNDMANN, O. et al. Kaemp ferol from the leaves of *Apocynum venetum* possesses anxiolytic activities in the elevated plus maze test in mice. **Phytomedicine**, v.16, p.295-302, 2009.

GHANIZADEH, A. Psychiatric comorbidity differences in clinic-referred children and adolescents with ADHD according to the subtypes and gender. **J Child Neurol**, v.24, p.679-684, 2009.

HALES, R. E.; YUDOFISKY, S. C. **Tratado de Psiquiatria clínica**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

HALLMAN, H.; JOSSON, G. Neurochemical studies on central dopamine neurons-regional characterization of dopamine turnover. **Medical Biology**, v. 62, p. 209, 1984.

HAMODA, H. M.; GUILD, D. J.; GUMLAK, S.; TRAVERS, B. H.; GONZALEZ-HEYDRICH, J. Association between attention-deficit/hyperactivity disorder and epilepsy in pediatric populations. **Expert Rev Neurother**, v.9, n.12, p.1747-54, 2009.

HAN, D. D.; GUN, H. H. Comparison of the monoamine transporters from human and mouse in their sensitivities to psychostimulant drugs. **BMC Pharmacol**, v. 6, p.1471- 2210, 2006.

HARRO, J.; ORELAND, L. Depression as a spreading adjustment disorder of monoaminergic neurons: a case for primary implication of the *locus coeruleus*. **Brain Research Reviews**, v. 38, p. 79-128, 2001.

HELLION-IBARROLA, M. C. et al. The anxiolytic-like effects of *Aloysia palustachya* (Griseb.) Moldenke (Verbenaceae) in mice. **J. Ethnopharmacol.**, v.105, p.400-408, 2006.

HENNINGSSEN, K. et al. Cognitive deficits in the rat chronic mild stress model for depression: Relation to anhedonic-like responses. **Behav. Brain Res.**, v.198, p.136-141, 2009.

HENSLER, J. G. Regulations of 5-HT1A receptor function in brain following agonist or antidepressant administration. **Life Science**, v.72, p.1665-1682, 2003.

HESSLINGER, B.; TEBARTZ VAN ELST, L.; THIEL, T.; HAEGELE, K.; HENNIG, J.; EBERT, D. Frontoorbital volume reductions in adult patients with attention deficit hyperactivity disorder. **Neurosci. Lett.**, v. 328, p.319-321, 2002.

HIGGINS, E. S. Do ADHD drugs take a toll on the brain? **Scientific American Mind**, p. 39-43, july/august 2009.

HIRSCH, E. H.; BARAM, T. Z; SNEAD III, O.C. Ontogenic study lithium-pilocarpine-induced status epilepticus in rats. **Brain Res.**, v. 583, p.120-126, 1992.

HONCHAR, M. P.; VOGLER, G. P.; GISH, B. G.; SHERMAN, W. R. Evidence that phosphoinositide metabolism in rat cerebral cortex stimulated by pilocarpine, physostigmine, and pargyline *in vivo* is not changed by chronic lithium treatment. **Journal Neurochemical**, v.55, p. 172-180, 1990.

HRUSKA, R. E.; LUDMER, L. M.; PERT, A.; PETER, J. R.; BUNNEY, W. E. Effects of lithium on [³H] quinuclidinyl benzilate binding to rat brain muscarinic cholinergic receptors. **J. Neurosci. Res.**, v.11, p.171, 1984.

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

IMPERATO, A.; DAZZI, L., CARTA, G.; COLOMBO, G.; BIGGION, G. 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.

IKONOMIDOU, C.; BITTIGAU, C.; ISHIMARU, M.J.; WOZNRAC, D.F.; KOCH, C.; GENZ, K.; PRICE, M.T.; HORSTER, F.; FELDETHOFF-MUSER, U.; TENKOVA, T.I.; DIKRANIAN, K.; OLNEY, J.W. Neurotransmitters and apoptosis in the developing brain. **Biochem. Pharmacol.**, v.62, p.401-405, 2001.

JENSEN, P. S.; HINSHAW, S. P.; KRAEMER, H. C., *et al.*: ADHD comorbidity findings from the MTA Study: Comparing comorbid subgroups. **J Am Acad Child Adolesc Psychiatry**, v. 40, p. 147-158, 2001.

JOBE, P. C.; BROWNING, R. A. The serotonergic and noradrenergic effects antidepressant drugs are anticonvulsant, not proconvulsant. **Epilepsy & Behavior**, v.7, p.602-619, 2005.

JOCA, S. R. *et al.* The antidepressive-like effect of oxcarbazepine: possible role of dopaminergic neurotransmission. **European Neuropsychopharmacology**, v. 10, p. 223-228, 2000.

JOHANSSON, C.; AHLENIUS, S. Evidence for the involvement of 5-HT_{1A} receptors in the mediation of exploratory locomotor activity in the rat. **J. Psychopharmacol.**, v. 3, p. 32-35; 1989.

JOPE, R. S. High affinity choline transport and acetylCoA production in brain and their roles in the regulation of acetylcholine synthesis. **Brain Research Rev.**, v.1, p. 313-344, 1979.

JOPE, R. S.; SIMONATO, M.; LALLY, K. Acetylcholine content in rat brain is elevated by status epilepticus induced by lithium and pilocarpine. **Journal Neurochemical**, v.49, p.944-951, 1987.

KALIA, M. Neurobiological basis of depression an update. **Metabolism: clinical and experimental**, v. 54, p. 24-27, 2005.

KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSEL, T. M. In **Principles of Neural Science**. 4th United States: McGraw-Hill, 2000.

KANNER, A. M. The Use of Psychotropic Drugs in Epilepsy: What Every Neurologist Should Know. **Seminars in Neurology**, v.28, n.3, p.379-88, 2008.

KAROLEWICZ, B.; PAUL, I. A. Group Housing of mice increases immobility and antidepressant sensitivity in the forced swimming and tail suspension tests. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 415, p. 197-201, 2001.

KATZ, M. M. *et al.* The timing, specificity, and clinical prediction of tricyclic drug effects in the depression. **Psychological Medicine**, v. 17, p. 297-309, 1987.

KATZ, M. M. *et al.* Drug-induced actions on brain neurotransmitter systems and changes in the behaviors and emotion of depressed patients. **Neuropsychopharmacology**, v. 11, p. 89-100, 1994.

KEELEY, M. L; STORCH, E. A. Anxiety disorder in youth. **J. Pediatr. Ners.**, v.24, p.26-40, 2009.

KIMKO, H. C.; CROOS, J. T.; ABERNETHY, D. R. Pharmacokinetics and clinical effectiveness of methylphenidate. **Clin Pharmacokinet**, v.37, p.457-470, 1999.

KLEIN-SCHWARTZ, W. Pediatric methylphenidate exposures: 7-year experience of poison centers in the United States. **Clin Pediatr**, v.42, p.159-164, 2002.

KLIMEC, V.; SCHENCK, J. E.; HAN, H.; STOCKMEIER, C. A.; ORDWAY, G. A. Dopaminergic abnormalities in amygdaloid nuclei in major depression: a postmortem study. **Biological Psychiatry**, v.52, p. 740-748, 2002.

KOZAK, R.; MARTINEZ, V.; YOUNG, D.; BROWN, H.; BRUNO, J. P.; SARTER M. Toward a neuro-cognitive animal model of the cognitive symptoms of schizophrenia: Disruption of cortical cholinergic neurotransmission following repeated amphetamine exposure in attentional task-performing, but not nonperforming, rats. **Neuropsychopharmacology**, v.32, p.2074–2086, 2007

KRAUSE, K. H.; DRESEL, S. H.; KRAUSE, J.; KUNG, H. F.; TATSCH, K. Increased striatal dopamine transporter in adult patients with attention deficit hyperactivity disorder: effects of methylphenidate as measured by single photon emission computed tomography. **Neuroscience Letters**, v. 285, p. 107-110, 2000.

KRAVITZ, H. M. *et al.* Antidepressant or antianxiety? A study of the efficacy of antidepressant medication. **Psychiatry Research**, v. 32, p. 141-149, 1990.

KRISHNAN, V.; NESTLER, E. J. The molecular neurobiology of depression. **Nature**, v. 455, p.894-902, 2008.

KUCZENSKI, R.; SEGAL, D. S., CHO, A. K., MELEGA, W. P. Hippocampus norepinephrine; caudate dopamine and serotonin; and behavioral responses to stereoisomers of amphetamine and methamphetamine. **J Neurosci**, v.15, p.1308-1317, 1995.

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

KULKARNI, S. K.; GEORGE, B. Lithium-pilocarpine neurotoxicity: a potential model of status epilepticus. **Meth. Fin. Exp. Clin. Pharmacol.**, v.17, p.551-567, 1995.

KUTCHER, S.; AMAN, M.; BROOKS, S. J. et al. International consensus statement on attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) and disruptive behaviour disorders (DBDs): clinical implications and treatment practice suggestions. **Eur Neuropsychopharmacol**, v.14, p.11-28, 2004.

LABANDEIRA-GARCIA, J. L.; TOBIO, J. P.; GUERRA, M. J. Compararison between normal developing striatum and developing striatall grafts using drug-induced Fos expression and neuron-specific enolase immunohistochemistry. **Neuroscience**, v. 60, p.399-415, 1994.

LAMBERT, G. *et al.* Reduced brain norepinephrine and dopamine release in treatment-refractory depressive illness. **Archives of General Psychiatry**, v. 57, p. 787-793, 2000.

LAPIN, I. P.; OXENKRUG, G. F. Intensification of the central serotonergic processes as a possible determinant of the thymoleptic effect. **Lancet**, v. 1, p. 132-136, 1969.

LAPIN, I. P. Only Controls: Effect of Handling, Sham Injection, and Intraperitoneal Injection of Saline on Behavior of mice in an Elevated Plus-Maze. **J. Pharmacol. Toxicol. Methods**, v.34, p.73-77, 1995.

LEFKOWITZ, R. J.; HOFFMAN, B. B.; TAYLOR, P. Neurohumoral transmission: the autonomic and somatic motor nervous system. *In*: GILMAN, A. G.; RUDDON, R. W.; MOLINOFF, P. B.; LIMBIRD, L .E.; HARDMAN, J. G. (Ed.). **The pharmacological basis of therapeutics**. New York: MacGraw-Hill, 1996. p.105-140.

LEMONDE, S.; TURECKI,G.; BAKISH, D.; DU, L.; HRDINA, P. D., BOWN, C. D., et al.: Impaired repression at a 5-hydroxytryptamine 1A receptor gene polymorphism associated with major depression and suicide. **J Neurol Sci**, v. 23, p.8788–8799, 2003.

LEONARD, B. E. Evidence for a biochemical lesion in depression. **Journal of Clinical Psychiatry**, v. 61, p. 12-17, 2000.

LEONARD, B. E; MCCARTAN, D.; WHITE, J.; KING, D. J. Methylphenidate: a review of its neuropharmacological, neuropsychological and adverse clinical effects. **Hum Psychopharmacol**, v. 19, p. 151-180, 2004.

LEVY, F.; SWANSON, J. M. Timing, space and ADHD: the dopamine theory revisited. **Australian and New Zealand Journal of Psychiatry**, v. 35, p. 504-511, 2001.

LIAO, C. F.; THEMME, A. P. N.; JOHO, R.; BARBERIS, C.; BIRNBAUMER, M.; BIRNBAUMER, L. Molecular cloning and expression of a fifth muscarinic acetylcholine receptor. **J. Biol. Chem.**, v.264, p. 7328-7337, 1989.

LISTER, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, v. 29, p. 180-185, 1987.

LOPES, R. As raízes do transtorno. **Psiquê ciência e vida**, São Paulo, v.5, n.53, maio 2010.

LOUZÃ, M. R.; MATTOS, P. Questões atuais no tratamento farmacológico do TDAH em adultos com metilfenidato. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, Rio de Janeiro, v.56, 2007.

LUO, L. et al. Antidepressant effects of Banxia Houpu decoction, a traditional Chinese medicinal empirical formula. **J. Ethnopharmacol.**, v.73, p.277-281, 2000.

MACNAUGHTON, N.; GRAY, J. A. Anxiolytic action on the behavioural inhibition system implies multiple types of arousal contribute to anxiety. **Journal of Affective Disorders**, v. 61, p.161-176, 2000

MALER, L.; FIBIGER, H. C.; MCGEER, P. L. Demonstration of the nigrostriatal projection by silver staining after nigral injections of 6- hydroxydopamine. **Experimental Neurology**, v. 40, n. 2, p.505-515, 1973.

MANN, J. J. *et al.* Increased serotonin₂ and β -adrenergic receptor binding in the frontal cortices of suicide victims. **Archives of General Psychiatry**, v. 43, p. 954-959, 1986.

MARCHETTI, R. L.; DAMASCENO, B. P. Epilepsia: Psicopatologia e comportamento. *In:* GUERREIRO, C. A. M.; GUERREIRO, M. M.; CENDES, F.; CENDES, I. L. **Epilepsia**. São Paulo: Editora Lemos, 2000. p. 231-242.

MARGIS, R.; PICON, P.; COSNER, A. F; SILVEIRA, R. O. Relação entre estressores, estresse e ansiedade. **Psiquiatr. RS**, v. 25 (suplemento 1), p. 65-74, 1 2003

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.

MARTIN, D.; QUIRINO, J.; MARI, J. Depression among women living in the outskirts of São Paulo, Southeastern Brazil. **Rev. Saúde Pública**, v. 41, p.591-597, 2007.

MELDRUM, B.; CHAPMAN, A. Epileptic seizures and epilepsy. *In:* SIEGEL G. J.; AGRANOFF, B. W.; ALBERS, R. W.; FISHER, S. K.; UHLER, M. D. 6th. **Basic**

Neurochemistry, Molecular, cellular and medical aspects. U.S.A: Lippicott Williams and Wilkins, 1999. p. 785.

MICHOTTE, Y.; KHAN, G. M.; SMOLDERS, I.; EBINGER, G. 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.; BIEDERMAN, J.; PRINCE, J.; FISCHER, M. J.; FARAONE, S. V. Impact of low birth weight on attention-deficit hyperactivity disorder. **J Dev. Behav. Pediatr.** v. 23, n.1, p.16-22, feb. 2002.

MICKLEY, G. A; REMMERS-ROEBER, D. R.; CROUSE, C.; PELUSO, R. Ketamine blocks a taste recognition memory in fetal rats. **Pharmacol. Biochem, Behav.**, v.67, p.575-580, 2000.

MISSALE, C. *et al.* Dopamine receptors: from structure to function. **Physiological Reviews**, v. 78, p. 189-225, 1998.

MOGENSEN, G. J.; JONES, D. L.; YIM, C. Y. From motivation to action: functional interface between the limbic system and the motor system. **Progress in Neurobiology**, v. 14, p.69-97, 1980.

MOGHADDAN, B.; ADAMS, B.; VERNA, A.; DALY, D. Activation of glutamatergic neurotransmission by ketamine: a novel step in the pathway from NMDA receptor blockade to dopaminergic and cognitive disruptions associated with the prefrontal cortex. **J. Neurosci.**, v. 17, p. 2921-2927, 1997.

MONTGOMERY, K. C. The relationship between fear induced by novel stimulation and exploratory behaviour. **J. Comp. Physiol. Psychol.**, v. 48, p. 254-260, 1958

MOODY, T. W.; MERALI, Z.; CRAWLEY, J. N. The effects of anxiolytics and other agents on rat grooming behavior. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 90, p. 281-290, 1993.

MORA, S. *et al.* Central nervous system activity of hidroalcoholic extract of *Casimiroa edulis* in rats and mice. **J. Ethnopharmacol.**, v.97, p.191-197, 2005.

MORRISETT, R. A.; JOPE, R. S.; SNEAD, O. C. Effects of drugs on the initiation and maintenance of status epilepticus induced by administration of pilocarpine to lithium-pretreated rats. **Exp Neurol**, v.97, p.193-200, 1987.

NATHANSON, N. M. ; MCKINNON, L. A ; KAKAYDJIAN, A. E. ; HAMILTON, S. E. ; ROSOFF, M. L. ; NADLER, L. S. Molecular analysis of the regulation of muscarinic receptor expression and function. **Life Sciences**, v.64, p.375-379, 1999.

NESTLER, J. E. ; HYMAN, S. E.; MALENKA, R. C. **Molecular Neuropharmacology : A foundation for clinical neuroscience.** New York: McGraw-Hill, 2009.

NEVE, K. A.; NEVE, R. L (Ed.). **The dopamine receptors.** Totowa, NJ: Humana press, 1997.

OLNEY, J. W.; DE-CUBAREFF, T.; LABRUYERE, J. Seizure-related brain damage induced by cholinergic agents. **Nature**, v. 301, p. 520-522, 1983.

OLNEY, J. W.; COLLINS, R. C.; SLOVITER, R. S. Excitotoxic mechanisms of epileptic brain damage. **Adv. Neurol.** v. 44, p. 857-877, 1986.

OLNEY, J. W.; FARBER, N. B.; WOZNIAK, D. F.; JEVTOVIC-TODOROVIC, V.; IKONOMIDOU, C. Environmental agents that have the potential to trigger massive apoptotic neurodegeneration in the developing brain. **Environ. Health Prospect.**, v.108, suppl. 3, p.383-388, 2000.

OLSON, R. Gaba. *In*: DAVIS, K.; CHARNEY, D.; COYLE, J.; NEMEROFF, C. (Ed.). **Neuropsychopharmacology: The fifth generation of progress**. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, 2002.

OZBAKIS-DENGIZ, G.; BAKIRCI, A. Anticonvulsant and hypnotic effects of amiodarone. **J. Zhejiang Univ. Sci. B**, v.10, p.317-322, 2009.

PALANZA, P. Animal models of anxiety and depression: how are females different? **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v.25, p.219-233, 2001.

PALMINI, A. Transtorno de hiperatividade/ Déficit de atenção, Descargas ao EEG, Crises epilépticas e Epilepsia: Abordagem prática de Intrigantes associações. **Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology**, v.10 (4Suppl 2), p.53-8, 2004.

PALOMO, T.; BENINGER, R. J.; KOSTRZEMA, R. M.; ARCHER, T. Brain sites of movement disorder: genetic and environmental agents in neurodevelopmental perturbations. **Neurotox Res.**, v.5, n. 1-3, p.1-26, 2003.

PATKAR, A. A. et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of augmentation with an extended release formulation of methylphenidate in outpatients with treatment-resistant depression. **Journal of Clinical Psychopharmacology**, v.26, p.653-656, 2006.

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

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E. Are the anxiogenic effects of yohimbine mediated by its action at benzodiazepine receptors? **Neurosci. Lett.**, v.55, p.5-9, 1985b.

PELLOW, S.; FILE, S. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 24, p. 525, 1986.

PENNARTZ, C.; GROENEWEGWN, H.; LOPEZ DA SILVA, F. H. The nucleus accumbens as a complex of functionally distinct neuronal ensemble: an integration of behavioural, electrophysiological and anatomical data. **Progress in Neurobiology**, v. 42, p.719-761, 1994.

PEPEU, G. Brain acetylcholine: an inventory of our knowledge on the 50th anniversary of its discovery. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 4, p. 416- 418, 1983.

PEREZ, R. M. G. *et al.* Neuropharmacological activity of *Solanum nigrum* fruit. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 62, p. 43-48, 1998.

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

PESTANA, F. M. **Avaliação Comportamental e dos Níveis Séricos e Metabolismo Periférico dos Hormônios Tireoidianos em Ratos Submetidos ao Estresse Social Seriado**. Dissertação (mestrado). – Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural Rio de Janeiro, 2010.

PLISZKA, S. R.; MC CRACKEN, J. T.; MAAS, J. W. Catecholamines in attention-déficit hyperactivity disorder: current perspectives. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, v. 35, p. 264-272, 1996.

POLANCZYK, G.; DE LIMA, M. S.; HORTA, B.L.; BIEDERMAN, J.; ROHDE, L. A. The worldwide prevalence of ADHD: a systematic review and metaregression analysis. **Am J Psychiatry**, v. 164, p. 942-948, 2007.

PORSOLT, R. D.; ANTON, N. B.; JALFRE, M. Behavioural despair in mice: a primary screening test for antidepressants. **Archives Internationales de Pharmacodynamie**, v. 229, p. 327-336, 1987.

POSNER, M. I.; PETERSOEN, S. E. The attention system of the human brain. **Annu Rev Neurosci.**, v.13, p.25-42, 1990.

PRANGE, A. The pharmacology and biochemistry of depression. **Diseases of the Nervous System**, v. 25, p. 217-221, 1964.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open fields as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, p.3-33, 2003.

RABBANI, M.; SAJJADI, S. E.; MOHAMMADI, A. Evaluation of the anxiolytic effect *Nepeta persica* Boiss. In mice. **eCAM**, v.2, p.181-186, 2008.

RAMUSSEN, E. R.; NEUMAN, R. J.; HEATH, A. C.; LEVY, F.; HAY, D. A.; TODD, R. D. Replication of the latent class structure of attention- deficit/ hyperactivity disorder (ADHD) subtypes in a sample of Australian twins. **Journal of Child Psychology and Psychiatry**, v. 43, p. 1018-1028, 2002.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. **Farmacologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

RAOL, Y. H.; LYNCH, D. R.; BROOKS-KAYAL, A. R. Role of excitatory amino acids in developmental epilepsies. **Ment. Retard Dev. Disabil Res. Rev.**, v.2., p.254-260, 2001.

RAPPORT, M. D.; CHUNG, K. M.; SHORE, G.; DENNEY, C. B.; ISAACS, P. Upgrading the science and technology of assessment and diagnosis: laboratory and clinic-based assessment of children with ADHA. **J. Clin. Child. Psychol.**, v.29, n.4, p.555-568, 2000.

RAVINDRAN, A. V. et al. Osmotic-release oral system methylphenidate augmentation of antidepressant monotherapy in major depressive disorder: results of a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. **Journal of Clinical Psychiatry**, v.69. p.87-94, 2008.

RAUPP, I. M. et al. Anxiolytic-like effect of chronic treatment with *Erythrina velutina* extract in the elevated plus-maze test. **J. Etnopharmacol.**, v.118, p.295-299, 2008.

RETZ, W.; THOME, J.; BLOCHER, D.; BAADER, M.; ROSLER, M. Association of attention deficit hyperactivity disorder-relates psychopathology and personality traits with the serotonin transporter promoter region polymorphism. **Neurosci. Lett.**, v.319, n.3, p.133-136, 2002.

REX, A.; STEPHENS, D. N.; FINK, H. "Anxiolytic" action of diazepam and abecarnil in a modified open field test. **Pharmacology Biochemistry Behavior**, v. 53, p. 1005-1012, 1996.

RICHMOND, R.; ZWAR, N. Review of bupropion for smoking cessation. **Drug Alcohol Rev.**, v. 22, p. 203-220, 2003.

RIESGO, R., ROHDE, L. A. A neurobiologia do TDAH. In: KAPCZINSKI, F., QUEVEDO, J. L.; IZQUIERDO, I. (ed.). **Bases Neuroquímicas do transtornos Psiquiátricos**. 2. ed.. Porto Alegre: Artes Médicas, 2004.

RODGERS, R. J. *et al.* Animal models of anxiety on ethological perspective. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, p. 289–304, 1997.

ROGAWSKI, M. A. Mechanism-specific pathways for new antiepileptic drug discovery. **Adv. Neurol.**, v. 76, p.11-27, 1998.

ROHDE, L. A., BIEDERMAN, J., BUSNELLO, E. A., ZIMMERMANN, H., SCHIMITZ, M., MARTINS, S., TRAMONTINA, S. ADAH in a school sample of Brazilian adolescents: a study of prevalence, comorbid condition and impairments. **J Am Child Adolesc Psychiatry**, v.38, p.716-722, 1999.

ROHDE, L. A.; M. FILHO; BENETTI, L.; GALLOIS, C.; KIELING, C. Transtorno de déficit de atenção/hiperatividade na infância e na adolescência: considerações clínicas e terapêuticas. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v.31, n.3, p.124-131, 2004.

ROSEN, J. B. et al. Analysis of behavioral constraints and neuroanatomy of fear to the predator odor trimethylthiazoline: A model for animal phobias. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v.32, p.1267-1276, 2008.

ROSSETTI, Z. L. *et al.* Depletion of mesolimbic dopamine during behavioral despair: partial reversal by chronic imipramine. **European Journal of Pharmacology**, v. 242, p. 313-315, 1993.

ROTH, R. H.; TAM, S-Y.; IDA, Y.; YANG, J. X.; DEUTCH, A. Y. Stress and mesocorticolimbic dopamine systems. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 537, p.138-147, 1988.

RÚBIA, K.; TAYLOS, E.; SMITH, A. B.; OKASANEN, H. e OVERMEYER, S. Neuropsychological analyses of impulsiveness in childhood hyperactivity. **Br. J. Psychiatry.**, v. 179, p.138-143, 2001.

RUSSEL, V.; DE VILLIERS, A.; SAGVOLDEN, T.; LAMM, M.; TALJAARD, J. Altered dopaminergic function in the prefrontal cortex, nucleus accumbens and caudate-putamen of an animal model of attention-deficit hyperactivity disorder—the spontaneously hypertensive rat. **Brain Res.**, v. 676, n.2, p.343-351, apr.1995.

SALES, I. M.; FREITAS, R. L.; SALDANHA, G. B.; SOUZA, G. F.; FREITAS, R. M. 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.

SCHILDKRAUT, J. J. The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. **The American Journal of Psychiatry**, v. 122, p. 509-520, 1965.

SEEMAN, P. Dopamine receptors and the dopamine hypothesis of schizophrenia. **Synapse**, v.1, p.133-152, 1987.

SEEMAN P, MADRAS B. K: Anti-hyperactivity medication: Methylphenidate and amphetamine. **Mol Psychiatry**, v. 3, p. 386-396, 1998.

SESACK, S. R.; PICKEL, V. M. Prefrontal cortical efferents in the rat synapse on unlabeled neuronal targets of catecholamines terminal in the nucleus accumbens septi and on dopamine neurons in the ventral tegmental area. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 320, p.145-160, 1992.

SÁNCHEZ-CARPINTERO, R.; NEVILLE, B. G. R. Attentional ability in children with epilepsy. **Epilepsia**, v.44(10),p.1340-9, 2003.

SHIH, T. M.; KOVIK, T. A.; CAPACIO, B. R. Anticonvulsants for poisoning by the organophosphorus compound soman: pharmacological mechanisms. **Neurosci. Biobehav Rev.**, v.15, p.349-362, 1991.

SHERMAN, E. M.; SLICK, D. J.; CONNOLLY, M. B.; EYRL, K. L. ADHD, neurological correlates and health-related quality of life in severe pediatric epilepsy. **Epilepsia**, v.48, n.6, p.1083-91, 2007.

SILVA, A. B. B.. **Mentes inquietas: TDAH Desatenção, Hiperatividade e Impulsividade**. Rio de Janeiro: Objetiva, 2009.

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

SOLANTO, M. V. Dopamine dysfunction in AD/HD: integrating clinical and basic neuroscience research. **Behav Brain Res.** v.130, p.65-71, 2002.

SONAVANE, G. S. et al. Anxiogenic activity of *Myristica fragrans* seeds. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.71, p.239-244, 2002.

SONUGA-BARKE, E. J.; TAYLOR, E.; SEMBI, S.; SMITH, C. Hyperactivity and delay aversion I. The effect of delay on choice. **Journal of Child Psychology and Psychiatry**, v. 33, p. 387-398, 1992.

SOREQ, H.; SEIDMAN, S. Acetylcholinesterase – new roles for an old actor. **Nature Reviews, Neuroscience**, v.2, p.294–302, 2001.

SOUSA, F. C. F. et al. Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: Uma revisão da bioatividade e potenciais benefícios nos distúrbios da ansiedade em modelos animais. **Braz. J. Pharmacogn.**, v.71, p. 239-244, 2002.

SOUZA, I.; SERRA, M. A.; MATTOS, P.; FRANCO, V. A. Comorbidades em crianças e adolescentes com transtorno do déficit de atenção: resultados preliminares. **Arq Neuropsiquiatr**, v.59, p.401-406, 2001.

SPENCER, T.; BIEDERMAN, J; WILENS, T.; FARAONE, V.; Overview and neurobiology of attention deficit/hyperactivity disorder. **J Clin Psychiatry.**, v.63(Suppl1 12), p.3-9, 2002.

SPENCER, T. J.; BIEDERMAN, J.; CICCONE, P. E.; MADRAS, B. K., DOUGHERTY, D. D.; BONAB, A. A.; LIVNI, E.; PARASRAMPURIA, D. A.; FISCHMAN, A. J. PET study examining pharmacokinetics, detection and likeability, and dopamine transporter receptor occupancy of short- and long-acting oral methylphenidate. **Am J Psychiatry**, v.163, p.387–395, 2006.

STAHL, S. M. **Essential psychopharmacology: Neuroscientific Basis and Practical Applications**. 2. ed. Cambridge University Press, 2000.

STAHL, S. M. **Stahl's essential psychopharmacology: neuroscientific basis and practical applications**. 3. ed. Nova York: Cambridge University Press, 2008.

STOLL, A. L. et al. Methylphenidate augmentation of serotonin selective reuptake inhibitors: a case series. **Journal of Clinical Psychiatry**, v.57, p.72-76, 1996.

STOUT, J. C.; WEISS, J. M. An animal model for measuring behavioral responses to anxiogenic and ansiolytic manipulation. **Pharmacology Biochemistry Behavior**, v. 47, p. 459-465, 1994.

SULLIVAN, R. M.; BRAKE, W. G. What the rodent prefrontal cortex can teach us about attention-deficit/ hyperactivity disorder: the critical role of early developmental events on prefrontal function. **Behavioural Brain Research**, v. 146, n.1-2, p. 43-55, 2003.

SVENSSON, T. H. Brain noradrenaline and the mechanisms of action of antidepressant drugs. **Acta Psychiatr. Scand**, v.402, p.18-27, 2000

SWANSON, J. M.; CANTWELL, D.; LERNER, M.; MCBURNETT, K.; HANNA, G. Effects of stimulant medication on learning in children with ADHD. **J Learn Disabil**, v.24, p.219-230, 1991.

SWANSON, J.; GUPTA, S.; LAM, A.; SHOULSON, I.; LERNER, M.; MODI, N.; LINDEMULDER, E.; WIGAL, S. 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. **Arch Gen Psychiatry**, v.60, p.204-211.

TAN, M.; APPLETON, R. Attention deficit and hyperactivity disorder, methylphenidate and epilepsy. **Arch.Dis. Child**, 90, 57-59, 2005.

TELLIOGLU, T.; ROBERTSON, D. Genetic or acquired deficits in the norepinephrine transporter: Current understating of clinical implications. **Exp. Rev. Mol. Med.**, 2001.

TIMMONS, S. D.; GEISERT, E.; STEWART, A. E.; LORENZON, N. M.; FOEHRING, R. C. Alpha 2-adrenergic receptor-mediated modulation of calcium current in neocortical pyramidalneurons.**Brain Res.**, v. 1014, p. 184 –196, 2004.

THAPAR, A.; HOLMES, J.; POULTON, K.; HARRINGTON, R. Genetic basis of attention deficit and hyperactivity. **Br. J. psychiatry**. v.174, p.105-111, 1999.

TIMMONS, S. D. *et al.* α 2-adrenergic receptor-mediated modulation of calcium current in neocortical pyramidal neurons. **Brain Research**, v. 1014, p. 184-196, 2004.

THOME-SOUZA, S.; KUCZYNSKI, E.; ASSUMPCAO, F.; JR., RZEZAK, P, FUENTES, D.; FIORE, L., *et al.* Which factors may play a pivotal role on determining the type of psychiatric disorder in children and adolescents with epilepsy? **Epilepsy Behav.**, v.5, n.6, p.988-94, 2004.

TREIT, D.; FUNDYTUS, M. Thigmotaxis as a test of anxiolytic activity in rats. **Pharmacol. Bichem. Behav.**, v. 31, p. 959-62, 1989.

TREIT, D.; MENARD, J.; ROYAN, C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. **Parmacology Biochemistry Behavior**, v. 44, p. 463-469, 1993.

TRENDELEMBURG, U. The TiPS lecture: Functional aspect of the neuronal uptake of noradrenaline. **Trends Pharmacol, Sci.**, v.12, p.334-337, 1991.

TRIPP, G., WICKENS, J. R. Neurobiology of ADHD. **Neuropharmacology**, v.57, p.579-589, 2009.

TURSKI, W. A.; CAVALHEIRO, E. A.; SCHWARZ, M.; CZUCZWAR, S. J.; Z. KLEINRONK, Z.; TURSKI, L., Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, eletroencephalographic and neuropathological study, **Behav. Brain Res.**, v.9, p.315–336, 1983a.

TURSKI, W. A.; CZUCZWAR, S. J.; KLEINROK, Z.; TURSKI, L. Cholinomimetics produce seizure and brain damage in rats. **Experientia**, v.39, p.1408-1411, 1983b.

TURSKI, L., IKONOMIDOU, C., TURSKI, W. A., BORTOLOTTA, Z. A.; CAVALHEIRO, E. A. Review: cholinergic mechanisms and epileptogenesis. The seizures induced by

pilocarpine: a novel experimental model of intractable epilepsy, **Synapse**, v. 3, p. 154-71, 1989.

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

VANHATALO, S.; RIIKONEN, R. Nitric oxide metabolites, nitrates and nitrites in the cerebrospinal fluid in children with west syndrome. **Epilepsy Research**, v.46, p.3-13, 2001.

VAN PRAAG, H. M. Anxiety and increased aggression as pacemakers of depression. **Acta Psychiatrica Scandinavica**, v. 393, p. 81-88, 1998.

VETULANI, J.; SULSER, F. Action of various antidepressant treatments reduces reactivity of noradrenergic cyclic AMP-generating system in limbic forebrain, **Nature**, v. 257, p. 495-496, 1975.

VOLKOM, N. D.; WANG, G.; FOWLER, J. S.; GATLEY, S. J.; LOGAN, J.; DING, Y. S.; HITZEMANN, R.; PAPPAS, N. Dopamine transporter occupancies in the human brain induced by therapeutic doses of oral methylphenidate. **The American journal of psychiatry**, v.155, p.1325-1331, 1998.

VOLKOW, N. D.; WANG, G.; FOWLER, J. S.; LOGAN, J.; GERASIMOV, M.; MAYNARD, L.; DING, Y.; GATLEY, S.J.; GIFFORD, A.; FRANCESCHI, D. Therapeutic doses of oral methylphenidate significantly increase extracellular dopamine in the human brain. **J Neurosci.**, v.21(RC121), p.1-5, 2001

VOLKOW, N. D.; WANG, G. J.; FOWLER, J. S.; LOGAN, J.; FRANCESCHI, D.; MAYNARD, L.; DINGS, Y. S.; GATLEY, S. J.; GIFFORD, A.; ZHUN, W.; SWANSON, J. M. Relationship between blockade of dopamine transporters by oral methylphenidate and the increases in extracellular dopamine: therapeutic implications. **Synapse**, v.43, p.181-187, 2002.

VOLKOW, N. D.; WANG, G. J.; FOWLER, J. S., DING, Y. S. 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.

WALLIS, D.; RUSSELL, H. F.; MUENKE, M. Genetics of Attention Deficit/ Hyperactivity Disorder. **Journal of Pediatric Psychology**, v.33, n. 10, p.1-15, 2008.

WILENS, T. E. Effects of methylphenidate on the catecholaminergic system in attention-deficit/hyperactivity disorder. **J Clin Psychopharmacol.**, v. 28 (3Suppl 2), s46-S53, 2008.

WATANABE, T.; MORIMOTO, K.; NAKAMURA, M.; SUWAKI, H. Modification of behavioral responses induced by electrical stimulation of the ventral tegmental area in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 93, p.119-129, 1998.

WIESEL, E. A.; FUXE, K.; HOKFELT, T.; AGNATI, L. F. Studies on dopamine turnover in ovariectomized or hypophysectomized female rats. Effects of 17 beta-estradiol benzoate-ethynodioldianetate and ovine prolactin. **Brain Research**, v. 148, p.399-411, 1978.

WIGAL, S. B. Efficacy and safety limitations of attention-deficit hyperactivity disorder pharmacotherapy and children and adults. **CNS drugs**, Suppl 1, 21-31, 2009.

YANG, P. B.; AMINI, B.; SWANN, A. C.; DAFNY, N. Strain differences in the behavioral responses of male rats to chronically administered methylphenidate. **Brain Research**, v. 971, p.139-152, 2003.

YANG, P. B.; SWANN, A. C.; DAFNY, N. Acute and chronic methylphenidate dose-response assessment on three adolescent male rat strains. **Brain Research Bulletin**, v. 71, p.301-310, 2006.

YANO, M.; STEINER, H. Methylphenidate and cocaine: the same effects on gene regulation? **Trend in Pharmacological Sciences**, v.28, p.588-596, 2007.

YAO, C.Y. et al. Laetispicine, an amide alkaloid from *Piper laetispicum*, presents antidepressant and antinociceptive effects in mice. **Phytomedicine**, v. 16, p.823-829, 2009.