



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

MARCO COLOMÉ BECK

**EFEITOS DO METILFENIDATO NA RECONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA DE
RECONHECIMENTO DE OBJETOS E A RELAÇÃO COM O SISTEMA
DOPAMINÉRGICOS DA REGIÃO CA1 DO HIPOCAMPO DORSAL DE RATOS
*WISTAR***

**Porto Alegre / RS
2017**

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

**EFEITOS DO METILFENIDATO NA RECONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA DE
RECONHECIMENTO DE OBJETOS E RELAÇÃO COM O SISTEMA
DOPAMINÉRGICOS DA REGIÃO CA1 DO HIPOCAMPO DORSAL DE RATOS
*WISTAR***

**Dissertação de mestrado apresentada à
Comissão Coordenadora do Programa
de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas II: Fisiologia, para obtenção
do título de Mestre em Ciências
Biológicas**

**Orientador: Prof. Dr. Fernando Benetti
Co-orientador: Prof. Dr. Cláudio Weber**

**Porto Alegre / RS
2017**

Marco Colomé Beck

**EFEITOS DO METILFENIDATO NA RECONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA DE
RECONHECIMENTO DE OBJETOS E RELAÇÃO COM O SISTEMA
DOPAMINÉRGICOS DA REGIÃO CA1 DO HIPOCAMPO DORSAL DE RATOS
*Wistar***

Dissertação de Mestrado apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Aprovado em: 22 de dezembro de 2017.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Juliana Sartori Bonini – Universidade Federal do Centro-Oeste

Dr. Guilherme Baldo – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Fernando Benetti- Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)
Orientador

Dedico este trabalho a minha família

AGRADECIMENTOS

Inicialmente quero agradecer aos meus avós, pais e irmãos por terem me acompanhado durante todo período de extremo cansaço físico e psicológico e que estiveram presentes em todos os meus momentos de angústia e sofrimento, bem como momentos de felicidade como este, sempre me mostrando o quão forte podemos ser e o quanto ainda podemos melhorar. Sempre me fizeram acreditar que podemos chegar onde quisermos. Obrigado pelas palavras de apoio, pelos conselhos, preocupação.

Gostaria de agradecer ao meu orientador Prof. Dr. Fernando Benetti por ter me recebido e me acolhido no seu grupo de pesquisa e ter me dado a oportunidade de estar realizando um sonho.

Ao Prof. Dr. Weber Cláudio, meu co-orientador, que me recebeu de braços abertos em sua universidade e cidade. Momento em que pude aprender muito, em um pequeno espaço de tempo, e compreender que o conhecimento que temos é o nosso bem precioso. Sua acolhida foi essencial.

Agradeço também à Prof. Dra. Pâmela Carpes, por ter me incentivado a realizar pesquisas na área experimental. Suas orientações e conversas foram essenciais para entender como devo ser com meus futuros alunos. Sua calma, compreensão, entendimento e, principalmente, humildade em se colocar como aluna quando necessário, me fizeram pensar não apenas onde, mas sim, como quero chegar. Muito obrigado.

Aos colegas do Laboratório: Ariley e Débora. Compreendo que nestes 2 anos que passamos juntos, aprendemos muitas coisas e uma delas foi a convivência, Acima de qualquer conhecimento que pudemos adquirir, aprendemos a respeitar nossas diferenças e, assim, vivermos bem. Das discussões de artigos, aos encontros ao acaso, aos encontros programados, aos experimentos e a tantos outros momentos que poderemos passar juntos. Obrigado pelo apoio e auxílio nestes momentos difíceis.

Agradeço ao André, veterinário responsável pelo biotério. Sempre me auxiliou no cuidado dos animais, bem como me ajudou quando necessário, para adaptar pedidos e manejo com o período que estes deveriam ficar alojados.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas II: Fisiologia, onde pude ingressar no programa e usufruir dos ensinamentos acadêmicos deste programa e professores.

Gostaria de agradecer também a toda a atenção e assistência fornecida por parte da coordenação, funcionários, professores e pesquisadores que estavam sempre de portas abertas para sanar dúvidas e auxiliar em minha formação acadêmica.

A todos os amigos e colegas da fisiologia da UFRGS e do IPB/PUCRS que de uma forma ou outra contribuíram e participaram na minha vida para que eu chegasse até aqui.

Sejamos sempre eternos, na medida em que vivemos momentos que nos transformam ao ponto de não nos tornarmos reféns do nosso cotidiano modificando tanto os outros quanto a nós mesmos, para vivermos felizes e em paz.

RESUMO

A memória é a capacidade que os seres vivos possuem de adquirir, formar, conservar e evocar dados ou informações do sistema nervoso central sobre experiências vivenciadas e sobre o meio que o cerca. Durante esse processo, diversos neurotransmissores são liberados, entre eles a dopamina, ativando diversas cascatas intracelulares neuronais. **Objetivo:** Estudar o efeito da dopamina na reconsolidação da memória na tarefa de reconhecimento de objetos e a ação dos receptores dopaminérgicos (D1 e D5) na região CA1 do hipocampo de ratos. **Metodologia:** foram utilizados 164 ratos Wistar, submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação de cânulas guia na região CA1 do hipocampo. Os animais foram habituados por quatro dias consecutivos no campo aberto durante 20 minutos. Na sessão de treino, os ratos foram expostos a dois diferentes objetos (A e B) por 5 min. Após 24h (reativação), um dos objetos foi trocado para um novo (objeto C), e os ratos foram reexpostos no campo aberto por 5 minutos. O metilfenidato (MTF - estimulador dopaminérgico) foi infundido antes ou após a fase de reativação, e os animais receberam também infusões bilaterais intra-CA1 dos agonistas/antagonistas dopaminérgicos. O teste da reconsolidação no reconhecimento de objetos foi realizado 24h, 72h ou 7 dias e 10 dias após a sessão de reativação. **Resultados:** Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média da porcentagem de tempo total de exploração. Os resultados mostraram que em 24 horas, infusão antes da reativação, o grupo MTF ($62,3 \pm 2,43$) não apresenta déficit de memória comparado ao grupo salina ($60,5 \pm 4,651$) $p=0,60$. Quando testados em 72 horas, o grupo MTF ($58,45 \pm 1,91$) apresentou déficit comparado com o salina ($50,01 \pm 2,43$) $p<0,05$. Foi realizada a infusão após a fase de reativação e realizado curva dose/resposta e identificado que em 24 horas apenas 1,0 mg/kg de metilfenidato não causa déficit ($62,34 \pm 4,64$) $p= 0,29$. Quando testados em 07 dias, os animais tratados com MTF ainda lembravam do objeto primário ($58,13 \pm 1,73$) comparado ao grupo salina ($66,42 \pm 1,35$) $p<0,01$. Quando utilizado a mesma janela temporal e utilizado o bloqueador dopaminérgico (SCH-23390), imediatamente após a reativação, os animais tratados com MTF e SCH-23390 ($61,99 \pm 3,87$) exploraram mais o objeto novo, comparados ao salina ($49,18 \pm 1,94$) $p<0,05$. Animais tratados com metilfenidato após a fase de reativação e testados em 10 dias não lembraram do objeto familiar ($p=0,74$) **Conclusão:** O metilfenidato infundido intraperitoneal pré reativação pode causar déficit de memória. Contudo, se for infundido imediatamente após a reativação, melhora o processo mnemônico para a memória do RO.

ABSTRACT

Memory is the ability of living beings to acquire, form, conserve and evoke data or information from the central nervous system about experiences and about the environment that surrounds them. During this process, several neurotransmitters are released, among them dopamine, activating several neuronal intracellular cascades.

Aim: To study the effects of dopamine on the reconsolidation of memory in the task of object recognition and the action of dopaminergic receptors (D1 and D5) on the CA1 region of rat hippocampus. **Methodology:** One hundred and sixty four Wistar rats were submitted to stereotactic surgery for implantation of guide cannulas in the CA1 region of the hippocampus. The animals were habituated for four consecutive days in the open field for 20 minutes. In the training session, the rats were exposed to two different objects (A and B) for 5 min. After 24h (reactivation), one of the objects was changed to a new one (object C), and the rats were reexposed in the open field for 5 minutes. Methylphenidate (MTF - dopaminergic stimulator) was infused before or after the reactivation phase, and the animals also received intra-CA1 bilateral infusions of dopaminergic agonists / antagonists. The reconsolidation test on object recognition was performed 24h, 72h, 7 days and 10 days after the reactivation session (A and D).

Results: Data are presented as mean \pm standard error of the mean of the percentage of total exploration time. The results showed that in 24 hours, infusion before reactivation, the MTF group (62.3 ± 2.43) did not present memory deficit compared to the saline group (60.5 ± 4.651) $p = 0.60$. When tested in 72 hours, the MTF group (58.45 ± 1.91) presented deficit compared to saline (50.01 ± 2.43) $p < 0.05$. Infusion was performed after the reactivation phase and a dose / response curve was performed and it was identified that in 24 hours only 1.0 mg / kg of methylphenidate did not cause deficit (62.34 ± 4.64) $p = 0.29$. When tested at 07 days, the MTF treated animals still resembled the primary object (58.13 ± 1.73) compared to the saline group (66.42 ± 1.35) $p < 0.01$. When the same time window was used and the dopaminergic blocker (SCH-23390) was used immediately after reactivation, the animals treated with MTF and SCH-23390 (61.99 ± 3.87) further explored the new object compared to saline (49.18 ± 1.94) $p < 0.05$. Animals treated with methylphenidate after the reactivation phase and tested at 10 days did not remember the family object ($p = 0.74$)

Conclusion: Intraperitoneal infused methylphenidate pre-reactivation may cause memory deficit. However, if it is infused immediately after reactivation, it improves the mnemonic process for RO memory.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Desenho esquemático sobre o tempo que perduram as memórias

Figura 02 - Modelo de armazenagem da memória proposto por ATKISON E SCHIFFRIN

Figura 03 - Organograma explicativo sobre os processos de consolidação, reconsolidação e esquecimento

Figura 04 - Curva de performance de aprendizado em relação a ansiedade

Figura 05 - Classificação das memórias diante da sua natureza e os testes utilizados para avalia-las

Figura 06 - Projeções dopaminérgicas provenientes da substância nigra, área tegmental ventral e o núcleo acubens

Figura 07 - Mecanismo de ação do metilfenidato sobre a receptação de dopamina dos neurônios dopaminérgicos

Figura 08 - Vista geral do equipamento de cirurgia estereotáxica utilizado

Figura 09 - Ilustração do encéfalo de rato e onde foram infundidas as drogas

Figura 10 - Desenho experimental comportamental primário mostrando as diferentes fases do experimento e o momento de infusão das drogas na memória de reconhecimento de objetos e a relação temporal

Figura 11 - Desenho experimental comportamental secundário mostrando as diferentes fases do experimento e o momento de infusão das drogas na memória de reconhecimento de objetos e a relação temporal

Figura 12 – Curva dose-resposta da ação do metilfenidato, infusão I.P., no teste da reconsolidação da memória de R.O. 24 horas após a fase de reconsolidação.

Figura 13 – Efeitos da infusão I.P. de metilfenidato imediatamente após a sessão de reativação, sobre o teste de reconsolidação da memória na tarefa de R.O. 24 horas após a sessão de reativação.

Figura 14 - Efeitos da infusão I.P. de metilfenidato imediatamente após a sessão de reativação e a infusão intrahipocampal do SCH-23390, sobre o teste de reconsolidação da memória na tarefa de R.O. 24 horas após a sessão de reativação

Figura 15 - Efeitos da infusão I.P. de metilfenidato imediatamente após a sessão de reativação, sobre o teste de reconsolidação da memória na tarefa de R.O. 07 dias após a sessão de reativação

Figura 16 - Efeitos da infusão I.P. de metilfenidato imediatamente após a sessão de reativação e a infusão intrahipocampal do SCH-23390, sobre o teste de reconsolidação da memória na tarefa de R.O. 07 dias após a sessão de reativação

Figura 17 - Efeitos da infusão intrahipocampal de metilfenidato e SCH-23390 imediatamente após a sessão de reativação, sobre o teste de reconsolidação da memória na tarefa de R.O. 07 dias após a sessão de reativação

Figura 18 - Efeitos da infusão I.P. de metilfenidato previamente a sessão de reativação sobre o teste de reconsolidação da memória na tarefa de R.O. 24 horas após a sessão de reativação.

Figura 19 – Efeitos da infusão I.P. de metilfenidato previamente a sessão de reativação sobre o teste de reconsolidação da memória na tarefa de R.O. 07 dias após a sessão de reativação

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µl – Microlitros

AP – Anteroposterior

cm – Centímetros

CPF – Córtex Pré-frontal

DV – Dorsoventral

HIP – Hipocampo

i.p. – Intraperitoneal

Kg – Quilograma(s)

LL – Latero-lateral

MCD – Memória de curta duração

mg – Miligrama(s)

min – Minuto(s)

MLD – Memória de longa duração

mm – Milímetro(s)

SN – Substância Nigra

SNC – Sistema Nervoso Central

VTA – Núcleo Ventro Tegmental

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	JUSTIFICATIVA	25
3	OBJETIVOS	26
3.1	Objetivo Geral	26
3.2	Objetivos Específicos	26
4	MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1	Animais e condições experimentais	27
4.2	Fármacos e sua via de administração	27
4.3	Protocolo de cirurgia estereotáxica	28
4.4	Reconhecimento de objetos (RO)	29
4.5	Descarte de materiais e resíduos	30
4.6	Medidas de biossegurança	31
4.7	Eutanásia	31
4.8	Desenho do estudo	31
4.9	Análise estatística e cálculo amostral	35
4.10	Aspectos éticos	35
5	RESULTADOS	36
5.1	Dados suplementares	43
6	DISCUSSÃO	46
7	CONCLUSÕES	51
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

1 INTRODUÇÃO

Para que se possa entender o que é memória e assim compreender como ocorre a sua formação e armazenamento é necessário, primeiramente, definir o seu conceito e classificar os tipos de memória. Segundo Izquierdo (2011), memória é a capacidade do sistema nervoso central dos seres vivos de adquirir, formar, conservar e evocar dados ou informações sobre o meio que os cerca. Esta capacidade de armazenar informações, torna os seres vivos capazes de modificar o próprio comportamento (CHAPOUTHIER, et al. 2006). Izquierdo afirma que *“Somos aquilo que recordamos”*, dando sentido ao conceito de que as memórias que os seres vivos formam e evocam compõe a personalidade, no qual as lembranças guiam os comportamentos. Assim não é possível gerar ou agir diante de algo que já se esqueceu (IZQUIERDO, 2011).

As memórias podem ser classificadas de acordo com o tempo de duração ou quanto a natureza do seu conteúdo (MCGAUGH e IZQUIERDO, 2000, SQUIRE, et al., 1996). As memórias podem durar somente o tempo necessário para que possamos utilizá-las (memória de trabalho), ou um tempo muito mais longo (memória de longa duração), quando necessário. As memórias armazenadas por um curto período de tempo (segundos, minutos, poucas horas) são chamadas de memória de curta duração (MCD) e as memórias mantidas por um longo período de tempo (muitas horas, dias, semanas, anos, décadas) são chamadas de memórias de longa duração (MLD) (MCGAUGH e IZQUIERDO, 2000; IZQUIERDO et al, 2002). Dessa forma, as memórias podem ser classificadas de acordo com o tempo em que persistem (Fig. 01).

Levando em conta as afirmações anteriores, as memórias ainda podem ser classificadas dessa forma: Memórias sensoriais, duração de segundos, que retêm uma breve impressão de um estímulo após este ter desaparecido, ou seja, depois que o sistema sensorial correspondente deixar de enviar informação ao cérebro elas deixam de existir. Memória de curta duração (MCD), duração de menos de 3 horas, permite manter uma pequena quantidade de informação em estado ativo e de fácil acesso para utilização. Memória de longa duração (MLD), duração de meses, anos ou toda a vida, contém informações de diversas origens que possuem fortes conexões formando um sistema de arquivos dinâmico que pode ser acessado a qualquer momento (IZQUIERDO et al, 2002).

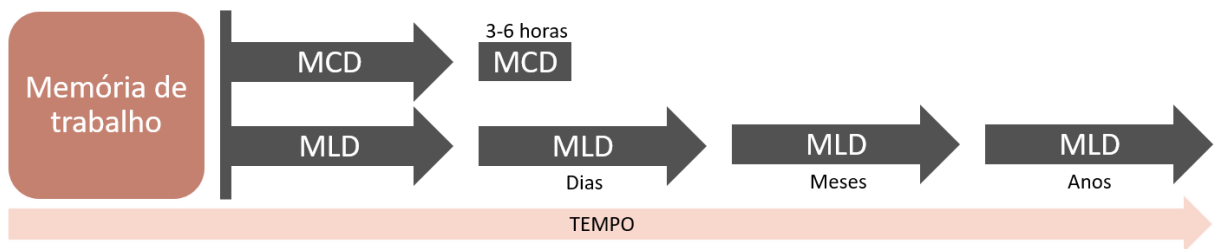


Fig. 01 - Desenho esquemático sobre o tempo que perduram as memórias. MCD: memória de curta duração; MLD: Memória de longa duração.

As memórias sensoriais citadas anteriormente e classificadas como de curta duração e de trabalho, realizam um rápido registro de um estímulo, adquiridos das áreas sensoriais e armazenam essas informações no cérebro. Estas memórias de duração muito breve (segundos) permitem compreender a informação, na medida em que ela vai sendo registrada pelo organismo, dentro do contexto que está sendo vivido no momento. Um exemplo simples a ser utilizado é a lembrança apenas da terceira palavra lida anteriormente nesta frase; duração de poucos segundos, para compreender o contexto e o sentido da afirmação. As MCD que perduram por mais tempo, com uma maior permanência (minutos, horas) também são chamadas de memórias primárias ou ativas, ou seja, são memórias que permitem manter a mente em um estado ativo, facilitando o acesso a uma quantidade limitada de informação, adquirida a pouco tempo (BADDELEY, 1992; IZQUIERDO e MEDINA, 1997; ROSSATO et al., 2007). Este tipo de memória é a que permite você ler um texto ou conversar com outra pessoa e interpretar o sentido a ser passado e compreender a continuidade do momento presente que está sendo vivido. (CAPLAN e WATERS, 1999)

A formação de uma memória é dependente de três fases iniciais, ou seja, a aquisição, a formação e a consolidação (MCGAUGH e IZQUIERDO, 2000). Após a aquisição de uma informação, ela passa pelo processo de consolidação, no qual são formadas novas associações sinápticas que correspondem àquela lembrança; após esta formação, ela pode passar pelo processo de reconsolidação ou de extinção. (IZQUIERDO et al., 2011). O processo de formação de memória depende de diversas áreas cerebrais que atuam em associação, interagindo entre elas durante todo o processo de formação de memória. Algumas áreas são específicas para o

armazenamento de algumas memórias como o estriado responsável pela memória não-declarativa procedural, o lobo temporal medial responsável por armazenamento de fatos e eventos, vias reflexas pelo aprendizado não associativo e a amígdala responsável pelas respostas emocionais, sendo esta última responsável por modular a força com que as memórias declarativas e não declarativas serão armazenadas (MAYFORD, SIEGELBAUM, e KANDEL, 2012).

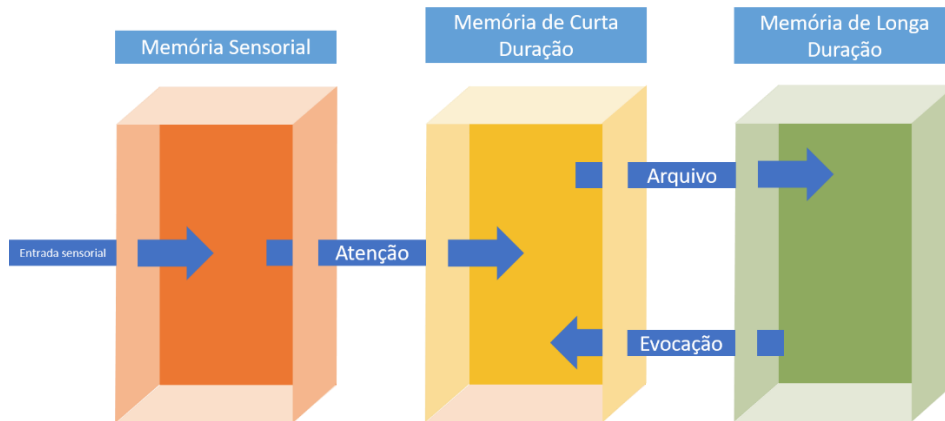


Fig. 02 - Modelo de formação da memória proposto por Atkinson e schiffrin. Imagem adaptada de: Atkinson, R. C., & Shiffrin, R. M. (1968). Chapter: Human memory: A proposed system and its control processes. In Spence, K. W., & Spence, J. T. The psychology of learning and motivation (Volume 2). New York: Academic Press. pp. 89–195. Em 1968 os autores propuseram este processo de formação da memória levando em conta o processo espacial.

Para que ocorra a formação da memória, é necessário que diversos processos e áreas cerebrais atuem em conjunto para que ocorra a formação e seu armazenamento. Assim, é necessário uma memória sensorial para identificarmos os estímulos táteis, visuais, olfativos, palatáveis, e eles sejam interpretados corretamente por áreas específicas cerebrais, realizando assim interconexões para a formação de um processo mnemônico. Para que esta memória seja formada corretamente e o indivíduo aprenda, é imprescindível que o indivíduo possua um nível mínimo de estresse e atenção (JAMES e MCGAUGH, 2002), sendo que, pouca atenção ou muito estresse interferem diretamente neste processo (Fig. 04). Neste processo primeiramente ocorre a formação de uma MCD, podendo ser armazenada por um curto período. Caso esta memória seja identificada como necessária, ela poderá se tornar uma memória de longa duração. Este processo inicial de aquisição da memória pode facilmente ser manipulado ou alterado (COHEN et al., 2006; 2008). Estudos demonstraram que as memórias podem ser alteradas por tratamentos amnésicos

como inibidores de síntese proteica (ROSSATO et al., 2007; FURINI et al., 2015) e inibidores de RNA mensageiro (SILVA e FRUSSA-FILHO, 2000) ou um novo aprendizado, que pode ser classificado como um aprendizado fraco em um processo de mecanismo de marcação e captura sináptica (CASSINI et al., 2013). Isso demonstra que existem dois momentos para a formação da memória, um primeiro no qual ela ainda está sendo processada (que está suscetível ao fortalecimento ou enfraquecimento) e um segundo momento no qual os tratamentos não interferem sobre a formação, momento em que a memória já estaria estável, consolidada. Quando estas memórias são consolidadas elas se tornam MDL e podem ser evocadas a qualquer momento, dependente ou não da vontade do indivíduo, sendo um processo contínuo (Fig. 03). Experimentos recentes investigaram os efeitos dos hormônios do estresse adrenal na memória e demonstraram fortes evidências extensas de que a adrenalina e os glicocorticoides modulam a consolidação da memória a longo prazo (ROOZENDAAL et al., 2008).

Esta memória, previamente consolidada, é volátil e capaz de entrar no processo de esquecimento natural (amnésia). Este esquecimento, o qual não é patológico, é identificado como um processo natural no qual o cérebro interpreta ter o poder de aperfeiçoar a sua capacidade de armazenamento, não consolidando informações que identifica serem repetidas ou não essenciais. Por outro lado, os indivíduos possuem as evocações, ou seja, capacidade de resgatar uma memória previamente consolidada e estimular a reconsolidação da memória.



Fig. 03 - Organograma explicativo sobre os processos de consolidação, reconsolidação e esquecimento.

As memórias também podem ser classificadas diante da sua natureza, não declarativas (implícitas) e declarativas (explícitas). A memória declarativa é aquela em que não se consegue utilizar palavras para descrever a lembrança ou como é evocada, e são divididas em não associativas (Hábitos) e associativas

(condicionamento operante). Já a memória explícita é aquela que pode ser explicada de forma fácil, com palavras, e pode ser dividida também em não-associativas (Exploração) e associativas (Memória espacial) (Fig. 05).

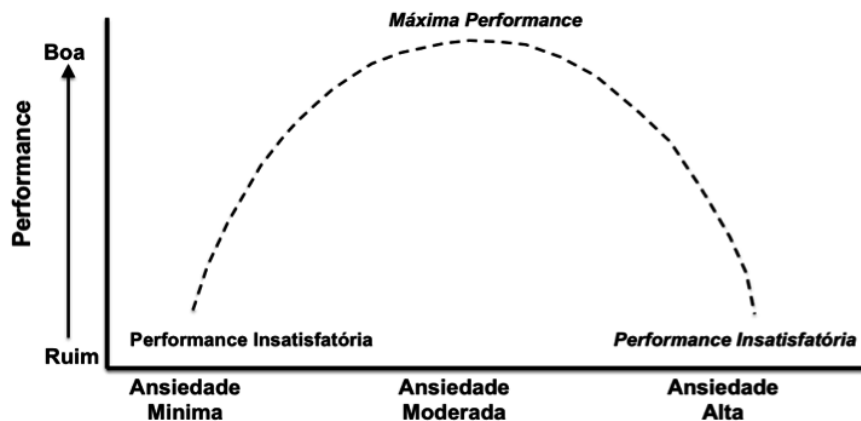


Fig. 04 – Curva de performance de aprendizado em relação a ansiedade. Imagem adaptada de Yerkes, Dodson, 1908.

As memórias episódicas são aquelas que são momentos vividos e que possuem informações sobre fatos do cotidiano, como o dia em que ganhou o presente de natal, jantou a primeira vez com o sogro ou andou de bicicleta. Já as memórias semânticas são aquelas que não se consegue descrever com palavras a memória, o indivíduo simplesmente lembra, como a música, a biologia, a matemática.

Para que ocorra a formação das memórias declarativas ou explícitas, é necessário que ocorra a associação uni ou poli modal das áreas associativas (frontal, temporal e lobos parietais) até que chegue no processo final que é a região hipocampal. Esse estímulo passa pelo córtex perirrinal e parahipocampal, córtex entorrinal, giro denteado, região CA3 e terminando na região CA1. (IZQUIERDO e MEDINA, 1997; IZQUIERDO et al., 2002; PRADO et al., 2006; BENETTI et al., 2009).

Há fortes evidências da atuação da região CA1 do hipocampo dorsal para a consolidação e a reconsolidação da memória de diferentes tipos de memória. (LEE et al., 2004; ALBERINI, 2005; ROSSATO et al., 2007; RADISKE et al., 2017). A reconsolidação da memória tem sido muito pesquisada com o intuito de entender os mecanismos presentes para a sua formação. Ela é caracterizada por uma desestabilização de uma memória previamente consolidada para uma atualização e

posterior estabilização (DUDAI e EISENBERG , 2004) sendo considerado, por alguns autores, como um processo contínuo e interminável de consolidação (MCKENZIE e EICHENBAUM, 2012). Afinal, ao labilizar uma memória consolidada, pode-se adicionar novas informações aprendidas ao traço mnemônico original (DUDAI e EISENBERG , 2004; MCKENZIE e EICHENBAUM , 2011). Essas alterações ocorrem devido ao processo de reativação da memória, momento em que o indivíduo é submetido ao mesmo ou a um estímulo similar ao vivido anteriormente, favorecendo assim a consolidação da memória.

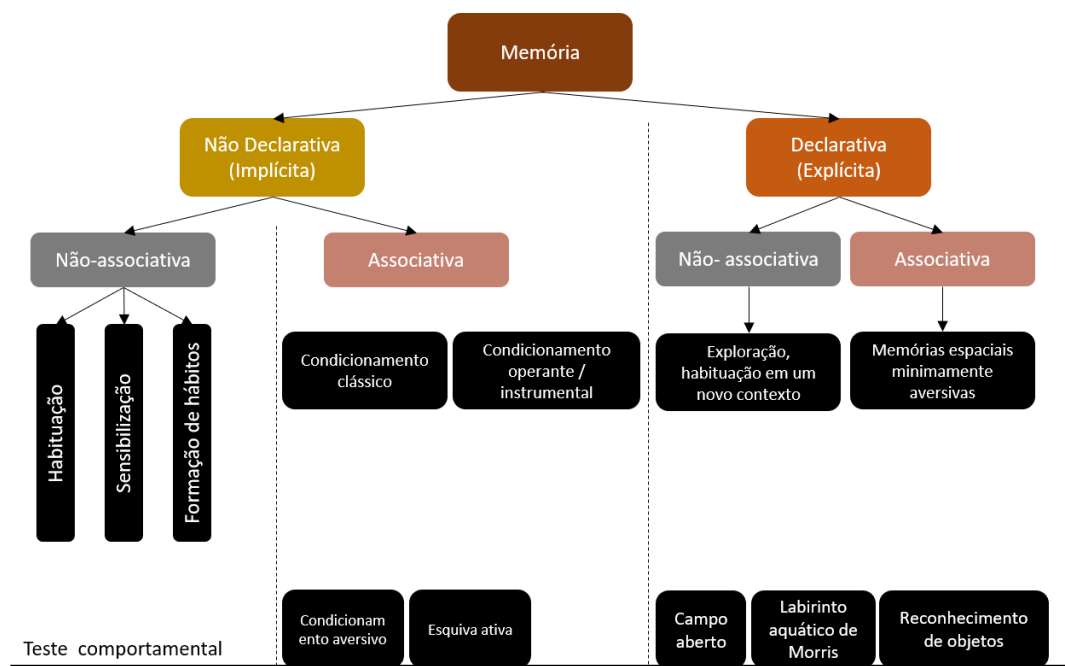


Fig. 05 – Classificação da memória segundo a sua natureza associativa ou não associativa

Adaptado de: Quillfeldt JA, 2006. Behavioral Methods to Study Learning and Memory in Rats, Em: Animal models and tools in ethical biomedical research.

Para que ocorra a consolidação da memória de longa duração é necessário que diversos neurotransmissores sejam liberados e diversas cascatas neuronais sejam acionadas, tendo por consequência a fosforilação e síntese proteica, expressão gênica e ativação de fatores de transcrição, como a ativação proteína quinase A (PKA) dependente de AMP cíclico, que é o responsável pela fosforilação da proteína de ligação do elemento de resposta ao AMPc (CREB) (ROSSATO et al, 2007; BENETTI et al, 2009; HU et al, 2013). Além disso, sabe-se que os neurotransmissores são responsáveis por gerar e modular estes estímulos ao longo das fases de consolidação

e reconsolidação da memória, entre eles estão a acetilcolina (VARGAS et al., 2014; CAMILO et al., 2001), a noradrenalina (MCREYNOLDS et al, 2014), a histamina (BENETTI et al., 2015) e a dopamina (VARGAS et al, 2014, ROSSATO et al, 2007; WANG et al, 2014).

A dopamina, entre tantas funções no SNC, possui um papel primordial na modulação da reconsolidação de memórias dependentes do hipocampo (ROSSATO et al, 2017; BENETTI et al., 2015). A dopamina é a principal catecolamina do sistema nervoso central envolvida no aprendizado e possui um papel essencial sobre a cognição (SALLES et al., 2013). Ela é sintetizada principalmente na Substância Nigra (SN) e na Área Tegmental Ventral (VTA) e possui função na regulação da motivação, humor, atividade motora, integração neuroendócrina e memória (HORN et al, 1979; FLUCKIGER et al, 1987). Sua produção ocorre pela ativação da enzima tirosina hidroxilase, que converte o aminoácido tirosina em L-DOPA que, posteriormente, será descarboxilada para a formação da dopamina. A dopamina possui dois tipos de famílias de receptores, família D1 (Receptores D1 e D5) e D2 (Receptores D2, D3 e D4). Diversos estudos têm demonstrado que os receptores D1 utilizam o AMPc como segundo mensageiro para modular a proteína quinase A (PKA) (FREY et al, 1993). Já os receptores D5, atuam pelo sistema fosfatidilinositol-3-quinase para regulação da proteína quinase C (PKC), ambas enzimas responsáveis pelo processo de fosforilação proteica (FELDER et al, 1989, BENETTI et al, 2015). Os corpos destes neurônios dopaminérgicos estão situados na SN e VTA e seus axônios realizam diversas conexões com diferentes áreas cerebrais como córtex pré-frontal, giro cingulado e hipocampo.

Alguns estudos demonstraram também que a redução da oferta de dopamina, pelo uso de antagonistas de receptores da família D1 ou lesão na região CA1 do hipocampo, prejudicam a formação e a consolidação da memória na tarefa de reconhecimento de objetos (RO) uma memória declarativa não associativa (CLARKE et al, 2011; BROADBENT et al, 2009). A utilização do antagonista de receptores da família D1 (SCH-23390) tem sido amplamente utilizada para compreender a ação da dopamina no hipocampo, mostrando que este neurotransmissor desempenha um importante papel na região CA1 hipocampal dorsal e na amígdala basolateral na aquisição da memória de medo (HEATH et al, 2015), na memória espacial (SILVA et al, 2012) e na consolidação da memória da tarefa de reconhecimento de objetos (BENETTI et al, 2015). Por outro lado, o aumento na oferta destes neurotransmissores

e captação pelos receptores acarretam no aumento do potencial de longa duração nos receptores D1/D5 e na produção de AMPc (OTMAKHOVA e LISMAN, 1996), o que auxilia a consolidação desta memória.

A neuroplasticidade hipocampal induzida pela dopamina, dependente dos receptores dopaminérgicos D1/D5, que são amplamente expressados na região CA1 do hipocampo, desempenha papel chave mediando a comunicação entre a VTA e o hipocampo na neuromodulação da memória, mostrando um papel crucial da dopamina nos processos de formação da memória (HANSEN e MANAHAN-VAUGHAN, 2014). Estudos clínicos têm demonstrado que as alterações no processo de liberação de dopamina, associada à ligação ao receptor do neurônio pós-sináptico e recaptção no neurônio pré-sináptico, estão diretamente ligadas com a esquizofrenia e o transtorno do déficit de atenção com hiperatividade (TDAH) (JEONG et al.,2015).

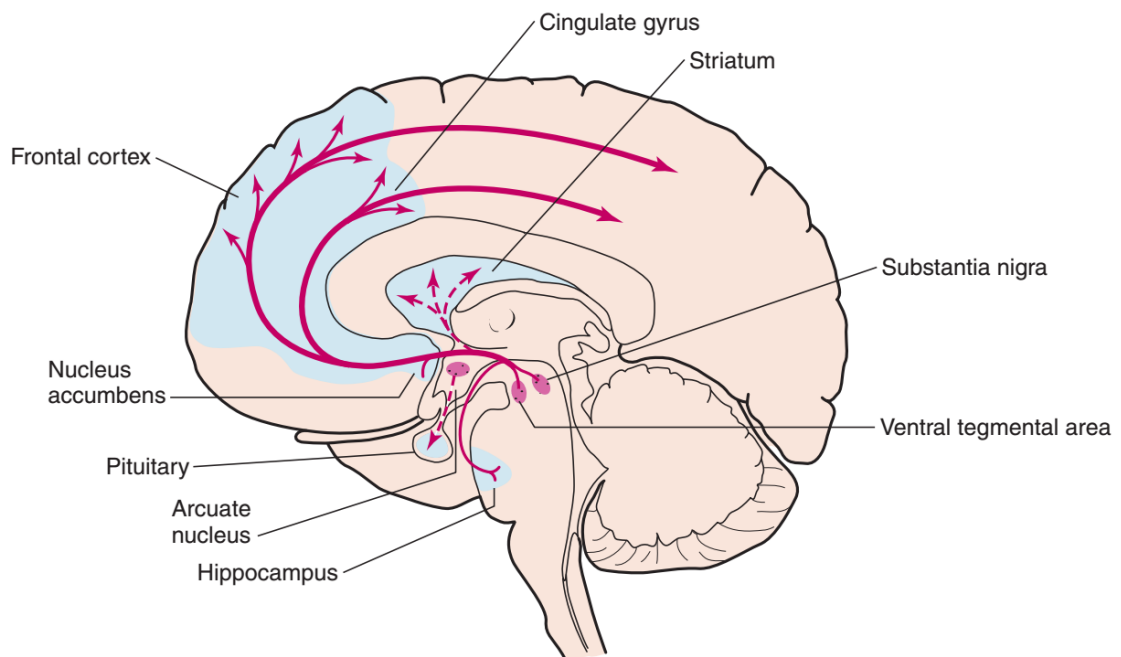


Fig 06. Projeções dopaminérgicas provenientes da substância nigra e área tegmental ventral

O TDAH ainda não possui uma etiologia bem compreendida, mas acredita-se que esta patologia afete, principalmente, o sistema dopaminérgico, devido ao aumento, em torno de 70%, dos transportadores de dopamina (DAT), proteínas responsáveis pela recaptção destes neurotransmissores (DOUGHERTY et al, 1999; JEONG et al, 2015). Dessa forma, não é possível manter níveis adequados de dopamina entre os neurônios, dificultando as sinapses químicas dopaminérgicas. Até

o momento, a única forma para estes pacientes serem diagnosticados é clínica e os sintomas são a instabilidade de humor, a falta de concentração e dificuldade no aprendizado. O tratamento é realizado com eficácia utilizando drogas psicoativas que possuam o cloridrato de metilfenidato como princípio ativo, sendo a primeira escolha para o tratamento (CHAI et al, 2012; ANVISA, 1998). Estudos realizados demonstraram que a utilização desta droga psicoativa reduz a ansiedade, a agitação, melhoram a memória de trabalho e a atenção quando administradas cronicamente (BIEDERMAN, 2006; TAKEUCHI et al, 2013).

O cloridrato de metilfenidato, mais conhecido com o nome comercial de Concerta® ou Ritalina®, é um fármaco psicoestimulante leve do sistema nervoso central, que tem como principais efeitos a melhora da atenção, da concentração e redução do comportamento impulsivo (WOOD et al., 2014; RAJALA et al, 2012). Este fármaco é análogo à anfetamina e atua por aumentar o estímulo da VTA (LISMAN e GRACE, 2005), aumentando a produção de dopamina e conseqüentemente os níveis de noradrenalina e dopamina extracelular no córtex pré-frontal, estriado e hipocampo (ARNSTEN e DUDLEY, 2005). Um estudo realizado por Volkow, identificou que quando indivíduos que possuíam baixa concentração de receptores dopaminérgicos da família D2 e dependência química, quando ingeriram a Ritalina®, descreveram uma sensação agradável, de prazer, diferentemente de indivíduos com alta concentração de receptores da família D1 que relataram uma sensação desagradável (VOLKOW e SWANSON, 2003). O cloridrato de metilfenidato atua como um inibidor competitivo dos transportadores dopamina e noradrenalina, impedindo que sejam recaptados pelo neurônio pré-sináptico, o que resulta no acúmulo de dopamina na fenda sináptica (SEEMAN e MADRAS, 1998). A utilização desta droga apresenta diferentes níveis de pico plasmático dependendo da forma como é administrada, sendo que quando administrada por via oral, o pico de concentração plasmática é encontrado entre 60 e 90 minutos (DAFNY e YANG, 2006; VOLKOW et al, 1998). Weikop e colaboradores, provaram em 2007, que o uso do metilfenidato acarreta aumento de dopamina e noradrenalina na região do hipocampo, ambos responsáveis por aumentar a potencialização a longo prazo e a depressão a longo prazo (WEIKOP et al., 2007), influenciando diretamente na plasticidade sináptica, na consolidação e possivelmente na reconsolidação da memória. Diversos autores concluíram que a reconsolidação não é uma recapitulação ou repetição da consolidação, sendo que possui tempo para a formação, estruturas cerebrais e processos moleculares

diferentes da consolidação (RADISKE et al, 2017; IZQUIERDO I, 2011). Por isso, estudos têm sido realizados no intuito de compreender os efeitos do metilfenidato principalmente na consolidação da memória (CARMACK et al, 2014; TAUKULIS et al., 2014; HEYSER et al., 2013; LEVIN et al., 2011, MIORANZZA et al., 2011). Até este momento, não foram encontrados na literatura muitos trabalhos experimentais em animais que utilizem o metilfenidato, e mimetizem os efeitos da via dopaminérgica VTA para o hipocampo, na busca para compreender os mecanismos de memória envolvidos na tarefa de reconsolidação da memória de RO objeto de estudo deste trabalho.

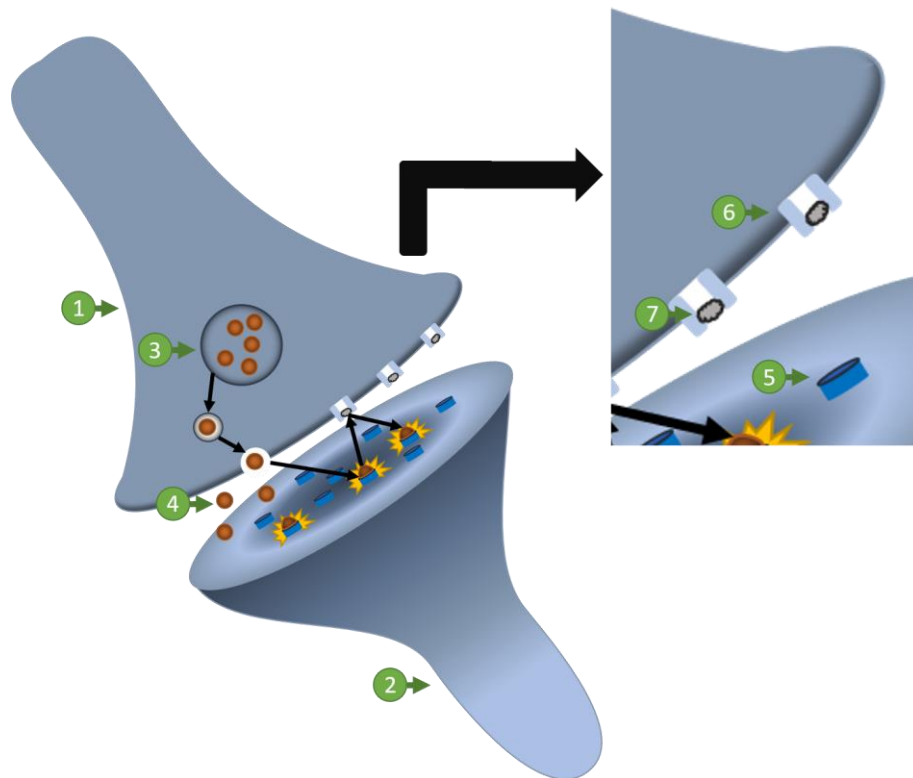


Fig. 07 - Mecanismo de ação do metilfenidato sobre a recepção de dopamina dos neurônios dopaminérgicos. Imagem ilustrando atuação do cloridrato de metilfenidato, inibindo a degradação da dopamina, pelo bloqueio das proteínas receptoras do neurônio pré-sináptico. (1) neurônio pré-sináptico, (2) neurônio pós-sináptico, (3) vesícula pré-sináptica, (4) dopamina, (5) receptores dopaminérgicos, (6) proteínas responsáveis pela recepção de dopamina, (7) cloridrato de metilfenidato.

Portanto, embora se tenha amplo entendimento acerca dos mecanismos gerais da reconsolidação, o entendimento sobre quais as redes específicas de acesso do

metilfenidato sobre a cognição e reconsolidação da memória de RO, ainda tem sido estudado. Assim, pesquisar como a administração oral do metilfenidato, associada ao uso de antagonistas dopaminérgicos (D1/D5) centrais na região CA1 do hipocampo dorsal de ratos, pode auxiliar na compreensão dos mecanismos mediadores dos seus efeitos, bem como identificar seus efeitos como um possível potencializador na persistência ou melhora da memória de RO.

2 JUSTIFICATIVA

É sabido que o uso do metilfenidato reduz a recaptção de dopamina no sistema nervoso central e que a maior disponibilidade deste neurotransmissor atua em neurônios da região CA1 hipocampais, podendo modular a reconsolidação da memória de objetos, visto que no hipocampo há grande densidade dos receptores dopaminérgicos tipo D1 e D5. Desse modo, a hipótese deste estudo foi que o uso do metilfenidato infundido intraperitoneal, antes pré ou pós a fase de reativação, poderia atuar incrementando o tempo da retenção de uma memória no teste da reconsolidação da memória de RO.

Baseado nas evidências apresentadas anteriormente, desenvolvemos este projeto de pesquisa baseado em um modelo com animais (ratos Wistar), e assim elucidar, pelo menos em parte, os efeitos neurofisiológicos da administração via i.p. do metilfenidato sobre a memória de longa duração e elucidar interação dos receptores dopaminérgicos da família D1/D5 no processo de reconsolidação da memória de reconhecimento de objetos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Investigar os efeitos do uso do metilfenidato I.P., sobre a reconsolidação da memória de RO em ratos machos Wistar.

3.2 Objetivos Específicos

- Estudar os efeitos que a administração I.P. de metilfenidato imediatamente após a sessão de reativação e a infusão do antagonista dopaminérgico SCH-23390 intra região CA1 sobre o teste da reconsolidação da memória do RO.

- Compreender os efeitos que a administração Intra região CA1 do hipocampo dorsal de ratos, após a fase de reativação, trazem para a reconsolidação da memória na tarefa de RO.

- Estudar a importância da ativação da via do VTA sobre a ativação/inativação dos receptores dopaminérgicos (D1/D5) na região CA1 do hipocampo dorsal de ratos submetidos ao teste da reconsolidação da memória de RO.

- Esclarecer se o metilfenidato pode melhorar o tempo de retenção da memória no RO, no teste de reconsolidação da memória de objetos, em diferentes períodos na tarefa de RO.

- Compreender se os receptores dopaminérgicos da família D1 são os principais responsáveis para a reconsolidação da memória na tarefa de RO.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os experimentos descritos a seguir, foram realizados após a aprovação deste projeto de pesquisa pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) desta Universidade.

4.1 Animais e condições experimentais

O estudo foi composto por uma amostra de 216 ratos machos Wistar da espécie *Rattus norvegicus*, fornecidos pelo Centro de Reprodução Experimental de Animais de Laboratório da UFRGS (CREAL). Estes animais foram transferidos para o biotério setorial do Instituto de Ciências Básicas de Saúde (ICBS), onde foram mantidos em caixas plásticas forradas com maravalha e mantidos no limite máximo de 4 animais por caixa (50 x 40 x 23 cm).

Todos foram expostos a um ciclo claro/escuro de 12 horas (início ciclo claro às 07h00min e início em ciclo escuro às 19h00min) com água e ração à vontade e a uma temperatura ambiente controlada de $22^{\circ}\pm 1^{\circ}$ C.

Todos os experimentos foram realizados de acordo com as normas dos “*Principles of laboratory animal care*” (NIH publication N° 85-23, revised 1996) e de acordo com a Lei de procedimentos para o uso científico de animais – Lei n 11.794 (BRASIL, 2008) e da portaria número 1.332, de 3 de dezembro de 2014 publicada no Diário Oficial da União, Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação.

Todos os animais foram mantidos no biotério do ICBS até possuírem em torno de 300g. Após este período, os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico estereotáxico, para a colocação das cânulas em região CA1 no hipocampo dorsal bilateralmente, para posterior administração do antagonista dos receptores da família D1 (SCH-23390) ou salina.

4.2 Fármacos e sua via de administração

Para a realização deste estudo foram selecionadas duas drogas e soro fisiológico a 0,9% (salina). As drogas selecionadas foram o metilfenidato, um fármaco psicoativo que realiza o bloqueio da recaptção da dopamina pelos neurônios pré-sinápticos e o SCH-23390, uma droga antagonista dos receptores da família D1, que

tem a função de bloquear a captação de dopamina pelos receptores dopaminérgicos D1 e D5 pelos neurônios pós-sinápticos.

A salina será utilizada como solvente e veículo na dissolução das drogas. Cada grupo recebeu duas substâncias diferentes. O metilfenidato (Sigma Aldrich, USA com 98% de pureza - 1mg/kg/peso corporal) e a salina (1mg/kg/peso corporal), foram ofertados por injeção I.P. e infusão central (1,5 µg / µL/ bilateral). O SCH-23390 (Sigma Aldrich, USA com 98% de pureza – 1,5 µg / µL/ bilateral) e a salina (1,5 µg / µL/ bilateral), foram infundidos na região CA1 do hipocampo.

Para os antagonistas de receptores da família D1, foi identificado que a dose de 1,5 µg/µL/bilateral é ideal para que ocorra bloqueio dos receptores dopaminérgicos sem produzir alterações comportamentais (MENEZES et al. 2015). As fases do experimento comportamental e suas divisões, bem como o momento da administração das substâncias estão no organograma (Fig. 01). Abaixo estão apresentados os grupos do experimento comportamental:

4.3 Protocolo de cirurgia estereotáxica

Primeiramente os animais foram anestesiados com xilazina (10 mg/kg) pH = 5.5 e ketamina (100 mg/kg) pH entre 3,5 e 5,0 via intraperitoneal e solução com volume de 1mL/kg de peso corporal. Após a anestesia fazer efeito, o animal foi fixado no aparelho de estereotaxia (Fig. 08) e foi realizada uma incisão que removerá uma porção aproximada de 1 cm da pele na região dorsal do crânio. Com o auxílio de uma tesoura, o experimentador expõe a calota craniana e realiza a remoção completa de tecidos, permitindo a visualização do bregma e o lambda que servirão de “guias” para medir as coordenadas onde as cânulas foram implantadas bilateralmente. As cânulas-guia de 27-gauge de 0,9 mm foram posicionadas 1,0 mm acima da região CA1 do hipocampo dorsal (região alvo na infusão de fármacos), de acordo com as coordenadas obtidas do Atlas de Paxinos, sendo elas as seguintes: Antero Posterior (AP) = - 4,2 mm; Médio Lateral (MD) = ± 3,0 mm; Dorso Ventral (DV) = - 1,3 mm; Inclinação Latero-Lateral (INCL LL) = 0° (Paxinos G, and Watson C, 1986) (Fig. 09). Após o termino da cirurgia extereotáxica os animais foram alocados em caixas separadas aquecidas, até que todos os animais da mesma caixa estivessem acordados e assim foram alocados juntos novamente. Estes animais foram aquecidos com cobertores e luz incandescente e receberam o tratamento para dor. Foi

administrado cloridrato de Tramadol 20% (3-5mg/kg) pH=5,5 (<http://chemicaland21.com/lifescience/phar/TRAMADOL%20HCl.htm>) intraperitoneal, de 8 em 8 horas durante o 3º e o 5º dia após a cirurgia estereotáxica, de acordo com a avaliação e, caso necessitassem, ficariam em recuperação. No dia seguinte ao procedimento cirúrgico, o experimentador iniciou a manipulação diária (4 dias) de cada animal individualmente como pré-requisito para iniciar qualquer procedimento comportamental. Neste procedimento experimental, o grau de severidade é moderado.



Fig. 08 – Vista geral do equipamento de cirurgia estereotáxica utilizado – Marca KROPF. Alemanha

4.4 Reconhecimento de objetos (RO)

Para identificar como o tratamento interferiu no aprendizado e formação da memória dos animais, foi utilizado o teste de reconhecimento de objetos adaptado de Ennaceure Delacour (1988 apud BENETTI et al., 2009). Para a realização deste teste, foi necessário uma caixa quadrada com dimensões de 60cm x 60cm x 45 cm, sendo 3 paredes de madeira e uma frontal em vidro transparente.

Antes de realizar o teste, os ratos foram submetidos a um protocolo de ambientação, no qual foram colocados na caixa durante 4 dias consecutivos por 20 minutos/dia, para que pudessem explorar livremente o ambiente.

Após o período de ambientação, foi realizada a primeira fase que consistiu em colocar dois objetos diferentes (A e B), não maiores que 10 cm, dentro da caixa e deixar o animal explorar livremente durante 5 minutos (fase denominada de treino). Nesta fase, cada animal foi colocado de forma delicada entre os objetos, para livre exploração do ambiente/objetos por um período de 5 minutos.

A segunda fase / sessão de reativação, foi realizada 24 horas após a sessão do treino. Esta fase de reativação consistiu em realizar a tarefa de reconhecimento de objetos, utilizando o mesmo protocolo da fase treino, mas um dos objetos foi substituído por um objeto novo (A e C) e os animais foram colocados novamente dentro da caixa, por 5 minutos, para avaliar a exploração dos objetos.

A terceira fase / sessão de reconsolidação da memória de objetos, consistiu em repetir a tarefa de RO. Na fase de reconsolidação os animais foram expostos novamente a outro objeto novo (D), mantendo assim o objeto apresentado na primeira e na segunda exposição (A), por cinco minutos, sendo avaliado o tempo de exploração de cada um dos objetos. A sessão consistiu em realizar o mesmo protocolo utilizado nas duas exposições anteriores 24 horas, 3 dias ou 7 dias após a fase de reativação. Neste procedimento experimental, o grau de severidade é leve.

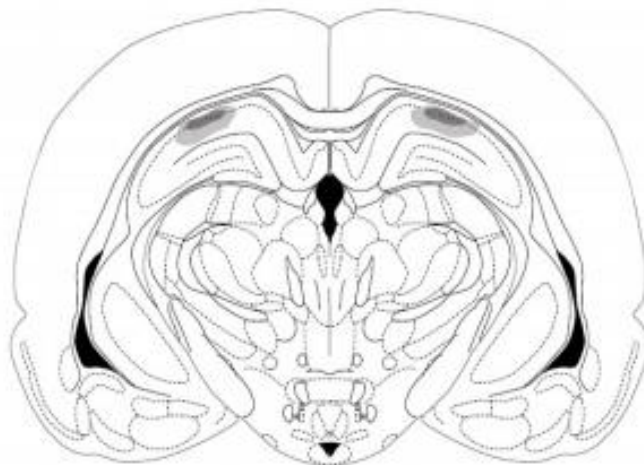


Fig. 09 - Ilustração do encéfalo de rato e onde foram infundidas as drogas - A ilustração mostra a localização da implantação das cânulas de infusão na região CA1 do hipocampo dorsal. Fonte: Atlas de Paxinos e Watson, 1986.

4.5 Descarte de materiais e resíduos

Os tecidos oriundos dos animais, assim como suas carcaças e outros resíduos como materiais contaminados e luvas, foram depositados em sacolas brancas para

transporte de material infectante. Os materiais perfuro cortantes foram descartados em caixas de papelão amarelo, específicas para esse tipo de resíduo (Descarpack®), e identificadas como material infectante. O lixo biológico e materiais perfuro cortantes foram recolhidos pela empresa terceirizada responsável pelo recolhimento da UFRGS. Resíduos químicos e vidrarias contaminadas foram encaminhadas ao Centro de Gestão e Tratamento de Resíduos Químicos, no Instituto de Química da UFRGS.

4.6 Medidas de biossegurança

Foram aplicadas todas as Normas de Segurança e Procedimentos de Boas Práticas de Laboratório, assim como todos os experimentos estiveram de acordo com as normas dos “Principles of laboratory animal care” (NIH publication Nº 85-23, revised 1996). Foram utilizadas luvas de látex e jalecos para o trabalho em bancada. Todas as medidas de proteção aos pesquisadores foram asseguradas, inclusive medidas de proteção a fim de evitar contato cutâneo com os reagentes utilizados.

4.7 Eutanásia

A eutanásia dos animais utilizados em todos os experimentos foi realizada por decapitação. A decapitação foi realizada por um experimentador experiente em uma sala limpa, silenciosa e separada dos outros animais. Um animal por vez foi levado à sala de decapitação, evitando o estresse dos demais animais.

4.8 Desenho do estudo

Os animais foram providos pelo CREAL/UFRGS e foram alocados no biotério setorial do ICBS. Após esses animais possuírem aproximadamente 300g, foram realizados os procedimentos estereotáticos para o implante de duas cânulas posicionadas bilateralmente na região CA1 do hipocampo. A cirurgia estereotática consistiu em anestésiar os ratos com Ketamina (100 mg/kg) e Xilazina (10 mg/kg), e o crânio do animal ser posicionado no aparelho estereotático, sendo que posteriormente foram utilizadas as coordenadas para o implante das cânulas em região CA1 do hipocampo dorsal. Após o término do implante das cânulas, foi confeccionado um capacete com a utilização de um parafuso, fixados no crânio, e

cimento acrílico, para que não ocorresse o deslocamento das mesmas. Antes dos ratos acordarem era aplicada uma injeção intraperitoneal de cloridrato de Tramadol 20% (5 mg/kg) pH=5,5 administrado de 8 em 8 horas durante 3 dias após a cirurgia estereotáxica e de acordo com a avaliação do estado do animal (<http://chemicalland21.com/lifescience/phar/TRAMADOL%20HCl.htm>).

Três dias após a cirurgia, os animais foram expostos a caixa que seria realizado o experimento, por 3 dias consecutivos, por um período de 20 minutos/dia, pois o experimento não teve a intenção de analisar a relação com o contexto e sim a identificação dos objetos. Após este período de 6 dias, todos os animais realizaram a tarefa de reconhecimento de objetos pelo protocolo de reconsolidação da memória. A tarefa que foi realizamos constituiu-se de três momentos: fase treino, que foi realizada utilizando dois objetos (Objeto A e objeto B); fase reativação, que ocorreu 24 horas após a fase de treino e foi retirando o objeto B e posicionando outro objeto no local (Objeto C); e fase teste de reconsolidação, na qual foi retirado o objeto C e posicionado um novo objeto (Objeto D). A fase de teste de reconsolidação foi realizada 24 horas após a reativação, 03 dias após a reativação e 07 dias após a reativação. Diante dos nossos experimentos, as drogas foram administradas em dois diferentes momentos, pré fase de reativação e pós fase de reativação. Os grupos estão descritos a seguir.

Grupos infusão pré fase de reativação.

1- Metilfenidato infundido I.P. (1,0 mg/kg/peso corporal) 30 minutos pré fase de reativação e avaliado com o teste de reconsolidação da memória 24 horas após.

2- Metilfenidato infundido I.P. (1,0 mg/kg/peso corporal) 30 minutos pré fase de reativação e avaliado com o teste de reconsolidação da memória 72 horas após.

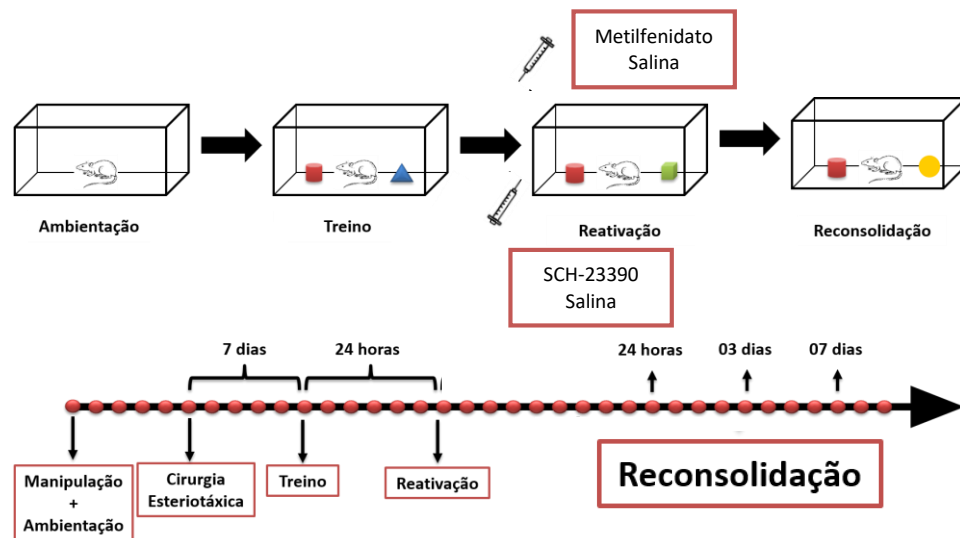


Fig. 10 - Desenho experimental comportamental primário mostrando as diferentes fases do experimento e o momento de infusão das drogas na memória de reconhecimento de objetos e a relação temporal. Inicialmente, todos os animais foram expostos à fase treino (A + B) 24 horas após esta fase, os animais foram expostos à fase de reativação, na qual os animais foram recolocados no campo aberto e reexpostos a um objeto familiar e um objeto novo (A + C). Trinta minutos antes de iniciar a fase de reativação os animais receberam via I.P. o MTF ou Salina (1mg/kg/peso corporal) concomitante a infusão intra CA1 de SCH-23390 ou salina (1.5 µg/µl/bilateral). O teste da reconsolidação consiste em expor o animal novamente ao campo aberto na presença de mesmo objeto familiar (A) apresentado nas duas sessões anteriores com outro objeto novo (D). O teste da reconsolidação da memória no reconhecimento de objetos será realizado 24 horas e 03 dias após a reativação.

Grupos infusão pós fase de reativação.

- 3- Metilfenidato infundido I.P., realizando curva dose/resposta nas doses de 0,5, 1,0 e 2,0 mg/kg/peso corporal, após a fase de reativação e avaliado com o teste de reconsolidação da memória 24 horas após.
- 4- Metilfenidato infundido intra região CA1 na dose de 10Mmol após a fase de reativação e avaliado com teste de reconsolidação 24 horas após.
- 5- Metilfenidato infundido I.P. (1,0 mg/kg/peso corporal) e SCH-23390 intra CA1 (1,5 µg / µL/ bilateral) após a fase de reativação e avaliado 24 horas após.
- 6- Metilfenidato infundido I.P. (1,0 mg/kg/peso corporal) após a fase de reativação e avaliado com o teste de reconsolidação da memória 7 dias após a fase de reativação e avaliado com o teste de reconsolidação da memória 07 dias após.
- 7- Metilfenidato infundido I.P. (1,0 mg/kg/peso corporal) associado a infusão de SCH-23390 intra CA1 (1,5 µg / µL/ bilateral) após a fase de reativação e avaliado com o teste de reconsolidação da memória após 7 dias

SCH-23390
Salina

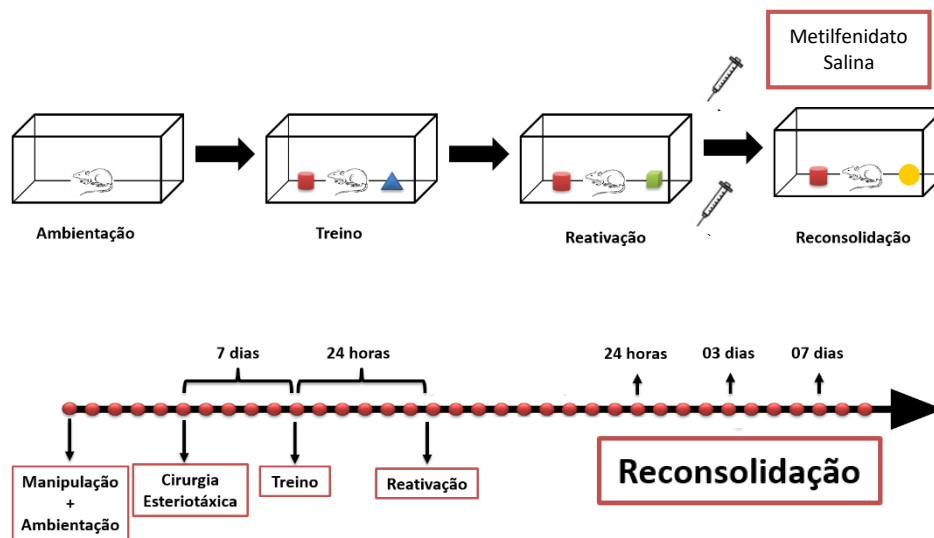


Fig. 11 - Desenho experimental comportamental secundário mostrando as diferentes fases do experimento e o momento de infusão das drogas na memória de reconhecimento de objetos e a relação temporal. Inicialmente, todos os animais foram expostos à fase treino (A + B) 24 horas após esta fase, os animais foram expostos à fase de reativação, na qual os animais foram recolocados no campo aberto e reexpostos a um objeto familiar e um objeto novo (A + C). Imediatamente após a fase de reativação os animais receberam via I.P. o Metilfenidato ou Salina (1mg/kg/peso corporal) e foram infundidos intra CA1 com SCH-23390 ou salina (1.5 µg/µl/bilateral). O teste da reconsolidação consiste em expor o animal novamente ao campo aberto na presença de mesmo objeto familiar (A) apresentado nas duas sessões anteriores com outro objeto novo (D). O teste da reconsolidação da memória no reconhecimento de objetos foi realizado 24 horas, 03 dias e 07 dias após a reativação.

Com estes dados conseguimos avaliar o possível efeito do metilfenidato em uma linha temporal de horas e/ou dias da memória, com a reconsolidação da memória pela tarefa de reconhecimento de objetos. Após a realização de todos os experimentos comportamentais propostos neste estudo, foi aplicada uma injeção intraperitoneal com sobre dose de anestésico – Tiopental 5/10% usado, portanto para eutanásia. Além disso, após a infusão do tiopental e morte dos animais, todos os animais foram decapitados com o uso da guilhotina, para se certificar de não haver sinais vitais recorrentes e somente então armazenados em freezer -20° C para posterior descarte, como descrito no item descarte de resíduos. O grau de severidade da deste procedimento de eutanásia é, portanto sem recuperação.

4.9 Análise estatística e cálculo amostral

O tamanho da amostra foi baseado em estudos anteriores tendo como referência o teste experimental e a droga antagonista utilizada nestes estudos (ROSSATO et al., 2007; ROSSATO et al., 2017; bem como estudos anteriores do grupo de pesquisa (BENETTI et al., 2008; BENETTI et al., 2013a, 2013b; BENETTI et al., 2015a , 2015b) sendo estimado entre 9 a 11 animais para cada grupo experimental.

Para a análise dos dados coletados foi utilizado o programa Excel for Windows® e GraphPad Prism versão 5 (GraphPad Software®, San Diego, CA). Inicialmente foi testada a normalidade dos dados com o teste de Kolmogorov-Smirnov e posterior a essa análise, foi utilizado o teste t-Student, seguido do pós-teste Newman-Keuls no qual a possibilidade de diferença estatística foi baseada na média hipotética de 50% acima ou abaixo do percentual de exploração de cada objeto para cada coluna de dados apresentados nos gráficos. O nível de significância considerado em todas as análises será de $P < 0,05$.

4.10 Aspectos éticos

Posteriormente à aprovação pela Comissão Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, este projeto de foi submetido à Comissão de Ética para Uso de Animais da UFRGS.

5 RESULTADOS

Buscando verificar o papel dos receptores dopaminérgicos da família D1 na reconsolidação da memória de reconhecimento de objetos, foram definidos diferentes momentos para a infusão do MTF e do SCH-23390, bem como estabelecida uma linha temporal para determinar se, e em qual momento, este sistema poderia estar envolvido no processo de reconsolidação.

Efeitos do metilfenidato na reconsolidação da memória na tarefa de reconhecimento de objetos (Curva dose/resposta) – Infusão intraperitoneal imediatamente após da fase de reativação

De acordo com a Fig. 12, não houve diferença de percentual de exploração entre o objeto A e o objeto B na sessão de treino. Foi realizada então a sessão de reativação e observou-se que houve diferença do tempo de exploração total do objeto C, comparado ao objeto A ($P < 0,001$), resultado já esperado pois até este momento não havia sido realizada nenhuma intervenção.

Imediatamente após a fase de reativação foram infundidas as concentrações pré-estabelecidas. Quando analisado o teste de reconsolidação da memória, verificou-se que os animais tratados com a dose de 1,0 mg/kg não apresentaram alteração na formação da memória

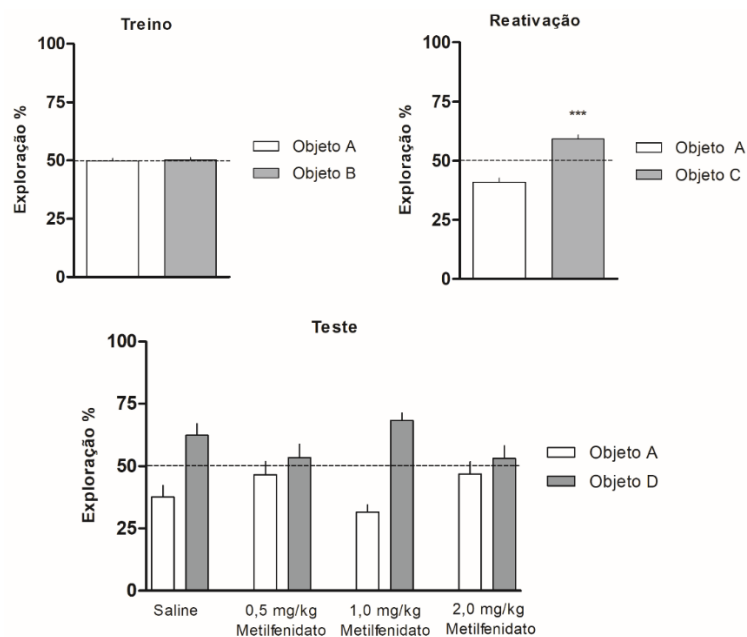


Fig. 12 - Curva dose-resposta da ação do metilfenidato, infusão I.P., no teste da reconsolidação da memória de R.O. 24 horas após a fase de reconsolidação. A sessão treino consistia em colocar o animal no

campo aberto na presença de dois objetos novos A e B na qual o animal explorar estes objetos durante uma sessão de 5 min. Vinte e quatro horas após a sessão do treino, estes animais foram expostos novamente ao campo aberto, contudo o objeto A foi mantido e foi retirado o outro objeto, posicionando um novo no mesmo local (A e C), esta fase denominada fase de reativação. Imediatamente após a fase de reativação os animais receberam a injeção de 1 mg/kg/peso corporal do Metilfenidato ou salina. Os animais retornaram para a caixa moradia e para a rotina do biotério e foram testados 24 horas após no campo aberto, neste momento foi alterado novamente um dos objetos, mantendo o objeto apresentado na fase treino e reativação (A e D). Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média da porcentagem de tempo total de exploração para $p < 0,05$ de significância. *** $P < 0,001$ e ** $P < 0,01$ e * $P < 0,5$ no teste t-Student. Grupo salina (N=7-10), Grupo metilfenidato 0,5 (N=7), Grupo metilfenidato 1,0 (N=7), Grupo metilfenidato 2,0 (N=8).

Efeitos do metilfenidato na reconsolidação da memória na tarefa de reconhecimento de objetos – Infusão central de 10Mmol imediatamente após da fase de reativação

De acordo com sessão de treino, não houve diferença de exploração entre o objeto A e o objeto B entre o percentual total de exploração. Na sessão de reativação, observou-se que houve diferença do tempo de exploração total do objeto C comparado ao objeto A ($P < 0,001$), resultado já esperado pois até este momento não havia sido realizada nenhuma intervenção, demonstrando a lembrança dos animais. Imediatamente após a fase de reativação foi infundido 1,0 mL intra-hipocampal bilateralmente, na concentração de 10 μ mol de metilfenidato.

Quando analisado o teste de reconsolidação da memória, verificou-se que houve prejuízo para a consolidação da memória dos animais tratados com o metilfenidato ($P < 0,001$), demonstrando que a utilização de um estimulante dopaminérgico interfere na formação da memória de longa duração após 24 horas.

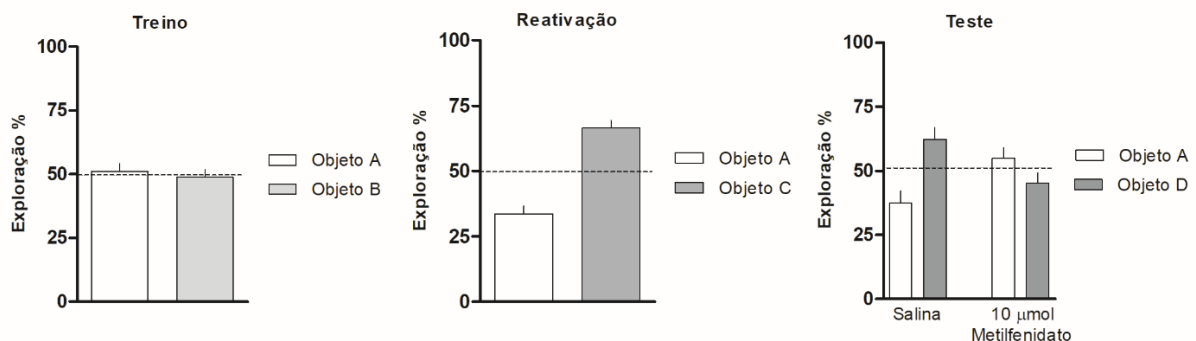


Fig. 13 - Efeitos da infusão I.P. de metilfenidato imediatamente após a sessão de reativação, sobre o teste de reconsolidação da memória na tarefa de R.O. 24 horas após a sessão de reativação. A sessão treino consistia em colocar o animal no campo aberto na presença de dois objetos novos A e B na qual o animal explorar estes objetos durante uma sessão de 5 min. Vinte e quatro horas após a sessão do treino, estes animais

foram expostos novamente ao campo aberto, contudo o objeto A foi mantido e foi retirado o outro objeto, posicionando um novo no mesmo local (A e C), esta fase denominada fase de reativação. Imediatamente após a fase de reativação os animais receberam a infusão intrahipocampal de 10 mmol bilateralmente. Os animais retornaram para a caixa moradia e para a rotina do biotério e foram testados 24 horas após no campo aberto, neste momento foi alterado novamente um dos objetos, mantendo o objeto apresentado na fase treino e reativação (A e D). Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média da porcentagem de tempo total de exploração para $p < 0,05$ de significância. *** $P < 0,001$ e ** $P < 0,01$ e * $P < 0,5$ no teste t-Student. Grupo salina (N=8), Grupo metilfenidato 10 μ mol (N=6).

Efeitos do metilfenidato na reconsolidação da memória na tarefa de reconhecimento de objetos em associação com bloqueador dopaminérgico.

De acordo com a fase treino, não houve diferença de exploração entre o objeto A e o objeto B entre o tempo total de exploração. Na sessão de reativação, observou-se que houve diferença do tempo de exploração total do objeto C comparado ao objeto A ($P < 0,001$). Imediatamente após a fase de reativação foi infundido I.P. 1,0 mg/kg/peso corporal ou salina e 1,0 mL intra-hipocampal bilateralmente na concentração de 10 Mmol de metilfenidato ou salina.

Quando analisado o teste de reconsolidação da memória, verificou-se que tanto o uso do metilfenidato na concentração de 1,0 mg/kg/peso corporal de metilfenidato e a associação com o uso do bloqueador dopaminérgico, não trouxeram prejuízos para a consolidação da memória dos animais. Isso demonstrando que a utilização de um bloqueador dopaminérgico na região CA1 do hipocampo imediatamente após a fase de reativação, não interfere na formação da memória de longa duração, quando testado em 24 horas.

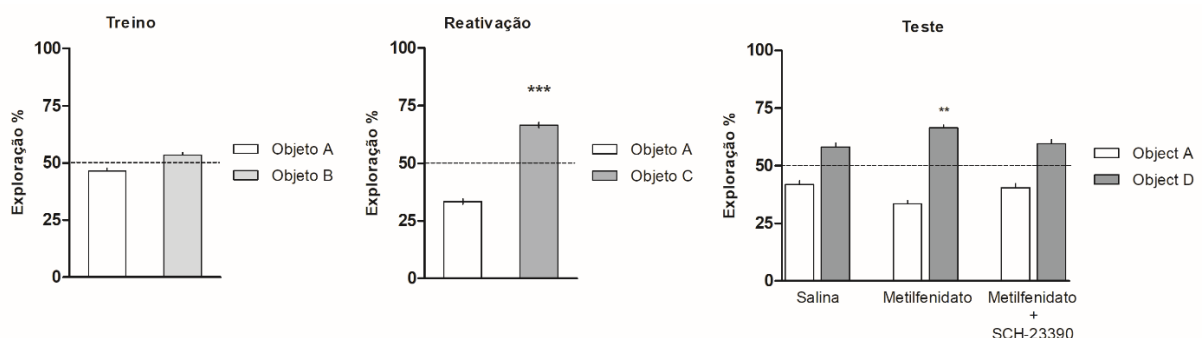


Fig. 14 - Efeitos da infusão I.P. de metilfenidato imediatamente após a sessão de reativação e a infusão intrahipocampal do SCH-23390, sobre o teste de reconsolidação da memória na tarefa de R.O. 24 horas após a sessão de reativação. A sessão treino consistia em colocar o animal no campo aberto na presença de dois objetos novos A e B na qual o animal explorar estes objetos durante uma sessão de 5 min. Vinte e quatro horas após a sessão do treino, estes animais foram expostos novamente ao campo aberto, contudo o objeto A foi

mantido e foi retirado o outro objeto, posicionando um novo no mesmo local (A e C), esta fase denominada fase de reativação. Imediatamente após a fase de reativação os animais receberam a injeção de 1 mg/kg/peso corporal do Metilfenidato ou salina e foi infundido o SCH-23390 ou salina na concentração de (1µm/µL). Os animais retornaram para a caixa moradia e para a rotina do biotério e foram testados 24 horas após no campo aberto, neste momento foi alterado novamente um dos objetos, mantendo o objeto apresentado na fase treino e reativação (A e D). Os dados são apresentados como média ± erro padrão da média da porcentagem de tempo total de exploração para $p < 0,05$ de significância. *** $P < 0,001$ e ** $P < 0,01$ e * $P < 0,5$ no teste t-Student. Grupo salina (N=8), Grupo metilfenidato (N=8), Grupo Metilfenidato + SCH-23390 (N=8).

Efeitos do metilfenidato na reconsolidação da memória na tarefa de reconhecimento de objetos – 7 dias.

De acordo com a fase treino, não houve diferença de exploração entre o objeto A e o objeto B entre o tempo total de exploração. Na sessão de reativação, observou-se que houve diferença do tempo de exploração total do objeto C comparado ao objeto A ($P < 0,001$). Imediatamente após a fase de reativação foi infundido I.P. 1,0 mg/kg/peso corporal de metilfenidato ou salina.

Quando analisado a sessão de teste da reconsolidação da memória, verificou-se que o uso do metilfenidato na concentração de 1,0 mg/kg/peso corporal aprimorou a consolidação da memória dos animais. Demonstrando que a utilização do metilfenidato imediatamente pós a fase de reativação interfere na consolidação da memória de longa duração, quando testado em 07 dias.

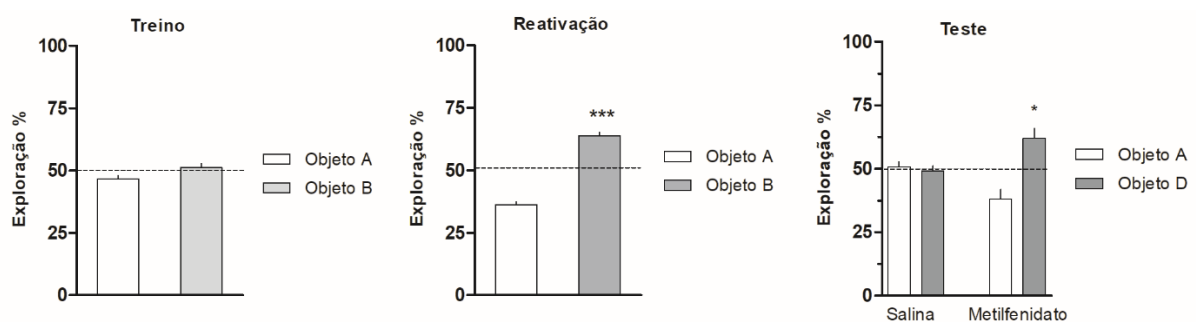


Fig. 15 - Efeitos da infusão I.P. de metilfenidato imediatamente após a sessão de reativação, sobre o teste de reconsolidação da memória na tarefa de R.O. 07 dias após a sessão de reativação. A sessão treino consistia em colocar o animal no campo aberto na presença de dois objetos novos A e B na qual o animal explorar estes objetos durante uma sessão de 5 min. Vinte e quatro horas após a sessão do treino, estes animais foram expostos novamente ao campo aberto, contudo o objeto A foi mantido e foi retirado o outro objeto, posicionando um novo no mesmo local (A e C), esta fase denominada fase de reativação. Imediatamente após a fase de reativação os animais receberam a injeção de 1 mg/kg/peso corporal do Metilfenidato ou salina. Os animais retornaram para a caixa moradia e para a rotina do biotério e foram testados 07 dias após no campo aberto, neste

momento foi alterado novamente um dos objetos, mantendo o objeto apresentado na fase treino e reativação (A e D). Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média da porcentagem de tempo total de exploração para $p < 0,05$ de significância. *** $P < 0,001$ e ** $P < 0,01$ e * $P < 0,5$ no teste t-Student. Grupo salina (N=10), Grupo metilfenidato (N=9).

Efeitos do metilfenidato na reconsolidação da memória na tarefa de reconhecimento de objetos em associação com bloqueador dopaminérgico – 7 dias.

Os ratos foram treinados (dia 01) na tarefa de reconhecimento de objetos, reativados (dia 02) trocando um dos objetos e testados (dia 03) 07 dias após a fase de reativação.

De acordo com a fase de treino, não houve diferença de exploração entre o objeto A e o objeto B entre o tempo total de exploração. Na sessão reativação, observou-se que houve diferença do tempo de exploração total do objeto C comparado ao objeto A ($P < 0,001$). Imediatamente após a fase de reativação foi infundido I.P. 1,0 mg/kg/peso corporal ou salina e 1,0 mL intra-hipocampal bilateralmente na concentração de 1 μ L de SCH-23390 na concentração de 10 μ mol ou salina.

Quando analisado o teste de reconsolidação da memória, verificou-se que o uso do metilfenidato na concentração de 1,0 mg/kg/peso corporal foi capaz de manter a memória até 07 dias após a sessão de reativação. Os animais tratados com MTF e o SCH-23390 aprenderam igualmente ao grupo tratado apenas com MTF ($P = 0,6$). Assim se pode concluir que o metilfenidato consegue manter os níveis dopaminérgicos adequados, após a sessão de reativação para que ocorra a formação e consolidação da memória ou que a dopamina não é o principal neurotransmissor responsável por este processo.

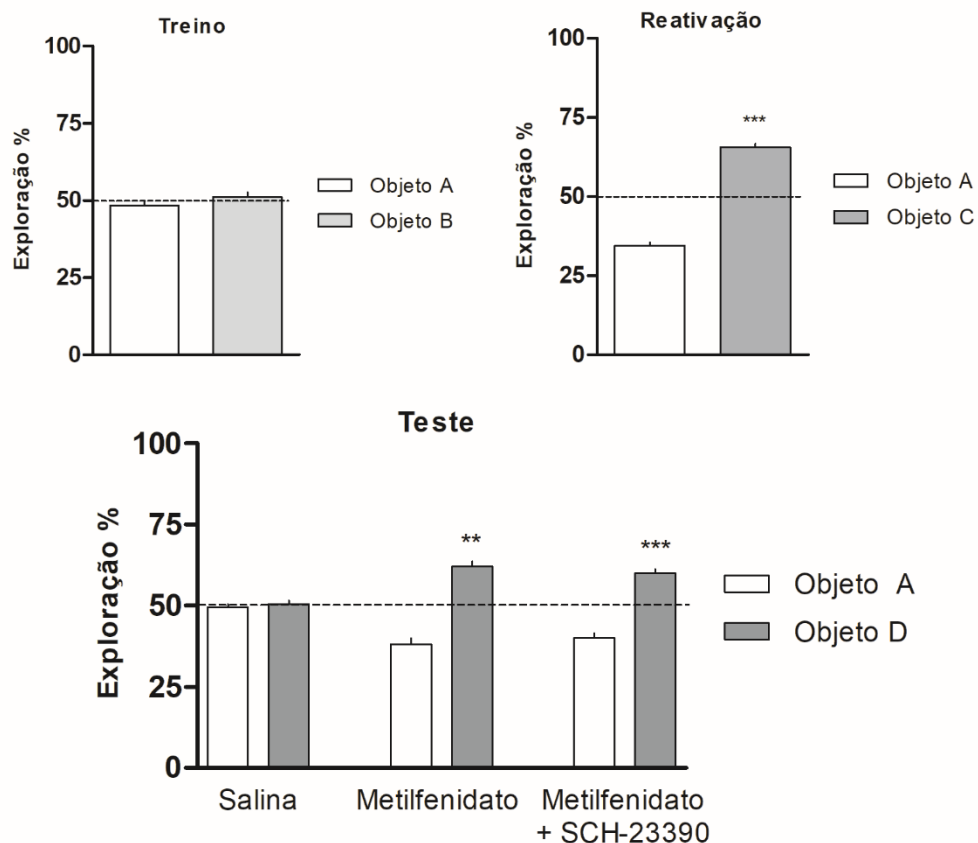


Fig. 16 - Efeitos da infusão I.P. de metilfenidato imediatamente após a sessão de reativação e a infusão intrahipocampal do SCH-23390, sobre o teste de reconsolidação da memória na tarefa de R.O. 07 dias após a sessão de reativação. A sessão treino consistia em colocar o animal no campo aberto na presença de dois objetos novos A e B na qual o animal explorar estes objetos durante uma sessão de 5 min. Vinte e quatro horas após a sessão do treino, estes animais foram expostos novamente ao campo aberto, contudo o objeto A foi mantido e foi retirado o outro objeto, posicionando um novo no mesmo local (A e C), esta fase denominada fase de reativação. Imediatamente após a fase de reativação os animais receberam a injeção de 1 mg/kg/peso corporal do Metilfenidato ou salina e foi infundido o SCH-23390 ou salina na concentração de (1 μ m/ μ L). Os animais retornaram para a caixa moradia e para a rotina do biotério e foram testados 07 dias após no campo aberto, neste momento foi alterado novamente um dos objetos, mantendo o objeto apresentado na fase treino e reativação (A e D). Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média da porcentagem de tempo total de exploração para $p < 0,05$ de significância. *** $P < 0,001$ e ** $P < 0,01$ e * $P < 0,5$ no teste t-Student. Grupo salina (N=10), Grupo metilfenidato (N=9).

Efeitos do metilfenidato e do bloqueador dopaminérgico infundidos intrahipocampal sobre na reconsolidação da memória na tarefa de reconhecimento de objetos – 7 dias.

De acordo com a fase de treino, não houve diferença de exploração entre o objeto A e o objeto B entre o tempo total de exploração. Na sessão de reativação, observou-se que houve diferença do tempo de exploração total do objeto C

comparado ao objeto A ($P < 0,001$). Imediatamente após a fase de reativação foi infundido 1,0 μL de metilfenidato na concentração de 10 Mmol e/ou salina, bilateralmente.

Quando analisados no teste de reconsolidação da memória, verificou-se que o uso de 1,0 μL de metilfenidato alterou o processo de consolidação da memória dos animais, bem como dos animais tratados com MTF e SCH-23390 ($P = 0,6$).

Assim, pode-se concluir que o metilfenidato quando aplicado intra-hipocampal altera os níveis dopaminérgicos adequados, interferindo no processo de formação e consolidação da memória.

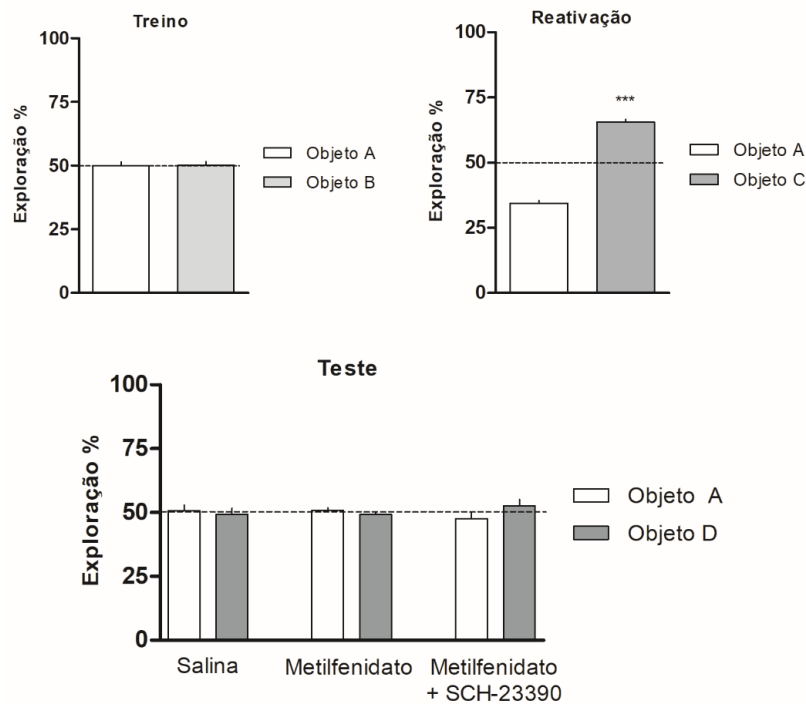


Fig. 17 - Efeitos da infusão intrahipocampal de metilfenidato e SCH-23390 imediatamente após a sessão de reativação, sobre o teste de reconsolidação da memória na tarefa de R.O. 07 dias após a sessão de reativação. A sessão treino consistia em colocar o animal no campo aberto na presença de dois objetos novos A e B na qual o animal explorar estes objetos durante uma sessão de 5 min. Vinte e quatro horas após a sessão do treino, estes animais foram expostos novamente ao campo aberto, contudo o objeto A foi mantido e foi retirado o outro objeto, posicionando um novo no mesmo local (A e C), esta fase denominada fase de reativação. Imediatamente após a fase de reativação os animais receberam a infusão central de 1 $\mu\text{m}/\mu\text{L}$ de Metilfenidato ou salina e foi infundido o SCH-23390 ou salina na concentração de (1 $\mu\text{m}/\mu\text{L}$). Os animais retornaram para a caixa moradia e para a rotina do biotério e foram testados 07 dias após no campo aberto, neste momento foi alterado novamente um dos objetos, mantendo o objeto apresentado na fase treino e reativação (A e D). Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média da porcentagem de tempo total de exploração para $p < 0,05$ de significância. *** $P < 0,001$ e ** $P < 0,01$ e * $P < 0,5$ no teste t-Student. Grupo salina (N=10), Grupo metilfenidato (N=9), Grupo metilfenidato + SCH-23390 (N=9).

Os resultados desta dissertação permitem algumas conclusões gerais:

- Ratos tratados com metilfenidato imediatamente após a fase de reativação apresentam melhora na memória de longa duração, lembrando até 7 dias.
- O uso do bloqueador dopaminérgico intra região CA1 do hipocampo dorsal dos ratos imediatamente após a fase de reativação, não causa déficit de memória.
- Ratos tratados com metilfenidato intra região CA1 do hipocampo dorsal, imediatamente após a fase de reativação, apresentam déficit de consolidação da memória.

5.1 Dados suplementares

Efeitos do metilfenidato na reconsolidação da memória na tarefa de reconhecimento de objetos – Infusão intra peritoneal antes da fase de reativação

Os ratos foram treinados (dia 01) na tarefa de reconhecimento de objetos, reativados (dia 02) trocando um dos objetos e testados (dia 03) 24 e 72 horas após a reativação.

De acordo com a fase de treino, não houve diferença na porcentagem de exploração entre o objeto A e o objeto B na sessão de treino. Previamente a sessão de reativação foi realizada a infusão I.P. de salina ou metilfenidato na concentração de 1,0 mg/kg/peso corporal e observou-se que houve diferença da porcentagem de exploração total do objeto C do grupo salina e do grupo MTF, ambos apresentando um valor de $P < 0,001$, demonstrando menor exploração do objeto familiar em ambos os grupos.

Quando analisado o teste de reconsolidação da memória verificou-se que não houve diferença estatística entre o grupo tratado e controle ($P = 0,35$), indicando que o metilfenidato não interfere no processo de consolidação da memória em 24 horas, quando infundido previamente a sessão de reativação.

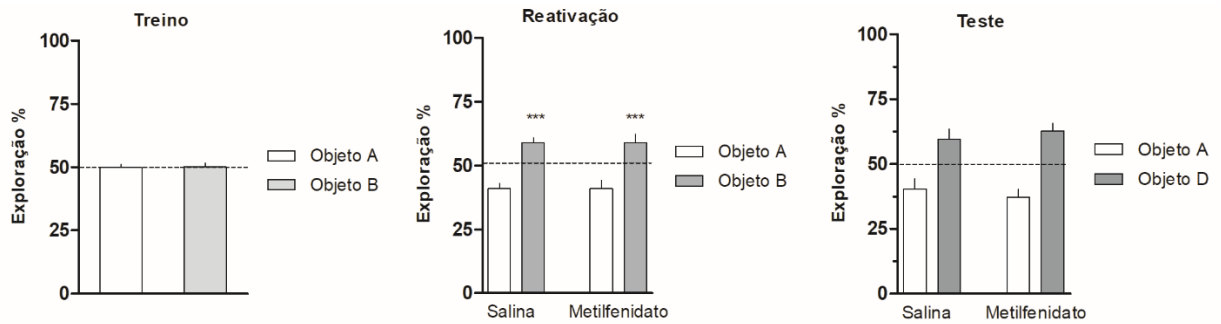


Fig. 18 – Efeitos da infusão I.P. de metilfenidato previamente a sessão de reativação sobre o teste de reconsolidação da memória na tarefa de R.O. 24 horas após a sessão de reativação. A sessão treino consistia em colocar o animal no campo aberto na presença de dois objetos novos A e B na qual o animal explorar estes objetos durante uma sessão de 5 min. Vinte e quatro horas após a sessão do treino, estes animais foram expostos novamente ao objeto A, mais um novo objeto, C, chamada fase de reativação, 30 minutos antes da fase de reativação os animais receberam a injeção de 1 mg/kg/peso corporal do Metilfenidato ou salina, os animais retornavam para a caixa moradia e para a rotina do biotério e foram testados 24 horas após no campo aberto. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média da porcentagem de tempo total de exploração para $p < 0,05$ de significância. *** $P < 0,001$ e ** $P < 0,01$ e * $P < 0,5$ no teste t-Student. Grupo salina (N=10), Grupo metilfenidato (N=11).

De acordo com a Fig. 13.A., não houve diferença de percentual de exploração entre o objeto A e o objeto B na sessão de treino. Previamente a sessão de reativação foi realizada a infusão I.P. de salina ou metilfenidato na concentração de 1,0 mg/kg/peso corporal e observou-se que houve diferença da porcentagem de exploração total do objeto C do grupo salina e do grupo MTF, referente ao aprendizado de cada grupo, ambos apresentando um valor de $P < 0,001$.

Quando analisado o teste de reconsolidação da memória, verificou-se que o grupo tratado com MTF apresentou déficit de memória quando comparado ao grupo salina no processo de reconsolidação da memória em 72 horas, quando infundido previamente a sessão de reativação.

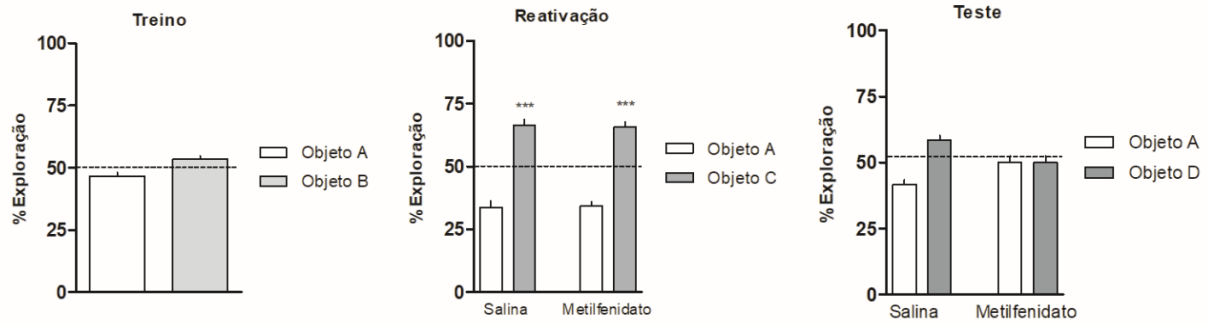


Fig. 19 - Efeitos da infusão I.P. de metilfenidato previamente a sessão de reativação sobre o teste de reconsolidação da memória na tarefa de R.O. 72 horas após a sessão de reativação. A sessão treino consistia em colocar o animal no campo aberto na presença de dois objetos novos A e B na qual o animal explorar estes objetos durante uma sessão de 5 min. Vinte e quatro horas após a sessão do treino, estes animais foram expostos novamente ao campo aberto, contudo o objeto A foi mantido e foi retirado o outro objeto, posicionando um novo no mesmo local (A e C), esta fase denominada fase de reativação. 30 minutos antes da fase de reativação, os animais receberam a injeção de 1 mg/kg/peso corporal do Metilfenidato ou salina. Os animais retornaram para a caixa moradia e para a rotina do biotério e foram testados 72 horas após no campo aberto, neste momento foi alterado novamente um dos objetos, mantendo o objeto apresentado na fase treino e reativação (A e D). Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média da porcentagem de tempo total de exploração para $p < 0,05$ de significância. *** $P < 0,001$ e ** $P < 0,01$ e * $P < 0,5$ no teste t-Student. Grupo salina (N=8-10), Grupo metilfenidato (N=8-11).

6 DISCUSSÃO

Os resultados encontrados nesse trabalho sugerem que o MTF infundido I.P., previamente a sessão de reativação, causa alterações no processo mnemônico e assim interfere diretamente na capacidade de remodelamento da memória de longa duração quando testados 72 horas após a sessão de reativação (Fig. 13).

Quando o MTF foi infundido I.P., com a dose de 1,0 mg/kg/peso corporal, imediatamente após a sessão de reativação, ela não interferiu no processo de formação da memória, comparado as doses de 0,5 e 2,0 mg/kg/peso corporal, que prejudicaram a reconsolidação da memória, no teste da reconsolidação, 24 horas após a fase de reconsolidação (Fig. 14).

Foi verificado também que o uso da dose de 1,0 mg/kg/peso corporal, foi capaz de melhorar a capacidade de armazenamento da memória em até 7 dias, comparado ao grupo salina (Fig. 17).

Os resultados encontrados também mostraram que a infusão intrahipocampal de SCH-23390 imediatamente após a sessão de reativação, concomitante ao uso de 1,0 mg/kg/peso corporal de MTF, não interferiu no teste de reconsolidação quando testados em 07 dias (Fig. 18).

A infusão do MTF intrahipocampal, imediatamente após a fase de reativação, interferiu diretamente no processo de reconsolidação mostrando que o possível aumento da concentração de dopamina intrahipocampal imediatamente após a sessão de reativação, prejudicou o processo mnemônico (Fig. 19).

Estes resultados nos levam a inferir que os receptores dopaminérgicos da família D1, presentes no hipocampo, não são os principais atuantes no processo de reconsolidação da memória na tarefa de R.O.

A hipótese primária deste estudo estava baseada que o uso do MTF e o aumento da concentração de dopamina livre nas fendas sinápticas na região CA1 do hipocampo no momento da reativação, iria melhorar o processo de consolidação da memória como uma premissa básica do efeito do medicamento usado na clínica para o tratamento do TDAH. Contudo, neste experimento, os animais apresentaram déficit de memória quando tratados com MTF na dose de 1,0 mg/kg/peso corporal e testados 72 horas após a fase de reativação (FIG. 13). Levando em conta este achado, concluímos que possivelmente os altos níveis de dopamina e noradrenalina livre intracerebral, propiciados pela droga, poderiam deixar os animais em um estado de

alerta muito elevado. Com isso, não é possível manter um nível de ansiedade adequado para realizar o processo mnemônico de forma apropriada (SILVA, 2000). A utilização de um estimulador leve do SNC previamente a sessão de aprendizado, pode identificar que o alto nível de agitação dos animais prejudicou o processo de formação de memória de longa duração. Pesquisa demonstrou também em seu estudo que drogas depressoras do SNC como cannabis e álcool prejudicam a formação das memórias, concluindo que é necessário que exista um equilíbrio entre o nível de ansiedade e tranquilidade para a formação adequada de uma memória. Até então foi demonstrado o efeito pró-cognitivo do MTF, contudo pesquisas mostraram que concomitante a esta melhora da capacidade de armazenamento, os animais podem apresentar aumento da ansiedade e atividade locomotora. Estudos já utilizaram estimuladores do SNC, com o intuito de melhorar a memória e obtiveram resultados positivos para a melhora da consolidação e reconsolidação (DE LIMA et al., 2011; BALDERAS et al., 2013). Vago demonstrou também em seu estudo que a infusão de um estimulador dopaminérgico previamente a sessão de treino, poderia prejudicar a formação da memória devido à falta de um processo de orientado de ativação de áreas sucessivas (VAGO et al, 2007).

Após identificarmos que o uso do MTF na dose de 1,0 mg/kg/peso corporal previamente a sessão de reativação acarretou em déficit da reconsolidação da memória, resolvemos alterar o modelo experimental e realizar a infusão de MTF após a sessão de reativação, não mexendo no processo de desenvolvimento de uma informação. Tentando assim, não interferir no processo de aprendizado e sim fortalecer uma memória em processo posterior a aquisição das informações visuais, olfativas, auditivas e táteis.

Posteriormente a uma busca, não sistemática, não foram identificados estudos que tenham realizado uma curva dose/resposta para a formação de memória de longa duração no teste de reconsolidação da tarefa de reconhecimento de objetos. Com isso, foi realizado um experimento para definir qual a melhor dose a ser utilizada nos experimentos para infusão após a fase de reativação. Nossos resultados demonstraram que a dose de 1,0 mg/kg/peso corporal foi a única que não interferiu para a reconsolidação da memória de longa duração quando testados em 24 horas. (Fig. 14) Estudos em uso crônico demonstrando melhora memória de longe duração, contudo, outros estudos também demonstraram que a mesma dose utilizada acarretaram em piora da memória demonstrando a não padronização de uma dose

específica. (HEYSER et al., 2004; LEBLANC-DUCHIN e TAUKULIS, 2007; 2009. SCHERER, 2009. MIORANZZA, 2011)

Os achados neste estudo demonstraram que o uso do metilfenidato imediatamente após a fase de reativação os animais apresentam melhora na capacidade de armazenamento, lembrando do objeto familiar por até 07 dias comparados ao grupo salina (Fig. 17).

Este achado demonstra os efeitos benéficos de um leve estimulador do SNC sobre a reconsolidação da memória. Furini e outros pesquisadores realizaram um estudo utilizando a infusão de SCH23-390 intrahipocampal imediatamente e 60 min, após a fase de reativação e concluíram que os receptores dopaminérgicos presentes no hipocampo não são responsáveis pela consolidação da memória de reconhecimento de objetos (FURINI et al., 2014). Rossato também estudou os efeitos destes mesmo receptores dopaminérgicos sobre a reconsolidação e identificou que os receptores dopaminérgicos da família D1 não são responsáveis pelo processo de reconsolidação da memória, mas sim estariam ligados ao momento anterior, a consolidação (ROSSATO et al, 2017). Estes achados vão ao encontro do nosso estudo que conseguiu demonstrar o mesmo efeito utilizando um protocolo similar de reconsolidação da memória.

Foi identificado que o MTF infundido I.P. imediatamente após sessão de reativação acarretou benefícios para a reconsolidação. Levando em conta este resultado, foi realizada a infusão concomitante de SCH-23390 para compreender se os receptores dopaminérgicos da família D1 estariam atuando neste processo na região CA1 do hipocampo. Foi identificado que, mesmo quando ocorreu a infusão do SCH-23390 intrahipocampal associada a infusão I.P. de MTF na dose de 1,0mg/kg, os animais ainda lembraram do objeto familiar. Com isso, podemos compreender que os receptores dopaminérgicos não são os principais atuantes no hipocampo para a reconsolidação da memória. O uso do metilfenidato para a reconsolidação tem se demonstrado uma ótima ferramenta, contudo, para diferentes tipos de memória como a memória aversiva (ABRAHAM et al, 2012, 2016; CARMACK et al, 2014 a) e memória de espacial (CARMACK et al, 2014 b; ANDRÉ et al, 2016). Estudos os quais já estão bem consolidados sobre os efeitos do sistema dopaminérgico. Uma pesquisa utilizando o bloqueador os receptores dopaminérgicos da família D1 (SCH-23390) em diferentes momentos do teste de reconsolidação da memória, e concluiu que os receptores dopaminérgicos presentes no hipocampo, não são necessários para e

reconsolidação do traço primário criado na tarefa de R.O. Contudo são essenciais para sua desestabilização quando a reativação ocorre junto com a incorporação de novas informações na memória original. Indo ao encontro dos resultados que foram encontrados neste estudo. (ROSSATO et al., 2017).

Diversos estudos já foram e tem sido realizados com o intuito de compreender os mecanismos presentes sobre a reconsolidação da memória (BALDERAS et al, 2013). A reconsolidação da memória é definida por uma desestabilização de uma memória previamente consolidada para uma posterior estabilização e consolidação (BROWN e AGGLETON, 2001). Sendo que toda a vez que esta memória é lembrada ela é modificada podendo se tornar mais forte ou esquecida, dependendo da intervenção que é realizada previamente, no momento ou posterior ao mesmo (MUMBY et al, 2002), momento o qual a memória está lábil o suficiente para que sofra alterações. Muitos autores consideram que o teste de reconsolidação de memória seja uma consolidação contínua, interminável, que mantêm os mesmos processos de aquisição, formação e consolidação da memória (MCKENZIE e EICHENBAUM, 2011). Contudo, estudos vem demonstrando que a reconsolidação da memória possui processo e mecanismos diferentes da consolidação (SARA, 2000; NADER e EINARSSON , 2010; WILSON et al, 2013).

Pesquisas têm sido realizadas também com o intuito de compreender quais são os mecanismos que atuam neste processo de modulação de uma memória pré existente (ALBERINI, 2005; TRONSON e TAYLOR, 2007; SCHWABE et al, 2014; MERLO et al, 2015). Este processo pode ser estudado com diversas tarefas como a esquivia inibitória (LÉNÁRD et al, 2017) e o reconhecimento de objetos (BALDERAS et al, 2013) ambos atuando diretamente nesta modulação da memória pré existente, processo que este estudo analisou.

Durante o processo de formação de memória é necessário que ocorra a ativação da via MAPK kinase para consolidação e reconsolidação de memória de reconhecimento de objetos de longo prazo e isso está associado diretamente à hiperfosforilação de ERK no hipocampo, córtex entorrinal e giro denteado (KELLY et al., 2003). Para que ocorra a atualização deste traço mnemônico, é necessário que ocorra a síntese proteica em regiões específicas do SNC como o hipocampo. Rossato publicou sua pesquisa em 2007 e demonstrou que quando é realizada a infusão do bloqueador de síntese proteica na região CA1 do hipocampo imediatamente após e 180 minutos após a fase de reativação, os animais apresentam prejuízo para a

formação da memória. Contudo, quando esta droga foi infundida 360 min. após a sessão de reativação eles lembravam do objeto familiar, demonstrando que ocorre síntese proteica no hipocampo, imediatamente após a fase de reativação momento o qual ele é essencial para seu remodelamento (ROSSATO et al, 2007).

Esta evocação da memória, ocorre para atualização de uma memória e é essencial para que melhore e fortaleça a memória já aprendida. Neste momento, as conexões sinápticas são fortalecidas e o ocorre o desenvolvimento do potencial de longa duração entre regiões do cérebro, como demonstrou Clarke em seu estudo, que verificou aumento da LTP entre a região CA1 e CA3 do hipocampo durante a fase de reativação (CLARKE et al, 2010).

Para que pudesse ser compreendido melhor a atuação do hipocampo e o sistema dopaminérgico sobre a reconsolidação da memória, o MTF foi infundido intrahipocampal imediatamente após a sessão de reativação concomitante ao SCH23-390 (Fig. 19). Durante os testes de reconsolidação da memória, foi identificado que ambos os grupos tiveram prejuízos sobre a formação da memória quando comparados com o grupo salina, mantendo um padrão de não aprendizagem. Vago demonstrou em sua pesquisa, realizando infusão central de apomorfina, agonista dopaminérgico não seletivo, na região CA1 do hipocampo, que existe a atuação dos receptores dopaminérgicos, em ligação direta com o córtex entorrinal. Entretanto, não na reconsolidação e sim na memória espacial de médio e longo prazo e consolidação.

Ao considerar a memória e a grande importância que o hipocampo possui para a aquisição de uma sequência temporal de eventos, bem como para a distinção de informações espaciais e sobre objetos, embora possa não desempenhar um papel direto na distinção das diferentes características de cada objeto, o hipocampo é fundamental como um detector de novidades devido ao seu papel na comparação de informações previamente armazenadas com os novos aspectos recebidos de uma situação particular. O hipocampo recebe insumos do córtex perirrinal, que é ele próprio o local de entrada para informação visual, olfativa e somatossensorial, todos os quais são relevantes para o reconhecimento de objetos.

Os resultados obtidos neste estudo sugerem que há uma enorme importância do sistema dopaminérgico na reconsolidação de memórias na tarefa de reconhecimento de objetos. Com isso estes resultados demonstramos a importante ação do MTF sobre a reconsolidação da memória, sobretudo não na atuação direta dos receptores dopaminérgicos da família D1 na região CA1 do hipocampo dorsal de ratos.

7 CONCLUSÕES

Nossos resultados mostraram que o efeito do metilfenidato imediatamente após a sessão de reativação induz uma melhora na janela temporal da memória de reconhecimento de objetos, porém não é mediada pela ação da classe dos receptores dopaminérgicos D1/D5 presentes na região CA1 do hipocampo dorsal de ratos.

Além disso, os efeitos parecem opostos quando infundidos pré reativação, porém estes dados carecem de mais estudos para comprovar estas evidencias farmacológica/comportamental.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, A. CUNNINGHAM, C. LATTAL, K. Methylphenidate enhances extinction of contextual fear. **Learn Mem.** Feb; 19(2): 67–72. 2012. DOI: 10.1101/lm.024752.111 PMID: PMC3262973

ABRAHAM, A.D. NEVE, K.A. LATTAL, K.M. Activation of D1/5 Dopamine Receptors: A Common Mechanism for Enhancing Extinction of Fear and Reward-Seeking Behaviors. **Neuropsychopharmacology.** Jul;41(8):2072-81. 2016. DOI: 10.1038/npp.2016.5.

ALBERINI, C. Mechanisms of memory stabilization: are consolidation and reconsolidation similar or distinct processes? **Trends in Neurosciences.** Volume 28, Issue 1, Jan., Pages 51-56, 2005.

ANDRÉ, M. A. MANAHAN-VAUGHAN, D. Involvement of Dopamine D1/D5 and D2 Receptors in Context-Dependent Extinction Learning and Memory Reinstatement. **Front Behav Neurosci.** Jan 21;9:372., 2016. DOI: 10.3389/fnbeh.2015.00372.

ARNSTEN, A.F., DUDLEY, A.G., Methylphenidate improves prefrontal cortical cognitive function through alpha2 adrenoceptor and dopamine D1 receptor actions: Relevance to therapeutic effects in Attention Deficit Hyperactivity Disorder. **Behav Brain Funct.** 22;1(1):2. 2005.

BADDELEY, A. D. **Working memory.** *Science*, 255, 556-559, 1992.

BALDERAS, I. MORENO-CASTILLA, P. BERMUDEZ-RATTONI, F. Dopamine D1 receptor activity modulates object recognition memory consolidation in the perirhinal cortex but not in the hippocampus. **Hippocampus.** Oct;23(10):873-8., 2013. DOI: 10.1002/hipo.22143

BENETTI F, BALDI E, BUCHERELLI C, BLANDINA P, PASSANI MB. Histaminergic ligands injected into the nucleus basalis magnocellularis differentially affect fear conditioning consolidation. **Int J Neuropsychopharmacol.** Apr;16(3):575-82, 2013a

BENETTI F, IZQUIERDO I. Histamine infused into basolateral amygdala enhances memory consolidation of inhibitory avoidance. **Int J Neuropsychopharmacol.** Aug;16(7):1539-45. 2013b

BENETTI F, da SILVEIRA CK, ROSA J, IZQUIERDO I. Histamine acting on the basolateral amygdala reverts the impairment of aversive memory of rats submitted to neonatal maternal deprivation. **Behav Brain Res**. Feb 1;278:83-9, 2015a .

BENETTI, F., FURINI, C.R., DE CARVALHO MYSKIW, J., PROVENSÍ, G., PASSANI, M.B., BALDI, E., BUCHERELLI, C., MUNARI, L., IZQUIERDO, I., BLANDINA, P. Histamine in the basolateral amygdala promotes inhibitory avoidance learning independently of hippocampus. **Proc Natl Acad Sci U S A**. pii: 201506109. [Epub ahead of print]. 2015b.

BENETTI F, MELLO PB, BONINI JS, MONTEIRO S, CAMMAROTA M, IZQUIERDO I. Early postnatal maternal deprivation in rats induces memory deficits in adult life that can be reversed by donepezil and galantamine. **Int J Dev Neurosci**. Feb;27(1):59-64. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2008.09.200. Epub 2008 Oct 2. PMID: 18948184. 2009.

BIEDERMAN, J. Introduction: new developments in the treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder. **J. Clin. Psychiatry** 67 (Suppl. 8), 4-6. 2006.

BROADBENT, N.J., GASKIN, S., SQUIRE, L.R., CLARK, R.E. Object recognition memory and the rodent hippocampus. **Learn Mem**. 22;17(1):5-11. doi: 10.1101/lm.1650110. 2009.

BRASIL. LEI Nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do parágrafo 1º do artigo 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. Diário Oficial da União [Internet]. Brasília, 9 out 2008. Seção 1. Disponível: <http://bit.ly/2Ghb5ZU> » <HTTP://BIT.LY/2GHB5ZU>

CAMILLO, M.A., ARRUDA PAES, P.C., ET AL., Gyroxin fails to modify in vitro release of labelled dopamine and acetylcholine from rat and mouse striatal tissue. **Toxicol** 39 (6), 843–853. 2001.

CAPLAN, D. WATERS, G. Verbal working memory and sentence comprehension. **Behavioral and Brain Sciences**, 22(1), 77-94.1999.

CARMACK, S. HOWELL, K. RASAEI, K. REAS, E. ANAGNOSTARAS, S. Animal model of methylphenidate's long-term memory-enhancing effects. **Learn Mem**. Jan 16;21(2):82-9. DOI: 10.1101/lm.033613.113. 2014a.

CARMACK, S.A. BLOCK, C.L. HOWELL, K. ANAGNOSTARAS, S.G. Methylphenidate enhances acquisition and retention of spatial memory. **Neurosci Lett**. May 1;567:45-50. DOI: 10.1016/j.neulet.2014.03.029. 2014b.

CASSINI, L.F. SIERRA, R.O. HAUBRICH, J. CRESTANI, A.P. SANTANA, F. DE OLIVEIRA ALVARES, L. QUILLFELDT, J.A. Memory reconsolidation allows the consolidation of a concomitant weak learning through a synaptic tagging and capture mechanism. **Hippocampus**. Oct;23(10):931-41. doi: 10.1002/hipo.22149. 2013.

CHAI, G., GOVERNALE, L., MCMAHON, A.W., TRINIDAD, J.P., STAFFA, J., MURPHY, D., Trends of outpatient prescription drug utilization in US children, 2002 e 2010. **Pediatrics** 130, 23e31. 2012.

CLARKE, A., TAYLOR, K.I., TYLER, L.K., The evolution of meaning: spatio-temporal dynamics of visual object recognition. **CognNeurosci**. 23(8):1887-99. doi: 10.1162/jocn.2010.21544. 2011.

CLARKE, J. CAMMAROTA, M. GRUART, A. IZQUIERDO, I. DELGADO-GARCÍAB, J. Plastic modifications induced by object recognition memory processing. **Proc Natl Acad Sci U S A**. Feb 9; 107(6): 2652–2657. DOI: 10.1073/pnas.0915059107. 2010.

COHEN, H, MATAR, M.A. BUSKILA, D. KAPLAN, Z. ZOHAR, J. Early post-stressor intervention with high-dose corticosterone attenuates posttraumatic stress response in an animal model of posttraumatic stress disorder. **Biol Psychiatry**. Oct 15;64(8):708-17. doi: 0.1016/j.biopsych.2008.05.025. 2008.

COHEN, H. KAPLAN, Z. MATAR, MA. LOEWENTHAL, U. KOZLOVSKY, N. ZOHAR, A. Anisomycin, a protein synthesis inhibitor, disrupts traumatic memory consolidation and attenuates posttraumatic stress response in rats. 2006 **J. Biol Psychiatry**. Oct 1;60(7):767-76. Epub. Jun 2 DOI: 10.1016/j.biopsych.2006.03.013. 2006.

CHAPOUTHIER, G. Registros evolutivos. **Viver Mente & Cérebro**, São Paulo, n.2, p. 8-13, 2006.

DAFNY, N., YANG, P.B. The role of age, genotype, sex, and route of acute and chronic administration of methylphenidate: a review of its locomotor effects. **Brain Res Bull**. 68(6):393-405. 2006.

DE LIMA MN, PRESTI-T.; J, DORNELLES A, SCALCO FS, ROESLER R, GARCIA VA, SCHRÖDER N. Modulatory influence of dopamine receptors on consolidation of

object recognition memory. **Neurobiol Learn Mem.** Mar;95(3):305-10. doi: 10.1016/j.nlm.2010.12.007. Epub 2010 Dec 25. PMID: 21187154. 2011.

DOUGHERTY, D. D.; BONAB, A. A.; SPENCER, T. J.; RAUCH, S. L.; MADRAS, B. K.; FISCHMAN, A. J.; Dopamine transporter density in patients with attention deficit hyperactivity disorder. **Lancet** 354, 2132-2133. doi: 10.1016/s0140- 6736(99)04030-1. 1999.

DUDAI, Y., EISENBERG, M. Rites of passage of the engram: reconsolidation and the lingering consolidation hypothesis. **Neuron.** 44(1):93-100. 2004.

FELDER, C.C., JOSE, P.A., AXELROD, J., The dopamine-1 agonist, SKF 82526, stimulates phospholipase-C activity independent of adenylate cyclase. **J Pharmacol Exp Ther.** 248(1):171–175. 1989.

FLUCKIGER, E., MULLER, E.E., THORNER, M.O., **Basic and clinical aspects of neuroscience.** New York: Springer-Verlag. 1987.

FREY, U. HUANG, Y.Y. KANDEL, E.R. Effects of cAMP Simulate a Late Stage of LTP in Hippocampal CA1. **Science.** Vol. 260, No. 5114 (Jun. 11, 1993), pp. 1661-1664 DOI: <http://dx.doi.org/10.1126/science.8389057>. 1993.

FURINI, C.R. MYSKIW, J.D.E. SCHMIDT, B.E. ZINN, C.G. PEIXOTO, P.B. PEREIRA, L.D. IZQUIERDO, I. The relationship between protein synthesis and protein degradation in object recognition memory. **Behav Brain Res.** Nov 1;294:17-24. doi: 10.1016/j.bbr.2015.07.038.2015.

FURINI, C.R., MYSKIW, J.C. SCHMIDT, B.E., MARCONDES, L.A., IZQUIERDO, I., D1 and D5 dopamine receptors participate on the consolidation of two different memories. **Behav Brain Res.** 1;271:212-7. doi: 10.1016/j.bbr.2014.06.027.) 2014.

HANSEN, N. MANAHAN-VAUGHAN, D. Dopamine D1/D5 receptors mediate informational saliency that promotes persistent hippocampal long-term plasticity. **Cereb Cortex,** 24:845–58. 2014.

HEATH, F.C., JURKUS, R., BAST, T., PEZZE, M.A., LEE, J.L., VOIGT, J.P., STEVENSON, C.W. Dopamine D1-like receptor signalling in the hippocampus and amygdala modulates the acquisition of contextual fear conditioning. **Psychopharmacology** (Berl). [Epub ahead of print] 2015.

HEYSER, C.J. PELLETIER, M. FERRIS, J.S. The Effects of Methylphenidate on Novel Object Exploration in Weanling and Periadolescent. **Rats Ann N Y Acad Sci.** DOI: 10.1196/annals.1308.066.2004.

HEYSER, C.J., MCNAUGHTON, C.H., VISHNEVETSKY, D., FIENBERG, A.A. Methylphenidate restores novel object recognition in DARPP-32 knockout mice. **Behav Brain Res.** 15;253:266-73. doi: 10.1016/j.bbr.2013.07.031. 2013.

HORN, A.S., KORF, J., WESTERRINK, B.H.C., **The neurobiology of dopamine.** London: Academic Pres. 1979.

ANVISA, 1998. Site:

<https://consultas.anvisa.gov.br/#/medicamentos/2599200126855/> (acesso realizado em 08/12/2017)

HU, Y.S., LONG, N., PIGINO, G., BRADY, S.T., LAZAROV, O., Molecular mechanisms of environmental enrichment: impairments in Akt/GSK3 β , neurotrophin-3 and CREB signaling. **PLoS One.** 21;8(5):e64460. doi: 10.1371/journal.pone.0064460. 2013.

IZQUIERDO, I. **Memória.** Artmed Porto Alegre. 2011.

IZQUIERDO, I. MEDINA, J. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. **Neurobiol Learn Mem.** Nov;68(3):285-316. DOI: 10.1006/nlme.1997.3799, 1997.

IZQUIERDO, L.A., BARROS, D.M., VIANNA, M.R., COITINHO, A. DEDAVID, E., SILVA, T., CHOI, H., MOLETTA, B., MEDINA, J.H., IZQUIERDO, I., Molecular pharmacological dissection of short- and long-term memory. **Cell Mol Neurobiol.** 22(3):269-87. 2002.

IZQUIERDO, I., MCGAUGH, J.L. Behavioural pharmacology and its contribution to the molecular basis of memory consolidation. **Behav Pharmacol.** 11(7-8):517-34, 2000.

JAMES, L. MCGAUGH, J. Role of adrenal stress hormones in forming lasting memories in the brain 2002 **Curr Opin Neurobiol.** Apr;12(2):205-10. [http://dx.doi.org/10.1016/S0959-4388\(02\)00306-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0959-4388(02)00306-9).2002.

JEONG, S.H., CHOI, K.S., LEE, K.Y., KIM, E.J., KIM, Y.S., JOO, E.J. Association between the dopamine transporter gene (DAT1) and attention deficit hyperactivity disorder-related traits in healthy adults. **Psychiatr Genet.** (3):119-26. doi: 10.1097/YPG.000000000000086. 2015.

KELLY, A. LAROCHE, S. DAVIS, S. Activation of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase in hippocampal circuitry is required for consolidation and reconsolidation of recognition memory. **J Neurosci.** 15;23(12):5354-60. 2003.

LEE, J.L. EVERITT, B.J. THOMAS, K.L. Independent Cellular Processes for Hippocampal Memory Consolidation and Reconsolidation. **Science.** Vol. 304, Issue 5672, pp. 839-843 DOI: 10.1126/science.1095760.2004.

LeBLANC-DUCHIN, D., TAUKULIS, H.K. Chronic oral methylphenidate administration to periadolescent rats yields prolonged impairment of memory for objects. **Neurobiol Learn Mem.** 88: 312-320. 2007.

LEBLANC-DUCHIN, D., TAUKULIS, H. K. Chronic oral methylphenidate induces post-treatment impairment in recognition and spatial memory in adult rats. **Neurobiol Learn Mem,** 91, 218-225. 2009.

LÉNÁRD, L. OLLMANN, T. LÁSZLÓ, K. KOVÁCS, A. GÁLOSI, R. KÁLLAI, V. ATTILA, T. KERTES, E. ZAGORACZ, O. KARÁDI, Z. PÉCZELY, L. Role of D2 dopamine receptors of the ventral pallidum in inhibitory avoidance learning. **Behav Brain Res.** Mar 15;321:99-105. doi: 10.1016/j.bbr.2017.01.005. Epub 2017 Jan 3. PMID: 28057528. 2017.

LEVIN, E.D., BUSHNELL, P.J., REZVANI, A.H. Attention-modulating effects of cognitive enhancers. **Pharmacol Biochem Behav.** 99(2):146-54. doi: 10.1016/j.pbb.2011.02.008. 2011.

LISMAN, J.E., GRACE, A.A., The hippocampal-VTA loop: controlling the entry of information into long-term memory. **Neuron** 46, 703e713. 2005.

MAYFORD, M. SIEGELBAUM, S.A. KANDEL, E.R. Synapses and memory storage. **Cold Spring Harb Perspect Biol.** Jun 1;4(6):a005751. doi: 10.1101/cshperspect.a005751. PMID: 22496389; PMCID: PMC3367555. 2012.

MERLO, E. BEKINSCHTEIN, P. JONKMAN, S. MEDINA, J. Mechanisms of Memory Consolidation, Reconsolidation, and Persistence.. **Neural Plasticity** 2015: 687175. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/687175> .2015.

MENEZES, J.; NIÉGE A.; BORGESA, S.; ROEHRSA, R.; MYSKIWB, J.C.; FURINIB, C.R.G.; IZQUIERDOB, I.; MELLO-CARPESA, P.B. Facilitation of fear extinction by novelty depends on dopamine acting on D1-subtype dopamine receptors in hippocampus. E1652–E1658. **PNAS. Published online.** March 9, 2015.

MCGAUGH, J.L., IZQUIERDO, I., The contribution of pharmacology to research on the mechanisms of memory formation. **Trends Pharmacol Sci.** 21(6):208-10, 2000. MCKENZIE, S. EICHENBAUM, H. Consolidation and reconsolidation: Two lives of memories? **Neuron.** Jul 28; 71(2): 224–233. doi: 10.1016/j.neuron.2011.06.037. 2012.

MCKENZIE, S., EICHENBAUM, H., Consolidation and reconsolidation: two lives of memories? **Neuron** 71, 224–233. 2011.

MCREYNOLDS, J.R., ANDERSON, K.M., DONOWHO, K.M., MCINTYRE, C.K.. Noradrenergic actions in the basolateral complex of the amygdala modulate Arc expression in hippocampal synapses and consolidation of aversive and non-aversive memory. **Neurobiol Learn Mem.** 115:49-57. doi: 10.1016/j.nlm.2014.08.016. 2014.

MIORANZZA, S., COSTA, M.S., BOTTON, P.H., ARDAIS, A.P., MATTE, V.L., ESPINOSA, J., SOUZA DO, PORCIÚNCULA, L.O. Blockade of adenosine A(1) receptors prevents methylphenidate-induced impairment of object recognition task in adult mice. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.** 15;35(1):169-76. doi: 10.1016/j.pnpbp.2010.10.022. 2011.

MUMBY, D.G. GASKIN, S. GLENN, M.J. SCHRAMEK, T.E. LEHMANN, H. Hippocampal damage and exploratory preferences in rats: memory for objects, places, and contexts. **Learn Mem.** Mar-Apr;9(2):49-57. DOI: 10.1101/lm.41302.2002.

NADER, K.; EINARSSON E.O. Memory reconsolidation: an update. **Ann N Y Acad Sci.** Mar;1191:27-41. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2010.05443.x, 2010.

OTMAKHOVA, N.A., LISMAN, J.E. D1/D5 dopamine receptor activation increases the magnitude of early long-term potentiation at CA1 hippocampal synapses. **J Neurosci.**16(23):7478-86. 1996.

PAXINOS, G., WATSON, C., **The rat brain in stereotaxic coordinates**. New York: Academic Press. 1986.

RADISKE, A. ROSSATO, J. GONZALEZ, M. KÖHLER, C. BEVILAQUA, L. CAMMAROTA, M. BDNF controls object recognition memory reconsolidation. **Neurobiol Learn Mem**. Jul;142(Pt A):79-84. DOI: 10.1016/j.nlm.2017.02.018. 2017.

RAJALA, A.Z., HENRIQUES, J.B., POPULIN, L.C. Dissociative effects of methylphenidate in nonhuman primates: trade-offs between cognitive and behavioral performance. **J Cogn Neurosci**. 24(6):1371-81. doi: 10.1162/jocn_a_00225. Reconsolidation of human memory: brain mechanisms and clinical relevance. 2012.

ROOZENDAAL, B.; SCHELLING, G.; MCGAUGH, J. L. Corticotropin-releasing factor in the basolateral amygdala enhances memory consolidation via an interaction with the β -adrenoceptor-cAMP pathway: dependence on glucocorticoid receptor activation. **J. Neurosci**. 28, 6642–6651. Doi: 10.1523/JNEUROSCI.1336-08. 2008.

ROSSATO, J. BEVILAQUA, L. MYSKIW, J. MEDINA, J. IZQUIERDO, I. CAMMAROTA, M. On the role of hippocampal protein synthesis in the consolidation and reconsolidation of object recognition memory. **Learning & memory** (Cold Spring Harbor, N.Y.). 14. 36-46. 10.1101/lm.422607, 2007.

ROSSATO, J.I. GONZALEZ, M.C. KÖHLER, C.A. BEVILAQUA, L.R. CAMMAROTA, M. BDNF controls object recognition memory reconsolidation Radiske **Neurobiol Learn Mem**. Jul;142 (Pt A):79-84. doi: 10.1016/j.nlm.2017.02.018. 2017.

SALLES, M.J., HERVÉ, D., RIVET, J.M., LONGUEVILLE, S., MILLAN, M.J., GIRAULT, J.A., MANNOURY, L.A. COUR, C., Transient and rapid activation of Akt/GSK-3 β and mTORC1 signaling by D3 dopamine receptor stimulation in dorsal striatum and nucleus accumbens. **J Neurochem**. 125(4):532-44. doi: 10.1111/jnc.12206. 2013.

SARA, S.J. Retrieval and reconsolidation: toward a neurobiology of remembering. **Learn Mem**. 7: 73-84. DOI: 10.1101/lm.7.2.73.2000.

SCHWABE, L. NADER, K. PRUESSNER, J.C. **Biol Psychiatry**. Aug 15;76(4):274-80. DOI: 0.1016/j.biopsych.2014.03.008.2014.

SEEMAN, P., MADRAS, B.K., Anti-hyperactivity medication: methylphenidate and amphetamine. **Mol Psychiatry**. Sep;3(5):386-96. 1998.

SILVA, R.H. FRUSSA-FILHO, R. The plus-maze discriminative avoidance task: a new model to study memory–anxiety interactions. Effects of chlordiazepoxide and caffeine, **J Neurosci Methods**. Oct 30;102(2):117-25. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0165-0270\(00\)00289-2](https://doi.org/10.1016/S0165-0270(00)00289-2). 2000.

SILVA, W.C., KÖHLER, C.C., RADISKE, A., CAMMAROTA, M. D1/D5 dopamine receptors modulate spatial memory formation. *da Neurobiol Learn Mem*. Feb;97(2):271-5. doi: 10.1016/j.nlm.2012.01.005. Epub 2012.
SCHERER, E. B., MATTÉ, C., FERREIRA, A. G., GOMES, K. M., COMIM, C. M., MATTOS, C., QUEVEDO, J., STRECK, E. L., WYSE A. T. Methylphenidate treatment increases Na(+), K (+)-ATPase activity in the cerebrum of young and adult rats. *Journal of Neural Transmission*, 116, 1681-1687. 2009.

SQUIRE, L.R., KANDEL, E.R., KOSSLYN, S.M., Cognitive neuroscience. **Curr Opin Neurobiol**. 1;6(2):153-7, 1996.

TAKEUCHI, A., OGINO, T., HANAFUSA, K., MOROOKA, T., OKA, M., YORIFUJI, T., Et al. Inhibitory function and working memory in attention deficit/hyperactivity disorder and pervasive developmental disorders: does a continuous cognitive gradient explain ADHD and PDD traits?. **Acta Med**. Okayama 67, 293-303. 2013.

TAUKULIS, H.K., BIGNEY, E.E., FRY, M.D., HOOPER, C. Object memory impairment at post-drug Day 15 but not at Day 1 after a regimen of repeated treatment with oral methylphenidate. **Neurosci Lett**. 30;566:252-6. doi: 10.1016/j.neulet.2014.03.001. 2014.

TRONSON, N.C. TAYLOR, J.R. Molecular mechanisms of memory reconsolidation. **Nat Rev Neurosci**. Apr;8(4):262-75. DOI: 10.1038/nrn2090. 2007.

VAGO, D. BEVAN, A. KESNER, R. The Role of the Direct Perforant Path Input to the CA1 Subregion of the Dorsal Hippocampus in Memory Retention and Retrieval. **Hippocampus**. 17(10): 977–987. DOI: 10.1002/hipo.20329. 2007.

VARGAS, L.S., LARA, M.V., GONÇALVES, R., MANDREDINI, V., PONCE-SOTO, L.A., MARANGONI, S., DAL BELO, C.A., MELLO-CARPES, P.B. The intrahippocampal infusion of crotamine from *Crotalus durissus terrificus* venom enhances memory persistence in rats. **Toxicon**. 85:52-8. doi: 10.1016/j.toxicon.2014.04.017. 2014.

VOLKOW, N.D., SWANSON, J.M., Variables that affect the clinical use and abuse of methylphenidate in the treatment of ADHD. **Am. J. Psychiatry** 160, 1909e1918. 2003.

VOLKOW, N.D., WANG, G.J., FOWLER, J.S. Dopamine transporter occupancies in the human brain induced by therapeutic doses of oral methylphenidate. **Am J Psychiatry**.155:1325-31. 1998.

WANG J, ZHOU M, WANG X, YANG X, WANG M, ZHANG C, ZHOU S, TANG N. Impact of ketamine on learning and memory function, neuronal apoptosis and its potential association with miR-214 and PTEN in adolescent rats. **PLoS One**. 2014 Jun 10;9(6):e99855. doi: 10.1371/journal.pone.0099855. eCollection 2014.

WEIKOP, P., YOSHITAKE, T., KEHR, J., Differential effects of adjunctive methylphenidate and citalopram on extracellular levels of serotonin, noradrenaline and dopamine in the rat brain. **Eur. Neuropsychopharmacol**. 17, 658e671. 2007.

WILSON, D.I. LANGSTON, R.F. SCHLESIGER, M.I. WAGNER, M. WATANABE, S. AINGE J.A. Lateral entorhinal cortex is critical for novel object-context recognition. **Hippocampus**. May;23(5):352-66. DOI: 10.1002/hipo.22095. 2013.

WOOD, S., SAGE, J.R., SHUMAN, T., ANAGNOSTARAS, S.G. Psychostimulants and cognition: a continuum of behavioral and cognitive activation. **Pharmacol Rev**. 16;66(1):193-221. doi: 10.1124/pr.112.007054. 2014.