



**Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica**

Metilfenidato causa alterações neuroquímicas e comportamentais em ratos

Emilene Barros da Silva Scherer

Orientadora: Profa Dra Angela Terezinha de Souza Wyse

Porto Alegre

2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica**

Metilfenidato causa alterações neuroquímicas e comportamentais em ratos

Emilene Barros da Silva Scherer

Orientadora: Profa Dra 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 à obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Porto Alegre

2010

Ao meu marido Lucácio,
pela compreensão, apoio e amor.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, por iluminar meu caminho e me dar forças para seguir em frente.

A minha orientadora, Prof^a Dr^a Angela Wyse, pelos sábios ensinamentos, incentivo, carinho, amizade e pelo exemplo de dedicação e competência.

À UFRGS, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica e a todos os professores que contribuíram para a minha formação.

Ao prof. Dr. Carlos Alexandre Netto pelo apoio e colaboração.

Ao prof. Dr. Clóvis M. D. Wannmacher pelos ensinamentos e amizade.

Aos professores Dr. Emilio L. Streck e Dr. João Quevedo pela colaboração neste trabalho.

Ao CNPq, pela bolsa concedida.

Aos meus amigos do laboratório, Aline, Ana Paula, Andréa, Bárbara, Cris Matté, Felipe, Fernanda, Jana, Ju, Lucas, Maira, Nize e Tiago, agradeço pela amizade, pelo ambiente de trabalho maravilhoso e pela ajuda constante. Em especial a Cris Matté, Andréa, Maira e Felipe pelo apoio na realização deste trabalho.

Aos amigos que passaram pelo laboratório e deixaram muitas saudades: Cris Mattos, Francieli, Siomara, Alexandra, Fábria, Daniela, Débora e Caren.

A minha grande amiga Grazi, pelo companheirismo e amizade.

A todos da minha família, pelo apoio e incentivo.

Ao meu filho Arthur, que tanta alegria me traz.

Ao meu esposo Lucácio, pelo amor, carinho e patrocínio. Por acreditar em mim quando eu resolvi me dedicar à pesquisa, me apoiando sempre.

A todos, MUITO OBRIGADA!

SUMÁRIO

RESUMO.....	VI
ABSTRACT.....	VII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	VIII
LISTA DE FIGURAS.....	IX
LISTA DE TABELAS.....	XI
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade.....	1
1.2. Metilfenidato (Ritalina®).....	4
1.3. Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase.....	8
1.4. Acetilcolinesterase.....	10
1.5. Fator neurotrófico derivado do encéfalo.....	12
1.6. Memória.....	14
1.7. Objetivos.....	17
2. ARTIGOS CIENTÍFICOS.....	19
CAPÍTULO I	19
CAPÍTULO II	27
3. DISCUSSÃO.....	61
4. CONCLUSÕES.....	72
5. PERSPECTIVAS.....	73
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74

RESUMO

O Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade é um transtorno prevalente e debilitante, diagnosticado com base em persistentes níveis de hiperatividade, desatenção e impulsividade. Fármacos estimulantes têm sido eficazes no tratamento desse transtorno, sendo que o metilfenidato é o agente terapêutico mais prescrito. Semelhante às ações celulares e comportamentais dos estimulantes cocaína e anfetamina, o metilfenidato aumenta a liberação e bloqueia a recaptação de dopamina e noradrenalina no cérebro de mamíferos. Milhares de crianças são tratadas com o metilfenidato para o déficit de Atenção/Hiperatividade, mas as consequências neuroquímicas desse tratamento a longo prazo, ainda não estão completamente elucidadas. No presente trabalho nós investigamos os efeitos do metilfenidato sobre alguns parâmetros bioquímicos e comportamentais em ratos. Considerando que os efeitos do metilfenidato sobre o metabolismo do sistema nervoso central são pouco conhecidos e que a Na^+, K^+ -ATPase é essencial para o funcionamento normal do cérebro, inicialmente avaliamos o efeito desse psicoestimulante (1,0, 2,0 e 10,0 mg/kg) sobre a atividade dessa enzima em cérebro de ratos jovens (25 dias de idade) e adultos (60 dias). Resultados mostraram que a administração aguda de metilfenidato aumentou a atividade da Na^+, K^+ -ATPase em hipocampo, córtex pré-frontal e estriado de ratos jovens e adultos. A administração crônica de metilfenidato a ratos jovens também estimulou a Na^+, K^+ -ATPase em hipocampo e córtex pré-frontal, mas não em estriado. Em ratos adultos, o metilfenidato estimulou a Na^+, K^+ -ATPase em todas as estruturas cerebrais estudadas, sugerindo que a ativação dessa enzima pode ser resultado dos efeitos do metilfenidato sobre o desenvolvimento do cérebro e excitabilidade neuronal. Considerando que estudos recentes têm indicado que o metilfenidato pode causar alterações no comportamento de animais, também investigamos o efeito da administração crônica de metilfenidato (2,0 mg/Kg) sobre a memória espacial em ratos jovens (15 dias). O imunoconteúdo do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) e a atividade da acetilcolinesterase (AChE) em hipocampo e córtex pré-frontal de ratos também foram avaliados. Os resultados mostraram que os animais tratados com metilfenidato apresentaram prejuízo na memória espacial na tarefa do labirinto aquático de Morris. Observamos também uma redução no imunoconteúdo de BDNF e aumento na atividade da AChE no córtex pré-frontal, mas não em hipocampo de ratos tratados com metilfenidato. Nossos resultados sugerem que o déficit na memória espacial pode estar relacionado com a diminuição nos níveis de BDNF e aumento da AChE no córtex pré-frontal de ratos jovens submetidos à administração de metilfenidato. Os resultados desse trabalho, em conjunto, mostraram que o metilfenidato causa alterações neuroquímicas e comportamentais em animais, que podem ser prejudiciais ao desenvolvimento do cérebro.

ABSTRACT

Attention-deficit hyperactivity disorder is a prevalent and debilitating disorder diagnosed on the basis in persistent levels of overactivity, inattention and impulsivity. Stimulant medications have been effective for the treatment of this disorder, and the methylphenidate is the most prescribed therapeutic agent. Similar to the cellular and behavioral actions of the stimulants cocaine and amphetamine, the methylphenidate enhances the release and blocks the reuptake of dopamine and norepinephrine in mammalian brain. Thousands of children receive methylphenidate for attention deficit/hyperactivity disorder, yet the long-term neurochemical consequences of treatment are unknown. In the present work we investigate the effects of methylphenidate on some biochemical and behavioral parameters in rats. Considering that methylphenidate effects on central nervous system metabolism are poorly known and that Na^+, K^+ -ATPase is essential to brain normal function, we initially evaluated the effect of this psychostimulant (1.0, 2.0 or 10.0 mg/Kg) on Na^+, K^+ -ATPase activity in the cerebrum of young (25 days old) and adult (60 days old) rats. Our results showed that acute methylphenidate administration increased Na^+, K^+ -ATPase activity in hippocampus, prefrontal cortex, and striatum of young and adult rats. Chronic administration of methylphenidate to young rats also increased Na^+, K^+ -ATPase activity in hippocampus and prefrontal cortex, but not striatum. In adult rats, methylphenidate increased the Na^+, K^+ -ATPase activity in all cerebral structures studied, suggesting that the activation of this enzyme might be the result of the effects of methylphenidate on brain development and neuronal excitability. Considering that recent studies have indicated that methylphenidate causes behavior alterations in animals, also investigated the effect of chronic methylphenidate (2.0 mg/Kg) administration to young rats (15 days old) on spatial memory. Brain-derived neurotrophic factor immunocontent (BDNF) and acetylcholinesterase (AChE) activity in hippocampus and prefrontal cortex were also evaluated. Results showed that methylphenidate-treated rats presented impaired performance on Morris water maze task. We also observed reduction on BDNF immunocontent and increased AChE activity in prefrontal cortex, but not in hippocampus of rats treated with methylphenidate. Our results suggested that the deficit in spatial memory may be related to decreased BDNF immunocontent and increased AChE in prefrontal cortex of young rats subjected to methylphenidate administration. The results of this work, together, showed that the methylphenidate causes neurochemical and behavioral changes in animals, which can be harmful to brain development.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh - acetilcolina

AChE - acetilcolinesterase

ATP - trifosfato de adenosina

BDNF - fator neurotrófico derivado do encéfalo

DSM-IV - Manual de Diagnóstico e Estatística dos Transtornos Mentais, 4ª edição

MAPK - proteína quinase ativada por mitógeno

MFD – metilfenidato

PET - Tomografia por Emissão de Póstron

PI3K - fosfoinositídeo 3-quinase

SNC - sistema nervoso central

TDA - transportador de dopamina

TDAH - Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade

TrkB - receptor de quinase relacionado à tropomiosina

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1. Estrutura química do metilfenidato.....5

Figura 2. Ciclo catalítico da Na^+, K^+ -ATPase.....9

CAPÍTULO I

Figura 1. Efeito da administração aguda de metilfenidato sobre a atividade da Na^+, K^+ -ATPase em hipocampo (A), córtex pré-frontal (B) e estriado (C) de ratos jovens.....22

Figura 2. Efeito da administração aguda de metilfenidato sobre a atividade da Na^+, K^+ -ATPase em hipocampo (A), córtex pré-frontal (B) e estriado (C) de ratos adultos.....23

Figure 3. Efeito da administração crônica de metilfenidato sobre a atividade da Na^+, K^+ -ATPase em hipocampo (A), córtex pré-frontal (B) e estriado (C) de ratos jovens.....23

Figura 4. Efeito da administração crônica de metilfenidato sobre a atividade da Na^+, K^+ -ATPase em hipocampo (A), córtex pré-frontal (B) e estriado (C) de ratos adultos.....24

CAPÍTULO II

- Figura 1.** Efeito da administração crônica de metilfenidato sobre a fase de aquisição da memória espacial em ratos.....54
- Figura 2.** Efeito da administração crônica de metilfenidato sobre os parâmetros avaliados na sessão de teste: latência para cruzar o local da plataforma (a), número de cruzamentos no local da plataforma (b), tempo de permanência no quadrante alvo (c) e no quadrante oposto (d).....55
- Figura 3.** Efeito da administração crônica de metilfenidato sobre a performance dos animais na tarefa do labirinto aquático de Morris para a avaliação da memória de trabalho.....56
- Figura 4.** Efeito da administração crônica de metilfenidato sobre a memória de trabalho em animais.....57
- Figura 5.** Efeito da administração crônica de metilfenidato sobre a concentração do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) em hipocampo (A) e córtex pré-frontal (B) de ratos.....58
- Figura 6.** Efeito da administração crônica de metilfenidato sobre a atividade da acetilcolinesterase (AChE) em hipocampo (A) e córtex pré-frontal (B) de ratos.....59

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1. Efeito da administração crônica de metilfenidato sobre a performance dos animais na tarefa do campo aberto.....	60
--	----

1. INTRODUÇÃO

1.1. Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade

O Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade (TDAH) está entre as doenças psiquiátricas mais comuns na infância e adolescência, afetando aproximadamente 5,29% de indivíduos menores de 18 anos (POLANCZYK et al., 2007). O TDAH é caracterizado por desatenção, hiperatividade e impulsividade, sendo que os sintomas frequentemente persistem na idade adulta. As consequências desse transtorno incluem prejuízo educacional, profissional e risco aumentado de desenvolvimento de outras desordens psiquiátricas (ROHDE et al.,1999; BIEDERMAN, 2003).

O diagnóstico do TDAH é fundamentalmente clínico, pois atualmente não existe nenhum marcador bioquímico para esse transtorno (TRIPP e WICKENS, 2009). O critério classificatório mais utilizado na literatura é fornecido pela quarta edição do DSM-IV, Manual de Diagnóstico e Estatística dos Transtornos Mentais (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 1994). O DSM-IV classifica os sintomas do TDAH em dois grupos: desatenção e hiperatividade/impulsividade. De acordo com esses critérios, são necessários seis ou mais sintomas em pelo menos um dos grupos para caracterizar o TDAH. Além disso, esses sintomas devem, no mínimo, persistir por seis meses e estarem presentes em dois ou mais ambientes distintos (por exemplo: casa e escola), o que pode causar prejuízo acadêmico e social para os indivíduos. Com base

nesses sintomas são reconhecidos três tipos clínicos de TDAH: predominantemente desatento, hiperativo-impulsivo ou combinado quando apresenta, no mínimo, seis sintomas em ambos os grupos.

É importante destacar que para o diagnóstico do TDAH é necessário correlacionar os sintomas com a história de vida da criança, desde que a desatenção, a hiperatividade e a impulsividade, isoladamente, podem ser resultantes de problemas no relacionamento das crianças com os pais e amigos, sistemas educacionais inadequados ou outros transtornos comumente encontrados na infância e adolescência. Além disso, o diagnóstico realizado antes dos sete anos de idade deve ser cauteloso, pois entre quatro e cinco anos um certo grau de hiperatividade em crianças é aceitável, uma vez que o desenvolvimento neuroevolutivo do encéfalo, com a completa mielinização da área pré-frontal, ocorre nessa faixa etária (MICK et al., 2002).

O TDAH apresenta uma elevada prevalência de comorbidades tais como, transtornos disruptivos do comportamento (transtorno de conduta e transtorno de oposição desafiante), depressão, ansiedade, transtornos na aprendizagem e abuso de drogas (BIEDERMAN et al., 1992; GORDON, 1993; BIEDERMAN et al., 1996).

Estudos demonstram que os sintomas do TDAH podem ser originados de disfunções no funcionamento cerebral, porém os mecanismos envolvidos ainda são pouco conhecidos. Entretanto, a influência de fatores genéticos e ambientais é amplamente aceita na literatura (TANNOCK, 1998). Evidências bioquímicas, farmacológicas e neurobiológicas indicam o envolvimento dos sistemas dopaminérgico,

noradrenérgico e serotoninérgico na fisiopatologia desse transtorno (PLISZKA et al., 1996; CASTELLANOS, 1997).

Os genes para o receptor D₄ de dopamina e para o transportador de dopamina (TDA₁) são os mais estudados, principalmente quanto aos polimorfismos. Pacientes com TDAH exibem uma maior concentração de transportadores de dopamina no cérebro em relação aos indivíduos normais (COOK et al., 1995; KRAUSE et al., 2000; FARAONE et al., 2001). Achados também indicam a participação de genes do sistema noradrenérgico na etiologia dessa doença, como os genes da enzima dopamina-β-hidroxilase e do receptor adrenérgico α_{2A} (ROMAN et al., 2003).

Dados na literatura mostram que possíveis agentes ambientais ou lesões no lobo frontal podem estar relacionados de forma indireta com o TDAH. O fumo e o álcool na gestação, o baixo peso ao nascer e a prematuridade estão sendo considerados fatores de risco para o desenvolvimento desse transtorno. Por outro lado, pacientes com lesões no lobo frontal podem apresentar sintomas de esquecimento, distração, impulsividade e desorganização similares aos encontrados no TDAH (FARAONE et al., 2003; THAPAR et al., 2003).

As primeiras teorias bioquímicas propostas para explicar o TDAH foram baseadas nas catecolaminas, visto que regiões relacionadas à sua fisiopatologia são inervadas por neurônios dopaminérgicos e noradrenérgicos. Os circuitos fronto-subcorticais, possivelmente implicados no TDAH, são ricos tanto em dopamina, quanto em noradrenalina (FARAONE e BIEDERMAN, 1998).

O sistema dopaminérgico além de desempenhar funções essenciais para a seleção, iniciação e manutenção das funções motoras também pode regular funções cognitivas (FARAONE e BIEDERMAN, 1998; SWANSON et al., 1998; KUCZENSKI e SEGAL, 2001). Além das evidências da participação da dopamina na fisiopatologia do TDAH, outros neurotransmissores como a noradrenalina e serotonina parecem estar envolvidos nesse transtorno (PLISZKA et al., 1996; GREVET et al., 2007).

O tratamento do TDAH envolve uma abordagem múltipla. O uso de psicoterapia comportamental e/ou fármacos estimulantes do sistema nervoso central (SNC) são as intervenções mais bem documentadas (ABIKOFF e GITTELMAN, 1985). Tendo em vista que a farmacoterapia tem um papel fundamental no manejo dos sintomas desse transtorno, a literatura apresenta os psicoestimulantes como as medicações de primeira escolha para o TDAH (GREENHILL et al., 1999).

1.2. Metilfenidato (Ritalina®)

O metilfenidato (MFD, metil 2-fenil-2-(2-piperidil) acetato – nomenclatura IUPAC) (Figura 1) tem sido amplamente utilizado em crianças para o tratamento do TDAH desde 1960. Além do TDAH, está indicado no tratamento da narcolepsia (GOODMAN e GILMAN, 2003). Estudos têm mostrado que o MFD melhora a função motora e cognitiva de pacientes com doença de Parkinson (AURIEL et al., 2009) e sintomas

de depressão na população geriátrica (FISCH, 1985). Embora ainda controverso, o MFD também tem sido utilizado com sucesso no tratamento da apatia e perda de motivação em pacientes com doença de Alzheimer (TEIXEIRA e CARAMELLI, 2006).

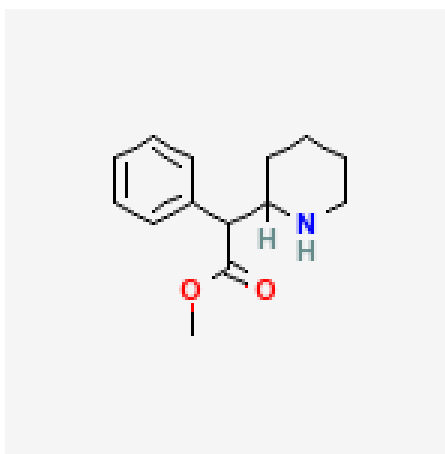


Figura 1 - Estrutura química do metilfenidato

Fonte: www.chemicalregister.com/upload/cr/113-45-1.png

Existe uma considerável quantidade de dados atestando a segurança e eficácia do MFD; entretanto, o seu mecanismo de ação ainda não está completamente elucidado (SOLANTO, 1998; CONNERS, 2002). Estudos mostram que o MFD bloqueia o transportador de dopamina, resultando no aumento da disponibilidade desse neurotransmissor na fenda sináptica, principalmente em estriado e córtex pré-frontal. Embora o MFD tenha uma maior afinidade pelos transportadores de dopamina, ele também atua sobre os sistemas noradrenérgico e serotoninérgico, bloqueando seus transportadores (GATLEY et al., 1996; KUZENSKI e

SEGAL, 1997).

O MFD é uma substância quiral cuja farmacologia específica está situada totalmente no enantiômero D. No cérebro humano, o enantiômero D se liga aos transportadores de dopamina, enquanto o enantiômero L não apresenta essa capacidade de ligação (VOLKOW et al., 2005).

O MFD apresenta ação curta, com uma meia-vida de 2 a 3 horas. A concentração plasmática é aproximadamente 10 ng/ml 2 horas após a ingestão oral (CHAN et al., 1983). Sua absorção é completa e rápida, atravessando a barreira hematoencefálica facilmente, devido a sua lipossolubilidade (AURIEL et al., 2009). Após a absorção, em um período de 48 a 96 horas, o MFD é metabolizado através do sistema microsomal hepático. O principal metabólito urinário é um produto desesterificado, o ácido ritalínico, que apresenta pouca afinidade pelos transportadores de dopamina (GOODMAN e GILMAN, 2003).

No cérebro humano, a farmacocinética do MFD foi investigada através de Tomografia por Emissão de Pósitron (PET) e carbono-11 ($[^{11}\text{C}]$ metilfenidato) (VOLKOW et al., 1995). 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. Por via oral, esse psicoestimulante atinge o pico da concentração cerebral após 60 minutos, bloqueando mais de 50% dos transportadores de dopamina (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 gastrointestinal, permeabilidade da barreira

hematoencefálica e resposta ao tratamento. A dose clínica pode variar de 0,1 a 1,6 mg/Kg/dia, normalmente dividida em 3 a 4 doses (KIMKO et al., 1999; SWANSON et al., 2003). Para a obtenção de melhor resposta terapêutica, a dose deve ser ajustada individualmente (SWANSON et al., 1991). Os efeitos colaterais mais comuns são agitação, diminuição do apetite, euforia, insônia e nervosismo. A intoxicação é caracterizada por um quadro de hiperatividade simpática, incluindo hipertensão, taquicardia e hipertermia (CORDIOLI et al., 2005).

O uso do MFD aumentou significativamente nos últimos anos, entretanto, as consequências da sua utilização ainda são pouco conhecidas. A maioria dos estudos foi conduzida em adultos, mas pouco é conhecido sobre a ação do MFD no cérebro jovem. Estudos mostram que o córtex pré-frontal, núcleo accumbens e amígdala, regiões cerebrais envolvidas em funções cognitivas, motivacionais, atencionais e emocionais, são vulneráveis aos efeitos agudos e crônicos do MFD. Nesse contexto, Moll e cols. (2001) mostraram que a administração de MFD durante o período pós-natal tem efeitos duradouros sobre o desenvolvimento do sistema dopaminérgico em ratos. O MFD também alterou a expressão de genes imediatos c-fos e zif-268 em ratos adolescentes; e essas alterações persistiram durante a vida adulta dos animais (BRANDON e STEINER, 2003; CHASE et al., 2003).

1.3. Na⁺,K⁺-ATPase

A Na⁺,K⁺-ATPase (EC 3.6.3.9) ou bomba de Na⁺ é uma proteína integral de membrana responsável pelo co-transporte de três íons Na⁺ para o meio extracelular e dois íons K⁺ para o meio intracelular, para cada molécula de trifosfato de adenosina (ATP) hidrolisada. Ela consome cerca de 40-60% do ATP cerebral para manter o gradiente eletroquímico necessário à excitabilidade neuronal, regulação do volume celular, balanço osmótico e para o transporte de moléculas ligadas ao co-transporte de Na⁺; como glicose, aminoácidos e neurotransmissores (ERECIŃSKA e SILVER, 1994; KAPLAN, 2002; JORGENSEN et al., 2003).

Quanto à estrutura, a Na⁺,K⁺-ATPase é formada por duas subunidades catalíticas α com dez segmentos transmembrânicos, que contêm os sítios de ligação para Na⁺, K⁺, ATP e glicosídeos cardíacos, duas subunidades β regulatórias glicosiladas, e uma subunidade γ com ação moduladora. Essa enzima apresenta uma distribuição ampla nas células dos mamíferos, sendo encontrada em maior concentração no cérebro (SKOU e ESMANN, 1992; TAGUCHI et al., 2007).

No ciclo catalítico da Na⁺,K⁺-ATPase, a subunidade α é fosforilada e desfosforilada em um resíduo de ácido aspártico para formar um β -aspartil fosfato durante a translocação de íons, estabilizando sua estrutura em duas formas, E₁ e E₂ (Figura 2). A forma E₁ é estabilizada pela ligação de três íons Na⁺. Quando ocorre a fosforilação da enzima há uma perda da afinidade pelos íons Na⁺ e liberação dos mesmos no meio extracelular.

A enzima passa a forma E_2 , com alta afinidade por íons K^+ , ligando assim dois íons, o que provoca sua desfosforilação, seguida pela perda da afinidade pelos íons K^+ , que são liberados no meio intracelular. Finalmente, a enzima liga ATP novamente voltando à forma E_1 , que tem alta afinidade por Na^+ (VASILETS e SCHWARZ, 1993; KAPLAN, 2002; JORGENSEN et al., 2003).

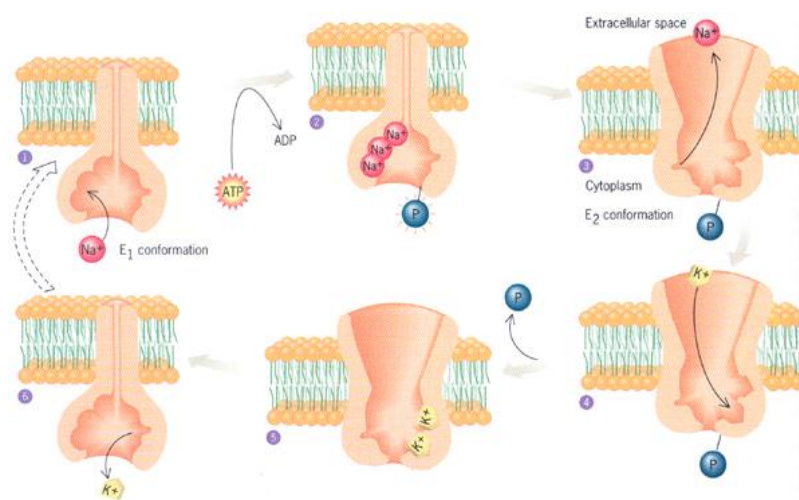


Figura 2. Ciclo catalítico da Na^+,K^+ -ATPase (Adaptado de Devlin, 2003)

Independente da sua função como bomba de íons, a Na^+,K^+ -ATPase é capaz de regular a expressão de seus genes e crescimento celular através da comunicação com o núcleo. Estudos mostram que essa enzima pode funcionar como receptor na transdução de sinal para a ouabaína, hormônios e neurotransmissores (XIE e ASKARI, 2002; TAGUCHI et al., 2007).

Considerando a importância da Na^+,K^+ -ATPase para o funcionamento normal do SNC, a inibição da sua atividade tem sido

associada a diversas neuropatologias, como a isquemia cerebral (WYSE et al., 2000), epilepsia, crises convulsivas e doença de Alzheimer (LEES, 1993; HATTORI et al., 1998). Dados na literatura mostram que essa enzima é inibida por radicais livres, produtos de lipoperoxidação e alterações na fluidez da membrana (DOBROTA et al., 1999; KURELLA et al., 1999; CHAKRABORTY et al., 2003).

A Na^+, K^+ -ATPase tem um papel fundamental na excitabilidade neuronal, bem como na captação e liberação de catecolaminas e serotonina (MATA et al., 1980; HERNÁNDEZ, 1987, 1992). Estudos em animais mostram que drogas psicoativas como a anfetamina (ZUGNO et al., 2009), fluoxetina (ZANATTA et al. 2001), selegilina (CARAGEORGIU et al. 2003), haloperidol, carbamazepina e lítio (WOOD et al. 1989) estimulam a atividade da Na^+, K^+ -ATPase.

1.4. Acetilcolinesterase

O sistema colinérgico é uma das mais importantes vias de modulação do SNC, desempenhando um papel fundamental em várias funções vitais, como aprendizado, memória, motivação, recompensa, fluxo sanguíneo cerebral e processamento sensorial e motor (MESULAM et al., 2002; SOFUOGLU e MOONEY, 2009).

A maioria dos neurotransmissores é removida da fenda sináptica por recaptação. Esse é o caso das sinapses dopaminérgicas, noradrenérgicas, glutamatérgicas, gabaérgicas e serotoninérgicas. Em contraste, a transmissão colinérgica é finalizada pela rápida hidrólise do

neurotransmissor acetilcolina (ACh) mediada pela enzima acetilcolinesterase (AChE) nas sinapses colinérgicas e junção neuromuscular (ZIMMERMAN e SOREQ, 2006).

A AChE (EC 3.1.1.7) é uma serina hidrolase, que pertence à família α/β hidrolase (CYGLER et al., 1993; SOREQ e SEIDMAN, 2001). Esta enzima hidrolisa uma ampla variedade de substratos, mostrando alta especificidade para o neurotransmissor ACh. A clivagem do substrato em produto ocorre através de duas etapas: acilação da enzima, seguida de desacilação envolvendo uma molécula de água. Esse processo acontece no sítio ativo localizado no interior da enzima, denominado tríade catalítica, formado pela serina, histidina e glutamato (SOREQ e SEIDMAN, 2001).

Além do seu papel clássico na transmissão colinérgica, a AChE tem sido associada a ações não colinérgicas como crescimento de neuritos (LAYER et al, 1993), diferenciação pós-sináptica (CHÁCON et al., 2003), hematopoiese, osteogênese (GRISARU et al.,1999), adesão celular (SILMAN e SUSSMAN, 2005) e regulação de funções imunes (KAWASHIMA e FUJI, 2000).

A AChE existe nas formas globular e assimétrica. A forma globular é composta por monômeros (G1), dímeros (G2) ou tetrâmeros (G4) da subunidade catalítica. A forma G4 ligada à membrana é a mais abundante no SNC (DAS et al., 2001). A forma assimétrica é encontrada na junção neuromuscular e consiste de um (A4), dois (A8) ou três (A12) tetrâmeros catalíticos ligados covalentemente a uma subunidade de colágeno Q (ALDUNATE et al., 2004).

A hipofunção colinérgica tem sido associada a prejuízos cognitivos característicos de algumas doenças neurodegenerativas. Nesse contexto, o tratamento com inibidores da AChE aumenta os níveis de ACh, e isso pode melhorar o aprendizado e a memória em pacientes com a doença de Alzheimer (BALLARD et al., 2005). Além do seu envolvimento na aprendizagem e memória, a ACh também desempenha um papel relevante na dependência de drogas (WILLIAMS e ADINOFF, 2008).

1.5. Fator Neurotrófico Derivado do Encéfalo

O fator neurotrófico derivado do encéfalo (do inglês - *brain-derived neurotrophic factor* – BDNF), um membro da família de polipeptídeos que inclui o fator de crescimento neural, neurotrofina-3 e neurotrofina 4/5, é a mais abundante neurotrofina expressa no SNC (THOENEN, 1995; LEWIN e BARDE, 1996). Como outros neuropeptídeos, o BDNF é sintetizado como um pró-peptídeo (pró-BDNF) sendo proteoliticamente transformado na forma madura (mBDNF). O pró-BDNF se liga e ativa o receptor pró-apoptótico p75, enquanto o mBDNF se liga e ativa o receptor de quinase relacionado à tropomiosina (TrkB) (BIBEL e BARDE, 2000).

O BDNF se encontra co-localizado pré e pós-sinápticamente com o receptor TrkB. A ligação ao receptor TrkB leva à dimerização e autofosforilação de resíduos de tirosina no domínio intracelular do receptor e ativação subsequente de precursores de sinalização citoplasmática, incluindo a proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), fosfolipase C e fosfoinosítido 3-quinase (PI3K) (KAPLAN e

MILLER, 2000).

Existe um grande número de estudos indicando o papel do BDNF na modulação da formação, maturação e plasticidade de sinapses glutamatérgicas e gabaérgicas (GOTTMANN et al., 2009). Além disso, o BDNF está envolvido na sobrevivência neuronal, diferenciação fenotípica e manutenção de neurônios dopaminérgicos, colinérgicos e serotoninérgicos (ALDERSON et al., 1990; HYMAN et al., 1991; ALTAR et al., 1994; MARTIN-IVERSON et al., 1994; EATON e WHITTEMORE, 1996).

O BDNF também é essencial na modulação da expressão gênica e cognição (POO, 2001; LU et al., 2005) e está presente em maior quantidade no hipocampo, mas também em córtex, cerebelo e prosencéfalo basal, áreas cerebrais que são vitais para os processos de aprendizado e memória (TIMMUSK et al., 1993; PRUUNSILD et al., 2007).

O BDNF tem sido implicado na fisiopatologia de várias doenças neurodegenerativas e neuropsiquiátricas como doença de Alzheimer (SCHINDOWSKI et al., 2008; TAPIA-ARANCIBIA et al., 2008), Huntington (GAUTHIER et al., 2004), transtorno bipolar, depressão (KAPCZINSKI et al., 2008b; RANTAMÄKI e CASTRÉN, 2008) e TDAH (LANKTREE et al., 2008). O papel central do BDNF no desenvolvimento do sistema dopaminérgico e o envolvimento desse neurotransmissor com o TDAH, sugerem que alterações na expressão do BDNF podem aumentar o risco para o desenvolvimento desse transtorno (TSAI, 2003).

Dados na literatura apontam para a participação dos sistemas

glutamatérgico e gabaérgico, bem como proteínas cinases e mecanismos hormonais nos processos de memória (IZQUIERDO e MEDINA, 1997; CAMMAROTA et al., 2005). Além disso, tem sido proposto o envolvimento da Na^+ , K^+ -ATPase, AChE e BDNF na modulação da cognição (SATO et al., 2004; WYSE et al., 2004; BALLARD et al., 2005; LU et al., 2005).

1.6. Memória

A memória não é estática, isolada ou uma única função cerebral; memória pode ser definida como uma complexa rede de diferentes funções inter-relacionadas trabalhando juntas para gerenciar as informações (PAUL et al., 2009). Suas fases compreendem a aquisição, a consolidação e a evocação de uma grande diversidade de informações (IZQUIERDO, 2002; SQUIRE e KANDEL, 2003). A aquisição é obtida através de experiências; a consolidação compreende a fase em que a informação obtida é processada e a evocação é a recordação, a lembrança daquilo que foi previamente aprendido (SQUIRE, 2004).

De uma maneira geral, a memória pode se classificada em dois grandes grupos: declarativa, referente à informação que é transmitida ou expressa e não-declarativa, representada por informações sobre habilidades motoras ou sensoriais que não podem ser transmitidas oralmente. A memória também pode ser classificada quanto ao tempo de duração, curta ou longa duração (IZQUIERDO, 2002).

A memória espacial é responsável pelo conhecimento, codificação, armazenamento e recuperação de informações sobre o arranjo espacial

dos objetos ou rotas específicas (KESSELS et al., 2001). Ela não pode ser classificada em um dos grupos mencionados anteriormente, pois envolve aspectos da memória declarativa e não-declarativa, bem como de curta e longa duração (MOSCOVITCH et al., 2006). Esse tipo de comportamento pode ser considerado uma expressão de curiosidade natural ou representar uma necessidade de adquirir informações sobre um estímulo ou ambiente novo (THINUS-BLANC, 1996).

A memória espacial pode ser dividida em memória espacial de trabalho ou memória espacial de referência. A memória espacial de trabalho é transitória e precede as memórias de curta e longa duração. No momento em que a informação é recebida ela determina se a mesma é nova ou já consta nos arquivos; e quanta informação será armazenada nos sistemas de curta e longa duração. Ela serve para manter por alguns segundos, no máximo poucos minutos, a informação que está sendo processada no momento. Seu processamento depende da atividade elétrica de neurônios do córtex pré-frontal. A memória espacial de referência exibe uma maior capacidade de armazenamento, duração e resistência aos interferentes do que a memória espacial de trabalho, sendo processada pelo circuito hipocampal e suas conexões (IZQUIERDO, 2002).

Um dos métodos mais utilizados para a avaliação da memória espacial em roedores é o labirinto aquático de Morris. Esse teste comportamental foi desenvolvido por Morris, em 1982, para avaliar o papel dos estímulos visuais como referências proximais e distais para a memória espacial em ratos. Dados na literatura mostram que a memória

espacial depende da ação de neurotransmissores em diversas áreas cerebrais. Lesões no hipocampo, córtex pré-frontal e estriado prejudicam o aprendizado de animais nessa tarefa (D`HOOGE e DE DEYN, 2001).

O uso prolongado de psicoestimulantes como a anfetamina e cocaína têm sido associado à disfunção cognitiva envolvendo aprendizado e memória. Estruturas cerebrais como o hipocampo e córtex pré-frontal, que são essenciais a funções cognitivas, são altamente sensíveis a derivados anfetamínicos (CAMARASA, 2008; SANTUCCI, 2008).

1.7. Objetivos

1.7.1 Objetivo geral

Considerando que: (1) os mecanismos de ação do MFD ainda não estão bem elucidados e (2) a Na^+, K^+ -ATPase, AChE e BDNF são importantes para a função cerebral e estão relacionados aos mecanismos de memória, o objetivo geral do nosso estudo foi investigar o efeito do MFD sobre alguns parâmetros neuroquímicos (Na^+, K^+ -ATPase, AChE e BDNF) e comportamentais em ratos.

Este trabalho será dividido em dois capítulos como segue:

➤ Capítulo I

Objetivos específicos:

- Investigar o efeito da administração aguda de MFD (1, 2 e 10 mg/Kg) sobre a atividade de Na^+, K^+ -ATPase em hipocampo, córtex pré-frontal e estriado de ratos jovens e adultos;
- Verificar o efeito da administração crônica de diferentes doses de MFD sobre a atividade de Na^+, K^+ -ATPase em cérebro de ratos jovens e adultos.

➤ Capítulo II

Objetivos específicos:

- Investigar o efeito da administração crônica de MFD sobre a memória espacial de referência e memória espacial de trabalho em ratos jovens na tarefa do labirinto aquático de Morris;
- Verificar a influência do tratamento crônico com MFD sobre o imunoconteúdo de BDNF em hipocampo e córtex pré-frontal de ratos jovens;
- Avaliar a atividade da AChE em hipocampo e córtex pré-frontal de ratos jovens submetidos à administração crônica de MFD.

2. ARTIGOS CIENTÍFICOS

CAPÍTULO I – ARTIGO 01

Methylphenidate treatment increases Na⁺, K⁺-ATPase activity in the cerebrum of young and adult rats

Emilene B. S. Scherer, Cristiane Matté, Andréa G. K. Ferreira, Karin
M. Gomes, Clarissa M. Comim, Cristiane Mattos, João Quevedo,
Emilio L. Streck and Angela T. S. Wyse

Periódico: Journal of Neural Transmission

Status: Publicado

Methylphenidate treatment increases Na⁺, K⁺-ATPase activity in the cerebrum of young and adult rats

Emilene B. S. Scherer · Cristiane Matté · Andréa G. K. Ferreira ·
Karin M. Gomes · Clarissa M. Comim · Cristiane Mattos ·
João Quevedo · Emilio L. Streck · Angela T. S. Wyse

Received: 28 April 2009 / Accepted: 22 August 2009 / Published online: 12 September 2009
© Springer-Verlag 2009

Abstract Methylphenidate is a central nervous system stimulant used for the treatment of attention-deficit hyperactivity disorder. Na⁺, K⁺-ATPase is a membrane-bound enzyme necessary to maintain neuronal excitability. Considering that methylphenidate effects on central nervous system metabolism are poorly known and that Na⁺, K⁺-ATPase is essential to normal brain function, the purpose of this study was to evaluate the effect of this drug on Na⁺, K⁺-ATPase activity in the cerebrum of young and adult rats. For acute administration, a single injection of methylphenidate (1.0, 2.0, or 10.0 mg/Kg) or saline was given to rats on postnatal day 25 or postnatal day 60, in the young and adult groups, respectively. For chronic administration, methylphenidate (1.0, 2.0, or 10.0 mg/Kg) or saline injections were given to young rats starting at postnatal day 25 once daily for 28 days. In adult rats, the same regimen was performed starting at postnatal day 60. Our results showed that acute methylphenidate administration increased Na⁺,

K⁺-ATPase activity in hippocampus, prefrontal cortex, and striatum of young and adult rats. In young rats, chronic administration of methylphenidate also enhanced Na⁺, K⁺-ATPase activity in hippocampus and prefrontal cortex, but not in striatum. When tested in adult rats, Na⁺, K⁺-ATPase activity was increased in all cerebral structures studied. The present findings suggest that increased Na⁺, K⁺-ATPase activity may be associated with neuronal excitability caused by methylphenidate.

Keywords Methylphenidate · Na⁺, K⁺-ATPase · Hippocampus · Prefrontal cortex · Striatum

Introduction

The psychostimulant methylphenidate (MPH, Ritalin[®]) is used in the treatment of hyperkinetic and other forms of attention-deficit/hyperactivity disorders (Chase et al. 2003; Banaschewski et al. 2006). It has been known that attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) is a neuropsychiatric disease of prevalence heterogeneous that can affect 3–9% of school-aged children and 4% of adults (Heiligenstein et al. 1998; Faraone et al. 2003; Polanczyk et al. 2007). This disorder, commonly diagnosed during childhood, is characterized by inattention, impulsivity, and hyperactivity (Goldman et al. 1998; Miller and Castellanos 1998). The long-term consequences include poor school performance, delinquency, difficulties with peers and family, and other antisocial behavior (Taylor et al. 2004).

Patients with ADHD exhibit dysfunction of dopaminergic and noradrenergic circuits, including prefrontal, subcortical regions (e.g., striatum), and limbic regions (e.g., hippocampus) (Arnsten et al. 1996; Dinn et al. 2001; Castellanos and Tannock 2002; Bush et al. 2005).

E. B. S. Scherer · C. Matté · A. G. K. Ferreira · C. Mattos ·
A. T. S. Wyse (✉)

Laboratório de Neuroproteção e Doenças Metabólicas,
Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro
Barcelos, 2600-Anexo, CEP 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil
e-mail: wyse@ufrgs.br

K. M. Gomes · C. M. Comim · J. Quevedo
Laboratório de Neurociências, Unidade Acadêmica de Ciências
da Saúde, Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde,
Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, SC, Brazil

E. L. Streck
Laboratório de Fisiopatologia Experimental,
Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde,
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde,
Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, SC, Brazil

Biochemical studies have shown that MPH, like amphetamine, enhances the release and blocks the reuptake of noradrenaline and dopamine in mammalian brain (Ferris et al. 1972; Biederman and Faraone 2005; Volkow et al. 2005). The distribution of MPH in brain is heterogeneous, and the maximum concentration occurs in the striatum, cortex, and cerebellum (Volkow et al. 2005). The effects of MPH treatment on central nervous system (CNS) development have been investigated since other psychoactive drugs such as fluoxetine and reboxetine may cause changes in the system of neurotransmitters during brain maturation (Moll et al. 2001; Bock et al. 2005).

Na^+ , K^+ -ATPase (E.C 3.6.1.37), an enzyme concentrated at nerve ending membranes, is responsible for generating and maintaining of ionic gradient necessary for neuronal excitability, consuming about 40–50% of the ATP produced in brain (Erecinska and Silver 1994). This enzyme has been related to various aspects of neural function, where it might modulate directly or indirectly the signaling transmission, neurotransmitter release and uptake, and neurogenesis (Choi 1988; Xie and Askari 2002; Deisseroth et al. 2004). Studies show that Na^+ , K^+ -ATPase activity is altered in various disorders affecting the brain, such as ischemia (Wyse et al. 2000a), neurodegenerative diseases (Hattori et al. 1998), neuropsychiatric disorders (Kurup and Kurup 2002; Goldstein et al. 2006), and animal models of depression and mania (Gamaro et al. 2003; Zugno et al. 2009). The relationship between Na^+ , K^+ -ATPase activity and neurotransmitter release has been demonstrated, suggesting that this enzyme could play a role in the neurotransmission modulation (Hernandez 1992a, b; Yang et al. 2007). Recent studies showed that amphetamine administration increased Na^+ , K^+ -ATPase activity in hippocampus of rats (Zugno et al. 2009).

Therefore, considering that Na^+ , K^+ -ATPase activity is critical for normal brain function, and that little is known about the neurochemical and behavioral consequences of MPH treatment on the developing brain, in the present study we investigated the effect of acute and chronic administration of MPH on Na^+ , K^+ -ATPase activity in hippocampus, prefrontal cortex, and striatum of young and adult rats. We used these cerebral structures because there are data showing that after administration of MPH an increase of this drug in hippocampus, cerebral cortex, and striatum occurs (Volkow et al. 2005).

Materials and methods

Animals

Male young (25 days old, $n = 40$) and adult (60 days old, $n = 40$) Wistar rats were obtained from Central Animal

House of Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, SC, Brazil. They were caged in groups of five with free access to food and water, and were maintained on a 12-h light–dark cycle (lights on at 7:00 am), at a temperature of $23 \pm 1^\circ\text{C}$. This study was performed in accordance with the Brazilian Society for Neuroscience and Behavior (SBNeC) recommendations for animal care and the NIH “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” (NIH publication No. 80-23, revised 1996); with the approval of Ethics Committee from Universidade do Extremo Sul Catarinense.

Acute administration of methylphenidate

A single intraperitoneal (i.p.) injection of MPH (1.0, 2.0, or 10.0 mg/kg of body weight) or saline (0.9% NaCl) was given to rats on postnatal day (PD) 25 ($n = 20$) or PD 60 ($n = 20$) in the young and adult groups, respectively ($n = 5$ per group totaling 8 groups). The doses chosen were based on previous reports suggesting that MPH doses lower than 5.0 mg/kg might better reflect clinical use (Gerasimov et al. 2000), while the dose of 10.0 mg/kg would mimic recreational use (Valvassori et al. 2007). Two hours after the injection, the animals were killed by decapitation without anesthesia, the brain was removed and hippocampus, prefrontal cortex, and striatum were obtained.

Chronic administration of methylphenidate

In young rats, MPH (1.0, 2.0, or 10.0 mg/kg, i.p.) or saline (0.9% NaCl) injections were given starting at PD 25 once a day, for 28 days (last injection at PD 53; $n = 20$). In adult rats, the same regimen was performed starting at PD 60 (last injection at PD 88; $n = 20$) totaling 8 groups ($n = 5$). Two hours after the last injection, the animals were killed by decapitation, the brain was removed and hippocampus, prefrontal cortex, and striatum were obtained (Chase et al. 2003).

Tissue preparation

The hippocampus, prefrontal cortex, and striatum were 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. The homogenates were centrifuged at $1000 \times g$ for 10 min; the supernatants were removed for Na^+ , K^+ -ATPase activity determination.

Na^+ , K^+ -ATPase activity assay

The reaction mixture for Na^+ , K^+ -ATPase assay contained 5.0 mM MgCl_2 , 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 initiated by 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 the addition of 1.0 mM ouabain. Na⁺, K⁺-ATPase activity was calculated by the difference between the two assays according to the method of Wyse et al. (2000b). Released inorganic phosphate (Pi) was measured by the method of Chan et al. (1986). Specific activity of the enzyme was expressed as nmol Pi released per min per mg of protein.

Protein determination

Protein was measured by the method of Bradford (1976) using bovine serum albumin as standard.

Statistical analysis

Data were analyzed by one-way ANOVA followed by the Duncan multiple range test when the *F* test was significant. All analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software in a PC-compatible computer. Values of *P* < 0.05 were considered significant.

Results

We initially investigated the effect of acute MPH administration on Na⁺, K⁺-ATPase activity in cerebrum of rats. Results showed that MPH (2.0 and 10.0 mg/kg) significantly increased Na⁺, K⁺-ATPase in hippocampus (Fig. 1a; *F*(3,12) = 20.59; *P* < 0.001), prefrontal cortex (1.0, 2.0, and 10.0 mg/kg) (Fig. 1b; *F*(3,12) = 25.10; *P* < 0.001), and striatum (2.0 mg/kg) (Fig. 1c; *F*(3,14) = 3.36; *P* < 0.05) of young rats. Figure 2 shows that Na⁺, K⁺-ATPase was significantly increased in hippocampus in all tested doses (Fig. 2a; *F*(3,12) = 13.34; *P* < 0.001), prefrontal cortex in 2.0 and 10.0 mg/kg (Fig. 2b; *F*(3,12) = 8.50; *P* < 0.01), and striatum in all tested doses (Fig. 2c; *F*(3,12) = 8.13; *P* < 0.01) of adult Wistar rats subjected to acute MPH administration.

Next, the effect of chronic MPH administration on Na⁺, K⁺-ATPase activity in cerebrum of rats was evaluated. Figure 3 shows that MPH, at the dose of 2.0 and 10.0 mg/kg, significantly increased Na⁺, K⁺-ATPase in hippocampus (Fig. 3a; *F*(3,14) = 3.93; *P* < 0.05), as well in prefrontal cortex in all tested doses (Fig. 3b; *F*(3,13) = 6.13; *P* < 0.01). Besides, Na⁺, K⁺-ATPase activity was not affected in striatum (Fig. 3c; *F*(3,13) = 0.904; *P* > 0.05) of young rats. Finally, MPH significantly increased Na⁺, K⁺-ATPase in hippocampus (only at 10.0 mg/kg) (Fig. 4a; *F*(3,15) = 15.18; *P* < 0.001), prefrontal cortex (2.0 and 10.0 mg/kg) (Fig. 4b; *F*(3,16) = 11.54; *P* < 0.001), and

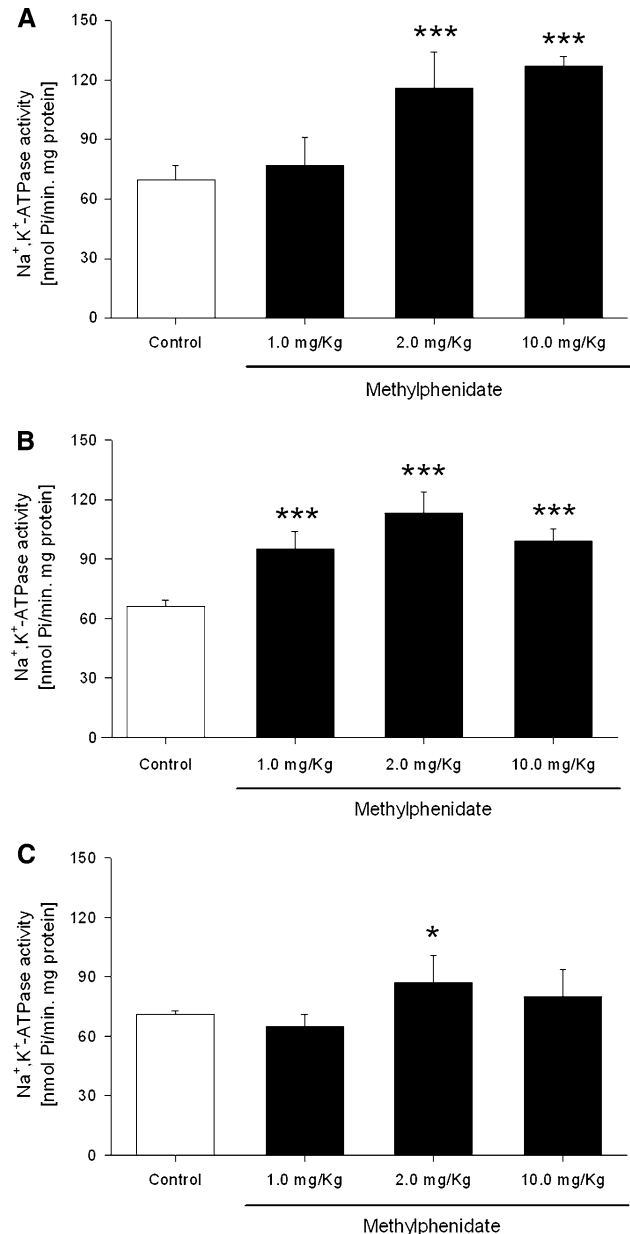


Fig. 1 Effect of acute administration of methylphenidate on Na⁺, K⁺-ATPase activity in hippocampus (a), prefrontal cortex (b), and striatum (c) of young rats. Results are expressed as mean ± SD for four to five independent experiments performed in duplicate. * *P* < 0.05, *** *P* < 0.001 compared to control (Duncan's multiple range test)

striatum, in all tested doses, (Fig. 4c; *F*(3,15) = 14.37; *P* < 0.001) of adult rats treated chronically.

Discussion

In the present study we evaluated the effect of a single or chronic administration of MPH on Na⁺, K⁺-ATPase activity in different cerebral structures from young and

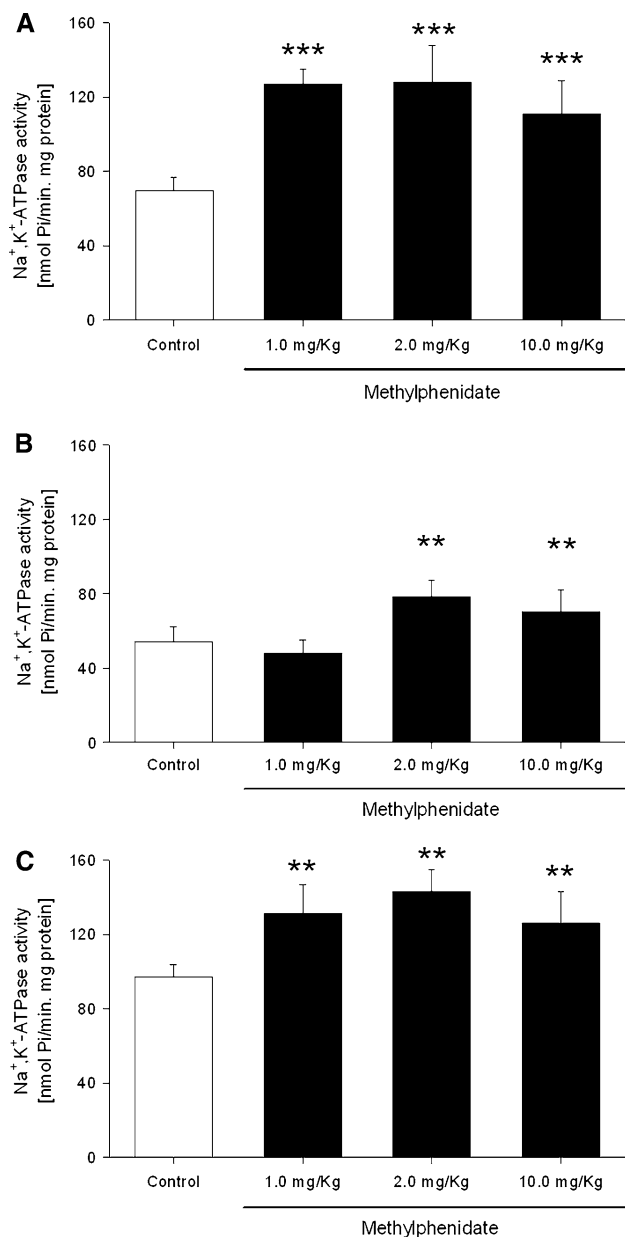


Fig. 2 Effect of acute administration of methylphenidate on Na⁺, K⁺-ATPase activity in hippocampus (a), prefrontal cortex (b), and striatum (c) of adult rats. Results are expressed as mean ± SD for four to five independent experiments performed in duplicate. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared to control (Duncan's multiple range test)

adult rats. Our findings showed that MPH acute administration enhanced Na⁺, K⁺-ATPase activity in hippocampus, prefrontal cortex, and striatum of young and adult rats. Chronic administration of MPH to young rats also increased Na⁺, K⁺-ATPase activity in hippocampus and prefrontal cortex, but not in striatum. In adult rats, MPH enhanced Na⁺, K⁺-ATPase activity in all brain structures evaluated. Differences between young and adult rats' response after MPH treatment have been reported, and

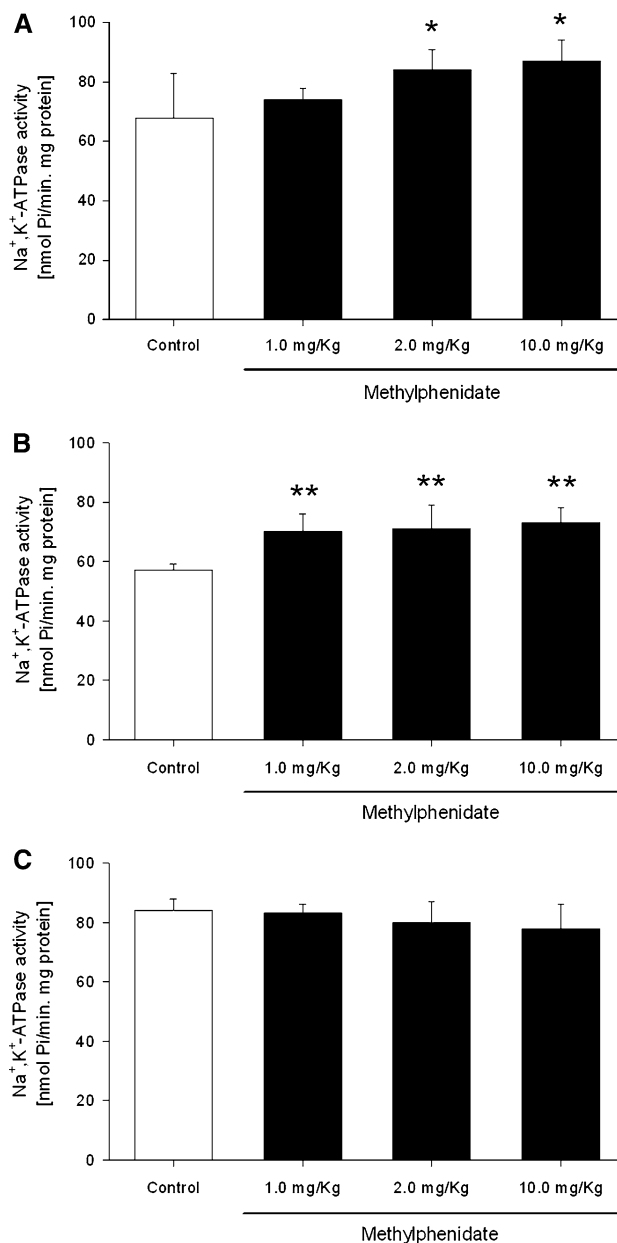


Fig. 3 Effect of chronic administration of methylphenidate on Na⁺, K⁺-ATPase activity in hippocampus (a), prefrontal cortex (b), and striatum (c) of young rats. Results are expressed as mean ± SD for four to five independent experiments performed in duplicate. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared to control (Duncan's multiple range test)

some researchers suggest that these differences depend on the brain area studied, of the dose, as well as of the age of exposure to the drug (Volkow et al. 1998; Yano and Steiner 2005; Chase et al. 2007).

Methylphenidate increases dopamine and noradrenaline in the synaptic cleft (Kuczenski and Segal 1997; Overtom et al. 2003). Although the efficacy of MPH for ADHD is well recognized, clinical and animal studies showed that MPH influences the brain development (Moll et al. 2001;

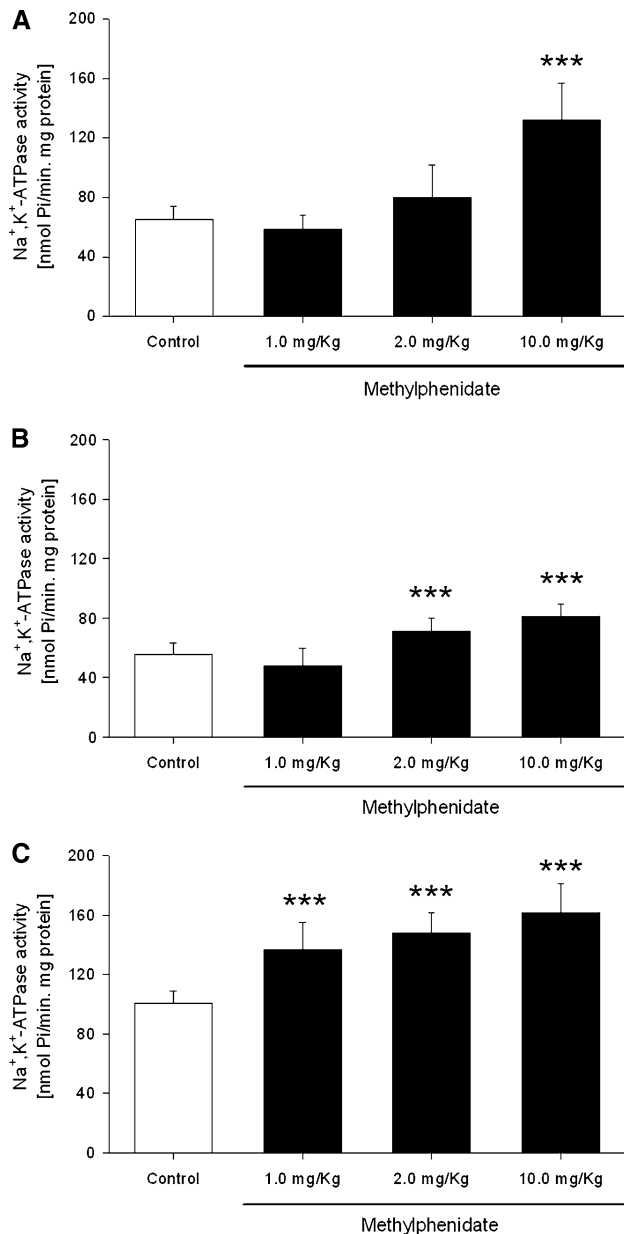


Fig. 4 Effect of chronic administration of methylphenidate on Na⁺, K⁺-ATPase activity in hippocampus (a), prefrontal cortex (b), and striatum (c) of adult rats. Results are expressed as mean \pm SD for four to five independent experiments performed in duplicate. *** $P < 0.001$ compared to control (Duncan's multiple range test)

Shaw et al. 2009). Exposure of the immature brain to drugs such as amphetamine and MPH may alter gene expression and could lead to permanent changes in cellular responsiveness, synaptic connectivity (Robinson and Kolb 2004; Stanwood and Levitt 2004; Andersen 2005), and interfere with normally developing neurotransmitter systems (Moll et al. 2001). Studies showed that the administration of MPH to young rodents produces notable changes in behavior, neurophysiology, and biochemistry in adulthood. These effects may be associated with dopamine receptor

overstimulation (Achat-Mendes et al. 2003; Bolanos et al. 2003; Carlezon et al. 2003; Adriani et al. 2006). In addition, MPH stimulates energy metabolism enzymes in the brain of young and adult rats (Fagundes et al. 2007; Scaini et al. 2008).

Na⁺, K⁺-ATPase is involved in several physiological functions such as regulation of the cell volume, cell differentiation, and maintenance of sodium and potassium equilibrium through biological membranes. Since this enzyme is involved in cellular excitability and cell energy metabolism (Erecinska and Silver 1994), modifications in the modulatory action of Na⁺, K⁺-ATPase can be involved in behavioral sensitization induced by psychostimulants (Munhoz et al. 2003).

For our knowledge, our results provide the first experimental demonstration that MPH stimulates Na⁺, K⁺-ATPase in cerebrum of young and adult rats. Interestingly, it is important to note that other psychoactive drugs such as amphetamine (Zugno et al. 2009), fluoxetine (Zanatta et al. 2001), selegiline (Carageorgiou et al. 2003), haloperidol, carbamazepine, and lithium (Wood et al. 1989) also increase Na⁺, K⁺-ATPase activity in the rat brain.

In summary, in the present study we demonstrated that MPH increased significantly the activity of Na⁺, K⁺-ATPase in cerebrum of young and adult rats. The mechanisms by which MPH administration stimulated Na⁺, K⁺-ATPase were not clear; however, we suggested that the activation of this enzyme might be the result of the effects of methylphenidate on brain development and neuronal excitability since Na⁺, K⁺-ATPase is very important for the normal functioning of CNS. Therefore, further studies are necessary to elucidate the mechanisms involved in the activation of Na⁺, K⁺-ATPase caused by MPH.

Study limitations

The main limitation of the present study is the fact that we did not evaluate methylphenidate effects in an animal model of ADHD, such as spontaneous hypertensive rats. Moreover, we used i.p. administration of methylphenidate, and patients usually take this drug orally.

Acknowledgments This work was supported in part by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq—Brazil).

References

- Achat-Mendes C, Anderson KL, Itzhak Y (2003) Methylphenidate and MDMA adolescent exposure in mice: long-lasting consequences on cocaine-induced reward and psychomotor stimulation in adulthood. *Neuropharmacology* 45:106–115

- Adriani W, Leo D, Greco D, Rea M, di Porzio U, Laviola G, Perrone-Capano C (2006) Methylphenidate administration to adolescent rats determines plastic changes on reward-related behavior and striatal gene expression. *Neuropsychopharmacology* 31:1946–1956
- Andersen SL (2005) Stimulants and the developing brain. *Trends Pharmacol Sci* 26:237–243
- Arnsten AF, Steere JC, Hunt RD (1996) The contribution of alpha 2-noradrenergic mechanisms of prefrontal cortical cognitive function. Potential significance for attention-deficit hyperactivity disorder. *Arch Gen Psychiatry* 53:448–455
- Banaschewski T, Coghill D, Santosh P, Zuddas A, Asherson P, Buitelaar J, Danckaerts M, Döpfner M, Faraone SV, Rothenberger A, Sergeant J, Steinhausen HC, Sonuga-Barke EJ, Taylor E (2006) Long-acting medications for the hyperkinetic disorders: a systematic review and European guideline. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 15:476–498
- Biederman J, Faraone SV (2005) Attention-deficit hyperactivity disorder. *Lancet* 366:237–248
- Bock N, Quentin DJ, Hüther G, Moll GH, Banaschewski T, Rothenberger A (2005) Very early treatment with fluoxetine and reboxetine causing long lasting changes of the serotonin but not the noradrenaline transporter in the frontal cortex of rats. *World J Biol Psychiatry* 6:107–112
- Bolanos CA, Barrot M, Berton O, Wallace-Black D, Nestler EJ (2003) Methylphenidate treatment during pre- and periadolescence alters behavioral responses to emotional stimuli at adulthood. *Biol Psychiatry* 54:1317–1329
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-die-binding. *Anal Biochem* 72:248–254
- Bush G, Valera EM, Seidman LJ (2005) Functional neuroimaging of attention-deficit/hyperactivity disorder: a review and suggested future directions. *Biol Psychiatry* 57:1273–1284
- Carageorgiou H, Zarros A, Tsakiris 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
- Carlezon WA Jr, Mague SD, Andersen SL (2003) Enduring behavioral effects of early exposure to methylphenidate in rats. *Biol Psychiatry* 54:1330–1337
- Castellanos FX, Tannock R (2002) Neuroscience of attention-deficit/hyperactivity disorder: the search for endophenotypes. *Nat Rev Neurosci* 3:617–628
- Chan KM, Delfer D, Junger KD (1986) A direct colorimetric assay for Ca²⁺-stimulated ATPase activity. *Anal Biochem* 157:375–380
- 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
- Chase T, Carrey N, Soo E, Wilkinson M (2007) Methylphenidate regulates activity regulated cytoskeletal associated but not brain-derived neurotrophic factor gene expression in the developing rat striatum. *Neuroscience* 144:969–984
- Choi DW (1988) Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage. *Trends Neurosci* 11:465–469
- Deisseroth K, Singla S, Toda H, Monje M, Palmer TD, Malenka RC (2004) Excitation-neurogenesis coupling in adult neural stem/progenitor cells. *Neuron* 42:535–552
- Dinn WM, Robbins NC, Harris CL (2001) Adult attention-deficit/hyperactivity disorder: neuropsychological correlates and clinical presentation. *Brain Cogn* 46:114–121
- Erecinska M, Silver IA (1994) Ions and energy in mammalian brain. *Prog Neurobiol* 43:37–71
- Fagundes AO, Rezin GT, Zanette F, Grandi E, Assis LC, Dal-Pizzol F, Quevedo J, Streck EL (2007) Chronic administration of methylphenidate activates mitochondrial respiratory chain in brain of young rats. *Int J Devl Neuroscience* 25:47–51
- Faraone SV, Sergeant J, Gillberg C, Biederman J (2003) The worldwide prevalence of ADHD: is it an American condition? *World Psychiatry* 2:104–113
- Ferris RM, Tang FLM, Maxwell RA (1972) A comparison of the capacities of isomers of amphetamine, deoxyipradrol and methylphenidate to inhibit the uptake of tritiated catecholamine into rat cerebral cortex slices, synaptosomal preparations of rat cerebral cortex, hypothalamus and striatum and into adrenergic nerves of rabbit aorta. *J Pharmacol Exp Ther* 181:407–416
- Gamaro GD, Streck EL, Matté 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
- Gerasimov MR, Franceschi M, Volkow ND, Rice O, Schiffer WK, Dewey SL (2000) Synergistic interactions between nicotine and cocaine or methylphenidate depend on the dose of dopamine transporter inhibitor. *Synapse* 38:432–437
- Goldman LS, Genel M, Bezman RJ, Slanetz PJ (1998) Diagnosis and treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder in children and adolescents. *JAMA* 279:1100–1107
- 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
- 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
- Heiligenstein E, Conyers LM, Berns AR, Miller MA (1998) Preliminary normative data on DSM-IV attention deficit hyperactivity disorder in college students. *J Am Coll Health* 46:185–188
- Hernandez JR (1992a) Na⁺, K⁺-ATPase regulation by neurotransmitters. *Neurochem Int* 20:1–10
- Hernandez JR (1992b) Na⁺, K⁺-ATPase regulation by serotonin in normal and kindled rats. *Brain Res* 593:239–244
- Kuczenski R, Segal DS (1997) Effects of methylphenidate on extracellular dopamine, serotonin and norepinephrine: comparison with amphetamine. *J Neurochem* 68:2032–2037
- 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
- Miller KJ, Castellanos FX (1998) Attention deficit/hyperactivity disorders. *Pediatr Rev* 19:373–384
- Moll GH, Hause S, Rütger E, Rothenberger A, Huether G (2001) Early methylphenidate administration to young rats causing a persistent reduction in the density of striatal dopamine transporters. *J Child Adolesc Psychopharmacol* 11:15–24
- Munhoz CD, Glezer I, Kawamoto EM, Araújo AP, Lepscha LB, Planeta CS, DeLucia R, Scavone C (2003) Changes in sodium, potassium-ATPase induced by repeated fencamfamine: the roles of cyclic AMP-dependent protein kinase and the nitric oxide-cyclic GMP pathway. *Neuropharmacology* 45:1151–1159
- Overtoom CC, Verbaten MN, Kemner C, Kenemans JL, van Engeland H, Buitelaar JK, van der Molen MW, van der Gugten J, Westenberg H, Maes RA, Koelega HS (2003) Effects of methylphenidate, desipramine, and L-dopa on attention and inhibition in children with Attention Deficit Hyperactivity Disorder. *Behav Brain Res* 145:7–15
- Polanczyk G, de Lima MS, Horta BL, Biederman J, Rohde LA (2007) The worldwide prevalence of ADHD: a systematic review and meta-regression analysis. *Am J Psychiatry* 164:942–948

- Robinson TE, Kolb B (2004) Structural plasticity associated with exposure to drugs of abuse. *Neuropharmacology* 47(Suppl 1):33–46
- Scaini G, Fagundes AO, Rezin GT, Gomes KM, Zugno AI, Quevedo J, Streck EL (2008) Methylphenidate increases creatine kinase activity in the brain of young and adult rats. *Life Sci* 83:795–780
- Shaw P, Sharp WS, Morrison M, Eckstrand K, Greenstein DK, Clasen LS, Evans AC, Rapoport JL (2009) Psychostimulant treatment and the developing cortex in attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Psychiatry* 166:58–63
- Stanwood GD, Levitt P (2004) Drug exposure early in life: functional repercussions of changing neuropharmacology during sensitive periods of brain development. *Curr Opin Pharmacol* 4:65–71
- Taylor E, Doepfner M, Sergeant J, Asherson P, Banaschewski T, Buitelaar J, Coghill D, Danckaerts M, Rothenberger A, Sonuga-Barke E, Steinhausen HC, Zuddas A (2004) European Clinical Guidelines for Hyperkinetic Disorder—first update. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 13(Suppl 1):7–30
- Valvassori SS, Frey BN, Martins MR, Réus GZ, Schimidtz F, Inácio CG, Kapczinski F, Quevedo J (2007) Sensitization and cross-sensitization after chronic treatment with methylphenidate in adolescent Wistar rats. *Behav Pharmacol* 18:205–212
- Volkow ND, Wang GJ, Fowler JS, Gatley SJ, Logan J, Ding YS, Hitzemann R, Pappas N (1998) Dopamine transporter occupancies in the human brain induced by therapeutic doses of oral methylphenidate. *Am J Psychiatry* 155:1325–1331
- Volkow ND, Wang G, 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
- Wood AJ, Elphick M, Grahame-Smith DG (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
- Wyse AT, Streck EL, Worm P, Wajner M, Ritter F, Netto CA (2000a) Preconditioning prevents the inhibition of Na⁺, K⁺-ATPase activity after brain ischemia. *Neurochem Res* 25:971–975
- Wyse AT, Streck EL, Barros SV, Brusque AM, Zugno AI, Wajner M (2000b) Methylmalonate administration decreases Na⁺, K⁺-ATPase activity in cerebral cortex of rats. *Neuroreport* 11:2331–2334
- Xie Z, Askari A (2002) Na⁺, K⁺-ATPase as a signal transducer. *Eur J Biochem* 269:2434–2439
- Yang ZJ, Torbey M, Li X, Bernardy J, Golden WC, Martin LJ, Koehler RC (2007) Dopamine receptor modulation of hypoxic-ischemic neuronal injury in striatum of newborn piglets. *J Cereb Blood Flow Metab* 27:1339–1351
- Yano M, Steiner H (2005) Methylphenidate (Ritalin) induces Homer 1a and zif 268 expression in specific corticostriatal circuits. *Neuroscience* 132:855–865
- Zanatta LM, Nascimento FC, Barros SV, Silva GR, Zugno AI, Netto CA, Wyse AT (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
- Zugno AI, Valvassori SS, Scherer EBS, Mattos C, Matté 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

CAPÍTULO II – ARTIGO 02**Methylphenidate affects memory, brain-derived neurotrophic factor
immunocontent and brain acetylcholinesterase activity in rat**

Emilene B. S. Scherer, Cristiane Matté, Maira J. da Cunha, Felipe
Schmitz, Carlos A. Netto and Angela T. S. Wyse

Status: A ser submetido

**Methylphenidate affects memory, brain-derived neurotrophic factor
immunocontent and brain acetylcholinesterase activity in rat**

Emilene B. S. Scherer, Cristiane Matté, Maira J. da Cunha, Felipe
Schmitz, Carlos A. Netto, Angela T. S. Wyse

Laboratório 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

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 3308 5573, Fax: 55 51 3308 5535, E-mail:
wyse@ufrgs.br

Abstract

Methylphenidate, a psychostimulant that affects both dopaminergic and noradrenergic systems, is one of the most frequently prescribed treatments for attention-deficit hyperactivity disorder. The present study investigated the effects of chronic administration of methylphenidate to juvenile rats on spatial memory, brain-derived neurotrophic factor immunocontent and acetylcholinesterase activity in hippocampus and prefrontal cortex. Rats received intraperitoneal injections of methylphenidate (2.0 mg/Kg) once a day, from the 15th to the 45th day of age or an equivalent volume of 0.9% saline solution (controls). Twenty-four hours after the last injection, animals were subjected to testing in the Morris water maze. After that, animals were killed and hippocampus and prefrontal cortex were obtained for determination of brain-derived neurotrophic factor immunocontent and acetylcholinesterase activity. Chronic administration of methylphenidate provoked impairment of spatial learning in reference and working memory tasks. A reduction on brain-derived neurotrophic factor immunocontent and an increased acetylcholinesterase activity in prefrontal cortex, but not in hippocampus of rats treated with methylphenidate were also observed. These results suggest that the deficit in spatial memory may be related to decreased brain-derived neurotrophic factor immunocontent and increased acetylcholinesterase in prefrontal cortex of juvenile rats subjected to methylphenidate administration.

Keywords: Methylphenidate; spatial memory; BDNF; acetylcholinesterase.

Introduction

Methylphenidate (MPH, Ritalin[®]) is a psychostimulant commonly used for the treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) and for narcolepsy (Swanson & Volkow, 2002; Thomas, Francescutti-Verbeem, & Kuhn, 2008). ADHD is a complex neurobehavioral disorder affecting school-age children and often persists into adulthood (Chase, Carrey, Soo, & Wilkinson, 2007). It is characterized by varying degrees of inattention, hyperactivity and impulsivity (Biederman & Faraone, 2005; Miller & Castellanos, 1998), with comorbidities such as learning disabilities (Sunohara, Malone, Rovet, Humphries, Roberts, & Taylor, 1999) and mood disorders (Wilens, Biederman, & Spencer, 2002).

MPH blocks both dopamine and noradrenaline transporters, inhibiting the presynaptic reuptake, so increasing the amount of both neurotransmitters in several brain regions including the hippocampus and the prefrontal cortex (Kuczenski & Segal, 2001). These cerebral structures are involved in memory mechanisms (Alonso, Vianna, Depino, Mello e Souza, Pereira, Szapiro, Viola, Pitossi, Izquierdo, & Medina, 2002; Izquierdo, Quillfeldt, Zanatta, Quevedo, Schaeffer, Schmitz, & Medina, 1997) and present their peak of synaptogenesis during childhood and adolescence in humans and rats (Bayer, Altman, Russo, & Zhang, 1993; Klintsova & Greenough, 1999; Rice & Barone, 2000). MPH is safe and effective in treating ADHD symptoms, but the long-term consequences of drug exposure on brain development and behavior remain unknown (Bethancourt, Camarena, & Britton, 2009). Recent investigations have shown that MPH promotes pronounced changes in expression of genes

(Yano & Steiner, 2007), maturation and signalling of the dopaminergic system (Fukui, Svenningsson, Matsuishi, Higashi, Nairn, Greengard, & Nishi, 2003; Moll, Hulse, R  ther, Rothenberger, & Huether, 2001).

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is a member of the family of neurotrophins that modulate different aspects of neuronal function during development and in the mature nervous system (Gottmann, Mittmann, & Lessmann, 2009). This neurotrophin acts through tropomyosin-related kinase B (TrkB) receptors either pre- and postsynaptically to modulate long-term potentiation (LTP), which serves as a molecular model for the synaptic events underlying memory formation (Farmer, Zhao, van Praag, Wodtke, Gage, & Christie, 2004; van Praag, Kempermann, & Gage, 1999). Furthermore, BDNF enhances glutamatergic synaptic transmission (Gottmann et al., 2009) and has been strongly implicated in spatial learning (Hall, Thomas, & Everitt, 2000; Kesslak, So, Choi, Cotman, & Gomez-Pinilla, 1998; Yamada, Mizuno, & Nabeshima, 2002).

Acetylcholinesterase (AChE) hydrolyzes the neurotransmitter acetylcholine (ACh) at the synaptic cleft of cholinergic synapses and neuromuscular junctions (Soreq & Seidman, 2001). In addition to its role in cholinergic transmission, AChE is associated with brain development, learning and memory, and neuronal damage (Ballard, Greig, Guillozet-Bongaarts, Enz, & Darvesh, 2005; Metz & Tracey, 2005; Zimmerman & Soreq, 2006). Several "nonclassical" AChE activities have been described as neurite growth (Layer, Weikert, & Alber, 1993), haematopoiesis, osteogenesis (Grisaru, Sternfeld, Eldor, Glick, & Soreq, 1999), as well as

an action as adhesion protein in synaptic development and maintenance (Silman & Sussman, 2005).

The aim of the present study is to investigate the effects of chronic administration of MPH to juvenile rats on spatial memory, as well as on BDNF immunocontent and AChE activity in hippocampus and prefrontal cortex of rats, cerebral structures known to be involved both in the action of MPH in the brain and in memory mechanisms.

Materials and methods

Animals and reagents

Male Wistar rats (15 days old) were obtained from the Central Animal House of Biochemistry Department, Institute of Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil. They were maintained on a 12:12 h light/dark cycle (lights on 07:00–19:00 h) in air conditioned constant temperature ($22\pm 1^{\circ}\text{C}$) colony room, with free access to water and 20% (w/w) protein commercial chow. Animal care followed the “Principles of Laboratory Animal Care” (NIH publication 85-23, revised 1985) and was approved by the Ethical Committee of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.

Chronic administration of methylphenidate

Rats were treated for 30 days (postnatal day 15-45) with an intraperitoneal (i.p.) injection of saline (0.9% NaCl) or MPH (2.0 mg/kg) once a day, resulting in plasma and brain levels of MPH within the range achieved under clinical conditions in humans (Gerasimov, Franceschi, Volkow, Gifford, Gatley, Marsteller, Molina, & Dewey, 2000; Volkow,

Wang, Fowler, Gatley, Logan, Ding, Hitzemann, & Pappas, 1998). Twenty-four hours after the last injections, animals were subjected to behavioral testing. Twenty-four hours after behavioral testing, animals were killed by decapitation without anesthesia, the brain was removed and hippocampus and prefrontal cortex were obtained for analysis of BDNF immunoccontent and AChE activity determination.

Behavioral testing

On the 45th day of life, animals were subjected to behavioral testing. The Morris water maze, an apparatus widely employed for the study of spatial learning and memory tasks (D'Hooge & De Deyn, 2001; Mc Namara & Skelton, 1993; Netto, Hodges, Sinden, Le Peilet, Kershaw, Sowinski, Meldrum, & Gray, 1993) was used. The behavioral experiments were conducted between 7h and 12h a.m. The water maze consisted of a black round tank, 200 cm in diameter and 100 cm high, filled to a depth of 50 cm with water maintained at constant temperature of 23°C. The tank was theoretically divided into four equal quadrants for the purpose of analysis. Several distal visual cues were placed on the walls of the room. Trials were recorded by a video camera mounted above the center of the tank.

Reference memory task

The task consisted of 7 training and one test sessions. In the acquisition phase, rats had daily sessions of 4 trials per day for 7 days to find the platform, submerged 2 cm under the water surface, placed on the

center of one of the quadrants of the tank during all training days. For each trial, the rat was placed in water facing tank wall, in one of the 4 starting locations (N, S, W and E). The order of starting position varied in every trial and any given sequence was not repeated on acquisition phase days. Rats were allowed to search for the platform during 60 s and, in the case of failure, they were gently guided to it; all animals were allowed to remain on the platform for 10 s. Latency to find the platform was measured in each trial. The interval between trials was of 15–20 min (Netto et al., 1993). One day after the last training trial, each rat was subjected to a probe trial in which the platform was removed. We measured four parameters, namely latency to cross over the location of the platform, the number of target crossings and the time spent in target (the quadrant in which the platform was located in the training sessions) and opposite quadrants. These parameters were taken as a measure for spatial memory (Netto et al., 1993). In order to detect motor impairments that could affect performance in experimental groups, the swimming speed was calculated by taking the distance traveled in the first 15 s of the probe trial.

Working memory task

After 1 week, the working memory version of Morris water maze was performed. The task consisted of 4 consecutive trials per day, with a 20 min inter-trial interval, when the animals were placed in the tank facing the wall and allowed to search for the submerged platform, positioned on the center of one of the quadrants. Platform position changed every

subsequent day during the four testing days. Latencies to find the platform in every first, second, third and fourth trials were calculated considering all testing days so to assess working memory performance (Netto et al., 1993).

Open field task

The task was run in a wooden box measuring 60 cm × 40 cm × 50 cm with a frontal glass wall, whose floor was divided by white lines into 12 equal squares. Animals were placed facing the rear left corner of the arena and observed for 2 min. The number of squares crossed with the four paws from one square to another and rearings were measured as indicative of motor activity (Netto, Dias, & Izquierdo, 1986).

Analysis of BDNF immunoccontent

Mature BDNF protein was assessed using the E-Max ELISA kit (Promega) according to the manufacturer's recommendations. Briefly, hippocampus and prefrontal cortex were individually homogenized in lysis buffer containing: 137 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), Igepal (1%), glycerol (10%), 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), 0.5 mM sodium vanadate, 0.1 mM EDTA, and 0.1 mM EGTA, and centrifuged for 3 min at 14,000 rpm at 4 °C. Supernatant was diluted (1:5 v/v) in sample buffer and incubated on a 96-well flat-bottom plates previously coated with anti-BDNF monoclonal antibody and blocked with Block and Sample buffer. After sample incubation, plates were incubated with polyclonal anti-human antibody for 2 h and horseradish peroxidase for 1 h. Then color

reaction with tetramethylbenzidine was quantified in a plate reader at 450 nm. The standard BDNF curve, ranging from 0 to 500 pg/mL, was performed in each plate.

Acetylcholinesterase assay

For the AChE assay, the hippocampus and prefrontal cortex were homogenized in 10 volumes 0.1 mM potassium phosphate buffer, pH 7.5, and centrifuged for 10min at 1000 x g. The supernatants were used for the enzymatic AChE analyses. AChE activity was determined according to Ellman et al. (1961), with some modifications. Hydrolysis rates were measured at acetylthiocholine concentration of 0.8 mM in 300 μ L assay solution with 30 mM phosphate buffer, pH 7.5, and 1.0 mM DTNB at 25 °C. About 15 μ L of hippocampus and prefrontal cortex supernatant was added to the reaction mixture and preincubated for 3 min. The hydrolysis was monitored by formation of the thiolate dianion of DTNB at 412 nm for 2–3 min (intervals of 30s). All samples were run in triplicate.

Protein determination

Protein was measured by the method of Lowry et al. (1951) using bovine serum albumin as standard.

Statistical analysis

Differences between groups in the Morris Water Maze performance were analyzed by one-way (ANOVA), repeated measures analysis of variance (ANOVA) or Student's T test; data from the probe trial

parameters, open field test, BDNF immunocontent and AChE activity were analyzed by Student's T test. A $p < 0.05$ was considered significant. Descriptive statistics data were expressed as mean \pm SEM or mean \pm SD. All analyses were performed using the Statistical Package for the Social Science (SPSS) software in a PC-compatible computer.

Results

Experiment 1: Effect of MPH on reference memory task in the Morris water maze

Figure 1 shows that chronic MPH administration affects the acquisition phase of reference memory. Repeated measures ANOVA (days versus groups) revealed a significant groups [$F(1,22) = 5.739$; $p < 0.05$] and days effect [$F(6,22) = 46.307$; $p < 0.001$]. Student's T test showed differences in days 2 and 4 between the two groups (both $p < 0.05$). Four parameters were evaluated in the test session, latency to cross over the location of the platform, the number of target crossings and the time spent in the target and opposite quadrants (Fig. 2A–D). The latency to cross over the platform location for the first time was significantly increased by MPH treatment when compared to saline group (A) [$t(22) = 2.822$; $p < 0.05$]. However, MPH administration did not affect the number of crossings over platform location area (B) [$t(22) = 1.669$; $p > 0.05$], time spent in the target quadrant (C) [$t(22) = 1.804$; $p > 0.05$], nor time in the opposite quadrant (D) [$t(22) = 1.580$; $p > 0.05$].

Experiment 2: Effect of MPH on working memory task in the Morris water maze

It was also shown that chronic MPH administration affected working memory in the Morris water maze. One-way ANOVA showed that MPH alters performance of rats on trials 3 [$F(1,22) = 10.702$; $p < 0.01$] and 4 [$F(1,22) = 69.544$; $p < 0.001$] (Fig.3). Figure 4 demonstrates that MPH-treated rats exhibit significant difference between T1-T3 [$t(22) = 2.856$; $p < 0.01$].

Experiment 3: Effect of chronic administration of MPH on open field task

In order to verify whether MPH would affect motor activity, we submitted both groups (with and without MPH treatment) to the open field arena. MPH did not alter the number of crossings [$t(22) = 1.153$; $p > 0.05$] nor of rearings [$t(22) = 0.700$; $p > 0.05$] (Table 1).

Experiment 4: Effect of chronic administration of MPH on BDNF immunocontent

Mature BDNF levels in hippocampus and prefrontal cortex of rats were measured after behavioral testing. Figure 5 shows that BDNF immunocontent was not affected in hippocampus [Fig. 5A; $t(8) = 0.172$; $p > 0.05$] when compared to control group. However, its administration significantly reduced BDNF levels in prefrontal cortex [Fig. 5B; $t(8) = 2.745$; $p < 0.05$] of experimental animals.

Experiment 5: Effect of chronic administration of MPH on AChE activity

Next, the effect of chronic MPH administration on AChE activity in hippocampus and prefrontal cortex were evaluated. In hippocampus, AChE activity was not affected by MPH [Fig. 6A; $t(9) = 1.350$; $p > 0.05$]; however its activity was significantly increased in prefrontal cortex [Fig. 6B; $t(9) = 4.253$; $p < 0.05$] of rats after behavioral testing.

Discussion

Present study demonstrates that chronic exposure to therapeutic dose of MPH (2.0 mg/kg) in juvenile rats significantly impairs learning/memory of a reference spatial task in the Morris water maze. MPH-treated animals also showed a reduced efficiency to find the platform position in the working memory task, suggesting a deficit of spatial navigation (Netto et al., 1993). Open-field task performance and the swim speeds (~34.70 cm/s) were used as a measure for spontaneous motor activity and the results indicate that none of the tested groups present any deficit.

Our results are in agreement with previous studies showing that exposure to MPH during early developmental periods causes behavioral changes in rats (Andersen, Arvanitogiannis, Pliakas, LeBlanc, & Carlezon, 2002) such as depressive-like effects in the forced-swim, reduced habituation to a familiar environment (Carlezon, Mague, & Andersen, 2003), increased anxiety-like behaviors, decreased sensitivity to rewarding stimuli (Bolaños, Barrot, Berton, Wallace-Black, & Nestler, 2003) and promotes transient effects on object recognition memory and contextual fear memory (Bethancourt et al., 2009). MPH administered chronically to

juvenile rats (7-35 days of life) affected brain areas involved in cognition, motivated behaviors, appetite, and stress (Gray, Punsoni, Tabori, Melton, Fanslow, Ward, Zupan, Menzer, Rice, Drake, Romeo, Brake, Torres-Reveron, & Milner, 2007) and induced post-treatment impairment in recognition and spatial memory in adult rats (LeBlanc-Duchin & Taukulis, 2009). Other psychostimulants such as cocaine and methamphetamine, administered early in postnatal development, have resulted in long-term alterations in behavior (Dow-Edwards & Hughes, 1995; Vorhees, Ahrens, Acuff-Smith, Schilling, & Fisher, 1994).

It has been previously reported that MPH treatment increases Na^+, K^+ -ATPase activity in the cerebrum of young and adult rats (Scherer, Matté, Ferreira, Gomes, Comim, Mattos, Quevedo, Streck, & Wyse, 2009) and there is evidence showing that this enzyme might play a relevant role in the molecular mechanisms of learning (Sato, Tanaka, Ohnishi, Teramoto, Irifune, & Nishikawa, 2004; Wyse, Bavaresco, Reis, Zugno, Tagliari, Calcagnotto, & Netto, 2004).

Some neurochemical parameters that could be related to memory impairment were also investigated. Our results show that MPH reduced BDNF immunocontent in prefrontal cortex, but not in the hippocampus of rats. Prefrontal cortex, whose proper functioning depends on maintaining a delicate balance of dopamine and norepinephrine activities, mediates executive abilities functions, such as working memory, attention regulation, behavioral inhibition, planning and organization (Arnsten & Li, 2005; Hastings, Parsey, Oquendo, Arango, & Mann, 2004). The lack of effect of MPH on this parameter in hippocampus is puzzling,

however, we suggest that the prefrontal cortex is more sensitive to drug action, since recent biochemical studies showed that MPH have more potent effects in this structure than in other brain areas (Arnsten, 2009; Drouin, Page, & Waterhouse, 2006; Kuczenski & Segal, 2002). Furthermore, lower levels of cortical BDNF have been associated with impaired working memory in dopamine transporter knockout mice (Li, Arime, Hall, Uhl, Cui, & Sora, 2009).

BDNF is a neurotrophin implicated in almost all aspects of central nervous system (CNS) development, including neuronal survival and proliferation, differentiation and maintenance of dopaminergic, cholinergic and serotonergic neurons (Alderson, Alterman, Barde, & Lindsay, 1990; Altar, Whitehead, Chen, Wortwein, & Madsen, 2003; Eaton & Whitemore, 1996) and synaptic plasticity (Gottmann et al., 2009). Memory acquisition and consolidation are associated with an increase in BDNF levels and the activation of its TrkB receptor, since this neurotrophin is one of the mediators of LTP at glutamatergic synapse in the CNS (Gottmann et al., 2009; Yamada & Nabeshima, 2003).

Moreover, effects of BDNF vary substantially depending on specific experimental conditions, e.g., the exact time point during development, the brain area studied, the location of BDNF release and the pattern of synaptic stimulation (Gottmann et al., 2009). MPH presented little effect on BDNF expression in the striatum of juvenile rats (25-38 days of life) (Chase et al., 2007). Moreover, Banerjee and colleagues (2009) showed that a single injection of MPH (2.0 mg/kg, i.p.) induced a reduction of BDNF mRNA in hippocampal and cortical brain regions of juveniles,

whereas effects in adults rats were significantly lower. It has been shown that the administration of others psychoactive drugs such as haloperidol and risperidone decreased BDNF levels in hippocampus, frontal and occipital cortices of rats (Angelucci, Mathé, & Aloe, 2000).

AChE is one of the most important enzymes in many living organisms, including humans and vertebrates, and is located greater quantity in the nervous system and in muscles, playing very important role in nerve signal transmission (Soreq & Seidman, 2001). The reduction in brain levels of ACh has been associated with cognitive alterations of some dementias. Treatment with AChE inhibitors increases ACh levels, and this can improve learning and memory in patients with Alzheimer's disease (Ballard et al., 2005).

Present reports show also that MPH increased AChE activity in prefrontal cortex, but not in the hippocampus of rats. The stimulation of this enzyme by MPH might decrease ACh levels, what could be associated with the memory impairment observed. In this context, there is evidence that ACh is involved in the behavioral effects of stimulant drugs such as amphetamine, cocaine and MPH. Repeated exposure to amphetamine induced disruption of prefrontal cholinergic activity and attentional performance in an animal model of cognitive symptoms for schizophrenia (Kozak, Martinez, Young, Brown, Bruno, & Sarter, 2007). Tzavara and colleagues (2006) showed that acute administration of MPH (1.0 and 3.0 mg/kg) increased cortical and hippocampal ACh release in rats.

The administration of galantamine, a drug inhibitor of AChE, reversed symptoms such as agitation, excitement and stereotyped behavior induced by amphetamine in monkeys (Andersen, Werge, & Fink-Jensen, 2007). Another study in rats showed that AChE inhibitors block the locomotor sensitization induced by cocaine (Hikida, Kitabatake, Pastan, & Nakanishi, 2003).

In conclusion, our results demonstrate that MPH impairs spatial learning/memory, reduces BDNF immunocontent and increases AChE in prefrontal cortex of rats. Although the mechanism(s) involved are not clearly defined, these findings are consistent with other studies reporting that this psychostimulant causes neurochemical and behavioral alterations in animals. Taken together, these observations are, at least in part, consistent with a hypothesis that impaired working memory may be associated with the decreased prefrontal cortex BDNF levels and increased of AChE activity found in juvenile rats subjected to chronic administration of MPH.

Acknowledgments

This work was supported in part by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq–Brazil), the FINEP Research Grant “Rede Instituto Brasileiro de Neurociência (IBN-Net)–Proc. No 01.06.0842-00”, and “Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT) para Excitotoxicidade e Neuroproteção (INCT/CNPq)”.

References

- Alderson, R. F., Alterman, A. L., Barde, Y. A., & Lindsay, R. M. (1990). Brain-derived neurotrophic factor increases survival and differentiated functions of rat septal cholinergic neurons in culture. *Neuron*, 5, 297-306.
- Alonso, M., Vianna, M. R., Depino, A. M., Mello e Souza, T., Pereira, P., Szapiro, G., Viola, H., Pitossi, F., Izquierdo, I., & Medina, J. H. (2002). BDNF-triggered events in the rat hippocampus are required for both short- and long-term memory formation. *Hippocampus*, 12, 551-560.
- Altar, C. A., Whitehead, R. E., Chen, R., Wörtwein, G., & Madsen, T. M. (2003). Effects of electroconvulsive seizures and antidepressant drugs on brain-derived neurotrophic factor protein in rat brain. *Biological Psychiatry*, 54, 703-709.
- Andersen, M. B., Werge, T., & Fink-Jensen, A. (2007). The acetylcholinesterase inhibitor galantamine inhibits d-amphetamine-induced psychotic-like behavior in Cebus monkeys. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 321, 1179-1182.
- Andersen, S. L., Arvanitogiannis, A., Pliakas, A. M., LeBlanc, C., & Carlezon, W. A. Jr. (2002). Altered responsiveness to cocaine in rats exposed to methylphenidate during development. *Nature Neuroscience*, 5, 13-14.
- Angelucci, F., Mathé, A. A., & Aloe, L. (2000). Brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase receptor TrkB in rat brain are significantly altered after haloperidol and risperidone administration. *Journal of neuroscience research*, 60,783-794.
- Arnsten, A. F. (2009). Toward a new understanding of attention-deficit hyperactivity disorder pathophysiology: an important role for prefrontal cortex dysfunction. *CNS Drugs*. 23, Suppl 1:33-41.
- Arnsten, A. F., & Li, B. M. (2005). Neurobiology of executive functions: catecholamine influences on prefrontal cortical functions. *Biological Psychiatry*, 57,1377-1384.

- Ballard, C. G., Greig, N. H., Guillozet-Bongaarts, A. L., Enz, A., & Darvesh, S. (2005). Cholinesterases: roles in the brain during health and disease. *Current Alzheimer research*, 2, 307-318.
- Banerjee, P. S., Aston, J., Khundakar, A. A., & Zetterström, T. S. (2009). Differential regulation of psychostimulant-induced gene expression of brain derived neurotrophic factor and the immediate-early gene Arc in the juvenile and adult brain. *The European journal of neuroscience*, 29, 465-476.
- Bayer, S. A., Altman, J., Russo, R. J., & Zhang, X. (1993). Timetables of neurogenesis in the human brain based on experimentally induced patterns in the rat. *Neurotoxicology*, 14, 83-144.
- Bethancourt, J. A., Camarena, Z. Z., & Britton, G. B. (2009). Exposure to oral methylphenidate from adolescence through young adulthood produces transient effects on hippocampal-sensitive memory in rats. *Behavioural Brain Research*, 202, 50-57.
- Biederman, J., & Faraone, S. V. (2005). Attention-deficit hyperactivity disorder. *Lancet*, 366, 237-248.
- Bolaños, C. A., Barrot, M., Berton, O., Wallace-Black, D., & Nestler, E. J. (2003). Methylphenidate treatment during pre- and periadolescence alters behavioral responses to emotional stimuli at adulthood. *Biological Psychiatry*, 54, 1317-1329.
- Carlezon, W. A. Jr., Mague, S. D., & Andersen, S. L. (2003). Enduring behavioral effects of early exposure to methylphenidate in rats. *Biological Psychiatry*, 54, 1330-1337.
- Chase, T., Carrey, N., Soo, E., & Wilkinson, M. (2007). Methylphenidate regulates activity regulated cytoskeletal associated but not brain-derived neurotrophic factor gene expression in the developing rat striatum. *Neuroscience*, 144, 969-984.
- D'Hooge, R., & De Deyn, P. P. (2001). Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain research. Brain research reviews*, 36, 60-90.

- Dow-Edwards, D. L., & Hughes, H. E. (1995). Adult reactivity in rats exposed to cocaine during two early postnatal periods. *Neurotoxicology & Teratology*, 17, 553-557.
- 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. *Journal of Neurophysiology*, 96, 622-632.
- Eaton, M. J., & Whittemore, S. R. (1996). Autocrine BDNF secretion enhances the survival and serotonergic differentiation of raphe neuronal precursor cells grafted into the adult rat CNS. *Journal of Neurophysiology*, 140, 105-114.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V. Jr., & Feather-Stone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7, 88-95.
- Farmer, J., Zhao, X., van Praag, H., Wodtke, K., Gage, F. H., & Christie, B. R. (2004). Effects of voluntary exercise on synaptic plasticity and gene expression in the dentate gyrus of adult male Sprague-Dawley rats in vivo. *Neuroscience*, 124, 71-79.
- Fukui, R., Svenningsson, P., Matsuishi, T., Higashi, H., Nairn, A. C., Greengard, P., & Nishi, A. (2003). Effect of methylphenidate on dopamine/DARPP signalling in adult, but not young, mice. *Journal of Neurochemistry*, 87, 1391-1401.
- 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. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 295, 51-57.
- Gottmann, K., Mittmann, T., & Lessmann V. (2009). BDNF signaling in the formation, maturation and plasticity of glutamatergic and GABAergic synapses. *Experimental brain research*, 199, 203-234.

- Gray, J. D., Punsoni, M., Tabori, N. E., Melton, J. T., Fanslow, V., Ward, M. J., Zupan, B., Menzer, D., Rice, J., Drake, C. T., Romeo, R. D., Brake, W. G., Torres-Reveron, A. & Milner, T. A. (2007). Methylphenidate administration to juvenile rats alters brain areas involved in cognition, motivated behaviours, appetite, and stress. *The journal of Neuroscience*, 27, 7196-7207.
- Grisaru, D., Sternfeld, M., Eldor, A., Glick, D., & Soreq, H. (1999). Structural roles of acetylcholinesterase variants in biology and pathology. *European journal of biochemistry*, 264, 672-686.
- Hall, J., Thomas, K. L., & Everitt, B. J. (2000). Rapid and selective induction of BDNF expression in the hippocampus during contextual learning. *Nature Neuroscience*, 3, 533-535.
- Hastings, R. S., Parsey, R. V., Oquendo, M. A., Arango, V., & Mann, J. J. (2004). Volumetric analysis of the prefrontal cortex, amygdala, and hippocampus in major depression. *Neuropsychopharmacology*, 29, 952-959.
- Hikida, T., Kitabatake, Y., Pastan, I., & Nakanishi, S. (2003). Acetylcholine enhancement in the nucleus accumbens prevents addictive behaviors of cocaine and morphine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 6169-6173.
- Izquierdo, I., Quillfeldt, J. A., Zanatta, M. S., Quevedo, J., Schaeffer, E., Schmitz, P. K., & Medina, J. H. (1997). Sequential role of hippocampus and amygdala, entorhinal cortex and parietal cortex in formation and retrieval of memory for inhibitory avoidance in rats. *The European journal of neuroscience*, 9, 786-793.
- Kesslak, J. P., So, V., Choi, J., Cotman, C. W., & Gomez-Pinilla, F. (1998). Learning upregulates brain-derived neurotrophic factor messenger ribonucleic acid: a mechanism to facilitate encoding and circuit maintenance? *Behavioral Neuroscience*, 112, 1012-1019.
- Klntsova, A. Y., & Greenough, W. T. (1999). Synaptic plasticity in cortical systems. *Current opinion in neurobiology*, 9, 203-208.

- Kozak, R., Martinez, V., Young, D., Brown, H., Bruno, J. P., Sarter, M. (2007). Toward a neuro-cognitive animal model of the cognitive symptoms of schizophrenia: disruption of cortical cholinergic neurotransmission following repeated amphetamine exposure in attentional task-performing, but not non-performing, rats. *Neuropsychopharmacology*, 32, 2074-2086.
- Kuczenski, R., & Segal, D. S. (2001). Locomotor effects of acute and repeated threshold doses of amphetamine and methylphenidate: relative roles of dopamine and norepinephrine. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 296, 876-883.
- Kuczenski, R., & Segal, D. S. (2002). Exposure of adolescent rats to oral methylphenidate: Preferential effects on extracellular norepinephrine and absence of sensitization and cross-sensitization to methamphetamine. *The journal of Neuroscience*, 22, 7264-7271.
- Layer, P. G., Weikert, T., & Alber, R. (1993). Cholinesterases regulate neurite growth of chick nerve cells in vitro by means of a non-enzymatic mechanism. *Cell and tissue research*, 273, 219-226.
- LeBlanc-Duchin, D., & Taukulis, H. K. (2009). Chronic oral methylphenidate induces post-treatment impairment in recognition and spatial memory in adult rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, 91, 218-225.
- Li, B., Arime, Y., Hall, F. S., Uhl, G. R., Cui, R., & Sora, I. (IN PRESS). Impaired spatial working memory and decreased frontal cortex BDNF protein level in dopamine transporter knockout mice. *European Journal of Pharmacology*.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The journal of biological chemistry*, 193, 265-267.
- McNamara, R. K., & Skelton, R. W. (1993). The neuropharmacological and neurochemical basis of place learning in the Morris water maze. *Brain research. Brain research reviews*, 18, 33-49.

- Metz, C. N., & Tracey, K. J. (2005). It takes nerve to dampen inflammation. *Nature Immunology*, 6, 756-757.
- Miller, K. J., & Castellanos, F. X. (1998). Attention deficit/hyperactivity disorders. *Pediatrics in review*, 19, 373-384.
- Moll, G. H, Hause, S., R  ther, E., Rothenberger, A., & Huether, G. (2001). Early methylphenidate administration to young rats causing a persistent reduction in the density of striatal dopamine transporters. *Journal of child and adolescent psychopharmacology*, 11, 15-24.
- Netto, C. A., Dias, R. D., & Izquierdo, I. (1986). Differential effect of posttraining naloxone, beta-endorphin, leu-enkephalin and electroconvulsive shock administration upon memory of an open-field habituation and of a water-finding task. *Psychoneuroendocrinology*, 11, 437-446.
- Netto, C. A., Hodges, H., Sinden, J. D., Le Peilet, E., Kershaw, T., Sowinski, P., Meldrum, B. S, & Gray, J. A. (1993). Effects of fetal hippocampal field grafts on ischaemic-induced deficits in spatial navigation in the water maze. *Neuroscience*, 54, 69-92.
- Rice, D., Barone, S. Jr. (2000). Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environmental health perspectives*, 108, 511-533.
- Sato, T., Tanaka, K., Ohnishi, Y., Teramoto, T., Irifune, M., & Nishikawa, T. (2004). Effects of steroid hormones on (Na⁺,K⁺)-ATPase activity inhibition-induced amnesia on the step-through passive avoidance task in gonadectomized mice. *Pharmacological Research*, 49, 151-159.
- Scherer, E. B., Matt  , 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(+), K (+)-ATPase activity in the cerebrum of young and adult rats. *Journal of Neural Transmission*, 116, 1681-1687.

- Silman, I., & Sussman, J. L. (2005). Acetylcholinesterase: 'classical' and 'non-classical' functions and pharmacology. *Current opinion in pharmacology*, 5, 293-302.
- Soreq, H., & Seidman, S. (2001). Acetylcholinesterase – new roles for an old actor. *Nature reviews. Neuroscience*, 2, 294-302.
- Sunohara, G. A., Malone, M. A., Rovet, J., Humphries, T., Roberts, W., & Taylor, M. J. (1999). Effect of methylphenidate on attention in children with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): ERP evidence. *Neuropsychopharmacology*, 21, 218-228.
- Swanson, J. M., & Volkow, N. D. (2002). Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of stimulants: implications for the design of new treatments for ADHD. *Behavioural brain research*, 130, 73-78.
- Thomas, D. M., Francescutti-Verbeem, D. M., & Kuhn, D. M. (2008). The newly synthesized pool of dopamine determines the severity of methamphetamine-induced neurotoxicity. *Journal of neurochemistry*, 105, 605-616.
- Tzavara, E. T., Bymaster, F. P., Overshiner, C. D., Davis, R. J., Perry, K. W., Wolff, M., McKinzie, D. L., Witkin, J. M., & Nomikos, G. G. (2006). Procholinergic and memory enhancing properties of the selective norepinephrine uptake inhibitor atomoxetine. *Molecular psychiatry*, 11, 187-195.
- van Praag, H., Kempermann, G., & Gage, F. H. (1999). Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nature Neuroscience*, 2, 266-270.
- Volkow, N. D., Wang, G. J., Fowler, J. S., Gatley, S. J., Logan, J., Ding, Y. S., Hitzemann, R., & Pappas, N. (1998). Dopamine transporter occupancies in the human brain induced by therapeutic doses of oral methylphenidate. *The American journal of psychiatry*, 155, 1325-1331.

- Vorhees, C. V., Ahrens, K. G., Acuff-Smith, K. D., Schilling, M. A., & Fisher, J. E. (1994). Methamphetamine exposure during early postnatal development in rats: I. Acoustic startle augmentation and spatial learning deficits. *Psychopharmacology*, 114, 392-401.
- Wilens, T. E., Biederman, J., & Spencer, T. J. (2002). Attention deficit/hyperactivity disorder across the lifespan. *Annual review of medicine*, 53, 113-131.
- Wyse, A. T., Bavaresco, C. S., Reis, E. A., Zugno, A. I., Tagliari, B., Calcagnotto, T., & Netto, C. A. (2004). Training in inhibitory avoidance causes a reduction of Na⁺,K⁺-ATPase activity in rat hippocampus. *Physiology & Behavior*, 80, 475-479.
- Yamada, K., Mizuno, M., & Nabeshima, T. (2002). Role for brain-derived neurotrophic factor in learning and memory. *Life Sciences*, 70, 735-744.
- Yamada, K., & Nabeshima, T. (2003). Brain-derived neurotrophic factor/TrkB signaling in memory processes. *Journal of pharmacological sciences*, 91, 267-270.
- Yano, M., & Steiner, H. (2007). Methylphenidate and cocaine: the same effects on gene regulation? *Trends in Pharmacological Sciences*, 28, 588-596.
- Zimmerman, G., & Soreq, H. (2006). Termination and beyond: acetylcholinesterase as a modulator of synaptic transmission. *Cell and tissue research*, 326, 655-669.

Legends to Figures

Figure 1. Effect of chronic methylphenidate administration on spatial memory acquisition phase. Data show latencies to find the platform across blocks of four trials on each day and are expressed as mean \pm SEM for 12 animals in each group. Different from control, * $p < 0.05$ (repeated measures ANOVA). MPH – methylphenidate.

Figure 2. Effect of chronic methylphenidate administration on performance of spatial memory test session parameters namely: time spend to cross the platform (a), number of crossings on the platform (b), time spend in the target quadrant (c) and the time spend in the opposite quadrant (d). Data are expressed as mean \pm SEM for 12 independent animals in each group. Different from control, * $p < 0.05$ (Student's t test). MPH – methylphenidate.

Figure 3. Effect of chronic methylphenidate administration on performance in working memory version of Morris water maze. Data are latencies to find the platform on each trial during the 4 days and are expressed as means \pm SEM for 12 animals in each group. Different from control, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (one-way ANOVA). MPH – methylphenidate.

Figure 4. Effect of chronic methylphenidate administration on performance in working memory. Data are expressed as mean \pm SEM for 12 animals in

each group. Significant difference between T1-T3, **p <0.01 MPH – methylphenidate.

Figure 5. Effect of chronic methylphenidate administration on BDNF concentration in hippocampus (A) and prefrontal cortex (B) of rats. Results are expressed as mean \pm SD for 5 animals in each group. Different from control, *p <0.05 (Student's t test). MPH – methylphenidate.

Figure 6. Effect of chronic methylphenidate administration on acetylcholinesterase (AChE) activity in hippocampus (A) and prefrontal cortex (B) of rats. Data are expressed as mean \pm SD for 5-6 animals in each group. Different from control, *p <0.05 (Student's t test). MPH – methylphenidate.

FIGURA 1

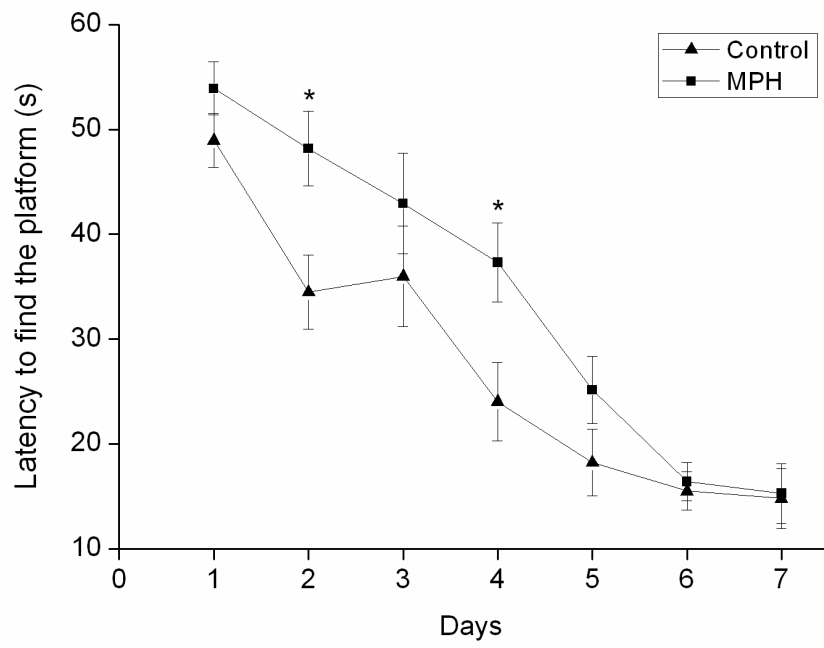


FIGURA 2

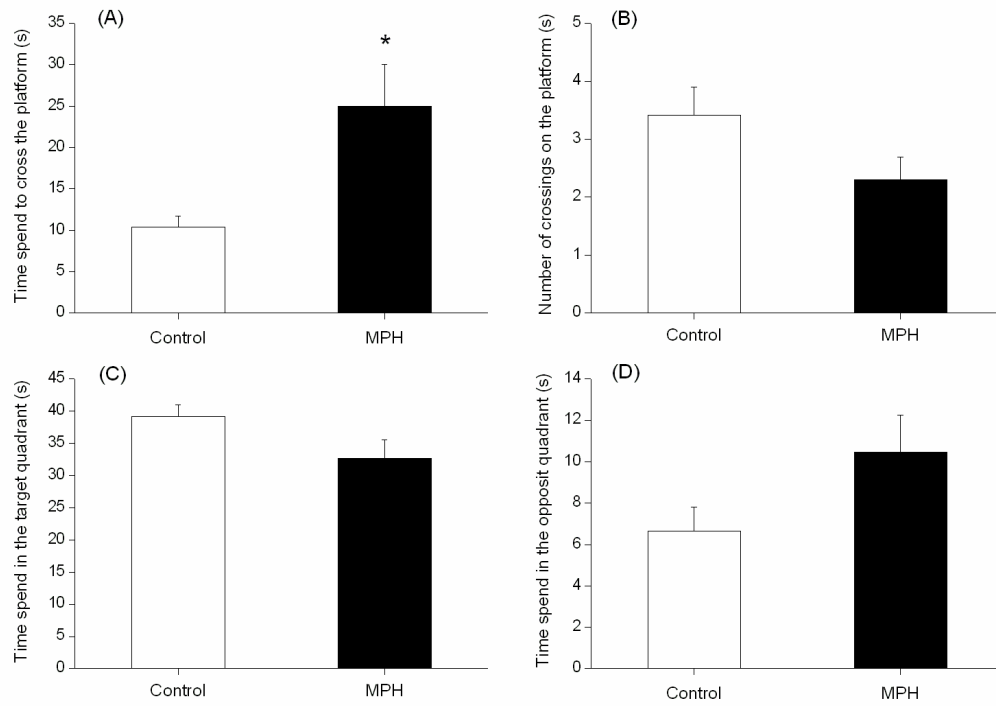


FIGURA 3

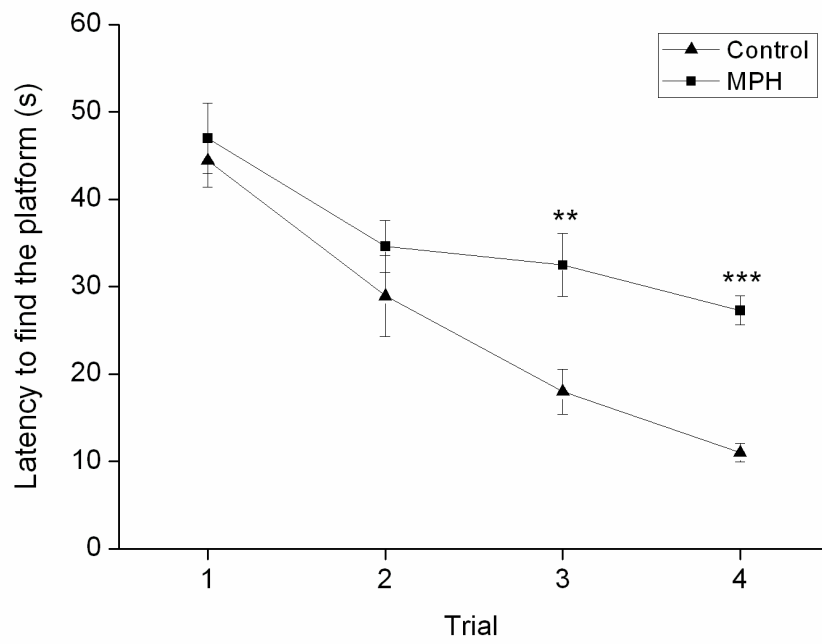


FIGURA 4

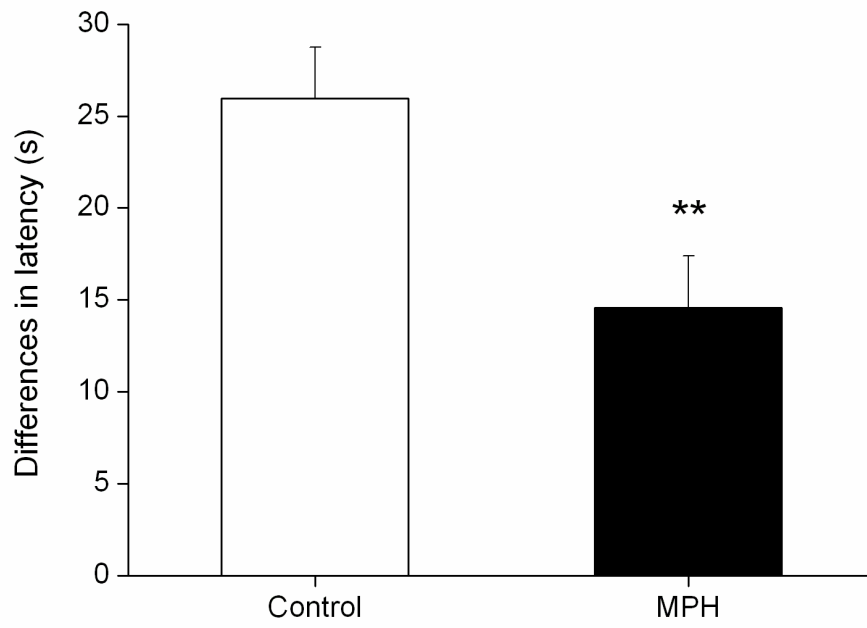


FIGURA 5

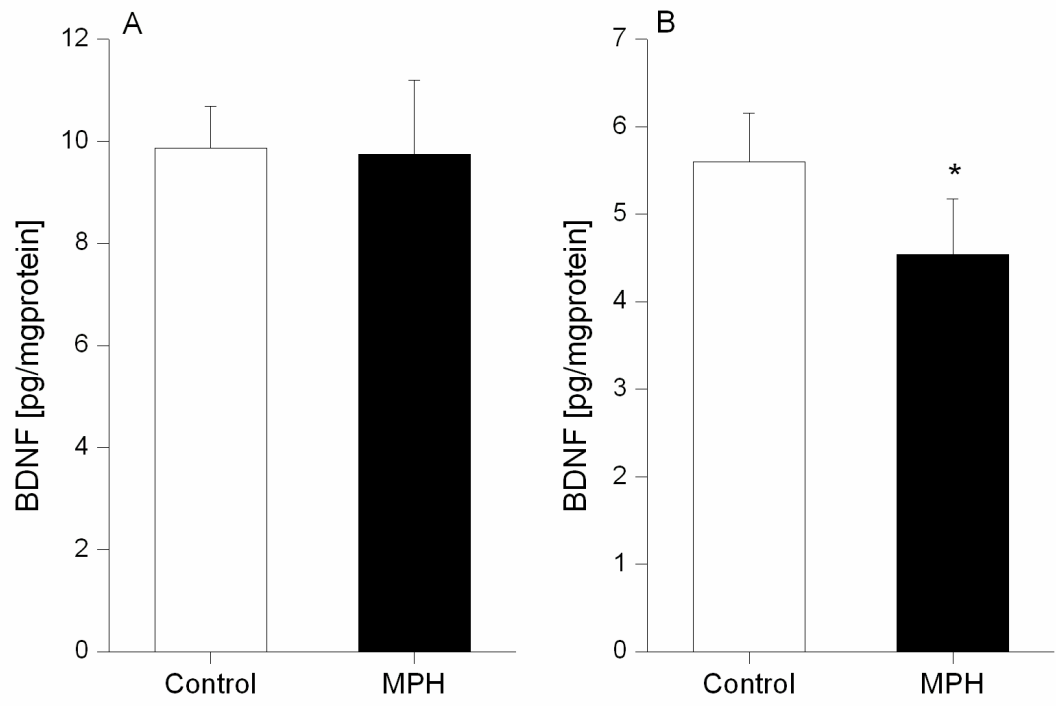


FIGURA 6

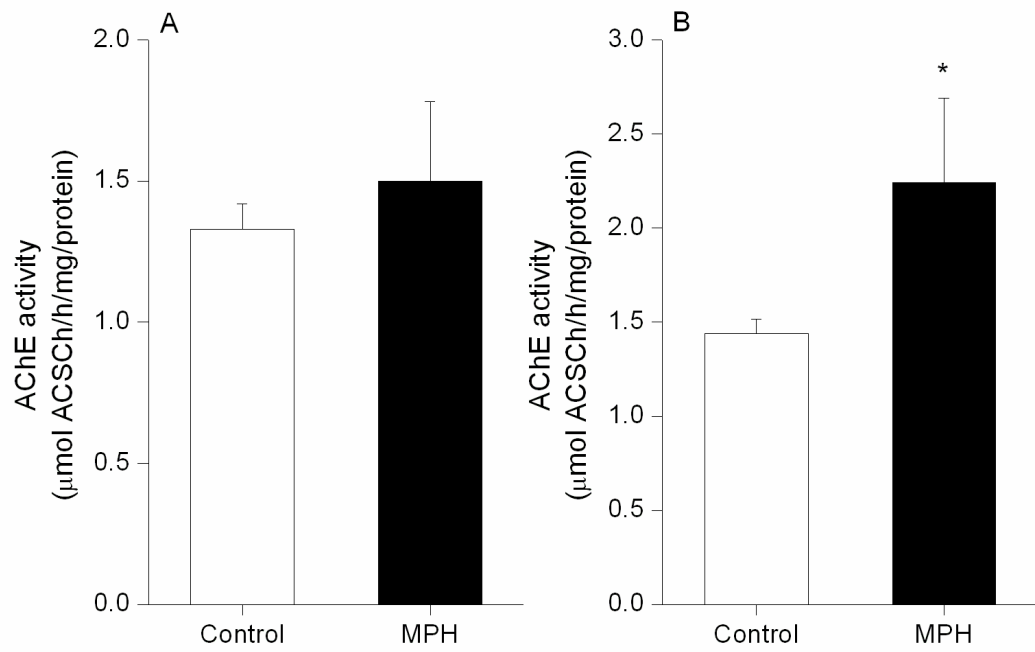


TABELA 1

Effect of chronic methylphenidate administration on performance (number of crossings and rearings) in the open field task.

Groups	Number of crossings	Number of rearings
Control	30.66 ± 2.62	10.83 ± 0.89
Methylphenidate	33.23 ± 4.29	9.92 ± 0.93

Data are expressed as mean ± SEM for 12 animals in each group. There were no significant differences between groups, $p > 0.05$ (Student's T test).

3. DISCUSSÃO

O psicoestimulante MFD tem um perfil neurofarmacológico semelhante à anfetamina e cocaína, sendo um dos mais prescritos tratamentos para o TDAH, um transtorno comportamental associado à disfunção no sistema catecolaminérgico e anormalidades cerebrais (WILENS, 2008).

O MFD diminui o comportamento impulsivo e melhora a atenção em pacientes com TDAH. Estudos sugerem que o MFD atenua os sintomas desse transtorno através do bloqueio dos transportadores de dopamina, inibindo a sua recaptção. Os receptores dopaminérgicos cerebrais são abundantes e se distribuem principalmente no córtex frontal, estriado, sistema límbico e hipotálamo (BERRIDGE e ROBINSON, 1998).

Dados na literatura mostram que o MFD inibe a recaptção de noradrenalina e estimula receptores alfa e beta-adrenérgicos no neurônio pós-sináptico (BENNETT et al., 1999). Evidências também sugerem que o MFD pode atuar sobre o sistema serotoninérgico (GATLEY et al., 1996; KUZENSKI e SEGAL, 1997).

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

funcionamento do SNC.

Recentes estudos mostraram que a exposição do cérebro imaturo ao MFD causa alterações bioquímicas e comportamentais em ratos, como alteração na expressão dos genes imediatos c-fos e fos-B (CHASE et al., 2005), ativação da via de sinalização da proteína cinase A no córtex pré-frontal (PASCOLI et al., 2005) e ansiedade (BOLAÑOS et al., 2003). Além disso, a persistente alteração catecolaminérgica causada pela administração crônica de MFD durante o desenvolvimento pode afetar a sinaptogênese, gliogênese e mielinização (LEVITT et al., 1997; BARONE et al., 2000; RICE e BARONE, 2000).

Considerando que pouco é conhecido sobre as consequências da utilização do MFD durante períodos prolongados, e que a Na^+, K^+ -ATPase é uma enzima fundamental para o funcionamento normal do SNC, no presente estudo, inicialmente investigamos o efeito da administração aguda e crônica de 1, 2 e 10 mg/Kg de MFD sobre a atividade da Na^+, K^+ -ATPase em hipocampo, córtex pré-frontal e estriado de ratos jovens e adultos. As doses escolhidas foram baseadas em dados da literatura, sugerindo que doses inferiores a 5 mg/Kg refletem o uso clínico (GERASIMOV et al., 2000) e a dose de 10 mg/Kg mimetiza o uso recreacional (VALVASSORI et al., 2007).

Nossos resultados mostraram que a administração aguda de MFD estimulou a atividade da Na^+, K^+ -ATPase em hipocampo, córtex pré-frontal e estriado de ratos jovens (25 dias) e adultos (60 dias). A administração crônica de MFD a ratos jovens também aumentou a atividade dessa enzima em hipocampo e córtex pré-frontal e não alterou a atividade da

Na⁺,K⁺-ATPase em estriado. Em ratos adultos, o MFD estimulou a atividade dessa enzima em todas as estruturas cerebrais avaliadas.

Nossos achados estão de acordo com vários estudos mostrando que a resposta ao tratamento com MFD varia de acordo com a área cerebral analisada, a dose e a idade de exposição ao fármaco. Neste contexto, Scaini e cols. (2008) mostraram que a administração aguda de MFD estimulou a atividade da enzima creatina cinase em córtex pré-frontal, hipocampo, estriado e córtex cerebral, mas não em cerebelo de ratos jovens e adultos. Os autores observaram que a administração crônica de MFD estimulou a atividade da enzima em todas as estruturas cerebrais avaliadas; a dose mais elevada (10 mg/Kg) apresentou efeitos mais pronunciados. Outra investigação demonstrou que ratos jovens submetidos à administração aguda de MFD apresentaram aumento na produção de superóxido no cerebelo (1, 2 e 10 mg/Kg) e hipocampo (somente 10 mg/Kg). O tratamento crônico com MFD não causou alteração nesse parâmetro em nenhuma estrutura cerebral analisada. Entretanto, em ratos adultos, a administração aguda desse psicoestimulante não teve efeito sobre a produção de superóxido e o tratamento crônico diminuiu esse parâmetro em cerebelo (GOMES et al., 2009).

A Na⁺,K⁺-ATPase está envolvida em várias funções fisiológicas, como a regulação do volume celular, diferenciação e manutenção do equilíbrio de sódio e potássio através das membranas biológicas. Desde que essa enzima está envolvida na excitabilidade neuronal e no metabolismo energético (ERECIŃSKA e SILVER, 1994), modificações na

sua atividade podem estar envolvidas na sensibilização comportamental induzida por psicoestimulantes (MUNHOZ et al., 2003).

O MFD aumenta a quantidade de dopamina e noradrenalina na fenda sináptica (KUCZENSKI e SEGAL, 1997; OVERTOOM et al., 2003). A dopamina pode regular a função da Na^+, K^+ -ATPase através da ativação de segundos mensageiros que promovem a inserção ou remoção dessa enzima da membrana plasmática (BARNARD et al., 1997; BRISMAR et al., 1998; RIDGE et al., 2002). Sabe-se que o metabolismo cerebral é ativado por elevadas concentrações de K^+ extracelular, que parece ser dependente da atividade da Na^+, K^+ -ATPase para a manutenção dos seus níveis basais (MCDUGAL, 1997; HASSEL e SONNEWALD, 2002). Receptores D_2 de dopamina afetam canais de K^+ e podem levar à estimulação da Na^+, K^+ -ATPase (YAMAGUCHI et al., 1996).

A estimulação da Na^+, K^+ -ATPase pela noradrenalina também tem sido relatada. Segundo Mallick e cols. (2000), a noradrenalina aumentou a atividade da Na^+, K^+ -ATPase em cérebro de ratos através do receptor $\alpha_1\text{A}$, possivelmente por desfosforilação da enzima. Nesse contexto, estudos sugerem que a fenilalanina estimulou a atividade da Na^+, K^+ -ATPase em cérebro de ratos devido à sua conversão em noradrenalina (TSAKIRIS et al., 1998). Em adição, estudos mostram que a administração aguda de desipramina, um inibidor da recaptção de noradrenalina utilizado no tratamento da depressão, aumentou a atividade da Na^+, K^+ -ATPase em hipotálamo e mesencéfalo de ratos (VIOLA e RODRIGUEZ, 2007). Andrews e Lavin (2006) mostraram que o MFD aumentou a excitabilidade no córtex pré-frontal de ratos pela ativação de receptores α_2

noradrenérgicos.

Tem sido demonstrado que o MFD altera o metabolismo energético cerebral. A administração crônica de MFD estimulou a atividade de enzimas da cadeia respiratória no cerebelo, hipocampo, córtex pré-frontal e estriado de ratos, sugerindo um aumento na produção de ATP (FAGUNDES et al., 2007). Propõe-se, então, que esses efeitos no metabolismo energético poderiam estar associados à estimulação da Na^+, K^+ -ATPase demonstrada em nosso estudo, desde que uma parte considerável do ATP cerebral é utilizado para sustentar a atividade desta enzima (ERECIŃSKA e SILVER, 1994).

Em neurociência tem sido reconhecido que as sinapses são modificáveis; as mudanças a curto e a longo prazo podem resultar de fatores intrínsecos e extrínsecos do ambiente. Essa plasticidade sináptica dos neurônios desempenha um papel importante em fenômenos como organização neuronal durante o desenvolvimento, o aprendizado e a formação da memória (ROBINSON e KOLB, 2004).

Anormalidades na plasticidade sináptica podem resultar de lesões cerebrais, influências ambientais negativas e crônica exposição a drogas psicotrópicas (ROBINSON e BERRIDGE, 2003; ROBINSON e KOLB, 2004). A exposição prolongada aos psicoestimulantes durante o desenvolvimento do SNC pode ocasionar mudanças neuronais permanentes, tais como alterações nos sistemas de neurotransmissores (ANDERSEN, 2003; STANWOOD e LEVITT, 2004). Neste contexto, dados na literatura sugerem que a persistente estimulação dos sistemas dopaminérgico e noradrenérgico pode contribuir para o déficit cognitivo

(ARNSTEN e LI, 2005).

Nesse trabalho, também investigamos o efeito da administração crônica de MFD a ratos jovens sobre a memória espacial de referência e a memória espacial de trabalho. Os ratos foram tratados por 30 dias, do 15º ao 45º dia de vida, com 2 mg/Kg de MFD. Ao término do tratamento, os animais foram submetidos à tarefa do labirinto aquático de Morris. Nessa tarefa comportamental, a memória avaliada é dependente principalmente do hipocampo, entretanto, outras estruturas cerebrais como os córtices parietal e pré-frontal também estão envolvidas na formação da memória espacial (D`HOOGE e DE DEYN, 2001).

Os resultados mostraram que a administração crônica de MFD prejudicou a aprendizagem/memória na fase de aquisição do labirinto aquático de Morris e na latência para cruzar, pela primeira vez, o local da plataforma. Os ratos tratados com MFD também apresentaram um prejuízo na memória espacial de trabalho. A tarefa do campo aberto e a velocidade de natação foram utilizadas como controle da atividade motora e os resultados obtidos demonstraram que os animais tratados não apresentavam alterações nesses parâmetros quando comparados aos controles.

Em concordância com nossos resultados, estudos mostram que a exposição ao MFD durante o desenvolvimento causa alterações comportamentais em ratos. A administração de MFD a ratos do 20º ao 35º dia de vida modificou a sensibilidade à cocaína na vida adulta (60 dias), aumentou os efeitos depressivos e reduziu a habituação a um ambiente familiar (CARLEZON et al., 2003). Animais adultos tratados com MFD (2

mg/Kg) na adolescência foram menos sensíveis aos estímulos de recompensa naturais como a sacarose, e apresentaram prejuízo no comportamento sexual. Além disso, esses animais mostraram maior sensibilidade a situações aversivas (BOLAÑOS et al., 2003).

Heyser e cols. (2004) observaram prejuízo na tarefa de reconhecimento de objetos em ratos jovens tratados por sete dias com MFD (5 mg/Kg). Em adição, doses similares de MFD administradas a ratos jovens durante 21 dias causaram prejuízo no mesmo teste comportamental, e esse efeito persistiu até 42 dias após a administração desse psicoestimulante (LeBLANC-DUCHIN e TAUKULIS, 2007).

Um estudo recente mostrou que a exposição ao MFD, desde a adolescência até a idade adulta de ratos, produz efeitos transitórios sobre tarefas comportamentais dependentes do hipocampo. Esses resultados sugerem que os efeitos do MFD sobre os processos cognitivos variam de acordo com o tempo de tratamento, o padrão de administração do fármaco e a complexidade da tarefa utilizada (BETHANCOURT et al., 2009).

Também foram investigados no presente estudo alguns parâmetros neuroquímicos que poderiam estar relacionados ao prejuízo na memória. Após os testes comportamentais foram avaliados o imunoconteúdo de BDNF e a atividade da enzima AChE em hipocampo e córtex pré-frontal de ratos. Essas estruturas cerebrais foram escolhidas porque elas estão envolvidas tanto na ação do MFD no SNC (VOLKOW et al. 2005) quanto nos mecanismos de memória (IZQUIERDO, 2002).

Os resultados mostram que o MFD reduziu o imunoconteúdo de

BDNF e estimulou a atividade da AChE em córtex pré-frontal, mas não em hipocampo de ratos. A ausência do efeito do MFD sobre esses parâmetros no hipocampo é intrigante, entretanto, podemos sugerir que o córtex pré-frontal é mais sensível à ação do fármaco, uma vez que recentes estudos bioquímicos mostraram que o MFD tem efeitos mais potentes no córtex pré-frontal em relação às outras estruturas cerebrais (KUCZENSKI e SEGAL, 2002; DROUIN et al., 2006; ARNSTEN, 2009).

O córtex pré-frontal, cujo funcionamento depende da manutenção de um delicado equilíbrio de dopamina e noradrenalina, medeia habilidades executivas como memória de trabalho, regulação da atenção, inibição comportamental, planejamento e organização (HASTINGS et al., 2004; ARNSTEN e LI, 2005).

Durante o desenvolvimento, a expressão de BDNF é mais abundante no cérebro do que em outros tecidos e aumenta constantemente durante o período pós-natal (HOFER et al., 1990; WETMORE et al., 1990; FRIEDMAN et al., 1991). O BDNF é a neurotrofina que se encontra mais distribuída no encéfalo, principalmente em hipocampo e córtex, sendo indispensável para a consolidação da memória (ALONSO et al., 2002).

Há evidências na literatura sugerindo que a dopamina regula os níveis de BDNF corticais e alguns desses efeitos podem envolver os receptores D₁. A infusão de antagonistas de receptores D₁ no córtex pré-frontal de primatas prejudicou a memória de trabalho (SAWAGUCHI e GOLDMAN-RAKIC, 1991). Além disso, em camundongos “knockout” para o transportador de dopamina, os baixos níveis de BDNF no córtex foram

associados a um prejuízo na memória de trabalho (LI et al., 2009).

Vários estudos têm mostrado que as mudanças na expressão do BDNF podem variar de acordo com diversos fatores tais como: o tipo de droga, dose, via de administração, duração do tratamento (TARDITO et al., 2006), fase do desenvolvimento, área cerebral analisada e padrão de estimulação sináptica (GOTTMAN et al., 2009). Além disso, o estresse oxidativo tem sido associado a baixos níveis de BDNF (KAPCZINSKI et al., 2008a).

A administração aguda e crônica de MFD a ratos jovens (25 dias) não alterou a expressão de BDNF no estriado ou córtex (CHASE et al., 2007). Entretanto, Banerjee e cols. (2009) mostraram que uma única dose de MFD (2 mg/Kg) administrada a ratos jovens reduziu a expressão do mRNA do BDNF no hipocampo e córtex. Em ratos adultos, os efeitos foram significativamente mais baixos quando comparados aos animais jovens.

O sistema colinérgico desempenha um papel fundamental nos mecanismos de memória. A enzima AChE contribui para a manutenção da integridade desse sistema através da finalização da ação sináptica do neurotransmissor ACh (ZIMMERMAN e SOREQ, 2006).

A redução nos níveis de ACh cerebral tem sido associada a alterações cognitivas características de algumas demências. Nesse contexto, inibidores reversíveis da AChE têm sido utilizados para melhorar o déficit cognitivo apresentado por pacientes com doença de Alzheimer e outras desordens neurodegenerativas (BALLARD et al., 2005).

Estudos demonstram que o sistema colinérgico está envolvido na

formação da memória espacial. Um grande aumento na ACh cortical foi detectado em ratos durante a execução de tarefas que envolvem a atividade exploratória espontânea e memória de trabalho (GIOVANNINI et al., 1998).

O reconhecimento de objetos parece ser dependente dos níveis de ACh, desde que estudos em animais mostraram que esse comportamento foi prejudicado pela hipofunção colinérgica induzida por fármacos (ENNACEUR e MELIANI, 1992), lesões no sistema colinérgico cortical e idade (BARTOLINI et al., 1996).

Nesse estudo também demonstramos que a administração crônica de MFD aumentou significativamente a atividade da AChE em córtex pré-frontal de ratos. Sugere-se, então que a estimulação dessa enzima diminui os níveis de ACh e isto poderia estar relacionado, pelo menos em parte, com o déficit cognitivo observado nos ratos tratados com MFD.

Nossos achados corroboram com dados da literatura, sugerindo que o sistema colinérgico pode ser modulado por psicoestimulantes. A repetida exposição à anfetamina induziu detrimento na atividade colinérgica pré-frontal em modelo animal de esquizofrenia (KOZAK et al., 2007). Outro estudo mostra que a administração aguda de 1 e 3 mg/Kg de MFD aumentou a liberação de ACh no hipocampo e córtex de ratos (TZAVARA et al., 2006).

A administração de galantamina, fármaco inibidor da AChE, reverteu sintomas como agitação, excitação e comportamento estereotipado induzidos pela anfetamina em macacos (ANDERSEN et al., 2007). Outro estudo conduzido em ratos mostrou que os inibidores da

AChE bloqueiam a sensibilização locomotora induzida pelo consumo de cocaína (HIKIDA et al., 2003).

Apesar dos processos de aprendizagem e memória envolverem múltiplos mecanismos e os efeitos exercidos pelo MFD sobre a cognição não estarem completamente elucidados, sugerimos que o déficit na memória espacial observado nesse estudo pode estar associado, pelo menos em parte, com a redução nos níveis de BDNF e a estimulação da AChE no córtex pré-frontal de ratos jovens.

Em suma, os resultados obtidos nesse estudo demonstraram que o MFD estimulou a atividade das enzimas Na^+, K^+ -ATPase e AChE, prejudicou a memória espacial e diminuiu os níveis de BDNF em ratos. Esses achados corroboram com pesquisas mostrando que a administração de MFD a animais promove alterações cerebrais que são importantes para a maturação e o desenvolvimento do SNC.

4. CONCLUSÕES

1. A administração aguda de MFD aumentou significativamente a atividade da Na^+, K^+ -ATPase em hipocampo, córtex pré-frontal e estriado de ratos jovens e adultos.
2. O tratamento crônico com MFD estimulou a atividade da Na^+, K^+ -ATPase em hipocampo, córtex pré-frontal e estriado de ratos adultos. Por outro lado, em ratos jovens, a atividade da enzima foi aumentada somente em hipocampo e córtex pré-frontal.
3. A administração crônica de MFD a ratos jovens estimulou a atividade da enzima AChE em córtex pré-frontal.
4. Ratos jovens tratados cronicamente com MFD apresentaram redução no imunoconteúdo de BDNF no córtex pré-frontal.
5. A administração crônica de MFD a ratos jovens prejudicou as memórias espaciais de referência e de trabalho.

Sabe-se que o MFD é amplamente utilizado para o tratamento do TDAH durante a infância e adolescência, mas os possíveis efeitos desse tratamento no desenvolvimento cerebral ainda não foram extensamente investigados. Para esclarecer estas questões, a utilização de estudos em animais tem se mostrado um excelente método. Portanto, os resultados do presente trabalho em conjunto, mostrando que o MFD causa alterações neuroquímicas e comportamentais em animais, podem ser úteis, pelo menos em parte, para o esclarecimento de possíveis efeitos desse psicoestimulante sobre o desenvolvimento cerebral.

5. PERSPECTIVAS

1. Avaliar a memória na tarefa aversiva de esquiva inibitória em ratos jovens após o tratamento crônico com MFD.
2. Estudar o efeito do MFD sobre a ansiedade através das tarefas de labirinto em cruz elevado (plus maze) e caixa claro-escuro em ratos jovens.
3. Avaliar alguns parâmetros de estresse oxidativo e excitotoxicidade em animais submetidos ao tratamento crônico com MFD.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIKOFF, H., GITTELMAN, R. (1985). Hyperactive children treated with stimulants. Is cognitive training a useful adjunct? *Arch Gen Psychiatry* 42: 953-961.
- ACCARDO, P., BLONDIS, T.A. (2001). What's all the fuss about Ritalin? *J Pediatr.* 138: 6-9.
- ALDERSON, R.F., ALTERMAN, A.L., BARDE, Y.A., LINDSAY, R.M. (1990). Brain-derived neurotrophic factor increases survival and differentiated functions of rat septal cholinergic neurons in culture. *Neuron* 5: 297-306.
- ALDUNATE, R., CASAR, J.C., BRANDAN, E., INESTROSA, N.C. (2004). Structural and functional organization of synaptic acetylcholinesterase. *Brain Res Brain Res Rev.* 47: 96-104.
- ALONSO, M., VIANNA, M.R., DEPINO, A.M., MELLO E SOUZA, T., PEREIRA, P., SZAPIRO, G., VIOLA, H., PITOSI, F., IZQUIERDO, I., MEDINA, J.H. (2002). BDNF-triggered events in the rat hippocampus are required for both short- and long-term memory formation. *Hippocampus* 12: 551-560.
- ALTAR, C.A., BOYLAN, C.B., FRITSCHKE, M., JACKSON, C., HYMAN, C., LINDSAY, R.M. (1994). The neurotrophins NT-4/5 and BDNF augment serotonin, dopamine, and GABAergic systems during behaviorally effective infusions to the substantia nigra. *Exp Neurol.* 130: 31-40.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION (1994). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th Ed. (DSM-IV)*. American Psychiatric Press, Washington, DC.
- ANDERSEN, M.B., WERGE, T., FINK-JENSEN, A. (2007). The acetylcholinesterase inhibitor galantamine inhibits d-amphetamine-induced psychotic-like behavior in Cebus monkeys. *J Pharmacol Exp Ther.* 321: 1179-1182.

- ANDERSEN, S.L. (2003). Trajectories of brain development: point of vulnerability or window of opportunity? *Neurosci Biobehav Rev.* 27: 3-18.
- ANDREWS, G.D., LAVIN, A. (2006). Methylphenidate increases cortical excitability via activation of alpha-2 noradrenergic receptors. *Neuropsychopharmacology* 31: 594-601.
- ARNSTEN, A.F., LI, B.M. (2005). Neurobiology of executive functions: catecholamine influences on prefrontal cortical functions. *Biol Psychiatry* 57: 1377-1384.
- ARNSTEN, A.F. (2009). Toward a new understanding of attention-deficit hyperactivity disorder pathophysiology: an important role for prefrontal cortex dysfunction. *CNS Drugs* 23(Suppl 1): 33-41.
- AURIEL, E., HAUSDORFF, J.M., GILADI, N. (2009). Methylphenidate for the treatment of Parkinson disease and other neurological disorders. *Clin Neuropharmacol.* 32: 75-81.
- BALLARD, C.G., GREIG, N.H., GUILLOZET-BONGAARTS, A.L., ENZ, A., DARVESH, S. (2005). Cholinesterases: roles in the brain during health and disease. *Curr Alzheimer Res.* 2: 307-318.
- BANERJEE, P.S., ASTON, J., KHUNDAKAR, A.A., ZETTERSTRÖM, T.S. (2009). Differential regulation of psychostimulant-induced gene expression of brain derived neurotrophic factor and the immediate-early gene Arc in the juvenile and adult brain. *Eur J Neurosci.* 29: 465-476.
- BARNARD, M.L., OLIVERA, W.G., RUTSCHMAN, D.M., BERTORELLO, A.M., KATZ, A.I., SZNAJDER, J.I. (1997). Dopamine stimulates sodium transport and liquid clearance in rat lung epithelium. *Am J Respir Crit Care Med.* 156: 709-714.
- BARONE, S.Jr., DAS, K.P., LASSITER, T.L., WHITE, L.D. (2000). Vulnerable processes of nervous system development: a review of markers and methods. *Neurotoxicology* 21: 15-36.

- BARTOLINI, L., CASAMENTI, F., PEPEU, G. (1996). Aniracetam restores object recognition impaired by age, scopolamine and nucleus basalis lesions. *Pharmacol Biochem Behav.* 53: 277-283.
- BENNETT, F.C., BROWN, R.T., CRAVER, J., ANDERSON, D. (1999). Stimulant medication for the child with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Pediatr Clin North Am.* 46: 929-944.
- BERRIDGE, K.C., ROBINSON, T.E. (1998). What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience? *Brain Res Brain Res Rev.* 28: 309-369.
- BETHANCOURT, J.A., CAMARENA, Z.Z., BRITTON, G.B. (2009). Exposure to oral methylphenidate from adolescence through young adulthood produces transient effects on hippocampal-sensitive memory in rats. *Behav Brain Res.* 202: 50-57.
- BIBEL, M., BARDE, Y.A. (2000). Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Genes Dev.* 14: 2919-2937.
- BIEDERMAN, J., FARAONE, S.V., KENAN, K., BENJAMIN, J., KRIFCHER, B., MOORE, C., SPRINCHT-BUCKMINSTER, S., UGAGLIA, K., JELLINEK, M.S., STEINGARD, R., SPENCER, T., NORMAN, D., KOLODNY, R., KRAUS, I., PERRIN, J., KELLER, M.B., TSUAG, M.T. (1992). Further evidence for family-genetic risk factors in ADHD: patterns of comorbidity in probands and relatives psychiatrically and pediatrically referred samples. *Arch Gen Psychiatry* 49: 728-738.
- BIEDERMAN, J., FARAONE, S.V., MICK, E., MOORE, P., LELON, E. (1996). Child behavior checklist findings further support comorbidity between ADHD and major depression in a referred sample. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 35: 734-742.
- BIEDERMAN, J. (2003). Pharmacotherapy for Attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) decreases the risk for substance abuse: findings from a longitudinal follow-up of youths with and without ADHD. *J Clin Psychiatry* 64(Suppl 11): 3-8.

- BOLAÑOS, C.A., BARROT, M., BERTON, O., WALLACE-BLACK, D., NESTLER, E.J. (2003). Methylphenidate treatment during pre- and periadolescence alters behavioral responses to emotional stimuli at adulthood. *Biol Psychiatry* 54: 1317-1329.
- BRANDON, C.L., STEINER, H. (2003). Repeated methylphenidate treatment in adolescent rats alters gene regulation in the striatum. *Eur J Neurosci.* 18: 1584-1592.
- BRISMAR, H., ASGHAR, M., CAREY, R.M., GREENGARD, P., APERIA, A. (1998). Dopamine-induced recruitment of dopamine D1 receptors to the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 95: 5573-5578.
- CAMARASA, J., MARIMÓN, J.M., RODRIGO, T., ESCUBEDO, E., PUBILL, D. (2008). Memantine prevents the cognitive impairment induced by 3,4 methylenedioxymethamphetamine in rats. *Eur J Pharmacol.* 589: 132-139.
- CAMMAROTA, M., BEVILAQUA, L.R., ROSSATO, J.I., RAMIREZ, M., MEDINA, J.H., IZQUIERDO, I. (2005). Relationship between short- and long-term memory and short- and long-term extinction. *Neurobiol Learn Mem.* 84: 25-32.
- CARAGEORGIU, H., ZARROS, A., TSAKIRIS, 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.
- CARLEZON, W.A.Jr., MAGUE, S.D., ANDERSEN, S.L. (2003). Enduring behavioral effects of early exposure to methylphenidate in rats. *Biol Psychiatry* 54: 1330-1337.
- CASTELLANOS, F.X. (1997). Toward a pathophysiology of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Clin Pediatr. (Phila)* 36: 381-393.
- CHACÓN, M.A., REYES, A.E., INESTROSA, N.C. (2003). Acetylcholinesterase induces neuronal cell loss, astrocyte hypertrophy and behavioral deficits in mammalian hippocampus. *J Neurochem.* 87: 195-204.

- 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: 705-710.
- 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.* 14: 769-772.
- CHASE, T.D., CARREY, N., BROWN, R.E., WILKINSON, M. (2005). Methylphenidate regulates c-fos and fosB expression in multiple regions of the immature rat brain. *Brain Res Dev Brain Res.* 156: 1-12.
- CHASE, T., CARREY, N., SOO, E., WILKINSON, M. (2007). Methylphenidate regulates activity regulated cytoskeletal associated but not brain-derived neurotrophic factor gene expression in the developing rat striatum. *Neuroscience* 144: 969-984.
- CONNERS, C.K. (2002). Forty years of methylphenidate treatment in Attention-Deficit/ Hyperactivity Disorder. *J Atten Disord.* 6(Suppl 1): S17-S30.
- 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.
- CYGLER, M., SCHRAG, J.D., SUSSMAN, J.L., HAREL, M., SILMAN, I., GENTRY, M.K., DOCTOR, B.P. (1993). Relationship between sequence conservation and three-dimensional structure in a large

family of esterases, lipases, and related proteins. *Protein Sci.* 2: 366-382.

- DAS, A., DIKSHIT, M., NATH, C. (2001). Profile of acetylcholinesterase in brain areas of male and female rats of adult and old age. *Life Sci.* 68: 1545-1555.
- D'HOOGE, R., DE DEYN, P.P. (2001). Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res Brain Res Rev.* 36: 60-90.
- DOBROTA, D., MATEJOVICOVA, M., KURELLA, E.G., BOLDYREV, A.A. (1999). Na⁺,K⁺-ATPase under oxidative stress: molecular mechanisms of injury. *Cell Mol Neurobiol.* 19: 141-149.
- 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.
- EATON, M.J., WHITTEMORE, S.R. (1996). Autocrine BDNF secretion enhances the survival and serotonergic differentiation of raphe neuronal precursor cells grafted into the adult rat CNS. *Exp Neurol.* 140: 105-114.
- ENNACEUR, A., MELIANI, K. (1992). Effects of physostigmine and scopolamine on rats' performances in object-recognition and radial-maze tests. *Psychopharmacology* 109: 321-330.
- ERECIŃSKA, M., SILVER, I.A. (1994). Ions and energy in mammalian brain. *Prog Neurobiol.* 43: 37-71.
- 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 Devl Neurosci.* 25: 47-51.
- FARAONE, S.V., BIEDERMAN, J. (1998). Neurobiology of attention-deficit hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry* 44: 951-958.

- 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., SERGEANT, J., GILLBERG, C., BIEDERMAN, J. (2003). The worldwide prevalence of ADHD: is it an American condition? *World Psychiatry* 2: 104-113.
- FISCH, R.Z. (1985). Methylphenidate for medical in-patients. *Int J Psychiatry Med.* 15: 75-79.
- FRIEDMAN, W.J., ERNFORS, P., PERSSON, H. (1991). Transient and persistent expression of NT-3/HDNF mRNA in the rat brain during postnatal development. *J Neurosci.* 11: 1577-1584.
- 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.
- GAUTHIER, L.R., CHARRIN, B.C., BORRELL-PAGES, M., DOMPIERRE, J.P., RANGONE, H., CORDELIERES, F.P, DE, M.J., MACDONALD, M.E., LESSMANN, V., HUMBERT, S., SAUDOU, F. (2004). Huntingtin controls neurotrophic support and survival of neurons by enhancing BDNF vesicular transport along microtubules. *Cell* 118: 127-138.
- 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.
- GIOVANNINI, M.G., BARTOLINI, L., KOPF, S.R., PEPEU, G. (1998). Acetylcholine release from the frontal cortex during exploratory activity. *Brain Res.* 784: 218-227.
- GOMES, K.M., INÁCIO, C.G., VALVASSORI, S.S., RÉUS, G.Z., BOECK, C.R., DAL-PIZZOL, F., QUEVEDO, J. (2009). Superoxide production after acute and chronic treatment with methylphenidate in young and adult rats. *Neurosci Lett.* 465: 95-98.

- GOODMAN E GILMAN. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. 10 ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 2003.
- GORDON, N. (1993). Learning disorders and delinquency. *Brain Dev.* 15: 169-172.
- GOTTMANN, K., MITTMANN, T., LESSMANN V. (2009). BDNF signaling in the formation, maturation and plasticity of glutamatergic and GABAergic synapses. *Exp Brain Res.* 199: 203-234.
- GREENHILL, L.L., HALPERIN, J.M., ABIKOFF, H. (1999). Stimulant medications. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 38: 503-512.
- GREVET, E.H., MARQUES, F.Z., SALGADO, C.A., FISCHER, A.G., KALIL, K.L., VICTOR, M.M., GARCIA, C.R., SOUSA, N.O., BELMONTE-DE-ABREU, P., BAU, C.H. (2007). Serotonin transporter gene polymorphism and the phenotypic heterogeneity of adult ADHD. *J Neural Transm.* 114: 1631-1636.
- GRISARU, D., STERNFELD, M., ELDOR, A., GLICK, D., SOREQ, H. (1999). Structural roles of acetylcholinesterase variants in biology and pathology. *Eur J Biochem.* 264: 672-686.
- HASSEL, B., SONNEWALD, U. (2002). Effects of potassium and glutamine on metabolism of glucose in astrocytes. *Neurochem Res.* 27: 167-171.
- HASTINGS, R.S., PARSEY, R.V., OQUENDO, M.A., ARANGO, V., MANN, J.J. (2004). Volumetric analysis of the prefrontal cortex, amygdala, and hippocampus in major depression. *Neuropsychopharmacology* 29: 952-959.
- HATTORI, N., KITAGAWA, K., HIGASHIDA, T., YAGYU, K., SHIMOHAMA, S., WATAYA, T., PERRY, G., SMITH, M.A., INAGAKI, C. (1998). Cl⁻-ATPase and Na⁺,K⁺-ATPase activities in Alzheimer's disease brains. *Neurosci Lett.* 254: 141-144.
- HERNÁNDEZ, J. (1987). Brain Na⁺,K⁺-ATPase activity possibly regulated by a specific serotonin receptor. *Brain Res.* 408: 399-402.
- HERNÁNDEZ, R.J. (1992). Na⁺,K⁺-ATPase regulation by neurotransmitters. *Neurochem Int.* 20: 1-10.

- HEYSER, C.J., PELLETIER, M., FERRIS, J.S. (2004). The effects of methylphenidate on novel object exploration in weanling and periadolescent rats. *Ann N Y Acad Sci.* 1021: 465-469.
- HIKIDA, T., KITABATAKE, Y., PASTAN, I., NAKANISHI, S. (2003). Acetylcholine enhancement in the nucleus accumbens prevents addictive behaviors of cocaine and morphine. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 100: 6169-6173.
- HOFER, M., PAGLIUSI, S.R., HOHN, A., LEIBROCK, J., BARDE, Y.A. (1990). Regional distribution of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the adult mouse brain. *EMBO J.* 9: 2459-2464.
- HYMAN, C., HOFER, M., BARDE, Y.A., JUHASZ, M., YANCOPOULOS, G.D., SQUINTO, S.P., LINDSAY, R.M. (1991). BDNF is a neurotrophic factor for dopaminergic neurons of the substantia nigra. *Nature* 350: 230-232.
- IZQUIERDO, I., MEDINA, J.H. (1997). Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol Learn Mem.* 68: 285-316.
- IZQUIERDO, I. *Memória*. Porto Alegre, Brasil: ArtMed Editora SA, 2002.
- JORGENSEN, P.L., HAKANSSON, K.O., KARLISH, S.J. (2003). Structure and mechanism of Na⁺,K⁺-ATPase: functional sites and their interactions. *Annu Rev Physiol.* 65: 817-849.
- KAPCZINSKI, F., FREY, B.N., ANDREAZZA, A.C., KAUER-SANT'ANNA, M., CUNHA, A.B., POST, R.M. (2008a). Increased oxidative stress as a mechanism for decreased BDNF levels in acute manic episodes. *Rev Bras Psiquiatr.* 30: 243-245.
- KAPCZINSKI, F., FREY, B.N., KAUER-SANT'ANNA, M., GRASSI-OLIVEIRA, R. (2008b). Brain-derived neurotrophic factor and neuroplasticity in bipolar disorder. *Expert Rev Neurother.* 8: 1101-1113.
- KAPLAN, D.R., MILLER, F.D. (2000). Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol.* 10: 381-391.

- KAPLAN, J.H. (2002). Biochemistry of Na⁺,K⁺-ATPase. *Annu Rev Biochem.* 71: 511-535.
- KAWASHIMA, K., FUJII, T. (2000). Extraneuronal cholinergic system in lymphocytes. *Pharmacol Ther.* 86: 29-48.
- KESSELS, R.P., DE HAAN, E.H., KAPPELLE, L.J., POSTMA, A. (2001). Varieties of human spatial memory: a meta-analysis on the effects of hippocampal lesions. *Brain Res Brain Res Rev.* 35: 295-303.
- KIMKO, H.C., CROSS, J.T., ABERNETHY, D.R. (1999). Pharmacokinetics and clinical effectiveness of methylphenidate. *Clin Pharmacokinet.* 37: 457-470.
- KLEIN-SCHWARTZ, W. (2003). Pediatric methylphenidate exposures: 7-year experience of poison centers in the United States. *Clin Pediatr.* 42: 159-164.
- KOZAK, R., MARTINEZ, V., YOUNG, D., BROWN, H., BRUNO, J.P., SARTER, M. (2007). Toward a neuro-cognitive animal model of the cognitive symptoms of schizophrenia: disruption of cortical cholinergic neurotransmission following repeated amphetamine exposure in attentional task-performing, but not non-performing, rats. *Neuropsychopharmacology* 32: 2074-2086.
- 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. (2001). Locomotor effects of acute and repeated threshold doses of amphetamine and methylphenidate: relative roles of dopamine and norepinephrine. *J Pharmacol Exp Ther.* 296: 876-883.
- KUCZENSKI, R., SEGAL, D.S. (2002). Exposure of adolescent rats to oral methylphenidate: preferential effects on extracellular

- norepinephrine and absence of sensitization and cross-sensitization to methamphetamine. *J Neurosci.* 22: 7264-7271.
- KURELLA, E.G., TYULINA, O.V., BOLDYREV, A.A. (1999). Oxidative resistance of Na⁺,K⁺-ATPase. *Cell Mol Neurobiol.* 19: 133-140.
- LANKTREE, M., SQUASSINA, A., KRINSKY, M., STRAUSS, J., JAIN, U., MACCIARDI, F., KENNEDY, J.L., MUGLIA, P. (2008). Association study of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and LIN-7 homolog (LIN-7) genes with adult Attention-deficit/hyperactivity disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 147B: 945-951.
- LAYER, P.G., WEIKERT, T., ALBER, R. (1993). Cholinesterases regulate neurite growth of chick nerve cells in vitro by means of a non-enzymatic mechanism. *Cell Tissue Res.* 273: 219-226.
- LeBLANC-DUCHIN, D., TAUKULIS, H.K. (2007). Chronic oral methylphenidate administration to periadolescent rats yields prolonged impairment of memory for objects. *Neurobiol Learn Mem.* 88: 312-320.
- LEES, G.J. (1993). Contributory mechanisms in the causation of neurodegenerative disorders. *Neuroscience* 54: 287-322.
- LEVITT, P., HARVEY, J.A., FRIEDMAN, E., SIMANSKY, K., MURPHY, E.H. (1997). New evidence for neurotransmitter influences on brain development. *Trends Neurosci.* 20: 269-274.
- LEWIN, G.R., BARDE, Y.A. (1996). Physiology of the neurotrophins. *Annu Rev Neurosci.* 19: 289-317.
- LI, B., ARIME, Y., HALL, F.S., UHL, G.R., CUI, R., SORA, I. (IN PRESS). Impaired spatial working memory and decreased frontal cortex BDNF protein level in dopamine transporter knockout mice. *Eur J Pharmacology.*
- LU, B., PANG, P.T., WOO, N.H. (2005). The yin and yang of neurotrophin action. *Nat Rev Neurosci.* 6: 603-614.
- MALLICK, B.N., ADYA, H.V., FAISAL, M. (2000). Norepinephrine-stimulated increase in Na⁺,K⁺-ATPase activity in the rat brain is

mediated through alpha1A-adrenoceptor possibly by dephosphorylation of the enzyme. *J Neurochem.* 74: 1574-1578.

MARTIN-IVERSON, M.T., TODD, K.G., ALTAR, C.A. (1994). Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 activate striatal dopamine and serotonin metabolism and related behaviors: interactions with amphetamine. *J Neurosci.* 14: 1262-1270.

MATA, M., FINK, D.J., GAINER, H., SMITH, C.B., DAVIDSEN, L., SAVAKI, H., SCHWARTZ, W.J., SOKOLOFF, L. (1980). Activity-dependent energy metabolism in rat posterior pituitary, primarily reflects sodium pump activity. *J Neurochem.* 34: 213-215.

MCDUGAL, D.B.Jr., COWSETTE, B.R., PUSATERI, M.E., CARTER, J.G., MANCHESTER, J.K., CHI, M.M., LOWRY, O.H. (1997). Glutamate and potassium stimulation of hippocampal slices metabolizing glucose or glucose and pyruvate. *Brain Res.* 755: 304-312.

MESULAM, M.M., GUILLOZET, A., SHAW, P., LEVEY, A., DUYSEN, E.G., LOCKRIDGE, O. (2002). Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. *Neuroscience* 110: 627-639.

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 Pediatr.* 23: 16-22.

MOLL, G.H., HAUSE, S., RÜTHER, E., ROTHENBERGER, A., HUETHER, G. (2001). Early methylphenidate administration to young rats causes a persistent reduction in the density of striatal dopamine transporters. *J Child Adolesc Psychopharmacology* 11: 15-24.

MORRIS, R.G., GARRUD, P., RAWLINS, J.N., O'KEEFE, J. (1982). Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 297: 681-683.

MOSCOVITCH, M., NADEL, L., WINOCUR, G., GILBOA, A., ROSENBAUM, R.S. (2006). The cognitive neuroscience of remote

episodic, semantic and spatial memory. *Curr Opin Neurobiol.* 16: 179-190.

MUNHOZ, C.D., GLEZER, I., KAWAMOTO, E.M., ARAÚJO, A.P., LEPSCHA, L.B., PLANETA, C.S., DELUCIA, R., SCAVONE, C. (2003). Changes in sodium, potassium-ATPase induced by repeated fencamfamine: the roles of cyclic AMP-dependent protein kinase and the nitric oxide-cyclic GMP pathway. *Neuropharmacology* 45: 1151-1159.

OVERTOOM, C.C., VERBATEN, M.N., KEMNER, C., KENEMANS, J.L., VAN ENGELAND, H., BUITELAAR, J.K., VAN DER MOLEN, M.W., VAN DER GUGTEN, J., WESTENBERG, H., MAES, R.A., KOELEGA, H.S. (2003). Effects of methylphenidate, desipramine, and L-dopa on attention and inhibition in children with Attention Deficit Hyperactivity Disorder. *Beh Brain Res.* 145: 7-15.

PASCOLI, V., VALJENT, E., CORBILLÉ, A.G., CORVEL, J.C., TASSIN, J.P., GIRAULT, J.A., 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-adrenoceptores. *Mol Pharmacology* 68: 421-429.

PAUL, C.M., MAGDA, G., ABEL, S. (2009). Spatial memory: Theoretical basis and comparative review on experimental methods in rodents. *Behav Brain Res.* 203: 151-164.

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

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

POO, M.M. (2001). Neurotrophins as synaptic modulators. *Nat Rev Neurosci.* 2: 24-32.

PRUUNSILD, P., KAZANTSEVA, A., AID, T., PALM, K., TIMMUSK, T. (2007). Dissecting the human BDNF locus: bidirectional

transcription, complex splicing, and multiple promoters. *Genomics* 90: 397-406.

- RANTAMÄKI, T., CASTRÉN, E. (2008). Targeting TrkB neurotrophin receptor to treat depression. *Expert Opin Ther Targets* 12: 705-715.
- 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.
- RIDGE, K.M., DADA, L., LECUONA, E., BERTORELLO, A.M., KATZ, A.I., MOCHLY-ROSEN, D., SZNAJDER, J.I. (2002). Dopamine-induced exocytosis of Na⁺,K⁺-ATPase is dependent on activation of protein kinase C-epsilon and -delta. *Mol Biol Cell* 13: 1381-1389.
- ROBINSON, T.E., BERRIDGE, K.C. (2003). Addiction. *Annu Rev Psychol.* 54: 25-53.
- ROBINSON, T.E., KOLB, B. (2004). Structural plasticity associated with exposure to drugs of abuse. *Neuropharmacology* 47: 33-46.
- ROHDE, L.A., BIEDERMAN, J., BUSNELLO, E.A., ZIMMERMANN, H., SCHMITZ, M., MARTINS, S., TRAMONTINA, S. (1999). ADHD in a school sample of Brazilian adolescents: a study of prevalence, comorbid conditions and impairments. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 38: 716-722.
- 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.
- SANTUCCI, A.C. (2008). Adolescent cocaine residually impairs working memory and enhances fear memory in rats. *Exp Clin Psychopharmacol.* 16: 77-85.
- SATO, T., TANAKA, K., OHNISHI, Y., TERAMOTO, T., IRIFUNE, M., NISHIKAWA, T. (2004). Effects of steroid hormones on (Na⁺,K⁺)-ATPase activity inhibition-induced amnesia on the step-through

passive avoidance task in gonadectomized mice. *Pharmacol Res.* 49: 151-159.

- SAWAGUCHI, T., GOLDMAN-RAKIC, P.S. (1991). D1 dopamine receptors in prefrontal cortex: involvement in working memory. *Science* 251: 947-950.
- SCAINI, G., FAGUNDES, A.O., REZIN, G.T., GOMES, K.M., ZUGNO, A.I., QUEVEDO, J., STRECK, E.L. (2008). Methylphenidate increases creatine kinase activity in the brain of young and adult rats. *Life Sci.* 83: 795-780.
- SCHINDOWSKI, K., BELARBI, K., BUÉE, L. (2008). Neurotrophic factors in Alzheimer's disease: role of axonal transport. *Genes Brain Behav.* 7(Suppl 1): 43-56.
- SILMAN, I., SUSSMAN, J.L. (2005). Acetylcholinesterase: 'classical' and 'non-classical' functions and pharmacology. *Curr Opin Pharmacol.* 5: 293-302.
- SKOU, J.C., ESMANN, M. (1992). The Na⁺,K⁺-ATPase. *J Bioenerg Biomembr.* 24: 249-261.
- SOFUOGLU, M., MOONEY, M. (2009). Cholinergic functioning in stimulant addiction: implications for medications development. *CNS Drugs* 23: 939-952.
- SOLANTO, M.V. (1998). Neuropsychopharmacological mechanisms of stimulant drug action in attention-deficit hyperactivity disorder: a review and integration. *Behav Brain Res.* 94: 127-152.
- SOREQ, H., SEIDMAN, S. (2001). Acetylcholinesterase - new roles for an old actor. *Nat Rev Neurosci.* 2: 294-302.
- SQUIRE, L.R., KANDEL, E.R. *Memória: da mente às moléculas.* Porto Alegre, Brasil: ArtMed Editora SA, 2003.
- SQUIRE, L.R. (2004). Memory systems of the brain: a brief history and current perspective. *Neurobiol Learn Mem.* 82: 171-177.
- STANWOOD, G.D., LEVITT, P. (2004). Drug exposure early in life: functional repercussions of changing neuropharmacology during sensitive periods of brain development. *Curr Opin Pharmacol.* 4: 65-71.

- SWANSON, J.M., CANTWELL, D., LERNER, M., MCBURNETT, K., HANNA, G. (1991). Effects of stimulant medication on learning in children with ADHD. *J Learn Disabil.* 24: 219-230.
- SWANSON, J.M., SERGEANT, J.A., TAYLOR, E., SONUGA-BARKE, E.J., JENSEN, P.S., CANTWELL, D.P. (1998). Attention-deficit hyperactivity disorder and hyperkinetic disorder. *Lancet.* 351: 429-433.
- SWANSON, J., GUPTA, S., LAM, A., SHOULSON, I., LERNER, M., MODI, N., LINDEMULDER, E., WIGAL, S. (2003). Development of a new once-a-day formulation of methylphenidate for the treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder: proof-of-concept and proof-of-product studies. *Arch Gen Psychiatry* 60: 204-211.
- TAGUCHI, K., KUMANOGOH, H., NAKAMURA, S., MAEKAWA, S. (2007). Ouabain-induced isoform-specific localization change of the Na⁺,K⁺-ATPase alpha subunit in the synaptic plasma membrane of rat brain. *Neurosci Lett.* 413: 42-45.
- TANNOCK, R. (1998). Attention deficit hyperactivity disorder: advances in cognitive, neurobiological, and genetic research. *J Child Psychol Psychiatry* 39: 65-99.
- TAPIA-ARANCIBIA, L., ALIAGA, E., SILHOL, M., ARANCIBIA, S. (2008). New insights into brain BDNF function in normal aging and Alzheimer disease. *Brain Res Rev.* 59: 201-220.
- TARDITO, D., PEREZ, J., TIRABOSCHI, E., MUSAZZI, L., RACAGNI, G., POPOLI, M. (2006). Signaling pathways regulating gene expression, neuroplasticity and neurotrophic mechanisms in the action of antidepressants: a critical overview. *Pharmacol Rev.* 58: 115-134.
- TEIXEIRA, A.L.Jr., CARAMELLI, P. (2006). Apathy in Alzheimer's disease. *Rev Bras Psiquiatr.* 28: 238-241.
- THAPAR, A., FOWLER, T., RICE, F., SCOURFIELD, J., VAN DEN BREE, M., THOMAS, H., HAROLD, G., HAY, D. (2003). Maternal smoking during pregnancy and attention-deficit hyperactivity disorder symptoms in offspring. *Am J Psychiatry* 160: 1985-1989.

- THINUS-BLANC, C. (1996). Exploration and spatial knowledge. In: Animal Spatial Cognition. Behavioral and Neural Approaches. 1st ed. Singapore: Word Scientific 1-42.
- THOENEN, H. (1995). Neurotrophins and neuronal plasticity. *Science* 270: 593-598.
- TIMMUSK, T., PALM, K., METSIS, M., REINTAM, T., PAALME, V., SAARMA, M., PERSSON, H. (1993). Multiple promoters direct tissue-specific expression of the rat BDNF gene. *Neuron* 10: 475-489.
- TRIPP, G., WICKENS, J.R. (2009). Neurobiology of ADHD. *Neuropharmacology* 57: 579-589.
- TSAI, S.J. (2003). Attention-deficit hyperactivity disorder and brain-derived neurotrophic factor: a speculative hypothesis. *Med Hypotheses* 60: 849-851.
- TSAKIRIS, S., KOUNINIOTOU-KRONTIRI, P., SCHULPIS, K.H., STAVRIDIS, J.C. (1998). L-phenylalanine effect on rat brain acetylcholinesterase and Na⁺,K⁺-ATPase. *Z Naturforsch C*. 53: 163-167.
- TZAVARA, E.T., BYMASTER, F.P., OVERSHINER, C.D., DAVIS, R.J., PERRY, K.W., WOLFF, M., MCKINZIE, D.L., WITKIN, J.M., NOMIKOS, G.G. (2006). Procholinergic and memory enhancing properties of the selective norepinephrine uptake inhibitor atomoxetine. *Mol Psychiatry* 11: 187-195.
- VALVASSORI, S.S., FREY, B.N., MARTINS, M.R., RÉUS, G.Z., SCHIMIDTZ, F., INÁCIO, C.G., KAPCZINSKI, F., QUEVEDO, J. (2007). Sensitization and cross-sensitization after chronic treatment with methylphenidate in adolescent Wistar rats. *Behav Pharmacol*. 18: 205-212.
- VASILETS, L.A., SCHWARZ, W. (1993). Structure-function relationships of cation binding in the Na⁺,K⁺-ATPase. *Biochim Biophys Acta* 1154: 201-222.

- VIOLA, M.S., RODRIGUEZ, L.A.G. (2007). Brain Na⁺,K⁺-ATPase isoforms: different hypothalamus and mesencephalon response to acute desipramine treatment. *Life Sci.* 81: 228-233.
- 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., 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.
- WETMORE, C., ERNFORS, P., PERSSON, H., OLSON, L. (1990). Localization of brain-derived neurotrophic factor mRNA to neurons in the brain by in situ hybridization. *Exp Neurol.* 109: 141-152.
- WILENS, T.E. (2008). Effects of methylphenidate on the catecholaminergic system in attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Clin Psychopharmacol.* 28(3Suppl 2): S46-S53.
- WILLIAMS, M.J., ADINOFF, B. (2008). The role of acetylcholine in cocaine addiction. *Neuropsychopharmacology* 33: 1779-1797.
- 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.
- WYSE, A.T.S., STRECK, E.L., WORM, P., WAJNER, A., RITTER, F., NETTO, C.A. (2000). Preconditioning prevents the inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase activity after brain ischemia. *Neurochem Res.* 25: 971-975.

- WYSE, A.T., BAVARESCO, C.S., REIS, E.A., ZUGNO, A.I., TAGLIARI, B., CALCAGNOTTO, T., NETTO, C.A. (2004). Training in inhibitory avoidance causes a reduction of Na⁺,K⁺-ATPase activity in rat hippocampus. *Physiol Behav.* 80: 475-479.
- XIE, Z., ASKARI, A. (2002). Na⁺,K⁺-ATPase as a signal transducer. *Eur J Biochem.* 269: 2434-2439.
- YAMAGUCHI, I., WALK, S.F., JOSE, P.A., FELDER, R.A. (1996). Dopamine D2L receptors stimulate Na⁺,K⁺-ATPase activity in murine LTK- cells. *Mol Pharmacol.* 49: 373-378.
- 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.
- ZIMMERMAN, G., SOREQ, H. (2006). Termination and beyond: acetylcholinesterase as a modulator of synaptic transmission. *Cell Tissue Res.* 326: 655-669.
- 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.

Livros Grátis

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

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

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

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

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