

UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE METILFENIDATO SOBRE A
CADEIA RESPIRATÓRIA MITOCONDRIAL EM CÉREBRO DE RATOS
JOVENS

ANA OLINDA NICKNICK FAGUNDES

CRICIÚMA – SANTA CATARINA
2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE METILFENIDATO SOBRE A
CADEIA RESPIRATÓRIA MITOCONDRIAL EM CÉREBRO DE RATOS
JOVENS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense, para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Emilio Luiz Streck

CRICIÚMA – SANTA CATARINA
2006

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE METILFENIDATO SOBRE A
CADEIA RESPIRATÓRIA MITOCONDRIAL EM CÉREBRO DE RATOS
JOVENS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense, para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Emilio Luiz Streck

**CRICIÚMA – SANTA CATARINA
2006**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

F156e Fagundes, Ana Olinda Nicknick.

Efeito da administração de metilfenidato sobre a cadeia respiratória mitocondrial em cérebro de ratos jovens / Ana Olinda Nicknick Fagundes ; orientador : Emilio Luiz Streck. - Criciúma : Ed. do Autor, 2007.

76 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2007.

1. Metilfenidato. 2. Distúrbio da falta de atenção com hiperatividade. 3. Sistema nervoso central. 4. Respiração mitocondrial. I. Título.

CDD. 21^a ed. 615.1

Bibliotecária: Flávia Cardoso – CRB 14/840
Biblioteca Central Prof. Eurico Back – UNESC



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão
Diretoria de Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 1.919 de 03.06.2005


PARECER

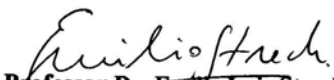
Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado) reuniram-se para realizar a arguição da Dissertação de MESTRADO apresentada pela candidata **ANA OLINDA NICKNICK FAGUNDES**, sob o título: "**Efeito da administração de metilfenidato sobre a cadeia respiratória mitocondrial em cérebro de ratos jovens**", para obtenção do grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE** do Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

Após haver analisado o referido trabalho e argüido a candidata, os membros são de parecer pela "**APROVAÇÃO**" da Dissertação.

Criciúma, SC, 30 de janeiro de 2007.


Professora Dra. Vanessa Moraes Andrade
Membro Relator


Professora Dra. Juliana da Silva
Membro Externo


Professor Dr. Emilio Luiz Streck
Presidente da Banca e Orientador

Dedico esta dissertação a todas as crianças portadoras do Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade, aos seus familiares, professores e terapeutas, que trabalham sempre num âmbito coletivo para melhor inserir estas crianças no trinômio escola-família-sociedade.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, pelo dom da sabedoria e da vida.

Ao Prof. Emilio Luiz Streck, por aceitar ser meu orientador, pela paciência, conhecimento, sabedoria e amizade na orientação deste trabalho.

À Prof^a Vanessa que prontamente aceitou ser a relatora deste trabalho.

A todos os colegas da 1^a turma de mestrado de Ciências da Saúde da UNESC, pela convivência, companheirismo e amizade.

Às alunas da graduação de biologia Samira e Gislaine, as quais me ensinaram a lidar com os nossos amiguinhos “ratos”, a ajuda e disponibilidade no decorrer do projeto.

Às bolsistas do laboratório Francine, Gislaine, Lara, Cristiane, Maíra, Cláudia, Eliane, Mariana (*in memoriam*) pelo apoio na confecção desse trabalho, sem o qual este não teria seus resultados.

À Mônica e a Beatriz (mestrado), pelas informações e amizade.

Ao meu marido, colega e companheiro Glauco o qual teve paciência e respeito pelo meu trabalho.

A minha mãe Nelva e aos meus filhos João Augusto e Gláucia e meu sobrinho Eduardo pelo carinho.

À UNESC e Prefeitura Municipal de Criciúma pela bolsa de estudos e a coordenação do Curso de Medicina Prof^a. Silvana pelo apoio

RESUMO

O metilfenidato é freqüentemente prescrito para o tratamento do transtorno de déficit de atenção e hiperatividade. Sabe-se que os psicoestimulantes podem causar alterações neuroquímicas e comportamentais, quando usados cronicamente. Os mecanismos responsáveis pelos efeitos terapêuticos e adversos desse fármaco ainda são pouco conhecidos. Estudos já demonstraram que o metilfenidato altera a atividade metabólica cerebral. A maior parte da energia é obtida pela fosforilação oxidativa, na cadeia respiratória mitocondrial. Tecidos com alta demanda energética, como o cérebro, possuem grandes quantidades de mitocôndria. O objetivo desse trabalho foi medir a atividade dos complexos II e IV da cadeia respiratória mitocondrial e da succinato desidrogenase em cerebelo, córtex pré-frontal, hipocampo, estriado e córtex cerebral de ratos jovens submetidos ao tratamento agudo e crônico com metilfenidato. Os resultados mostram que o tratamento agudo com metilfenidato não alterou as enzimas avaliadas no cerebelo, córtex pré-frontal e córtex cerebral de ratos. O complexo II e a succinato desidrogenase também não foram alteradas no hipocampo e estriado. Além disso, o complexo IV foi ativado nessas estruturas cerebrais. Também foi demonstrado que a atividade das enzimas mitocondriais foram aumentadas pela administração crônica de metilfenidato. A succinato desidrogenase foi ativada no cerebelo, córtex pré-frontal e estriado, mas não foi alterada no hipocampo e córtex cerebral. O complexo II foi ativado no cerebelo e córtex pré-frontal, mas não sofre alteração no hipocampo, estriado e córtex cerebral. O complexo IV foi ativado no cerebelo, hipocampo, estriado e córtex cerebral e não sofreu modificação na sua atividade no córtex pré-frontal. Esses achados mostram que o metilfenidato, principalmente no tratamento crônico, aumentou a atividade de enzimas mitocondriais. Mais estudos são necessários para melhorar a compreensão sobre os efeitos do metilfenidato sobre o sistema nervoso central em desenvolvimento e sobre possíveis consequências na idade adulta do uso prévio do fármaco.

Palavras-chave: Metilfenidato. Cadeia Respiratória.

ABSTRACT

Methylphenidate is frequently prescribed for the treatment of attention deficit/hyperactivity disorder. Psychostimulants can cause long-lasting neurochemical and behavioral adaptations. The exact mechanisms underlying its therapeutic and adverse effects are still not well understood. In this context, it was previously demonstrated that methylphenidate altered brain metabolic activity, evaluated by glucose consumption. Most cell energy is obtained through oxidative phosphorylation, in the mitochondrial respiratory chain. Tissues with high energy demands, such as the brain, contain a large number of mitochondria. In this work, our aim was to measure the activities of mitochondrial respiratory chain complexes II and IV and succinate dehydrogenase in cerebellum, prefrontal cortex, hippocampus, striatum, and cerebral cortex of young (25 days-old) rats submitted to acute or chronic treatment with methylphenidate. We showed that acute treatment did not affect the enzymes in cerebellum, prefrontal and cerebral cortex of rats. Complex II and succinate dehydrogenase were not affected in hippocampus and striatum. Besides, complex IV was increased by acute administration of methylphenidate in these brain areas. Our results also showed that mitochondrial respiratory chain enzymes activities were increased by chronic administration of methylphenidate. Succinate dehydrogenase was activated in cerebellum, prefrontal cortex and striatum, but did not change in hippocampus and brain cortex. Complex II activity was increased in cerebellum and prefrontal cortex and was not affected in hippocampus, striatum and brain cortex. Finally, complex IV activity was increased in cerebellum, hippocampus, striatum and brain cortex. Complex IV was not affected in prefrontal cortex. These findings show that methylphenidate, especially when chronically administered, increases some enzymes of mitochondrial respiratory chain. Further research to improve understanding of methylphenidate effects on developing nervous system and the potential consequences in adulthood resulting from early-life drug exposure.

Key-words: Methylphenidate, Respiratory Chain.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPC - Monofosfato de Adenosina Cíclico

ATP - Trifosfato de Adenosina

CID-10 - Código Internacional de Doenças

D1, D2, D3, D4, D5 - Receptores Dopaminérgicos

DA - Dopamina

DAT - Transportador de Dopamina

DNA - Ácido Desoxirribonucléico

DSM-IV-TR - Manual Diagnóstico e Estatístico dos Transtornos Mentais

EAN - Espécies Ativas de Nitrogênio

ERK - Quinase Regulada por Sinais Extracelulares

HVA - Ácido Homovanílico

IEG - Genes Imediatos

Ip - Intraperitoneal

MAO - Monoamina Oxidase

MRI - Imagem de Ressonância Magnética

Nac - *Nucleus Acumbens*

NET - Transportador de Noradrenalina

PET - Tomografia por Emissão de Póstron

PKA - Proteína Quinase A

SDH - Succinato Desidrogenase

SNC - Sistema Nervoso Central

SPECT - Tomografia Computadorizada por Emissão de Fóton

TDAH - Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade

SUMÁRIO

PARTE I.....	11
1 INTRODUÇÃO.....	11
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	14
2.1 Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade.....	14
2.1.1 Histórico e Conceito.....	11
2.1.2 Etiologia.....	16
2.1.3 Fisiopatologia.....	18
2.1.4 Apresentação Clínica.....	21
2.1.5 Tratamento.....	24
2.2 Metilfenidato.....	24
2.2.1 Propriedades Gerais.....	24
2.2.2 Farmacocinética.....	26
2.2.3 Farmacodinâmica.....	26
2.3 Metabolismo Energético Cerebral.....	31
2.4 Metabolismo Intermediário e Cadeia Respiratória.....	33
3 JUSTIFICATIVA E PROBLEMA.....	41
4 HIPÓTESES E PERGUNTAS CIENTÍFICAS.....	42
5 OBJETIVOS.....	43
5.1 Objetivo Geral.....	43
5.2 Objetivos Específicos.....	43
PARTE II.....	44
6 ARTIGO I.....	44
7 ARTIGO II.....	65
PARTE III.....	80
8 DISCUSSÃO.....	81
9 CONCLUSÕES.....	89
10 PERSPECTIVAS.....	90
11 REFERÊNCIAS.....	91

PARTE I

1 INTRODUÇÃO

O metilfenidato é um dos fármacos estimulantes do sistema nervoso central (SNC) mais utilizados no tratamento do transtorno de déficit de atenção/hiperatividade (TDAH), uma síndrome neuro-comportamental que afeta de 3 a 9% das crianças em idade escolar (DOUGHERTY et al, 1999; NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 2000) e aproximadamente 4% dos adultos (FARAONE et al 2003). Relacionado a prejuízo acadêmico e social, diagnosticado tipicamente nos primeiros anos da vida escolar da criança (por volta dos 7 anos). Os sintomas do TDAH classificam-se em três categorias: desatenção, hiperatividade e impulsividade, com nível inapropriado de atenção em relação ao esperado para idade com ou sem impulsividade e hiperatividade. Isto leva a distúrbios motores, perceptivos e cognitivo-comportamentais (KAPLAN et al, 2002).

O metilfenidato é um efetivo tratamento para esta desordem, tem sido utilizado por mais de 50 anos, reduzindo de maneira significativa os sintomas de desatenção, hiperatividade e impulsividade em até 70% das crianças tratadas (GREENHILL et al, 2002; SWANSON et al, 1998). As propriedades farmacológicas do metilfenidato têm sido bem caracterizadas em vários estudos pré-clínicos, entretanto seus mecanismos de ação não são completamente estudados (SOLANTO, 1998). Pesquisas sugerem que o metilfenidato aumenta o nível de dopamina extracelular no cérebro (CASTELLANOS et al, 1996 a; VOLKOW et al, 1994). Esta teoria tem sido sustentada em parte por estudos que mostraram que o metilfenidato bloqueia transportadores de dopamina e de noradrenalina

(DOUGHERTY et al, 1999; KRAUSE et al, 2000; SOLANTO, 1998). As disfunções dopaminérgica e noradrenérgica estão envolvidas nas vias da atenção (neurônios noradrenérgicos) e motivação (neurônios dopaminérgicos) na patogênese do TDAH (DOUGHERTY et al, 1999; SOLANTO, 1998).

No entanto, apesar do uso freqüente do metilfenidato, atualmente existem poucas informações sobre os possíveis efeitos do uso continuado desse fármaco no desenvolvimento (DOUGHERTY et al, 1999; NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 2000). Nesse sentido, muitos estudos têm sido realizados com o objetivo de melhor compreender os mecanismos de ação do metilfenidato sobre o SNC. Chase e colaboradores (2002) mostraram, por exemplo, que a exposição de metilfenidato durante períodos críticos do desenvolvimento neural altera o padrão normal de expressão gênica. Além disso, foi demonstrado que ratos pré-púberes tratados cronicamente com metilfenidato apresentaram diminuição no número de transportadores de dopamina, sendo que esse efeito permaneceu até a idade adulta (MOLL et al, 2001). O metilfenidato também alterou o comportamento de ratos de 10 dias de idade, induzindo aumento na atividade locomotora (MCDOUGALL et al, 1999).

Em 1987, Porrino e Lucignani demonstraram que a administração de metilfenidato alterou significativamente e de forma dose-dependente a atividade metabólica em várias regiões do sistema nervoso central, medida pela taxa de utilização cerebral de glicose. A diminuição no metabolismo energético cerebral parece estar associada com algumas doenças neurodegenerativas, como as doenças de Alzheimer, Parkinson, Huntington e isquemia cerebral (BEAL, 1992; HEALES et al, 1999). Além disso, sabe-se que a redução de obtenção de energia no cérebro também pode comprometer a síntese de neurotransmissores e lipídios (DI

DONATO, 2000; HERTZ e PENG, 1992). Deficiências no funcionamento normal da cadeia respiratória mitocondrial levam a uma rápida queda na produção de energia e conseqüente morte celular (ANKARCRONA et al, 1995).

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade

2.1.1 Conceito e Histórico

O transtorno sofreu várias nomenclaturas e na década de 1940 foi designado como *Lesão Cerebral Mínima*. Em 1962, no simpósio de Oxford foi oficializada a expressão *Disfunção Cerebral Mínima*, reconhecendo-se que as alterações estão mais relacionadas com disfunções nas vias nervosas do que propriamente lesões. Posteriormente, em 1980, segundo o Manual Diagnóstico e Estatístico da Associação Americana da Psiquiatria (DSM-III) o transtorno foi designado como *Distúrbio da Atenção*. Em 1987, a nomenclatura foi novamente modificada para TDAH no DSM-III-R e mantida no DSM-IV (1994). Na CID-10 é classificada como um transtorno hipercinético.

Conceitualmente, o TDAH se caracteriza por ser uma síndrome neurocomportamental com sintomas classificados em três categorias: desatenção, hiperatividade e impulsividade, com nível inapropriado de atenção em relação ao que se espera para a idade; com ou sem impulsividade e hiperatividade (GOLDMAN et al, 1998; KIRBY et al, 2002; MILLER e CASTELLANOS, 1998; SWANSON et al, 1998). Estes sintomas devem aparecer em dois ou mais ambientes distintos (casa e escola, e ou/ casa e trabalho), levando a distúrbios motores, perceptivos cognitivos e comportamentais. Existe importante comprometimento funcional em diversas áreas como acadêmica, social, profissional e afetiva. À medida que o indivíduo cresce, também há aumento das comorbidades, principalmente no aspecto psiquiátrico.

Na faixa etária entre 4 e 5 anos é aceitável certo grau de hiperatividade em crianças, em função do processo neuroevolutivo, visto que a região pré-frontal completa sua mielinização durante esta faixa etária. O encéfalo tem uma progressão pósterio-anterior, mielinizando primeiro a região da visão e por último as áreas anteriores (MICK et al, 2002). Epidemiologicamente, o TDAH tem uma prevalência estimada de 5 a 8% (FARAONE et al, 2003; NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 2000; ROHDE et al, 1999) na idade escolar (acima de 7 anos) com variações de 3 a 17,8%, diminuindo sua prevalência com o aumento da idade, atingindo aproximadamente 4% dos adultos (FARAONE et al, 2003; SWANSON et al, 1998). Na infância é mais freqüente em meninos do que meninas, na relação 2:1 e podendo chegar até 6,2: 1. Na idade escolar aproxima-se de 2:1, na adolescência aproxima-se de 1:1 e na idade adulta há um predomínio no sexo feminino na proporção de 2:1 (BIEDERMAN e FARAONE, 2004). No entanto, estudos epidemiológicos indicam que essa prevalência pode ser de duas a três vezes maior (PAULE et al, 2000).

Em relação a sua expressão clínica, existe um predomínio da desatenção no sexo feminino. No sexo masculino, os sintomas de hiperatividade e impulsividade são mais representativos (RHODE, 2003). Crianças com TDAH têm tendência a desenvolverem outros transtornos disruptivos do comportamento na infância, adolescência e idade adulta, principalmente o transtorno opositor desafiante e de conduta, também problemas acadêmicos, transtornos anti-sociais e abuso de drogas (BIEDERMAN e FARAONE, 2000).

2.1.2 Etiologia

A etiologia do TDAH é multifatorial, as causas exatas ainda são desconhecidas, contudo a influência de fatores genéticos e ambientais já é bem aceita na literatura (TANNOCK et al, 1998). O envolvimento genético é substancial, e acredita-se que vários genes sejam responsáveis pela suscetibilidade genética ao transtorno somado aos agentes ambientais. Estudos com o gene transportador de dopamina (DAT 1), gene do receptor D4 de dopamina são os pioneiros (COOK et al, 1995). Estudos que sugerem forte influência encontraram uma herdabilidade relativamente alta ultrapassando 0,70 (THAPAR et al, 1999; TANNOCK, 1998). O risco de TDAH parece ser de 2 a 8 vezes maior nos pais das crianças afetadas do que na população geral (FARAONE, 1998). Outro gene do sistema dopaminérgico intensamente investigado neste transtorno é o gene do receptor D4 de dopamina. O grande interesse por este gene surgiu a partir da observação de sua associação com a dimensão de personalidade “busca de novidades”, provavelmente relacionada ao TDAH (EBSTEIN, 1996). Além disso, o produto deste gene concentra-se em áreas do cérebro cujas funções estão prejudicadas na doença (MATSUOMOTO, 1995 e BARKLEY, 1997). La Hoste et al (1996) foram os primeiros a detectar a associação deste gene com o TDAH. Embora muitas investigações posteriores tenham replicado a associação com o gene do receptor D4, os resultados são controversos.

Praticamente todos os demais genes conhecidos do sistema dopaminérgico já foram objeto de estudos de associação com o TDAH, incluindo genes que codificam os receptores D2, D3 e D5 e genes de enzimas relacionadas

ao metabolismo de dopamina (ROMAN, 2003). Destes, o mais promissor parece ser o gene receptor D5 de dopamina (LOWE, 2003).

Estudos do envolvimento dos genes dos sistemas noradrenérgicos e mais recentemente do serotoninérgicos ainda são bastante iniciais e investigações adicionais se fazem necessárias antes que se possa confirmar ou não suas influências na etiologia do TDAH. A associação do TDAH com complicações na gestação ou no parto é ainda bastante divergente, mas situações como toxemia, eclâmpsia, pós-datismo, trabalho de parto muito longo, estresse fetal, baixo peso ao nascer, hemorragias pré-parto e má saúde materna favorecem ao transtorno (MICKE et al, 2002). Também associação entre exposição a fumo e álcool durante a gravidez e a presença do TDAH nos filhos. (FARAONE; BIEDERMAN, 2003). Outros fatores como dano cerebral perinatal do lobo frontal, podem afetar os processos de atenção, motivação e planejamento, relacionados de forma indireto com a doença.

A maioria dos estudos sobre possíveis agentes ambientais e TDAH só evidenciaram uma associação dos mesmos e não causa direta. O substrato neurobiológico do transtorno advém dos estudos neuropsicológicos, de neuroimagem e de neurotransmissores; formando um tripé pela imaturidade cerebral, sistemas atencionais anterior e posterior e envolvimento de catecolaminas, especialmente a dopamina e noradrenalina (RIESGO et al, 2004). Nesse contexto, sabe-se que o TDAH é causado por uma deficiência de dopamina nos centros de controle motor dos gânglios da base, particularmente no estriado (DOUGHERTY et al, 1999). A neuromaturação encefálica tem progressão pósterio-anterior, isto é, a mielinização se inicia pela região da visão por volta do nascimento e se completa em torno dos 2 anos de idade. Por último, mieliniza-se as áreas anteriores. Dado esse fato, é aceitável certo grau de hiperatividade em crianças sem lesão até 4 a 5 anos.

A região pré-frontal, onde está o “freio motor”, completa sua maturação por volta dos 7 anos.

2.1.3 Fisiopatologia

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 (SOLANO, 1998; HAN e GU, 2006). A teoria proeminente é que no TDAH existe uma disfunção da neurotransmissão dopaminérgica, com conseqüente desregulação desses circuitos, incluindo 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). Estudos têm mostrado evidências da participação do estriado na modulação da atenção e impulsividade no TDAH (AYLWARD et al, 1996; CASTELLANOS et al, 1996). A impulsividade do TDAH parece estar ligada a prejuízo na transmissão da via dopaminérgica das projeções estriado-córtico-frontal (CASTELLANOS, 1997; RUBIA et al, 2001; SWANSON et al, 1998; VAIDYA et al, 1998).

O prejuízo nas tarefas executivas do TDAH está provavelmente relacionado com o córtex pré-frontal dorso lateral (CASTELLANOS, 1997; DINN et al, 2001). Estudos neurológicos identificaram prejuízos em pacientes com TDAH por

suas performances em tarefas requerendo a função do córtex pré-frontal. Estudos de neuroimagem confirmam insuficiências funcionais e estruturais no circuito do córtex pré-frontal. Pacientes portadores de TDAH demonstram alterações genéticas, incluindo genes relacionados à neurotransmissão das catecolaminas (ARNSTEN e LI, 2005). Lesões na região do córtex pré-frontal podem produzir sintomas relacionados com esquecimento, distração, impulsividade e desorganização. As projeções dopaminérgicas mesocorticais estão relacionadas a funções cognitivas como fluência verbal, aprendizado, vigilância durante tarefas executivas, concentração e manutenção da atenção. As vias noradrenérgicas pré-frontais estão relacionadas à manutenção do foco de atenção, disposição, fadiga, motivação e interesse (STAHL, 2000).

Os sintomas relacionados com a hiperatividade e impulsividade nesse transtorno parecem ser controlados pela via dopaminérgica nigroestriatal. A base neurobiológica para o TDAH ainda não está completamente definida. Não ocorre prejuízo em uma única via ou região cerebral, existem evidências de hipofunção dopaminérgica no lobo frontal e nos gânglios da base. Estudos mais recentes de neuroimagem e ressonância magnética (MRI) sugerem que existe menos atividade neural na região frontal e nos gânglios da base (ZAMETKIN et al, 1993; BAUMGARDNER et al, 1996; CASTELLANOS et al, 1996; FILIPEK et al, 1997; MATARO et al, 1997), e alterações no córtex cingular anterior em indivíduos que apresentam TDAH (BUSH et al, 1999). Estudos de imagem (TC por emissão de fóton SPECT e TC por emissão de pósitron PET) têm demonstrado redução no metabolismo nas regiões frontal e gânglios da base (SIEG et al, 1995; ERNEST et al, 1998; LOU et al, 1998; ERNEST et al, 1999).

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. A visão anatomofuncional mais abrangente e completa deve incluir um circuito neural com dois sistemas atencionais: um anterior que tende a ser dopaminérgico (fig.1) 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).(fig. 2) 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-fronto-parietais, que ligam o sistema atencional anterior e posterior e são o suporte anatomofuncional para a memória de trabalho (LEVY e FARROW, 2001).

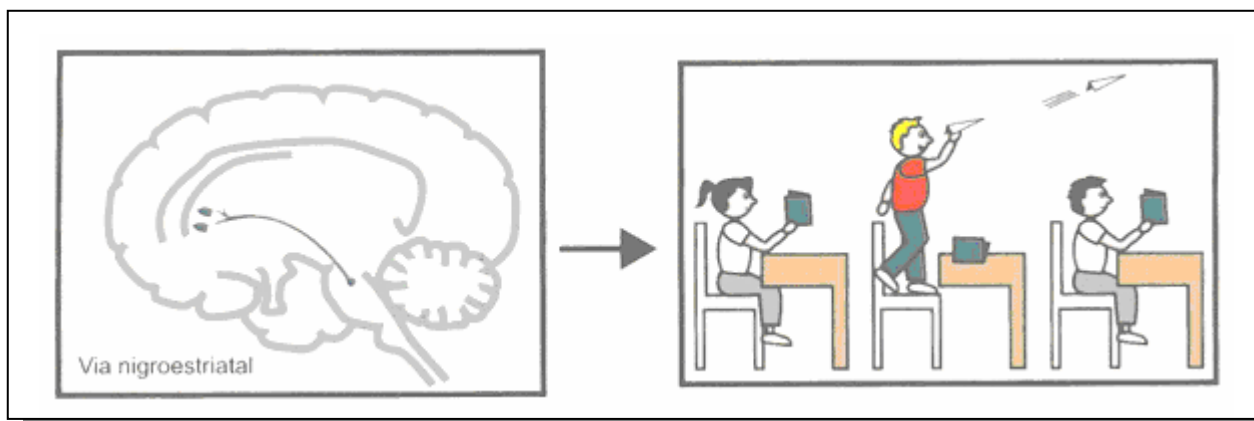


Figura 1 – Hiperatividade no TDAH

Fonte: STEPHEN, (2000).

* A hiperatividade motora é mediada pela atividade dopaminérgica na via nigroestriatal. A impulsividade pode ser inibida pela ação do glutamato sobre o córtex passando pelo estriado. Embora o aumento da dopamina nesta via possa aumentar o comportamento motor e impulsividade nas pessoas normais, pode promover um efeito paradoxal de calma motora e redução do comportamento de impulsividade nos pacientes com transtorno de déficit de atenção.

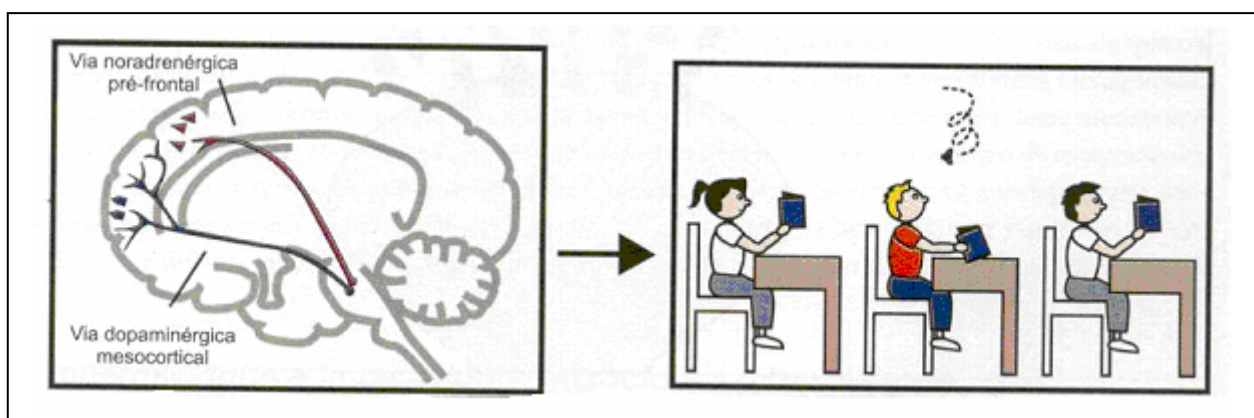


Figura 2 – Déficit de Atenção no TDAH

Fonte: STEPHEN, (2000).

* A via noradrenérgica que se projeta do *locus ceruleus*, no tronco cerebral, para o córtex frontal e a via dopaminérgica que se projeta da área tegmental ventral, no tronco cerebral, para as áreas corticais pré-frontais mesocortical e dorsolateral, podem, hipoteticamente, mediar a atenção, a vigília, a concentração e outras funções cognitivas correlatas. Se deixarem de funcionar, podem resultar em distração e déficit de atenção.

2.1.4 Apresentação Clínica

Atualmente menciona-se três subtipos de TDAH: com predomínio de desatenção; com predomínio de hiperatividade e com uma combinação de ambos. É

considerado um distúrbio que se inicia tipicamente cedo na infância e continua na idade adulta (CASTELLANOS, 1997).

O quadro clínico se baseia fundamentalmente nos três sinais principais que são identificados como déficit de atenção, a hiperatividade e a impulsividade, com possíveis variações entre eles. A descrição da sintomatologia está definida pelos critérios do Manual Diagnóstico e Estatístico das Doenças Mentais (DSM-IV), as crianças com TDAH são facilmente reconhecidas em clínicas, escolas e em casa (TAYLOR et. al, 2001).

A desatenção, a hiperatividade ou a impulsividade como sintomas isolados podem resultar de muitos problemas de relação, sistemas educacionais inadequados ou podem estar associados a outros transtornos comumente encontrados na infância e adolescência. Portanto, para o diagnóstico do TDAH, é sempre necessário contextualizar os sintomas na história de vida da criança (RODHE et al, 2000).

Algumas condições especiais são requeridas para o seu diagnóstico:

- a. A duração dos sintomas de desatenção e ou hiperatividade/impulsividade: as crianças com o transtorno têm história clínica desde a idade pré-escolar com presença dos sintomas ou pelo menos um período de vários meses de sintomatologia intensa;
- b. Freqüência e intensidade dos sintomas: é fundamental que pelo menos 6 dos sintomas de desatenção e ou 6 dos sintomas de hiperatividade/impulsividade estejam presentes na vida da criança;
- c. Persistência dos sintomas em vários locais e ao longo do tempo: por exemplo casa e escola;
- d. Prejuízo clínico significativo na vida da criança;

- e. Verificar cuidadosamente se o sintoma supostamente presente correlaciona-se com o constructo básico do transtorno, ou seja, a dasatenção, hiperatividade/impulsividade (RHODE et al, 2000).

A apresentação pode variar de acordo com o estágio de desenvolvimento. O diagnóstico deve ser cauteloso antes dos 6 anos de idade.

Existe uma alta prevalência de comorbidades entre o TDAH e os transtornos disruptivos do comportamento, como o transtorno de conduta e o do opositor desafiante, situada na faixa de 30 a 50%. As taxas de comorbidades também são bastante significativas com a depressão (5 a 20%), transtornos de ansiedade (25%) e transtorno de aprendizado (10 a 25%) (BIEDERMAN et al, 1991). Também há associação de TDAH e abuso e dependência de drogas na adolescência e, principalmente, na fase adulta (BIEDERMAN, 1991).

A base para a avaliação diagnóstica é formada pela história clínica, observação do comportamento atual do paciente e relato dos pais e professores sobre o funcionamento da criança nos diversos ambientes que frequenta. A história clínica pregressa sobre o comportamento é decisiva para definição diagnóstica, história médica perinatal e problemas relacionados a prematuridade (LOWE, 2003).

A avaliação neurológica é relevante; além de exame neurológico evolutivo, testes neuropsicológicos também podem ser realizados. Os exames de neuroimagem não fazem parte do ambiente clínico, mas sim da pesquisa (RODHE, et. Al., 2003).

2.1.5 Tratamento

O tratamento do TDAH envolve uma abordagem múltipla, englobando intervenções psicossociais e psicofarmacológicas (AMERICAM ACADEMY PEDIATRICS GUIDELINE, 1997). O tratamento não-farmacológico engloba manejo educacional, avaliação psicossocial e psiquiátrica, acompanhamento paciente-família-ambientes e terapia cognitiva comportamental, que tem sido vista como uma das formas de tratamento mais eficaz (MTA COOPERATIVE GROUP, 2004). No tratamento farmacológico, estimulantes do SNC são os fármacos de primeira linha. A farmacoterapia deve ser orientada levando-se em consideração as comorbidades. O metilfenidato é o estimulante mais usado no Brasil e é a primeira escolha nos casos de TDAH sem comorbidades.

2.2 Metilfenidato

2.2.1 Propriedades Gerais

Por mais de 50 anos, o metilfenidato tem sido usado como um efetivo tratamento para o TDAH, sendo o fármaco de mais freqüente prescrição e reduzindo de maneira considerável os sintomas de desatenção, hiperatividade e impulsividade em até 70% das crianças (GREENHILL et al, 2002). Suas propriedades farmacológicas têm sido bem caracterizadas, mas seu mecanismo de ação não está completamente estudado (SOLANTO, 1998).

O metilfenidato é um derivado da piperidina e está relacionado estruturalmente à anfetamina. 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 metilfenidato 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 E GILMAN, 2006).

O principal mecanismo de ação deste fármaco está relacionado com o aumento de dopamina na fenda sináptica, liberada em resposta a um estímulo evidente. Ele o faz principalmente pela ligação com os transportadores de dopamina (DAT), bloqueando-os (CASTELANOS et al, 1996; VOLKOW et al, 1994). Além disso, bloqueia também transportadores de noradrenalina (DOUGHERTY et al. 1999). A disfunção nos sistemas dopaminérgicos e noradrenérgicos tem uma função de auto-regulação como atenção seletiva (neurônios noradrenérgicos) e 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 e SEGEL, 1997), serotonina (GAINETDINOV et al, 1999) e glutamato (GAINETDINOV, 2001).

2.2.2 Farmacocinética

A farmacocinética específica do metilfenidato reside principalmente no enantiômero *D* (DING et al 1997; PATRICK et al, 1987). No cérebro humano, o *D*-metilfenidato liga-se aos DAT enquanto o enantiômero *L*-metilfenidato não (DING et al, 1997). A distribuição do *D*-metilfenidato em cérebros de babuínos e humanos é maior nos gânglios da base, enquanto o enantiômero *L*-metilfenidato se distribui de forma homogênea em todo cérebro. Ambos enantiômeros têm taxas similares de captação, com pico de concentração alcançado dentro de 10 minutos após a administração. No entanto, a taxa de depuração do enantiômero *D* é significativamente mais lenta do que do *L*. Segundo Volkow et al (2005), a farmacocinética do metilfenidato no cérebro humano é investigada através do uso de PET e carbono-11 ($[^{11}\text{C}]$ metilfenidato) (VOLKOW et al, 1995). Quando administrado de forma intravenosa a captação de $[^{11}\text{C}]$ metilfenidato pelo cérebro humano foi alta ($7,5\% \pm 1,5\%$) e rápida, com o pico alcançado em 4 a 10 minutos. A distribuição do metilfenidato administrado por via oral foi significativamente mais lenta do que por via intravenosa (VOLKOW et al, 1995). Após a administração oral, o fármaco atinge seu pico de concentração cerebral entre 60 a 90 minutos, bloqueando mais de 50% dos DAT, fazendo com que aumente significativamente o nível de dopamina extracelular nos gânglios basais, em especial no estriado.

Estudos de imagem em cérebros humanos têm demonstrado que o bloqueio dos DAT pelo metilfenidato é dose-dependente (VOLKOW et al, 1998). A dose terapêutica é de 5 mg/kg e a dose máxima é de 60 mg/dia. Seu pico de ação é de 2 horas e o tempo de meia-vida, de 1 a 3 horas. O principal metabólito urinário é um produto desesterificado, o ácido ritalínico (GOODMAN e GILMAN, 2006). O

metilfenidato tem sido considerado um fraco estimulante do SNC devido ao seu rápido metabolismo em ácido ritalínico, nas doses orais recomendadas. Seu metabólito tem pouca afinidade pelos DAT, indicando que o metilfenidato, na dose terapêutica, bloqueia um grande percentual de DAT (VOLKOW et al, 1998).

2.2.3 Farmacodinâmica

O tratamento com metilfenidato leva a uma amplificação do sinal dopaminérgico pelo bloqueio dos DAT, visto que a dopamina diminui no neurônio estriatal após sua liberação enquanto o sinal córticoestriatal se fortalece nas células do estriado. Esta amplificação aumenta o sinal seletivo nos neurônios alvo (KIYATKIN e REBEC, 1996). Dessa forma, uma conclusão que se chega é que em indivíduos com TDAH, o tratamento com metilfenidato induz um aumento na amplificação do sinal dopaminérgico estriatal, que poderia levar à melhora da atenção e diminuição da distração. Adicionalmente, a dopamina é um neurotransmissor que salienta o sinal do estímulo e dirige a motivação da performance na direção da meta do comportamento (BERRIDGE e ROBINSON, 1998; HOLLERMAN e SCHULTZ 1998; KOOB, 1996). Desse modo, poderia se especular que a melhora do sinal dopaminérgico induzida pelo metilfenidato causa um aumento na percepção do estímulo para realização e motivação do indivíduo para engajar-se em tarefas com melhora da atenção e performance.

Volkow et al (2005) relataram que o efeito do metilfenidato 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 e 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 distribuição de dopamina no cérebro é mais restrita do que a noradrenalina, encontra-se em quantidades mais abundantes no corpo estriado, uma parte do sistema motor extrapiramidal relacionada coordenação do movimento (BERRIDGE, 1998). Também é encontrada em algumas regiões do sistema límbico e hipotálamo, é sintetizada a partir da tirosina pela β -hidroxilase em neurônios dopaminérgicos. Após sua liberação na fenda sináptica é, em grande parte, recaptada por transportadores específicos (DAT) pertencente aos transportadores de monoaminas. Sua metabolização se faz pelas enzimas monoamina oxidase (MAO) e catecolamina O-metiltransferase (DING, 1997). Seus principais produtos são o ácido diidroxifenilacético e o ácido homovanílico. São excretados na urina.

Os neurônios dopaminérgicos formam três vias principais (vias dopaminérgicas no sistema nervoso central) (RANG e DALE, 2003).

- a. A via nigroestriatal, responsável por cerca de 75% da dopamina no cérebro, consiste em corpos celulares situados na substância negra cujos axônios terminam no corpo estriado. Esta via está relacionada com a atividade motora e da atenção (junto com a via noradrenérgica);
- b. Via mesolímbica/mesocortical, onde os corpos celulares dessas vias projetam-se do mesencéfalo, através do feixe pós-encefálico medial,

para partes do sistema límbico, particularmente *nucleus accumbens* e o núcleo amigdalóide, bem como para o córtex frontal;

- c. Sistema túbero-hipofisário, com nerônios que se projetam do hipotálamo ventral para a eminência mediana e hipófise.

Os receptores dopaminérgicos são em grande número e distribuem-se amplamente no cérebro, estão mais concentrados no estriado, sistema límbico, córtex frontal, hipotálamo e adenohipófise. Estão agrupados em duas famílias, D₁ e D₂, relacionados respectivamente com ativação e inibição da adenilatociclase (KIYATKIN, 1996). A família de receptores D₁ inclui D₁ e D₅ e a família D₂ inclui D₂, D₃ e D₄. Todos os receptores são pertencentes à família dos receptores transmembranas acoplados à proteína G. Os receptores D₁ são mais abundantes em regiões dopaminérgicas, como o estriado, sistema límbico, tálamo e hipotálamo (VOLKOW, 1994). Os receptores D₃ são encontrados no sistema límbico, mas não no estriado. Os receptores D₄ são fracamente expressos, principalmente no córtex e no sistema límbico, porém são de grande interesse pelo possível envolvimento com a esquizofrenia, dependência de drogas e com o TDAH. A dopamina atua tanto em nível pré quanto pós-sináptico. Os receptores D₃ pré-sinápticos são encontrados no estriado e sistema límbico, onde atuam ao inibir a síntese e liberação de dopamina. Portanto, quando os antagonistas agem nesses receptores, aumentam a síntese e a liberação da dopamina, provocando seu acúmulo e de seus metabólitos em certas regiões do cérebro, levando ao aumento na taxa de descarga de neurônios dopaminérgicos. Em 1968, Ungerstedt (DALE et. Al. 547, 2003) demonstrou que a ablação bilateral da substância negra em ratos, destruindo os neurônios nigro-estriatais, provoca catalepsia profunda, tornando os animais inativos a ponto de morrerem de inanição a menos que sejam alimentados artificialmente. Os efeitos

adversos mais comuns do metilfenidato incluem dor abdominal, insônia, anorexia, perda de apetite (EFRON et al, 1997; GOLINKO, 1984) e déficit de crescimento.

Pouco se conhece ainda sobre os mecanismos que contribuem para a eficácia dos estimulantes ou sobre a possível consequência neuroadaptacional do metilfenidato sobre seus efeitos à longo prazo, de uso crônico, principalmente em crianças, e seus efeitos sobre a neuroquímica (GREENHILL, 2001; NATIONAL INSTITUTES STATEMENT, 2000; SAFER e ALLEN, 1989).

A ação dos estimulantes sobre o córtex pré-frontal está implicada no desenvolvimento da sensibilização locomotora e mudanças comportamentais. Além disso, acredita-se que está associada a certos aspectos das drogas de abuso (VANDERSCHUREM e KALINAS, 2000). Dado a esse fato existe grande interesse em se conhecer se há efeitos adversos decorrentes do uso prolongado de estimulantes na aprendizagem e no comportamento (COYLE, 2000), visto que, na criança, o SNC está em contínuo desenvolvimento e amadurecimento (BENES, 1998).

Estudos recentes com animais têm sido realizados para tentar esclarecer questões relacionadas ao uso agudo e crônico do metilfenidato (CARBONE e SILVAGANI, 2004). Alguns estudos mostram que esse fármaco altera de forma significativa a expressão de genes imediatos, como o *c-fos* (CHASE et al, 2003; BRANDON e STEINER, 2003). A administração aguda aumentou de forma significativa a expressão desses genes, enquanto que a administração crônica causou efeito inverso. Além disso, as alterações verificadas em ratos jovens persistiram na fase adulta (CHASE et al, 2003; BRANDON e STEINER, 2003). Estudo recente (CHASE et al, 2005) confirmou os efeitos do metilfenidato no estriado de ratos jovens e adultos e sua ação nos genes imediatos *c-fos* e *fos-B*.

Segundo os autores, a repetida administração do metilfenidato regula de forma diferente o *c-fos* e *fos-B* nessa estrutura cerebral, induz mudanças duradouras na expressão gênica. Além disso, o cérebro imaturo responde de maneira diferente a ação do metilfenidato quando comparada ao cérebro adulto. Em outro estudo, o efeito do metilfenidato sobre as vias de sinalização do córtex pré-frontal em ratos, a proteína quinase A (PKA) e a quinase regulada por sinais extracelulares (ERK) foi investigado. Observou-se que a administração de metilfenidato ativa a PKA no córtex pré-frontal *in vivo*, mas a ativação da ERK pelo metilfenidato não foi observada (PASCOLI et al, 2005).

O metilfenidato tem mecanismo de ação similar às anfetaminas, fármacos estimulantes do SNC, atuando predominantemente na liberação de dopamina nos terminais dopaminérgicos pré-sinápticos. Pouco se conhece sobre as alterações neuroquímicas induzidas por este fármaco e as alterações nas vias de sinalização celular ou na expressão dos genes imediatos. É de crucial importância que se venha a conhecer estes dados visto que este fármaco é largamente utilizado na infância, período do diagnóstico do TDAH, onde o indivíduo está em pleno desenvolvimento neurobiológico e psicológico.

2.3 Metabolismo Energético Cerebral

As vias bioquímicas metabólicas cerebrais não são diferentes dos demais tecidos e órgãos do ser humano. A estratégia básica do catabolismo é obter energia na forma de ATP (Trifosfato de Adenosina), poder redutor e elementos de construção para as biossínteses (STRYER, 2002). Sob condições normais, os

substratos para o metabolismo cerebral são a glicose e o O_2 e seus produtos finais são dióxido de carbono e água (SOKOLOFF, 1977). Em contraste com a maioria dos outros tecidos, os quais exibem consideráveis flexibilidades para extração e consumo de nutrientes da circulação sanguínea, o cérebro normal é restrito quase que exclusivamente à glicose. Isto se deve em grande parte à membrana hematoencefálica, extremamente seletiva quanto a sua permeabilidade (CLARK et al, 1993).

O cérebro é um órgão de intensa atividade metabólica e muito pobre em substratos, com pouca reserva energética. Por isso, necessita de contínua oferta de substratos. A glicose é, virtualmente, o único alimento para o cérebro humano, exceto no jejum prolongado. Esta, diferentemente dos demais tecidos, não necessita de insulina para ser captada e oxidada (DICKINSON, 1996). O cérebro consome cerca de 120 g de glicose diariamente, o que corresponde a uma captação de energia de aproximadamente 420 kcal, correspondendo a 60% da utilização de glicose por todo o organismo em estado de repouso. O padrão de utilização deste nutriente varia conforme a etapa do desenvolvimento do SNC do indivíduo, seu estado nutricional e o destino de sua cadeia de átomos de carbono (MARKS et al, 2005).

A glicose captada pelo cérebro não está atrelada somente à obtenção de energia, mas é também fonte para a biossíntese de diversos constituintes do cérebro, como os neurotransmissores (SOKOLOFF, 1982). Pequenas quantidades de O_2 são usadas para oxidação de substâncias que não a glicose, como na síntese e degradação de monoaminas. A quantidade de O_2 utilizada para esses processos é extremamente pequena e indetectável em face do grande consumo para a oxidação dos carboidratos. Situações de jejum prolongado fazem com que o SNC passe a

utilizar corpos cetônicos para a obtenção de energia, para que o organismo seja poupado de um catabolismo protéico resultante da necessidade de manutenção da glicemia via gliconeogênese (MARKS et al, 2005).

2.4 Metabolismo Intermediário e Cadeia Respiratória

Em 1937, Hans Krebs propôs uma série de reações do metabolismo intermediário de carboidratos. Atualmente, o ciclo proposto por Krebs leva o seu nome (Figura 3). Há aproximadamente meio século, Kennedy e Lehninger descobriram que as mitocôndrias contêm as enzimas do ciclo de Krebs e as enzimas de oxidação dos ácidos graxos, além dos complexos respiratórios. Mitocôndrias são organelas intracelulares, que tem com principal função a produção de ATP pelo metabolismo aeróbico. Além disso, desempenham papel importante e crítico no processo de apoptose celular e servem de tampão de cálcio. Tecidos com intensa atividade metabólica aeróbica, como o cérebro e os músculos esquelético e cardíaco, apresentam altas concentrações dessa organela (ORTH e SCHAPIRA, 2001).

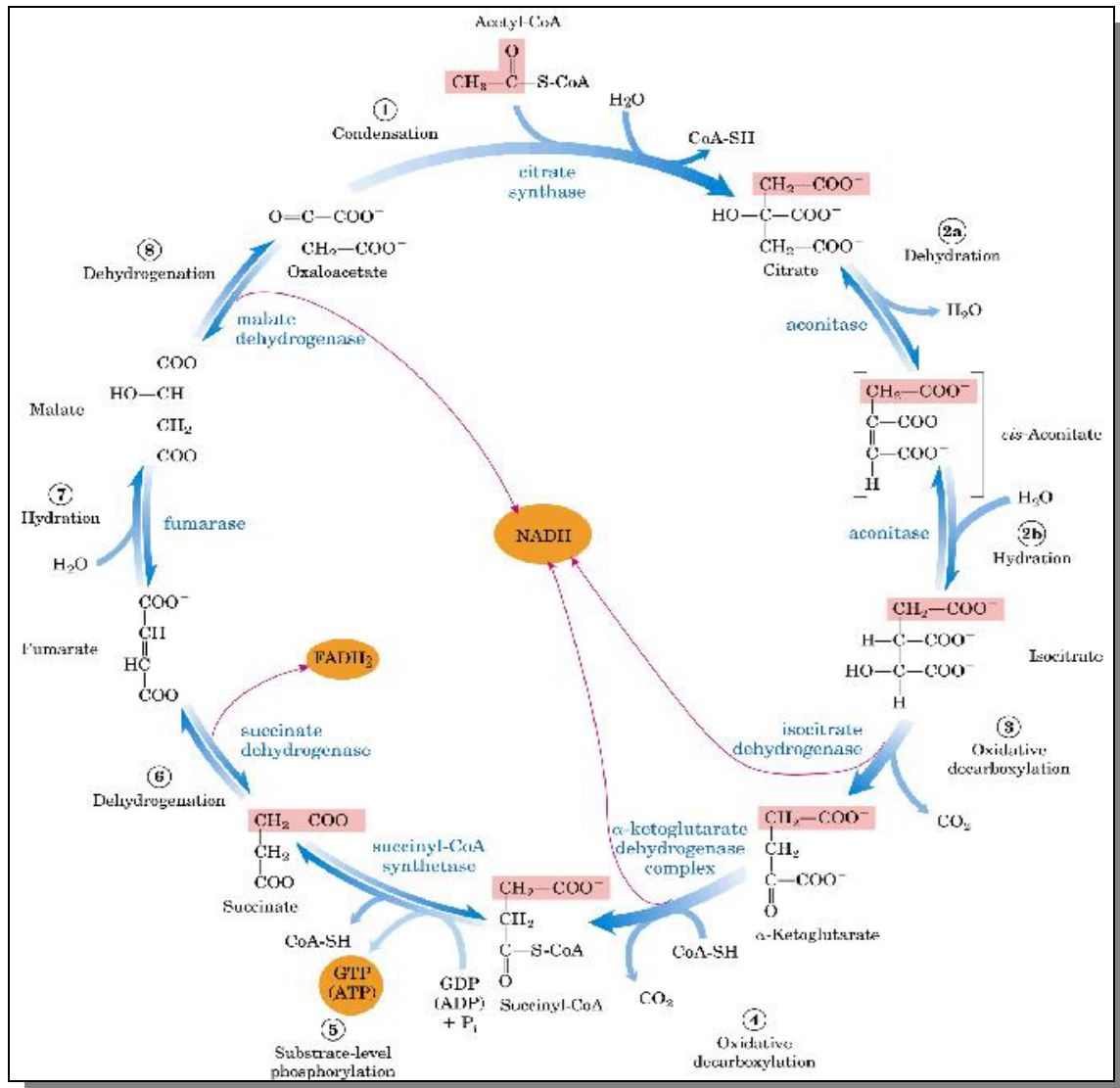


Figura 3 – Ciclo de Krebs
 Fonte: NELSON e COX (2000).

Alguns anos depois, Palade e Sjöstrand, através da microscopia eletrônica, mostraram que a mitocôndria apresenta duas membranas, uma externa e uma interna, muito dobrada. Em 1961, Peter Mitchell propôs a teoria quimiosmótica, sugerindo que o transporte de elétrons e a síntese de ATP estão acoplados a um gradiente de prótons na membrana mitocondrial interna. Mitchell sugeriu que bombas de prótons criariam esse gradiente (de prótons), que seria a força motriz para a síntese de ATP (BERG et al, 2004).

Os seres vivos precisam de energia para realizar várias funções, como, por exemplo, o transporte ativo de íons e moléculas, síntese de macromoléculas e outras biomoléculas a partir de precursores simples e para a contração muscular. A energia necessária para realizar essas funções é proveniente da oxidação de substâncias na respiração celular. O ATP é o principal combustível da célula na maioria dos processos que precisam de energia. A energia é liberada pela hidrólise de ATP e serve para impulsionar uma série de reações (NELSON e COX, 2000).

A glicose é a principal fonte de energia utilizada pela maioria das células e ocupa uma posição central no metabolismo. A glicose é transportada para dentro das células por proteínas transportadoras específicas. Ao entrar na célula, a glicose pode ser metabolizada por diferentes rotas metabólicas. A principal via de degradação da glicose é a glicólise, uma rota que envolve uma seqüência de reações que ocorre no citosol e forma como produto final o piruvato. Uma molécula de glicose gera duas moléculas de piruvato e de ATP. Além disso, a glicose pode participar do ciclo das pentoses, que tem como objetivo formar NADPH, um doador de elétrons de fundamental importância em biossínteses redutoras, e ribose-5-fosfato, precursor na biossíntese de nucleotídeos. Quando a célula está com elevados níveis de ATP, a glicose pode ser armazenada na forma de glicogênio, que pode ser liberado e utilizado rapidamente se a célula necessitar de energia, ou formar triacilglicerol (BERG et al, 2004; CLARK et al, 1993; MARKS et al, 2005; NELSON e COX, 2000). Em organismos superiores, o piruvato, formado na glicólise a partir de glicose, pode seguir duas rotas metabólicas distintas. Quando há baixa quantidade de oxigênio, como no trabalho muscular forçado ou na hipóxia, o piruvato pode ser convertido em lactato pela enzima lactato desidrogenase, formando ATP e consumindo NADH. No entanto, só uma pequena quantidade de

energia da glicose é liberada pela conversão de piruvato a lactato (BERG et al, 2004; MARKS et al, 2005; NELSON e COX, 2000). Em condições aeróbicas, o piruvato é transportado para dentro da mitocôndria e sofre ação do complexo enzimático da piruvato desidrogenase, que forma acetil coenzima A (acetil-CoA). A acetil-CoA inicia o ciclo de Krebs. É importante salientar que a acetil-CoA pode ser formada também pela oxidação de ácidos graxos e aminoácidos (BERG et al, 2004; CLARK et al, 1993; MARKS et al, 2005; NELSON e COX, 2000).

O ciclo de Krebs ocorre na matriz mitocondrial e consiste de uma seqüência de reações onde, em cada volta do ciclo, são formadas três moléculas de NADH, uma de FADH₂, duas de CO₂ e uma de GTP. O NADH e FADH₂ produzidos no ciclo de Krebs são carreadores de elétrons e são utilizados na cadeia respiratória para a produção de ATP na fosforilação oxidativa (MARKS et al, 2005; STRYER, 2005; NELSON e COX, 2000). Altos níveis de ATP inibem o ciclo de Krebs por mecanismos complementares em vários locais do ciclo. Um dos pontos de controle é a conversão de piruvato a acetil-CoA pela enzima piruvato desidrogenase, inibida por ATP, acetil-CoA e NADH (WILLIAMSON e COOPER, 1980).

A fosforilação oxidativa é o processo principal para produção de energia celular, todos os passos oxidativos na degradação de carboidratos, gorduras e aminoácidos convergem a este estágio final da respiração celular em que a energia provida da oxidação pelo fluxo de elétrons através das enzimas da cadeia respiratória mitocondrial promove a síntese de ATP (NELSON e COX, 2004).

A cadeia respiratória e o ciclo de Krebs, ocorrem nas mitocôndrias. A cadeia respiratória é formada por uma série de complexos protéicos, onde ocorre a transferência de elétrons doados por NADH e FADH₂. A transferência de elétrons

pela cadeia respiratória leva ao bombeamento de prótons da matriz para o lado citosólico da membrana mitocondrial interna (Figura 4).

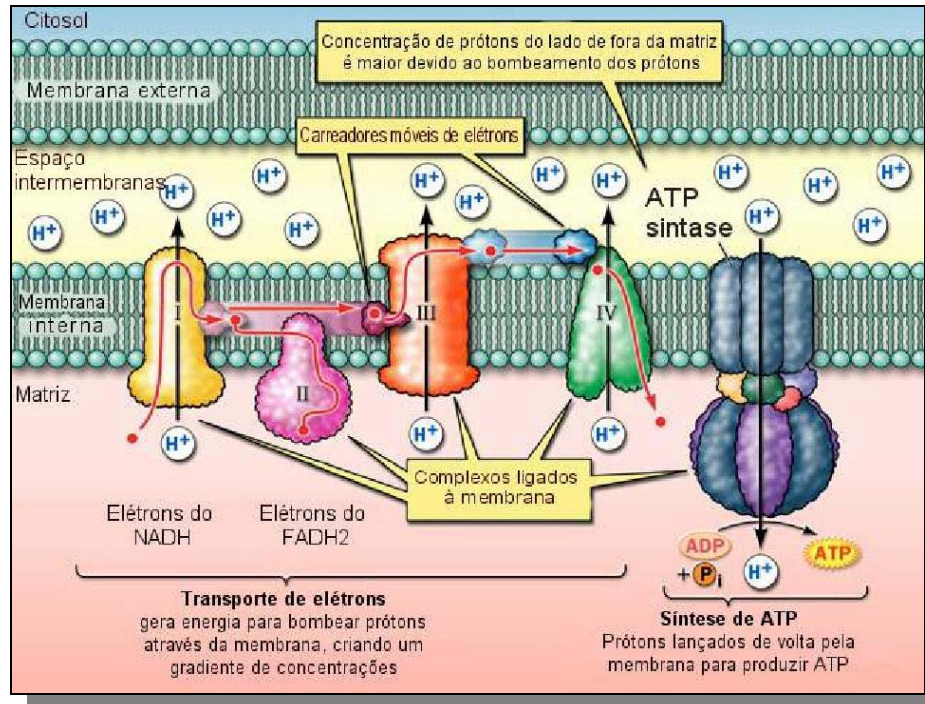


Figura 4 – Cadeia Respiratória Mitocondrial

Fonte: NELSON e COX (2000).

O gradiente de prótons é usado para impulsionar a síntese de ATP (ERECINSKA e DAGANI, 1990; HEALES et al, 1999; WALLACE, 1999; NELSON e COX, 2000). A cadeia respiratória é composta de quatro complexos (I, II, III e IV) e da ATP sintase.

O complexo I, também chamado de NADH: ubiquinona oxirredutase, realiza a transferência de elétrons do NADH para a ubiquinona, formando ubiquinol. Essa reação faz com que dois prótons sejam bombeados para o espaço intermembrana. O complexo II, também denominado de succinato:Q(ubiquinona) oxirredutase, é formado pela succinato desidrogenase (SDH), enzima do ciclo do ácido cítrico que gera FADH₂ na oxidação de succinato a fumarato e três subunidades hidrofóbicas. Esta enzima tem FAD como grupo prostético. Os elétrons

e os prótons do succinato são transferidos para o FAD, que se reduz a FADH₂. O FADH₂, não sai do complexo. Também fazem parte do complexo II alguns centros de Fe-S e o citocromo b₅₆₀. Por esses componentes passam os elétrons derivados do FADH₂ antes de finalmente serem doados para a coenzima Q são transferidos para centros Fe-S e daí para coenzima Q, para entrarem na cadeia transportadora de elétrons. Duas outras enzimas a glicerol fosfato desidrogenase e a acil CoA desidrogenase, transferem do mesmo modo seus elétrons de alto potencial do FADH₂, para coenzima Q, formando ubiquinol (QH₂), o estado reduzido da ubiquinona. O complexo succinato:Q oxireductase e outras enzimas que transferem elétrons do FADH₂ para ubiquinona, ao contrário da NADH:Q oxirredutase, não transportam próton. Em conseqüência, menos ATP é formada na oxidação do FADH₂ do que do NADH (STRYER, 2002). Este complexo não atinge a parte externa da membrana mitocondrial, tem contato apenas com a matriz mitocondrial. Avaliando-se esse complexo enzimático, pode-se ter uma idéia da segunda porta de entrada de elétrons na cadeia transportadora mitocondrial desses e também uma parcela do funcionamento do ciclo do ácido cítrico uma vez que a SDH é a única enzima do ciclo de Krebs presente na membrana mitocondrial e não na matriz, fazendo um elo entre ciclo do ácido cítrico e cadeia de transporte de elétrons. O complexo III, ou citocromo c oxirredutase, transfere elétrons do ubiquinol para o citocromo c, reação que serve para o bombeamento de mais quatro prótons. O complexo IV, mais conhecido como citocromo c oxidase, contém dois citocromos do tipo a (a e a₃) e dois íons de cobre, cada qual associado a um dos dois citocromos. Os íons de cobre, alternando entre os estados de oxidação Cu²⁺ e Cu¹⁺, fazem parte do transporte dos eléteons. O complexo IV é responsável pela doação de quatro elétrons para a molécula de oxigênio (O₂) que, liga-se a prótons do meio e converte-

se em água (MARKS, 2000). A retidada de prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembrana contribui para o restabelecimento do gradiente de prótons.

Nessa etapa os últimos dois prótons são bombeados (BERG et al, 2004; VOET e VOET, 1995; WALLACE, 1999). O gradiente eletroquímico formado pelo bombeamento de prótons durante a cadeia respiratória mitocondrial é utilizado como força motriz para a ATPsintase, formar ATP (fosforilação oxidativa). O ATP é transportado para fora da mitocôndria com o concomitante transporte de ADP para dentro da mitocôndria, através de um sistema antiporte (BERG et al, 2004; HEALES et al, 1999; WALLACE, 1999; NELSON e Cox, 2000; VOET e VOET, 1995). A membrana mitocondrial interna é impermeável a prótons em toda a sua extensão, exceto na ATP sintase; e é por este canal que os prótons atravessam a membrana e retornam a matriz mitocondrial.

As necessidades celulares de ATP variam grandemente segundo o estado fisiológico do tecido ou órgão, o cérebro é um tecido de alta demanda mesmo em repouso. Evidências clínicas indicam que o cérebro é extremamente sensível às variações no metabolismo energético. O cérebro humano constitui somente 2% do peso corporal, entretanto pelos seus altos processos de energia consome aproximadamente 25% do total da glicose corporal. Com raras exceções, a glicose é quase que o substrato obrigatório do metabolismo cerebral. Em alguns tecidos, a glicose pode seguir vários caminhos metabólicos, no cérebro, é quase que totalmente oxidada a CO_2 e H_2O através de uma seqüência de passos pela glicólise, ciclo do ácido cítrico associado a fosforilação oxidativa a qual tem um rendimento de 38 ATP por molécula de glicose. De fato, o consumo de oxigênio pelo cérebro é de 20% do consumo de todo o organismo.

Para promover o ajuste da produção de ATP ao seu gasto, o transporte de elétrons e a síntese de ATP são processos intimamente acoplados, isto é, só existe oxidação de coenzimas se houver síntese de ATP e vice-versa. Os substratos desse processo são as coenzimas reduzidas, oxigênio, ADP e fosfato inorgânico (Pi). Desses, o ADP é o único que atinge concentrações limitantes nas células, sendo por isso o regulador de ambos os processos. Esta regulação da velocidade de oxidação de coenzimas exercida pelo ADP denomina-se de controle respiratório. Que resulta num perfeito ajuste entre a velocidade de produção de coenzimas reduzidas e a velocidade de sua oxidação pela cadeia de transporte de elétrons, com produção de ATP e portanto a produção de energia pela célula.

Deficiências no funcionamento normal da cadeia respiratória mitocondrial levam à diminuição da síntese de ATP (HEALES et al, 1999). Sabe-se também que o dano causado à mitocôndria leva a uma rápida queda na produção de energia e consequente morte celular (ANKARCRONA et al, 1995).

3 JUSTIFICATIVA E PROBLEMA

O TDAH é a síndrome neuro-comportamental mais freqüente da infância (NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 2000). Estima-se que esse transtorno ocorra em 3 a 6% da população (SWANSON et al, 1998). No entanto, estudos epidemiológicos indicam que essa prevalência pode ser de duas a três vezes maior (PAULE et al, 2000). Embora o TDAH seja caracterizado por sintomas de desatenção, hiperatividade e impulsividade, é uma patologia bastante heterogênea, pelo menos do ponto de vista fenotípico, e exige critérios bem distintos para o seu diagnóstico. O metilfenidato (fármaco estimulante do SNC) é amplamente utilizado no tratamento desse transtorno, e o uso desse fármaco aumentou drasticamente nos últimos anos (GREENHILL et al, 2002). O aumento na utilização do metilfenidato levou ao questionamento sobre as conseqüências, a longo prazo, do uso crônico desse fármaco em crianças com TDAH (KUCZENSKI e SEGAL, 2001). As anfetaminas, bem como outros fármacos psicoestimulantes, têm sido associadas a déficits dos sistemas cerebrais dopaminérgicos e noradrenérgicos com exposição a longo prazo (SPINA e COHEN, 1989; LA VOIE e HASTINGS, 1999; PAGE et al, 2001). Outra preocupação em relação ao uso deste fármaco é uma possível supressão no crescimento (KAPLAN et al, 2002). Por essa razão, é importante conhecer e determinar os efeitos do tratamento crônico com metilfenidato durante o período crítico do desenvolvimento da criança. Existem poucos trabalhos que avaliam a possibilidade de efeitos tóxicos do metilfenidato sobre o SNC, sua relação com idade de uso e tempo de exposição (HUSSON et al, 2004). Além disso, os sintomas do TDAH continuam na idade adulta em aproximadamente 60% dos casos, e a terapia com estimulantes do SNC, como o metilfenidato, ainda é o tratamento mais eficiente.

4 HIPÓTESES E PERGUNTAS CIENTÍFICAS

1. A administração aguda e crônica de metilfenidato modifica a atividade enzimática dos complexos II e IV da cadeia respiratória mitocondrial e da succinato desidrogenase em cérebro de ratos jovens?
2. Animais jovens respondem de forma diferente aos tratamentos agudo e crônico com metilfenidato?
3. Existem alterações na atividade dos complexos II e IV da cadeia respiratória mitocondrial e da succinato desidrogenase em diferentes estruturas cerebrais e diferentes doses de metilfenidato?

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo Geral

Considerando (a) o uso continuado e freqüente do metilfenidato no tratamento do TDAH, (b) que o metilfenidato altera a atividade metabólica cerebral (PORRINO e LUCIGNANI, 1987) (c) que alterações no metabolismo energético cerebral podem provocar danos neurológicos graves (HERTZ e PENG, 1992) e (d) que os efeitos do uso crônico e agudo do metilfenidato são pouco conhecidos, este trabalho tem como objetivo geral avaliar os efeitos do metilfenidato sobre os complexos enzimáticos II e IV da cadeia respiratória mitocondrial e succinato desidrogenase em cérebros de ratos jovens.

5.2 Objetivos Específicos

Esse projeto tem como objetivos específicos:

1. Avaliar o efeito da administração crônica de metilfenidato sobre os complexos II e complexo IV da cadeia respiratória mitocondrial e da enzima succinato desidrogenase, nas doses de 1 mg/kg, 2 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg e 20 mg/kg no estriado, hipocampo, córtex pré-frontal, córtex cerebral e cerebelo de ratos jovens.
2. Avaliar o efeito da administração aguda de metilfenidato sobre os complexos II e complexo IV da cadeia respiratória mitocondrial e da enzima succinato desidrogenase, nas doses de 1 mg/kg, 2 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg e 20 mg/kg no estriado, hipocampo, córtex pré-frontal, córtex cerebral e cerebelo de ratos jovens.

PARTE II

6 ARTIGO I

Ana O. Fagundes; Gislaine T. Rezin; Francine Zanette; Eliane Grandi; Lara C. Assis; Felipe Dal-Pizzol; João Quevedo; Emilio Luiz Streck. ***Chronic administration of methylphenidate activates mitochondrial respiratory chain in brain of young rats.***

Aceito para publicação na *International Journal of Developmental Neuroscience*.

Chronic administration of methylphenidate activates mitochondrial respiratory chain in brain of young rats

Ana O. Fagundes¹, Gislaine T. Rezin¹, Francine Zanette¹, Eliane Grandi¹, Lara C. Assis¹, Felipe Dal-Pizzol¹, João Quevedo², Emilio L. Streck¹

¹Laboratório de Fisiopatologia Experimental, Universidade do Extremo Sul Catarinense, 88806-000 Criciúma, SC, Brazil;

²Laboratório de Neurociências, Universidade do Extremo Sul Catarinense, 88806-000 Criciúma, SC, Brazil.

Correspondence: Prof. Emilio L. Streck, Laboratório de Fisiopatologia Experimental, Universidade do Extremo Sul Catarinense, 88806-000, Criciúma, SC, Brazil. Fax: #55 48 3341 2644. E-mail: emiliostreck@terra.com.br

ABSTRACT

Methylphenidate is frequently prescribed for the treatment of attention deficit/hyperactivity disorder. Psychostimulants can cause long-lasting neurochemical and behavioral adaptations. The exact mechanisms underlying its therapeutic and adverse effects are still not well understood. In this context, it was previously demonstrated that methylphenidate altered brain metabolic activity, evaluated by glucose consumption. Most cell energy is obtained through oxidative phosphorylation, in the mitochondrial respiratory chain. Tissues with high energy demands, such as the brain, contain a large number of mitochondria. In this work, our aim was to measure the activities of mitochondrial respiratory chain complexes II and IV and succinate dehydrogenase in cerebellum, prefrontal cortex, hippocampus, striatum, and cerebral cortex of young rats (starting on 25th post-natal day and finishing on 53rd post-natal day) chronically treated with methylphenidate. Our results showed that mitochondrial respiratory chain enzymes activities were increased by chronic administration of this drug. Succinate dehydrogenase was activated in cerebellum, prefrontal cortex and striatum, but did not change in hippocampus and brain cortex. Complex II activity was increased in cerebellum and prefrontal cortex and was not affected in hippocampus, striatum and brain cortex. Finally, complex IV activity was increased in cerebellum, hippocampus, striatum and brain cortex, and was not affected in prefrontal cortex. These findings suggest that chronic exposure to methylphenidate in young rats increases mitochondrial enzymes involved in brain metabolism. Further research is being carried out in order to better understand the effects of this drug on developing nervous system and the potential consequences in adulthood resulting from early-life drug exposure.

Key words: methylphenidate, succinate dehydrogenase, complex II, complex IV, mitochondrial respiratory chain, brain.

1. Introduction

The use of amphetamine-like stimulants, particularly methylphenidate, are considered as the best available pharmacotherapy in the treatment of children with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) (Safer and Allen, 1989; Garland, 1998; Wigal et al., 1999; Biederman et al., 2000; Challman and Lipsky, 2000). ADHD is a worldwide and highly prevalent disorder, estimated to affect 5–10% of children (Faraone et al., 2003) and 4% of adults, characterized by inattention, impulsivity and hyperactivity. The symptoms often persist into young adulthood, and long-term consequences include lower educational and occupational achievement and increased risk for developing other psychiatric disorders (Mannuzza et al., 1997, 1998).

Methylphenidate blocks the dopamine transporters, and this indirect dopamine agonist effect may be critical for its therapeutic effects (Volkow et al., 1998; Greenhill, 2001). However, the mechanisms underlying the stimulant therapeutic efficacy or possible enduring neuroadaptational consequences of methylphenidate long-term drug exposure are poorly understood.

The effects of chronic and repeated exposure to low doses of stimulants in animals (Robinson and Becker, 1986; Segal and Kuczenski, 1994; Van der Schuren and Kalivas, 2000) and humans (Sax and Strakowski, 1998; Strakowski and Sax, 1998; Strakowski et al., 2001) have raised the possibility of subsequent drug abuse as one consequence of long-term adolescent stimulant treatment (Schenk and Davidson, 1998; Laviola et al., 1999; Brandon et al., 2001).

Preclinical studies also raise the possibility that repeated exposure to stimulant drugs causes enduring neuroadaptations that contribute to other

neuropsychiatric disorders (Robinson and Berridge, 2000). Repeated exposure to stimulant drugs has also been linked to the development of psychomimetic-like effects in rats (Robinson and Becker, 1986). Once established, these behavioral adaptations can endure for remarkably long periods without drug treatment, suggesting that they may be caused by stable and long-lasting molecular adaptations (Carlezon and Nestler, 2002; Nestler, 2001; Van der Schuren and Kalivas, 2000).

Like many other drugs with stimulant properties (including cocaine, amphetamine, morphine, and nicotine), methylphenidate increases extracellular concentrations of dopamine within key portions of rat brain reward circuits, including the nucleus accumbens and related regions (Kuczenski and Segal, 1997, 2001, 2002; Volkow et al., 2001).

Most cell energy is obtained through oxidative phosphorylation, a process requiring the action of various respiratory enzyme complexes located in a special structure of the inner mitochondrial membrane, the mitochondrial respiratory chain. Tissues with high energy demands, such as the brain, contain a large number of mitochondria, being therefore more susceptible to reduction of the aerobic energy metabolism. It is well described that impairment of energy production caused by mitochondrial dysfunction has been implicated in the pathogenesis of a number of diseases, including neurological conditions such as dementia, cerebral ischemia, Alzheimer's disease and Parkinson's disease (Brennan et al., 1985; Beal, 1992; Heales et al. 1999; Blass, 2001; Schurr, 2002). Porrino and Lucignani (1987) measured rates of local cerebral glucose utilization following acute administration of methylphenidate in doses ranging from 1.25 to 15.0 mg/kg. This study showed that significant dose-dependent alterations in metabolic activity were found in the components of extra-pyramidal system, nucleus accumbens and olfactory tubercle.

Therefore, considering that mechanisms underlying methylphenidate therapeutic and side effects are still poorly known, in the present work we evaluated the activities of mitochondrial respiratory chain complexes II and IV and succinate dehydrogenase from young rat brain after chronic administration of methylphenidate.

2. Experimental procedure

2.1. Animals: Adult and male Wistar rats (250-300 g) were obtained from Central Animal House of Universidade do Extremo Sul Catarinense. They were caged in group of 5 with free access to food and water and were maintained on a 12-h light-dark cycle (lights on 7:00 am), at a temperature of $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. The experiments were performed between 2 p.m. and 5 p.m.

2.2. Methylphenidate administration: Methylphenidate HCl (1, 2, 5, 10 or 20 mg/kg, intraperitoneal) or saline injections were given to young rats starting on 25th post-natal day, once daily for 28 days (last injections on 53rd post-natal day) (Chase et al., 2003). Two hours after the last injection, the subjects were sacrificed by decapitation and the cerebellum, prefrontal cortex (prefrontal), hippocampus, striatum and cerebral cortex (cortex) were immediately dissected out and stored for posterior biochemical analyses (n=6 animals per group). This study was performed in accordance with National Institutes of Health guidelines and with the approval of Ethics Committee from Universidade do Extremo Sul Catarinense.

2.3. Tissue and homogenate preparation: Cerebellum, prefrontal cortex, hippocampus, striatum and cerebral cortex were homogenized (1:10, w/v) in SETH buffer, pH 7.4 (250 mM sucrose, 2 mM EDTA, 10 mM Trizma base, 50 IU/ml heparin). The homogenates were centrifuged at 800 x g for 10 min and the supernatants kept at -70°C until used for enzyme activity determination. The maximal period between homogenate preparation and enzyme analysis was always less than 5 days. Protein content was determined by the method described by Lowry and colleagues (1951) using bovine serum albumin as standard.

2.4. Respiratory chain enzyme activities: The activities of the respiratory chain enzyme complexes succinate: DCIP oxireductase (complex II) and succinate: phenazine oxireductase (soluble succinate dehydrogenase (SDH)) were determined according to the methods of Fischer and colleagues (1985). Complex II (succinate: DCIP oxireductase) activity was measured by following the decrease in absorbance due to the reduction of 2,6-DCIP) at 600 nm with 700 nm as reference wavelength ($\epsilon = 19.1 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$). The reaction mixture consisting of 40 mM potassium phosphate, pH 7.4, 16 mM succinate and 8 μM DCIP was preincubated with 40–80 μg homogenate protein at 30°C for 20 min. Subsequently, 4 mM sodium azide and 7 μM rotenone were added and the reaction was initiated by addition of 40 μM DCIP and was monitored for 5 min. The activity of succinate: phenazine oxireductase (soluble SDH) was measured following the decrease in absorbance due to the reduction of 2,6-DCIP at 600 nm with 700 nm as reference wavelength ($\epsilon = 19.1 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) in the presence of phenazine methasulphate (PMS). The reaction mixture consisting of 40 mM potassium phosphate, pH 7.4, 16 mM succinate and 8 μM DCIP was preincubated with 40–80 μg homogenate protein at 30°C for 20 min.

Subsequently, 4 mM sodium azide, 7 μ M rotenone and 40 μ M DCIP were added and the reaction was initiated by addition of 1 mM PMS and was monitored for 5 min. The activity of cytochrome *c* oxidase (complex IV) was measured by the method of Rustin and colleagues (1994). Complex IV activity was measured by following the decrease in absorbance due to the oxidation of previously reduced cytochrome *c* at 550 nm with 580 nm as reference wavelength ($\epsilon = 19.1 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$). The reaction buffer contained 10 mM potassium phosphate, pH 7.0, 0.6 mM *n*-dodecyl-d-maltoside, 2–4 μ g homogenate protein and the reaction was initiated with addition of 0.7 μ g reduced cytochrome *c*. The activity of complex IV was measured at 25°C for 10 min.

2.5. Statistical analysis: Data were analyzed by one-way analysis of variance followed by the Tukey test when F was significant. All analyses were performed using the Statistical Package for the Social Science (SPSS) software.

3. Results

In the present work, we evaluated the activities of mitochondrial respiratory chain complexes II and IV and succinate dehydrogenase from rat brain after chronic administration of methylphenidate. As seen on Figure 1, succinate dehydrogenase was significantly activated in cerebellum ($F(5,30)=34.13$; $p<0.01$), prefrontal ($F(5,30)=9.00$; $p<0.01$) and striatum ($F(5,30)=17.68$; $p<0.01$), but did not change in hippocampus ($F(5,30)=1.59$; $p=0.19$) and cortex ($F(5,30)=6.80$; $p=0.06$) by chronic administration of methylphenidate. Besides, complex II activity was increased in cerebellum ($F(5,30)=36.38$; $p<0.01$) and prefrontal ($F(5,30)=17.46$; $p<0.01$) and was

not affected by administration chronic exposure in hippocampus ($F(5,30)=1.97$; $p=0.11$), striatum ($F(5,30)=3.15$; $p=0.07$) and ($F(5,30)=3.46$; $p<0.08$) cortex (Figure 2). Finally, complex IV activity was increased in cerebellum ($F(5,30)=12.13$; $p<0.01$), hippocampus ($F(5,30)=20.02$; $p<0.01$), striatum ($F(5,30)=14.64$; $p<0.01$) and cortex ($F(5,30)=6.23$; $p<0.01$). Besides, complex IV was not affected in prefrontal ($F(5,30)=1.87$; $p=0.13$) (Figure 3).

4. Discussion

The precise mechanisms underlying methylphenidate therapeutic and side effects are still not well known. It is well described that methylphenidate blocks dopamine transporters and this indirect dopamine agonist effect may possibly be important for its therapeutic effects. Besides, evidence from literature suggest that methylphenidate and other stimulant drugs have profound and long-lasting neurobiological effects (Volkow et al., 1998; Greenhill, 2001). It is also well known that alterations on brain metabolism are related to various disorders. Energy impairment has been linked to neuronal death and neurodegeneration (Brennan et al., 1985; Beal, 1992; Heales et al. 1999; Blass, 2001; Schurr, 2002). In this context, Porrino and Lucignani (1987) showed that reductions of local cerebral glucose utilization following chronic methylphenidate administration occurs. Volkow and colleagues (2005) showed that the distribution of methylphenidate in brain is heterogeneous, and the maximum concentration occurs in the striatum, cortex, and cerebellum. Prefrontal cortex is also one target of methylphenidate therapy (Marsteller et al., 2002; Schweitzer et al., 2004).

There are a few works evaluating the possible neurotoxic effect of methylphenidate in the central nervous system and its relationship with the age and time of exposure to the drug (Husson et al., 2004). Several researches have been focused on methylphenidate effects in the central nervous system during childhood and adolescence exposure despite to alterations in the dopaminergic circuits function (Brandon and Steiner, 2003; Federici et al., 2005; Mague et al., 2005), gene expression (Penner et al., 2002; Chase et al., 2003; Brandon and Steiner, 2003) and others molecular changes related to neuronal metabolism (Fukui et al., 2003).

In this work, we demonstrated, for the first time, that mitochondrial respiratory chain enzymes are activated in brain of young rats after chronic exposure to methylphenidate. Particularly, we showed that complexes II and IV and succinate dehydrogenase activities were increased in cerebellum of young rats submitted to chronic administration of methylphenidate. The cerebellum is typically involved in motor control. Besides, clinical and research findings have also shown cerebellar involvement in a number of cognitive and affective processes. In this context, reviews of neuroimaging data indicate that the cerebellum is active in a number of cognitive tasks independent of motor control (Desmond and Fiez, 1998). Middleton and Strick (2001) have also demonstrated cerebellar–cortical connections that provide an anatomic substrate for a cerebellar–prefrontal circuit in the pathophysiology of ADHD.

Prefrontal lesions are associated with social disinhibition, impulse dyscontrol, organizational, planning, working memory, attentional dysfunctions, dysfluency and slowing of spontaneous behaviors (Lou, 1996). In this context, we also demonstrated that complex II and succinate dehydrogenase activities were increased, but not complex IV in prefrontal cortex.

Succinate dehydrogenase and complex IV were activated in striatum and complex II was not affected. Striatum damage is plausibly associated with the etiology of ADHD (Lou, 1996). Experimental striatal lesions in animals produce hyperactivity and poor performance on working memory and response inhibition tasks (Alexander et al., 1986). The striatum also is one of the richest sources of dopaminergic synapses (Dougherty et al., 1999) and dopamine is important in the regulation of striatal functions. Drugs commonly used to treat ADHD have effects on striatum (Volkow et al., 2002). Succinate dehydrogenase and complex II were not affected in hippocampus, while complex IV activity was increased. Finally, complex IV was also activated in cerebral cortex of rats, but complex II and succinate dehydrogenase were not altered.

The amphetamine family of psychostimulants has been associated to long-term deficits in dopaminergic and serotonergic systems in the brain. This probably results from dopamine- and glutamate-generated reactive oxygen species (Spina and Cohen, 1989; LaVoie and Hastings, 1999; Page et al., 2001) that inhibit mitochondrial function to further increase reactive oxygen species (Schinder et al., 1996; Prehn, 1998; Berman and Hastings, 1999) and decrease ATP production (Chan et al., 1994; Virmani et al., 2002). In contrast, in this work we demonstrated that chronic administration of methylphenidate increased mitochondrial respiratory chain enzymes in brain of young rats. We speculate that methylphenidate may enhance ATP production by activating mitochondrial respiratory chain, possibly for neurotransmitters reuptake and ionic gradient re-establishment. Consequently, more oxygen is consumed and reactive oxygen species are produced. Martins and colleagues (2006) showed that chronic methylphenidate treatment induced oxidative stress in young rat brain.

Further studies are being carried out in our laboratory in order to elucidate the activation of respiratory chain enzymes activities caused by chronic administration of methylphenidate. The activities of other important metabolic enzymes, such the Krebs cycle ones must also be evaluated. The precise long-lasting effects of methylphenidate use remain unknown. Our findings demonstrated, for the first time, that after chronic administration of this drug, mitochondrial respiratory chain enzymes activities were increased in some brain regions of young rats.

Acknowledgements

This work was supported by grants from Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq) and Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC).

References

- Alexander, G.E., DeLong, M.R., Strick, P.L., 1986. Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex. *Annu. Rev. Neurosci.* 9, 357-381.
- Beal, M.F., 1992. Does impairment of energy metabolism result in excitotoxic neuronal death in neurological illnesses? *Ann. Neurol.* 31, 119-130.
- Berman, S.B., Hastings, T.G., 1999. Dopamine oxidation alters mitochondrial respiration and induces permeability transition in brain mitochondria: implications for Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 73, 1127-1137.

- Biederman, J., Mick, E., Faraone, S.V., 2000. Age-dependent decline of symptoms of attention deficit hyperactivity disorder: impact of remission definition and symptom type. *Am. J. Psychiatry* 157, 816-818.
- Blass, J.P., 2001. Brain metabolism and brain disease: is metabolic deficiency the proximate cause of Alzheimer dementia? *J. Neurosci. Res.* 66, 851-856.
- Brandon, C.L., Marinelli, M., Baker, L.K., White, F.J., 2001. Enhanced reactivity and vulnerability to cocaine following methylphenidate treatment in adolescent rats. *Neuropsychopharmacology* 25, 651-661.
- Brandon, C.L., Steiner, H., 2003. Repeated methylphenidate treatment in adolescent rats alters gene regulation in the striatum. *Eur. J. Neurosci.* 18, 1584–1592.
- Brennan, W.A., Bird, E.D., Aprille, J.R., 1985. Regional mitochondrial respiratory activity in Huntington's disease brain. *J. Neurochem.* 44, 1948-1950.
- Carlezon Jr., W.A., Nestler, E.J., 2002. Elevated levels of GluR1 in the midbrain: a trigger for sensitization to drugs of abuse? *Trends Neurosci.* 25, 610-615.
- Challman, T.D., Lipsky, J.J., 2000. Methylphenidate: its pharmacology and uses. *Mayo Clin. Proc.* 75, 711-721.
- Chan, P., Di Monte, D.A., Luo, J.J., DeLanney, L.E., Irwin, I., Langston, J.W., 1994. Rapid ATP loss caused by methamphetamine in the mouse striatum: relationship between energy impairment and dopaminergic neurotoxicity. *J. Neurochem.* 62, 2484–2487.
- Chase, T.D., Brown, R.E., Carrey, N., Wilkinson, M., 2003. Daily methylphenidate administration attenuates c-fos expression in the striatum of prepubertal rats. *NeuroReport* 14, 769-772.
- Desmond, J.E., Fiez, J.A., 1998. Neuroimaging studies of the cerebellum: language, learning, and memory. *Trends Cogn. Sci.* 2, 355–362.

- Dougherty, D.D., Bonab, A.A., Spencer, T.J., Rauch, S.L., Madras, B.K., Fischman, A.J., 1999. Dopamine transporter density is elevated in patients with ADHD. *Lancet* 354, 2132-2133.
- Faraone, S.V., Sergeant, J., Gillberg, C., Biederman, J., 2003. The worldwide prevalence of ADHD: is it an American condition? *World Psychiatry* 2, 104-113.
- Federici, M., Geracitano, R., Bernardi, G., Mercuri, N.B., 2005. Actions of methylphenidate on dopaminergic neurons of the ventral midbrain. *Biol. Psychiatry* 57, 361–365.
- Fischer, J.C., Ruitenbeek, W., Berden, J.A., Trijbels, J.M., Veerkamp, J.H., Stadhouders, A.M., Sengers, R.C., Janssen, A.J., 1985. Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. *Clin. Chim. Acta* 153, 23-26.
- Fukui, R., Svenningsson, P., Matsuishi, T., Higashi, H., Nairn, A.C., Greengard, P., Nishi, A., 2003. Effect of methylphenidate on dopamine/DARPP signalling in adult, but not young, mice. *J. Neurochem.* 87, 1391–1401.
- Garland, E.J., 1998. Pharmacotherapy of adolescent attention deficit hyperactivity disorder: challenges, choices, caveats. *J. Psychopharmacol.* 12, 385-395.
- Greenhill, L.L., 2001. Clinical effects of stimulant medication in attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD). In: Solanto, M.V., Arnsten, A.F.T., Castellanos, F.X. (Eds.), *Stimulant Drugs and ADHD: Basic and Clinical Neuroscience*. Oxford Univ. Press, New York, pp. 31-71.
- Heales, S.J., Bolaños, J.P., Stewart, V.C., Brookes, P.S., Land, J.M., Clark, J.B., 1999. Nitric oxide, mitochondria and neurological disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1410, 215-228.

- Husson, I., Mesples, B., Medja, F., Leroux, P., Kosofsky, B., Gressens, P., 2004. Methylphenidate and MK-801, an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist: shared biological properties. *Neuroscience* 125, 163-170.
- Kuczenski, R., Segal, D.S., 1997. Effects of methylphenidate on extracellular dopamine, serotonin, and norepinephrine: comparison with amphetamine. *J. Neurochem.* 68, 2032-2037.
- Kuczenski, R., Segal, D.S., 2001. Locomotor effects of acute and repeated threshold doses of amphetamine and methylphenidate: relative roles of dopamine and norepinephrine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 296, 876-883.
- Kuczenski, R., Segal, D.S., 2002. Exposure of adolescent rats to oral methylphenidate: preferential effects on extracellular norepinephrine and absence of sensitization and cross-sensitization to methamphetamine. *J. Neurosci.* 22, 7264-7271.
- Laviola, G., Adriani, W., Livia Terranova, M., Gerra, G., 1999. Psychobiological risk factors for vulnerability to psychostimulants in human adolescents and animal models. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 23, 993-1010.
- LaVoie, M.J., Hastings, T.G., 1999. Dopamine quinone formation and protein modification associated with the striatal neurotoxicity of methamphetamine: evidence against a role for extracellular dopamine. *J. Neurosci.* 19, 1484-1491.
- Lou, H., 1996. Etiology and pathogenesis of attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD); significance of prematurity and perinatal hypoxic-haemodynamic encephalopathy. *Acta Paediatr.* 85, 1266-1271.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-267.

- Mague, S.D., Andersen, S.L., Carlezon Jr., W.A., 2005. Early developmental exposure to methylphenidate reduces cocaine-induced potentiation of brain stimulation reward in rats. *Biol. Psychiatry* 57, 120–125.
- Mannuzza, S., Klein, R.G., Bessle, A., Malloy, P., LaPadula, M., 1998. Adult psychiatric status of hyperactive boys grown up. *Am. J. Psychiatry* 155, 493-498.
- Mannuzza, S., Klein, R.G., Bessler, A., Malloy, P., Hynes, M.E., 1997. Educational and occupational outcome of hyperactive boys grown up. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* 36, 1222-1227.
- Martins, M.R., Reinke, A., Petronilho, F.C., Gomes, K.M., Dal-Pizzol, F., Quevedo, J., 2006. Methylphenidate treatment induces oxidative stress in young rat brain. *Brain Res.* 1078, 189-197.
- Marsteller, D.A., Gerasimov, M.R., Schiffer, W.K., Geiger, J.M., Barnett, C.R., Borg, J.S., et al., 2002. Acute handling stress modulates methylphenidate-induced catecholamine overflow in the medial prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology* 27, 163-170.
- Middleton, F.A., Strick, P.L., 2001. Cerebellar projections to the prefrontal cortex of the primate. *J. Neurosci.* 21, 700-712.
- Nestler, E.J., 2001. Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. *Nat. Rev., Neurosci.* 2, 119-128.
- Page, G., Peeters, M., Najimi, M., Maloteaux, J.M., Hermans, E., 2001. Modulation of the neuronal dopamine transporter activity by
- Penner, M.R., McFadyen, M.P., Pinaud, R., Carrey, N., Robertson, H.A., Brown, R.E., 2002. Age-related distribution of c-fos expression in the striatum of CD-1

- mice after acute methylphenidate administration. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 135, 71–77.
- Porrino, L.J., Lucignani, G., 1987. Different patterns of local brain energy metabolism associated with high and low doses of methylphenidate. Relevance to its action in hyperactive children. *Biol. Psychiatry* 22, 126-138.
- Prehn, J.H., 1998. Mitochondrial transmembrane potential and free radical production in excitotoxic neurodegeneration. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 357, 316-322.
- Robinson, T.E., Becker, J.B., 1986. Enduring changes in brain and behavior produced by chronic amphetamine administration: a review and evaluation of animal models of amphetamine psychosis. *Brain Res. Rev.* 11, 157-198.
- Robinson, T.E., Berridge, K.C., 2000. The psychology and neurobiology of addiction: an incentive-sensitization view. *Addiction* 95, 91-117.
- Rustin, P., Chretien, D., Bourgeron, T., Gerard, B., Rotig, A., Saudubray, J.M., Munnich, A., 1994. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin. Chim. Acta* 228, 35-51.
- Safer, D.J., Allen, R.P., 1989. Absence of tolerance to the behavioral effects of methylphenidate in hyperactive and inattentive children. *J. Pediat.* 115, 1003-1008.
- Sax, K.W., Strakowski, S.M., 1998. Enhanced behavioral response to repeated D-amphetamine and personality traits in humans. *Biol. Psychiatry* 44, 1192-1195.
- Schenk, S., Davidson, E., 1998. Stimulant pre-exposure sensitizes rats and humans to the rewarding effects of cocaine. *NIDA Res. Monogr.* 169, 56-82.

- Schinder, A.F., Olson, E.C., Spitzer, N.C., Montal, M., 1996. Mitochondrial dysfunction is a primary event in glutamate neurotoxicity. *J. Neurosci.* 16, 6125-6133.
- Schurr, A., 2002. Energy metabolism, stress hormones and neural recovery from cerebral ischemia/hypoxia. *Neurochem. Int.* 41, 1-8.
- Schweitzer, J.B., Lee, D.O., Hanford, R.B., Zink, C.F., Ely, T.D., Tagamets, M.A., et al., 2004. Effect of methylphenidate on executive functioning in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder: normalization of behavior but not related brain activity. *Biol. Psychiatry* 56, 597-606.
- Segal, D.S., Kuczenski, R., 1994. Behavioral pharmacology of amphetamine. In: Cho, A.K., Segal, D.S. (Eds.), *Amphetamine and its Analogues: Psychopharmacology, Toxicology and Abuse*. Academic, San Diego, pp. 115-150.
- Spina, M.B., Cohen, G., 1989. Dopamine turnover and glutathione oxidation: implications for Parkinson disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 1398-1400.
- Strakowski, S.M., Sax, K.W., 1998. Progressive behavioral response to repeated D-amphetamine challenge: further evidence for sensitization in humans. *Biol. Psychiatry* 44, 1171-1177.
- Strakowski, S.M., Sax, K.W., Rosenberg, H.L., DeBello, M.P., Adler, C.M., 2001. Human response to repeated low-dose D-amphetamine: evidence for behavioral enhancement and tolerance. *Neuropsychopharmacology* 25, 548-554.
- Van der Schuren, L.J.M.J., Kalivas, P.W., 2000. Alterations in dopaminergic and glutamatergic transmission in the induction and expression of behavioral

sensitization: a critical review of preclinical studies. *Psychopharmacology* 151, 99-120.

Virmani, A., Gaetani, F., Imam, S., Binienda, Z., Ali, S., 2002. The protective role of L-carnitine against neurotoxicity evoked by drug of abuse, methamphetamine, could be related to mitochondrial dysfunction. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 965, 225-232.

Volkow, N.D., Wang, G., Fowler, J.S., Ding, Y., 2005. Imaging the effects of methylphenidate on brain dopamine: new model on its therapeutic actions for attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol. Psychiatry* 57, 1410-1415.

Volkow, N.D., Wang, G., Fowler, J.S., Logan, J., Gerasimov, M., Maynard, L., 2001. Therapeutic doses of oral methylphenidate significantly increases extracellular dopamine in the human brain. *J. Neurosci.* 21, 121.

Volkow, N.D., Wang, G-J., Fowler, J.S., Gatley, S.J., Logan, J., Ding, Y-S., 1998. Dopamine transporter occupancies in the human brain induced by therapeutic doses of oral methylphenidate. *Am. J. Psychiatry* 155, 1325-1331.

Wigal, T., Swanson, J.M., Regino, R., Lerner, M.A., Soliman, I., Steinhoff, K., 1999. Stimulant medications for the treatment of ADHD: efficacy and limitations. *Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev.* 5, 215-224.

Figure 1 – Succinate dehydrogenase activity in the cerebellum, prefrontal cortex, hippocampus, striatum and cerebral cortex of young rats submitted to chronic methylphenidate treatment. Rats were submitted to chronic treatment with methylphenidate (1, 2, 5, 10 or 20 mg/kg) or saline. Two hours after last administration, rats were sacrificed and the brain regions were collected for determination of succinate dehydrogenase activity as described under Experimental procedures. Data are expressed as units per mg protein, for six independent experiments performed in duplicate. Different from control (saline) $*p<0.01$ (Tukey test).

Figure 2 – Complex II activity in the cerebellum, prefrontal cortex, hippocampus, striatum and cerebral cortex of young rats submitted to chronic methylphenidate treatment. Rats were submitted to chronic treatment with methylphenidate (1, 2, 5, 10 or 20 mg/kg) or saline. Two hours after last administration, rats were sacrificed and the brain regions were collected for determination of complex II activity as described under Experimental procedures. Data are expressed as units per mg protein, for six independent experiments performed in duplicate. Different from control (saline) $*p<0.01$ (Tukey test).

Figure 3 – Complex IV activity in the cerebellum, prefrontal cortex, hippocampus, striatum and cerebral cortex of young rats submitted to chronic methylphenidate treatment. Rats were submitted to chronic treatment with methylphenidate (1, 2, 5, 10 or 20 mg/kg) or saline. Two hours after last administration, rats were sacrificed and the brain regions were collected for determination of complex IV activity as described under Experimental procedures.

Data are expressed as units per mg protein, for six independent experiments performed in duplicate. Different from control (saline) * $p < 0.01$ (Tukey test).

7 ARTIGO II

Ana O. Fagundes; Maira R. Aguiar; Claudia P. Aguiar; Eliane Grandi; Samira S. Valvassori; João Quevedo; Emilio L. Streck. ***Effect of acute administration of methylphenidate on brain mitochondrial respiratory chain of young rats.***

Submetido a *Cellular and Molecular Neurobiology*.

**Effect of acute administration of methylphenidate on brain
mitochondrial respiratory chain of young rats**

Ana O. Fagundes¹, Maira R. Aguiar¹, Claudia P. Aguiar¹, Eliane Grandi¹, Samira S.
Valvassori², João Quevedo², Emilio L. Streck¹

*¹Laboratório de Fisiopatologia Experimental, Universidade do Extremo Sul
Catarinense, 88806-000 Criciúma, SC, Brazil;*

*²Laboratório de Neurociências, Universidade do Extremo Sul Catarinense,
88806-000 Criciúma, SC, Brazil.*

Correspondence: Prof. Emilio L. Streck, Laboratório de Fisiopatologia Experimental,
Universidade do Extremo Sul Catarinense, 88806-000, Criciúma, SC, Brazil. Fax:
#55 48 3341 2644. E-mail: emiliostreck@terra.com.br

SUMMARY

Methylphenidate is commonly used for the treatment of attention deficit/hyperactivity disorder. It is believed that this drug can cause long-lasting neurochemical and behavioral adaptations. The exact mechanisms underlying methylphenidate therapeutic and adverse effects are still not well understood, especially when used in childhood and adolescence. We have recently demonstrated that methylphenidate chronic administration activates mitochondrial respiratory chain enzymes in brain of young rats. The objective of this study was to evaluate the activities of mitochondrial respiratory chain complexes II and IV and succinate dehydrogenase in cerebellum, prefrontal cortex, hippocampus, striatum and cerebral cortex of young rats (25 days old) after one single administration of methylphenidate. We showed that acute treatment did not affect the enzymes in cerebellum, prefrontal and cerebral cortex of rats. Complex II and succinate dehydrogenase were not affected in hippocampus and striatum. Besides, complex IV was increased by acute administration of methylphenidate in these brain areas. These findings show that methylphenidate acute exposure increases mitochondrial respiratory chain complex IV, only in hippocampus and striatum of young rats.

KEY WORDS: methylphenidate; mitochondrial respiratory chain; brain.

INTRODUCTION

Oxidative phosphorylation is a process requiring the action of the mitochondrial respiratory chain. The brain contains a large number of mitochondria, being more susceptible to fluctuations in aerobic metabolism. In this context, it is known that mitochondrial dysfunction is implicated in the pathogenesis of a number of diseases (Brennan et al., 1985; Beal, 1992, 2005; Heales et al. 1999; Blass, 2001, 2002; Schurr, 2002; Land et al., 2004; Lin and Beal, 2006).

Methylphenidate is currently used in the treatment of children with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) (Safer and Allen, 1989; Garland, 1998; Wigal et al., 1999; Biederman et al., 2000; Challman and Lipsky, 2000; Volkow et al., 2002). This disorder is highly prevalent, affecting around 5–10% of children and 4% of adults (Faraone et al., 2003). ADHD is characterized by inattention, impulsivity and hyperactivity. The long-term consequences include lower educational and occupational achievement and increased risk for developing other psychiatric disorders (Mannuzza et al., 1997, 1998). The mechanisms underlying the therapeutic effects of methylphenidate are not fully known. However, it is well described that this drug blocks the dopamine transporters, and that this effect is probably critical for its therapeutic effects (Volkow et al., 1998, 2002, 2005).

There are few works regarding the effects of methylphenidate on brain metabolism. In 1997, Porrino and Lucignani showed significant dose-dependent alterations in metabolic activity in the components of the extra-pyramidal system, nucleus accumbens and olfactory tubercle, evaluated by rates of local cerebral glucose utilization following acute administration of methylphenidate in doses ranging from 1.25 to 15.0 mg/kg. In a recent work from our laboratory, we demonstrated that

chronic administration of methylphenidate increased mitochondrial enzymes involved in brain metabolism in young rats (Fagundes et al., 2007). In this study we aimed to measure the activities of mitochondrial respiratory chain complexes II and IV and succinate dehydrogenase from young rat brain after acute administration of methylphenidate.

METHODS

2.1. Animals: Young male Wistar rats (25 days old) were obtained from Central Animal House of UNESC. They were caged in groups of 5 with free access to food and water and were maintained on a 12-h light-dark cycle (lights on 7:00 am), at a temperature of $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

2.2. Methylphenidate administration: Methylphenidate HCl (1, 2, 5, 10 or 20 mg/kg, intraperitoneal) or saline injections were given to young rats (Chase et al., 2003). Two hours after the injection, the animals were sacrificed by decapitation and the cerebellum, prefrontal cortex (prefrontal), hippocampus, striatum and cerebral cortex (cortex) were immediately dissected out and stored for posterior biochemical analyses (n=6 animals per group). This study was performed in accordance with National Institutes of Health guidelines and with the approval of Ethics Committee from UNESC.

2.3. Tissue and homogenate preparation: Cerebellum, prefrontal cortex, hippocampus, striatum and cerebral cortex were homogenized (1:10, w/v) in SETH buffer, pH 7.4 (250 mM sucrose, 2 mM EDTA, 10 mM Trizma base, 50 IU/mL

heparin). The homogenates were centrifuged at 800 x g for 10 min and the supernatants kept at -70°C until used for enzyme activity determination. Protein content was determined by the method described by Lowry and colleagues (1951) using bovine serum albumin as standard.

2.4. Respiratory chain enzyme activities: The activities of the respiratory chain enzyme complexes succinate: DCIP oxireductase (complex II) and succinate: phenazine oxireductase (soluble succinate dehydrogenase (SDH)) were determined according to the methods of Fischer and colleagues (1985). Complex II (succinate: DCIP oxireductase) activity was measured by following the decrease in absorbance due to the reduction of 2,6-DCIP at 600 nm with 700 nm as reference wavelength ($\epsilon = 19.1 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$). The reaction mixture consisting of 40 mM potassium phosphate, pH 7.4, 16 mM succinate and 8 μM DCIP was preincubated with 40–80 μg homogenate protein at 30°C for 20 min. Subsequently, 4 mM sodium azide and 7 μM rotenone were added and the reaction was initiated by addition of 40 μM DCIP and was monitored for 5 min. The activity of succinate: phenazine oxireductase (soluble SDH) was measured following the decrease in absorbance due to the reduction of 2,6-DCIP at 600 nm with 700 nm as reference wavelength ($\epsilon = 19.1 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) in the presence of phenazine methasulphate (PMS). The reaction mixture consisting of 40 mM potassium phosphate, pH 7.4, 16 mM succinate and 8 μM DCIP was preincubated with 40–80 μg homogenate protein at 30°C for 20 min. Subsequently, 4 mM sodium azide, 7 μM rotenone and 40 μM DCIP were added and the reaction was initiated by addition of 1 mM PMS and was monitored for 5 min. The activity of cytochrome c oxidase (complex IV) was measured by the method of Rustin and colleagues (1994). Complex IV activity was measured by following the decrease

in absorbance due to the oxidation of previously reduced cytochrome *c* at 550 nm with 580 nm as reference wavelength ($\epsilon = 19.1 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$). The reaction buffer contained 10 mM potassium phosphate, pH 7.0, 0.6 mM *n*-dodecyl-d-maltoside, 2–4 μg homogenate protein and the reaction was initiated with addition of 0.7 μg reduced cytochrome *c*. The activity of complex IV was measured at 25°C for 10 min.

2.5. Statistical analysis: Data were analyzed by one-way analysis of variance followed by the Tukey test when F was significant.

RESULTS

In this study, we measured the activities of mitochondrial respiratory chain complexes II and IV and succinate dehydrogenase from young rat brain after acute administration of methylphenidate. Figure 1 shows that succinate dehydrogenase activity was not affected by methylphenidate acute treatment in brain of young rats. Figure 2 shows similar results, where complex II activity was also not altered by acute administration of the drug. Finally, as seen on Figure 3, the acute administration of methylphenidate increased complex IV activity in hippocampus and striatum, and did not affect the enzyme in cerebellum, prefrontal and cerebral cortex.

DISCUSSION

Some studies report methylphenidate effects in the central nervous system during childhood and adolescence. Alterations in dopaminergic circuits function (Brandon and Steiner, 2003; Federici et al., 2005; Mague et al., 2005), gene

expression (Penner et al., 2002; Chase et al., 2003; Brandon and Steiner, 2003) and others molecular changes related to neuronal metabolism (Fukui et al., 2003) were already reported.

In this work, our aim was to evaluate the effect of acute administration of methylphenidate on the activities of mitochondrial respiratory chain enzymes in brain of young rats. Energy impairment has been linked to neuronal death and neurodegeneration (Brennan et al., 1985; Beal, 1992, 2005; Heales et al. 1999; Blass, 2001, 2002; Schurr, 2002; Land et al., 2004; Lin and Beal, 2006). In this context, a recent report from our research group showed that chronic administration of this drug in young rats caused an activation of mitochondrial respiratory chain enzymes in brain (Fagundes et al., 2007). In this work, we demonstrated that only complex IV was activated in hippocampus and striatum of young rats after acute methylphenidate administration. Besides, succinate dehydrogenase and complex II were not affected.

Volkow and colleagues (2005) showed that the distribution of methylphenidate in brain is heterogeneous, and the maximum concentration occurs in the striatum, cortex, and cerebellum. However, in this work, only hippocampus and striatum were affected. The reason why these activation occurs only in these brain areas is not well known, since the drug is also present in other areas.

These findings are in accordance to our recent work, where activation of these enzymes by methylphenidate chronic administration was reported. It is believed that methylphenidate activates mitochondrial respiratory chain, possibly for neurotransmitters reuptake and ionic gradient re-establishment. Our findings demonstrated, for the first time, that acute administration of methylphenidate

activates mitochondrial respiratory chain complex IV activity in hippocampus and striatum of young rats.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense (PPGCS-UNESC).

REFERENCES

- Beal, M.F. (1992). Does impairment of energy metabolism result in excitotoxic neuronal death in neurological illnesses? *Ann. Neurol.* 31:119-130.
- Beal, M.F. (2005). Mitochondria take center stage in aging and neurodegeneration. *Ann. Neurol.* 58:495-505.
- Biederman, J., Mick, E., and Faraone, S.V. (2000). Age-dependent decline of symptoms of attention deficit hyperactivity disorder: impact of remission definition and symptom type. *Am. J. Psychiatry* 157:816-818.
- Blass, J.P. (2001). Brain metabolism and brain disease: is metabolic deficiency the proximate cause of Alzheimer dementia? *J. Neurosci. Res.* 66:851-856.
- Blass, J.P. (2002). Glucose/mitochondria in neurological conditions. *Int. Rev. Neurobiol.* 51:325-376.
- Brandon, C.L., and Steiner, H. (2003). Repeated methylphenidate treatment in adolescent rats alters gene regulation in the striatum. *Eur. J. Neurosci.* 18:1584-1592.
- Brennan, W.A., Bird, E.D., and Aprille, J.R. (1985). Regional mitochondrial respiratory activity in Huntington's disease brain. *J. Neurochem.* 44:1948-1950.

- Challman, T.D., and Lipsky, J.J. (2000). Methylphenidate: its pharmacology and uses. *Mayo Clin. Proc.* 75:711-721.
- Chase, T.D., Brown, R.E., Carrey, N., and Wilkinson, M. (2003). Daily methylphenidate administration attenuates c-fos expression in the striatum of prepubertal rats. *NeuroReport* 14:769-772.
- Fagundes, A.O., Rezin, G.T., Zanette, F., Grandi, E., Assis, L.C., Dal-Pizzol, F., Quevedo, J., and Streck, E.L. (2007). Chronic administration of methylphenidate activates mitochondrial respiratory chain in brain of young rats. *Int. J. Dev. Neurosci.* In press.
- Faraone, S.V., Sergeant, J., Gillberg, C., and Biederman, J. (2003). The worldwide prevalence of ADHD: is it an American condition? *World Psychiatry* 2:104-113.
- Federici, M., Geracitano, R., Bernardi, G., and Mercuri, N.B. (2005). Actions of methylphenidate on dopaminergic neurons of the ventral midbrain. *Biol. Psychiatry* 57:361-365.
- Fischer, J.C., Ruitenbeek, W., Berden, J.A., Trijbels, J.M., Veerkamp, J.H., Stadhouders, A.M., Sengers, R.C., and Janssen, A.J. (1985). Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. *Clin. Chim. Acta* 153:23-26.
- Fukui, R., Svenningsson, P., Matsuishi, T., Higashi, H., Nairn, A.C., Greengard, P., and Nishi, A. (2003). Effect of methylphenidate on dopamine/DARPP signalling in adult, but not young, mice. *J. Neurochem.* 87:1391-1401.
- Garland, E.J. (1998). Pharmacotherapy of adolescent attention deficit hyperactivity disorder: challenges, choices, caveats. *J. Psychopharmacol.* 12:385-395.
- Heales, S.J., Bolaños, J.P., Stewart, V.C., Brookes, P.S., Land, J.M., and Clark, J.B. (1999). Nitric oxide, mitochondria and neurological disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1410:215-228.
- Land, J.M., Morgan-Hughes, J.A., Hargreaves, I., and Heales, S.J. (2004). Mitochondrial Disease: A Historical, Biochemical, and London Perspective. *Neurochem. Res.* 29:483-491.
- Lin, M.T., and Beal, M.F. (2006). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 443:787-795.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-267.

- Mague, S.D., Andersen, S.L., and Carlezon Jr., W.A. (2005). Early developmental exposure to methylphenidate reduces cocaine-induced potentiation of brain stimulation reward in rats. *Biol. Psychiatry* 57:120-125.
- Mannuzza, S., Klein, R.G., Bessler, A., Malloy, P., and LaPadula, M. (1998). Adult psychiatric status of hyperactive boys grown up. *Am. J. Psychiatry* 155:493-498.
- Mannuzza, S., Klein, R.G., Bessler, A., Malloy, P., and Hynes, M.E. (1997). Educational and occupational outcome of hyperactive boys grown up. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* 36:1222-1227.
- Penner, M.R., McFadyen, M.P., Pinaud, R., Carrey, N., Robertson, H.A., and Brown, R.E. (2002). Age-related distribution of c-fos expression in the striatum of CD-1 mice after acute methylphenidate administration. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 135:71-77.
- Porrino, L.J., and Lucignani, G. (1987). Different patterns of local brain energy metabolism associated with high and low doses of methylphenidate. Relevance to its action in hyperactive children. *Biol. Psychiatry* 22:126-138.
- Rustin, P., Chretien, D., Bourgeron, T., Gerard, B., Rotig, A., Saudubray, J.M., and Munnich, A. (1994). Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin. Chim. Acta* 228:35-51.
- Safer, D.J., and Allen, R.P. (1989). Absence of tolerance to the behavioral effects of methylphenidate in hyperactive and inattentive children. *J. Pediatr.* 115:1003-1008.
- Schurr, A. (2002). Energy metabolism, stress hormones and neural recovery from cerebral ischemia/hypoxia. *Neurochem. Int.* 41:1-8.
- Volkow, N.D., Fowler, J.S., Wang, G., Ding, Y., and Gatley, S.J. (2002). Mechanism of action of methylphenidate: insights from PET imaging studies. *J. Atten. Disord.* 6:S31-43 (Suppl 1).
- Volkow, N.D., Wang, G., Fowler, J.S., and Ding, Y-S. (2005). Imaging the effects of methylphenidate on brain dopamine: new model on its therapeutic actions for attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol. Psychiatry* 57:1410-1415.
- Volkow, N.D., Wang, G-J., Fowler, J.S., Gatley, S.J., Logan, J., and Ding, Y-S. (1998). Dopamine transporter occupancies in the human brain induced by therapeutic doses of oral methylphenidate. *Am. J. Psychiatry* 155:1325-1331.

Wigal, T., Swanson, J.M., Regino, R., Lerner, M.A., Soliman, I., and Steinhoff, K. (1999). Stimulant medications for the treatment of ADHD: efficacy and limitations. *Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev.* 5:215-224.

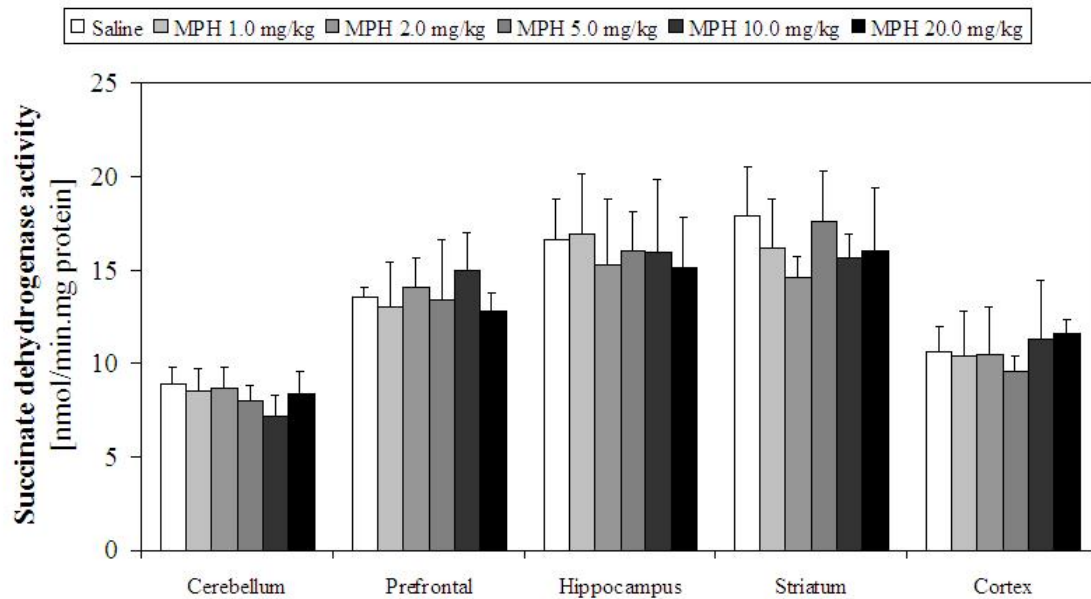


Figure 1 – Succinate dehydrogenase activity in the cerebellum, prefrontal cortex, hippocampus, striatum and cerebral cortex of young rats submitted to acute methylphenidate treatment. Rats were submitted to acute treatment with methylphenidate (1, 2, 5, 10 or 20 mg/kg) or saline. Two hours after the injection, rats were sacrificed and the brain regions were collected for determination of succinate dehydrogenase activity as described under Methods. Data are expressed as units per mg protein, for six independent experiments performed in duplicate.

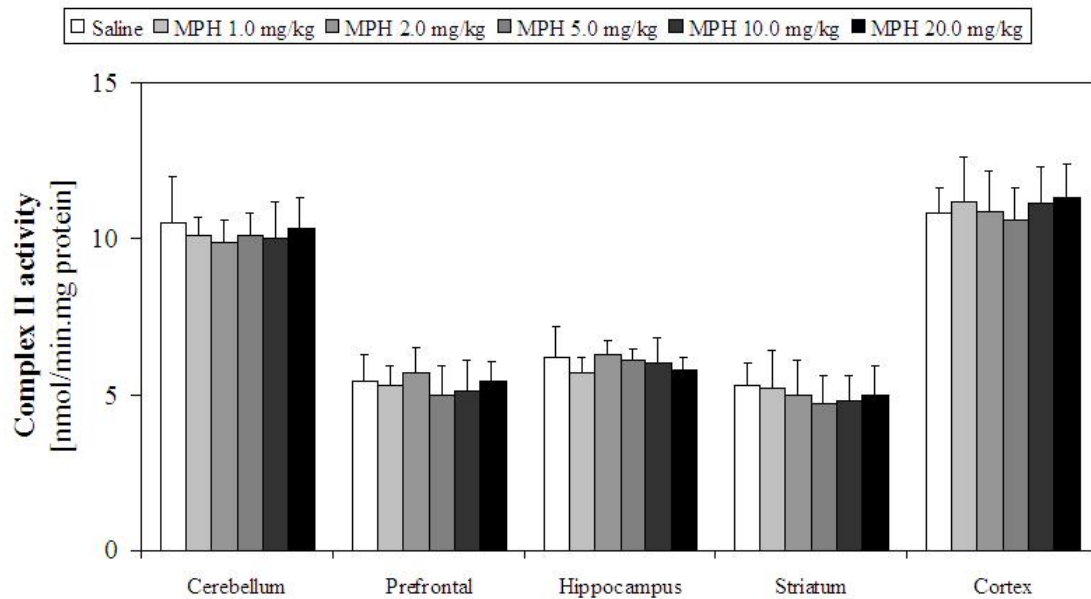


Figure 2 – Complex II activity in the cerebellum, prefrontal cortex, hippocampus, striatum and cerebral cortex of young rats submitted to acute methylphenidate treatment. Rats were submitted to acute treatment with methylphenidate (1, 2, 5, 10 or 20 mg/kg) or saline. Two hours after the injection, rats were sacrificed and the brain regions were collected for determination of succinate dehydrogenase activity as described under Methods. Data are expressed as units per mg protein, for six independent experiments performed in duplicate.

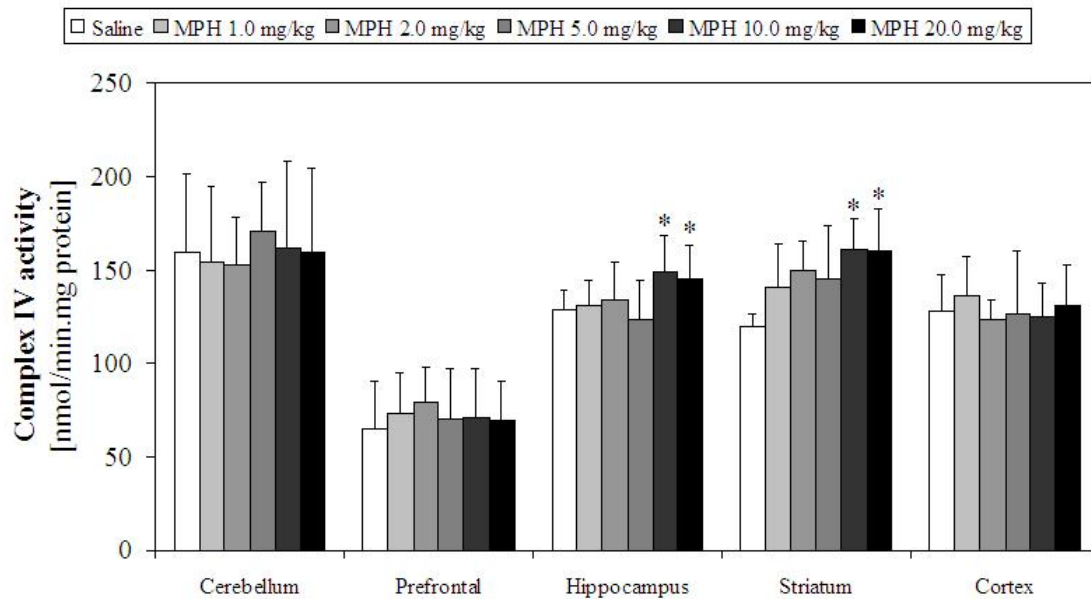


Figure 3 – Complex IV activity in the cerebellum, prefrontal cortex, hippocampus, striatum and cerebral cortex of young rats submitted to acute methylphenidate treatment. Rats were submitted to acute treatment with methylphenidate (1, 2, 5, 10 or 20 mg/kg) or saline. Two hours after the injection, rats were sacrificed and the brain regions were collected for determination of succinate dehydrogenase activity as described under Methods. Data are expressed as units per mg protein, for six independent experiments performed in duplicate. Different from control (saline) * $p < 0.05$ (Tukey test).

PARTE III

8 DISCUSSÃO

Do grupo das anfetaminas, o metilfenidato, conhecido comercialmente como Ritalina®, é o fármaco de 1ª escolha no tratamento de crianças e adolescentes que apresentam o TDAH. Esse transtorno surge na infância, é diagnosticado por volta dos 7 anos de idade, apresentando como principais características os sintomas de desatenção, hiperatividade e impulsividade, em mais de um ambiente freqüentado pela criança ou adolescente. Percebe-se que o sintoma de desatenção permanece ao longo da vida, porém os sintomas de hiperatividade e impulsividade tendem a diminuir com o passar dos anos. O diagnóstico é essencialmente clínico, apesar de haver estudos com objetivo de detectar marcadores biológicos para esta doença. O FDA relatou neste ano que 2,5 milhões de crianças, nos Estados Unidos, utilizam estimulantes (anfetamina e metilfenidato) para o tratamento do TDAH, sendo que destes, 10% são meninos com 10 anos de idade. O diagnóstico em pacientes adultos é recente e tem resultado em crescimento da prescrição destas medicações.

Charles Bradley (1937) fez a primeira observação de que a benzedrina (uma mistura de *D* e *L* -anfetamina) tinha o efeito de acalmar o comportamento hiperativo de crianças. Desde então, vários estudos vêm sendo conduzidos a aprovar o uso de estimulantes para atenuar os sintomas do TDAH (SOLANTO, 1998). As propriedades farmacológicas do metilfenidato têm sido bem caracterizadas em diversos estudos pré-clínicos, no entanto seus mecanismos de ação não está completamente entendido (SOLANTO, 1998). Pesquisas sugerem que o

metilfenidato aumenta o nível extracelular de dopamina no cérebro (CASTELLANOS et al, 1996; VOLKOW et al, 1994). Esta hipótese está bem sustentada, em parte por estudos pré-clínicos que encontraram o metilfenidato bloqueando transportadores de dopamina e de noradrenalina (DOUGHERTY et al, 1999, KRAUSE, 2000; SOLANO; 1998). Disfunções dos sistemas dopaminérgicos e noradrenérgicos estão implicados na patogênese do TDAH (DOUGHERTY et al, 1999; SOLANTO, 1998). Os DAT são os principais responsáveis pela remoção e recaptção de dopamina da fenda sináptica. Pela regulação da concentração de dopamina na sinapse, os DAT regulam ambos a magnitude e a duração do sinal dopaminérgico. O metilfenidato, ao bloquear os DAT, leva a um aumento de dopamina na sinapse e espaço extracelular, amplificando a resposta final do estímulo. Este efeito agonista dopaminérgico do metilfenidato possivelmente está relacionado com suas propriedades terapêuticas (VOLKOW et al, 1998; GREENHILL, 2001). Por outro lado, evidências na literatura sugerem que, o metilfenidato, bem como outras drogas e fármacos estimulantes, tem provocado alterações da ordem neurobiológicas, quando usadas por longos períodos (BRENNAN et al, 1985; BEAL, 1992; HEALES et al, 1999; BLASS, 2001; SCHURR, 2002) levando a alterações no metabolismo cerebral. O prejuízo ou diminuição de energia no cérebro pode levar a neurodegenerações e até morte neuronal. Neste contexto, Porrino e Lucignani (1987) mostraram que a administração crônica de metilfenidato leva à redução da utilização de glicose cerebral localizada. Volkow e colaboradores (1995) demonstraram que a distribuição do metilfenidato é heterogênea e a máxima concentração ocorre no estriado, córtex e cerebelo (MARSTELLER et al, 2002; SCHWEITZER et al, 2004).

Existem poucos trabalhos que avaliam a possibilidade de efeitos neurotóxicos do metilfenidato, bem como a sua relação com idade de uso e tempo de exposição (HUSSON et al, 2004). Algumas pesquisas têm sido focadas nos efeitos do metilfenidato sobre o SNC em crianças e adolescentes, sobre alterações na função do sistema dopaminérgico (BRANDON e STEINER, 2003; FEDERICI et al, MAGUE et al, 2005), expressão gênica (PENNER et al, 2002; CHASE et al, 2003; BRANDON and STEINER, 2003) e outras alterações moleculares no metabolismo neuronal (FUKAI et al, 2003).

Neste trabalho, foram analisadas as atividades de algumas enzimas da cadeia respiratória mitocondrial em animais jovens expostos ao tratamento crônico e agudo com metilfenidato. Particularmente, foram analisadas as atividades de enzimas do complexo II e IV da cadeia respiratória e a succinato desidrogenase (que também faz parte do ciclo de Krebs).

Observou-se aumento da atividade enzimática dos complexos II e IV e succinato desidrogenase no cerebelo de ratos jovens tratados de forma crônica com metilfenidato, mas não houve diferença significativa em relação às doses administradas. No tratamento agudo, não se observaram alterações nas atividades enzimáticas. O cerebelo está tipicamente ligado à função do equilíbrio e coordenação dos movimentos, além da aprendizagem motora. Ele auxilia tanto na seqüência de atividades motoras como na monitorização e ajustes dessas atividades produzidas por outra parte do encéfalo (MACHADO, 2004; GUYTON, 1993). Além disso, está envolvido no controle motor, em processos afetivos e em grande número de tarefas cognitivas. Neste contexto, estudos de neuroimagem indicam que o cerebelo se relaciona com tarefas cognitivas independentes do controle motor (DESMOND e FIEZ, 1998). Middleton e Strick (2001) também demonstraram

conexões cortical-cerebelares que servem de substrato anatômico para o circuito pré-frontal-cerebelar na fisiopatologia do TDAH. O cerebelo também está relacionado com algumas doenças neuropsiquiátricas como depressão, autismo e esquizofrenia (FILIPEK et al, 1997; HARRISON, 1999); não só está envolvido com o controle do comportamento, mas também em muitos aspectos do comportamento cognitivo, como o planejamento, memória de trabalho e o comportamento seqüencial (MIDDLETON et al, 2000).

A área pré-frontal compreende a parte anterior não-motora do lobo frontal. Esta região desenvolveu-se muito durante a evolução dos mamíferos e, no ser humano, ocupa cerca de um quarto da superfície do córtex cerebral. Suas conexões são bastante complexas, através dos fascículos de associação do córtex ela recebe fibras de todas as demais áreas ligando-se ao sistema límbico. Tem a função de escolher opções e estratégias comportamentais mais adequadas à situação física e social; manutenção da atenção e controle do comportamento emocional, exercida em conjunto com o hipotálamo e sistema límbico (MACHADO, 2004). Lesões nesta região levam a distúrbios relacionados com desatenção, impulsos descontrolados, desorganização, alterações no comportamento social e memória de trabalho (LOU,1996). Neste contexto, foi demonstrado que o tratamento agudo com metilfenidato não produziu alterações nas atividades enzimáticas. Com o tratamento crônico, houve aumento na atividade das enzimas do complexo II da cadeia respiratória e succinato desidrogenase, o mesmo não ocorrendo com o complexo IV. Também não houve efeito dose-dependente do metilfenidato no córtex pré-frontal.

Com o tratamento crônico, a succinato desidrogenase e o complexo IV foram ativados no estriado, enquanto que o complexo II não foi alterado. No tratamento agudo, o complexo IV foi ativado nas doses de 10 e 20 mg/kg, e o

complexo II e a succinato desidrogenase não sofreram alterações. Lesões experimentais em estriado de animais leva a hiperatividade, prejuízos na execução de tarefas e memória de trabalho (ALEXANDER et al, 1986). No corpo estriado (constituído pelo núcleo caudado, putâmen e globo pálido), as conexões são extremamente complexas. Suas funções são exercidas através de um circuito básico que liga o córtex cerebral através de fibras córtico-estriatais, que por sua vez são moduladas por circuitos subsidiários ou satélites que a ele se ligam. O estriado, assim como o cerebelo, tem função no planejamento motor. Há evidências de que além desse mecanismo puramente motor, outro através do qual informações originadas em uma outra área cortical são processadas no corpo estriado e através do circuito básico voltam a esta mesma área, podendo influenciar áreas não-motoras do córtex, como a área pré-frontal, ligada exclusivamente a funções psíquicas (MACHADO, 2004). A área do estriado é rica em dopamina e suas sinapses (DOUGHERTY et al, 1999) estão diretamente relacionadas com o TDAH e a ação do metilfenidato (VOLKOW et al, 2002). As outras estruturas cerebrais (córtex, córtex pré-frontal e hipocampo) se relacionam com os sistemas dopaminérgicos e/ou noradrenérgicos ligadas a este transtorno, que provavelmente são a projeção dopaminérgica mesocortical e/ou noradrenérgica pré-frontal (STAHL, 2000).

No hipocampo, a administração crônica de metilfenidato não alterou a atividade da succinato desidrogenase e do complexo II, enquanto que o complexo IV teve a atividade aumentada em 2 e 5 mg/kg e inibida em 10 e 20 mg/kg. Contrariamente, com o tratamento agudo, o complexo IV teve sua atividade aumentada nas doses de 5, 10 e 20 mg/kg. Além disso, não foram observadas outras alterações enzimáticas no tratamento agudo nessa estrutura. O hipocampo é uma estrutura cerebral que faz parte do sistema límbico (atua na regulação do

comportamento emocional, memória e aprendizagem) e da via dopaminérgica que faz parte da área tegmentar ventral (localizada acima da substância negra), dirigindo-se ao córtex pré-frontal e passando pelo hipocampo. Esta via é chamada de via mesolímbica (mesocortical) e está relacionada com a dependência de drogas de abuso e comportamento emocional. Pesquisas demonstraram que o pré-tratamento com metilfenidato em ratos jovens pode alterar a resposta à cocaína durante a fase adulta, levando a mudança duradoura na neurobiologia do sistema de recompensa cerebral. No entanto, esta mudança observada depende da fase de desenvolvimento durante a qual o animal foi exposto ao metilfenidato (ANDERSEN et al, 2001). Do ponto de vista neuroquímico, as áreas encefálicas relacionadas ao comportamento emocional são importantes porque apresentam diversidade de substâncias ativas, como as monoaminas. A riqueza dessas áreas em monoaminas, em especial a dopamina, noradrenalina e serotonina é muito significativa para a farmacologia, visto que muitos fármacos usados para o tratamento de distúrbios, principalmente comportamentais, agem no sentido de modificar o teor das aminas cerebrais (MACHADO, 2004). Estudos com o sistema dopaminérgico na região mesolímbica em ratos identificaram neuroadaptações induzidas por estimulantes (NESTLER, 2001); estas estão relacionadas com alterações no sistema de recompensa ou propriedades aversivas de drogas de abuso (CARLEZON et al, 1998; KELZ et al, 1999). Uma das neuroadaptações envolvidas é a CREB (proteína de ligação ao elemento que responde a AMPc) (ANDERSEN et al, 2001), um fator de transição ativado por estimulantes (CARLEZON et al, 1998). Muitos genes cuja transcrição é regulada pelo CREB foram identificados; como o *c-fos* (ANDERSEN et al, 2001) o qual é alterado pela administração de metilfenidato (CHASE et al, 2003,

2005; BRANDON e STEINER, 2003), além do *zif-268* (BRANDON e STEINER, 2003) e *fosB* (CHASE, 2005).

Alterações moleculares descritas acima podem estar relacionadas com alterações comportamentais nos animais tratados com metilfenidato. Observam-se sinais de depressão e prejuízos na capacidade de habituação (CARLEZON et al, 2003), responsividade a estímulos emocionais e ansiedade (BOLANÕS et al, 2003) em ratos adultos que foram tratados com metilfenidato durante um período da adolescência. Sintomas de depressão e ansiedade envolvem estruturas cerebrais como hipocampo (FILE et al, 2000; CHEETA et al, 2000, KEMPERMAN, 2002), córtex pré-frontal (ZHONG e YAN, 2004; SHAH e TREIT, 2004) e córtex cerebral (SETNIK e NÓBREGA, 2004; TALPALAR e GROSSMAN, 2004).

Finalmente, no córtex cerebral, o complexo IV foi ativado e a succinato desidrogenase e o complexo II não se alteraram. Da mesma forma, não se observaram alterações significativas dose-dependentes. No tratamento agudo, nesta estrutura não ocorreu nenhuma alteração nas enzimas dos complexos II e IV e na succinato desidrogenase. No córtex cerebral chegam os impulsos provenientes de todas as vias da sensibilidade que aí se tornam conscientes e são interpretadas. Do córtex partem os impulsos nervosos que iniciam e comandam os movimentos voluntários e com ele estão relacionados os fenômenos psíquicos (MACHADO, 2004).

O metilfenidato tem ação psicomotora similar à cocaína e às anfetaminas, (KOOB et al, 1998; WISE e BOZARTH, 1987). Estudos têm mostrado que o metilfenidato possui propriedades estimulantes pelo bloqueio dos DAT (SCHWERI et al, 1985; VOLKOW et al, 1998); induz o aumento à dose dependente em regiões cerebrais ativadas pelas drogas de abuso (GERASIMOV et al, 2000; VOLKOW et al,

1998) e produz aumento da resposta motora depois de repetidas administrações (CRAWFORD et al, 1998; MCDUGALL et al, 1999). Anfetaminas, bem como outros psicoestimulantes, têm sido associadas a déficits dos sistemas cerebrais dopaminérgicos e noradrenérgicos, com exposição a longo prazo.

Isto é, provavelmente, causado por produção aumentada de espécies reativas de oxigênio geradas pelo excesso de dopamina (SPINA e COHEN, 1989; LA VOIE e HASTINGS, 1999; PAGE et al, 2001). A que da produção de ATP (CHAN et al, 1994; VIRMANI et al, 2002) pela inibição da função mitocondrial também determina o aumento dessas espécies (SCHINDLER et al., 1996; PREHN, 1998; BERMAN and HASTINGS, 1999). Neste contexto, Martins e colaboradores (2006) mostraram que, em cérebros de animais jovens tratados com metilfenidato, ocorreu um aumento de parâmetros de estresse oxidativo.

Em contraste, neste estudo, foi demonstrado que a administração crônica do metilfenidato aumentou, de maneira geral, a atividade enzimática de complexos da cadeia respiratória mitocondrial em cérebro de ratos jovens. Nos animais jovens que foram submetidos ao tratamento agudo, houve alteração na atividade do complexo IV no estriado e hipocampo. Por esses resultados, pode-se concluir que o metilfenidato possivelmente aumenta a produção de ATP pela ativação da cadeia transportadora de elétrons. A energia cerebral é usada principalmente para a recaptção de neurotransmissores e restabelecimento do gradiente iônico necessário para a excitabilidade neuronal. Conseqüentemente, mais oxigênio é consumido e espécies reativas de oxigênio podem ser geradas. Mais estudos são necessários para elucidar essas questões, como o consumo de oxigênio mitocondrial após o tratamento com metilfenidato.

O aumento da atividade da cadeia respiratória mitocondrial, descrita neste trabalho, foi verificado em animais sem TDAH. Modelos animais de TDAH, com tratamentos semelhantes podem apresentar resultados diferentes. Mais estudos estão sendo realizados em nosso laboratório, com a finalidade de esclarecer a razão do aumento da atividade desses complexos enzimáticos após a administração crônica e aguda do metilfenidato. A atividade de outras importantes enzimas relacionadas com o metabolismo como as do ciclo de Krebs também serão avaliadas.

Clinicamente, o metilfenidato é o fármaco mais prescrito para crianças em idade escolar, visto que crianças menores de 5 anos de idade podem apresentar comportamentos disruptivos (RAPPLEY et al, 1999; DEBAR et al, 2003). O cérebro da criança na faixa etária entre 6 a 12 anos não está totalmente desenvolvido, anátomo e neurofuncionalmente, já que até 6 anos de idade ainda há reprodução neuronal. Entre 6 a 14 anos de idade há uma seleção natural dos neurônios, ficando as vias mais fortalecidas (GASSANIGA e HEATHERTON, 2005). A criança que apresenta o TDAH e faz uso de metilfenidato geralmente tem declínio de seus sintomas. Porém, o uso deste fármaco pela criança pode ser prolongado e a sua administração ocorre no período em que está ainda apresenta maturação cerebral. Por isso é necessário realizar estudos com animais experimentais, principalmente jovens, com o objetivo de verificar possíveis efeitos adversos provocados pelo uso crônico deste fármaco.

9 CONCLUSÕES

- a. Animais jovens tratados cronicamente com metilfenidato demonstraram aumento da atividade enzimática dos complexos II e IV da cadeia respiratória mitocondrial e da enzima succinato desidrogenase;
- b. A enzima succinato desidrogenase foi significativamente ativada no cerebelo, córtex pré-frontal e estriado. Não houve mudanças no hipocampo e córtex dos animais tratados cronicamente com metilfenidato;
- c. O complexo II da cadeia respiratória foi significativamente aumentado no cerebelo e córtex pré-frontal, mas não foram observadas alterações no hipocampo, estriado e córtex dos animais jovens tratados cronicamente com metilfenidato;
- d. O complexo IV da cadeia respiratória mitocondrial aumentou significativamente no cerebelo, hipocampo, estriado e córtex. Além disso, não foi alterado na região pré-frontal dos animais jovens submetidos a tratamento crônico com metilfenidato.
- e. Animais jovens tratados de forma aguda com metilfenidato mostraram aumento da atividade enzimática do complexo IV da cadeia respiratória mitocondrial, somente no estriado e hipocampo.

10 PERSPECTIVAS

Nesse estudo, encontraram-se resultados significativos sobre o efeito do metilfenidato na cadeia respiratória mitocondrial em cérebro de ratos jovens. A partir desses resultados, pretende-se continuar estudos em animais jovens e também em adultos submetidos a tratamentos com metilfenidato de forma crônica e aguda. A avaliação de alterações mitocondriais em animais submetidos ao modelo animal de TDAH também se faz necessária. É de crucial importância que se continue avaliando os efeitos de um fármaco usado predominantemente em crianças.

11 REFERÊNCIAS

AMERICAN ACADEMY OF CHILD AND ADOLESCENT PSYCHIATRY (AACAP). Practice parameters for the assessment and treatment of children, adolescent and adults with attention-Deficit hyperactivity disorder. **J. Am. Adolesc. Psychiatry**, v. 36 (10 Suppl), p. 85-121, 1997.

ANKARCRONA, M.; DYPBUKT, J.M.; BONFOCO, E.; ZHIVOTOVSKY, B.; ORRENIUS, S.; LIPTON, A.S.; NICOTERA, P. Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. **Neuron**, v.15, p.961-973, 1995.

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

AYLWARD, E.H.; REISS, A.L.; READER, M.J.; SINGER, H.S.; BROWN, J.E.; DENCKLA, M.B. Basal ganglia volumes in children with attention-deficit hyperactivity disorder. **J. Child Neurol**, v. 11, p. 112-115, 1996.

APA. Manual **Diagnóstico e Estatístico dos Transtornos Mentais**. 4. ed.Ver. (DSM-IV-TR). Porto Alegre: Artmed, 2002.

BAUMGARDNER, T.L.; SINGER, H.S.; DENCKIA, M.B.; RUBIN, M.A. ABRAMS, M.T.; COLLI M.J.; REISS, A.L. Corpus callosum morphology in children with Tourett syndrome and attention deficit hyperactivity disorder. **Neurology**, v. 47, p. 477-482, 1996.

BEAL, M.F. Does impairment of energy metabolism result in excitotoxic neuronal death in neurological illnesses? **Annals of Neurology**, v.31, p.119-130, 1992.

BENES, F.M. Brain development, VII.Human brain growth spans decades. **Am.J. Psychiatry**, v. 155, p.1489,1998.

BERG, Jeremy Mark; TYMOCZKO, John L; STRYER, Lubert. **Bioquímica**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2004.

BERRIDGE KC, ROBINSON TE. GAT is the role of dopamine in reward: Hedonic impact, reward learning, or incentive salience? **Brain Res Brain Res Rev**, v.28, p.309-369, 1998.

BIEDERMANN, J.; NEWCORN, J.; SPRICH, S. Comorbidity of attention deficit hyperactivity disorder with conduct, depressive, anxiety, and other disorders. **Am. J. Psychiatry**, p. 564-577, 1991.

BIEDERMAN, J.; FARAONE, S.V.; KENAN, K.; BENJAMIN, J.; KRIFCHER, B.; MOORE, C.; SPRINCHT-BUCKMINSTER, S.; UGAGLIA, K.; JELLINEK, M.S.; STEINGARD, R.; SPENCER T., NORMAN, D.; KOLODNY R.; KRAUS I.; PERRIN J.; KELLER M.B.; TSUAG M.T. Further evidence for family genetic risk factors in ADHD: patter of comorbidity in probands and relatives in psychiatrically and peditrically referred samples. **Arch Gen Psychiatry**, v.49, p. 728-738,1992a.

BIEDERMAN, J.; FARAONE, S.V.; LAPEY K. Comorbidity of diagnosis in attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). **Child Adolesc Psychiatr Clin North Am.** v. 1, p. 335-360,1992b.

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. The Massachusetts General Hospital studies of gender influences on attention-deficit/hyperactivity disorder in youth and relatives. **Psychiatr. Clin. North Am.**, v. 27, p. 225-232, 2004.

BIEDERMAN, J.; MONUTEAX, M.; SEIDMAN, L.; et al. Impact of executive function deficits and ADHD on academic outcomes in children. **J Consult Clin Psychol**, v.72, p. 757-766, 2004.

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

BUSH, G.; FRAZIER, J.A.; RAUCH, S.L.; SEIDMAN, L.J.; WHALEN, P.J.; JANIKE, M.A.; et al. Anterior cingulated cortex dysfunction in attention deficit/hyperactivity disorder revealed by MRI and counting stroop. **Biol. Psychiatry**, v. 45, p. 1542-1552, 1999.

BRANDON, C.L.; STEINER H. Repeated methylphenidate treatment in adolescent rats alters gene regulation in the striatum. **Eur J Neurosci**, v. 18, p. 1584-1592, 2003.

CARDINAL RN, PENNICOTT DR, SUGATHAPALA CL, ROBBINS TW, EVERITT BJ. **Impulsive choice induced in rats by lesions of nucleus accumbens core.** Science, p. 2499-2501, 2001.

CARBONI, E.; SILVAGNI, A. Experimental investigations on dopamine transmission and methylphenidate in ADHD. **Neural Plast**, v. 11, p. 79-95, 2004.

CASEY, B.J.; CASTELLANOS, F.X.; GIEDD, J.N.; et al. Implication of right frontostriatal circuitry in response inhibition and attention deficit/hyperactivity disorder. **Jour Of the American Acad of Child and Adolesc Psychiatry**, p. 374-383, 1997.

CASTELLENOS, F.X.; ELIA, J.; KRUESI, M.J.; GULOTTA, C.S.; MEFFORD, I.N.; POTTER, W.Z.; RITCHIE, G.F.; RAPOPORT, J.L.; Cerebrospinal fluid monoamine metabolites in boys with attention-deficit hyperactivity disorder. **Psychiatry Res.** v.52, p. 305-316, 1996a.

CASTELLANOS, F.X.; GIEDD, J.N.; MARSH; W.L.; HAMBURGER, S.D.; VAITUZIS,AC.; DICKSTEINS, D.P.; et al. Quantitative brain magnetic resonance imaging in attention deficit hyperactivity disorder. **Arch. Gen. Psychiatry**, p. 607-616, 1996b.

CASTELLANOS, F.X.; ELIA, J.; KRUESI, M.J.; MARSH, W.L.; GULOTTA, C.S.; POTTER, W.Z.; et al. Cerebrospinal fluid homovalilic acid predicts behavioral response to stimulants in 45 boys with attention deficit/hyperactivity disorder. **Neuropsychol**, v. 14, p. 125-772, 1996c.

CASTELLENOS, F.X. Toward a pathophysiology of attention-deficit/hyperactivity disorder. **Cin. Pediatr. (Phila)**, v. 36, p. 381-393, 1997.

CHASE, T.D.; BROWN, R.E.; CARREY, N.; WILKINSON, M. Daily methylphenidate administration attenuates c-fos expression in the striatum of prepubertal rats. **Neuroreport**, v.14, p.769-772, 2002.

CHASE, T.D.; BROWN, R.E.; CARREY, N.; WILKINSON, M. Daily methylphenidate administration attenuates c-fos expression in the striatum of prepubertal rats. **Neuroreport**, v. 15, p. 769-772, 2003.

CHASE, T.D.; CARREY N.; BROWN R.E.; WILKINSON M. Methylphenidate: differentially regulates c-fos and fos-B expression in the developing rat striatum. **Dev. Brain Res**, p. 181-191, 2005.

CLARK, J. B., BATES, T.E., CULLINGFORD, T, LAND, J.M. Development of enzymes of energy metabolism in the neonatal mammalian brain. **Dev. Neurosci-Basel**, v. 17, p. 174-180, 1993.

COYLE, J.T. **Psychotropic drug use in very young children**. *Jama*, v. 283, p. 1059-1060, 2000.

COOK, E.H; STEIN, M.A; KRASOWSKI, M.D; COX, NJ; OIKON, DM; KIEFFE, JE. Association of attention deficit/disorder and the dopamine transporter gene. **Am J Hum Genet**, p. 993-998, 1995.

DEVLIN, Thomas M.; MICHELACCI, Yara M. **Manual de bioquímica**: com correlações clínicas. São Paulo: Edgard Blücher, 2003.

DI DONATO, S. Disorders related to mitochondrial membranes: pathology of the respiratory chain and neurodegeneration. **Journal of Inherited Metabolic Disorders**, v.23, p.247-263, 2000.

DICKINSON, C.J. Cerebral oxidative metabolism in hypertension. **Clin. Sci**, v. 91, p. 539-550, 1996.

DINN, W.WM.; ROBBINS, N.C.; HARRIS, C.L. Adult attention-deficit/hyperactivity disorder: neuropsychological and clinical presentation. **Brain Cogn**, v. 46, p. 114-121, 2001.

DING YS, FOWLER JS, VOLKOW ND, DEWEY SL, WANG GJ, LOGAN J, ET AL. **Chiral drugs**: Comparison of the pharmacokinetics of [¹¹C]d-treo and L-treo-methylphenidate in the human and baboon brain *Psychopharmacology (Berl)*, p.71-78, 1997.

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.

DUTRA, J.C.; WAJNER, M.; WANNMACHER, C.F.; DUTRA-FILHO, C.S.; WANNMACHER, C.M.D. Effects of methylmalonate and propionate on glucose and

ketone bodies uptake "in vitro" by developing rats. **Biochemical Medicine and Metabolic Biology**, v.45, p. 56-64, 1991.

EFRON D, JARMAN F, BARKER M: Side effects of methylphenidate and dexamphetamine in children with attention deficit hyperactivity disorder : A double-blind, crossover trial. **Pediatrics**, v.100, p. 662-666, 1997.

EBSTEIN, R.P.; NEMANOV, L.; KLOTZ, I.; GRINTSENKO, I.; BELMAKER, R.H. Additional evidence for no association between the dopamine D4 receptor(DRD4) exon III repeat polymorphism and human personality trait of novelty seeking. **Mol. Psychiatry**, v. 2, p. 472-477, 1997.

ERECINSKA, M., SILVER, I. A. Ions and energy in mammalian brain. **Prog. Neurobiol**, v. 43, p. 37-71, 1994.

ERNEST, M.; ZAMETKIN, A.J.; MATOCHIK, J.A.; PASCUALVACA, D.; JONS, P.H.; COHEN, R.M. Additional evidence for an association between the dopamine D4 receptor (DRD4) exon III repeat polymorphism human personality study. **J. Neurosci**, v. 18, p. 5901-5907, 1998.

ERNEST, M.; ZAMETKIN, A.J.; MATOCHIK, J.A.; PASCUALVACA, D.; JONS, P.H.; COHEN, R.M. High midbrain (18F) DOPA accumulation in children with attention deficit hyperactivity disorder. **Am. J. Psychiatry**, v.156, p. 1209-1215, 1999.

FALOONA, G.R.; SRERE, P.A. Escherichia coli citrate synthase. Purification and the effect of potassium on some properties. **Biochemistry**, v. 8, p. 4497-4503, 1969.

FARAONE, S.V.; BIEDERMAN, J. neurobiology of attention deficit hyperactivity disorder. **Biol Psychiatry**, v. 44, p. 951-958, 1998.

FARAONE SV, SERGEAT J, GILLBERG C, BIEDERMAN J. **The worldwide prevalence of ADHD: is it an American conditio?** World Psychiatry , 2003.

FILIPEK, P.A.; SEMRUDCLIKEMAN, M.; STEINGARD, R.J.; RENSHAW, P.F.; KENNEDY, D.N.; BIEDERMAN, J. Volumetric MRI analysis comparing subjects having attention-deficit hyperactivity disorder with normal controls. **Neurolog**, v. 48, p. 589-601, 1997.

FISCHER, J.C.; RUITENBEEK, W.; BERDEN, J.A.; TRIJBELS, J.M.; VEERKAMP, J.H.; STADHOUDERS, M.S.; SENGERS, R.C.; JANSEN, A.J. Differential

investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. **Clinica Chimica Acta**, v.153, p.23-26, 1985.

GAINETDINOV, R.R.; WETSEL, W.C.; JONES, S.R.; LEVIN, E.D.; JABER, M.; CARON, M.G. Role of serotonin in the paradoxical calming 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.

GIROS, B.; JABER, M.; JONES, S.R.; WIGHTMAN, R.M.; CARON, M.G. Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. **Nature**, v.379, p.606-612, 1996.

GOLINKO BE: Side effects of dextroamphetamine and methylphenidate in hyperactive children- a brief review. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 8, p. 1-8, 1984.

GOLDMAN L.S.; GENEL M.; SLANETZ P.J. Diagnosis and treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder in children and adolescents. Council on Scientific Affairs, American Medical Association. **JAMA**, v. 279, p. 1100-1107, 1998.

GOODMAN E GILMAN. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**, p.233-301, 2006.

GREENHILL, L.L.;PLISZKA, S.; DULCAN, M.K.; BERNET, W.; ARNOLD, V.; BEITCHMAN, J.; BENSON, R.S.; BUKSTEIN, O.; KINLAN, J.; McCLELLAN, J.; RUE, D.; SHAW, J.A.; STOCK, S. (American Academy of Child and Adolescent Psychiatry): Practice parameter for the use of stimulant medications in the treatment of children, adolescents, and adults. **Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry**, v.41, p.26S-49S, 2002.

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.

HEALES, S.J.; BOLAÑOS, J.P.; STEWART, V.C.; BROOKES, P.S.; LAND, J.M.; CLARK, J.B. Nitric oxide, mitochondria and neurological disease. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1410, p.215-228, 1999.

HEILIGENSTEIN E, CONYERS LM, BERNS AR, MILLER MA. Preliminary normative data on DSM-IV attention deficit hyperactivity disorder in college students. **J Am Coll Health**, v. 46, p. 185-188, 1998.

HERTZ, L.; PENG, L. Energy metabolism at the cellular level of the CNS. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v.70, p.S145-S157, 1992.

HOLLERMAN JR, SCHULTZ W: Dopamine neurons report an error in the temporal prediction of reward during learning. **Nat Neurosci**, v. 1, p. 304-309, 1998.

HUGHES, B.P. A method for estimation of serum creatine kinase and its use in comparing creatine kinase and aldolase activity in normal and pathologic sera. **Clinica Chimica Acta**, v.7, p.597-604, 1962.

Husson, I., Mesples, B., Medja, F., Leroux, P., Kosofsky, B., Gressens, P. Methylphenidate and MK-801, an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist: shared biological properties. **Neuroscience**, v. 125, p. 163-170, 2004.

IZENWASSER, S.; WERLING, L.L.; COX, B.M. Comparison of the effects of cocaine and other inhibitors of dopamine uptake in rat striatum, nucleus accumbens, olfactory tubercle, and medial prefrontal cortex. **Brain Research**, v.520, p.303-309, 1990.

KAPLAN, H.I.; SADOCK, B.J.; GREBB, J.A. **Compêndio de Psiquiatria: Ciências do Comportamento e Psiquiatria Clínica**. São Paulo: Artmed, 2002.

KASSER, T.R.; DEUTCH, A.; MARTIN, R.J. Uptake and utilization of metabolites in specific sites relative to feeding status. **Physiology Behaviour**, v.36, p.1161-1165, 1986.

KIRBY K.; RUTMAN L.E.; BERNSTEIN H. Attention-deficit/hyperactivity disorder: A therapeutic update. **Curr Opin Pediatr**, v.14, p. 236-246, 2002.

KIYATKIN EA, REBEC GV. Dopaminergic modulation of glutamate-induced excitations of neurons in the neostriatum and nucleus accumbens of awake, unrestrained rats. **J Neurophysiol**, v. 75, p. 142-153, 1996.

KRAUSE, K.H.; DRESEL, S.H.; KRAUSE. 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. **Neurosci. Lett**, v. 285, p. 107-110, 2000.

KOOB GF. Hedonic valence, dopamine and motivation. **Mol Psychiatry**, v. 1, p. 186-189, 1996.

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

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

LA HOSTE, G.L.; SWANSON, J.M.; WIGAL, S.B. GLABE, C.; WIGAL, T.; KING, N.; et al. Dopamine D4 receptor gene polymorphism is associated with attention deficit hyperactivity disorder. **Mol. Psychiatry**, v. 1, p. 121-214, 1996.

LAVOIE, M.J., HASTINGS, T.G. Dopamine quinone formation and protein modification associated with the striatal neurotoxicity of methamphetamine: evidence against a role for extracellular dopamine. **J. Neurosci**, v. 19, p.1484-1491, 1999.

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.

LOU, H.C.; ANDRESEN, J.; STEINBERG, B.; MCLAUGHLIN, T.; FRIBERG, L. The striatum in a putative cerebral network activated by verbal awareness in normals and in ADHD children. **Euro J Neural**, v. 5, p. 67-74, 1998.

LOWE, N.; KIRLEY, A.; HAWI, Z.; SHAM, P.; WICKHAM, H.; KRATOCHVILL, C.J.; et al. Joint analysis of DRD5 marker concludes association with ADHD confined to the predominantly inattentive and combined subtypes. **Am J Hum Genet**, v. 74, p. 348-356, 2003.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J Biol Chem**, p. 267-275, 1951.

MACHADO, Angelo B. M. **Neuroanatomia funcional**. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 1993-2000.

MARKS, D.B.; MARKS, A.D.; SMITH, C.M. **Basic medical biochemistry**. 2 nd

edition. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2005.with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v.193, p.265-267, 1951.

MATARO, M.; GARCIASANCHEZ, C.; JUNQUE, C.; ESTEVEZGONZALVEZ, A.; PUJOL, J. Magnetic resonance imaging measurement of the caudate nucleus in adolescence with attention-deficit hyperactivity disorder and its relationship with neuropsychological and behavioral measures. **Arch. Neurol**, v. 54, p. 963-968, 1997.

MILLER K.J.;CASTELLANOS F.X. Attention deficit/hyperactivity disorders. **Pediatr Rev**, v. 19, p. 373-384, 1998.

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 (1), p. 16-22, 2002.

McDOUGALL, S.A.; COLLINS, R.L.; KAPER, P.E.; WATSON, J.B.; CRAWFORD, C.A. Effects of repeated methylphenidate treatment in the young rat: sensitization of both locomotor activity and stereotyped sniffing. **Experimental and Clinical Psychopharmacology**, v.7, p.208-218, 1999.

MOLL, G.H.; HAUSE, S.; RUTHER, E.; ROTHENBERGER, A.; HUETHER, G. Early methylphenidate administration to young rats causes a persistent reduction in the density of striatal dopamine transporters. **Journal of Childhood and Adolescence Psychopharmacology**, v.11, p.15-24, 2001.

MTA Cooperative Group. National Institute of Mental Health Multimodal Treatment Study of ADHD follow-up: 24 month outcomes of treatment strategies for attention-deficit/hyperactivity disorder. **Pediatrics**, v. 113, p. 754-761, 2004.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 3.ed. New York: Worth Publishers, 2000.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH: Consensus development conference statement: diagnosis and treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD). **Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry**, v.39, p.182-193, 2000.

ORTH, M., SCHAPIRA, A.H.V. Mitochondria and degenerative disorders. **Am. J. Med. Gen**, v. 106, p. 27-36, 2001.

PATRICK KS, CALDWELL RW, FERRIS RM, BREESE GR. Pharmacology of the enantiomers of threo-methylphenidate. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 241, p. 152-158, 1987.

PAULE, M.G.; ROWLAND, A.S.; FERGUSON, S.A.; CHELONIS, J.J.; TANNOCK, R.; SWANSON, J.M.; CASTELLANOS, F.X. Attention deficit/hyperactivity disorder: characteristics, interventions and models. **Neurotoxicology and Teratology**, v.22, p.631-651, 2000.

PASCOLI V.; VALJENT E.; CORBILLÉ A.; CORVEL J.; TASSIN J.; GIRAULT J.; HERVÉ D. cAMP and Extracellular Signal-Regulated Kinase Signaling in Response to d-Amphetamine and Methylphenidate in the Prefrontal Cortex in Vivo: Role of β 1-adrenoceptores. **Mol Pharmacology**, v. 68, p. 421-429, 2005.

PORRINO, L.J.; LUCIGNANI, G. Different patterns of local brain energy metabolism associated with high and low doses of methylphenidate. Relevance to its action in hyperactive children. **Biological Psychiatry**, v.22, p.126-138, 1987.

PORRINO LJ, RAPOPORT JL, BEHAR D, ISMOND DR, BUNNEY WE JR. A naturalistic assessment of the motor activity of hyperactive boys. II. Stimulant drug effects. **Arch Gen Psychiatry**, v. 40, p. 688-693, 1983.

RANG HP, DALE MM, RITER JM E MOORE PK, **Farmacologia**. 5 ed, v. 4, p. 543-547, 2003.

RAMIREZ, O.; JIMÉNEZ, E. Opposite transitions of chick brain catalytically active cytosolic creatine kinase isoenzymes during development. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v.18, p.815-823, 2000.

RIESGO R, ROHDE LA. **A neurobiologia do TDAH**. In: KAPCZINSKI F, QUEVEDO JL, IZQUIERDO I, editores. Bases Neuroquímicas do transtornos Psiquiátricos 2ª edição. Porto Alegre: Artes Médicas, 2004.

ROHDE, L.A.; BUSNELLO, E.A.; CHACHAMOVICH, E.; VIEIRA, G.M.; PINZON, V.; KETZER, C.R. Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade: revisando conhecimentos. **Rev. ABP-APAL**, p. 166-178, 1998.

ROHDE, L.A.; BIEDERMAN, J.; BUSNELLO, E.A.; ZIMMERMANN, H.; SCHMITZ, M. MARTINS, S; et al. ADHD in a school sample of Brazilian adolescents: a study of prevalence, comorbid conditions and impairments. **J. Am. Acad. Child. Adolesc. Psychiatry**, p. 716-722, 1999.

ROHDE, L.A.; BARBOSE, G.; TRAMONTINA, S.; POLANCZYK, G. Transtorno de Déficit de atenção/hiperatividade. **Rev Bras. Psiquiatria**, v. 22(Supl II), p. 7-11, 2000.

ROHDE, L.A.; ROMAN, T.; SZOBOT, C; CUNHA, R.D.; HUTZ, M.H; BIEDERMAN, J. Dopamine Transporter gene, response to methylphenidate and cerebral blood flow in attention-deficit/hyperactivity disorder: a pilot study. **Synapse**, v. 48(2), p. 87-89, 2003.

ROMAN, T.; SCHMITZ, M.; POLANCZYK, G.V.; EIZIRIK M.; ROHDE, L.A.; HUTZ, M.H. Is the alpha -2^a adrenergic receptor gene (ADR2A) associated with attention-deficit/hiperactivity disorder? **Am J Med Genet**, v. 120B, p. 116-120, 2003.

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

RUSTIN, P.; CHRETIEN, D.; BOURGERON, T.; GERARD, B.; RÖTIG, A.; SAUDUBRAY, J.M.; MUNNICH, A. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. **Clinica Chimica Acta**, v. 228, p.35-51, 1994.

SAFER, D.J.; ALLEN, R.P. Absence of tolerance to the behavioral effects of methylphenidate in hyperactive and inattentive children. **J Pediatr**, v. 115, p. 1003-1008, 1989.

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

SIEG, F.G.; GAFFNEY, G.R.; PRESTON, D.F.; HELLINGS, J.A. Spect brain imaging abnormalities in attention-deficit hyperactivity disorder. **Clin. Nucl. Med**, v. 20, p. 55-60, 1995.

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

SHIMOJO, N.; NAKA, K.; NAKAJIMA, C.; YOSHIKAWA, C.; OKUDA, K.; OKADA, K. Test-strip method for measuring lactate in whole blood. **Clinical Chemistry**, v. 35, p. 1992-1994, 1989.

SOKOLOFF, L. The radioactive deoxyglucose method. Theory, procedure, and applications for measurement of local glucose utilization in the central nervous system. In Agranoff BW, Aprison MH (eds), **Advances in Neurochemistry**. New York, Plenum, v.4, p.82, 1982.

SOKOLOFF, L; REIVICTH M; KENNEDY C; DES ROUSIERS MH; PATLAK, CS, PETTIGREW KD; SAKURADA, O; SHINOHARA, M. The deoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization: Theory, procedure, and normal values anesthetized albino rat. **J Neurochem**, v. 28, p. 897-916, 1977.

SOLANTO, M.V. Neuropharmacological basis of stimulant drug action in the attention deficit disorder with hyperactivity: a review and synthesis. **Psychological Bulletin**, v. 95, p. 387-409, 1984.

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.

SPINA, M.B., CONHEN, G.. Dopamine **turnover and glutathione oxidation**: implications for Parkinson disease. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, v. 86, p. 1398-1400, 1989.

STEPHEN, M.S. Psicofarmacologia: base neurocientífica e aplicações práticas. 2. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2000.

STOREY, K.B. Phosphofructokinase from Oyster Adductor Muscle. **Methods in Enzimology**, v. 90, p. 39-44, 1982.

SWANSON, J.M.; SERGEANT, J.A.; TAYLOR, E.; SONUGA-BARKE, E.J.S.; JENSEN, P.S.; CANTWELL, D.P. Attention deficit disorder and hyperkinetic disorder. **Lancet**, v. 351, p. 429-433, 1998.

TANNOCK R. Attention- deficit/ hyperactivity disorder; advances incognitive, neurobiological, and genetic research. **J Child Psychol Psychiat**, v. 39, p. 65-99, 1998.

TAYLOR, F.B.; RUSSO, J. Comparing guanfacine and dextroamphetamine for the treatment of adult attention-deficit/hyperactivity disorder. **J Clin Psychopharmacol**, v. 21, p. 223-228, 2001.

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

TRINDER, P.A. Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen. **Journal of Clinical Pathology**, v. 22, p.158-161, 1969.

VAIDYA, C.; AUSTIN, G.; KIRKORIAN, G.; RIDLEHUBE, H.W.; DESMOND, J.E.; GLOVER, G.H.; GABRIEL, J.D.E. Selective effects methylphenidate in attention deficit hyperactivity disorder: A functional magnetic resonance study. **Proc. Natl. Sci. USA**, v. 95, p. 14494-14499, 1998.

VOLKOW, N.D.; WANG, G.J.; FOWLER, M.; LOGAN, J.; SCHLYER, D.; HITZEMANN, R.; et al. Imaging endogenous dopamine competition with (11C)raclopride in the human brain. **Synapse**, v.16(4), p. 255-262, 1994.

VOLKOW, N.D.; DING, Y.S.; FOWLER, J.S.; WANG, G.J.; LOGAN, J.; GATLEY, J.S.; DEWEY, S.; ASHBY, C.; LIEBERMANN, J.; HITZEMANN, R.; WOLF, A.P. Is methylphenidate like cocaine? Studies on their pharmacokinetics and distribution in the human brain. **Archives of General Psychiatry**, v. 52, p.456-63, 1995.

VOLKOW, N.D.; DING, Y.S.; FOWLER, J.S.; WANG, G.J.; LOGAN, J.; GATLEY, dopamine transporter occupancies in the human brain induced by therapeutic doses of oral methylphenidate. **Am J 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. **Journal of Neuroscience**, v.15, p.121, 2001.

VOLKOW, N.D.; WANG, G.; FOWLER, JS, AND DING. Y.S. Imaging the effects of methylphenidate on brain dopamine: new model on its therapeutic actions for attention- deficit/hyperactivity disorder. **Biol Psychiatry**, v. 57, p. 1410-1415, 2005.

WALLACE, D. C. Mitochondrial diseases in man and mouse. **Science**, v. 283, p.1482-1487, 1999.

ZAMETKIN, A.AJ.; LIEBENAUTER, L.L.; FITZGERALD, G.A.; KING, A.C.; MINKUNAS, D.V.; HERSCOVICH, P.; YAMADA, E.M.; COHEN, R.M. Brain metabolism in teenagers with attention-deficit hyperactivity disorder. **Arch. Gen. Psychiatry**, v. 50, p. 333-340, 1993.

ZIGMOND, Michael J. **Fundamental Neuroscience**. San Diego: Academic Press, 1999.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)