

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

ANA OLINDA NICKNICK FAGUNDES

EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE METILFENIDATO SOBRE A
CADEIA RESPIRATÓRIA MITOCONDRIAL E CREATINA QUINASE
EM CÉREBRO DE RATOS JOVENS E ADULTOS

CRICIÚMA (SC), OUTUBRO DE 2009

ANA OLINDA NICKNICK FAGUNDES

**EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE METILFENIDATO SOBRE A
CADEIA RESPIRATÓRIA MITOCONDRIAL E CREATINA QUINASE
EM CÉREBRO DE RATOS JOVENS E ADULTOS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Emilio Luiz Streck

Co-orientador: Prof. Dr. João Quevedo

CRICIÚMA (SC), OUTUBRO DE 2009

Dedico esta tese 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

Ao Divino Pai Eterno, pelo dom da sabedoria e da vida.

Aos colegas da 1ª turma de Doutorado de Ciências da Saúde da UNESC Karin, Fabiana e Tiago pela convivência, companheirismo e amizade.

Às alunas da pós-graduação Gisele, Gislaine, Fabrícia e Gislaine, as quais muito me ensinaram no decorrer do projeto.

Às bolsistas do laboratório pelo apoio na confecção desse trabalho, sem o qual este não teria seus resultados.

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 Glaucia e meu sobrinho Eduardo pelo carinho.

À UNESC e Prefeitura Municipal de Criciúma pela bolsa de estudos e ao Prof. Diogo Silva pelo apoio

AGRADECIMENTO ESPECIAL

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

O conhecimento, não é de quem o detém.

Mas, de quem dele o precisa.

Muito obrigada.

RESUMO

O metilfenidato é frequentemente 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 celular 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 I, II, III e IV da cadeia respiratória mitocondrial e da creatina quinase em cerebelo, córtex pré-frontal, hipocampo, estriado e córtex cerebral de ratos jovens e adultos submetidos à administração aguda e crônica de metilfenidato nas doses de 2, 5, 10mg/kg/dia. Os resultados mostram que os complexos I e III não foram alterados pela administração crônica de metilfenidato em cérebro de ratos jovens. No entanto, a administração aguda diminuiu a atividade do complexo I no cerebelo e córtex pré-frontal, sem afetar os demais complexos. A administração aguda e crônica de metilfenidato causou inibição de todos os complexos da cadeia respiratória mitocondrial no hipocampo, córtex pré-frontal, estriado e córtex cerebral de ratos adultos. Por outro lado, não alteraram suas atividades em cerebelo. A creatina quinase teve sua atividade aumentada após a administração aguda do fármaco no córtex pré-frontal, hipocampo, estriado e córtex cerebral. O mesmo não foi evidenciado em cerebelo de ratos adultos e jovens. Na administração crônica, o metilfenidato também aumentou a atividade enzimática nessas regiões cerebrais, bem como no cerebelo dos animais jovens e adultos. Esse trabalho demonstrou que o metilfenidato exerce efeitos sobre a cadeia respiratória mitocondrial e creatina quinase, que são de fundamental importância na regulação, regeneração e manutenção do ATP.

Palavras-chave: Metilfenidato, cadeia respiratória mitocondrial, creatina quinase, transtorno de déficit de atenção e hiperatividade.

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 I, II, III, and IV and creatine kinase in cerebellum, prefrontal cortex, hippocampus, striatum, and cerebral cortex of young (25 days-old) and adults (60 days-old) rats submitted to acute or chronic administration with methylphenidate doses 2,5 or 10mg/kg/d. Our results showed that complexes I, II, III and IV were inhibited after acute or chronic MPH administration in the hippocampus, prefrontal cortex, striatum and cerebral cortex in adult animals. On the other hand, cerebellum was not affected. The results showed that complexes I and III were not affected by chronic administration of MPH in young rats. Moreover, the acute administration of MPH decreased complex I activity in cerebellum and prefrontal cortex, whereas complexes II, III and IV were not altered. Results showed that MPH acute administration increased the enzyme creatine kinase prefrontal cortex, hippocampus, striatum and cerebral cortex, but not cerebellum of young and adult rats. Chronic administration of MPH also increased CK activity in these brain regions, as well as the cerebellum, in young and adult rats. This study showed that methylphenidate exerts effects on the mitochondrial respiratory chain and creatine kinase, which play an important role in cell energy homeostasis.

Keywords: Methylphenidate, mitochondrial respiratory chain, creatine kinase, attention deficit hyperactivity disorder.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPC - Monofosfato de Adenosina Cíclico

ATP - Trifosfato de Adenosina

CID-10 - Código Internacional de Doenças

CK - Creatina Quinase

CPr - Creatina fosfato

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.....	10
1 INTRODUÇÃO.....	10
1.1 Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade.....	10
1.1.1 Conceito-Histórico.....	10
1.1.2 Tratamento.....	16
1.2 Metilfenidato.....	16
1.2.1 Propriedades Gerais.....	16
1.2.2 Farmacocinética.....	17
1.2.3 Farmacodinâmica.....	19
1.3 Metabolismo Energético Cerebral.....	23
1.4 Metabolismo Intermediário e Cadeia Respiratória.....	24
1.5 Creatina Quinase.....	31
2 JUSTIFICATIVA E PROBLEMA.....	35
3 OBJETIVOS.....	37
3.1 Objetivo Geral.....	37
3.2 Objetivos Específicos.....	37
PARTE II.....	38
4 ARTIGO I.....	38
5 ARTIGO II.....	58
6 ARTIGO III.....	66
PARTE III.....	73
7 DISCUSSÃO.....	73
8 CONCLUSÕES.....	85
9 PERSPECTIVAS.....	86
10 REFERÊNCIAS.....	87

PARTE I - INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade

1.1.1 Conceito- Histórico

O transtorno de déficit de atenção e hiperatividade(TDAH) 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) e DSM-IV-TR (2004 revisão). 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; Miller et al, 1998; Swanson et al, 1998; Kirby et al, 2002; Biederman et al, 2005). 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). A região pré-frontal, onde está o “freio motor”, completa sua maturação por volta dos 7 anos.

Epidemiologicamente, o TDAH tem uma prevalência estimada de 5 a 8% (Rohde et al, 1999; National Institutes of Health, 2000; Faraone et al, 2003; Skounti et al, 2007) 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 (Swanson et al, 1998; Faraone et al, 2003; Polanczyk et al, 2007).

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; Frigério et al, 2006). No entanto, estudos epidemiológicos indicam que essa prevalência pode ser de duas a três vezes maior (Paule et al, 2000; Kessler et al, 2005; Faraone; Zuddas; 2006; Rhode 2007).

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 e 2007). Crianças com TDAH têm tendência a desenvolverem outros transtornos disruptivos do comportamento na infância,

adolescência e idade adulta, principalmente o transtorno oppositor desafiante e de conduta, também problemas acadêmicos, transtornos anti-sociais e abuso de drogas (Faraone, 2000 e 2005; Kooij, 2005; Biederman, 2006). 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). 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; 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. 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, dos 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.

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 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; Swanson et al, 1998; Vaidya et al, 1998; Rubia et al, 2001).

O prejuízo nas tarefas executivas do TDAH está provavelmente relacionado com o córtex pré-frontal dorso lateral. 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 nigroestriada. Não ocorre prejuízo em uma única via ou região cerebral, existem evidências de hipofunção dopaminérgica no lobo frontal e nos gânglios da base. 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 (2001) revisaram as conexões pré-fronto-parietais, que ligam o sistema atencional anterior e posterior e são o suporte anatomofuncional para a memória de trabalho.

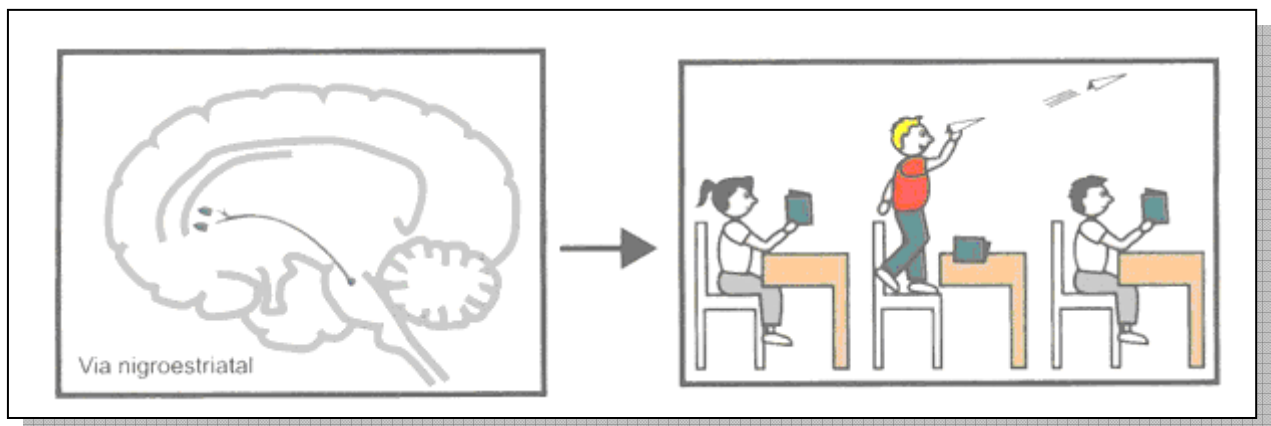


Figura 1 – Hiperatividade no TDAH

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.

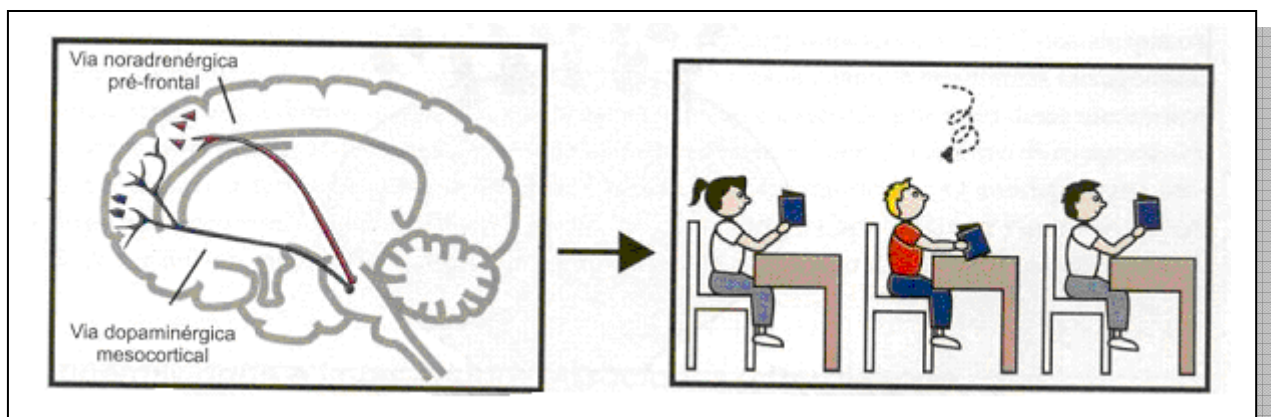


Figura 2 – Déficit de Atenção no TDAH

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.

1.1.2 Tratamento

O tratamento do TDAH envolve uma abordagem múltipla, englobando intervenções psicossociais e psicofarmacológicas (American 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.

1.2 Metilfenidato

1.2.1 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; Markowitz et al, 2003; Volkow et al, 2008).

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 (Volkow et al, 1994; Rubia et al, 2001). 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 (Solanto, 1998; Dougherty et al, 1999). 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).

1.2.2 Farmacocinética

A farmacocinética específica do metilfenidato reside principalmente no enantiômero *D* (Patrick et al, 1987; Ding et al 1997; Quinn, 2008). No cérebro humano, o *D*-metilfenidato liga-se aos DAT enquanto o enantiômero *L*-metilfenidato não (Ding et al, 1997; Quinn, 2008). 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).

1.2.3 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 (Koob, 1996; 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 o bloqueio 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 (Yang et al, 2007).

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 à 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 (via nigroestriatal, mesolímbica/mesocortical, túbero-hipofisário vias dopaminérgicas no sistema nervoso central) (Rang e Dale, 2003).

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, 2002, 2005). 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 (Golinko, 1984; Efron et al, 1997;) déficit de crescimento e recentemente estudos de efeitos psicóticos (Pediatrics, 2009) e toxicidades cardiovascular (Dadfarmay et al, 2009).

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 (Safer e Allen, 1989; National Institutes Statement, 2000; Greenhill, 2001).

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 (Volkow et al, 2004). 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. (Volkow et al 2002; Manjanatha et al, 2008).

1.3 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 (Lehninger et al, 2007). Sob condições normais, os substratos para o metabolismo cerebral são a glicose e o O₂ e seus produtos finais são dióxido de carbono e água. 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. Pequenas quantidades de O₂ 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).

1.4 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).

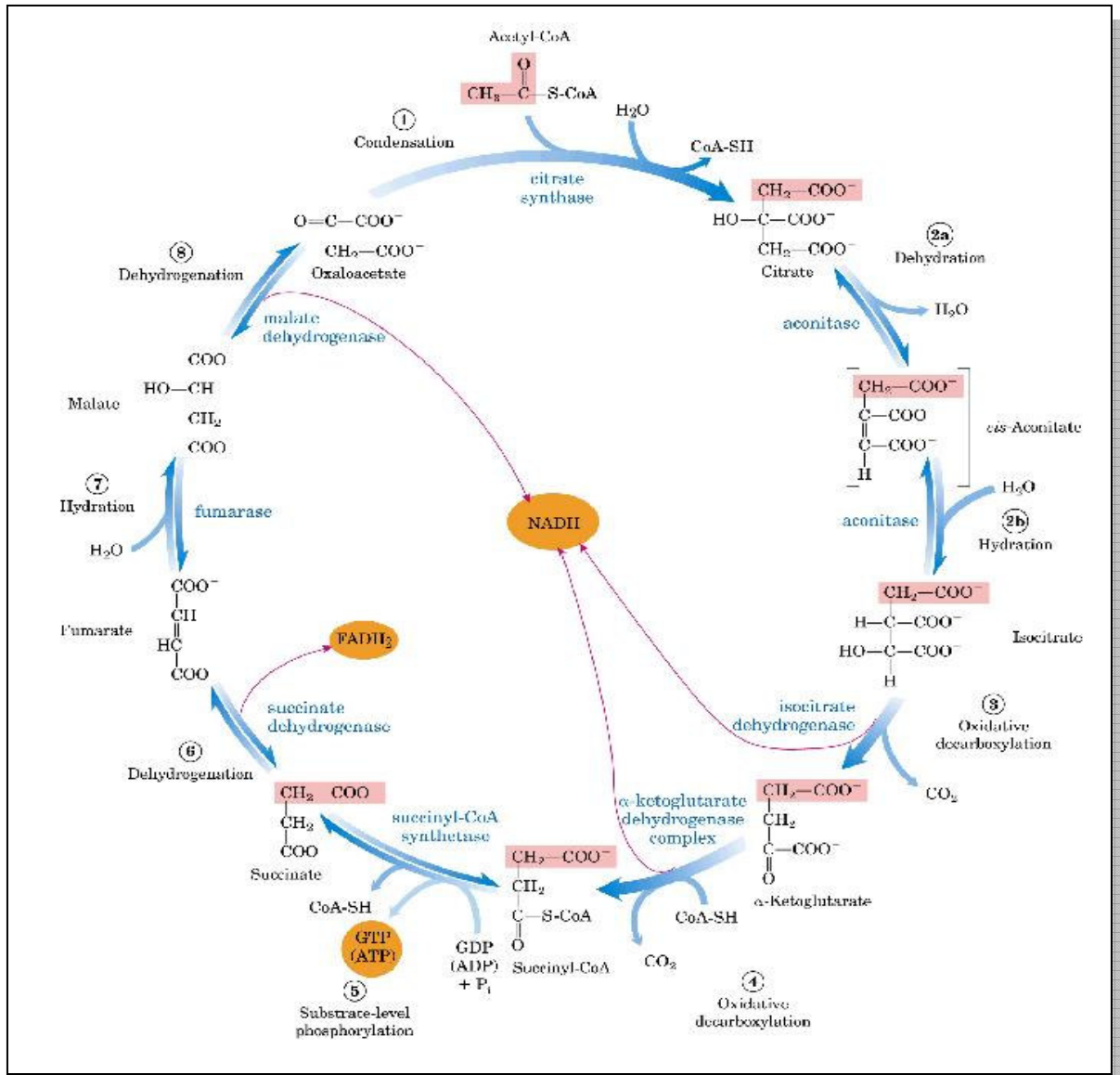


Figura 3 – Ciclo de Krebs
Fonte: NELSON e COX (2007).

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, 2008).

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, 2007).

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 (Clark et al, 1993; Marks et al, 2007; Nelson e Cox, 2007; Berg et al, 2008). Em organismos superiores, o piruvato, formado na glicólise a partir de glicose, pode seguir 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 (Marks et al, 2007, Nelson e Cox, 2007; Berg et al, 2008). 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 (Clark et al, 1993; Marks et al, 2007; Nelson e Cox, 2007; Berg et al, 2008).

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, 2007; Stryer, 2008; Nelson e Cox, 2008). 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 (Leningher, 2007).

A fosforilação oxidativa é o processo principal para obtenção 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, 2007).

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 espaço intermembranas na face mitocondrial interna (Figura 4).

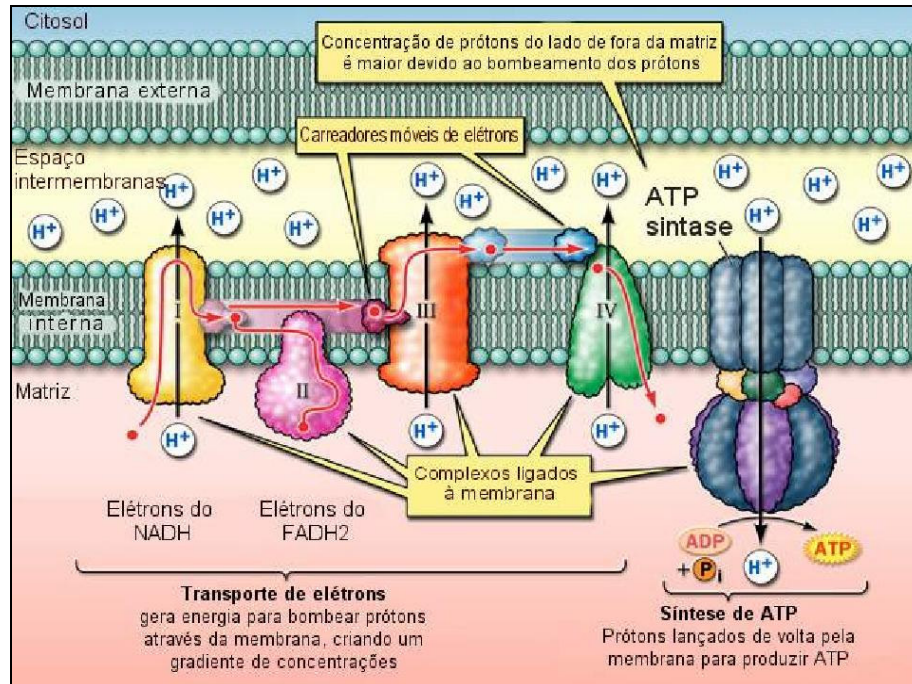


Figura 4 – Cadeia Respiratória Mitocondrial

Fonte: NELSON e COX (2007).

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, 2007).

A cadeia respiratória é basicamente composta de quatro complexos enzimáticos (I, II, III e IV) e 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, 2007). 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 elétrons. 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, 2007). A retida 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 (Voet e Voet, 1995; Wallace, 1999; Berg et al, 2008). O gradiente eletroquímico formado pelo bombeamento de prótons durante a cadeia respiratória mitocondrial é utilizado como força motriz para a ATP sintase, 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 (Heales et al, 1999; Wallace, 1999; Voet e Voet, 2002; Nelson e Cox, 2007; Berg et al, 2008). 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.

1.5 Creatina Quinase

A glicólise aeróbica é o principal meio de síntese de ATP pelo cérebro (Sokoloff, 1989). A taxa de glicólise no cérebro está acoplada ao fluxo sanguíneo cerebral e a taxa de captação de oxigênio. Estas taxas por sua vez são dependentes da utilização do ATP pelos fatores tais como concentração de ADP, pH local ou concentração extracelular de K^+ (Holtzman e Olson, 1983). Uma fonte viável de ATP é sintetizada no cérebro pelo sistema creatina quinase/ creatina fosfato. Justifica-se dizer que esta é uma enzima chave no metabolismo energético do cérebro, por encontrar-se em intensa atividade neste tecido (Norwood et al, 1983).

Esta enzima foi descoberta em extratos de músculos por Karl Lohman, em 1934 (Wallimann et al, 1992). A creatina quinase está localizada em tecidos com alta demanda energética, devido a suas funções fisiológicas, como o cérebro, músculo e

coração (Wyss et al, 1992). Possui cinco isoenzimas, três citoplasmáticas e duas mitocondriais. As citoplasmáticas são compostas por dois tipos de subunidades, a M de “muscle” e a B de “brain”; os nomes são em função dos lugares de onde foram primeiramente isoladas. Essas isoenzimas são conhecidas como CK-MM, encontrada no músculo esquelético, CK-BB, encontrada no cérebro e CK-MB, encontrada no músculo cardíaco (Eppenberg et al, 1967; Wallimann et al, 1992). As isoenzimas da creatina quinase são semelhantes cineticamente, porém se diferem na capacidade de unir-se a organelas subcelulares ou proteínas (Eder et al, 1999). As isoenzimas mitocondriais são chamadas de CK-Mi ubíqua, expressa no cérebro e CK-Mi sarcomérica, expressa no músculo (Saks et al, 1985; Schlegel et al, 1988; Wallimann et al, 1992; Gross et al, 1996) e estão localizadas no espaço intermembrana da mitocôndria (Schlegel et al, 1988; Wyss et al, 1992; Eder et al, 1999). A interação entre as isoenzimas citoplasmáticas e mitocondriais é de fundamental importância para homeostasia energética celular (Silva et al, 2003).

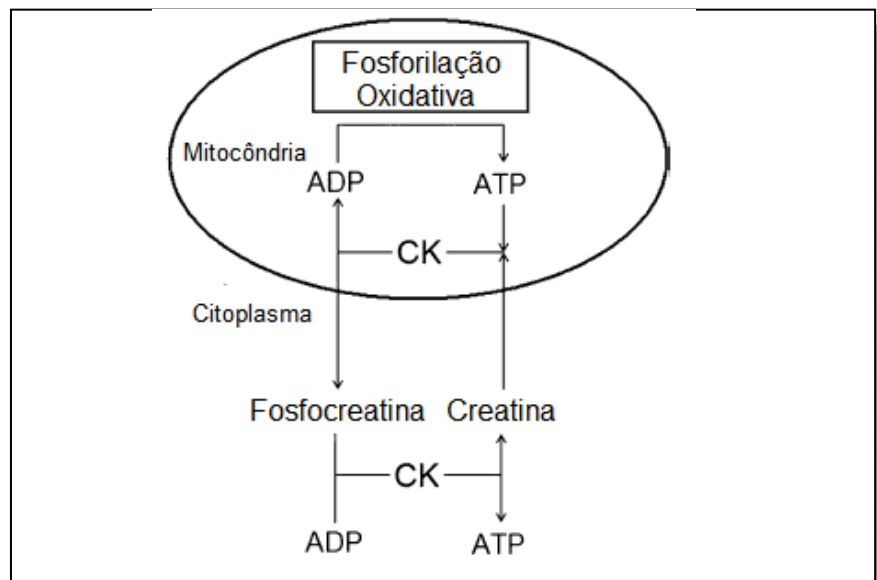


Figura 5 O sistema creatina quinase/fosfocreatina/creatina como sistema de tamponamento dos níveis de ATP celular

Fonte: Rezin et al, (2008).

A creatina quinase é responsável por catalisar reversivelmente a reação entre a creatina fosfato e a ADP, formando creatina e ATP (Berg et al, 2008). O ATP formado na fosforilação oxidativa é transformado em ADP pela ação da creatina quinase, devido à transferência do grupo fosfato ao grupamento guanidino da creatina, formando assim a PCr que sai da mitocôndria enquanto uma nova creatina entra. A PCr é exportada da mitocôndria para os locais de consumo de energia no citoplasma. Desse modo, a CK citoplasmática age sobre a PCr formando o ATP e liberando a molécula de creatina que voltará à mitocôndria para sofrer redução novamente (Bessman & Carpenter, 1985; Schlegel et al, 1988; Schnyder et al, 1991; Wallimann et al, 1992). Tem sido demonstrado também uma relação da CK com ATPases celulares específicas, como as bombas responsáveis por manter gradientes iônicos transmembrana (Molloy et al, 1992; Kaldis et al, 1996).

O cérebro de ratos, bem como outros tecidos com alta e variável taxa de ATP, apresenta alta concentração de PCr e atividade da CK. O sistema de creatina fosfato-creatina quinase é importante para a homeostase energética, sendo responsável pelo controle metabólico (Wallimann et al, 1992; Khuchua et al, 1998; Schlattner e Wallimann, 2000). A concentração de creatina fosfato no cérebro encontra-se igualmente elevada tanto quanto o ATP, a creatina quinase é extremamente ativa nesse tecido. O nível de creatina fosfato é bastante sensível às mudanças na oxigenação provendo o grupamento fosfato para a fosforilação do ADP, desse modo mantendo o nível do ATP (Meyer et al, 1984). O sistema creatina quinase também desempenha papel na regulação da atividade mitocondrial. Nos neurônios com distribuição heterogênea de mitocôndrias, a creatina fosfato desempenha um papel importante no transporte de energia, funciona como um dos tampões metabólicos.

Sabe-se que ocorre alteração da creatina quinase em várias doenças. Neste contexto, MacDonald et al, (2006) demonstrou níveis diminuídos de ácido ribonucléico mensageiro de creatina quinase em pacientes bipolares, especialmente no hipocampo. Outro estudo mostrou que a administração de anfetamina, como um modelo animal de mania, inibiu a atividade da creatina quinase em cérebro de ratos (Streck et al, 2008). Outro estudo demonstrou uma diminuição na atividade da creatina quinase em cérebro de ratos submetidos ao modelo animal de esquizofrenia (dados não publicados). Burbaeva et al, (2003), também mostraram que a creatina quinase apresenta-se alterada no cérebro de pacientes com esquizofrenia, sugerindo que esta diminuição leva a uma disfunção no metabolismo energético cerebral estando envolvido na patogênese deste transtorno.

A CK parece estar envolvida em certas condições patológicas relacionadas com deficiência de energia cerebral. Em condições anóxicas, a adição de creatina ao meio de incubação contendo fatias de cérebro protege a transmissão sináptica e mantém o potencial de ação via Na^+ , K^+ - ATPase (Whittingham e Lipton, 1981); a adição de creatina aumenta os níveis de creatina fosfato reduzindo a queda de ATP, a liberação de Ca^{2+} e a morte celular (Carter et al, 1995). A deficiência congênita de creatina cerebral está associada a disfunção extrapiramidal, convulsões e fraqueza muscular (Stockler et al, 1994). Como a energia é necessária para manter o desenvolvimento e regulação das funções cerebrais, tem sido postulado que o prejuízo na função da CK, pode ser um importante passo no processo neurodegenerativo que leva a perda neuronal no cérebro (Tomimoto et al, 1993). De fato, a atividade da CK está severamente reduzida em várias doenças neurodegenerativas (David et al, 1998; Aksenov et al, 2000).

2 JUSTIFICATIVA E PROBLEMA

O TDAH é a síndrome neuro-comportamental mais freqüente da infância (National Institutes of Health, 2004). Estima-se que esse transtorno ocorra em 3 a 6% da população (Swanson et al, 1998, Skounti et al, 2007; Cardo et al, 2007). No entanto, estudos epidemiológicos indicam que essa prevalência pode ser de duas a três vezes maior (Paule et al, 2000; Faraone et al, 2003; Kashala et al, 2005; Rohde, 2007). Em 2003 numa pesquisa conduzida pelos Centros de Controle e Prevenção de Doenças dos EUA, 7,8% das crianças americanas com idade de 04 a 17 anos já receberam um diagnóstico de TDAH (Andrew et al, Pediatrics, 2009).

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 é amplamente utilizado no tratamento desse transtorno, e o uso desse fármaco aumentou drasticamente nos últimos anos (Greenhill et al, 2002; Centers for Disease Control and Prevention Mental Health, 2008). Internacionalmente o metilfenidato é classificado como substância controlada pela Convenção de Substâncias Psicotrópicas apesar do seu valor médico, apresenta grande probabilidade de abuso por causa do seu potencial de dependência. No Brasil, estudantes têm feito usos indevidos para aumentar concentração e diminuir o cansaço visando elevar o desempenho escolar. O aumento na utilização do metilfenidato levou ao questionamento sobre as conseqüências, em longo prazo, do uso crônico desse fármaco em crianças com TDAH (Kuczenski e Segal, 2001; FDA 2003; US FDA 2006 e FDA MedWatch, 2007) e adultos sem o transtorno. As anfetaminas, bem como outros fármacos psicoestimulantes, têm sido associadas a

déficits dos sistemas cerebrais dopaminérgicos e noradrenérgicos com exposição em longo prazo (Spina e Cohen, 1989; Lavoie 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). Pesquisas recentes sugerem que fármacos usados para o tratamento do TDAH podem ter como efeitos adversos como alucinações e ou outros efeitos psicóticos (Pediatrics, 2009). Por essa razão, é importante conhecer e determinar os efeitos da administração crônica de 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.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Considerando (a) o uso continuado e freqüente do metilfenidato no tratamento do TDAH, (b) que o metilfenidato altera a atividade metabólica cerebral (c) que alterações no metabolismo energético cerebral podem provocar danos neurológicos graves 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 de I à IV da cadeia respiratória mitocondrial e da creatina quinase em cérebros de ratos jovens e adultos.

3.2 Objetivos Específicos

Esse projeto tem como objetivos específicos:

1. Avaliar o efeito da administração aguda de metilfenidato sobre os complexos I, II, III, e IV da cadeia respiratória mitocondrial e da enzima creatina quinase, nas doses de 1 mg/kg, 2 mg/kg e 10 mg/kg no estriado, hipocampo, córtex pré-frontal, córtex cerebral e cerebelo de ratos Wistar jovens e adultos.
2. Avaliar o efeito da administração crônica de metilfenidato sobre os complexos I, II, III e IV da cadeia respiratória mitocondrial e da enzima creatina quinase nas doses de 1 mg/kg, 2 mg/kg e 10 mg/kg no estriado, hipocampo, córtex pré-frontal, córtex cerebral e cerebelo de ratos Wistar jovens e adultos.

PARTE II - RESULTADOS

4 ARTIGO I

Effect of acute and chronic administration of methylphenidate on mitochondrial respiratory chain in the brain of young rats

Ana O. Fagundes, Maira R. Aguiar, Claudia S. Aguiar, Patricia M. Santos, Monique U. Sachet, Nayara M. Bernhardt, Gislane T. Rezin, Samira S. Valvassori, João Quevedo, Emilio L. Streck

Artigo aceito para o periódico Neurochemical Research

5 ARTIGO II**Inhibition of mitochondrial respiratory chain in the brain of adult rats after acute and chronic administration of methylphenidate**

Ana O. Fagundes, Giselli Scaini, Patricia M. Santos, Monique U. Sachet, Nayara M. Bernhardt, Gislaine T. Rezin, Samira S. Valvassori, Patrícia F. Schuck, João Quevedo, Emilio L. Streck

Artigo aceito para publicação no periódico Neurochemical Research

6 ARTIGO III

Methylphenidate increases creatine kinase activity in the brain of young and adult rats

Giselli Scaini, Ana O. Fagundes, Gislaine T. Rezin, Karin M. Gomes, Alexandra I. Zugno, João Quevedo, Emilio L. Streck

Artigo publicado no periódico Life Sciences

PARTE III - DISCUSSÃO

7 DISCUSSÃO

Do grupo das anfetaminas, o metilfenidato é o fármaco de 1ª escolha no tratamento de crianças e adolescentes que apresentam o TDAH, uma vez que este favorece a concentração nas tarefas a serem realizadas, promovendo uma maior estabilidade (Gomes et al., 2007). 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 (Bálint et al., 2008). O diagnóstico é essencialmente clínico, apesar de haver estudos com objetivo de detectar marcadores biológicos para esta doença. Fármacos estimulantes, como o metilfenidato, são usados extensivamente para o tratamento do TDAH para diminuir sintomas de desatenção (Cormier 2008; Ghuman et al., 2008). Também em certas condições como a manutenção do estado de vigília, o metilfenidato pode melhorar a atenção e performance em indivíduos sem o TDAH (Elliott et al., 1997). De fato, com o passar das décadas, tem crescido de forma assustadora o uso de medicamentos estimulantes para melhora de aspectos cognitivos, o que também levou ao aumento dos efeitos de potencial de abuso e droga-adição (Sahakian et al., 2007). 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 (Johann-Liang et al., 2009).

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, Philipson et al., 2008). As propriedades farmacológicas do metilfenidato têm sido bem caracterizadas em diversos estudos pré-clínicos. Pesquisas sugerem que o metilfenidato aumenta o nível extracelular de dopamina no cérebro (Castellanos et al., 1996; Volkow et al., 2004, 2008). Esta hipótese está bem sustentada, em parte por estudos pré-clínicos que encontraram o metilfenidato bloqueando transportadores de dopamina (DAT) e de noradrenalina (Dougherty et al., 1999; Krause, 2000; Solanto, 1998; Volkow et al., 2004, 2008). Disfunções dos sistemas dopaminérgicos e noradrenérgicos estão implicadas na patogênese do TDAH (Dougherty et al., 1999; Solanto, 1998). Os DAT são os principais responsáveis pela remoção e recaptação 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 (Volkow et al., 2004). Este efeito agonista dopaminérgico está relacionado com suas propriedades terapêuticas. Por outro lado, evidências na literatura sugerem que o metilfenidato, bem como outros fármacos estimulantes, tem provocado alterações da ordem neurobiológicas, quando usadas por longos períodos (Beal, 1992; Heales et al., 1999; Blass, 2001; Schurr, 2002; Klein-Schwartz 2002, US FDA 2006; FDA MedWatch, 2007) levando a alterações no metabolismo

cerebral. O prejuízo ou diminuição de energia no cérebro pode levar a neurodegenerações e até morte neuronal.

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 (Narjaro et al., 1981; Gross-Tusur et al., 2002; Hussson et al., 2004, Gelperin et al., 2006). Algumas pesquisas têm sido focadas nos efeitos do metilfenidato sobre o SNC em crianças e adolescentes, sobre alterações na função do sistema dopaminérgico (Bloom et al., 1988; Brandon E Steiner, 2003; Federici et al., Mague et al., 2005), expressão gênica (Penner et al., 2002; Chase et al., 2003, 2007; Brandon and Steiner, 2003; Federici et al., 2005; Mague et al., 2005) e outras alterações moleculares no metabolismo neuronal (Fukai et al., 2003).

No presente trabalho, foram analisadas as atividades de algumas enzimas da cadeia respiratória mitocondrial em cérebro de animais Wistar jovens e adultos, expostos a administração crônica e aguda do metilfenidato. Particularmente, foram analisadas as atividades de enzimas do complexo de I à IV da cadeia respiratória e a enzima creatina quinase que são na maioria dos tecidos responsáveis pela obtenção de ATP e manutenção do equilíbrio homeostático energético. (Bressman et al., 1985; Wallimann et al., 1992; Fagundes et al., 2007).

Foi demonstrado que, após a administração aguda e crônica de metilfenidato em ratos adultos, houve inibição da atividade enzimática dos quatro complexos da cadeia respiratória mitocondrial, em particular nas regiões do hipocampo, córtex pré-frontal, estriado e córtex cerebral. Por outro lado, não se observou alterações em região de cerebelo. Volkow et al., em (2004) demonstrou que o metilfenidato distribui-se de forma heterogênea em todo o cérebro, alcançando

seus níveis mais elevados na região do estriado, córtex cerebral, córtex pré-frontal e cerebelo.

Nosso estudo quanto à administração crônica de metilfenidato em cérebro de ratos jovens demonstrou que os complexos I e III não foram afetados. Por outro lado, a administração aguda de metilfenidato diminuiu a atividade do complexo I nas regiões do cerebelo e córtex pré-frontal, os demais complexos não sofreram alterações.

Nesse trabalho, foi demonstrado que a atividade da CK aumentou após administração tanto aguda quanto crônica de metilfenidato em cérebro de ratos jovens e adultos. Os resultados demonstraram que agudamente, a administração de metilfenidato aumentou a atividade da CK nas regiões do córtex pré-frontal, hipocampo, estriado e córtex cerebral de animais jovens e adultos nas doses de 10mg/kg. Também foi verificado que dose de 2mg/kg, que é a dose para tratamento de TDAH, aumentou a atividade da CK somente no córtex pré-frontal de ratos jovens, não sendo alterada em cerebelo de ratos jovens e adultos. Por outro lado, a administração crônica levou ao aumento da CK em todas as áreas do cérebro de ratos jovens na dose de 10mg/kg. Na dose de 2mg/kg o aumento também foi geral com exceção do cerebelo. Situação semelhante foi averiguada em animais adultos.

A administração aguda de metilfenidato em ratos jovens nas doses de 10mg/kg produziu padrão de efeitos semelhantes na atividade da CK em relação a animais adultos. A administração aguda do fármaco na dose intermediária de 2mg/kg não alterou a atividade da CK em qualquer área do cérebro estudada, exceto para córtex pré-frontal de ratos jovens. A administração crônica de metilfenidato produziu efeito de aumento da atividade da CK em cérebro de ratos jovens incluindo o cerebelo na maior dose. A dose intermediária também resultou em

aumento nas áreas do hipocampo, córtex pré-frontal e estriado. Em ratos adultos, somente na administração crônica (na dose mais alta) observou-se aumento da atividade da CK.

Em 2007, Fagundes et al., demonstram que metilfenidato altera a atividade enzimática dos complexos II e IV da cadeia respiratória em cérebro de ratos jovens. Porrino e Lucignani (1987) já mostraram que a administração aguda de metilfenidato leva à redução da utilização de glicose cerebral localizada. Volkow e colaboradores (2008) demonstraram que o metilfenidato diminui a quantidade de glicose cerebral necessária para o desempenho de tarefas cognitivas. Os estudos para o uso de estimulantes como metilfenidato e anfetaminas para a melhora das tarefas cognitivas tem aumentado consideravelmente, mas ainda existem muitas controversas. Ainda não se sabe ao certo como eles atuam ou porque melhoram a performance em alguns indivíduos e em outros não.

Fármacos psicoestimulantes, como as anfetaminas e metilfenidato, tem sido associados a longo prazo com déficits dos sistemas cerebrais dopaminérgicos e serotoninérgicos, resultando na geração de espécies reativas de oxigênio (La Voie et al., 1999 e Page et al., 2001). A inibição da cadeia respiratória mitocondrial, posteriormente leva a uma grande produção de espécies reativas de oxigênio (Schneider et al., 1996 e Berman et al., 1999). Isto pode ter como conseqüências diminuição na obtenção de ATP (Chan et al., 1994 e Virmani et al., 2002). O complexo enzimático I é o principal responsável pela entrada de elétrons na cadeia mitocondrial. Postula-se que danos neste sistema afetam o funcionamento de transferência dos elétrons e com isso a obtenção de ATP. A inibição do complexo I levou a geração de anion superóxido (Navarro e Boveris, 2007). A queda na obtenção de ATP (Chan et al., 1994; Virmani et al., 2002) pela inibição da função

mitocondrial também determina o aumento de espécies reativas de oxigênio (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.

Alterações na obtenção energética em nível cerebral estão relacionadas a doenças neuronais e consequente neurodegeneração (Beal, 1992 e Lin et al., 2006).

Andreazza e colaboradores em (2007) demonstraram que o metilfenidato aumentou índices de dano no DNA de ratos jovens e adultos. No estudo de Andreu e colaboradores de (1998) onde compararam padrões eletroforéticos de produtos da transcrição de DNA mitocondrial de ratos jovens, adultos e senis. Este estudo revelou uma diminuição na taxa de síntese de RNAs mitocondriais idade dependente. Por outro lado, houve um aumento idade dependente da proteína carbonyl contida nas membranas mitocondriais, principalmente de animais senis, sugerindo dano mitocondrial oxidativo. A redução na síntese de RNAs e as alterações causadas pela peroxidação lipídica das membranas mitocondriais poderiam contribuir para o enfraquecimento da função mitocondrial. Desse modo, sugere-se que a inibição dos complexos da cadeia respiratória causados pelo metilfenidato pode exercer efeito tóxico sobre o cérebro de ratos Wistar adultos.

O metilfenidato tem ação psicomotora similar à cocaína e às anfetaminas, (Koob et al., 1998; Wise e Bozarth, 1987; Volkow et al., 2007). Estudos têm mostrado que o metilfenidato possui propriedades estimulantes, induz o aumento à dose dependente em regiões cerebrais ativadas pelas drogas de abuso (Klein-Schwartz 2002; Gerasimov et al., 2000; Volkow et al., 1998, 2005, 2007; Yung et al., 1981). 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 (Bolanós 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).

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 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, 1998).

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).

Os efeitos do metilfenidato sobre o metabolismo cerebral ainda são pouco conhecidos, dado a este fato, além do estudo dos complexos enzimáticos da cadeia respiratória mitocondrial, foi de fundamental importância o estudo da CK que desempenha um papel importante na homeostase da energia celular. Regenera de forma rápida o ATP em tecidos com altas demandas como o cérebro, músculos e coração. A enzima catalisa de maneira reversível de transferência grupamento y-fosfato do ATP para o grupamento guanidino de creatina formando PCr e ADP (Bessman e Carpenter, 1985; Wallimann et al., 1992).

Muitos trabalhos têm demonstrado que uma diminuição na atividade da CK está associada a doenças neurodegenerativas (David et al., 1998; Aksenov et al., 2000) e outros estados patológicos (Gross et al., 1998; Streck et al., 2008). Em nosso laboratório, recentemente foi demonstrado que alguns antipsicóticos como haloperidol e holanzapina inibem atividade de CK em cérebro de ratos Wistar (Assis et al., 2007), também foi inibida após eletroconvulsoterapia (Burigo et al., 2006) e por compostos de Rutênio (Zanette et al., 2007).

Neste contexto, nossos resultados podem estar relacionados com estudo realizado por Kolb e colaboradores em (2003) que relata que fármacos psicoestimulantes como as anfetaminas e cocaína podem promover o crescimento

neuronal em algumas regiões cerebrais, dado a este fato poderia se especular que o aumento da atividade da CK estaria relacionado ao aumento da produção de ATP. Por outro lado, Ricacuarde (2005) demonstrou que o uso de anfetaminas semelhante ao que é usado na clínica para o TDAH, danifica as terminações nervosas dopaminérgicas no estriado de adultos primatas (não humanos). Pelo que foi demonstrado em nossos estudos, pode-se concluir que os efeitos neurotóxicos são mais pronunciados em cérebro de animais adultos do que nos jovens.

O uso recreativo de metilfenidato isto é doses de 10mg/kg parece estar aumentando de forma considerável, e a definição deste tipo de administração em roedores não é ainda muito bem explorada (Volkow, 2006). Doses inferiores a 5mg/kg de metilfenidato via intraperitoneal reflete aquelas usadas clinicamente. No presente estudo, observou-se que os efeitos mais pronunciados ocorreram nas doses mais elevadas principalmente em relação a atividade da CK. Neste contexto um estudo de interesse foi o de Botly et al., (2008) que caracteriza a administração intravenosa de metilfenidato em ratos demonstrando que dopamina medeia os efeitos de reforço. Em uma análise Yano e Steiner (2007) apresentaram estudos sobre efeitos do metilfenidato no uso em longo prazo sobre o desenvolvimento cerebral. Algumas modificações como alterações nos genes da transcrição que são semelhantes aquelas que ocorrem com cocaína e anfetaminas. Outros efeitos como a expressão de peptídeos opioides e densidades moleculares pós-sináptica diferem entre metilfenidato, cocaína e anfetamina. Como discutido entre esses autores, as diferenças sustentam que o metilfenidato produz menos neuroadaptação que cocaína e anfetamina.

O TDAH tornou-se um diagnóstico crescente e comum em crianças na idade escolar e em adultos, muitos dos quais são tratados com fármacos

psicoestimulantes como o metilfenidato (Pediactrics, 2009). É de fundamental importância que pesquisas sejam realizadas para que o sucesso terapêutico não seja sobreposto por efeitos indesejáveis, uma vez que alterações na obtenção e manutenção de energia (ATP) estão relacionadas a morte neuronal e neurodegeneração (Heales et al., 1999; Di Donato, 2000; Blass 2001; Schurr 2002).

8 CONCLUSÕES

1. A administração aguda de metilfenidato em cérebro de ratos jovens levou a inibição da atividade do complexo I da cadeia respiratória no cerebelo e córtex pré-frontal;
2. A administração crônica de metilfenidato em cérebro de ratos jovens levou ao aumento da atividade enzimática dos complexos II e IV;
3. Tanto a administração aguda quanto crônica em animais adultos levou a inibição dos quatro complexos da cadeia respiratória mitocondrial;
4. A administração de metilfenidato em cérebro de ratos jovens e adultos tanto aguda quanto crônica levou ao aumento da atividade da CK nas áreas cerebrais estudadas com exceção do cerebelo. Também um efeito mais pronunciado na dose mais elevada de 10mk/kg.

9 PERSPECTIVAS

1. Avaliar a expressão dos complexos I, II, III e IV da cadeia respiratória mitocondrial e da creatina quinase após administração de metilfenidato em cérebro de ratos.
2. Avaliar outros parâmetros de metabolismo energético cerebral após a administração de metilfenidato.
3. Avaliar a atividade e a expressão dos complexos I, II, III e IV da cadeia respiratória mitocondrial e da creatina quinase após administração de metilfenidato, em cérebro de animais da linhagem SHR (do inglês, *spontaneous hypertensive rats*), considerado um modelo animal de TDAH.

10 REFERÊNCIAS

- AKSENOV M; AKSENOV M; BUTTERFIELD DA; MARKESBERY WR. Oxidative modification of creatine kinase BB in Alzheimer's disease brain. **J. of Neuroche.**, 74: 2520-2527. 2000.
- 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. Psych.**, 36: 85-121. 1997.
- ANDERSEN SL; ARVANITOGIANNIS A; PLISKAS A; LEBALNC, C; CARLEZON WA. Altered responsiveness to cocaine in rats exposed to methylphenidate during development. **Nature**, 5:13-14. 2001.
- ANDREW D; MOSHOLDER KG; TAREK AH; KATHELEEN P; ROSEMARY JOHANN-LIANG. Alucinações e Outros Sintomas Psicóticos Associado ao Uso de Medicções para o TDAH em crianças. **Pediatrics**, 123:611-616. 2009.
- ASSIS LC; SCAINI G; DI-PIETRO PB; CASTRO AA; COMIM CM; STRECK EL; QUEVEDO J. Effect of antipsychotics on creatine kinase activity in rat brain. **Basic & Clini. Pharmacol. & Toxicol.**, 101:315-319. 2007.
- AYLWARD EH; REISS AL; READER MJ; SINGER HS; BROWN JE; DENCKLA MB. Basal ganglia volumes in children with attention-deficit hyperactivity disorder. **J. Child. Neurol.**, 11:112-115. 1996.
- APA. **Manual Diagnóstico e Estatístico dos Transtornos Mentais**. 4 ed. (DSM-IV-TR). Porto Alegre: Artmed. 2004.
- BARKLEY RA E COLS. Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade. Manual para diagnóstico e tratamento. In: **História** (Barkley RA). Porto Alegre: Artmed, 15-87. 2008.

- BÁLINT S; CZOBOR P; MÉSZÁROS A; SIMON V; BITTER I. Neuropsychological impairments in adult attention déficit hyperactivity disorder: a literature review. **Psychiatr. Hung.**, 23:324-35. 2008.
- BEAL MF. Does impairment of energy metabolism result in excitotoxic neuronal death in neurological illnesses? **Annals of Neurol.**, 31:119-130. 1992.
- BENES FM. Brain development, VII.Human brain growth spans decades. **Am.J. Psych.**, 155:1489. 1998.
- BERG JM; TYMOCZKO JL; STRYER L. **Bioquímica**. 6 ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 2008.
- BESSMAN SP; CARPENTER CL. The creatine-creatine phosphate energy shuttle. **Annual Rev. of Bioch.**, 54: 831-862. 1985.
- BERRIDGE KC; ROBINSON TE. GAT is the role of dopamine in reward: Hedonic impact, reward learning, or incentive salience? **Brain Res. Brain Res. Rev.**, 28:309-369. 1998.
- BERMAN SB, HASTINGS TG. Dopamine oxidation alters mitochondrial respiration and induces permeability transition in brain mitochondria: implications for Parkinson's disease. **J. Neuroch.**, 73:1127-1137. 1999.
- BIEDERMAN J; FARAONE SV. The Massachusetts General Hospital studies of gender influences on attention-deficit/hyperactivity disorder in youth and relatives. **Psychiatr. Clin. North Am.**, 27:225-232. 2004.
- BIEDERMAN J; MONUTEAX M; SEIDMAN L. Impact of executive function deficits and ADHD on academic outcomes in children. **J. Consult. Clin. Psychol.**, 72:757-766. 2004.
- BIEDERMAN J; FARAONE SV. Attention-deficit hyperactivity disorder. **The Lancet** 366:237-248. 2005.

- BIEDERMAN J; MONUTEAUX MC; MICK E. Young adult outcome of attention deficit hyperactivity disorder: a controlled 10-year follow-up study. **Psychol. Med.**, 36:167-179. 2006.
- BOLANÓ S CA; BARROT M; BERTON O; WALLACE-BLACK D; NESTLER EJ. Methylphenidate treatment during pre- and periadolescence alters behavioral responses to emotional stimuli at adulthood. **Biol. Psych.**, 54:1317-29. 2003.
- BOTLY LC; BURTON CL; RIZOS Z; FLETCHER PJ. **Characterization of methylphenidate self-administration and reinstatement in the rat. Psychopharmacology**, 199:55-66. 2008.
- BURIGO MR; BASSANI C; FEIER G; DAL-PIZZOL F; QUEVEDO J; STRECK EL. Decreased creatine kinase activity caused by electroconvulsive shock. **Neuroch. Resea.**, 31:877-81. 2006.
- BURBAEVA GS; SAVUSHKINA OK; BOKSHA IS. Creatine kinase BB in brain in schizophrenia. **The World J. of Biol. Psych.**, 4:177-183. 2003.
- BLOOM AS; RUSSELL LJ; WEISSKOPF B; BLACKERBY JL. Methylphenidate-induced delusional disorder in a child with attention deficit disorder with hyperactivity. **J. Am. Acad. Child Adolesc. Psych.**, 27:88-89. 1988.
- BRANDON CL; STEINER H. Repeated methylphenidate treatment in adolescent rats alters gene regulation in the striatum. **Eur. J. Neuros.**, 18:1584-1592. 2003.
- BESSMAN SP; CARPENTER CL. The creatine–creatine phosphate energy shuttle. **Annual Rev. of Bioch.**, 54:831-865. 1985.
- CARDINAL RN; PENNICOTT DR; SUGATHAPALA CL; ROBBINS TW; EVERITT BJ. Impulsive choice induced in rats by lesions of nucleus accumbens core. **Science**, 2499-2501. 2001.
- CARDO E; SERVERA M; LLOBERA-CANAVES J. Estimation of the prevalence of attention deficit hyperactivity disorder among the standard population on the island of Majorca. **Rev. Neurol.**, 44:10-14. 2007.

- CARBONI E; SILVAGNI A. Experimental investigations on dopamine transmission and methylphenidate in ADHD. **Neural Plast** ,11:79-95. 2004.
- CARLEZON WA; THOME J; OLSEN VG; LONE-LODD SB; BROCKEN ES; HIROI N; DUMAN R; NEVE RL; NESTLER J. Regulation of cocaine reward by CREB. **Science**, 282: 2272-2275. 1998.
- CARLEZON WA; MANGUE SD; ANDERSEN EL. Enduring behavioral effects of early exposure to methylphenidate in rats. **Biol. Psych.**, 54:1330-3. 2003.
- CARTER AJ; MULLER ER; PSCHOM U; STRANSKY W. Preincubation with creatine enhances levels of creatine phosphate and prevents anoxic damage in rat hippocampus slices. **J. Neuroch.**, 64:2691-2599. 1995.
- CASEY B.J; CASTELLANOS FX; GIEDD JN. Implication of right frontostriatal circuitry in response inhibition and attention deficit/hyperactivity disorder. **J. of the Am. Acad. of Child and Adolesc. Psych.**, 374-383. 1997.
- CASTELLENOS FX; ELIA J; KRUESI MJ; GULOTTA CS; MEFFORD IN; POTTER WZ; RITCHIE GF; RAPOPORT JL. Cerebrospinal fluid monoamine metabolites in boys with attention-deficit hyperactivity disorder. **Psych. Res.**, 52:305-316. 1996a.
- CASTELLANOS FX; GIEDD JN; MARSH WL; HAMBURGER SD; VAITUZIS AC; DICKSTEINS DP. Quantitative brain magnetic resonance imaging in attention deficit hyperactivity disorder. **Arch. Gen. Psych.**, 607-616. 1996b.
- CASTELLANOS FX; ELIA J; KRUESI MJ; MARSH WL; GULOTTA CS; POTTER WZ. Cerebrospinal fluid homovalillic acid predicts behavioral response to stimulants in 45 boys with attention deficit/hyperactivity disorder. **Neuropsychol**, 14:125-772. 1996.
- CASTELLENOS FX. Toward a pathophysiology of attention-deficit/hyperactivity disorder. **Cin. Pediatr. (Phila)**, 36:381-393. 1997.
- CEPHALON, INC. PROVIGIL PRESCRIBING INFORMATION, 2008.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, MENTAL HEALTH IN USA: prevalence of diagnosis and medication treatment for ADHD-United States, 2003, accessed November 21, 2008

CHAN P; DI MONTE DA; LUO JJ; DELANNEY LE; IRWIN I; LANGSTON JW. Rapid ATP loss caused by methamphetamine in the mouse striatum: relationship between energy impairment and dopaminergic neurotoxicity. **J. Neuroch.**, 62:2484-2487. 1994.

CHASE TD; BROWN RE; CARREY N; WILKINSON M. Daily methylphenidate administration attenuates c-fos expression in the striatum of prepubertal rats. **Neuroreport**, 14:769-772. 2002.

CHASE TD; BROWN RE; CARREY N; WILKINSON M. Daily methylphenidate administration attenuates c-fos expression in the striatum of prepubertal rats. **Neuroreport**, 15:769-772. 2003.

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

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

CHEETA S; KENNY PJ; FILE S.E. Hippocampal and septal injections of nicotine and 8-OH-DPAT distinguish among different animal tests of anxiety. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psych.**, 24:1053-67. 2000.

CLARK JB; BATES TE; CULLINGFORD T; LAND JM. Development of enzymes of energy metabolism in the neonatal mammalian brain. **Dev. Neurosci-Basel**, 17:174-180. 1993.

CORMIER E. Attention Deficit/Hyperactivity Disorder: A Review and Update. **J. of Ped. Nurs.**, 23:345-357. 2008.

- COYLE JT. Psychotropic drug use in very young children. **Jama**, 283:1059-1060. 2000.
- COOK EH; STEIN MA; KRASOWSKI MD; COX NJ; OIKON DM; KIEFFE JE. Association of attention deficit/disorder and the dopamine transporter gene. **Am. J. Hum. Gener.**, 993-998. 1995.
- DADFARMAY S; DIXON J. A Case of Acute Cardiomyopathy and Pericarditis Associated with Methylphenidate. **Cardiovascular Toxicology**, 9:49-52. 2009.
- DEVLIN TM. **Manual de bioquímica**: com correlações clínicas. Edgard Blücher, São Paulo, 2007.
- DAVID S; SHOEMAKER M; HALEY BE. Abnormal properties of creatine kinase in Alzheimer's disease brain: correlation of reduced enzyme activity and active site photolabeling with aberrant cytosol-membrane partitioning. **Molec. Brain Resear.**, 54:276-287. 1998.
- DESMOND JE; FIEZ JA. Neuroimaging studies of the cerebellum: language, learning, and memory. **Trends Cogn. Sci.**, 2:355-362. 1998.
- DI DONATO S. Disorders related to mitochondrial membranes: pathology of the respiratory chain and neurodegeneration. **J. of Inherited Metaboli. Disor.**, 23:247-263. 2000.
- DICKINSON CJ. Cerebral oxidative metabolism in hypertension. **Clin. Sci.**, 91:539-550, 1996.
- DINN WWM; ROBBINS NC; HARRIS CL. Adult attention-deficit/hyperactivity disorder: neuropsychological and clinical presentation. **Brain Cogn.**, 46:114-121. 2001.
- DING YS; FOWLER JS; VOLKOW ND; DEWEY SL; WANG GJ; LOGAN J. **Chiral drugs**: Comparison of the pharmacokinetics of [11C]d-treo and L-treo-methylphenidate in the human and baboon brain *Psychopharmacology (Berl)*, 71-78. 1997.

- DOUGHERTY DD; BONAB AA; SPENCER TJ; RAUCH SL; MADRAS BK; FISCHMAN AJ. Dopamine transporter density in patients with attention deficit hyperactivity disorder. **Lancet**, 354:2132-2133. 1999.
- DUTRA JC; WAJNER M; WANNMACHER CF; DUTRA-FILHO CS; WANNMACHER CMD. Effects of methylmalonate and propionate on glucose and ketone bodies uptake "in vitro" by developing rats. **Bioch. Med. and Metabol. Biol.**, 45:56-64. 1991.
- EDER M; SCHLATTNER U; BECKER A; WALLIMANN T; KABSCH W; FRITZ-WOLF K. Crystal structure of brain-type creatine kinase at 1.41 Å resolution. **Protein Science**, 11:2258-2269. 1999.
- EPPENBERGER HM; DAWSON DM; KAPLAN NO. The comparative enzymology of creatine kinases isolation and characterization from chicken and rabbit tissues. **J. of Biol. Chem.**, 242: 204-209. 1967.
- 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**, 100:662-666. 1997.
- EBSTEIN RP; NEMANOV L; KLOTZ I; GRINTSENKO I; BELMAKER RH. Additional evidence for an association between the dopamine D4 receptor(DRD4) exon III repeat polymorphism and human personality trait of novelty seeking. **Mol. Psych.**, 2:472-477. 1997.
- ELLIOTT R; SAHAKAIN BJ; MATTHEWS K; BANNERJEA A; RIMMER J. Effects of methylphenidate on spatial working memory and planning in healthy young adults. **Psychopharmacology (Berl)**, 131:196-206.1997
- ERECINSKA M; SILVER IA. Ions and energy in mammalian brain. **Prog. Neurobiol.**, 43:37-71. 1994.
- ERNEST M; ZAMETKIN AJ; MATOCHIK JA. PASCUALVACA D; JONS PH; COHEN, RM. Additional evidence for an association between the dopamine D4 receptor

(DRD4) axon III repeat polymorphism human personality study. **J. Neurosci.**, 18:5901-5907. 1998.

ERNEST M; ZAMETKIN AJ; MATOCHIK JA; PASCUALVAGA D; JONS PH; COHEN, RM. High midbrain (18F) DOPA accumulation in children with attention deficit hyperactivity disorder. **Am. J. Psych.**, 156:1209-1215. 1999.

FDA. Food and Drug Administration. Pediatric Advisory Committee Meeting, June 30, 2006.

FDA MedWatch Attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) drug products: medication guides required to alert patients to possible cardiovascular and psychiatric risks. 2007.

FAGUNDES AO; REZIN GT; ZANETTE F; GRANDI E; ASSIS LC; DAL-PIZZOL F, QUEVEDO J; STRECK EL. Chronic administration of methylphenidate activates mitochondrial respiratory chain in brain of young rats. **Inter. J. of Devel. Neuros.**, 25:47-51. 2007.

FALOONA GR; SRERE PA. Escherichia coli citrate synthase. Purification and the effect of potassium on some properties. **Biochemistry**, 8:4497-4503. 1969.

FARAONE SV; BIEDERMAN J. Neurobiology of attention deficit hyperactivity disorder. **Biol. Psych.**, 44:951-958. 1998.

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

FARAONE SV; BIEDERMAN J. What is the prevalence of adult ADHD? Results of a population screen of 966 adults. **J. Atten. Disord.**, 9:384-391. 2005.

FARAONE SV; BIEDERMAN J; MICK E. The age-dependent decline of attention deficit hyperactivity disorder: a meta-analysis of follow-up studies. **Psychol. Med.**, 36:159-165. 2006.

- FEDERICI M; GERACITANO R; BERNARDI G; MERCURI; NB. Actions of methylphenidate on dopaminergic neurons of the ventral midbrain. **Biol. Psych.**, 57:361-36. 2005.
- FILE, S.E.; KENNY, P.J.; CHEETA, S. The role of the dorsal hippocampal serotonergic and cholinergic systems in the modulation of anxiety. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 66:65-72, 2000.
- FILIPEK PA; SEMRUDCLIKEMAN M; STEINGARD RJ; RENSHAW PF; KENNEDY DN; BIEDERMAN J. Volumetric MRI analysis comparing subjects having attention-deficit hyperactivity disorder with normal controls. **Neurolog.**, 48:589-601, 1997.
- FISCHER JC; RUITENBEEK W; BERDEN JA; TRIJBELS JM; VEERKAMP JH; STADHOUDERS MS; SENGERS RC; JANSEN AJ. Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. **Clin. Chim. Acta.**, 153:23-26. 1985.
- FUKUI R; SVENNINGSSON P; MATSUSHI T; HIGASHI H; NAIRN AC; GREENGARD P; NISHI A. Effect of methylphenidate on dopamine/DARPP signalling in adult, but not young, mice. **J. of Neurochem.**, 87:139-1401. 2003.
- FRIGERIO A; VANZIN L; PASTORE V. The Italian preadolescent mental health project (PrISMA): rationale and methods. **Int. J. Methods Psychiatr. Res.**, 15:22-35. 2006.
- GAINETDINOV RR; WETSEL WC; JONES SR; LEVIN ED; JABER M; CARON MG. Role of serotonin in the paradoxical claming effect of psychostimulants on hyperactivity. **Science**, 283:39-402. 1999.
- GAINETDINOV RR; WETSEL SR; JONES ED; LEVIN M; JABER MG. Role on serotonin in the paradoxical calming effect of psychostimulants on hyperactivity. **Science**, 98:39-401. 2001.
- GELPERIN K; PHELAN K. Psychiatric adverse events associated with drug treatment of ADHD: review of postmarketing safety data. **FDA Report**, 2006.

- GERASIMOV MR; FRANCESCHI M; VOLKOW ND; RICE O; SCHIFFER WK; DEWEY SL. Synergistic interactions between nicotine and cocaine or methylphenidate depend on the dose of dopamine transporter inhibitor. **Synapse**, 38:432-437. 2000.
- GIROS B; JABER M; JONES SR; WIGHTMAN RM; CARON MG. Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. **Nature**, 379:606-612. 1996.
- GOLINKO BE. Side effects of dextroamphetamine and methylphenidate in hyperactive children- a brief review. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psych.**, 8:1-8. 1984.
- GOLDMAN LS; GENEL M; SLANETZ PJ. Diagnosis and treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder in children and adolescents. Council on Scientific Affairs, American Medical Association. **JAMA**, 279:1100-1107. 1998.
- GOODMAN e GILMAN. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**, 11 ed. McGraw-Hill, Rio de Janeiro, 233-301. 2006.
- GOMES M; PALMINI A; BARBIRATO F; ROHDE LA; MATTOS P. Conhecimento sobre o transtorno de déficit de atenção/hiperatividade no Brasil. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, 56:94-101. 2007.
- GUYTON AC. **Neurociência Básica: Anatomia e Fisiologia**. 6ª ed. Guanabara Koogan, 2006.
- GHUMAN JK; ARNOLD LE; ANTHONY BJ. Psychopharmacological and other treatments in preschool children with attention deficit/hyperactivity disorder: current evidence and practice. **J. Child Adolesc. Psychopharmacol.**, 18:413-47. 2008.
- GROSS WL; BOK MI; INGWALL JS; ARSTALL MA; SMITH TW; BALLIGAND JL; KELLY R. Nitric oxide inhibits creatine kinase and regulates rat heart contractile reserve. **Proceed. of the Nat. Acad. of Scien.**, 93: 5604-5609. 1998.

- GROSS-TSUR V; JESEPH A; SHALEV RS. Hallucinations during methylphenidate therapy. **Neurology**, 63:753-754. 2004.
- HAN DD; GUN HH. Comparison of the monoamine transporters from human and mouse in their sensitivities to psychostimulant drugs. **BMC Pharmacol.**, 6:1471-2210. 2006.
- HARRISON PJ. The neuropathology of schizophrenia. A critical review of the data and their interpretation. **Brain**, 122:593-624. 1999.
- HEALES SJ; BOLAÑOS JP; STEWART VC; BROOKES PS; LAND JM; CLARK JB. Nitric oxide, mitochondria and neurological disease. **Biochim. et Biophys. Acta.**, 1410:215-228. 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.**, 46:185-188. 1998.
- HERTZ L; PENG L. Energy metabolism at the cellular level of the CNS. **Canadian J. of Physiol. and Pharmacol.**, 70:45-157. 1992.
- HOLLERMAN JR; SCHULTZ W: Dopamine neurons report an error in the temporal prediction of reward during learning. **Nat. Neurosci.**, 1:304-309. 1998.
- HUGHES BP. A method for estimation of serum creatine kinase and its use in comparing creatine kinase and aldolase activity in normal and pathologic sera. **Clin. Chim. Acta.**, 7:597-604. 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**, 125:163-170. 2004.
- IZENWASSER S; WERLING LL; COX BM. 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**, 520:303-309. 1990.

- JOHANN-LIANG R; WYETH J; CHEN M; COPE JU. Pediatric drug surveillance and the Food and Drug Administration's adverse event reporting system: an overview of reports. **Pharmacoepidemiol. Drug Saf.**, 18:24-7. 2009.
- KAPLAN HI; SADOCK BJ; GREBB JA. **Compêndio de Psiquiatria: Ciências do Comportamento e Psiquiatria Clínica.** São Paulo: Artmed, 2002.
- KASSER TR; DEUTCH A; MARTIN RJ. Uptake and utilization of metabolites in specific sites relative to feeding status. **Physiol. Behav.**, 36:1161-1165. 1986.
- KEMPERMAN G. Regulation of adult hippocampal neurogenesis - implications for novel theories of major depression. **Bipolar Disord.**, 4:17-33. 2002.
- KESSLER RC; ADLER LA; BARKLEY R. Patterns and predictors of attentiondeficit/hyperactivity disorder persistence into adulthood: results from the national comorbidity survey replication. **Biol. Psych.**, 57:1442–1451. 2005.
- KASHALA E, TYLLESKAR T, ELGEN I, et al. Attention deficit and hyperactivity disorder among school children in Kinshasa, Democratic Republic of Congo. **Afr. Health Sci.**, 5:172–181. 2005.
- KELZ MB; CHEN J; CARLEZON WA; WHISLER K; GILDEN L; BECKMANN AA.; STEFFEN C; ZHANG Y; MAROTTI L; SELF DW; TKATCH T; BARANAUSKAS G; SURMEIER DJ; NEVE RL; DUMAN RS; PICCIOTTO MK; NESTLER EJ. Expression of transcription factor fosB in the Brain controls sensitivity to cocaine. **Nature**, 401: 272-276. 1999.
- KIRBY K; RUTMAN LE; BERNSTEIN H. Attention-deficit/hyperactivity disorder: A therapeutic update. **Curr. Opin. Pediatr.**, 14:236-246. 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.**, 75:142-153. 1996.
- KLEIN-SCHWARTZ W. Abuse and toxicity of methylphenidate. **Curr. Opin. Pediatr.**, 14:219-223. 2002.

- KRAUSE KH; DRESEL SH; KRAUSE HF; 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**, 285:107-110. 2000.
- KOLB B; GORNY G; LI Y; SAMAHA AN; ROBINSON TE. **Amphetamine or cocaine limits the ability of later experience to promote structural plasticity in the neocortex and nucleus accumbens**. Proceedings of the **Nat. Acad. of Science of the USA** 100, 10523–10528. 2003.
- KOOB GF. Hedonic valence, dopamine and motivation. **Mol. Psych.**, 1:186-189. 1996.
- KOOIJ JJ; BUITELAAR JK; VAN DEN OORD EJ. Internal and external validity of attention-deficit hyperactivity disorder in a population-based sample of adults. **Psychol. Med.**, 35:817-827. 2005.
- KUCZENSKI R; SEGAL DS. Effects of methylphenidate on extracellular dopamine, serotonin, and norepinephrine: Comparison with amphetamine. **J. Neurochem.**, 68:2032-2037. 1997.
- KUCZENSKI, R.; SEGAL, D.S. Locomotor effects of acute and repeated threshold doses of amphetamine and methylphenidate: relative roles of dopamine and norepinephrine. **J. of Pharmacol. and Experimental Therapeut.**, 296:876-883. 2001.
- KHUCHUA ZA; QIN W; BOERO J; CHENG J; PAYNE RM; SAKS VA; STRAUSS AW. Octamer formation and coupling of cardiac sarcomeric mitochondrial creatine kinase are mediated by charged N-terminal residues. **The J. of Biol. Chem.**, 273: 2990-2996. 1998.
- KLEIN-SCHWARTZ W. Pediatric methylphenidate exposures: 7-year experience of poison centers in the United States. **Clinical Pediatrics**, 42:159-164. 2003.

- LA HOSTE GL; SWANSON JM; WIGAL SB; GLABE C; WIGAL T; KING N. Dopamine D4 receptor gene polymorphism is associated with attention deficit hyperactivity disorder. **Mol. Psych.**, 1:121-214. 1996.
- LA VOIE; HASTINGS TG. 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. 1999.
- LEHNINGER AL; NELSON DL; COX MM. **Princípios de bioquímica**. 4 ed. Sarvier, São Paulo, 2007.
- LEVY F; SWANSON JM. Timing, space and ADHD: the dopamine theory revisited. **Australian and New Zealand J. of Psych.**, 35:504-511. 2001.
- LIN MT; BEAL MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. **Nature**, 443:787-795. 2006.
- LOU HC; 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**, 5:67-74. 1998.
- LOWE N; KIRLEY A; HAWI Z; SHAM P; WICKHAM H; KRATOCHVILL CJ. Joint analysis of DRD5 marker concludes association with ADHD confined to the predominantly inattentive and combined subtypes. **Am. J. Hum. Genet.**, 74:348-356. 2003.
- LOWRY OH; ROSEBROUGH NJ; FARR AL; RANDALL RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, 267-275. 1951.
- MACDONALD ML; NAYDENOV A; CHU M; MATZILEVICH D; KONRADI C. Decrease in creatine kinase messenger RNA expression in the hippocampus and dorsolateral prefrontal cortex in bipolar disorder. **Bipolar Disorders**, 8:255-264. 2006.
- ACHADO ABM. **Neuroanatomia funcional**. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 2004.

- MANJANATHA MG; SHELTON SD; DOBROVOLSKY VN; SHADDOCK JG; MCGARRITY LG; DOERGE DR. Pharmacokinetics, Dose-Range, and Mutagenicity Studies of Methylphenidate Hydrochloride in B6C3F1Mice. **Environ. and Molecul. Mutagen.**, 49:585-593. 2008.
- MAGUE SD; ANDERSEN SL; CARLEZON JR WA. Early developmental exposure to methylphenidate reduces cocaine-induced potentiation of brain stimulation reward in rats. **Biol. Psych.**, 57:120-125. 2005.
- MARKS DB; MARKS AD; SMITH CM. Basic medical biochemistry. 2 nd edition. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2005.with the Folin phenol reagent. **J. of Biol. Chem.**, 193:265-267. 2007.
- MARKOWITZ JS; STRAUGHN AB; PATRICK KS. Advances in the pharmacotherapy of attention-deficit-hyperactivity disorder: focus on methylphenidate formulations. **Pharmacotherapy**, 23:1281-99. 2003.
- MATARO M; GARCIASANCHEZ C; JUNQUE C; ESTEVEZ GONZALVEZ 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.**, 54:963-968. 1997.
- MEYER RA; SWEENEY HL; KUSHMERICK MJ. A simple analysis of the phosphocreatine shuttle. **Am. J. Physiol.**, 246:365-377. 1984.
- MIDDLETON FA; STRICK PL. Cerebellar projections to the prefrontal cortex of the primate. **J. Neurosci.**, 21:700-712. 2001
- MILLER KJ; CASTELLANOS FX. Attention deficit/hyperactivity disorders. **Pediatr. Rev.**, 19:373-384. 1998.
- MICK E; BIEDERMAN J; PRINCE J; FISCHER MJ; FARAONE SV. Impact of low birth weight on attention-deficit hyperactivity disorder. **J. Dev. Behav. Pediatr.**, 23:16-22. 2002.

- McDOUGALL SA; COLLINS RL; KARPER PE; WATSON JB; CRAWFORD CA. Effects of repeated methylphenidate treatment in the young rat: sensitization of both locomotor activity and stereotyped sniffing. **Experim. and Clinical Psychopharmacol.**, 7:208-218. 1999.
- MOLL GH; 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. **J. of Childhood and Adolesc. Psychopharmacol.**, 11:15-24. 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**, 113:754-761. 2004.
- NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH: Consensus development conference statement: diagnosis and treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD). **J. of the Am. Academy of Child and Adoles. Psych.**, 39:182-193. 2005.
- NARJARO CA; BUSTO U; SELLERS EM. A method for estimating the probability of adverse drug reactions. **Clin. pharmacol. Ther.**, 30:239-245. 1981.
- NAVARRO A; BOVERIS A. The mitochondrial energy transduction system and the aging process. **Am. J. Physiol. Cell. Physiol.**, 292:670-686. 2007.
- NESTLER EJ. Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. **Nat. Rev. Neurosci.**, 2:119-128. 2001.
- ORTH M; SCHAPIRA AHV. Mitochondria and degenerative disorders. **Am. J. Med. Gen.**, 106:27-36. 2001.
- PAGE G; PEETERS M; NAJIMI M. Modulation of the neuronal dopamine transporter activity by the metabotropic glutamate receptor mGluR5 in rat striatal synaptosomes through phosphorylation mediated processes. **J. Neurochem.**, 76:1282-1290. 2001.

- PATRICK KS; CALDWELL RW; FERRIS RM; BREESE GR. Pharmacology of the enantiomers of threo-methylphenidate. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 241:152-158. 1987.
- PAULE MG; ROWLAND AS; FERGUSON SA; CHELONIS JJ; TANNOCK R; SWANSON JM; CASTELLANOS FX. Attention deficit/hyperactivity disorder: characteristics, interventions and models. **Neurotoxicol. and Teratol.**, 22:631-651. 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. Pharmacol.**, 68:421-429. 2005.
- PORRINO LJ; LUCIGNANI G. Different patterns of local brain energy metabolism associated with high and low doses of methylphenidate. Relevance to its action in hyperactive children. **Biol. Psych.**, 22:126-138. 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 Psych.**, 40:688-693. 1983.
- POLANCZYK G; LIMA MS; HORTA BL. The worldwide prevalence of attentiondeficit/hyperactivity disorder: A systematic review and meta-regression analyses. **Am. J. Psych.**, (in press)
- PHILIPSEN A; HEBLINGER B; TEBARTZ VAN ELST L; DTSCH ARZTEBL. Attention Deficit Hiperactivity Disorder in Adulthood: Diagnosis, Etiology and Therapy. Dtsch **Arztebl Int.**, 105:311-317. 2008.
- PLISKA SR; MCCRACKEN JT; MASS JW. Catecholamines in attention-deficit hyperactivity disorder: Current perspectives. **J. Am. Acad. Child. Adolesc. Psych.**, 35:264. 1996.

- PREHN JH. Mitochondrial transmembrane potential and free radical production in excitotoxic neurodegeneration. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, 357:316-322. 1998.
- QUINN D; Does Chirality Matter? Pharmacodynamics of Enantiomers of Methylphenidate in Patients With Attention-Deficit / Hyperactivity Disorder. **J. of Clin. Psychopharmacol.**, 28:62-66. 2006.
- RANG HP; DALE MM; RITER JM e MOORE PK, **Farmacologia**. 5 ed, 4:543-547. 2003.
- REENHILL LL; PLISZKA S; DULCAN MK; BERNET W; ARNOLD V; BEITCHMAN J; BENSON RS; BUKSTEIN O; KINLAN J; McCLELLAN J; RUE D; SHAW JA; 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. **J. of the Am. Acad. of Child and Adoles. Psych.**, 41:26-49. 2002.
- RAMIREZ, O.; JIMÉNEZ, E. Opposite transitions of chick brain catalytically active cytosolic creatine kinase isoenzymes during development. **Inter. J. of Develop. Neurosci.**, 18:815-823. 2000.
- REZIN GT; AMBONI G; ZUGNO AI; QUEVEDO J; STRECK EL. Mitochondrial Dysfunction and Psychiatric Disorders. **Neurochem. Resear.**, (Epub ahead of print), 2008.
- RICAURTE GA; MECHAN AO; YUAN J; HATZIDIMITRIOU G; XIE T; MAYNE AH; MCCANN UD. Amphetamine treatment similar to that used in the treatment of adult attention-deficit/hyperactivity disorder damages dopaminergic nerve endings in the striatum of adult nonhuman primates. **The J. of Pharmacol. and Experime. Therapeu.**, 315:91-98. 2005.
- RIESGO R; ROHDE LA. **A neurobiologia do TDAH**. In: KAPCZINSKI F, QUEVEDO JL, IZQUIERDO I, editores. **Bases Neuroquímicas dos transtornos Psiquiátricos**, 2 edição. Porto Alegre: Artes Médicas, 2004.

- ROHDE LA; BUSNELLO EA; CHACHAMOVICH E; VIEIRA GM; PINZON V; KETZER CR. Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade: revisando conhecimentos. **Rev. ABP-APAL.**, 166-178. 1998.
- ROHDE LA; BIEDERMAN J; BUSNELLO EA; ZIMMERMANN H; SCHMITZ M; MARTINS S. ADHD in a school sample of Brazilian adolescents: a study of prevalence, comorbid conditions and impairments. **J. Am. Acad. Child. Adolesc. Psych.**, 716-722. 1999.
- ROHDE LA; BARBOSE G; TRAMONTINA S; POLANCZYK G. Transtorno de Déficit de atenção/hiperatividade. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, 22:7-11. 2000.
- ROHDE LA; ROMAN T; SZOBOT C; CUNHA RD; HUTZ MH; BIEDERMAN J. Dopamine Transporter gene, response to methylphenidate and cerebral blood flow in attention-deficit/hyperactivity disorder: a pilot study. **Synapse**, 48:87-89. 2003.
- ROHDE LA; BIEDERMAN J; BUSNELLO EA. ADHD in a school sample of Brazilian adolescents: a study of prevalence, comorbid conditions, and impairments. **J. Am. Acad. Child Adolesc. Psych.**, 38:716-722. 1998.
- ROHDE LA; POLANCZYK. Epidemiology of attention deficit/hyperactivity disorder across the lifespan. **Curr. Opin. in Psych.**, 20:386-392. 2007.
- ROMAN T; SCHMITZ M; POLANCZYK GV; EIZIRIK M; ROHDE LA; HUTZ MH. Is the alpha -2^a adrenergic receptor gene (ADR2A) associated with attention-deficit/hiperactivity disorder? **Am. J. Med. Genet**, 120:116-120. 2003.
- RUBIA K; TAYLOS E; SMITH AB; OKASANEN; OVERMEYER S; NEWMAN S; OKASANNEN H. Neuropsychological analyses of impulsiveness in childhood hyperactivity. **Br. J. Psych.**, 179:138-143. 2001.
- RUSTIN, P.; CHRETIEN, D.; BOURGERON, T.; GERARD, B.; RÖTIG, A.; SAUDUBRAY, J.M.; MUNNICH, A. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. **Clin. Chim. Acta.**, 228:35-51. 1994.

- SAFER DJ; ALLEN RP. Absence of tolerance to the behavioral effects of methylphenidate in hyperactive and inattentive children. **J. Pediatr.**, 115:1003-1008. 1989.
- SAKS VA; KUZNETSOV AV; KUPRIYANOV VV; MICELI MV; JACOBUS WE. Creatine kinase of rat heart mitochondria. The demonstration of functional coupling to oxidative phosphorylation in an inner membrane-matrix preparation. **The J. of Biol. Chem.**, 260: 7757-7764. 1985.
- SEEMAN P; MADRAS BK. Anti-hyperactivity medication: Methylphenidate and amphetamine. **Mol. Psych.**, 3:386-396. 1998.
- SIEG FG; GAFFNEY GR; PRESTON DF; HELLINGS JA. Spect brain imaging abnormalities in attention-deficit hyperactivity disorder. **Clin. Nucl. Med.**, 20:55-60. 1995.
- SOLANTO MV. Neuropsychopharmacological mechanisms of stimulant drug action in attention-deficit hyperactivity disorder: a review and integration. **Behav. Brain Res**, 94:127-152. 1998.
- STRECK EL; AMBONI G; SCAINI G; DI-PIETRO PB; REZIN GT; VALVASSORI SS; LUZ G; KAPCZINSKI F; QUEVEDO J. Brain creatine kinase activity in an animal model of mania. **Life Sciences**, 82:424-429. 2008.
- STAHL SM. **Essential psychopharmacology: Neuroscie. Basis and Practical Applications**. 2^o ed. Cambridge University Press, 2000.
- TSOCKLER S; HOLZBACH U; HANEFELD F; MARQUARDAT L; HELMS G; REQUART M; HANICKE W; FRAHM J. Creatine deficiency in brain: A new treatable in born error of metabolism. **Pediatr. Res.**, 36:409-413. 1994.
- SAHAKIAN B; MOREIN-ZAMIR S. Professor's little *helper*. **Nature**, 450:1157. 2007.
- SETNIK B; NOBREGA JN. Long-chain acyl-Coenzyme A synthetase-2 mRNA: increased cerebral cortex expression in an animal model of depression. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psych.**, 28:577-582. 2004.

- SHAH AA; TREIT D. Infusions of midazolam into the medial prefrontal cortex produce anxiolytic effects in the elevated plus-maze and shock-probe burying tests. **Brain Res.**, 996:31-40. 2004.
- SCHINDER AF; OLSON EC; SPITZER NC; MONTAL M. Mitochondrial dysfunction is a primary event in glutamate neurotoxicity. **J. Neurosci.**, 16:6125-6133. 1996.
- SCHLATTNER U; WALLIMANN T. Octamers of mitochondrial creatine kinase isoenzymes differ in stability and membrane binding. **The J. of Biological Chem.**, 275: 17314-17320. 2000.
- SCHLEGEL J; ZURBRIGGEN B; WEGMANN G; WYSS M; EPPENBERGER H; WALLIMANN T. Native mitochondrial creatine kinase forms octameric structures. I. isolation of two interconvertible mitochondrial creatine kinase forms, dimeric and octameric mitochondrial creatine kinase: characterization, localization, and structure-function relationships. **The J. of Biol. Chem.**, 264:16942-16953. 1988.
- SCHNYDER T; GROSS H; WINKLER H; EPPENBERGER HM; WALLIMANN T. Crystallization of mitochondrial creatine kinase. Growing of large protein crystals and electron microscopic investigation of microcrystals consisting of octamers. **The J. of Biol. Chem.**, 266:5318-5322. 1991.
- SILVA CG; BUENO AR; SCHUCK PF; LEIPNITZ G; RIBEIRO CA; WANNMACHER CD; WYSE AS; WAJNER M. D-2-Hydroxyglutaric acid inhibits creatine kinase activity from cardiac and skeletal muscle of young rats. **Eur. J. of Clinical Investiga.**, 33: 840-847. 2003
- 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), **Advan. in Neurochem.**, New York, Plenum, 4:82. 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.**, 28:897-916. 1977.

SKOUNTI M; PHILALITHIS A; GALANAKIS E. Variations in prevalence of attention deficit hyperactivity disorder worldwide. **Eur. J. Pediatric**, 166:117-123. 2007.

SOLANTO MV. Neuropsychopharmacological mechanisms of stimulant drug action in attention-deficit hyperactivity disorder: a review and integration. **Behav. Brain Resear.**, 94:127-152. 1998.

SPINA MB; CONHEN G. Dopamine **turnover and glutathione oxidation**: implications for Parkinson disease. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 86:1398-1400. 1989.

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

STRECK EL; AMBONI G; SCAINI G; DI-PIETRO PB; REZIN GT; VALVASSORI SS; LUZ G; KAPCZINSKI F; QUEVEDO J. Brain creatine kinase activity in an animal model of mania. **Life Sciences**, 82: 424-429. 2008.

SWANSON JM; SERGEANT JA; TAYLOR E; SONUGA-BARKE EJS; JENSEN PS; CANTWELL DP. Attention deficit disorder and hyperkinetic disorder. **Lancet**, 351:429-433. 1998.

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

TALPALAR AE; GROSSMAN Y. Enhanced excitability compensates for high-pressure-induced depression of cortical inputs to the hippocampus. **J. Neurophysiol.**, 92:3309-3319. 2004.

TOMIMOTO H, YAMAMOTO K; HOMBURGER; HA; YANAGIHARA T. Immunoelectronmicroscopic investigation of creatine kinase BB-isoenzyme after cerebral ischemiain gerbils. **Acta Neuropathol.**, 86:447-455.1993.

- VAIDYA C; AUSTIN G; KIRKORIAN G; RIDLEHUBE HW; DESMOND JE; GLOVER GH; GABRIEL JDE. Selective effects methylphenidate in attention deficit hyperactivity disorder: A functional magnetic resonance study. **Proc. Nat. Sci. USA.**, 95:14494-14499. 1998.
- VIRMANI A; GAETANI F; IMAM S; BINIENDA Z; ALI. 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, 2002.
- VOLKOW ND; WANG GJ; FOWLER M; LOGAN J; SCHLYER D; HITZEMANN R. Imaging endogenous dopamine competition with (11C)raclopride in the human brain. **Synapse**, 6:255-262. 1994.
- VOLKOW ND; DING YS; FOWLER JS; WANG GJ; LOGAN J; GATLEY JS; DEWEY S; ASHBY C; LIEBERMANN J; HITZEMANN R; WOLF AP. Is methylphenidate like cocaine? Studies on their pharmacokinetics and distribution in the human brain. **Arch. of General Psych.**, 52:456-63. 1995.
- VOLKOW ND; DING YS; FOWLER JS; WANG GJ; LOGAN J; GATLEY. dopamine transporter occupancies in the human brain induced by therapeutic doses of oral methylphenidate. **Am. J. psych.**, 155:1325-1331. 1998.
- VOLKOW ND; WANG G; FOWLER JS; LOGAN J; GERASIMOV M; MAYNARD L; DING Y; GATLEY SJ; GIFFORD A; FRANCESCHI D. Therapeutic doses of oral methylphenidate significantly increase extracellular dopamine in the human brain. **J. of Neurosci.**, 15:121. 2001.
- VOLKOW ND; FOWLER JS; DING J; GATLEY SJ. mechanism of action of methylphenidate: Insights from PET imaging studies. **J. Atten. Disorder**, 31-43. 2002.
- VOLKOW D; FOWLER J S; WANGG-J; SWANSON JM. Dopamine in drug abuse and addiction: results from imaging studies and treatment implications. **Mol. Psych.**, 9:557-569. 2004.

- 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. Psych.**, 57: 1410-1415. 2005.
- Volkow, N.D. Stimulant medications: how to minimize their reinforcing effects? **The Am. J. of Psych.**, 163: 359-361. 2006
- VOLKOW ND; WANG GJ; NEWCORN J; FOWLER JS; TELANG F; SOLANTO MV; LOGAN J; WONG C; MA Y; SWANSON JM; SCHULZ K; PRADHAN K. Brain dopamine transporter levels in treatment and drug naïve adults with ADHD. **Neuroimage**, 34:182-1190. 2007.
- VOLKOW ND; JOANNA S; FOWLER; GENE-JACK WANG; FRANK TELANG, JEAN LOGAN, CHRISTOPHER WONG, JIM MA, KITH PRADHAN, HELENE BENVENISTE, JAMES M. SWANSON; Methylphenidate Decreased the Amount of Glucose Needed by the Brain to Perform a Cognitive Task; **Plos One**, 3:2017. 2008.
- VOLKOW ND; SWANSON JM. Does Childhood Treatment of ADHD with Stimulant Medication Affect Substance Abuse in Adulthood? **The Am. J. of Psych.**, 165:553-555. 2008.
- VOLZ TJ; FARNSWORTH SJ; ROWLEY SD; HANSON GR; FLECKENSTEIN AE. Methylphenidate-induced increases in vesicular dopamine sequestration and dopamine release in the striatum: The role of muscarinic and dopamine D2 receptors. **The J. of Pharmacol. and Experimen. Therapeut.**, 327:161-167. 2008.
- VOLKOW ND; WANG GJ; NEWCORN J; TELANG F; SOLANTO MV; FOWLER JS; LOGAN J; MA Y; SCHULZ K; PRADHAN K; WANG C; SWANSON JM. Depressed dopamine activity in caudate and preliminary evidence of limbic involvement in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder. **Arch. Gen Psych.**, 64:932-940. 2009.
- VOET D; VOET JG; PRATT CW. **Fundamentos de bioquímica**. Artmed, Porto Alegre, 2002.

- WALLIMANN T; WYSS M; BRDICZKA D; NICOLAY K; EPPENBERGER HM. Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the 'phosphocreatine circuit' for cellular energy homeostasis. **The Biochem. J.**, 281: 21-40. 1992.
- WISE RA; BOZARTH MA. A psychomotor stimulant theory of addiction. **Psychol. Rev.**, 94: 469-492. 1987.
- WHITTINGHAM TS; LIPTON P. Cerebral Synaptic transmission during anoxia is protected by creatine. **J. Neurochem.**, 37:1618-1621, 1981.
- WYSS M; SMEITIN KJ; WEVERS RA; WALLIMANN T. Mitochondrial creatine kinase: a key enzyme of aerobic energy metabolism. **Biochim. et Biophys. Acta.**, 1102:119-166. 1992.
- YANG SM; WANG YU; LI J; FARAONE SV. Association of norepinephrine transporter gene with methylphenidate response. **J. Am. Acad. Child. Adolesc. Psych.**, 43:1154-1158, 2004.
- YANG PB, SWANN AC, DAFNY N. Methylphenidate treated at the test cage-dose-dependent sensitization or tolerance depend on the behavioral assay used. **Critical Rev. in Neurobiol.**, 19:59-77. 2007.
- YANO M; STEINER H. Methylphenidate and cocaine: the same effects on gene regulation? **Trends in Pharmacol. Scie.**, 28:88-96. 2007
- YOUN, JG. Methylphenidate-induced hallucinosis: case histories and possible mechanisms of action. **J. Dev. Behav. Pediatric.**, 2:35-38. 1981.
- ZANETTE F; VICTOR EG; SCAINI G; DI-PIETRO PB; CARDOSO DC; CRISTIANO MP; DAL-PIZZOL F; PAULA MM; STRECK. Modulation of creatine kinase activity by ruthenium complexes. **J. of Inorganic Biochem.**, 101:267-273. 2007.

ZHONG P; YAN Z. Chronic antidepressant treatment alters serotonergic regulation of GABA transmission in prefrontal cortical pyramidal neurons. **Neurosc.**,129:65-73. 2004.

ZUDDAS A; MARZOCCHI GM; OOSTERLAAN J. Factor structure and cultural factors of disruptive behaviour disorders symptoms in Italian children. **Eur. Psych.**, 21:410-418. 2006.