

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA

**TRATAMENTO PRECOCE CRÔNICO COM UMA DOSE CLINICAMENTE
RELEVANTE DE METILFENIDATO AUMENTA OS NÍVEIS DE GLUTAMATO
NO LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO E PREJUDICA A HOMEOSTASE
GLUTAMATÉRGICA EM CÓRTEX PRÉ-FRONTAL DE RATOS**

FELIPE SCHMITZ

ORIENTADORA

Prof^a. Dr^a. Angela Terezinha de Souza Wyse

Porto Alegre

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA

**TRATAMENTO PRECOCE CRÔNICO COM UMA DOSE CLINICAMENTE
RELEVANTE DE METILFENIDATO AUMENTA OS NÍVEIS DE GLUTAMATO
NO LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO E PREJUDICA A HOMEOSTASE
GLUTAMATÉRGICA EM CÓRTEX PRÉ-FRONTAL DE RATOS**

FELIPE SCHMITZ

ORIENTADORA

Prof^a. Dr^a. Angela Terezinha de Souza Wyse

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como
requisito parcial para à obtenção do título de Mestre em Bioquímica

Porto Alegre

2015

*Aos meus pais, **Olavio** e **Mariza**, pela
confiança, incentivo e amor incondicional.*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, professora Angela Wyse, por confiar em mim e pelo comprometimento, profissionalismo e dedicação com que tem me orientado em todos esses anos. Seu otimismo, alegria e força me mantêm sempre motivado!

À UFRGS, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica pelo ensino gratuito e de qualidade.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

Aos amigos e colegas do laboratório: Aline, Bru Schweinberger, Bruna Z., Cassi, Elias, Jana, Matheus S., Tiago e aos novos bolsistas de IC, pela ótima convivência e companheirismo.

Em especial agradeço ao André, Helenita e Paula Pierozan pela amizade, apoio incondicional e parceria na concretização desse trabalho.

Agradeço aos professores: Florencia Barbé-Tuana, Diogo L. de Oliveira e Carmen R. Vargas, bem como seus alunos pela colaboração na execução desse trabalho. Muito obrigado!

Aos amigos que seguiram seus caminhos e que deixam muitas saudades: Aline da Cunha, Bá, Dani Sidegum, Déia, Edu Liberato, Emi Scherer, Fê Machado, Mairita, Matheus Gru, Samantita e Tiago Herpich. De longe ou de perto, estarei sempre torcendo muito por vocês!

Aos amigos da graduação. Muito obrigado por tudo e principalmente pela amizade que, com certeza, será para sempre!

Ao meu querido Mau, pela nossa parceria que foi tão especial! Tenho certeza de que o céu é um lugar muito mais alegre e bonito com você aí. Fique em paz, meu amigo!

Aos meus MARAVILHOSOS pais, Olavio e Mariza, pelo incentivo constante aos meus estudos, amizade, confiança e amor. Apesar da distância dolorosa, em pensamento, estão sempre presentes comigo. AMO VOCÊS!!

Desistir? Eu já pensei seriamente nisso, mas nunca me levei realmente a sério. É que tem mais chão nos meus olhos do que cansaço nas minhas pernas, mais esperança nos meus passos do que tristeza nos meus ombros, mais estrada no meu coração do que medo na minha cabeça.”

Cora Coralina

SUMÁRIO

RESUMO.....	VII
ABSTRACT.....	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	IX
LISTA DE FIGURAS.....	X
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Metilfenidato.....	1
1.2 Transtorno de déficit de atenção e hiperatividade.....	4
1.3 Efeitos neurotóxicos do metilfenidato.....	9
1.4 Modelos experimentais de TDAH.....	12
1.5 Sistema glutamatérgico.....	15
1.6 Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase.....	18
1.7 Radicais livres e estresse oxidativo.....	20
2. OBJETIVOS.....	23
2.1 Objetivo geral.....	23
2.2 Objetivos específicos.....	23
3. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS E RESULTADOS.....	25
3.1 Artigo científico.....	25
4. DISCUSSÃO.....	67
5. CONCLUSÕES.....	75
6. PERSPECTIVAS.....	76
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77

RESUMO

A tentativa de compreender as consequências do tratamento precoce crônico com metilfenidato é muito importante uma vez que este psicoestimulante tem sido amplamente utilizado em crianças de idade pré-escolar. Além disso, pouco se sabe sobre os mecanismos envolvidos nas alterações persistentes no comportamento e no funcionamento neuronal associada à sua utilização. Neste estudo, nós inicialmente investigamos o efeito do tratamento precoce crônico com metilfenidato sobre o perfil de aminoácidos no líquido cefalorraquidiano. Além disso, foram também avaliados a homeostase glutamatérgica, a Na^+, K^+ -ATPase e o equilíbrio redox no córtex pré-frontal de ratos jovens. Ratos Wistar receberam injeções intraperitoneais de metilfenidato (2,0 mg/kg) ou um volume equivalente de solução salina 0,9% (controles), uma vez por dia, do 15º ao 45º dia de vida. Vinte e quatro horas após a última administração de metilfenidato, os animais foram decapitados e o líquido cefalorraquidiano e o córtex pré-frontal foram obtidos e processados conforme o protocolo para cada uma das análises. Os resultados mostraram que o metilfenidato alterou o perfil de aminoácidos no líquido cefalorraquidiano, aumentando os níveis de glutamato. A captação de glutamato foi diminuída pelo tratamento crônico com metilfenidato, mas o conteúdo dos transportadores, GLAST e GLT-1, não foram alterados por esse tratamento. A atividade e o imunoconteúdo das subunidades catalíticas (α_1 , α_2 e α_3) da Na^+, K^+ -ATPase foram diminuídos em córtex pré-frontal de ratos submetidos ao metilfenidato. Alterações na expressão gênica das subunidades α_1 e α_2 da Na^+, K^+ -ATPase também foram observadas. O conteúdo de sulfidrilas, um marcador inversamente correlacionado com dano proteico, foi diminuído. A atividade da CAT foi aumentada e a razão SOD/CAT foi diminuída em córtex pré-frontal de ratos. Os demais parâmetros avaliados não apresentaram diferenças significativas quando comparado aos controles. Os nossos resultados, tomados em conjunto, sugerem que o tratamento precoce crônico com metilfenidato promove excitotoxicidade devido, pelo menos em parte, à inibição da captação de glutamato provavelmente causada por perturbações na função da Na^+, K^+ -ATPase e/ou pelo dano à proteína observados no córtex pré-frontal. Esses achados podem contribuir, pelo menos em parte, para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos nas alterações bioquímicas e comportamentais associadas ao uso crônico de metilfenidato durante o desenvolvimento do sistema nervoso central.

Palavras-chave: metilfenidato; excitotoxicidade glutamatérgica; líquido cefalorraquidiano; córtex pré-frontal; α subunidades da Na^+, K^+ -ATPase; equilíbrio redox

ABSTRACT

Understanding the consequences of chronic treatment with methylphenidate is very important since this psychostimulant is extensively used in preschool age children. Additionally to this, little is known about the mechanisms involved in persistent changes in behavior and neuronal function related with use of methylphenidate. In this study, we initially investigate the effect of chronic treatment with methylphenidate in juvenile rats on the amino acids profile in cerebrospinal fluid, as well as on glutamatergic homeostasis, Na⁺,K⁺-ATPase function and redox balance in prefrontal cortex. Wistar rats at early age received intraperitoneal injections of methylphenidate (2.0 mg/kg) or an equivalent volume of 0.9% saline solution (controls), once a day, from the 15th to the 45th day of life. Twenty-four hours after the last administration of methylphenidate, the animals were decapitated and the cerebrospinal fluid and the prefrontal cortex were obtained and processed according to the protocol for each analysis. Our results showed that methylphenidate altered amino acid profile in cerebrospinal fluid, increasing the levels of glutamate. In the prefrontal cortex, methylphenidate administration was able to decrease the glutamate uptake, with no changes in GLAST and GLT-1; and the activity and immunocontent of catalytic subunits (α_1 , α_2 and α_3) of Na⁺,K⁺-ATPase. We also observe changes in α_1 and α_2 gene expression of catalytic α subunits of Na⁺,K⁺-ATPase, decrease in sulfhydryl content, CAT activity and SOD/CAT ratio in juvenile rat prefrontal cortex treated with methylphenidate. Taken together, our results suggest that chronic treatment with methylphenidate at early age induces excitotoxicity, at least in part, due to inhibition of glutamate uptake probably caused by disturbances in the Na⁺,K⁺-ATPase function and/or protein damage observed in the prefrontal cortex. These findings may contribute, at least in part, to a better understanding of mechanisms involved in the biochemical and behavioral changes associated with chronic use of methylphenidate during the development of the central nervous system.

Keywords: methylphenidate; juvenile rats; excitotoxicity glutamatergic; cerebrospinal fluid; prefrontal cortex; α subunits of Na⁺,K⁺-ATPase; redox balance

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPA: α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato

ATP: adenosina trifosfato

CAT: catalase

DCFDA: diacetato de 2'7'- diclorofluoresceína

DCFH: 2'7'- diclorofluoresceína

DSM-IV: Manual de Diagnóstico e Estatística dos Transtornos Mentais

GLAST: transportador de glutamato-aspartato

GLT-1: transportador de glutamato

GSH: glutationa reduzida

GPx: glutationa peroxidase

IL-1 β : interleucina1- β

IL-6: interleucina 6

MCP-1: proteína quimiotática de monócito do tipo 1

MFD: metilfenidato

MAO: monoamino oxidase

NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)

NMDA: N-metil-D-aspartato

SHR: ratos espontaneamente hipertensos

SNAP-25: proteína associada à sinaptossomas

SNC: sistema nervoso central

SOD: superóxido dismutase

TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TNF- α : fator de necrose tumoral alfa

TDAH: Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1. Sinapse dopaminérgica.....	2
Figura 2. Sinapse glutamatérgica.....	16
Figura 3. Estrutura da Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase.....	18

1. INTRODUÇÃO

1.1 Metilfenidato

O metilfenidato (MFD), um psicoestimulante análogo das anfetaminas, tem sido amplamente utilizado em crianças para o tratamento do Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade (TDAH). O MFD também é o medicamento de escolha para o tratamento da narcolepsia (Goodman e Gilman, 2003). Além disso, estudos têm mostrado que o MFD melhora a função motora e cognitiva de pacientes com doença de Parkinson (Auriel et al., 2009), bem como sintomas de depressão na população geriátrica (Fisch, 1985). Embora ainda controverso, ele também tem sido utilizado com sucesso no tratamento da apatia e perda de motivação em pacientes com doença de Alzheimer (Teixeira e Caramelli, 2006).

O MFD promove a remissão dos sintomas, bem como a melhora de aspectos funcionais importantes como a interação social e o desempenho acadêmico em grande parte dos portadores de TDAH (Klein, 1995). No entanto, o MFD também é amplamente utilizado por indivíduos não portadores de TDAH com a finalidade de melhorar a atenção e aumentar o desempenho intelectual (Swanson e Volkow, 2003). Embora os mecanismos neurais envolvidos na eficácia terapêutica do MFD no tratamento do TDAH ainda não sejam completamente conhecidos, acredita-se que sua atuação esteja, pelo menos em parte, relacionada ao aumento de dopamina no córtex pré-frontal e estriado, uma vez que, assim como a cocaína e a anfetamina, o MFD aumenta os níveis de dopamina através do bloqueio do transportador dopaminérgico (Volkow et al., 2002) (Figura 1). Embora o MFD tenha uma maior afinidade

pelos transportadores de dopamina, ele também atua sobre os sistemas noradrenérgico, serotoninérgico e glutamatérgico (Gainetdinov, 2001; Gatley et al., 1996; Kuzenski e Segal, 1997).

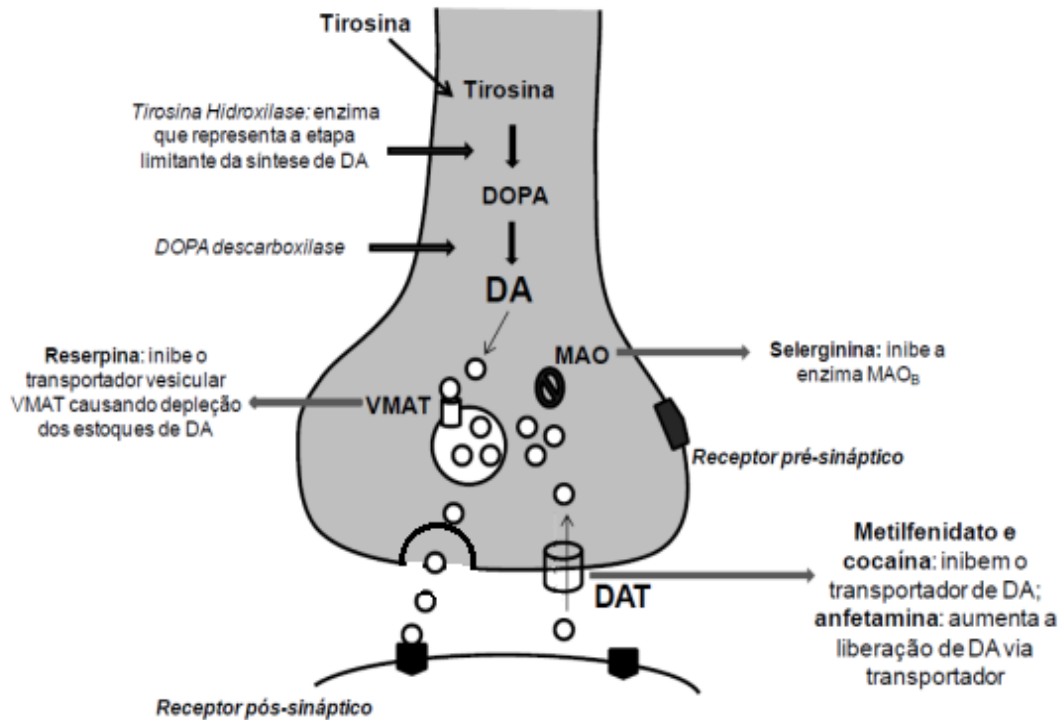


Figura 1. Sinapse dopaminérgica (Nestler et al., 2009, modificado).

Esquema dos eventos envolvidos na síntese e recaptação da dopamina (DA). A síntese de DA inicia-se pela transformação do aminoácido tirosina, que provém da dieta, em DOPA, pela ação da enzima tirosina hidroxilase. Na sequência, a DOPA é convertida em DA pela ação da enzima DOPA descarboxilase. A DA recém-sintetizada é armazenada em vesículas, onde permanece protegida da degradação enzimática via MAO, até ser liberada por exocitose. Uma vez liberada a DA atua em receptores pré e pós-sinápticos tendo sua ação interrompida principalmente pela recaptação via transportador de DA (DAT). Esse transportador representa o principal alvo de atuação dos psicoestimulantes, dentre eles o MFD.

O MFD apresenta ação curta, com uma meia-vida de 2 a 3 horas (Chan et al., 1983). Sua absorção é completa e rápida, atravessando a barreira cérebro-sangue facilmente, devido à sua lipossolubilidade (Auriel et al., 2009). O MFD é desesterificado pelo sistema microsomal hepático produzindo principalmente o ácido ritalínico. Esse metabólito possui baixa afinidade pelos

transportadores de dopamina e é facilmente eliminado pela urina devido a sua hidrofília (Goodman e Gilman, 2003).

No cérebro humano, a farmacocinética do MFD foi investigada através de Tomografia por Emissão de Pósitron e carbono-11 ($[^{11}\text{C}]$ metilfenidato) (Volkow et al., 1995) e os resultados mostram que os níveis cerebrais de MFD atingem o pico entre 4 a 10 minutos após a administração intravenosa de $[^{11}\text{C}]$ metilfenidato. O pico da concentração cerebral após administração oral ocorre em 60 minutos e mais de 50% dos transportadores de dopamina são bloqueados (Volkow et al., 2002).

As doses diárias necessárias para alcançar os benefícios clínicos variam amplamente em crianças e adultos devido à variabilidade na absorção pelo trato gastrintestinal, permeabilidade da barreira cérebro-sangue e resposta ao tratamento. Doses abaixo de 5 mg/kg/dia são consideradas doses clínicas, acima disso é considerada dose de abuso ou recreacional (Goodman e Gilman, 2003). Os efeitos colaterais mais comuns são agitação, diminuição do apetite, euforia, insônia e nervosismo. A intoxicação é caracterizada por um quadro de hiperatividade simpática, incluindo hipertensão, taquicardia e hipertermia (Cordioli et al., 2005).

O aumento no número de prescrições do MFD, nos últimos anos, tem preocupado os pesquisadores, uma vez que o mecanismo de ação e as consequências neuroadaptacionais do MFD ainda não são completamente conhecidos, principalmente quando usado por longos períodos e durante o desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) (Greenhill, 2001; National Institutes Statement, 2000; Safer e Allen, 1989).

Foi mostrado que a ação dos estimulantes no córtex pré-frontal está implicada no desenvolvimento da sensibilização locomotora e mudanças comportamentais. Acredita-se que esse achado possa estar associado a certos aspectos das drogas de abuso. Por isso, há particular interesse em conhecer os efeitos adversos do uso prolongado do MFD na aprendizagem e no comportamento (Coyle, 2000), principalmente em crianças, uma vez que o SNC está em contínuo desenvolvimento e amadurecimento (Benes, 1998). Alguns estudos mostram que o MFD altera a expressão dos genes imediatos c-fos (Chase et al, 2003) e zif-268 (Brandon e Steiner, 2003). Outro estudo demonstrou que o MFD altera algumas vias de sinalização no córtex pré-frontal de ratos: a proteína quinase A (PKA) e a quinase regulada por sinais extracelulares (ERK) (Pascoli et al., 2005).

1.2 Transtorno de déficit de atenção e hiperatividade

O TDAH afeta cerca de 8-12% das crianças em todo o mundo (Faraone et al., 2003) e o seu diagnóstico é realizado principalmente de acordo com a 4ª Edição do Manual de Diagnóstico e Estatística dos Transtornos Mentais (DSM-IV). Os principais sintomas segundo o DSM-IV são altos níveis de desatenção, hiperatividade e impulsividade que começam na infância e que causam prejuízos sobre tarefas funcionais como o desempenho escolar, capacidade intelectual, relações sociais e funções ocupacionais. A criança para ser diagnosticada com TDAH deve apresentar pelo menos seis sintomas de desatenção e/ou seis sintomas de hiperatividade/impulsividade durante os últimos seis meses, pelo menos. Além disso, é importante que os clínicos levem em consideração a percepção dos sintomas por mais de uma pessoa,

como pais, professores e avós (Westgard e Darcy, 2004). Com base nos sintomas, o DSM-IV permite o diagnóstico de três diferentes subtipos de TDAH: principalmente desatento, principalmente hiperativo/impulsivo ou combinado.

O diagnóstico do TDAH segundo o DSM-IV apresenta algumas fragilidades que o caracterizam como subjetivo e menos confiável do que os testes laboratoriais normalmente utilizados para outras especialidades médicas. A fragilidade deve-se ao fato de que seus principais sintomas não são específicos e podem ser resultantes também de problemas no relacionamento das crianças com os pais e amigos, sistemas educacionais inadequados ou outros transtornos comumente encontrados na infância e adolescência.

O aumento no uso de MFD também é um alerta de subdiagnóstico e/ou superidentificação de casos. Vários estudos têm mostrado aumento na prescrição de drogas estimulantes (Fogelman et al., 2003; Miller et al., 2001; Olfson et al., 2003; Schmitd-Troschke et al., 2004; Zito et al., 2000), particularmente em crianças muito jovens (menos de cinco anos de idade) em que a diferenciação entre níveis saudáveis de hiperatividade, comum dessa idade, e sintoma, podem ser confundidos (Dofner et al., 2004). Por outro lado, tem sido mostrado que o diagnóstico do TDAH pode ser confiável, desde que seja realizado por clínicos bem treinados e capacitados (Faraone et al., 2005).

Estudos clínicos (Biederman et al., 1992; Lahey et al., 2002; Murphy et al., 2002) e epidemiológicos (Bird et al., 1994; Kadesjo e Gillberg, 2001; Willcutt et al., 1999) mostram que o diagnóstico do TDAH pode prever resultados clinicamente significativos, desde que crianças com TDAH apresentam maior risco de desenvolver comorbidades, tais como outras desordens psiquiátricas associadas e abuso de drogas. Além disso, o TDAH pode persistir até a idade

adulta com importantes prejuízos clínicos, mesmo que normalmente acompanhados por um declínio nos sintomas (Adler e Chua, 2002). Alguns estudos sugerem que adultos com TDAH têm maiores chances de apresentar transtornos de personalidade (Katz et al., 1998; Modestin et al., 2001). Indivíduos com TDAH também estão mais sujeitos a apresentar baixo rendimento escolar, problemas de relacionamento, conflito familiar, ocupação em cargos pouco remunerados, conflitos sociais, infrações e acidentes de trânsito (Abikoff et al., 2004; Biederman et al., 2004; Cox et al., 2004; DiScala et al., 1998; Greene et al., 2001; Steinhausen et al., 2003). Por isso, o diagnóstico é muito importante, pois os médicos podem alertar os pais para o potencial negativo associado ao TDAH e ajustar o melhor tratamento caso a caso (Jensen et al., 2001; State et al., 2004).

Alterações genéticas foram descritas como fator importante na fisiopatologia do TDAH (Faraone, 2004; Faraone e Doyle, 2001). Polimorfismos nos genes para o receptor de dopamina D_4 e para o transportador de dopamina 1 são prevalentes nos circuitos fronto-subcorticais, que estão implicados na fisiopatologia do TDAH (Faraone e Biederman, 1998). Além disso, pacientes com TDAH exibem uma maior concentração de transportadores de dopamina no cérebro em relação aos indivíduos normais (Cook et al., 1995; Faraone et al., 2001; Krause et al., 2000). Polimorfismos nos genes da dopamina- β -hidroxilase, principal enzima responsável pela conversão da dopamina à norepinefrina, e do receptor adrenérgico α_{2A} , também estão implicados na fisiopatologia do TDAH (Roman et al., 2003). Alteração no gene que codifica um transportador de serotonina e no gene que codifica o receptor 1_B desse neurotransmissor também parece estar implicada com o TDAH. A proteína

associada à sinaptossomas (SNAP-25) é específica de neurônios e está envolvida no transporte e liberação de neurotransmissor da vesícula sináptica. Estudos têm mostrado que ratos que não expressam essa proteína apresentam hiperatividade, que foi revertida tanto pelo tratamento com estimulantes (Wilson, 2000) quanto pela inserção do gene saudável (Raber et al., 1997).

Por outro lado, alterações nos genes da catecol-O-metil-transferase, monoamino oxidase, transportador de norepinefrina e seus receptores parecem não estar associados ao TDAH (Faraone et al., 2005).

Além de fatores genéticos, alguns estudos indicam que complicações na gravidez e no parto aumentam o risco para o TDAH como hipóxia, toxemia, saúde materna frágil, idade materna, longa duração do trabalho de parto, sofrimento fetal e hemorragia pré-parto (Hack et al., 2004; Indredavik et al., 2004; Mick et al., 2002; Saigal et al., 2003). Muitos estudos sugerem que a prematuridade e o baixo peso ao nascer são fatores de risco para o TDAH (Botting et al., 1997; Hack et al., 2004; Indredavik et al., 2004; Saigal et al., 2003). A exposição fetal ao álcool também está associada com prejuízo comportamental, cognitivo e de aprendizagem em crianças e que podem se apresentar como TDAH (Autti-Ramo, 2000; Boyd et al., 1991; Brown et al., 1991). Os receptores de nicotina podem modular a atividade dopaminérgica e, portanto, sugere-se que a exposição crônica do feto a essa substância pode desregular e danificar o sistema dopaminérgico atuando como um fator de risco para o TDAH. Nesse sentido, estudos em animais têm mostrado que a prole de fêmeas expostas à nicotina durante a gestação é mais hiperativa do que a prole de fêmeas não expostas (Fung e Lau, 1989; Richardson e Day, 1994; Van De Kamp e Collins, 1994). Além disso, uma revisão clínica mostrou um

aumento de risco de TDAH em filhos de mães tabagistas (Markussen-Linnet, 2003).

Estudos mostram também que adversidades psicossociais como discórdia conjugal grave, baixa renda familiar, famílias numerosas, criminalidade paterna, transtorno mental materno (depressão, por exemplo), baixa escolaridade materna e família adotiva são fatores que se correlacionam significativamente com distúrbios psiquiátricos na infância, inclusive TDAH (Barkley, 1998; Nichols e Chen, 1981; Offord et al., 1992; Palfrey et al., 1985; Rutter et al., 1975).

A desregulação dos circuitos de dopamina e norepinefrina foi, inicialmente, vinculada à patofisiologia do TDAH devido ao fato que medicamentos que atuam sobre esses sistemas melhoravam os sintomas desse transtorno e também porque animais que apresentavam lesões nesses circuitos apresentavam comportamento semelhante ao TDAH (Schneider, 1994; Shaywitz et al., 1978). As funções executivas, comumente prejudicadas no TDAH, são controladas por circuitos fronto-subcorticais e inclui a inibição de ação e pensamento, memória de trabalho, controle de interferentes, planejamento e atenção sustentada (Barkley et al., 2001; Castellanos e Tannock, 2002; Miyake et al., 2000; Robbins et al., 1998; Willcutt et al., 2005). Além disso, estudos de imagem demonstram que os pacientes possuem uma diminuição do volume das regiões fronto-subcorticais (Faraone e Biederman, 2004). No entanto, embora o padrão neuropsicológico do TDAH mais descrito seja a desregulação desses circuitos, não há uma única teoria neuropsicológica que explique tudo sobre o TDAH, pois os prejuízos neuropsicológicos

presentes nesse transtorno normalmente são heterôgeneos, o que corresponde a uma heterogeneidade causal (Nigg et al., 2004; Sonuga-Barke, 2005).

Contudo, o TDAH é descrito como sendo uma desordem complexa, multifatorial, causada pela confluência de diferentes fatores de risco (genéticos, biológicos, ambientais e psicossociais), que isoladamente exercem um pequeno efeito, mas quando concomitantes apresentam um efeito maior, podendo manifestar os sinais e sintomas do TDAH.

Estudos de imagem cerebral e de variantes genéticas fornecem informações sobre a causa e a fisiopatologia, no entanto ainda não apresentam acurácia suficiente para serem utilizados como marcador para o diagnóstico do TDAH, que permanece sendo essencialmente clínico. Além disso, mais conhecimento sobre a fisiopatologia do TDAH são necessários para compreender os mecanismos neurais relacionados à doença e, conseqüentemente, melhorar o seu diagnóstico e o tratamento, que inclui atualmente uma abordagem múltipla, no entanto os medicamentos estimulantes são primeira escolha, especialmente o MFD (Greenhill et al., 1999).

1.3 Efeitos neurotóxicos do metilfenidato

O abuso de psicoestimulantes é um sério problema de saúde pública internacional devido ao seu alto potencial de dependência e o risco elevado de comprometimento neurológico quando utilizado por um longo período (Cadet e Krasnova, 2009). Alterações sobre o sistema dopaminérgico, estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e excitotoxicidade, têm sido alguns dos mecanismos envolvidos na neurotoxicidade dos psicoestimulantes. Além disso,

mais recentemente, tem sido mostrado que essas substâncias podem promover neuroinflamação, alterações na barreira cérebro-sangue e na neurogênese (Gonçalves et al., 2014). Embora o MFD seja amplamente utilizado na clínica, inúmeras questões e incertezas permanecem sobre os efeitos moleculares e as suas consequências após o seu uso prolongado (Duong et al., 2012). Alguns estudos têm mostrado que o MFD promove efeitos semelhantes aos das anfetaminas (Kollins et al., 2001). Além disso, a preocupação acerca do uso prolongado de MFD vem crescendo, uma vez que o uso recreativo desse psicoestimulante entre adolescentes e jovens adultos têm se tornado cada vez mais comum (Verster e van Niekerk, 2012).

Alterações sobre o sistema dopaminérgico e ativação da microglia na substância negra foram reportadas após administração de MFD (4 x 20 mg/kg, a cada 2 horas) (Sadasivan et al., 2012). Além disso, ratos pré-tratados cronicamente com MFD exibiram maior dependência de cocaína (Harvey et al., 2011).

Vários estudos demonstram que o estresse oxidativo está provavelmente envolvido nos mecanismos tóxicos induzidos pelo MFD. Nós recentemente demonstramos que o córtex pré-frontal de ratos jovens duas horas após tratamento crônico com MFD (2 mg/kg, uma vez ao dia, durante 30 dias) é mais sensível aos efeitos oxidativos que o hipocampo, estriado e cerebelo (Schmitz et al., 2012). Além disso, tem sido mostrado que o tratamento agudo com MFD aumenta a atividade da superóxido dismutase e catalase, bem como a peroxidação de lipídios em cérebro de ratos jovens e adultos (Gomes et al., 2008; Martins et al., 2006). Aumento do índice de dano ao DNA também foi verificado em estriado e hipocampo de ratos jovens

submetidos ao tratamento com MFD (Andreazza et al., 2007). No entanto, apesar desses recentes dados, mais estudos são necessários para compreender a causa e as consequências da alteração no equilíbrio redox promovido pelo MFD sobre o SNC.

Em relação à função mitocondrial, os efeitos do MFD parecem ser dependentes da idade do animal e do protocolo de administração. MFD (1, 2 ou 10 mg/kg, uma vez por dia, durante 28 dias) aumentou a atividade da Na^+, K^+ -ATPase (Scherer et al., 2009), bem como a atividade de enzimas envolvidas no metabolismo energético (Fagundes et al., 2007) em estruturas cerebrais de ratos adultos. Por outro lado, a administração aguda de MFD (1, 2 ou 10 mg/kg) reduziu a atividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial em várias estruturas cerebrais (Fagundes et al., 2010a; Fagundes et al., 2010b).

Mais recentemente foi mostrado que o tratamento crônico com MFD (2,5 mg/kg, durante 5 dias) leva à sensibilização comportamental em ratos, juntamente com uma diminuição nos níveis da enzima glutamato descarboxilase no estriado e um aumento no córtex pré-frontal (Freese et al., 2012).

Aumento dos níveis de mRNA de IL-6 e TNF- α foram observados em estriado de ratos após uma única administração de MFD (Sadasivan et al., 2012). Além disso, MFD (5-20 mg/kg, 5 dias por semana, durante 3 meses) induziu astrogliose, aumento da espessura da membrana basal e aumento de vesículas pinostáticas nas células endotélias, sugerindo que o MFD promove alterações na função da barreira cérebro-sangue (Bahcelioglu et al., 2009).

Ratos jovens tratados com MFD (2 mg/kg, duas vezes por dia, durante 15 dias) apresentaram uma diminuição na sobrevivência de novas células no hipocampo, sem alterar a proliferação celular (Lagace et al., 2006). Schaefer et al. (2009) também relatou que o tratamento crônico com MFD (5 mg/kg, durante 30 dias) não alterou o número de células em proliferação. Por outro lado, foi recentemente descrito um aumento da proliferação celular e diferenciação de neuroblastos após administração de MFD (10 mg/kg, uma vez por dia, durante 28 dias) (Leet et al., 2012).

1.4 Modelos experimentais de TDAH

Os modelos animais são importantes ferramentas para a investigação dos mecanismos moleculares, celulares, comportamentais, bem como para compreensão do desenvolvimento dos circuitos neurais em crianças com desordens psiquiátricas, tais como o TDAH (Arime et al., 2011).

Os modelos experimentais candidatos a mimetizar um determinado transtorno são avaliados de acordo com a sua validade de face (ou seja, devem apresentar sintomatologia clínica), validade preditiva (os sintomas devem ser melhorados após tratamento terapêutico com os agentes normalmente utilizados na clínica) e validade de construção (o modelo deve reproduzir fatores etiológicos da doença) (Sagvolden et al., 2005; Sora et al., 2011; Willner, 1991).

Ratos espontaneamente hipertensos (SHR) são um modelo para o TDAH. Esses animais são produzidos a partir do cruzamento entre irmãos da linhagem Wistar e eles apresentam impulsividade, hiperatividade e desatenção, similares ao TDAH. A impulsividade e a hiperatividade desenvolvem-se ao

longo do tempo, no entanto, a hiperatividade não está presente em ambientes novos e sob condições ameaçadoras (van den Bergh, 2006; Sagvolden et al., 2005). Além das alterações comportamentais, os SHR apresentam uma menor liberação de dopamina no córtex pré-frontal e estriado (Carboni et al., 2003; Heal et al., 2008; Russel et al., 2000). Distúrbios no sistema noradrenérgico também estão presentes nesse modelo como o aumento da liberação de noradrenalina pelo glutamato (Russell et al., 2000; Russell e Wiggins 2000). A hiperatividade nesse modelo melhora após tratamento com MFD (Leo et al., 2003). Em contrapartida, esse modelo é bastante questionado e é consenso entre muitos pesquisadores de que ele não é um bom modelo para o TDAH (Arime et al., 2011; dela Peña et al., 2012; Sora et al., 1998; van der Bergh et al., 2006). Um dos motivos é o fato dos animais apresentarem pressão arterial elevada enquanto os pacientes não a apresentam (Hendley e Ohlsson, 1991). Outros pesquisadores (dela Peña et al., 2012; van der Bergh et al., 2006) também tem encontrado diferentes respostas entre Wistar e SHR, o que tem questionado a validade dos SHR como modelo para o TDAH. van der Bergh et al. (2006) demonstrou que a maior locomoção dos SHR não foi corrigida pelo MFD no campo aberto. Mostrou também que os SHR não apresentaram diferença na atenção e que foram menos impulsivos que os controles. Além disso, dela Peña et al. (2012) demonstrou que o pré-tratamento com MFD aumenta as chances de animais Wistar se tornarem dependentes à cocaína em relação aos SHR.

Para separar a hiperatividade da hipertensão, uma nova linhagem foi desenvolvida a partir do cruzamento entre SHR e Wistar (Hendley e Ohlsson, 1991). Esses animais apresentam os sintomas do TDAH e não são

hipertensos, porém a hiperatividade não foi diminuída pelo MFD, ou seja, esse modelo não apresenta validade preditiva.

Camundongos knockout para o transportador de dopamina são animais desenvolvidos sem o gene para esse transportador e também são utilizados como um modelo para o TDAH (Sora et al., 1998). Esses animais apresentam níveis de dopamina dez vezes maiores do que ratos selvagens no estriado (Shen et al., 2004). Esse modelo apresenta hiperlocomoção em ambientes novos, bem como aprendizagem e memória prejudicados (Gainetdinov et al., 1999; Li et al., 2010). MFD e anfetaminas foram eficazes na redução da hiperatividade presente nesse modelo (Gainetdinov et al., 1999). Por outro lado, esse modelo apresenta limitações importantes como os níveis elevados de dopamina, uma vez que não há evidências dos pacientes serem hiperdopaminérgicos. Além disso, esses animais não apresentam transportador de dopamina, principal alvo do mecanismo de ação das abordagens farmacológicas utilizadas para tratar o TDAH, inclusive o MFD. A melhora na hiperatividade observada deve-se ao aumento dos níveis de dopamina em circuitos mesocorticais que se originam do córtex pré-frontal a regiões subcorticais que estão alteradas nesse modelo e não simplesmente devido ao aumento de dopamina no estriado (Zhang et al., 2010).

Camundongo mutante coloboma é um modelo para o TDAH produzido a partir da irradiação por neutron e exhibe alta hiperatividade que é notavelmente reduzida por anfetaminas, mas não pelo MFD (Hess et al., 1992; Hesse et al., 1996). As mutações estão presentes nos genes que codificam a SNAP-25 e fosfolipase β -1 (Hess et al., 1994).

Ratos mutantes Grin1 são animais que tem uma mutação no gene Grin1, que codifica a subunidade 1 do receptor N-metil-D-aspartato (NMDA). Estes camundongos apresentam atividade locomotora elevada que é melhorada pelo MFD (Furuse et al., 2010). Contudo não está claro se a mutação em Grin1 está associada com o TDAH e se esse modelo apresenta validade preditiva frente a outras terapias utilizadas.

No entanto, considerando que ainda não há um modelo animal que satisfaça plenamente os critérios necessários para ser classificado como um bom modelo para o TDAH e que o MFD também é amplamente utilizado por não portadores de TDAH, os animais Wistar têm sido muito úteis e amplamente utilizados em todo o mundo para desvendar os mecanismos celulares, moleculares e comportamentais da neurotoxicidade do MFD.

1.5 Sistema glutamatérgico

O aminoácido glutamato é o principal neurotransmissor excitatório no SNC de mamíferos e está envolvido em diversas funções fisiológicas importantes, tais como aprendizado, memória, desenvolvimento e envelhecimento (Danbolt, 2001). O glutamato é sintetizado e estocado em vesículas nos neurônios pré-sinápticos a partir da glutamina proveniente das células gliais, em uma reação catalisada pela enzima glutaminase (Meldrum, 2000).

A liberação de glutamato na fenda sináptica ocorre por exocitose dependente de Ca^{2+} , decorrente da despolarização do terminal pré-sináptico (Attwell, 2000) (Figura 2). No meio extracelular, o glutamato exerce suas funções biológicas ao se ligar a receptores glutamatérgicos localizados na

superfície das células neurais, principalmente nos neurônios pré e pós-sinápticos. Esses receptores são classificados como ionotrópicos ou metabotrópicos, conforme suas características moleculares. Os receptores ionotrópicos possuem um canal iônico em sua estrutura e, quando ativos, se tornam permeáveis a íons como Na^+ , Ca^{2+} e K^+ ; esses receptores são subdivididos em NMDA, AMPA e cainato. Os receptores metabotrópicos são moléculas acopladas a proteínas G, que atuam modulando a atividade de enzimas como adenilato ciclase e fosfolipase C; esses receptores são subdivididos em receptores do grupo I, II e III (Danbolt, 2001).

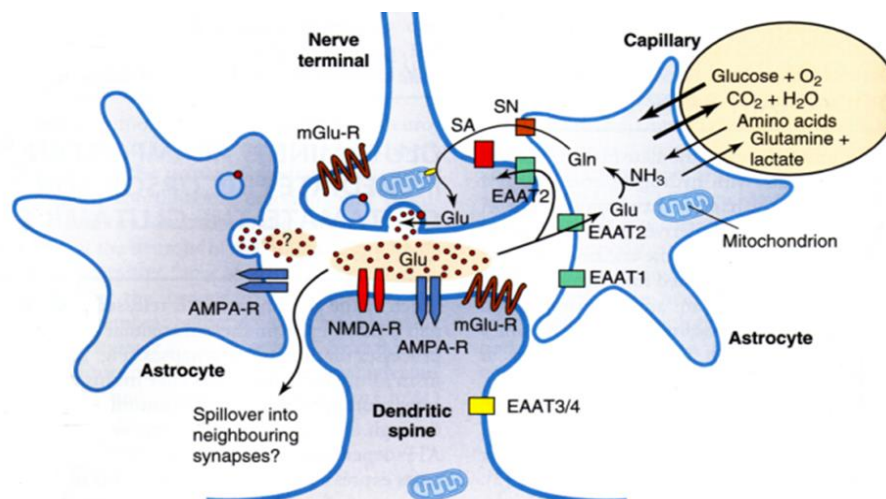


Figura 2. Sinapse glutamatérgica (Siegel et al., 2006).

EAAT1-4: transportador de aminoácidos excitatórios; Gln: glutamina; Glu: glutamato; NMDA-R e AMPA-R: receptores ionotrópicos de glutamato NMDA e AMPA, respectivamente; mGlu-R: receptor metabotrópico de glutamato; SA e SN: sistema A e sistema N de transporte de glutamina.

Após o glutamato exercer sua ação nos receptores glutamatérgicos, a sinalização glutamatérgica é finalizada por um processo denominado captação de glutamato, onde o glutamato é removido da fenda sináptica por transportadores especializados, dependentes de Na^+ , localizados principalmente nas membranas gliais (Anderson e Swanson, 2000). Há cinco diferentes isoformas de transportadores de glutamato, identificadas até o

momento: GLAST (EAAT1), GLT-1 (EAAT2), EAAC1 (EAAT3), EAAT4 e EAAT5, sendo que GLAST e GLT-1 são quantitativamente, os principais transportadores de glutamato em todas as regiões cerebrais, responsáveis por aproximadamente 90% da captação desse aminoácido (Danbolt, 2001).

O processo de captação de glutamato é realizado contra o gradiente de concentração, uma vez que a concentração desse aminoácido na fenda sináptica é muito menor que a sua concentração intracelular (Nicholls, 2008). Para isso, os transportadores usam o gradiente eletroquímico gerado pela enzima Na^+, K^+ -ATPase para o co-transporte de 3 Na^+ :1 H^+ : 1 glutamato para o meio intracelular, enquanto que 1 íon K^+ é lançado para o meio extracelular, com gasto de 1 ATP (Kanner, 2006). Há evidências de que o transporte de glutamato possa ser inibido pela ação de radicais livres que, possivelmente, atuam sobre os grupamentos sulfidrilas dos seus transportadores (Sheldon e Robinson, 2007; Volterra et al., 1994).

A amplitude da sinalização glutamatérgica depende basicamente da concentração e do tempo de permanência do glutamato na fenda sináptica (Danbolt, 2001). Desse modo, cabe ressaltar a importância do funcionamento adequado dos transportadores para uma efetiva captação de glutamato, uma vez que a superestimulação dos receptores glutamatérgicos pode induzir excitotoxicidade, um processo que envolve influxo de íons Na^+ , Ca^{2+} , estresse oxidativo, déficit energético, e que pode culminar em morte neuronal (Maragakis e Rothstein, 2001; 2004; Nicholls, 2008). Nesse contexto, a excitotoxicidade parece estar implicada na fisiopatologia de várias doenças agudas e crônicas do SNC incluindo epilepsia, isquemia e doença de Alzheimer (Danbolt, 2001; Maragakis e Rothstein, 2004).

1.6 Na⁺,K⁺-ATPase

A Na⁺,K⁺-ATPase é uma proteína integral de membrana que usa a energia da hidrólise de uma molécula de ATP para transportar 3 íons Na⁺ para o compartimento extracelular e 2 íons K⁺ para o compartimento intracelular, simultaneamente. A Na⁺,K⁺-ATPase funcional é composta por duas subunidades α e duas subunidades β . A subunidade α é responsável pela atividade catalítica da enzima e sofre fosforilação e mudança conformacional acoplada à hidrólise de ATP e ao transporte dos íons Na⁺ e K⁺. Essa subunidade também contém o sítio de ligação da ouabaína (glicosídeo cardíaco e inibidor específico da enzima). A subunidade β é uma proteína glicosilada de adesão intercelular necessária para direcionar a subunidade α para a membrana plasmática. Outra subunidade ainda menor (γ) tem sido implicada na regulação da atividade dessa enzima (Geering, 2008) (Figura 3).

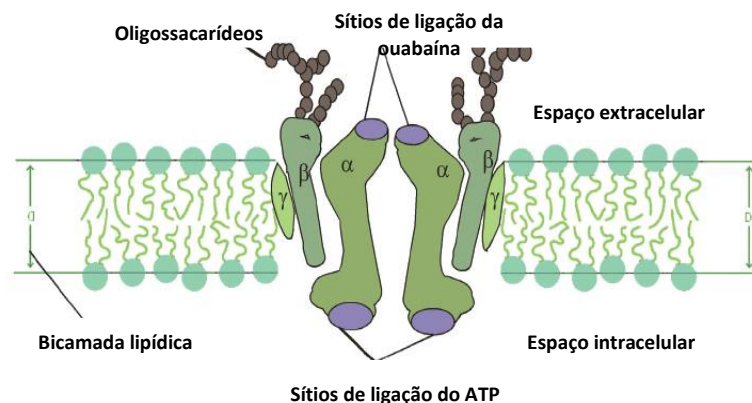


Figura 3. Estrutura da Na⁺,K⁺-ATPase (Modificado de Suhail, 2010)

Os genes de quatro isoformas da subunidade catalítica α (α_1 , α_2 , α_3 e α_4) foram identificados em mamíferos até o momento. As isoformas α_1 , α_2 e α_3 se encontram em diferentes tipos de células do SNC, entretanto a α_4 não é expressa no cérebro. A isoforma α_1 é ubiquamente expressa enquanto a α_2 é expressa em pequenos subconjuntos de neurônios, porém em muitos astrócitos. A isoforma α_3 é expressa exclusivamente em neurônios de várias estruturas cerebrais (Bottger et al., 2011; McGrail et al., 1991). Existem três isoformas da subunidade β em mamíferos (β_1 , β_2 e β_3) e tem sido sugerido que a isoforma β_1 é expressa em neurônios enquanto a β_2 é encontrada em astrócitos (Benarroch, 2011; Geering, 2008). Uma subunidade γ modulatória foi encontrada no cérebro, mas essa subunidade parece não ser essencial para a atividade da Na^+, K^+ -ATPase (Geering, 2008) (Figura 3).

O gradiente de íons Na^+ e K^+ gerado pela Na^+, K^+ -ATPase é importante para uma série de funções celulares tais como regulação do volume celular, pH, manutenção do potencial de membrana em repouso e transporte de moléculas ligadas ao co-transporte de Na^+ , como aminoácidos, neurotransmissores e glicose (Blanco, 2005; Jorgensen et al., 2003). Nos neurônios, a restauração dos gradientes de Na^+ e K^+ pela isoforma α_3 é muito importante para a manutenção da excitabilidade neuronal, condução do potencial de ação em axônios mielinizados e para o transporte secundário de neurotransmissores acoplados ao Na^+ (Benarroch, 2011). Em astrócitos, a α_2 é co-localizada com diferentes transportadores de glutamato, gerando o gradiente eletroquímico necessário para a captação desse neurotransmissor e consequente finalização da sinalização glutamatérgica (Rose et al., 2009).

A regulação da Na^+, K^+ -ATPase inclui diversos fatores como disponibilidade de substrato, componentes da membrana celular, hormônios e fosforilação (Lopina, 2000; Wang e Yu, 2005). Além disso, essa enzima é sensível ao ataque de radicais livres (Wang et al., 2003), sendo inibida por metabólitos formados durante a peroxidação lipídica e por alterações na membrana plasmática (Chakraborty et al., 2003; Dencher et al., 2007; Rauchova et al., 1999).

A atividade da Na^+, K^+ -ATPase é importante para a remoção de glutamato da fenda sináptica e alterações na sua atividade parecem estar associadas a diversas patologias que afetam o SNC, tais como enxaqueca (Suhail, 2010), doença de Alzheimer (Vitvitsky et al., 2012), depressão (Goldstein et al., 2006), doença de Parkinson e epilepsia (Aperia, 2007; Benarroch, 2011). Estudos em animais mostram que drogas psicoativas como a anfetamina (Zugno et al., 2009), fluoxetina (Zanatta et al., 2001), selegilina (Carageorgiou et al., 2003), haloperidol, carbamazepina e lítio (Wood et al., 1989), bem como MFD (Scherer et al., 2009) alteram a atividade da Na^+, K^+ -ATPase. No entanto, ainda faltam estudos para compreender os efeitos da administração crônica de MFD sobre a função da Na^+, K^+ -ATPase, especialmente durante o desenvolvimento cerebral.

1.7 Radicais livres e estresse oxidativo

O radical livre pode ser definido como qualquer espécie química que contém um ou mais elétrons desemparelhados no seu orbital mais externo. O elétron desemparelhado geralmente leva a uma elevada reatividade e instabilidade da molécula (Halliwell e Gutteridge, 2007). Eles são gerados nos

sistemas vivos quando aproximadamente 5% do oxigênio molecular (O_2) não é completamente reduzido até a formação de água na cadeia transportadora de elétrons. As principais espécies reativas são: ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^{\bullet}). O peroxinitrito ($ONOO^-$) é formado a partir da reação do NO^{\bullet} com o $O_2^{\bullet-}$ (Halliwell e Whiteman, 2004; Valko et al., 2004).

As espécies reativas podem exercer tanto papel benéfico quanto deletério para os sistemas vivos. Elas têm papel benéfico quando atuam, por exemplo, no combate a agentes infecciosos e nos processos de sinalização celular. Por outro lado, elevadas concentrações de espécies reativas causam danos às biomoléculas como lipídios, proteínas e DNA, que podem levar a perda de função celular. Enzimas, proteínas transportadoras e receptores podem ter sua estrutura alterada quando oxidadas por espécies reativas com consequente prejuízo das suas funções (Halliwell, 2012; Valko et al., 2007).

Em condições fisiológicas as espécies reativas são mantidas em equilíbrio devido, em grande parte, a capacidade de neutralização do sistema de defesa antioxidante enzimático e não enzimático. As defesas antioxidantes enzimáticas incluem a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx). Os antioxidantes não enzimáticos são representados pelo ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), glutathione, carotenóides, flavonóides e outros antioxidantes (Halliwell and Gutteridge, 2007; Halliwell, 2011). A SOD é uma metaloenzima que catalisa a reação de dismutação do $O_2^{\bullet-}$, formando H_2O_2 e O_2 . O H_2O_2 pode ser decomposto pelas enzimas CAT e GPx. A CAT atua na decomposição do H_2O_2 a H_2O e O_2 sendo encontrada principalmente nos peroxissomos da maioria dos

tecidos em humanos, estando presente em maior quantidade no fígado. Por outro lado, o cérebro apresenta pequenas quantidades de CAT (Marklund et al., 1985). A GPx, localizada nas membranas celulares, decompõe o H_2O_2 através do acoplamento de sua redução a H_2O com a concomitante oxidação da glutatona ao dissulfeto de glutatona (Halliwell and Gutteridge, 2007).

Em condições fisiológicas, existe um equilíbrio entre a produção de espécies reativas e as defesas antioxidantes. Entretanto, quando esse equilíbrio é rompido ocorre um processo denominado de estresse oxidativo e que pode estar associado a diversas patologias. Todas as células aeróbias sofrem danos oxidativos, no entanto, o cérebro dos mamíferos é altamente sensível. Alguns fatores que tornam o SNC altamente suscetível às espécies reativas incluem: alto consumo de oxigênio; presença de neurotransmissores que sofrem auto-oxidação como dopamina, serotonina e noradrenalina; alta concentração de ferro; lipídios de membrana ricos em ácidos graxos insaturados e defesas antioxidantes modestas (Halliwell, 2012). Evidências têm sugerido o envolvimento do estresse oxidativo na patogênese de doenças neurodegenerativas como Huntington, Alzheimer e Parkinson (Petrozzi et al., 2007; Mancuso et al., 2010).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

A fim de investigar e compreender as alterações cerebrais promovidas pelo MFD, o objetivo **geral** do presente trabalho foi avaliar o efeito desse psicoestimulante sobre o perfil de aminoácidos no líquido cefalorraquidiano e no córtex pré-frontal de ratos submetidos ao modelo de tratamento precoce crônico com este fármaco. Além disso, investigamos os possíveis efeitos do MFD sobre a homeostase glutamatérgica; atividade, imunoconteúdo e expressão gênica da Na⁺,K⁺-ATPase; bem como parâmetros de estresse oxidativo em córtex pré-frontal desses animais.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito do MFD sobre as concentrações de diferentes aminoácidos em líquido cefalorraquidiano e córtex pré-frontal de ratos submetidos ao modelo de tratamento precoce crônico com este fármaco;
- Investigar a captação de glutamato, bem como o imunoconteúdo dos transportadores de glutamato, GLAST e GLT-1, em córtex pré-frontal de ratos jovens submetidos ao tratamento crônico com MFD;
- Determinar a atividade da Na⁺,K⁺-ATPase, bem como o imunoconteúdo e a expressão gênica das subunidades catalíticas (α_1 , α_2 e α_3) em córtex pré-frontal de ratos jovens tratados cronicamente com MFD;
- Avaliar alguns parâmetros de estresse oxidativo, a saber: os níveis de espécies reativas, dano a proteínas e lipídios, bem como a atividade de enzimas

antioxidantes (SOD, CAT e GPx) em córtex pré-frontal de ratos jovens submetidos ao tratamento crônico com MFD.

3. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS E

RESULTADOS

Esse item será apresentado na forma de artigo científico.

3.1 Artigo científico

Chronic treatment with a clinically-relevant dose of methylphenidate increases glutamate levels in cerebrospinal fluid and impairs glutamatergic homeostasis in prefrontal cortex of juvenile rats

Felipe Schmitz, Paula Pierozan, André F. Rodrigues, Helena Biasibetti, Daniella M. Coelho, Ben Hur Mussulini, Mery S. L. Pereira, Mariana M. Parisi, Florencia Barbé-Tuana, Diogo L. de Oliveira, Carmen R. Vargas, Angela T. S. Wyse

Periódico: **Molecular Neurobiology**

Status: **Submetido para publicação**

Chronic treatment with a clinically-relevant dose of methylphenidate increases glutamate levels in cerebrospinal fluid and impairs glutamatergic homeostasis in prefrontal cortex of juvenile rats

Felipe Schmitz¹, Paula Pierozan¹, André F. Rodrigues¹, Helena Biasibetti¹, Daniella M. Coelho², Ben Hur Mussulini³, Mery S. L. Pereira³, Mariana M. Parisi⁴, Florencia Barbé-Tuana⁴, Diogo L. de Oliveira³, Carmen R. Vargas²,
Angela T. S. Wyse¹

¹Laboratório de Neuroproteção e Doenças Metabólicas, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

²Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

³Laboratório de Sinalização Glutamatérgica, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

⁴Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

Address reprint requests to: Dr. Angela T. S. Wyse, Departamento de Bioquímica, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2600-Anexo, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil, Phone: 55 51 33085573, Fax: 55 51 33085535, E-mail: wyse@ufrgs.br

ABSTRACT

Understanding the consequences of chronic treatment with methylphenidate is very important since this psychostimulant is extensively prescribed to preschool age children. Additionally, little is known about the mechanisms underlying the persistent changes in behavior and neuronal function related with the use of methylphenidate. In this study, we initially investigate the effect of chronic treatment with methylphenidate in juvenile rats on the amino acids profile in cerebrospinal fluid, as well as on glutamatergic homeostasis, Na⁺,K⁺-ATPase function and balance redox in prefrontal cortex. Wistar rats at early age received intraperitoneal injections of methylphenidate (2.0 mg/kg) or an equivalent volume of 0.9% saline solution (controls), once a day, from the 15th to the 45th day of age. Our results showed that methylphenidate altered amino acid profile in cerebrospinal fluid, increasing the levels of glutamate. In the prefrontal cortex, methylphenidate administration was able to decrease the glutamate uptake, with no changes in GLAST and GLT-1; and the activity and immunocontent of catalytic subunits (α_1 , α_2 and α_3) of Na⁺,K⁺-ATPase. We also observed changes in α_1 and α_2 gene expression of catalytic α subunits of Na⁺,K⁺-ATPase, decrease in sulfhydryl content, CAT activity and SOD/CAT ratio in juvenile rat prefrontal cortex treated with methylphenidate. Together, our results, suggest that chronic treatment with methylphenidate at early age induces excitotoxicity, at least in part, due to inhibition of glutamate uptake probably caused by disturbances in the Na⁺,K⁺-ATPase function and/or protein damage observed in the prefrontal cortex.

Keywords: Methylphenidate; Juvenile rats; Excitotoxicity glutamatergic; Cerebrospinal fluid; Prefrontal cortex; α subunits of Na^+, K^+ -ATPase

INTRODUCTION

Amphetamine-like stimulants, mainly methylphenidate (MPH), has been widely used to treat attention-deficit hyperactivity disorder [1-3]. Attention-deficit hyperactivity disorder is a complex neuropsychiatric disease worldwide, highly prevalent, affecting 5% to 12% of children [4] and with the main characteristics are excessive levels of inattention, hyperactivity and impulsivity [5-8]. In addition, has been significantly increasing the use of MPH among normal people to improve cognitive performance and children of preschool age [9].

There is no doubt that the MPH is effective to treat symptoms of attention-deficit hyperactivity disorder, increasing the concentration of dopamine and norepinephrine neurotransmitters in synapses by blocking their transporters [9-12]. However, the increased prescription of MPH, especially among preschool children, is worrisome [13-15]. It has been shown that long-term treatment with stimulants in children and adolescents affects the neurotransmitter systems, which could lead to structural changes in the brain and long-term behavioral, biochemical and molecular changes in adulthood [14]. In this context, Chase et al. [16] showed that MPH administration alters c-fos expression in brain of juvenile rats. The exact mechanisms by which MPH the developing brain are still poorly understood, but recent studies have shown the possible involvement of the glutamatergic system [17-18].

Most neurotransmitters are amino acids or may be synthesized from amino acids or other biochemical intermediates. Amino acids can quickly enter the cerebrospinal fluid through a single amino acid transporter [19]. Glutamate, an amino acid, is the major excitatory neurotransmitter in the central nervous system (CNS) and plays important role in brain plasticity processes, such as

learning/memory and development [20, 21]. On the other hand, overstimulation of the glutamatergic system may leads to a process known as excitotoxicity [22], which has been implicated in the pathogenesis of various CNS disorders including epilepsy, ischemia and Alzheimer's disease [23-25]. Therefore, the maintenance of glutamate below of its toxic levels is essential for the normal brain function. Glutamate transporters, GLT-1 and GLAST, located predominantly in glial cells [20, 25, 26], remove the glutamate from the synaptic cleft through a mechanism known as glutamate uptake, maintaining its physiologic levels and avoid excitotoxicity [20, 27-28]. These transporters are Na^+ dependent proteins that use electrochemical Na^+ gradient generated by Na^+, K^+ -ATPase activity to drive the uphill transport of glutamate, suggesting that the Na^+, K^+ -ATPase may have a key regulator of glutamate transporter activity [29].

Na^+, K^+ -ATPase is an integral membrane protein that regulates neuronal signaling, ion homeostasis, muscle contraction, and substrate transportation of most animal cells [30]. This enzyme transports 3 Na^+ from within the cell in exchange for 2 K^+ from outside the cell using the energy derived from hydrolysis of one molecule of ATP [31]. Disturbance in Na^+, K^+ -ATPase may induce significant damage on brain function. The inhibition of its activity is found in various diseases that affect the CNS, including schizophrenia [32], cerebral ischemia [33], Alzheimer's disease [34], depression [35] and mania [36]. It has been reported that Na^+, K^+ -ATPase is particularly susceptible to free radicals attack and/or induction of oxidative stress [37, 38]. In this context, recently our researcher group has shown that the MPH treatment induce a pro-oxidative status in prefrontal cortex of juvenile rats at 2 hours after the last injection [39].

In addition, it has been shown that reactive oxygen species may play a role in the behavioral changes and neurodegeneration after psychostimulant use [40].

Little is known about the mechanisms that contribute to the effectiveness and consequences neuroadaptacional of MPH use, particularly in long term fashion stages of brain development [41, 42]. Therefore, the purpose of the present study, initially, was to investigate the effect of chronic treatment with MPH on amino acids concentration in cerebrospinal fluid and prefrontal cortex of juvenile rats. We also investigated the effect of MPH treatment on the glutamatergic homeostasis (glutamate uptake and immunocontent of glutamate transporters, GLAST e GLT-1), as well as on the activity, immunocontent and gene expression of Na⁺K⁺-ATPase catalytic subunits (α_1 , α_2 and α_3) in prefrontal cortex of juvenile rats. Finally, we evaluated the effects of MPH treatment on some oxidative stress parameters, namely [2'7'-dichlorofluorescein diacetate (H₂DCF-DA)], antioxidant defenses [(SOD, CAT and GPx activities) and SOD/CAT ratio]; and on parameters of biomolecules damage [thiobarbituric acid reactive substances (TBARS levels) and sulfhydryl content (SH content)] in prefrontal cortex of juvenile rats.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Animals and reagents

Considering an $\alpha = 0.05$, a power estimated at 0.80 and values of previous studies; we determined that 5 animals per group were sufficient for this study. A total of 110 male and female Wistar rats were used. The rats were obtained from the Central Animal House of the Department of Biochemistry of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil. Litters

were culled to seven pups on postnatal day (PD 3) (day of parturition = PD 0) and were kept with the dam until weaning on PD 21. After weaning, the rats were re-housed in boxes containing up to five animals the same sex. Animals were maintained on a 12:12 light/dark cycle at a constant temperature ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), with free access to water and commercial protein chow. All animals were treated in accordance with the "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" (NIH publication No. 80-23, revised 1996) and a research protocol approved by the University's Ethics Committee (No. 24812). All chemicals were obtained from Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA.

Chronic early treatment with methylphenidate

Beginning on PD 15, rats were weighed and injected intraperitoneally with saline solution (control group) or 2.0 mg/kg of methylphenidate (MPH group), once a day, for thirty consecutive days. MPH was dissolved in saline and injected at a volume of 1 mL/100g of body weight. The control group received equivalent volume of saline solution. This dose was selected because it produces clinically relevant levels of MPH in the plasma [43]. Twenty-four hours after the last injection (PD 45), the animals were decapitated and the cerebrospinal fluid and prefrontal cortex were removed and processed according to each analysis. We chose to start administering MPH to rats at 15 days of life because in the first 3 weeks during the post-natal period in rats are characterized by intense synaptogenesis, myelination and gliogenesis, comparable to early childhood in humans [44]. Treatment lasted thirty days because it has been shown that this period mimics chronic use in humans [45]. Both male and female were included in this study because our previous work found no significant differences

between males and females juvenile in regards to responses to MPH treatment [46].

Determination of amino acids concentrations

Prefrontal cortex was previously homogenized in 5 volumes (1:5, w/v) of 0.9% saline solution, centrifuged at 800 g for 10 min at 4 °C and the supernatant was taken to amino acids determination. Free amino acids in cerebrospinal fluid and prefrontal cortex were determined by HPLC method according to Joseph and Marsden [47] with slight modifications [48]. Amino acids were quantitatively determined by relating their chromatographic peak area to those obtained from a known standard mixture and to that of internal standard peak area (homocysteic acid). Fourteen rats were needed for this assay (n = 7).

Assay of glutamate uptake and GLAST and GLT-1 immunocontent

Glutamate uptake was performed according to Frizzo et al. [49]. Fourteen rats were needed for this assay (n = 7). Prefrontal cortex was cut into 400 µm thick slices with a McIlwain chopper. Briefly, slices were pre-incubated in Hank's balanced salt solution (HBSS) at 37 °C for 15 min, followed by adding a solution containing 0.33 mCi/mL L-[2,3-³H] glutamate (Amersham International, UK) with 100 µM unlabeled glutamate at 37 °C. Incubation was stopped after 5 min with two ice-cold washes of 1 mL HBSS, immediately followed by the addition of 0.5 N NaOH. Sodium-independent uptake was determined on ice (4 °C), using HBSS containing N-methyl-D-glucamine instead of sodium chloride. The results were subtracted from the total uptake to obtain the sodium-dependent uptake

and were calculated as nmol of glutamate/min/mg protein. Both the specific and non-specific uptakes were performed in triplicate.

GLAST and GLT-1 immunocontent. Sixteen rats were needed for this assay (n = 8). Prefrontal cortex was dissected out and immediately homogenized in a 25 mM HEPES solution (pH 7.4) with 0.1% SDS and protease inhibitor cocktail (Sigma, USA). Samples (20 µg protein/well) were separated in an 8 % SDS-PAGE mini-gel and transferred to a nitrocellulose membrane using a Trans-Blot system (Bio-Rad, São Paulo/SP, Brazil). Membranes were processed as follow: (1) blockage with 5 % bovine serum albumin (Sigma, USA) for 2 h; (2) incubation with primary antibody overnight: 1:1,000 rabbit anti-GLAST or rabbit anti-GLT-1 glutamate transporters (Alpha Diagnostic International); 1:2,000 mouse anti-β actin (Sigma); (3) incubation with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody for rabbit 1:3,000 and mouse 1:3,000 (Amersham Pharmacia Biotech) for 2 h; and (4) chemiluminescence detection (ECL, Amersham Pharmacia Biotech, São Paulo/SP, Brazil) with X ray films (Kodak X-Omat, Rochester, NY, USA). The films were scanned and bands intensities were analyzed using Image J software (developed at the US National Institutes of Health and available on the web site (<http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>)). In order to determine the adequate amount of protein to be assayed, different protein concentrations were carried out in the same gel for each antibody tested.

Assay of activity, immunocontent and gene expression of catalytic α subunits of Na⁺,K⁺-ATPase

Na⁺,K⁺-ATPase activity assay. Prefrontal cortex was homogenized in 10 volumes (1:10, w/v) of 0.32 mM sucrose solution containing 5.0 mM HEPES and 1.0 mM EDTA, pH 7.5. Homogenates were centrifuged at 1,000 g for 10 min at 4 °C. Supernatants were taken for Na⁺,K⁺-ATPase activity assay. Fourteen rats were needed for this assay (n = 7). Reaction mixture for Na⁺,K⁺-ATPase activity assay contained 5.0 mM MgCl₂, 80.0 mM NaCl, 20.0 mM KCl, and 40.0 mM Tris-HCl, pH 7.4, in a final volume of 200 µL. After 10 min of pre-incubation at 37 °C, the reaction was started by the addition of ATP to a final concentration of 3.0 mM and was incubated for 20 min. Controls were carried out under the same conditions with addition of 1.0 mM ouabain. Na⁺,K⁺-ATPase activity was calculated by the difference between the two assays [33]. Released inorganic phosphate (Pi) was measured by the method of [50] and enzyme specific activity was expressed as nmol Pi released per min per mg of protein.

Immunocontent of catalytic α subunits by western blotting. Fourteen rats were needed for this assay (n = 7). Prefrontal cortex of rats were homogenized in a lysis solution containing 2 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 6.8, and 4 % SDS. For electrophoresis analysis, samples were dissolved in 25 % (v/v) of a solution containing 40 % glycerol, 5 % mercaptoethanol, and 50 mM Tris-HCl, pH 6.8. Equal protein concentrations were loaded onto 10 % polyacrylamide gels and analyzed by SDS-PAGE. The gels were transferred (Trans-blot SD semidry transfer cell, BioRad) to nitrocellulose membranes for 1 h at 15 V in transfer buffer (48 mM Trizma, 39 mM glycine, 20 % methanol, and 0.25 % SDS). The blot was then washed for 10 min in Tris-buffered saline (TBS) (0.5 M NaCl, 20 mM Trizma, pH 7.5), followed by a 2 h incubation in blocking solution

(TBS plus 5 % bovine serum albumin, fraction V). After incubation, the blot was washed twice for 5 min with blocking solution plus 0.05 % Tween-20 (T-TBS). Next the blot was incubated overnight at 4 °C in blocking solution containing one of the following monoclonal antibodies: anti- β actin diluted 1:1000; or monoclonal anti- Na^+, K^+ -ATPase (α_1 subunit) antibody clone M8-P1-A3 (Sigma, St. Louis, MO, USA); or Na^+, K^+ -ATPase α_2 -isoform (Millipore, Billerica, MA, USA); or monoclonal anti- Na^+, K^+ -ATPase (α_3 subunit) antibody clone XVIF9-G10 (Sigma, St. Louis, MO, USA) diluted 1:5000. The blot was then washed twice for 5 min with T-TBS and incubated for 2 h in antibody solution containing peroxidase-conjugated anti-mouse IgG or peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG diluted 1:5000. The blot was washed twice for 5 min with T-TBS and twice for 5 min with TBS and developed using a chemiluminescence ECL kit (Amersham, Oakville, Ontario).

Gene expression of catalytic α subunits by quantitative RT-PCR. Analysis of Na^+, K^+ -ATPase catalytic subunits expression was carried out by quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR) with SYBR green as fluorescent detector. Gene sequence information was collected from databases (www.ncbi.nlm.nih.gov, www.ensembl.org) and used for primers' design with software from Integrated DNA Technologies (www.idtdna.com) (Table 1). Prefrontal cortex from fourteen rats was dissected (n =7), immediately snaps frozen in liquid nitrogen and subsequently stored at -80 °C. Total RNA extraction was performed using TRIZOL[®] reagent (Invitrogen) in accordance with the manufacturer instructions. RNA was quantified in a biophotometer (Eppendorf) at 260/280nm and the integrity was confirmed by electrophoresis in a 1 % formamide-agarose gel. cDNA was synthesized with

M-MLV Reverse Transcriptase (Sigma) from 2 µg of total RNA. 3 µl of diluted cDNA (1:10) was used as template for PCR reactions with Platinum® Taq Polymerase (Invitrogen) in a final volume of 20 µl. The thermal cycling profile for all genes was an initial denaturation step at 94 °C for 10 min followed by 40 cycles of 15 sec at 94 °C, 15 sec at 60 °C, 15 sec at 72 °C for data acquisition. The specificity of amplification and absence of primer-dimer was confirmed using melting curve analysis at the end of each run. Additionally, we confirmed the amplification of a single amplicon of the specified size by agarose gel electrophoresis. All reactions were carried out in a StepOnePlus® real-time PCR system (Applied Biosystems). Samples were normalized by the constitutive gene (GAPDH) and calibrated by the average of the Δ CT of the group itself [51]. In order to analyze data by the Comparative CT Method ($\Delta\Delta$ CT method) we previously checked for similarity of PCR efficiencies between the targets (Alpha1, Alpha2, Alpha3) and endogenous control (GAPDH).

Assay of oxidative stress parameters

For determination of oxidative stress parameters was necessary twenty four rats (n = 6). Prefrontal cortex was homogenized in 10 volumes (1:10, w/v) of 20 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4, containing 140 mM KCl. The homogenates were centrifuged at 800 g for 10 min at 4 °C. The pellet was discarded, and the supernatant was immediately separated and used for the measurements of oxidative stress.

2'7'-Dichlorofluorescein fluorescence assay. Reactive oxygen species production was measured according to the method of LeBel and colleagues [52] and based on the oxidation of 2'7'-dichlorofluorescein (H₂DCF). The samples were incubated in a medium containing 100 µM 2'7'-dichlorofluorescein

diacetate (H₂DCF-DA) solution. Reaction produces the fluorescent compound dichlorofluorescein (DCF) which is measured at $\lambda_{em}=488$ nm and $\lambda_{ex}= 525$ nm. Results were represented as nmol DCF/mg protein.

Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). TBARS, an index of lipid peroxidation, were measured according to Ohkawa and colleagues [53]. The samples were incubated in a medium containing 8.1 % sodium dodecyl sulfate (SDS), 20 % acetic acid, and 0.8 % thiobarbituric acid. This mixture was vortexed, and the reaction was carried out in a boiling water bath for 1 h. The resulting pink-stained TBARS were determined spectrophotometrically at 535 nm. A calibration curve was generated using 1,1,3,3-tetramethoxypropane as a standard, and the results were represented as nmol of TBARS/mg of protein.

Sulfhydryl content. This assay was performed as described by Aksenov and Markesbery [54], which is based on the reduction of 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) by sulfhydryl groups, which in turn become oxidized (disulfide), generating a yellow derivative (TNB) whose absorption is measured spectrophotometrically at 412 nm. Briefly, 15 μ L of homogenate were added to 275 μ L of phosphate buffer saline pH 7.4 containing 1 mM EDTA. The reaction was started by the addition of 10 μ L of 10 mM DTNB and incubated for 30 minutes at room temperature in a dark room. The sulfhydryl content is inversely correlated to oxidative damage to the protein. Results were reported as nmol of TNB per milligram of protein.

Superoxide dismutase assay (SOD). SOD activity assay is based on the capacity of pyrogallol to autoxidize, a process highly dependent on superoxide, which is a substrate for SOD. Inhibition of autoxidation of this compound occurs in the presence of SOD, whose activity was then indirectly assayed at 420 nm

[55]. A calibration curve was performed with purified SOD as a standard, in order to calculate the activity of SOD present in the samples. The results were represented as units per milligram of protein.

Catalase assay (CAT). CAT activity was assayed using a SpectraMax M5/M5 Microplate Reader (Molecular Devices, MDS Analytical Technologies, Sunnyvale, CA, USA). The method used is based on the disappearance of H₂O₂ at 240 nm in a reaction medium containing 20 mM H₂O₂, 0.1 % Triton X-100, 10 mM potassium phosphate buffer pH 7.0, and 0.1–0.3 mg protein/mL [56]. One CAT unit is defined as 1 μmol of H₂O₂ consumed per minute, and the results were represented as units per milligram of protein.

Glutathione peroxidase assay (GPx). GPx activity was measured using tert-butyl-hydroperoxide as a substrate [57]. NADPH disappearance was monitored at 340 nm. The medium contained 2 mM glutathione, 0.15 U/mL glutathione reductase, 0.4 mM azide, 0.5 mM tert-butyl-hydroperoxide, and 0.1 mM NADPH. One GPx unit is defined as 1 μmol of NADPH consumed per minute; the specific activity is represented as units per milligram of protein.

Protein determination

The protein content of samples was determined using bovine serum albumin as standard, according to Peterson [58] for glutamate uptake, Bradford [59] for Na⁺,K⁺-ATPase parameters and GLAST and GLT-1 immunocontent or Lowry et al. [60] for oxidative stress parameters.

Statistical analysis

Analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software, in a PC-compatible computer. Student's *t* test was used to evaluate the different parameters after the dates presented a normal distribution in Shapiro–Wilk test. Results are expressed as means \pm SD, and differences were considered statistically significant when $p < 0.05$. In all cases, litter effects were controlled by assigning not more than two subjects from a litter to a particular group.

RESULTS

Initially we evaluated the effect of chronic treatment with MPH on the levels of various amino acids in cerebrospinal fluid of juvenile rats. Table 2 shows that chronic treatment with MPH caused a significant increase in glutamate levels ($p < 0.05$) and ornithine ($p < 0.05$), as well as a decrease in tyrosine levels ($p < 0.05$) as compared to control (saline). Histidine levels were only detected in the cerebrospinal fluid of animals chronically treated with MPH. There was no significant difference for other amino acids examined (aspartate, serine, glutamine, glycine, alanine, tryptophan, methionine, valine, phenylalanine, isoleucine, leucine and lysine) when compared to the control group ($p > 0.05$). Although the levels of methionine have not shown significant difference when compared to controls, there is a tendency of reduction ($p = 0.099$) in the cerebrospinal fluid of juvenile rats treated with MPH.

We also measured the concentrations of amino acids in the prefrontal cortex of juvenile rats chronically treated with MPH in order to evaluate a possible participation of this structure in the alteration of concentration of some amino acids observed in cerebrospinal fluid. Table 3 shows that, in prefrontal

cortex, MPH treatment increased the levels of histidine ($p < 0.01$), glycine ($p < 0.05$) and tyrosine ($p < 0.01$), but reduced the levels of serine ($p < 0.05$), glutamine ($p < 0.05$) and leucine ($p < 0.01$). Aspartate, glutamate, alanine, tryptophan, methionine, valine, phenylalanine, isoleucine, ornithine and lysine were not altered ($p > 0.05$), when compared to the control group.

In order to investigate the changes in the levels of glutamate and glutamine observed so far, our next step was to evaluate the effects of chronic early treatment with MPH on glutamate uptake in prefrontal cortex of juvenile rats. Figure 1 shows that chronic MPH treatment decreased glutamate uptake in the prefrontal cortex of juvenile rats ($p < 0.05$) when compared to the control group. The effect of chronic MPH treatment on the immunocontent of GLAST and GLT-1 was also evaluated. Figure 2 shows that MPH did not alter the immunocontent of GLAST and GLT-1 in the prefrontal cortex of juvenile rats ($p > 0.05$).

Since the activity of Na^+, K^+ -ATPase is closely related to clearance of glutamate from the extracellular fluid and synaptic cleft, we tested the effect of chronic MPH administration on this enzyme. As can be observed in Figure 3, the specific activity of this enzyme was decreased in the prefrontal cortex of juvenile rats treated with MPH ($p < 0.001$). We also evaluated the immunocontent of catalytic α subunits of Na^+, K^+ -ATPase in prefrontal cortex of juvenile rats that received chronic treatment with MPH. Figure 4 shows that chronic MPH administration significantly reduced the immunocontent of α_1 subunit ($p < 0.05$), α_2 subunit ($p < 0.001$) and α_3 subunit ($p < 0.01$) in the prefrontal cortex.

Changes in the activity and immunocontent of catalytic α subunits may reflect changes in gene expression of their genes. Therefore, we also investigated the gene expression of catalytic α subunits in prefrontal cortex of juvenile rats under chronic treatment with MPH. Figure 5 shows that MPH increased the gene expression of α_1 catalytic subunit ($p < 0.05$), and decreased α_2 ($p < 0.05$) and did not alter the gene expression of α_3 in rat prefrontal cortex.

Since oxidative stress affects glutamatergic homeostasis and Na^+, K^+ -ATPase, we investigated the effects of chronic treatment with MPH on different parameters of oxidative stress in the prefrontal cortex of juvenile rats. Table 5 shows that chronic MPH treatment caused protein damage, as indicated by the decreased of SH content ($p < 0.01$). In addition, CAT activity was increased ($p < 0.05$) and SOD/CAT ratio decreased ($p < 0.05$). However, the levels of DCF (a measure of the production of reactive oxygen species), TBARS (a measure damage to lipids), and the activity of SOD and GPx were not altered by MPH treatment ($p > 0.05$), as compared to controls.

DISCUSSION

In the present study, initially, we investigated the effects of chronic treatment with MPH on amino acids concentrations in cerebrospinal fluid and prefrontal cortex of juvenile rats. Our results showed that MPH increases glutamate concentration in cerebrospinal fluid and decreases glutamine levels in rat prefrontal cortex. These results suggest that MPH may induce an imbalance in glutamate homeostasis, leading to glutamatergic excitotoxicity via inhibition of glutamate uptake. This was confirmed in the prefrontal of juvenile rats chronically treated with MPH.

MPH acts by blocking dopamine and norepinephrine transporters, increasing the levels of these neurotransmitters in various brain pathways [1, 2, 43, 62-64]. Dopamine and glutamatergic systems are intricately interlinked, via intracellular signaling pathways, as well as via physical interactions [64]. However, to our knowledge, little is known about the influence of the glutamatergic system on the consequences of the use of MPH during brain development. In order to investigate whether the changes provoked by MPH treatment had some relationship with glutamate transporters levels, responsible to account for the majority of extracellular glutamate [11], in the present study we evaluated the immunoccontent of GLAST and GLT-1 in homogenate of prefrontal cortex. Results showed that GLAST and GLT-1 levels were not altered in prefrontal cortex in juvenile rats treated with MPH, suggesting that the decrease of glutamate uptake induced by MPH does not involve a quantitative changes in the transporters protein, but possible an alteration on its proper function.

One of the mechanisms proposed for the regulation of glutamate transporter is based on the dependence of glutamate uptake by the gradient of Na^+ generated by the Na^+, K^+ -ATPase [29]. In agreement with this point, our results demonstrated that chronic early treatment with MPH decreased Na^+, K^+ -ATPase activity in prefrontal cortex. The α subunit of the enzyme Na^+, K^+ -ATPase is responsible for the catalytic activity; it has been identified four isoforms of the α subunit (α_1 , α_2 , α_3 , and α_4): α_1 is ubiquitously expressed; α_2 is expressed mainly in skeletal muscle and brain (astrocytes), α_3 is expressed by neurons and heart cells and α_4 is expressed only in testes [65]. Considering that chronic treatment with MPH at early age inhibited Na^+, K^+ -ATPase activity, we

extend our study and investigated whether the MPH could alter the immunocontent and the gene expression of the catalytic α subunits of this enzyme in the prefrontal cortex of juvenile rats. The results showed that the immunocontent of α_1 , α_2 and α_3 isoforms were significantly decreased. In addition, chronic treatment with MPH increased the gene expression pattern of the α_1 subunit and decreased of α_2 , but did not change α_3 subunit, in prefrontal cortex of juvenile rats. The decrease in the activity and immunocontent of catalytic subunits (α_1 , α_2 and α_3), as well as in gene expression of α_2 (expressed mainly in astrocytes) of Na^+, K^+ -ATPase observed in rat prefrontal cortex treated with MPH, suggesting strongly a connection between this enzyme and the impairment in glutamate uptake observed in this study. It is probable that changes in Na^+, K^+ -ATPase function and glutamate uptake contribute, at least in part, with the increase in glutamate levels observed in cerebrospinal fluid these animals. Interestingly, the gene expression of the α_1 subunit was increased, which is ubiquitously expressed, suggesting an attempt to compensate the decrease in its immunocontent and hence the activity of Na^+, K^+ -ATPase. However we must consider that the relationship between mRNA and proteins expression can be altered by factors such as protein degradation rate and post-transcriptional modifications of mRNA. The amount of enzyme at the plasma membrane may be modified by changes in the rate of synthesis or degradation of the individual polypeptides, as well as by mobilization of enzyme molecules from the endosomal pools to the cell surface [30, 66]. In addition, a decrease in α_1 subunit of Na^+, K^+ -ATPase and an increase in protein damage after traumatic brain injury has been reported by Lima et al. [67].

Na⁺,K⁺-ATPase is a membrane-embedded protein highly vulnerable to oxidative insult [68-70] and the glutamate transport also can be impaired by lipid and protein damage [71, 72]. Recently we have shown an increased in reactive oxygen species formation, SOD/CAT ratio (an indicative of redox imbalance), as well as lipid peroxidation and protein damage in prefrontal cortex of juvenile rats at 2 hours after the last administration of MPH [39]. Based on these results and in order to better understating the alterations observed on Na⁺,K⁺-ATPase and uptake glutamate caused by MPH treatment, in the present study we also investigated the effects of chronic treatment with MPH on some oxidative stress parameters at 24 hours after the last administration of MPH in juvenile rats. The results shown that MPH did not alter reactive oxygen species formation (DCF levels) and lipid peroxidation (TBARS levels) probably by larger detoxification of reactive species indicated by decrease in SOD/CAT ratio. However, the protein damage (indicated by decrease in SH content) remained in prefrontal cortex of juvenile rats treated chronically with MPH. In this context, we suggest that the protein damage promoted by chronic early treatment with MPH in prefrontal cortex could lead to conformational changes on the Na⁺,K⁺-ATPase, altering the immunocontent of catalytic α subunits. The reduction in the content of catalytic α subunits could decrease the levels of available of the enzyme molecules and consequently its activity.

There is evidence suggesting that alterations in the Na⁺,K⁺-ATPase activity may be associated with neuronal excitability, secondary transport, neurotransmitter signaling in brain, impairment in spatial learning and anxiety related behavior [73]. Furthermore, clinical studies have linked changes in the enzyme activity with depressive [74] and mood disorders [75]. It has been

reported that in astrocytes the α_2 isoform of the Na^+, K^+ -ATPase is co-localized with different glutamate transporters forming a protein-complex. Thus, we believe that the decrease in gene expression and immunocontent of α_2 subunit might be associated with the glutamatergic excitotoxicity caused by MPH, resulting in accumulation of glutamate in cerebrospinal fluid. Based on these, it is plausible to suggest that the association of MPH with cerebral alterations may be related, at least in part, to injury on Na^+, K^+ -ATPase and protein damage. These findings are in agreement with studies previous performed in our researcher group [39, 76] who also demonstrated that the prefrontal cortex is sensitive to MPH, since this drug has a more potent effect in this structure than in other brain areas studied [77-79].

Tyrosine is synthesized from phenylalanine into the CNS and acts as a precursor in the biosynthesis of catecholamines (dopamine, noradrenaline and adrenaline) and melatonin. Tyrosine hydroxylase is the first enzyme and the limiting step in this pathway. It converts tyrosine to DOPA and its activity is inhibited by free catecholamines competing for the binding site with the cofactor tetrahydrobiopterin [19]. In this study, we showed that the MPH increased the concentration of tyrosine in the prefrontal cortex and decreased in the cerebrospinal fluid of juvenile rats. These results are quite predictable since MPH increases the levels of noradrenaline and dopamine, which in turn blocks the conversion of tyrosine to DOPA. In fact, Woods et al. [80] showed that exogenous tyrosine enhances the effects of MPH on the release of extracellular dopamine.

Histidine is an amino acid precursor of histamine synthesis in neurons. Histamine is a neurotransmitter that controls a wide variety of neurobiological

and behavioral functions [81, 82]. In addition, histamine facilitates directly the activation of NMDA receptor containing NR2B subunit through its binding to the site modulatory of polyamines present in this receptor [83-85]. Here, we found an increase in histidine concentration in cerebrospinal fluid and prefrontal cortex from juvenile rats subjected to chronic early treatment with MPH. These results suggest that the chronic treatment with MPH inhibited the conversion of histidine to histamine, which could prevent further activation of the glutamatergic system.

Glycine is an inhibitory neurotransmitter synthesized in the nerve terminal mainly from serine by the action of serine hydroxy methyltransferase. While serine is synthesized from 3-phosphoglycerate, an intermediate in the glycolytic pathway. Parallel to serine synthesis, occur the glutamate conversion into α -ketoglutarate. The serine acts as a repressor of synthesis of enzymes of its biosynthetic pathway, on the other hand, the synthesis of these enzymes is increased when the level of this amino acid is decreased [19]. In this study, we have demonstrated that the MPH increased the glycine and decreased the serine concentrations in prefrontal cortex of juvenile rats suggesting a possible attempt to decrease the glutamate level.

Activation of glutamate receptors has been shown to increase energy consumption by leads to influx of ions, which have to be pumped out again in a process requiring energy [20]. In this study, there was a reduction in leucine concentrations in the prefrontal cortex of juvenile rats exposed to a chronic treatment with MPH, suggesting that this amino acid is used as energy source. Furthermore, the increase in ornithine concentration found in the cerebrospinal fluid of rats treated with MPH reinforces the hypothesis of further degradation of

amino acids in brains these animals. In fact, Fagundes et al. [86] demonstrated that chronic treatment with MPH increases brain energy demand, since demonstrated an increase in the activity of the enzymes of the mitochondrial respiratory chain.

Understanding the consequences of chronic treatment with MPH on early stages of brain development is very important since this psychostimulant has been used extensively in preschool age children. Moreover, little is known about the mechanisms that contribute to the persistent changes in behavior and neuronal functioning associated to MPH exposure, particularly when used for long term during stages of brain development [1, 41, 42, 87-91]. The prefrontal cortex is a key brain region mediating cognitive and executive functions, including working memory, sustained attention, inhibitory response control, and cognitive flexibility [92, 93], and it has been identified as the primary target region of MPH [94].

In summary, in the present study we demonstrated that chronic treatment at early age with a clinically-relevant dose of MPH increases glutamate levels in cerebrospinal fluid of rats, at least in part, due to inhibition of glutamate uptake caused probably by disturbances in Na^+, K^+ -ATPase and/or protein damage in prefrontal cortex (Figure 6). These findings provide new basis for understanding of known biochemical and behavioral changes associated with chronic use of MPH during the development of CNS.

Acknowledgments

This work was supported in part by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq–Brazil).

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. Biederman J, Mick E, Faraone SV (2000) Age-dependent decline of symptoms of attention deficit hyperactivity disorder: impact of remission definition and symptom type. *Am J Psychiatry* 157:816-818
2. Challman TD, Lipsky JJ (2000) Methylphenidate: its pharmacology and uses. *Mayo Clin Proc* 75:711-721
3. Biederman J, Spencer T, Wilens T (2004) Evidence-based pharmacotherapy for attention-deficit hyperactivity disorder. *Int J Neuropsychopharmacol* 7:77-97
4. Biederman J, Faraone S (2005) Attention-deficit hyperactivity disorder. *Lancet* 366:237–248
5. Goldman LS, Genel M, Bezman RJ, Slanetz PJ (1998) Diagnosis and treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder in children and adolescents. Council on Scientific Affairs, American Medical Association. *JAMA* 279:1100-1107
6. Miller KJ, Castellanos FX (1998) Attention deficit/hyperactivity disorders. *Pediatr Rev* 19:373-384
7. Swanson J, Castellanos FX, Murias M, LaHoste G, Kennedy J (1998) Cognitive neuroscience of attention deficit hyperactivity disorder and hyperkinetic disorder. *Curr Opin Neurobiol* 8:263-271
8. Kirby K, Rutman LE, Bernstein H (2002) Attention-deficit/hyperactivity disorder: a therapeutic update. *Curr Opin Pediatr* 14:236-246
9. Smith ME, Farah MJ (2011) Are Prescription Stimulants “Smart Pills”? The Epidemiology and Cognitive Neuroscience of Prescription Stimulant Use by Normal Healthy Individuals. *Psychological Bulletin* 137:717–741
10. Elliott R, Sahakian BJ, Matthews K, Bannerjee A, Rimmer J, Robbins TW (1997) Effects of methylphenidate on spatial working memory and planning in healthy young adults. *Psychopharmacology (Berl)* 131:196–206
11. Berridge CW, Devilbiss DM, Andrzejewski ME, Arnsten AF, Kelley AE, Schmeichel B, et al. (2006) Methylphenidate preferentially increases catecholamine neurotransmission within the prefrontal cortex at low doses that enhance cognitive function. *Biol Psychiatry* 60:1111–1120

12. Arnsten AF, Pliszka SR (2011) Catecholamine influences on prefrontal cortical function: relevance to treatment of attention deficit/hyperactivity disorder and related disorders. *Pharmacol Biochem Behav* 99:211-216
13. Benes FM (1998) Brain development, VII. Human brain growth spans decades. *Am J Psychiatry* 155:1489
14. Zito JM, Safer DJ, dos Reis S, Gardner JF, Boles M, Lynch F (2000) Trends in the prescribing of psychotropic medications to preschoolers. *JAMA* 283:1025-1030
15. Rowland SA, Lesesne CA, Abramowitz AJ (2002) The epidemiology of attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD): a public health view. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 8:162-170
16. Chase TD, Brown RE, Carrey N, Wilkinson M (2003) Daily methylphenidate administration attenuates c-fos expression in the striatum of prepubertal rats. *Neuroreport* 14:769-772 *Neurosci Lett* 465:95-98
17. Urban KR, Li Y, Gao W (2013) Treatment with a clinically-relevant dose of methylphenidate alters NMDA receptor composition and synaptic in the juvenile rat prefrontal cortex. *Neurobiology of Learning and Memory* 101:65-74
18. Cheng J, Xiong Z, Duffney LJ, Wei J, Liu A, Liu S, Chen Guo-Jun, Yan Z (2014) Methylphenidate exerts dose-dependent effects on glutamate receptor and behaviors. *Biol Psychiatry* 15:953-962
19. Marks' Basic Medical Biochemistry: A Clinical Approach by Michael A Lieberman, Allan D. Marks, 3^o edition, 2009
20. Danbolt NC (2001) Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* 65:1–105
21. Segovia G, Porrás A, Del Arco A et al (2001) Glutamatergic neurotransmission in aging: a critical perspective. *Mech Ageing Dev* 122:1–29
22. Nicholls DG (2008) Oxidative stress and energy crises in neuronal dysfunction. *Ann N Y Acad Sci* 1147:53–60
23. Meldrum BS (1994) The role of glutamate in epilepsy and other CNS disorders. *Neurology* 44:14–23
24. Maragakis NJ, Rothstein JD (2001) Glutamate transporters in neurologic disease. *Arch Neurol* 58:365–370
25. Maragakis NJ, Rothstein JD (2004) Glutamate transporters: animal models to neurologic disease. *Neurobiol Dis* 15:461–473
26. Sheldon AL, Robinson MB (2007) The role of glutamate transporters in neurodegenerative diseases and potential opportunities for intervention. *Neurochem Int* 51:333–355
27. Anderson CM, Swanson RA (2000) Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia* 32:1–14
28. Attwell D (2000) Brain uptake of glutamate: food for thought. *J Nutr* 130:1023–1025
29. Rose EM, Koo JC, Antflick JE et al (2009) Glutamate transporter coupling to Na⁺,K⁺-ATPase. *J Neurosci* 29:8143–8155
30. Blanco G, Mercer RW (1998) Isozymes of the Na⁺,K⁺-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. *Am J Physiol* 275:F633–F650
31. Kaplan JH (2002) Biochemistry of Na⁺,K⁺-ATPase. *Annu Ver Biochem* 71:511–535

32. Kurup AR, Kurup PA (2002) Membrane Na⁺,K⁺-ATPase mediated cascade in bipolar mood disorder, major depressive disorder, and schizophrenia—relationship to hemispheric dominance. *Int J Neurosci* 112:965–982
33. Wyse ATS, Streck EL, Worm P, Wajner A, Ritter F, Netto CA (2000) Preconditioning prevents the inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase activity after brain ischemia. *Neurochem Res* 25:971–975
34. Hattori N, Kitagawa K, Higashida T, Yagyu K, Shimohama S, Wataya T, Perry G, Smith MA, Inagaki C (1998) Cl-ATPase and Na⁺,K⁺-ATPase activities in Alzheimer's disease brains. *Neurosci Lett* 254:141–144
35. Gamaro GD, Streck EL, Matte C, Prediger ME, Wyse AT, Dalmaz C (2003) Reduction of hippocampal Na⁺,K⁺-ATPase activity in rats subjected to an experimental model of depression. *Neurochem Res* 28:1339–1344
36. Zugno AI, Valvassori SS, Scherer EB, Mattos C, Matte C, Ferreira CL, Rezin GT, Wyse AT, Quevedo J, Streck EL (2009) Na⁺,K⁺-ATPase activity in an animal model of mania. *J Neural Transm* 116:431–436
37. Selhub J (2006) The many facets of hyperhomocysteinemia: studies from the Framingham cohorts. *J Nutr* 136:1726S– 1730S
38. Scherer EB, da Cunha AA, Kolling J, da Cunha MJ, Schmitz F, Sitta A, Lima DD, Delwing D, Vargas CR, Wyse AT (2011) Development of an animal model for chronic mild hyperhomocysteinemia and its response to oxidative damage. *Int J Dev Neurosci* 29:693–699
39. Schmitz F, Scherer EB, Machado FR, da Cunha AA, Tagliari B, Netto A, Wyse AT (2012) Methylphenidate induces lipid and protein damage in prefrontal cortex, but not in cerebellum, striatum, and hippocampus of juvenile rats. *Metab Brain Dis* 27:605-612
40. Fukami G, Hashimoto K, Koike K, Okamura N, Shimizu E, Iyo M (2004) Effect of antioxidant N-acetyl-cysteine on behavioral changes and neurotoxicity in rats after administration of methamphetamine. *Brain Res* 1016:90-95
41. Greenhill LL (2001) Clinical effects of stimulant medication in attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD). In: Solanto MV, Arnsten AFT, Castellanos FX (eds) *Stimulant drugs and ADHD: basic and clinical neuroscience*. Oxford University Press, New York, pp 31-71
42. Husson I, Mesplès B, Medja F, Leroux P, Kosofsky B, Gressens P (2004) Methylphenidate and Mk-801, an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist: shared biological properties. *Neuroscience* 125:163-170
43. Gerasimov MR, Franceschi M, Volkow ND, Gifford A, Gatley SJ, Marsteller D, et al (2000) Comparison between intraperitoneal and oral methylphenidate administration: A microdialysis and locomotor activity study. *J Pharmacol Exp Ther* 295:51-57
44. Rice D, Barone S Jr (2000) Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environ Health Perspect* 108:511-533.
45. Andreazza AC, Frey BN, Valvassori SS, Zanotto C, Gomes KM, Comim CM, et al (2007) DNA damage in rats after treatment with methylphenidate. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 31:1282-1288

46. Schmitz F, Scherer EB, da Cunha MJ, da Cunha AA, Lima DD, Delwing D, et al (2012) Chronic methylphenidate administration alters antioxidant defenses and butyrylcholinesterase activity in blood of juvenile rats. *Mol Cell Biochem* 361:281-288
47. Joseph MH, Marsden CA (1986) Amino acids and small peptides. In: Lim CF, editor. *HPLC of small peptides*. Oxford: IRL Press
48. Wajner M, Coelho DM, Barschak AG, et al. (2000) Reduction of large neutral amino acid concentrations in plasma and CSF of patients with maple syrup urine disease during crises. *J Inher Metab Dis* 23:505–512
49. Frizzo ME, Lara DR, Prokopiuk Ade S et al (2002) Guanosine enhances glutamate uptake in brain cortical slices at normal and excitotoxic conditions. *Cell Mol Neurobiol* 22:353–363
50. Chan KM, Delfert D, Junger KD (1986) A direct colorimetric assay for Ca^{2+} -stimulated ATPase activity. *Anal Biochem* 157:375–380
51. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method 25:402–408
52. LeBel CP, Ali SF, McKee M, Bondy SC (1990) Organometal-induced increases in oxygen reactive species: the potential of 2',7'-dichlorofluorescein diacetate as an index of neurotoxic damage. *Toxicol Appl Pharmacol* 104:17-24
53. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95:351-358
54. Aksenov MY, Markesbery WR (2001) Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 302:141-145
55. Marklund SL (1985) Pyrogallol autoxidation. In: *Handbook for Oxygen Radical Research*. CRC Press, Boca Raton, pp 243-247
56. Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105:121-126
57. Wendel A (1981) Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 77:325-333
58. Peterson GL (1977) A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem* 83:346–356
59. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254
60. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275
61. Kuczenski R, Segal DS (2001) Locomotor effects of acute and repeated threshold doses of amphetamine and methylphenidate: relative roles of dopamine and norepinephrine. *J Pharmacol Exp Ther* 296:876-883
62. Volkow ND, Chang L, Wang GJ, Fowler JS, Leonido-Yee M, Franceschi D, et al (2001) Association of dopamine transporter reduction with psychomotor impairment in methamphetamine abusers. *Am J Psychiatry* 158:377-382
63. Volkow ND, Wang GJ, Fowler JS, Ding YS (2005) Imaging the effects of methylphenidate on brain dopamine: new model on its therapeutic actions for attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry* 57:1410-1415

64. Cepeda C, Levine MS (2006) Where do you think you are going? The NMDA-D1 receptor trap. *Science's Signal Transduction Knowledge Environment: STKE*, 2006:20–24.
65. Xu KY (2011) Allosteric property of the Na⁺,K⁺-ATPase beta(1) subunit. *Biochem Biophys Res Commun* 415:479–484
66. McDonough AA, Farley RA (1993) Regulation of Na,K-ATPase activity. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2:725–734
67. Lima FD, Oliveira MS, Furian AF, Souza MA, Rambo LM, Ribeiro LR, Silva LF, Retamoso LT, Hoffmann MS, Magni DV, Pereira L, Figuera MR, Mello CF, Royes LF (2009) Adaptation to oxidative challenge induced by chronic physical exercise prevents Na⁺,K⁺-ATPase activity inhibition after traumatic brain injury. *Brain Res* 1279:147–155
68. Potts MB, Koh SE, Whetstone WD, Walker BA, Yoneyama T, Claus CP, Manvelyan HM, Noble-Haeusslein LJ (2006) Traumatic injury to the immature brain: inflammation, oxidative injury, and iron-mediated damage as potential therapeutic targets. *Neuro Rx* 3:143–153
69. Dencher NA, Frenzel M, Reifschneider NH, Sugawa M, Krause F (2007) Proteome alterations in rat mitochondria caused by aging. *Ann N Y Acad Sci* 1100:291–298
70. Zakharova IO, Sokolova TV, Furaev VV, Rychkova MP, Avrova NF (2007) Effects of oxidative stress inducers, neurotoxins, and ganglioside GM1 on Na⁺,K⁺-ATPase in PC12 and brain synaptosomes. *Zh Evol Biokhim Fiziol* 43:148–154
71. Blanc EM, Keller JN, Fernandez S et al (1998) 4-hydroxynonenal, a lipid peroxidation product, impairs glutamate transport in cortical astrocytes. *Glia* 22:149–160
72. Pedersen WA, Cashman NR, Mattson MP (1999) The lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal impairs glutamate and glucose transport and choline acetyltransferase activity in NSC-19 motor neuron cells. *Exp Neurol* 155:1–10
73. Moseley AE, Williams MT, Schaefer TL, Bohanan CS, Neumann JC, Behbehani MM, Vorhees CV, Lingrel JB (2007) Deficiency in Na,K-ATPase alpha isoform genes alters spatial learning, motor activity, and anxiety in mice. *J Neurosci* 27:616–626
74. Goldstein I, Levy T, Galili D, Ovadia H, Yirmiya R, Rosen H, Lichtstein D (2006) Involvement of Na⁺,K⁺-ATPase and endogenous digitalis-like compounds in depressive disorders. *Biol Psychiatry* 60:491–499
75. Bagrov AY, Bagrov YY, Fedorova OV, Kashkin VA, Patkina NA, Zvartau EE (2002) Endogenous digitalis-like ligands of the sodium pump: possible involvement in mood control and ethanol addiction. *Eur Neuropsychopharmacol* 12:1–12
76. Scherer EB, da Cunha MJ, Matté C, Schmitz F, Netto CA, Wyse AT (2010) Methylphenidate affects memory, brain-derived neurotrophic factor immunocontent and brain acetylcholinesterase activity in the rat. *Neurobiol Learn Mem* 94:247-253
77. Arnsten AF (2009) Toward a new understanding of attention-deficit hyperactivity disorder pathophysiology: an important role for prefrontal cortex dysfunction. *CNS Drugs* 23:33-41
78. Drouin C, Page M, Waterhouse B (2006) Methylphenidate enhances noradrenergic transmission and suppresses mid- and long-latency

- sensory responses in the primary somatosensory cortex of awake rats. *J Neurophysiol* 96:622-632
79. Kuczenski R, Segal DS (2002) Exposure of adolescent rats to oral methylphenidate: preferential effects on extracellular norepinephrine and absence of sensitization and cross-sensitization to methamphetamine. *J Neurosci* 22:7264-7271
 80. Woods SK, Meyer JS (1991) Exogenous tyrosine potentiates the methylphenidate-induced increase in extracellular dopamine in the nucleus accumbens: a microdialysis study. *Brain Research* 560:97-105
 81. Brown RE, Stevens DR, Haas HL (2001) The physiology of brain histamine. *Progress in Neurobiology* 63:637-672
 82. Haas H, Panula P (2003) The role of histamine and the tuberomammillary nucleus in the nervous system. *Nature Reviews* 4:121-130
 83. Bekkers JM (1993) Enhancement by histamine of NMDA-mediated synaptic transmission in the hippocampus. *Science* 261:104-106
 84. Vorobjev VS, Sharonova IN, Walsh IB, Haas HL (1993) Histamine potentiates N-methyl-D-aspartate responses in acutely isolated hippocampal neurons. *Neuron* 11:837-844
 85. Williams K (1994) Subunit-specific potentiation of recombinant N-methyl-D-aspartate receptors by histamine. *Molecular Pharmacology* 46:531-541
 86. Fagundes AO, Rezin GT, Zanette F, Grandi E, Assis LC, Dal-Pizzol F, et al (2007) Chronic administration of methylphenidate activates mitochondrial respiratory chain in brain of young rats. *Int J Dev Neurosci* 25:47-51
 87. Robinson TE, Berridge KC (1993) The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Res Rev* 18:247-291
 88. Pierce RC, Kalivas RW (1997) A circuitry model of the expression of behavioral sensitization to amphetamine-like psychostimulants. *Brain Res Rev* 25:193-216
 89. Robinson TE, Berridge KC (2000) The psychology and neurobiology of addiction: an incentive-sensitization view. *Addiction* 95:s91-s117
 90. Dafny N, Yang PB (2006) The role of age, genotype, sex, and route of acute and chronic administration of methylphenidate: a review of its locomotor effects. *Brain Res Bull* 68:393-405
 91. Gonçalves J, Baptista S, Silva AP (2014) Psychostimulants and brain dysfunction: A review of the relevant neurotoxic effects. *Neuropharmacology* 87:135-149.
 92. Goldman-Rakic PS (1995): Cellular basis of working memory. *Neuron* 14:477-485
 93. Dalley JW, Cardinal RN, Robbins TW (2004): Prefrontal executive and cognitive functions in rodents: Neural and neurochemical substrates. *Neurosci Biobehav Res* 28:771-784
 94. Arnsten AF (2009) Toward a new understanding of attention-deficit hyperactivity disorder pathophysiology: An important role for prefrontal cortex dysfunction. *CNS Drugs* 23:33-41

Table 1. RT-PCR primers sequence of Na⁺,K⁺-ATPase catalytic subunits and GAPDH

Gene	N° Genbank (mRNA)	N° Ensembl (gene)		Primer sequence	Amplicon size
Alpha1	NM_012504	ENSRNOG00000030019	Forward	CTGCTTTCCTGTCCCTACTGC	125pb
			Reverse	CTCCGGCACCTCGTCATAC	
Alpha2	NM_012505	ENSRNOG00000007290	Forward	GAGGACGAACCATCCAATGAC	133pb
			Reverse	CTAGGCACCATGTTCTTGAAGG	
Alpha3	NM_012506	ENSRNOG00000020263	Forward	TAAAGTGCAATCGAGCTGTCC	142 pb
			Reverse	AGGATCGGGTTGTCATTGGG	
GAPDH	NM_017008	ENSRNOG00000018630	Forward	GGTGATGCTGGTGTGAGTA	272 pb
			Reverse	ACTGTGGTCATGAGCCCTTC	

Table 2. Effect of chronic treatment with methylphenidate on amino acids concentrations in cerebrospinal fluid ($\mu\text{mol/L}$) from juvenile rats

Amino acid	Control	MPH
Aspartate	4.94 \pm 2.16	4.48 \pm 1.89
Glutamate	9.28 \pm 1.79	13.96 \pm 3.37*
Serine	57.4 \pm 5.01	58.97 \pm 5.32
Histidine	nd	9.3 \pm 2.11
Glutamine	574.2 \pm 28.46	542 \pm 28.41
Glycine	92.76 \pm 20.86	93.68 \pm 10.46
Alanine	71.22 \pm 6.37	69.3 \pm 9.12
Tyrosine	14.8 \pm 0.48	10.97 \pm 3.62*
Tryptophan	4.06 \pm 1.59	4.83 \pm 1.58
Methionine	4.52 \pm 0.67	3.36 \pm 1.21
Valine	7.42 \pm 2.14	9.60 \pm 1.94
Phenylalanine	6.06 \pm 0.79	6.93 \pm 0.90
Isoleucine	3.62 \pm 0.97	4.02 \pm 2.11
Leucine	7.10 \pm 1.39	8.24 \pm 2.08
Ornithine	3.5 \pm 0.50	4.74 \pm 0.75*
Lysine	89.42 \pm 4.61	98.15 \pm 7.56

Results are expressed as mean \pm S.D. for 5-7 animals in each group. nd = not detected.

Different from control, * $p < 0.05$ (Student's t test). MPH, methylphenidate

Table 3. Effect of chronic treatment with methylphenidate on amino acids concentrations in prefrontal cortex ($\mu\text{mol/L}$) from juvenile rats

Amino acid	Control	MPH
Aspartate	920.31 \pm 135.75	991.75 \pm 77.33
Glutamate	1725.05 \pm 36.21	1753.87 \pm 71.07
Serine	197.95 \pm 11.38	182.10 \pm 10.01*
Histidine	45.70 \pm 11.99	64.13 \pm 5.51**
Glutamine	782.74 \pm 71.14	591.10 \pm 137.20*
Glycine	429.91 \pm 47.23	483.50 \pm 34.13*
Alanine	262.66 \pm 48.52	265.83 \pm 38.66
Tyrosine	16.53 \pm 1.74	19.62 \pm 1.45**
Tryptophan	11.80 \pm 1.80	11.38 \pm 1.73
Methionine	16.38 \pm 2.70	16.83 \pm 1.32
Valine	27.30 \pm 4.87	24.60 \pm 4.38
Phenylalanine	14.83 \pm 2.36	14.62 \pm 0.80
Isoleucine	11.65 \pm 2.43	10.63 \pm 0.84
Leucine	26.40 \pm 2.02	22.83 \pm 1.80**
Ornithine	2.92 \pm 0.85	3.31 \pm 1.33
Lysine	46.60 \pm 3.70	45.24 \pm 4.22

Results are expressed as mean \pm S.D. for 5-7 animals in each group.

Different from control, * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ (Student's *t* test). MPH, methylphenidate

Table 4. Effect of chronic treatment with methylphenidate on parameters of oxidative stress in prefrontal cortex from juvenile rats

	Control	MPH
DCF (nmol/mg protein)	53.98 ± 5.60	60.40 ± 19.70
TBARS levels (nmol/mg protein)	0.61 ± 0.11	0.69 ± 0.17
SH content (nmol TNB/mg protein)	38.69 ± 4.24	30.83 ± 3.65**
SOD activity (units/mg protein)	6.66 ± 1.78	5.54 ± 1.54
CAT activity (units/mg protein)	2.93 ± 0.29	3.87 ± 0.57*
GPx activity (units/mg protein)	25.09 ± 2.79	23.13 ± 3.32
SOD/CAT ratio	2.25 ± 0.46	1.42 ± 0.60*

Results are expressed as mean ± S.D. for 5-6 animals in each group.

Different from control, * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ (Student's *t* test). MPH, methylphenidate

Legend to figures

Figure 1. Effect of chronic treatment with methylphenidate on glutamate uptake in slices of prefrontal cortex of juvenile rats. Results are expressed as mean \pm S.D. for 6–7 animals in each group. Different from control, * $p < 0.05$ (Student's *t* teste). MPH, methylphenidate

Figure 2. Effect of chronic treatment with methylphenidate on glutamate transporters immunocontent, GLAST (A) and GLT-1 (B) in homogenates of prefrontal cortex of juvenile rats. Results are expressed as mean \pm S.D. for 7-8 animals in each group. Rat = positive control; MPH, methylphenidate

Figure 3. Effect of chronic treatment with methylphenidate on Na⁺,K⁺-ATPase specific activity in homogenates of prefrontal cortex of juvenile rats. Results are expressed as mean \pm S.D. for 6–7 animals in each group. Different from control, *** $p < 0.001$ (Student's *t* teste). MPH, methylphenidate

Figure 4. Effect of chronic treatment with methylphenidate on immunocontent of the α_1 , α_2 , and α_3 subunits of the Na⁺,K⁺-ATPase in homogenate of prefrontal cortex from juvenile rats. All lanes received equivalent amounts (50 μ g) of total protein from cell extract. The blots were developed using an ECL kit. Uniformity of gel loading was confirmed with β -actin as the standard since its level is not affected by the experimental treatment. Representative immunological reactions are shown below. Results are expressed as mean \pm S.D. for 6-7 animals in each group. Different from control, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ (Student's *t* teste). MPH, methylphenidate

Figure 5. Effect of chronic treatment with methylphenidate on gene expression of α_1 , α_2 , and α_3 subunits of the Na^+ , K^+ -ATPase in prefrontal cortex of juvenile rats. Results are expressed as mean \pm S.D. for 6-7 animals in each group. Different from control, * $p < 0.05$ (Student's t teste). MPH, methylphenidate

Figure 6. Graphical summary of the processes that were quantified throughout the investigations, highlighting the main effects of chronic treatment with a clinically-relevant dose of methylphenidate on crucial parameters for the proper functioning of central nervous system in cerebrospinal fluid (in blue) and prefrontal cortex (in green) of juvenile rats. In summary, we demonstrated that methylphenidate increases glutamate levels in cerebrospinal fluid of rats, at least in part, due to inhibition of glutamate uptake caused probably by disturbances in Na^+ , K^+ -ATPase and/or protein damage observed in prefrontal cortex of juvenile rats. Phe, phenylalanine; Tyr, tyrosine; Gln, glutamine; Glu, glutamate; DA, dopamine; MPH, methylphenidate

Figure 1

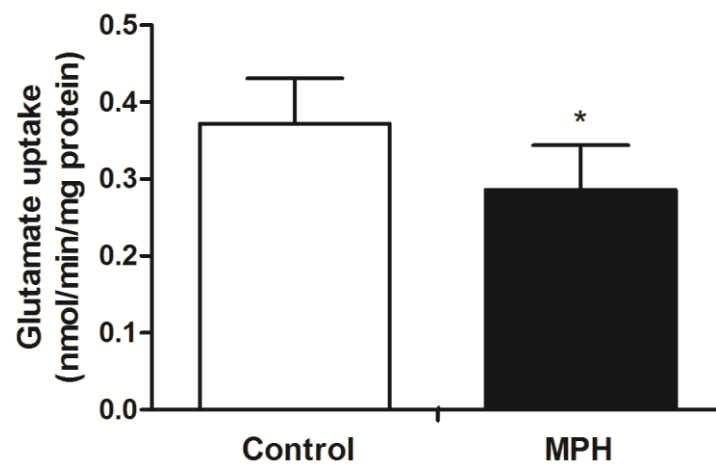


Figure 2

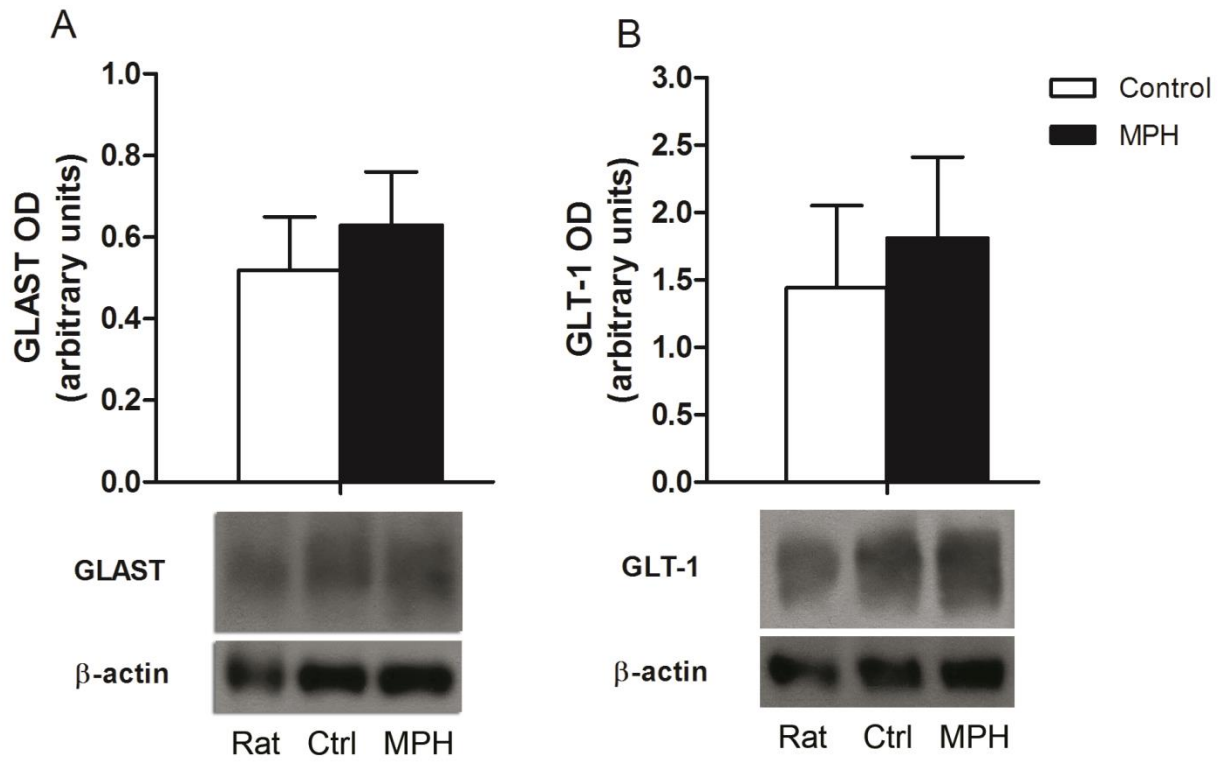


Figure 3

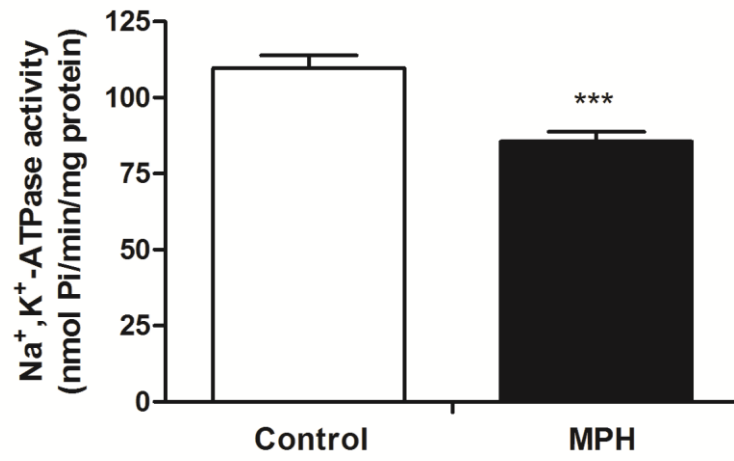


Figure 4

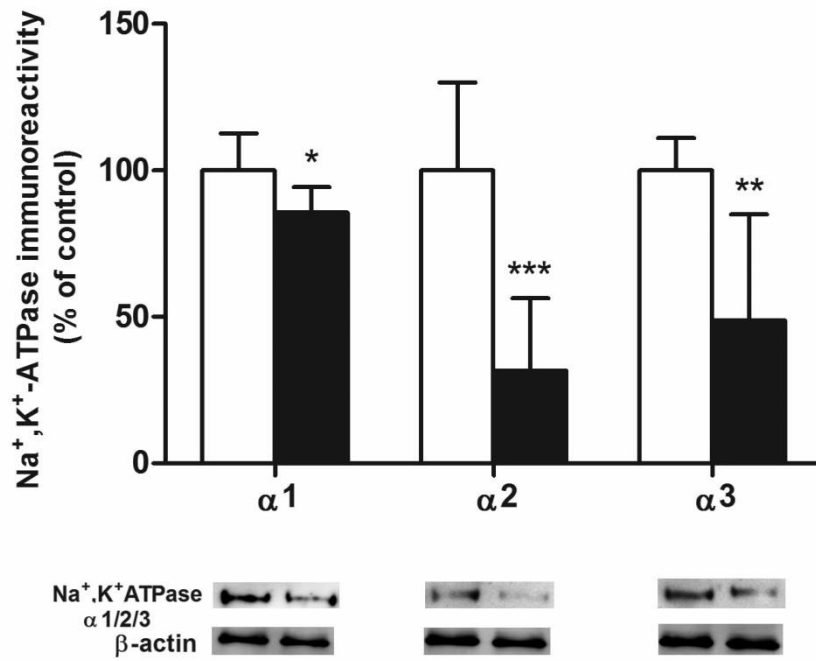


Figure 5

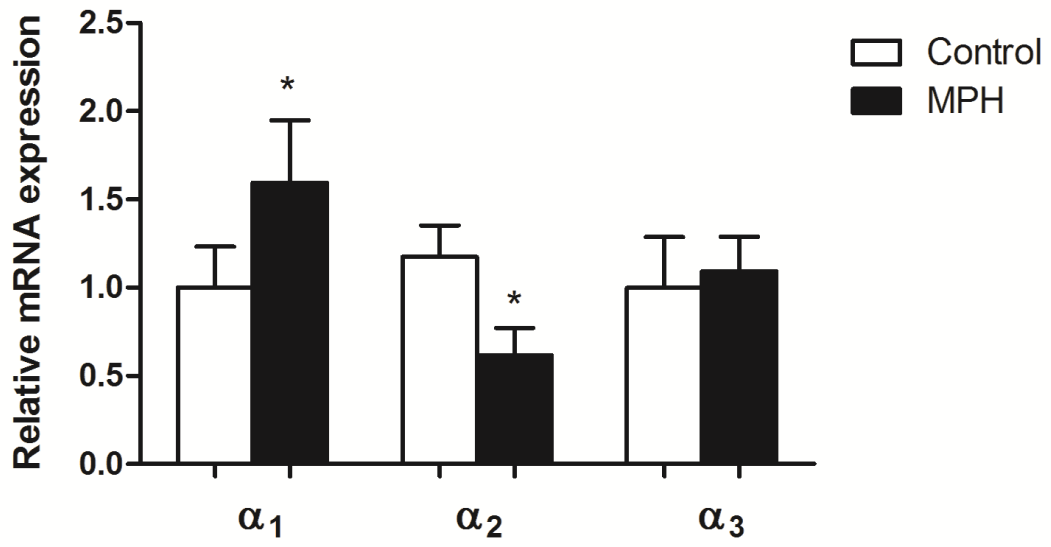
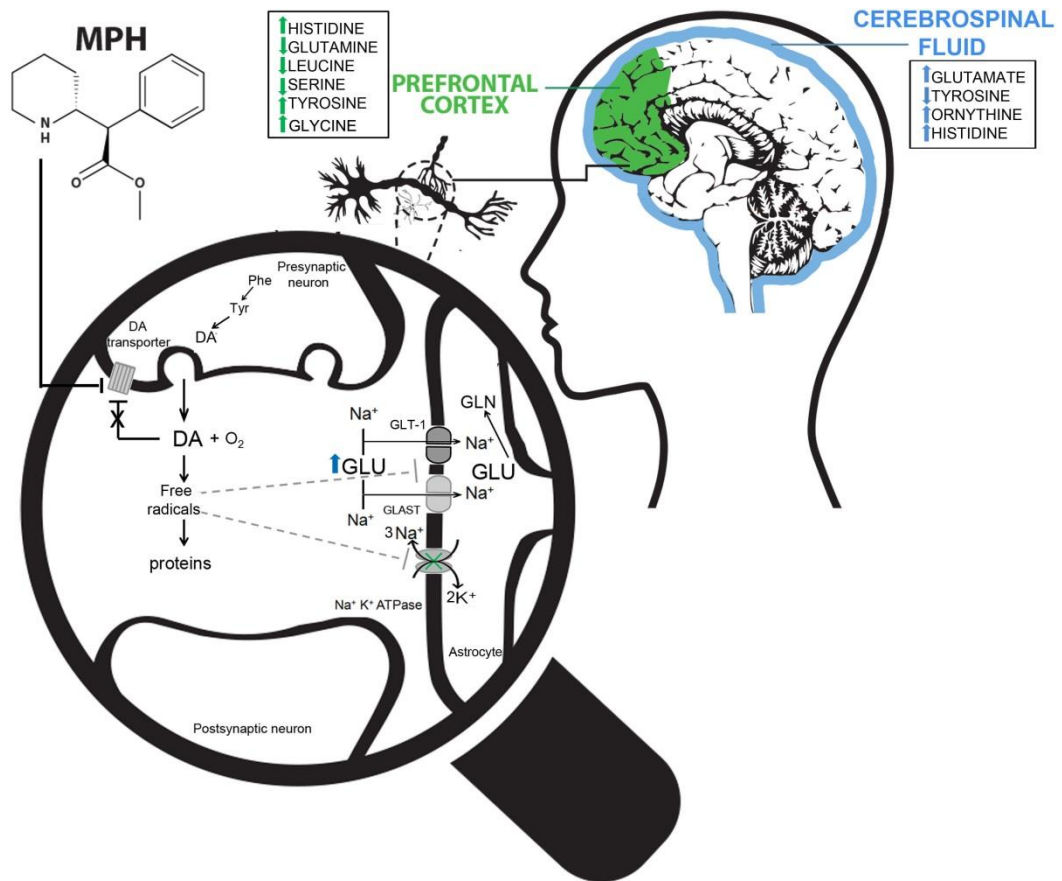


Figure 6



4. DISCUSSÃO

No presente estudo, inicialmente, foram investigados os efeitos da exposição crônica com MFD sobre as concentrações de aminoácidos no líquido cefalorraquidiano e no córtex pré-frontal de ratos jovens. Os resultados mostraram que o MFD aumenta a concentração de glutamato no líquido cefalorraquidiano e diminui os níveis de glutamina no córtex pré-frontal de ratos. Além disso, a captação de glutamato foi inibida pelo MFD em córtex pré-frontal desses animais. Estes resultados sugerem que o MFD pode promover um desequilíbrio na homeostase do glutamato, levando à excitotoxicidade glutamatérgica através da inibição da captação desse neurotransmissor.

O mecanismo de ação do MFD baseia-se no bloqueio dos transportadores de dopamina e norepinefrina, aumentando os níveis desses neurotransmissores em várias vias cerebrais (Biederman e Faraone, 2000; Cepeda e Levine, 2006; Challman e Lipsky, 2000; Gerasimov et al., 2000; Volkow et al., 2001; Volkow et al., 2005). O sistema dopaminérgico e glutamatérgico estão intrinsecamente interligados, através de vias de sinalização intracelular, bem como através de interações físicas (Cepeda e Levine, 2006). No entanto, para nosso conhecimento, pouco se sabe sobre a participação do sistema glutamatérgico nas consequências do uso de MFD durante o desenvolvimento cerebral. No presente estudo também foi avaliado o imunoconteúdo dos transportadores de glutamato, GLAST e GLT-1, em homogeneizado de córtex pré-frontal, a fim de investigar se as alterações provocadas pelo tratamento com o MFD sobre a captação e os níveis de glutamato observados foram influenciadas pelo conteúdo desses

transportadores, responsáveis por retirar a maioria do glutamato extracelular (Berridge et al., 2006). Os resultados mostraram que os níveis de GLAST e GLT-1 não foram alterados no córtex pré-frontal de ratos jovens tratados com MFD, o que sugere que a diminuição da captação de glutamato promovido pelo MFD não envolve uma alteração quantitativa, mas talvez uma alteração no funcionamento adequado dessas proteínas transportadoras.

Um dos mecanismos propostos para a regulação do transporte de glutamato, baseia-se na dependência da captação desse neurotransmissor pelo gradiente de Na^+ gerado pela Na^+, K^+ -ATPase (Rose et al., 2009). Considerando-se que o tratamento precoce crônico com MFD inibiu a atividade da Na^+, K^+ -ATPase, nós extendemos nosso estudo e investigamos se o MFD poderia alterar o imunoconteúdo e a expressão gênica das subunidades α catalíticas desta enzima no córtex pré-frontal de ratos jovens. Os resultados mostraram que o imunoconteúdo das três isoformas da subunidade α encontradas no cérebro (α_1 , α_2 e α_3) foram reduzidos significativamente. Além disso, o tratamento precoce crônico com MFD aumentou o padrão de expressão do gene da subunidade α_1 e diminuiu da subunidade α_2 , mas não alterou o da subunidade α_3 , no córtex pré-frontal de ratos jovens. A diminuição na atividade e no imunoconteúdo das subunidades catalíticas (α_1 , α_2 e α_3), assim como na expressão do gene da subunidade α_2 (expressa principalmente nos astrócitos) da Na^+, K^+ -ATPase em córtex pré-frontal de ratos tratados com MFD, sugerem um possível mecanismo para explicar o prejuízo da captação de glutamato observada neste estudo. Além disso, é possível sugerir que as alterações na Na^+, K^+ -ATPase e na captação de glutamato possam contribuir, pelo menos em parte, com o aumento dos níveis de glutamato observado no

líquido cefalorraquidiano destes animais. Interessantemente, a expressão do gene da subunidade α_1 , que é ubiquamente expressa, foi aumentada pelo MFD, sugerindo uma tentativa de compensar a diminuição do seu imunoconteúdo e, por conseguinte, o prejuízo na atividade Na^+, K^+ -ATPase.

No entanto, deve-se levar em consideração que a relação entre mRNA e imunoconteúdo de proteínas pode ser alterada por vários fatores tais como: a taxa de degradação da proteína e modificações pós-transcricionais do mRNA. A quantidade de enzima na membrana plasmática pode ser modificada também por alterações na taxa de síntese e/ou degradação dos polipeptídeos individualmente, bem como pela mobilização de moléculas de enzima a partir do endossoma para a superfície da célula (Blanco et al., 2009; McDonough e Farley, 1993). Nesse contexto, tem sido relatado a associação entre uma diminuição na subunidade α_1 da Na^+, K^+ -ATPase e um aumento de dano à proteína após lesão traumática do cérebro (Lima et al., 2009).

A Na^+, K^+ -ATPase é uma proteína de membrana altamente vulnerável ao estresse oxidativo (Dencher et al., 2007; Potts et al., 2006; Zakharova et al., 2007). Além disso, a captação de glutamato também pode ser prejudicada por dano lipídico e proteico provocados pelo estresse oxidativo (Blanc et al., 1998; Pedersen et al., 1999). Recentemente, nosso grupo demonstrou um aumento na formação de espécies reativas e na razão SOD/CAT (um indicativo de desequilíbrio redox), bem como aumento do dano lipídico e proteico em córtex pré-frontal de ratos jovens duas horas após a última administração de MFD (Schmitz et al., 2012).

Com base nestes resultados e no intuito de melhor elucidar as alterações observadas sobre a Na^+, K^+ -ATPase e a captação de glutamato

provocada pelo tratamento com MFD, no presente estudo, nós também investigamos o efeito do tratamento precoce crônico com MFD sobre alguns parâmetros de estresse oxidativo vinte e quatro horas após a última administração de MFD. Os resultados mostraram que o MFD não alterou a formação de espécies reativas (níveis DCF) e a peroxidação lipídica (níveis de TBARS) provavelmente pela maior detoxificação dessas espécies, conforme indicada pela redução na razão SOD/CAT. No entanto, o dano à proteína (indicado pela diminuição do conteúdo de sulfidrilas) permaneceu no córtex pré-frontal de ratos jovens tratados cronicamente com MFD, mesmo vinte e quatro horas após a última administração. Neste contexto, podemos sugerir que o dano à proteína promovido pelo tratamento precoce crônico com MFD sobre o córtex pré-frontal poderia levar a mudanças conformacionais na estrutura da Na^+, K^+ -ATPase, alterando o imunoc conteúdo das subunidades α catalíticas. A redução do conteúdo das subunidades α catalíticas da Na^+, K^+ -ATPase poderia diminuir, conseqüentemente, a sua atividade.

Evidências sugerem que alterações na Na^+, K^+ -ATPase podem estar associadas a alterações na excitabilidade neuronal, transporte secundário, sinalização por neurotransmissor, prejuízo na memória espacial e ansiedade (Moseley et al., 2007). Além disso, estudos clínicos têm relacionado alterações na atividade da enzima com comportamento depressivo (Goldstein et al., 2006) e alterações de humor (Bagrov et al., 2002). Foi relatado que a isoforma α_2 da Na^+, K^+ -ATPase, presente nos astrócitos, está co-localizada com diferentes transportadores de glutamato formando um complexo proteico. Acreditamos que a diminuição na expressão do gene e do imunoc conteúdo da subunidade α_2 pode estar associada com a excitotoxicidade glutamatérgica causada pelo

MFD. Com base nestes pontos, é plausível sugerir que as alterações associadas ao uso de MFD podem estar relacionadas, pelo menos em parte, com o prejuízo na Na⁺,K⁺-ATPase e com o dano proteico observado. Estes resultados estão de acordo com estudos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa, que também demonstraram que o córtex pré-frontal é sensível ao MFD (Schmitz et al., 2012; Scherer et al., 2010), provavelmente porque esse psicoestimulante tem um efeito mais potente nesta estrutura do que em outras áreas cerebrais estudadas (Arnsten, 2009; Drouin et al., 2006; Kuczenski and Segal, 2002).

A maioria dos neurotransmissores são aminoácidos ou podem ser sintetizados a partir de aminoácidos ou outros intermediários bioquímicos. Os aminoácidos podem entrar rapidamente no líquido cefalorraquidiano por meio de transportadores (Marks, 2009). A tirosina pode vir da dieta ou ser sintetizada a partir de fenilalanina no SNC e atua como um precursor na biossíntese das catecolaminas (dopamina, noradrenalina e adrenalina) e melatonina. A tirosina hidroxilase é a primeira enzima e o passo limitante nesta via. Ela converte tirosina em DOPA e a sua atividade é inibida pelas catecolaminas livres que competem com o cofator pelo sítio de ligação (Marks, 2009). Nós mostramos nesse estudo que o MFD aumentou a concentração de tirosina no córtex pré-frontal e diminuiu no líquido cefalorraquidiano de ratos jovens. Estes resultados são bastante previsíveis desde que o MFD aumenta os níveis de noradrenalina e dopamina que, por sua vez, bloqueiam a conversão de tirosina a DOPA. De fato, Woods e Meyer (1991) mostraram que a administração de tirosina aumenta os efeitos do MFD sobre a liberação de dopamina extracelular.

A histidina é um aminoácido precursor da síntese de histamina nos neurônios. A histamina é um neurotransmissor que controla uma ampla variedade de funções neurobiológicas e comportamentais (Brown et al., 2001; Haas e Panula, 2003). Além disso, a histamina facilita diretamente a ativação do receptor glutamatérgico NMDA que contém a subunidade NR2B através da sua ligação ao seu sítio modulatório de poliaminas (Bekkers, 1993; Vorobjev et al., 1993; Williams, 1994). Neste estudo, verificou-se um aumento na concentração de histidina no córtex pré-frontal e no líquido cefalorraquidiano de ratos jovens submetidos ao tratamento precoce crônico com MFD. Estes resultados sugerem que o tratamento crônico com MFD inibiu a conversão de histidina a histamina, como um possível mecanismo para impedir uma ativação ainda maior do sistema glutamatérgico.

A glicina é um neurotransmissor inibitório sintetizado no terminal nervoso, principalmente, a partir de serina pela ação da serina hidroximetiltransferase. A serina, por sua vez, é sintetizada a partir de 3-fosfoglicerato, um intermediário na via glicolítica. Paralelamente a síntese de serina, ocorre a conversão de glutamato à α -cetoglutarato. A serina atua como um repressor da síntese de enzimas da sua via biossintética, por outro lado, a síntese destas enzimas é aumentada quando o nível deste aminoácido está diminuído (Marks, 2009). Neste estudo, demonstramos que o MFD aumentou a concentração de glicina e diminuiu de serina no córtex pré-frontal de ratos jovens, sugerindo um possível mecanismo para diminuir o nível de glutamato através da sua maior conversão à α -cetoglutarato.

A ativação dos receptores de glutamato está associada com o influxo de íons e, conseqüentemente, com gasto energético para refazer o gradiente

desses íons (Danbolt, 2001). Neste estudo, verificou-se uma redução nas concentrações de leucina no córtex pré-frontal de ratos jovens submetidos ao tratamento crônico com MFD, sugerindo dessa forma que este aminoácido pode estar sendo usado como fonte de energia. Além disso, o aumento na concentração de ornitina observada no líquido cefalorraquidiano de ratos tratados com MFD reforça a hipótese de uma maior degradação de produtos contendo nitrogênio no cérebro destes animais, inclusive aminoácidos. De fato, Fagundes et al. (2007) demonstrou que o tratamento crônico com MFD aumenta a demanda energética cerebral, uma vez que foi observado um aumento da atividade das enzimas da cadeia respiratória mitocondrial.

Compreender as consequências do tratamento precoce crônico com MFD durante o desenvolvimento cerebral é muito importante uma vez que este psicoestimulante tem sido amplamente utilizado em crianças de idade pré-escolar. Somado a isso, pouco se sabe sobre os mecanismos que contribuem para as alterações persistentes no comportamento e no funcionamento neuronal associados ao uso de MFD, especialmente quando usado por um período prolongado (Biederman et al., 2000; Dafny e Yang, 2006; Gonçalves et al., 2014; Greenhill, 2001; Husson et al., 2004; Pierce e Kalivas, 1997; Robinson e Berridge, 1993; 2000). Sabe-se que o córtex pré-frontal exerce importante papel mediando funções cognitivas, execução de tarefas, memória de trabalho, manutenção da atenção, controle de resposta inibitória e flexibilidade cognitiva (Dalley, 2004; Goldman-Rakic, 1995). Além disso, o córtex pré-frontal é identificado como o alvo primário do MFD (Arnsten, 2009).

Em resumo, no presente estudo, foi demonstrado que o tratamento precoce crônico com uma dose clinicamente relevante de MFD aumenta os

níveis de glutamato no líquido cefalorraquidiano de ratos, devido, pelo menos em parte, à inibição da captação de glutamato causada, provavelmente, pelas alterações na Na^+, K^+ -ATPase e/ou no conteúdo de sulfidrilas em córtex pré-frontal de ratos jovens. Estes resultados fornecem nova base para a compreensão das alterações bioquímicas e comportamentais associadas ao uso crônico de MFD durante o desenvolvimento do SNC.

5. CONCLUSÕES

- O tratamento precoce crônico com MFD em ratos:
 1. Aumentou os níveis de glutamato, histidina e ornitina no líquido. A concentração de tirosina foi diminuída;
 2. Aumentou os níveis de histidina, tirosina e glicina no córtex pré-frontal; enquanto os níveis de glutamina, leucina e serina foram diminuídos;
 3. Diminuiu a captação de glutamato em córtex pré-frontal, mas não alterou o imunoconteúdo dos transportadores de glutamato, GLAST e GLT-1.
 4. Diminuiu a atividade da Na^+, K^+ -ATPase, bem como o imunoconteúdo das subunidades catalíticas (α_1 , α_2 e α_3) no córtex pré-frontal;
 5. Aumentou a expressão gênica da subunidade catalítica α_1 , diminuiu de α_2 e não alterou de α_3 , em córtex pré-frontal;
 6. Diminuiu o conteúdo de sulfidrilas, um indicativo de dano proteico, bem como aumentou a atividade da CAT e diminuiu a razão SOD/CAT em córtex pré-frontal.

6. PERSPECTIVAS

- Investigar o efeito da administração crônica de MFD sobre parâmetros neuroinflamatórios, a saber: a atividade, imunoconteúdo e expressão gênica da acetilcolinesterase; os níveis das interleucinas (TNF- α , IL-1 β IL-6) e quimiocina (MCP-1), bem como o imunoconteúdo de NF- κ B em córtex pré-frontal de ratos;
- Investigar o efeito da administração crônica de MFD sobre a função mitocondrial, como: massa mitocondrial e potencial de membrana, MTG e MTR, respectivamente. Atividade do complexo da piruvato desidrogenase e citrato sintase, bem como a atividade dos complexos da cadeia respiratória e os níveis de ATP intracelular em córtex pré-frontal de ratos;
- Avaliar o conteúdo e a viabilidade de neurônios (NeuN) e astrócitos (GFAP) maduros, bem como o imunoconteúdo das neurotrofinas (BDNF e NGF) em córtex pré-frontal de ratos;
- Avaliar o efeito da administração crônica de MFD sobre o conteúdo de gangliosídios (GM1, GD1a, GD1b and GT1b) e fosfolípidios (esfingomileina, fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina), bem como sobre a concentração de colesterol em córtex pré-frontal de ratos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abikoff H., Hechtman L., Klein R.G., Gallagher R., Fleiss K., Etcovitch J. Cousins L., Greenfield B., Martin D., Pollack S. (2004) Social functioning in children with ADHD treated with long-term methylphenidate and multimodal psychosocial treatment. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 43:820–829.
- Adler L.A., Chua H.C. (2002) Management of ADHD in adults. *J Clin Psychiatry* 63:29–35
- Anderson C.M., Swanson R.A. (2000) Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation and physiological functions. *Glia* 32:1-14.
- Andreazza A.C., Frey B.N., Valvassori S.S., Zanotto C., Gomes K.M., Comim C.M., Cassini C., Stertz L., Ribeiro L.C., Quevedo J., Kapczinski F., Berk M., Çonçalves C.A. (2007) DNA damage in rats after treatment with methylphenidate. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 31:1282-1288.
- Aperia A. (2007) New roles for an old enzyme: Na,K-ATPase emerges as an interesting drug target. *J Intern Med.* 261:44-52.
- Arime Y., Kubo Y., Sora I. (2011). Animals models of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Pharm Bull* 34:1373-1376.
- Arnsten A.F. (2009) Toward a new understanding of attention-deficit hyperactivity disorder pathophysiology: an important role for prefrontal cortex dysfunction. *CNS Drugs* 23:33-41.
- Attwell D. (2000) Brain uptake of glutamate: food for thought. *J Nutr* 130:1023-5.
- Auriel E., Hausdorff J.M., Giladi N. (2009) Methylphenidate for the treatment of Parkinson disease and other neurological disorders. *Clin Neuropharmacol.* 32:75-81.
- Autti-Ramo I. (2000) Twelve-year follow-up of children exposed to alcohol in utero. *Dev Med Child Neurology* 42:406–11.
- Bagrov A.Y., Bagrov Y.Y., Fedorova O.V., Kashkin V.A., Patkina N.A., Zvartau E.E. (2002) Endogenous digitalis-like ligands of the sodium pump: possible involvement in mood control and ethanol addiction. *Eur Neuropsychopharmacol* 12:1–12.
- Bahcelioglu M., Gozil R., Take G., Elmas C., Oktem H., Kadioglu D., Calguner E., Erdogan D., Sargon M.F., Yazici A.C., Tas M., Bardakci Y., Senol S. (2009) Doserelated immunohistochemical and ultrastructural changes after oral methylphenidate administration in cerebrum and cerebellum of the rat. *World J. Biol. Psychiatry* 10:531-543.

- Barkley R.A. (1998) Attention deficit hyperactivity disorder: a handbook for diagnosis and treatment. New York: Guilford.
- Barkley R.A., Edwards G., Laneri M., Fletcher K., Metevia L. (2001) Executive functioning, temporal discounting, and sense of time in adolescents with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) and oppositional defiant disorder (ODD). *J Abnorm Child Psychol* 29:541–56.
- Bekkers J.M. (1993) Enhancement by histamine of NMDA-mediated synaptic transmission in the hippocampus. *Science* 261:104-106.
- Benarroch E.E. (2011) Na⁺,K⁺-ATPase: functions in the nervous system and involvement in neurologic disease. *Neurology*. 76:287-93.
- Benes F.M. (1998) Brain development, VII.Human brain growth spans decades. *Am.J. Psychiatry* 155:1489.
- Berridge C.W., Devilbiss D.M., Andrzejewski M.E., Arnsten A.F., Kelley A.E., Schmeichel B., Hamilton C., Spencer R.C. (2006) Methylphenidate preferentially increases catecholamine neurotransmission within the prefrontal cortex at low doses that enhance cognitive function. *Biol Psychiatry* 60:1111–1120.
- Biederman J., Faraone S.V., Lapey K. (1992) Comorbidity of diagnosis in attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). *Child Adolesc Psychiatr Clin North Am* 1:335–60.
- Biederman J., Mick E., Faraone S.V. (2000) Age-dependent decline of symptoms of attention deficit hyperactivity disorder: impact of remission definition and symptom type. *Am J Psychiatry* 157:816-818.
- Biederman J., Monuteaux M., Doyle A.E., Seidman L.J., Wilens T.E., Ferrero F., Morgan C.L., Faraone S.V. (2004) Impact of executive function deficits and ADHD on academic outcomes in children. *J Consult Clin Psychol* 72:757–766.
- Bird H., Gould M., Staghezza-Jaramillo B. (1994) The comorbidity of ADHD in a community sample of children aged 6 through 16 years. *J Child Fam Stud* 3:365–78.
- Blanc E.M., Keller J.N., Fernandez S. Mattson M.P. (1998) 4-hydroxynonenal, a lipid peroxidation product, impairs glutamate transport in cortical astrocytes. *Glia* 22:149–160.
- Blanco G. (2005) Na,K-ATPase subunit heterogeneity as a mechanism for tissue-specific ion regulation. *Semin Nephrol*. 25:292-303.
- Bottger P., Tracz Z., Heuck A., Nissen P., Romero-Ramos M., Lykke-Hartmann K. (2011) Distribution of Na/K-ATPase alpha 3 isoform, a sodium-potassium P-type pump associated with rapid-onset of dystonia parkinsonism (RDP) in the adult mouse brain. *J Comp Neurol*. 519:376-404.

- Botting N., Powls A., Cooke R.W., Marlow N. (1997) Attention deficit hyperactivity disorders and other psychiatric outcomes in very low birthweight children at 12 years. *J Child Psychol Psychiatry* 38:931–941.
- Boyd T.A., Ernhart C.B., Greene T.H., Sokol R.J., Martier S. (1991) Prenatal alcohol exposure and sustained attention in the preschool years. *Neurotoxicol Teratol* 13:49–55.
- Brandon C.L., Steiner H. (2003) Repeated methylphenidate treatment in adolescent rats alters gene regulation in the striatum. *Eur J Neurosci*, 18:1584-1592.
- Brown R.T., Coles C.D., Smith I.E., Platzman K.A., Silverstein J., Erickson S., Falek A. (1991) Effects of prenatal alcohol exposure at school age. II. Attention and behavior. *Neurotoxicol Teratol* 13:369–76.
- Brown R.E., Stevens D.R., Haas H.L. (2001) The physiology of brain histamine. *Progress in Neurobiology* 63:637-672.
- Cadet J.L., Krasnova, I.N. (2009) Molecular bases of methamphetamine induced neurodegeneration. *Int. Rev. Neurobiol.* 88:101-119.
- Carageorgiou H., Zarros A., Tsarkiris S. (2003) Selegiline long-term effects on brain acetylcholinesterase, Na⁺,K⁺-ATPase activities, antioxidant status and learning performance of aged rats. *Pharmacol Res.* 48:245-251.
- Carboni E., Silvagni A., Valentini V., Di Chiara G. (2003) Effect of amphetamine, cocaine and depolarization by high potassium on extracellular dopamine in the nucleus accumbens shell of SHR rats. An in vivo microdialysis study. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 27:653-659.
- Castellanos F.X., Tannock R. (2002) Neuroscience of attention deficit/ hyperactivity disorder: the search for endophenotypes. *Nat Rev Neurosci* 3:617–28.
- Cepeda C., Levine M.S. (2006) Where do you think you are going? The NMDA-D1 receptor trap. *Science's Signal Transduction Knowledge Environment: STKE*, 2006:20-24.
- Chakraborty H., Sen P., Sur A., Chatterjee U., Chakrabarti S. (2003) Age-related oxidative inactivation of Na⁺,K⁺-ATPase in rat brain crude synaptosomes. *Exp Gerontol.* 38:705-10.
- Challman T.D., Lipsky J.J. (2000) Methylphenidate: its pharmacology and uses. *Mayo Clin Proc* 75:711-721.
- Chan Y.P., Swanson J.M., Soldin S.S., Thiessen J.J., Macleod S.M., Logan W. (1983) Methylphenidate hydrochloride given with or before breakfast: II. Effects on plasma concentration of methylphenidate and ritalinic acid. *Pediatrics* 72:56-59.
- Chase T.D., Brown R.E., Carrey N., Wilkinson M. (2003) Daily methylphenidate administration attenuates c-fos expression in the striatum of prepubertal rats. *Neuroreport*, 15:769-772.

- Cook E.H.Jr., Stein M.A., Krasowski M.D., Cox N.J., Olkon D.M., Kieffer J.E., Leventhal B.L. (1995) Association of attention-deficit disorder and the dopamine transporter gene. *Am J Hum Genet.* 56:993-998.
- Cordioli A.V. et al. *Psicofármacos.* 3 ed. Porto Alegre: ArtMed Editora S.A., 2005.
- Coyle J.T. (2000) Psychotropic drug use in very young children. *Jama* 283:1059-1060.
- Cox D.J., Humphrey J.W., Merkel R.L., Penberthy J.K., Kovatchev B. (2004) Controlled-release methylphenidate improves attention during onroad driving by adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Am Board Fam Pract* 17:235–39.
- Dafny N., Yang P.B. (2006) The role of age, genotype, sex, and route of acute and chronic administration of methylphenidate: a review of its locomotor effects. *Brain Res Bull* 68:393–405.
- Dalley J.W., Cardinal R.N., Robbins T.W. (2004) Prefrontal executive and cognitive functions in rodents: Neural and neurochemical substrates. *Neurosci Biobehav Res* 28:771–784.
- Danbolt N.C. (2001) Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* 65:1-105.
- dela Peña I., Yoon S.Y., Lee J.C., dela Peña J.B., Sohn A.R., Ryu, J.H., Shin, C.Y., Cheong, J.H. (2012) Methylphenidate treatment in the spontaneously hypertensive rat: influence on methylphenidate self-administration and reinstatement in comparison with Wistar rats. *Psychopharmacology* 221:217-226.
- Dencher N.A., Frenzel M., Reifschneider N.H., Sugawa M., Krause F. (2007) Proteome alterations in rat mitochondria caused by aging. *Ann N Y Acad Sci.* 1100:291-298.
- DiScala C, Lescohier I, Barthel M, Li G. Injuries to children with attention deficit hyperactivity disorder. *Pediatrics* 1998; 102: 1415–21.
- Dopfner M., Rothenberger A., Sonuga-Barke E. (2004) Areas for future investment in the field of ADHD: preschoolers and clinical networks. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 13:130–135.
- Drouin C., Page M., Waterhouse B. (2006) Methylphenidate enhances noradrenergic transmission and suppresses mid- and long-latency sensory responses in the primary somatosensory cortex of awake rats. *J Neurophysiol* 96:622-632.
- Duong S., Chung K., Wigal S.B. (2012) Metabolic, toxicological, and safety considerations for drugs used to treat ADHD. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 8:543-552.
- Fagundes A.O., Rezin G.T., Zanette F., Grandi E., Assis L.C., Dal-Pizzol F., Quevedo J., Streck E.L. (2007) Chronic administration of methylphenidate activates mitochondrial respiratory chain in brain of young rats. *Int. J. Dev. Neurosci.* 25:47-51.

- Fagundes A.O., Aguiar M.R., Aguiar C.S., Scaini G., Sachet M.U., Bernhardt N.M., Rezin G.T., Valvassori S.S., Quevedo J., Streck E.L. (2010a) Effect of acute and chronic administration of methylphenidate on mitochondrial respiratory chain in the brain of young rats. *Neurochem. Res.* 35:1675-1680.
- Fagundes A.O., Scaini G., Santos P.M., Sachet M.U., Bernhardt N.M., Rezin G.T., Valvassori S.S., Schuck P.F., Quevedo J., Streck E.L. (2010b) Inhibition of mitochondrial respiratory chain in the brain of adult rats after acute and chronic administration of methylphenidate. *Neurochem. Res.* 35:405-411.
- Faraone S.V. Genetics of adult attention deficit hyperactivity disorder. (2004) In: Spencer T, ed. *Psychiatric clinics of North America*. Philadelphia, PA: Saunders Press, 303–21.
- Faraone S.V., Biederman J. (1998) Neurobiology of attention-deficit hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry* 44:951–58.
- Faraone S.V., Biederman J. (2004) Neurobiology of attention deficit hyperactivity disorder. In: Charney DS, Nestler EJ, eds. *Neurobiology of mental illness*. 2nd edn. New York, NY: Oxford University Press.
- Faraone S.V., Biederman J., Zimmerman B.A. (2005) Correspondence of parent and teacher reports in medication trials. *Eur J Child Adolesc Psychiatry* 14:20–27.
- Faraone S.V., Doyle A.E. (2001) The nature and heritability of attention deficit/hyperactivity disorder. *Child Adolesc Psychiatr Clin North Am* 10:299–316.
- Faraone S.V., Doyle A.E., Mick E., Biederman J. (2001) Meta-analysis of the association between the 7-repeat allele of the dopamine D(4) receptor gene and attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Psychiatry* 158:1052-1057.
- Faraone S.V., Perlis R.H., Doyle A.E., Smoller J.W., Goralnick J.J., Holmgren M.A., Sklar P. (2005) Molecular genetics of attention deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry* 57:1313–1323.
- Faraone S.V., Sergeant J., Gillberg C., Biederman J. (2003) The worldwide prevalence of ADHD: is it an American condition? *World Psychiatry* 2:104–13.
- Fisch R.Z. (1985) Methylphenidate for medical in-patients. *Int J Psychiatry Med.* 15:75-79.
- Fogelman Y., Vinker S., Guy N., Kahan E. (2003) Prevalence of and change in the prescription of methylphenidate in Israel over a 2-year period. *CNS Drugs* 17: 915–919.
- Freese L., Muller E.J., Souza M.F., Couto-Pereira N.S., Tosca C.F., Ferigolo M., Barros H.M. (2012) GABA system changes in methylphenidate sensitized female rats. *Behav. Brain Res.* 231:181-186.
- Fung Y.K., Lau Y.S. (1989) Effects of prenatal nicotine exposure on rat striatal dopaminergic and nicotinic systems. *Pharmacol Biochem Behav* 33:1–6.

- Furuse T., Wada Y., Hattori K., Yamada I., Kushida T., Shibukawa Y., Masuya H., Kaneda H., Miura I., Seno N., Kanda T., Hirose R., Toki S., Nakanishi K., Kobayashi K., Sezutsu H., Gondo Y., Noda T., Yuasa S., Wakana S. (2010) Phenotypic characterization of a new Grin1 mutant mouse generated by ENU mutagenesis. *Eur. J. Neurosci.* 31:1281-1291.
- Gainetdinov R.R., Wetsel W.C., Jones S.R., Levin E.D., Jaber M., Caron M.G. (1999) Role of serotonin in the paradoxical calming effect of psychostimulants on hyperactivity. *Science* 283:397-401.
- Gainetdinov R.R., Wetsel S.R., Jones E.D., Levin M., Jaber M.G. (2001) Role on serotonin in the paradoxical calming effect of psychostimulants on hyperactivity. *Science.* 98:397-401.
- Gatley S.J., Pan D., Chen R., Chaturvedi G., Ding Y.S. (1996) Affinities of methylphenidate derivatives for dopamine, norepinephrine and serotonin transporters. *Life Sci.* 58:231-239.
- Geering K. (2008) Functional roles of Na,K-ATPase subunits. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 17:526-532.
- Gerasimov M.R., Franceschi M., Volkow N.D., Gifford A., Gatley S.J., Marsteller D., Molina P.E., Dewey S.L. (2000) Comparison between intraperitoneal and oral methylphenidate administration: A microdialysis and locomotor activity study. *J Pharmacol Exp Ther* 295:51-57.
- Goldman-Rakic P.S. (1995) Cellular basis of working memory. *Neuron* 14:477–485.
- Goldstein I., Levy T., Galili D., Ovadia H., Yirmiya R., Rosen H., Lichtstein D. (2006) Involvement of Na(+), K(+)-ATPase and endogenous digitalis-like compounds in depressive disorders. *Biol Psychiatry.* 60:491-499.
- Gomes K.M., Petronilho F.C., Mantovani M., Garbelotto T., Boeck C.R., Dal- Pizzol F., Quevedo, J. (2008) Antioxidant enzyme activities following acute or chronic methylphenidate treatment in young rats. *Neurochem. Res.* 33:1024-1027.
- Gonçalves J., Baptista S., Silva A.P. (2014) Psychostimulants and brain dysfunction: A review of the relevant neurotoxic effects. *Neuropharmacology* 87:135-149.
- Goodman e Gilman. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica.* 10 ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 2003.
- Greene R.W., Biederman J., Faraone S.V., Monuteaux M.C., Mick E., DuPre E.P., Fine C.S., Goring J.C. (2001) Social impairment in girls with ADHD: patterns, gender comparisons, and correlates. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 40:704–710.
- Greenhill L.L., Halperin J.M., Abikoff H. (1999) Stimulant medications. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 38:503-512.
- Greenhill L.L., Pliszka S., Dulcan M.K., Bernet W., Arnold V., Beitchman J., Benson R.S., Bukstein O., Kinlan J., McClellan J., Rue D., Shaw J.A., Stock S. (2002)

(American Academy of Child and Adolescent Psychiatry): Practice parameter for the use of stimulant medications in the treatment of children, adolescents, and adults. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry* 41:26S-49S.

- Haas H., Panula P. (2003) The role of histamine and the tuberomamillary nucleus in the nervous system. *Nature Reviews* 4:121-130.
- Hack M., Youngstrom E.A., Cartar L., Schluchter M., Taylor H.G., Flannery D., Klein N., Borawski E. (2004) Behavioral outcomes and evidence of psychopathology among very low birth weight infants at age 20 years. *Pediatrics* 114:932–940.
- Halliwell B. (2011) Free radicals and antioxidants - quo vadis? *Trends Pharmacol Sci.* 32:125-30.
- Halliwell B. (2012) Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutr Rev.* 70:257-65.
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C. (2007) *Free radicals in biology and medicine.*, Vol., Oxford University., New York.
- Halliwell B., Whiteman M. (2004) Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol.* 142:231-55.
- Harvey R.C., Sen S., Deaciuc A., Dwoskin L.P., Kantak K.M. (2011) Methylphenidate treatment in adolescent rats with an attention deficit/hyperactivity disorder phenotype: cocaine addiction vulnerability and dopamine transporter function. *Neuropsychopharmacology* 36:837-847.
- Heal D.J., Smith S.L., Kulkarni R.S., Rowley H.L. (2008) New perspectives from microdialysis studies in freely-moving, spontaneously hypertensive rats on the pharmacology of drugs for the treatment of ADHD. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 90:184-197.
- Hendley E. D., Ohlsson W. G. (1991) Two new inbred rat strains derived from SHR: WKHA, hyperactive, and WKHT, hypertensive, rats. *Am. J. Physiol.* 261:583-589.
- Hess E.J., Jinnah H.A., Kozak C.A., Wilson M.C. (1992) Spontaneous locomotor hyperactivity in a mouse mutant with a deletion including the Snap gene on chromosome 2. *J. Neurosci.* 12:2865-2874.
- Hess E.J., Collins K.A., Wilson M.C. (1996) Mouse model of hyperkinesis implicates SNAP-25 in behavioral regulation. *J. Neurosci.* 16:3104-3111.
- Hess E.J., Collins K.A., Copeland N.G., Jenkins N.A., Wilson M.C. (1994) Deletion map of the coloboma (Cm) locus on mouse chromosome 2. *Genomics*, 21:257-261.

- Husson I., Mesplès B., Medja F., Leroux P., Kosofsky B., Gressens P. (2004) Methylphenidate and Mk-801, an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist: shared biological properties. *Neuroscience* 125:163-170.
- Indredavik M.S., Vik T., Heyerdahl S., Kulseng S., Fayers P., Brubakk A.M. (2004) Psychiatric symptoms and disorders in adolescents with low birth weight. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 89:445–450.
- Jensen P.S., Hinshaw S.P., Kraemer H.C., et al. (2001) ADHD comorbidity findings from the MTA study: comparing comorbid subgroups. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 40:147–158.
- Jorgensen P.L., Hakansson K.O., Karlsh S.J. (2003) Structure and mechanism of Na,K-ATPase: functional sites and their interactions. *Annu Rev Physiol.* 65:817-49.
- Kadesjo B., Gillberg C. (2001) The comorbidity of ADHD in the general population of Swedish school-age children. *J Child Psychol Psychiatry* 42:87–92.
- Kanner B.I. (2006) Structure and function of sodium-coupled GABA and glutamate transporters. *J Membr Biol* 213:89-100.
- Katz L.J., Goldstein G., Geckle M. (1998) Neuropsychological and personality differences between men and women with ADHD. *J Attent Disord* 2:239-247.
- Klein R.G. (1995) The role of methylphenidate in psychiatry. *Arch Gen Psychiatry.* 52:429-33.
- Kollins S.H., MacDonald E.K., Rush C.R. (2001) Assessing the abuse potential of methylphenidate in nonhuman and human subjects: a review. *Pharmacol Biochem Behav* 68:611-627.
- Krause K.H., Dresel S.H., Krause J., Kung H.F., Tatsch K. (2000). 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.
- Kuczenski R., Segal D.S. (1997) Effects of methylphenidate on extracellular dopamine, serotonin, and norepinephrine: comparison with amphetamine. *J Neurochem.* 68:2032-2037.
- Kuczenski R., Segal D.S. (2002) Exposure of adolescent rats to oral methylphenidate: preferential effects on extracellular norepinephrine and absence of sensitization and cross-sensitization to methamphetamine. *J Neurosci* 22:7264-7271.
- Lagace D.C., Yee J.K., Bolanos C.A., Eisch A.J. (2006) Juvenile administration of methylphenidate attenuates adult hippocampal neurogenesis. *Biol. Psychiatry* 60:1121-1130.
- Lahey B.B., Loeber R., Burke J., Rathouz P.J., McBurnett K. (2002) Waxing and waning in concert: dynamic comorbidity of conduct disorder with other disruptive

and emotional problems over 7 years among clinic-referred boys. *J Abnorm Psychol* 111:556–567.

- Lee T.H., Lee C.H., Kim I.H., Yan B.C., Park J.H., Kwon S.H., Park O.K., Ahn J.H., Cho J.H., Won M.H., Kim S.K. (2012) Effects of ADHD therapeutic agents, methylphenidate and atomoxetine, on hippocampal neurogenesis in the adolescent mouse dentate gyrus. *Neurosci. Lett.* 524:84-88.
- Leo D., Sorrentino E., Volpicelli F., Eyman M., Greco D., Viggiano D., di Porzio U., Perrone-Capano C. (2003) Altered midbrain dopaminergic neurotransmission during development in an animal model of ADHD. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 27:661-669.
- Li B., Arime Y., Hall F.S., Uhl G.R., Sora I. (2010) Impaired spatial working memory and decreased frontal cortex BDNF protein level in dopamine transporter knockout mice. *Eur. J. Pharmacol.*, 628:104-107.
- Lima F.D., Oliveira M.S., Furian A.F., Souza M.A., Rambo L.M., Ribeiro L.R., Silva L.F., Retamoso L.T., Hoffmann M.S., Magni D.V., Pereira L., Figuera M.R., Mello C.F., Royes L.F. (2009) Adaptation to oxidative challenge induced by chronic physical exercise prevents Na⁺,K⁺-ATPase activity inhibition after traumatic brain injury. *Brain Res* 1279:147–155.
- Lopina O.D. (2000) Na⁺,K⁺-ATPase: structure, mechanism, and regulation. *Membr Cell Biol.* 13:721-44.
- Mancuso M., Orsucci D., LoGerfo A., Calsolaro V., Sicilian G. (2010) Clinical features and pathogenesis of Alzheimer's disease: involvement of mitochondria and mitochondrial DNA. *Adv Exp Med Biol* 685:34-44.
- Maragakis N.J., Rothstein J.D. (2001) Glutamate transporters in neurologic disease. *Arch Neurol* 58:365-70.
- Maragakis N.J., Rothstein J.D. (2004) Glutamate transporters: animal models to neurologic disease. *Neurobiol Dis* 15:461-473.
- Marklund S.L. (1985) Pyrogallol autoxidation. In: *Handbook for Oxygen Radical Research*. CRC Press, Boca Raton, 243-247.
- Marks' Basic Medical Biochemistry: A Clinical Approach by Michael A Lieberman, Allan D. Marks, 3^o edition, 2009.
- Markussen-Linnet K., Dalsgaard S., Obel C., Wisborg K., Henriksen T.B., Rodriguez A., Kotimaa A., Moilanen I., Thomsen P.H., Olsen J., Jarvelin M.R. (2003) Maternal lifestyle factors in pregnancy risk of attention deficit hyperactivity disorder and associated behaviors: review of the current evidence. *Am J Psychiatry* 160:1028–1040.
- Martins M.R., Reinke A., Petronilho F.C., Gomes K.M., Dal-Pizzol F., Quevedo J. (2006) Methylphenidate treatment induces oxidative stress in young rat brain. *Brain Res.* 1078:189-197.

- McDonough A.A., Farley R.A. (1993) Regulation of Na,K-ATPase activity. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2:725–734.
- McGrail K.M., Phillips J.M., Sweadner K.J. (1991) Immunofluorescent localization of three Na,K-ATPase isozymes in the rat central nervous system: both neurons and glia can express more than one Na,K-ATPase. *J Neurosci.* 11:381-91.
- Meldrum B.S. (2000) Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J Nutr* 130:1007-1015.
- Mick E., Biederman J., Prince J., Fischer M.J., Faraone S.V. (2002) Impact of low birth weight on attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Dev Behav Pediatrics* 23:16–22.
- Miller A.R., Lalonde C.E., McGrail K.M., Armstrong R.W. (2001) Prescription of methylphenidate to children and youth, 1990–1996. *CMAJ* 165:1489–94.
- Miyake A., Friedman N.P., Emerson M.J., Witzki A.H., Howerter A., Wager T.D. (2000) The unity and diversity of executive functions and their contributions to complex “Frontal Lobe” tasks: a latent variable analysis. *Cognit Psychol* 41:49–100.
- Modestin J., Matutat B., Wurmle O. (2001) Antecedents of opioid dependence and personality disorder: attention-deficit/hyperactivity disorder and conduct disorder. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 251:42–47.
- Moseley A.E., Williams M.T., Schaefer T.L., Bohanan C.S., Neumann J.C., Behbehani M.M., Vorhees C.V., Lingrel J.B. (2007) Deficiency in Na,K-ATPase alpha isoform genes alters spatial learning, motor activity, and anxiety in mice. *J Neurosci* 27:616–626.
- Murphy K.R., Barkley R.A., Bush T. (2002) Young adults with attention deficit hyperactivity disorder: subtype differences in comorbidity, educational, and clinical history. *J Nerv Ment Dis* 190:147–157.
- National Institutes of Health: Consensus development conference statement: diagnosis and treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD). *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*, v.39 p.182-193, 2000.
- Nestler J.E., Hyman S.E., Malenka R.C. (2009) *Molecular Neuropharmacology. A foundation for clinical neuroscience.* Second edition. Copyright.
- Nichols P.L., Chen T.C. (1981) *Minimal brain dysfunction: a prospective study.* Hillsdale, NJ, USA: Lawrence Erlbaum Associates.
- Nicholls D.G. (2008) Oxidative stress and energy crises in neuronal dysfunction. *Ann N Y Acad Sci* 1147:53-60.
- Nigg J.T., Goldsmith H.H., Sachek J. (2004) Temperament and attention deficit hyperactivity disorder: the development of a multiple pathway model. *J Clin Child Adolesc Psychol* 33:42–53.

- Offord D.R., Boyle M.H., Racine Y.A., Fleming J.E., Cadman D.T., Blum H.M., Byrne C., Links P.S., Lipman E.L., MacMillan H.L., et al. (1992) Outcome, prognosis and risk in a longitudinal follow-up study. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 31:916–23.
- Olfson M., Gameroff M.J., Marcus S.C., Jensen P.S. (2003) National trends in the treatment of attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Psychiatry* 160:1071–77.
- Palfrey J.S., Levine M.D., Walker D.K., Sullivan M. (1985) The emergence of attention deficits in early childhood: a prospective study. *J Dev Behav Pediatr* 6:39–48.
- Pascoli V., Valjent E., Corbillé A., Corvel J., Tassin J., Girault J., Hervé D. (2005) cAMP and Extracellular Signal-Regulated Kinase Signaling in Response to d-Amphetamine and Methylphenidate in the Prefrontal Cortex in Vivo: Role of β 1-adrenoceptors. *Mol Pharmacology*, 68:421-429.
- Pedersen W.A., Cashman N.R., Mattson M.P. (1999) The lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal impairs glutamate and glucose transport and choline acetyltransferase activity in NSC-19 motor neuron cells. *Exp Neurol* 155:1–10.
- Petrozzi L., Ricci G., Giglioli N.J., Siciliano G., Mancuso M. (2007) Mitochondria and neurodegeneration. *Biosci Rep* 27:87-104.
- Pierce R.C., Kalivas R.W. (1997) A circuitry model of the expression of behavioral sensitization to amphetamine-like psychostimulants. *Brain Res Rev* 25:193–216.
- Potts M.B., Koh S.E., Whetstone W.D., Walker B.A., Yoneyama T., Claus C.P., Manvelyan H.M., Noble-Haesslein L.J. (2006) Traumatic injury to the immature brain: inflammation, oxidative injury, and iron-mediated damage as potential therapeutic targets. *Neuro Rx* 3:143–153.
- Raber J., Mehta P.P., Kreifeldt M., Parsons L.H., Weiss F., Bloom F.E., Wilson M.C. (1997) Coloboma hyperactive mutant mice exhibit regional and transmitter-specific deficits in neurotransmission. *J Neurochemistry* 68:176–186.
- Rauchova H., Drahota Z., Koudelova J. (1999) The role of membrane fluidity changes and thiobarbituric acid-reactive substances production in the inhibition of cerebral cortex Na⁺/K⁺-ATPase activity. *Physiol Res*. 48:73-78.
- Richardson G.A., Day N.L. (1994) Detrimental effects of prenatal cocaine exposure: illusion or reality? *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 33:28–34.
- Robbins T.W., James M., Owen A.M., Sahakian B.J., Lawrence A.D., McInnes L., Rabbitt P.M. (1998) A study of performance on tests from the CANTAB battery sensitive to frontal lobe dysfunction in a large sample of normal volunteers: implications for theories of executive functioning and cognitive aging. *J Int Neuropsychol Soc* 4:474–490.
- Robinson T.E., Berridge K.C. (1993) The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Res Rev* 18:247–291.

- Robinson T.E., Berridge K.C. (2000) The psychology and neurobiology of addiction: an incentive-sensitization view. *Addiction* 95:91–117.
- Roman T., Schmitz M., Polanczyk G.V., Eizirik M., Rohde L.A., Hutz M.H. (2003) Is the alpha-2A adrenergic receptor gene (ADRA2A) associated with attention-deficit/hyperactivity disorder? *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 120:116-120.
- Rose E.M., Koo, J.C., Antflick, J.E., Ahmed, S.M., Angers, S., Hampson D.R. (2009) Glutamate transporter coupling to Na,K-ATPase. *J Neurosci.* 29:8143-55.
- Russell V., de Villiers A., Sagvolden T., Lamm M., Taljaard J. (1995) Altered dopaminergic function in the prefrontal cortex, nucleus accumbens and caudate-putamen of an animal model of attention-deficit hyperactivity disorder--the spontaneously hypertensive rat. *Brain Res.* 676:343-351.
- Russell V., Allie S., Wiggins T. (2000) Increased noradrenergic activity in prefrontal cortex slices of an animal model for attention-deficit hyperactivity disorder--the spontaneously hypertensive rat. *Behav. Brain Res.*, 117:69-74.
- Russell V.A., Wiggins T.M. (2000) Increased glutamate-stimulated norepinephrine release from prefrontal cortex slices of spontaneously hypertensive rats. *Metab. Brain Dis.* 15:297-304.
- Rutter M., Cox A., Tupling C., Berger M., Yule W. (1975) Attainment and adjustment in two geographical areas: vol 1. The prevalence of psychiatric disorders. *Br J Psychiatry* 126:493–509.
- Sadasivan S., Pond B.B., Pani A.K., Qu C., Jiao Y., Smeyne R.J. (2012) Methylphenidate exposure induces dopamine neuron loss and activation of microglia in the basal ganglia of mice. *PLoS One* 7:33693.
- Safer D.J., Allen R.P. (1989) Absence of tolerance to the behavioral effects of methylphenidate in hyperactive and inattentive children. *J Pediatr.* 115:1003-1008.
- Sagvolden T., Johansen E.B., Aase H., Russell V.A. (2005) A dynamic developmental theory of attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) predominantly hyperactive/impulsive and combined subtypes. *Behav. Brain Sci.* 28: 397-419, discussion, 419-468.
- Sagvolden T., Russell V.A., Aase H., Johansen E.B., Farshbaf M. (2005) Rodent models of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol. Psychiatry* 57:1239-1247.
- Saigal S., Pinelli J., Hoult L., Kim M.M., Boyle M. (2003) Psychopathology and social competencies of adolescents who were extremely low birth weight. *Pediatrics* 111:969–975.
- Schaefers A.T., Teuchert-Noodt G., Bagorda F., Brummelte S. (2009) Effect of postnatal methamphetamine trauma and adolescent methylphenidate treatment on adult hippocampal neurogenesis in gerbils. *Eur. J. Pharmacol.* 616:86-90.

- Scherer E.B., Matte C., Ferreira A.G., Gomes K.M., Comim C.M., Mattos C., Quevedo J., Streck E.L., Wyse A.T. (2009) Methylphenidate treatment increases Na(p), K (p)-ATPase activity in the cerebrum of young and adult rats. *J. Neural Transm.* 116:1681-1687.
- Scherer E.B., da Cunha M.J., Matté C., Schmitz F., Netto C.A., Wyse A.T. (2010) Methylphenidate affects memory, brain-derived neurotrophic factor immunocontent and brain acetylcholinesterase activity in the rat. *Neurobiol Learn Mem* 94:247-253.
- Schmidt-Troschke S.O., Ostermann T., Melcher D., Schuster R., Erben C.M., Matthiessen P.F. (2004) [The use of methylphenidate in children: analysis of prescription usage based in routine data of the statutory health insurance bodies concerning drug prescriptions]. *Gesundheitswesen* 66:387–92.
- Schmitz F., Scherer E.B., da Cunha M.J., da Cunha A.A., Lima D.D., Delwing D., Netto C.A., Wyse A.T. (2012) Chronic methylphenidate administration alters antioxidant defenses and butyrylcholinesterase activity in blood of juvenile rats. *Mol Cell Biochem* 361:281-288.
- Schmitz F., Scherer E.B., Machado F.R., da Cunha A.A., Tagliari B., Netto C.A., Wyse A.T. (2012) Methylphenidate induces lipid and protein damage in prefrontal cortex, but not in cerebellum, striatum and hippocampus of juvenile rats. *Metab. Brain Dis.* 27:605-612.
- Schneider J.S., Sun Z.Q., Roeltgen D.P. (1994) Effects of dopamine agonists on delayed response performance in chronic low-dose MPTPtreated monkeys. *Pharmacol Biochem Behav* 48:235–40.
- Segovia G., Porrás A., Del Arco A., Mora F. (2001) Glutamatergic neurotransmission in aging: a critical perspective. *Mech Ageing Dev* 122:1-29.
- Shaywitz S.E., Cohen D.J., Shaywitz B.A. (1978) The biochemical basis of minimal brain dysfunction. *J Pediatr* 92:179–87.
- Shen H.W., Hagino Y., Kobayashi H., Shinohara-Tanaka K., Ikeda K., Yamamoto H., Yamamoto T., Lesch K.P., Murphy D.L., Hall F.S., Uhl G.R., Sora I. (2004) Regional differences in extracellular dopamine and serotonin assessed by in vivo microdialysis in mice lacking dopamine and/or serotonin transporters. *Neuropsychopharmacology* 29:1790-1799.
- Sheldon A.L., Robinson M.B. (2007) The role of glutamate transporters in neurodegenerative diseases and potential opportunities for intervention. *Neurochem Int* 51:333-355.
- Siegel G.J., Albers R.W., Brady S.T., Price D.L. (2006) *Basic neurochemistry.* Academic Press, California, USA.
- Sonuga-Barke E.J. (2005) Casual models of Attention-deficit/hyperactivity disorder: from common simple deficits to multiple developmental pathways. *Biol Psychiatry* 57:1231–38.

- Sora I., Wichems C., Takahashi N., Li X.F., Zeng Z., Revay R., Lesch K., Murphy D.L., Uhl G.R. (1998) Cocaine reward models: conditioned place preference can be established in dopamine- and in serotonin-transporter knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1375:7699-7704.
- State R.C., Frye M.A., Altshuler L.L., Strober M., DeAntonio M., Hwang S., Mintz J. (2004) Chart review of the impact of attention-deficit/hyperactivity disorder comorbidity on response to lithium or divalproex sodium in adolescent mania. *J Clin Psychiatry* 65:1057–1063.
- Steinhausen H.C., Drechsler R., Foldenyi M., Imhof K., Brandeis D. (2003) Clinical course of attention-deficit/hyperactivity disorder from childhood toward early adolescence. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 42:1085–1092.
- Suhail M. (2010) Na, K-ATPase: Ubiquitous Multifunctional Transmembrane Protein and its Relevance to Various Pathophysiological Conditions. *J Clin Med Res.* 2:1-17.
- Swanson J.M., Volkow N.D. (2003) Serum and brain concentrations of methylphenidate: Implications for use and abuse. *Neurosci Biobehav Rev* 27:615–621.
- Teixeira A.L.Jr., Caramelli P. (2006) Apathy in Alzheimer's disease. *Rev Bras Psiquiatr.* 28:238-241.
- Valko M., Izakovic M., Mazur M., Rhodes C.J., Telser J. (2004) Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem.* 266:37-56.
- Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T., Mazur M., Telser J. (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 39:44-84.
- Van De Kamp J., Collins A. (1994) Prenatal nicotine alters nicotinic receptor development in the mouse brain. *Pharmacol Biochem Behav* 47:889–900.
- van der Bergh F.S., Bloemarts E., Chan J.S.W., Groenink L., Olivier B. Oosting R.S. (2006) Spontaneously hypertensive rats do not predict symptoms of attention-deficit hyperactivity disorder. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 83:380-390.
- Verster G.C., van Niekerk A.A. (2012) Moral perspectives on stimulant use by healthy students. *S. Afr. Med. J.* 102:909-911.
- Vitvitsky V.M., Garg S.K., Keep R.F., Albin R.L., Banerjee R. (2012) Na⁺ and K⁺ ion imbalances in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta.* 1822:1671-81.
- Volkow N.D., Ding Y.S., Fowler J.S., Wang G.J., Logan J., Gatley J.S., Dewey S., Ashby C., Liebermann J., Hitzemann R., et al. (1995) Is methylphenidate like cocaine? Studies on their pharmacokinetics and distribution in the human brain. *Arch Gen Psychiatry* 52:456-463.

- Volkow N.D., Fowler J.S., Wang G.J., Ding Y.S., Gatley S.J. (2002) Role of dopamine in the therapeutic and reinforcing effects of methylphenidate in humans: results from imaging studies. *Eur Neuropsychopharmacol* 12:557–566.
- Volkow N.D., Chang L., Wang G.J., Fowler J.S., Leonido-Yee M., Franceschi D., Sedler M.J., Gatley S.J., Hitzemann R., Ding Y.S., Logan J., Wong C., Miller E.N. (2001) Association of dopamine transporter reduction with psychomotor impairment in methamphetamine abusers. *Am J Psychiatry* 158:377-382.
- Volkow N.D., Wang G.J., Fowler J.S., Ding Y.S. (2005) Imaging the effects of methylphenidate on brain dopamine: new model on its therapeutic actions for attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry* 57:1410-1415.
- Volterra A., Trotti D., Racagni G. (1994) Glutamate uptake is inhibited by arachidonic acid and oxygen radicals via two distinct and additive mechanisms. *Mol Pharmacol* 46:986-992.
- Vorobjev V.S., Sharonova I.N., Walsh I.B., Haas H.L. (1993) Histamine potentiates N-methyl-D-aspartate responses in acutely isolated hippocampal neurons. *Neuron* 11:837-844.
- Wang X.Q., Yu S.P. (2005) Novel regulation of Na, K-ATPase by Src tyrosine kinases in cortical neurons. *J Neurochem.* 93:1515-23.
- Wang X.Q., Xiao A.Y., Sheline C., Hyrc K., Yang A., Goldberg M.P., Choi D.W., Yu S.P. (2003) Apoptotic insults impair Na⁺, K⁺-ATPase activity as a mechanism of neuronal death mediated by concurrent ATP deficiency and oxidant stress. *J Cell Sci.* 116:2099-110.
- Westgard J.O., Darcy T. (2004) The truth about quality: medical usefulness and analytical reliability of laboratory tests. *Clin Chim Acta* 346:3–11.
- Willcutt E.G., Pennington B.F., Chhabildas N.A., Friedman M.C., Alexander J. (1999) Psychiatric comorbidity associated with DSM-IV ADHD in a nonreferred sample of twins. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 38:1355–62.
- Willcutt E.G., Brodsky K., Chhabildas N., et al. (2005) The neuropsychology of attention deficit hyperactivity disorder: validity of the executive function hypothesis. In: Gozal D, Molfese D, eds. *Attention deficit hyperactivity disorder from genes to patients*. Totowa, NJ: Humana Press.
- Williams K. (1994) Subunit-specific potentiation of recombinant N-methyl-D-aspartate receptors by histamine. *Molecular Pharmacology* 46:531-541.
- Willner P. (1991) "Methods for Assessing the Validity of Animal Models of Human Psychopathology," Humana Press, Clifton.
- Wilson M.C. (2000) Coloboma mouse mutant as an animal model of hyperkinesia and attention deficit hyperactivity disorder. *Neurosci Biobehav Rev* 24:51–57.
- Wood A.J., Elphick M., Grahame-Smith D.G. (1989) Effect of lithium and of other drugs used in the treatment of manic illness on the cation-transporting

properties of Na⁺,K⁺-ATPase in mouse brain synaptosomes. *J Neurochem.* 52: 1042-1049.

Woods S.K., Meyer J.S. (1991) Exogenous tyrosine potentiates the methylphenidate-induced increase in extracellular dopamine in the nucleus accumbens: a microdialysis study. *Brain Research* 560:97-105.

Zakharova I.O., Sokolova T.V., Furaev V.V., Rychkova M.P., Avrova N.F. (2007) Effects of oxidative stress inducers, neurotoxins, and ganglioside GM1 on Na⁺,K⁺-ATPase in PC12 and brain synaptosomes. *Zh Evol Biokhim Fiziol* 43:148–154.

Zanatta L.M., Nascimento F.C., Barros S.V., Silva G.R., Zugno A.I., Netto C.A., Wyse A.T. (2001) In vivo and in vitro effect of imipramine and fluoxetine on Na⁺,K⁺-ATPase activity in synaptic plasma membranes from the cerebral cortex of rats. *Braz J Med Biol Res.* 34:1265-1269.

Zhang X., Bearer E.L., Boulat B., Hall F.S., Uhl G.R., Jacobs R.E. (2010) Altered neurocircuitry in the dopamine transporter knockout mouse brain. *PLoS ONE* 5:11506.

Zito J.M., Safer D.J., dos Reis S., Gardner J.F., Boles M., Lynch F. (2000) Trends in the prescribing of psychotropic medications to preschoolers. *JAMA* 283:1025–30.

Zugno A.I., Valvassori S.S., Scherer E.B., Mattos C., Matté C., Ferreira C.L., Rezin G.T., Wyse A.T., Quevedo J., Streck E.L. (2009) Na⁺,K⁺-ATPase activity in an animal model of mania. *J Neural Transm.* 116:431-436.