

PUCRS

ESCOLA DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE

DOUTORADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: NEUROCIÊNCIAS

CAROLINA GARRIDO ZINN

**MODULAÇÃO DA MEMÓRIA DE RECONHECIMENTO SOCIAL PELOS SISTEMAS  
NORADRENÉRGICO E DOPAMINÉRGICO EM DIFERENTES ESTRUTURAS CEREBRAIS: O  
METILFENIDATO E O APRENDIZADO DEPENDENTE DE ESTADO**

Porto Alegre  
2017

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica  
do Rio Grande do Sul

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE

CAROLINA GARRIDO ZINN

Modulação da memória de reconhecimento social pelos sistemas noradrenérgico e dopaminérgico em diferentes estruturas cerebrais: o metilfenidato e o aprendizado dependente de estado

PORTO ALEGRE

2017

CAROLINA GARRIDO ZINN

Modulação da memória de reconhecimento social pelos sistemas noradrenérgico e dopaminérgico em diferentes estruturas cerebrais: o metilfenidato e o aprendizado dependente de estado

Tese apresentada como requisito para a obtenção do grau de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

ORIENTADOR: PROF. DR. IVAN IZQUIERDO

CO-ORIENTADORA: PROF. DRA. JOCIANE DE CARVALHO MYSKIW

PORTO ALEGRE

2017

## Ficha Catalográfica

Z78 Zinn, Carolina Garrido

Modulação da memória de reconhecimento social pelos sistemas noradrenérgico e dopaminérgico em diferentes estruturas cerebrais : O metilfenidato e o aprendizado dependente de estado / Carolina Garrido Zinn .  
– 2017.

147 f.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, PUCRS.

Orientador: Prof. Dr. Ivan Izquierdo.

Co-orientadora: Profa. Dra. Jociane de Carvalho Myskiw.

1. Memória. 2. Dependência de estado. 3. Metilfenidato. 4. Dopamina. 5. Noradrenalina. I. Izquierdo, Ivan. II. Myskiw, Jociane de Carvalho. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

CAROLINA GARRIDO ZINN

Modulação da memória de reconhecimento social pelos sistemas noradrenérgico e dopaminérgico em diferentes estruturas cerebrais: o metilfenidato e o aprendizado dependente de estado

Tese apresentada como requisito para a obtenção do grau de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Aprovada em: \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

BANCA EXAMINADORA:

---

Prof. Dr. Carlos Fernando de Mello - UFSM

---

Prof. Dra. Nadja Schörder - PUCRS

---

Prof. Dr. Rafael Roesler - UFRGS

---

Prof. Dr. Rodrigo Grassi - PUCRS

---

Prof. Dra. Maria Martha Campos (Suplente) - PUCRS

PORTO ALEGRE

2017

*À minha mãe,  
Meu grande exemplo de pessoa e superação.*

## AGRADECIMENTOS

O amadurecimento científico desta tese de doutorado reflete, de muitas maneiras, a progressão do meu crescimento como ser humano e como pesquisadora. Este processo de maturação não se concretizaria sem a influência sinérgica de pessoas a quem gostaria de agradecer imensamente.

Agradeço primeiramente aos meus pais, **Angela e Getúlio**, que sempre fizeram o máximo para que eu tivesse acesso a uma boa educação, ética e valores. Muito obrigada pelas inúmeras conversas e conselhos, por estarem sempre disponíveis, pelo apoio moral e financeiro. Vocês vibraram comigo em cada pequena conquista e estiveram presentes, sempre me ajudando, nos momentos difíceis. Muito obrigada por tudo! Amo vocês! Um agradecimento especial à minha mãe, por ter acreditado no meu sonho de criança de ser cientista, e por ter me incentivado fervorosamente desde o começo da minha jornada científica até hoje. Mãe, parece que o sonho está se tornando realidade e tu foste fundamental para isso. A ti dedico este trabalho.

Ao meu esposo e melhor amigo, **Jacopo**, pelo carinho, companheirismo e compreensão. Obrigada por trazer alegria aos meus dias, especialmente naqueles mais cinzentos.

Ao meu orientador e querido **Mestre**, Professor **Ivan Izquierdo**, por ter me recebido de volta ao Centro de Memória e me dado a oportunidade de aprender um pouco mais com a sua simpatia, humildade, gentileza e genialidade. O senhor transmite saber até nas pequenas situações cotidianas. Seus ensinamentos são valiosos tanto para o meu crescimento profissional como pessoal. É uma honra fazer parte do seu grupo de pesquisa e poder conviver com o senhor diariamente.

À minha co-orientadora, Professora **Jociane Myskiw**, pela pronta acolhida no meu retorno ao laboratório, pelo auxílio na elaboração deste projeto e na solução de problemas durante a sua execução, pelas várias discussões científicas que conduziram este trabalho. Foste essencial para o desenvolvimento desta tese. Obrigada pela atenção, paciência, ensinamentos e carinho.

À Professora **Cristiane Furini**, minha parceira de laboratório desde a iniciação científica, tua ajuda e disponibilidade foram fundamentais para a realização deste trabalho. Obrigada pelo carinho, preocupação e amizade ao longo destes anos.

Aos amigos e colegas que fazem ou fizeram parte do Centro de Memória, pessoas especiais, com as quais partilhei meus dias nestes quatro anos, e que

contribuíram de alguma forma para a realização desta tese. Ao **Nicolas Clairis**, por me apresentar o tema pelo qual me apaixonei, a memória de reconhecimento social. Às companheiras de experimentos, que viraram amigas do coração, **Lorena Cavalcante, Scheila Schmidt e Flávia Ferreira**, obrigada pelas longas conversas, discussões científicas (ou não), pela amizade, parceria e colaboração. Nós formamos um time e tanto! Conhecê-las foi um presente especial durante esta caminhada e com certeza levarei nossa amizade para a vida. À amiga **Roberta Fabbri**, pelas conversas, incentivos e entusiasmo pela ciência. À **Bruna Saenger, Jonny Behling, Fernanda Rodrigues, Eduarda Nachtigall, Clarissa Penha, Eduardo Assis Brasil, Bianca Schmidt, Patrícia Peixoto e Gabriel Heemann**, muito obrigada pela grande ajuda nos experimentos. À **Letícia Bühler**, pelo interesse, dedicação e responsabilidade com que abraçou este projeto. Obrigada a todos pela ajuda e pelos bons momentos vividos no lab e fora dele!

À Professora **Mara Zanini**, pela pronta disponibilidade e competência para extrair o metilfenidato. Sem a tua ajuda este trabalho não seria viável.

Às professoras **Nadja Schroder e Maria Martha Campos**, por me orientarem nos estágios docente e reforçarem em mim o sentimento de que ensinar é realmente fascinante. As suas contribuições durante a banca de qualificação, juntamente ao professor **Rafael Roesler**, foram de grande valia para o aprimoramento desta tese. Estendo o agradecimento aos professores **Carlos de Mello e Rodrigo Grassi**, por terem aceitado participar desta banca examinadora. Sou muito grata a todos pelas correções, sugestões, críticas, e também por compartilharem comigo seus conhecimentos e experiências.

Aos amigos **Fernando Benetti e Weber Cláudio**, que me estimularam a fazer o doutorado.

To teacher **Débora Pasin Montenegro**, for reviewing my english texts and for all the good and funny moments we had together in the last 3 months. Being part of your Phd project (and meet you) was amazing! You helped me a lot to improve my english pronounce and other useful skills for the academia. You have my gratitude.

Aos demais professores que passaram pela minha vida, contribuíram para a minha formação e me inspiraram de alguma forma a seguir por este caminho.

Aos familiares e amigos, que ficaram na torcida e me encorajaram nos momentos difíceis. São muitos, mas vou citar alguns nomes: **Virginia, Rosane, Tia Tânia, Tia Vera, Tio Itamar, Monas, Mariana, Ingrid e Ayrton**. Muito obrigada!



À **Luciane** e ao **Pedro**, pelo amparo psicológico sempre que necessário, pelas conversas que me fizeram refletir, amadurecer e aprender durante esta jornada. À Luciane por entender a minha visão científica e tentar me mostrar que nem tudo na vida é baseado só em alterações neuroquímicas. Ao Pedro, pelas inúmeras explicações científicas, pelas ideias em relação a este projeto, e por sempre tentar me mostrar que as coisas podem ser simples e fáceis de serem resolvidas.

À Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul pelo apoio financeiro e infraestrutura necessários à execução deste trabalho.

À CAPES pela bolsa de estudos e ao CNPq e FAPERGS pelo apoio financeiro.

*Memory is the glue that holds our mental life together. Without its unifying power, both our conscious and unconscious life would be broken into as many fragments as there are seconds in the day. Our life would be empty and meaningless.*

*(KANDEL; DUDAI; MAYFORD, 2014)*

## RESUMO

A memória de reconhecimento social (MRS) é crucial à reprodução, formação de grupos sociais e sobrevivência das espécies. Sabe-se que a ocitocina, a vasopressina, os hormônios sexuais e o bulbo olfatório têm um forte envolvimento na formação da MRS. Apesar de sua relevância, a participação de neurotransmissores, como dopamina (DA), noradrenalina (NA) e histamina (HIS), bem como das estruturas amígdala basolateral (BLA) e região CA1 do hipocampo (CA1) – já amplamente conhecidos pela sua importância na consolidação e manutenção de outros tipos de memórias – permanece desconhecido quanto à MRS. Sendo assim, a primeira parte deste trabalho buscou avaliar a participação dos receptores D1/D5 dopaminérgicos,  $\beta$ -adrenérgicos e H2 histaminérgicos na BLA e CA1 sobre a consolidação da MRS. Para isso, ratos Wistar machos adultos (3 meses) foram submetidos a tarefa de discriminação social (TDS), que baseia-se na tendência natural dos roedores de explorar a novidade. O animal adulto foi exposto a um juvenil (21 dias) coespecífico por 1 hora (sessão de treino) e 24 horas depois ao juvenil previamente encontrado (familiar) e a um novo juvenil durante 5 minutos (sessão de teste), quando o tempo de exploração foi medido. As intervenções farmacológicas ocorreram imediatamente após a sessão de treino. Verificou-se que os receptores H2 histaminérgicos são necessários para a consolidação da memória tanto em CA1 quanto na BLA. Contudo a ativação dos receptores D1/D5 dopaminérgicos e  $\beta$ -adrenérgicos interfere de forma oposta nas duas estruturas cerebrais: os receptores D1/D5 são necessários em CA1, mas não na BLA para a consolidação da MRS, enquanto a ativação dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos é indispensável na BLA, porém não em CA1. O metilfenidato (MPH) é um fármaco amplamente utilizado no tratamento do Transtorno do Déficit de Atenção e Hiperatividade. Exerce seu efeito terapêutico pelo aumento nos níveis de DA e NA em estruturas cerebrais envolvidas nos processos de aprendizagem, como córtex pré-frontal (CPF) e hipocampo. Uma vez que a DA e a NA tem ações opostas na MRS, decidimos avaliar o efeito do MPH sobre a formação e a evocação da MRS, já que esta droga atua sobre os níveis de ambos os neurotransmissores e tem sido utilizada como *doping* acadêmico por indivíduos saudáveis. Utilizando a TDS, com as intervenções farmacológicas em diferentes momentos, verificamos que: 1) o MPH, administrado de forma sistêmica aguda previamente à aquisição da informação,

bloqueou a MRS; 2) O bloqueio foi revertido quando os animais receberam MPH no momento da aquisição e da evocação, caracterizando o fenômeno conhecido como dependência de estado (DE); 3) A DE é associada ao CPF, mas não a CA1; 4) A DE não depende de CA1, pois o aumento de NA em CA1 prejudica a evocação da MRS. Além disso, verificamos que o tratamento crônico de 21 dias com MPH causa uma maior persistência da MRS, quando realizada uma sessão de treino mais fraca. Considerando os resultados obtidos, este trabalho demonstra que o hipocampo, a amígdala basolateral e o córtex pré-frontal, modulados pelos sistemas dopaminérgico e noradrenérgico, regulam o processamento da MRS.

Palavras-chave: Memória de reconhecimento social; Dopamina; Noradrenalina; Metilfenidato; Hipocampo; Amígdala basolateral; Córtex pré-frontal; Dependência de estado.

## ABSTRACT

The social recognition memory (SRM) is crucial to reproduction, formation of social groups and species survival. It is well known that oxytocin, vasopressin, sexual hormones and the olfactory bulb are strongly involved in the formation of SEM. Despite its relevance, the involvement of neurotransmitters such as dopamine (DA), noradrenaline (NE) and histamine (HIS), as well as the brain structures basolateral amygdala (BLA) and CA1 region of dorsal hippocampus – commonly known for their importance in consolidating and maintaining other types of memories – remains unknown when concerning SRM. Therefore, the first part of this study aims to evaluate the participation of the D1/D5 dopaminergic,  $\beta$ -adrenergic and H2 histaminergic receptors into BLA and CA1 on consolidation of SRM. For this, male Wistar adult rats (3 months) were submitted to the social discrimination task (SDT), which is based on the natural tendency of the rodents to explore the novelty. The adult animal was exposed to a juvenile (21 days) conspecific for 1 hour (training session) and 24 hours later to the juvenile previously met (familiar) and to a new juvenile during 5 minutes (test session), when the exploration time was measured. Pharmacological interventions took place immediately after the training session. We verified that the H2 histaminergic receptors are required to the consolidation of SRM both in CA1 and BLA. However, the activation of D1/D5 dopaminergic and  $\beta$ -adrenergic receptors interferes in an opposite way in the two brain structures: D1/D5 receptors are required in CA1, but not in BLA for consolidation of MRS, whereas activation of  $\beta$ -adrenergic receptors is indispensable in BLA, but not in CA1. Methylphenidate (MPH) is a drug widely used in the treatment of Attention Deficit Hyperactivity Disorder. It exerts its therapeutic effect by increasing levels of DA and NE in brain structures involved in the learning processes, such as prefrontal cortex (PFC) and hippocampus. Since DA and NE have opposite actions in MRS, we decided to evaluate the effect of MPH on the formation and recall of MRS, since this drug acts on the levels of both neurotransmitters and has been used for academic doping by healthy individuals. Using SDT, with pharmacological interventions at different times, we verified that: 1) MPH, administered acutely prior to the information acquisition, blocked SRM; 2) Blockade was reversed when the animals received MPH at the time of acquisition and retrieval, characterizing the phenomenon known as state dependency (SD) learning; 3) The SD is associated

to the CPF, but not to CA1; 4) SD does not depend on CA1, since the increase of NE in CA1 impairs the retrieval of the SRM. In addition, we verified that the 21-day chronic treatment with MPH causes a greater persistence of MRS when a weaker training session is performed. Considering the obtained results, this work demonstrates that the hippocampus, the basolateral amygdala and the prefrontal cortex, modulated by the dopaminergic and noradrenergic systems, regulate the SRM processing.

Keywords: Social recognition memory; Dopamine; Noradrenaline; Methylphenidate; Hippocampus; Basolateral amygdala; Prefrontal cortex; State dependency.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1. PARADIGMAS UTILIZADOS PARA VERIFICAR A MEMÓRIA DE RECONHECIMENTO SOCIAL.....	31
FIGURA 2. CIRCUITARIA CEREBRAL ATIVADA NO PROCESSAMENTO DAS INFORMAÇÕES OLFATIVAS ASSOCIADAS À MEMÓRIA DE RECONHECIMENTO SOCIAL EM ROEDORES.....	32
FIGURA 3. SISTEMA HISTAMINÉRGICO .....	35
FIGURA 4. SÍNTESE DA HISTAMINA .....	36
FIGURA 5. SÍNTESE DAS CATECOLAMINAS .....	39
FIGURA 6. SISTEMA DOPAMINÉRGICO .....	41
FIGURA 7. REGULAÇÃO DA ADENILIL CICLASE PELOS RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS DAS FAMÍLIAS D1 E D2.....	42
FIGURA 8. SISTEMA NORADRENÉRGICO .....	44
FIGURA 9. SÍTIOS FARMACOLOGICAMENTE SENSÍVEIS DO NEURÔNIO NORADRENÉRGICO.....	45
FIGURA 10. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PROTOCOLO EXPERIMENTAL DA TAREFA DE DISCRIMINAÇÃO SOCIAL .....	60
FIGURA 11. DESENHO ESQUEMÁTICO DOS LOCAIS DE MICROINFUSÃO .....	62
FIGURA 12. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PROTOCOLO EXPERIMENTAL DA TAREFA DE DISCRIMINAÇÃO SOCIAL E DAS INTERVENÇÕES FARMACOLÓGICAS.....	78
FIGURA 13. ESPECTRO DE RMN DE HIDROGÊNIO DO PRODUTO OBTIDO APÓS A EXTRAÇÃO DE METILFENIDATO DAS DRÁGEAS DE RITALINA .....	80
FIGURA 14. ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DO PRODUTO OBTIDO APÓS A EXTRAÇÃO DE METILFENIDATO DAS DRÁGEAS DE RITALINA .....	81
FIGURA 15. ESPECTRO DE RMN DE HIDROGÊNIO UTILIZADO COMO REFERÊNCIA PARA A EXTRAÇÃO DO METILFENIDATO .....	82
FIGURA 16. ESPECTRO DE INFRAVERMELHO UTILIZADO COMO REFERÊNCIA PARA A EXTRAÇÃO DO METILFENIDATO .....	83
FIGURA 17. DESENHO ESQUEMÁTICO DOS LOCAIS DE MICROINFUSÃO .....	85
FIGURA 18. EFEITO DO TRATAMENTO CRÔNICO COM METILFENIDATO SOBRE A MEMÓRIA DE RECONHECIMENTO SOCIAL.....	114
FIGURA 19. O METILFENIDATO NÃO CAUSA EFEITO A LONGO PRAZO SOBRE A MRS, ATÉ 14 DIAS APÓS O FIM DO TRATAMENTO.....	115
FIGURA 20. O TRATAMENTO CRÔNICO COM METILFENIDATO FACILITA A PERSISTÊNCIA DA MEMÓRIA DE RECONHECIMENTO SOCIAL.....	117
FIGURA 21. O EFEITO FACILITADOR DO TRATAMENTO CRÔNICO COM METILFENIDATO NÃO PERDURA NA AUSÊNCIA DA DROGA. ....	118

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1. TEMPO TOTAL DE EXPLORAÇÃO DURANTE O TREINO DE 5 MINUTOS. ....	118
TABELA 2. TEMPO TOTAL DE EXPLORAÇÃO DURANTE O TESTE. ....	119



## LISTA DE SIGLAS

AC	Adenilil ciclase
AMPc	Adenosina monofosfato
ATP	Adenosina trifosfato
CPF	Córtex pré-frontal
DA	Dopamina
DAG	Diacilglicerol
DAT	Transportador de dopamina, do inglês <i>Dopamine transporter</i>
DβH	Dopamina β-hidroxilase
FNMT	Fentolamina N-metiltransferase
GPCR	Receptores acoplados à proteína G, do inglês <i>G protein-coupled receptors</i>
IP <sub>3</sub>	Inositoltrifosfato
LC	Locus coeruleus
LTD	Depressão de longa duração, do inglês <i>Long term depression</i>
LTP	Potencialização de longa duração, do inglês <i>Long term potentiation</i>
MAO	Monoamino-oxidase
MPH	Metilfenidato, do inglês <i>methylphenidate</i>
MRS	Memória de reconhecimento social
NA	Noradrenalina
NET	Transportador de noradrenalina, do inglês <i>Noradrenaline transporter</i>
NPY	Neuropeptídeo Y
PKA	Proteína quinase dependente de AMPc
TDAH	Transtorno do Déficit de Atenção e Hiperatividade
TH	Tirosina hidroxilase

VMAT	Transportador vesicular de monoaminas, do inglês <i>vesicular monoamine transporter</i>
VTA	Área tegmentar ventral, do inglês <i>Ventral tegmental area</i>
5HT	5-hidroxitriptamina ou serotonina

## SUMÁRIO

<b>APRESENTAÇÃO .....</b>	<b>22</b>
<b>CAPÍTULO I: MEMÓRIA E O CÉREBRO SOCIAL .....</b>	<b>23</b>
1. INTRODUÇÃO .....	24
1.1. MEMÓRIA: CONCEITOS E CLASSIFICAÇÕES .....	24
1.2. CÉREBRO SOCIAL: MEMÓRIA DE RECONHECIMENTO SOCIAL E SEUS MECANISMOS .....	27
1.3. NEUROTRANSMISSORES ENVOLVIDOS NA FORMAÇÃO DA MEMÓRIA .....	33
1.3.1. HISTAMINA .....	34
1.3.2. CATECOLAMINAS: DOPAMINA E NORADRENALINA .....	38
1.4. TRANSTORNO DE DÉFICIT DE ATENÇÃO E HIPERATIVIDADE E O SEU TRATAMENTO: O METILFENIDATO .....	47
1.5. METILFENIDATO E RECONHECIMENTO SOCIAL EM ROEDORES .....	51
1.6. JUSTIFICATIVA .....	52
<b>CAPÍTULO II: MODULAÇÃO DA CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA DE RECONHECIMENTO SOCIAL NO HIPOCAMPO DORSAL E AMÍGDALA BASOLATERAL .....</b>	<b>54</b>
2. INTRODUÇÃO .....	55
2.1. OBJETIVOS.....	57
2.1.1. OBJETIVO GERAL .....	57
2.1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	57
2.2. METODOLOGIA .....	58
2.2.1. ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	58
2.2.2. CIRURGIA ESTEREOTÁXICA.....	58
2.2.3. MANIPULAÇÃO .....	58
2.2.4. PARADIGMA DE DISCRIMINAÇÃO SOCIAL .....	59
2.2.5. INTERVENÇÃO FARMACOLÓGICA .....	60
2.2.6. ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	61
2.2.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	62
2.3. ARTIGO CIENTÍFICO.....	63
2.4. CONCLUSÕES.....	69
<b>CAPÍTULO III: METILFENIDATO INDUZ DEPENDÊNCIA DE ESTADO NA MEMÓRIA DE RECONHECIMENTO SOCIAL .....</b>	<b>70</b>
3. INTRODUÇÃO .....	71
3.1. OBJETIVOS.....	75
3.1.1. OBJETIVO GERAL .....	75
3.1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	75
3.2. METODOLOGIA .....	76
3.2.1. ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	76
3.2.2. CIRURGIA ESTEREOTÁXICA.....	76
3.2.3. MANIPULAÇÃO .....	76
3.2.4. PARADIGMA DE DISCRIMINAÇÃO SOCIAL .....	77
3.2.5. CARACTERIZAÇÃO FARMACOLÓGICA DO METILFENIDATO .....	79
3.2.6. INTERVENÇÃO FARMACOLÓGICA .....	83
3.2.7. ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	85
3.2.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	85
3.3. RESULTADOS .....	87
3.3.1. PARTE I: TRATAMENTO AGUDO COM METILFENIDATO – ARTIGO ORIGINAL .....	88

PARTE II: TRATAMENTO CRÔNICO COM METILFENIDATO .....	114
3.4.DISSCUSSÃO.....	120
<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>124</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>126</b>
<b>ANEXO A – CARTA DE SUBMISSÃO DO ARTIGO .....</b>	<b>147</b>

## APRESENTAÇÃO

A presente tese de doutorado é resultado de dois estudos principais, os quais buscaram investigar, separadamente, através de manipulação farmacológica, como se dá o controle da memória de reconhecimento social e quais os efeitos do tratamento agudo e crônico com um estimulante do sistema nervoso central, o metilfenidato, sobre este tipo de memória.

A tese se divide em quatro partes: O Capítulo I destina-se a explanar a logística de organização da tese e justificar o assunto de pesquisa, apresentando uma revisão da literatura sobre os tipos de memória e neurotransmissores envolvidos, com enfoque na memória de reconhecimento social; o Capítulo II contempla um resumo com os principais pontos que levaram ao estudo de receptores específicos de noradrenalina, dopamina e histamina no hipocampo e amígdala basolateral, sobre o controle da memória de reconhecimento social, apresenta os objetivos que guiaram este trabalho, os materiais e métodos utilizados para tanto apresentado de forma expandida, e resultados e discussão no formato de artigo científico original, publicado na revista *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; o Capítulo III, da mesma forma que o capítulo anterior, constitui-se da introdução, expondo a problemática do uso do metilfenidato, dos objetivos, dos materiais e métodos, resultados obtidos com o tratamento farmacológico agudo e crônico com metilfenidato sobre a memória de reconhecimento social, sendo uma parte na forma de um manuscrito submetido à revista *Neurobiology of Learning and Memory*, e a discussão; por fim a última parte é composta por uma sessão listando as principais conclusões oriundas desta tese.

*CAPÍTULO I:*  
*MEMÓRIA E O CÉREBRO SOCIAL*

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Memória: conceitos e classificações

As memórias são peças-chave para a formação da nossa identidade, uma vez que o acervo de nossas memórias, adquiridas através de experiências, nos torna seres únicos (IZQUIERDO, 2011). As memórias são também essenciais para guiar os nossos comportamentos futuros, pois acessando as ações passadas e suas consequências, podemos atuar sobre estes conhecimentos previamente armazenados, agindo e pensando de novas maneiras (MCGAUGH, 2015; SQUIRE, 2009; STERN; ALBERINI, 2013). Sendo assim, as memórias são imprescindíveis para a sobrevivência e adaptação ao meio que nos cerca (DOYLE; KIEBLER, 2011; MCGAUGH, 2013; SCHACTER, 1997).

A memória é o resultado de um processo no qual aquilo que é aprendido persiste ao longo do tempo (SQUIRE, 2009). Logo, aprendizado e memória são fortemente conectados. Tudo o que sabemos foi adquirido por meio de experiências e mantido pela memória, por exemplo, o rosto e o nome de um amigo ou familiar, matemática, um número de telefone, aprender a andar de bicicleta ou tocar uma música no violão (IZQUIERDO, 2011; SQUIRE, 2009). A memória consiste na aquisição, conservação e evocação de determinadas informações adquiridas através dos diversos sistemas sensoriais (DUDAI, 1997; IZQUIERDO, 2011). O processo de formação da memória é extremamente complexo, e requer diferentes mecanismos moleculares e celulares, além da participação de diversas estruturas cerebrais. O início da formação de uma memória se dá através da fase de aquisição, também chamada de aprendizagem. A mesma ocorre quando um indivíduo é exposto a uma nova informação. Posteriormente, ocorre a fase de armazenamento dessa informação recém adquirida, processo chamado de consolidação (IZQUIERDO; MEDINA, 1997). Finalmente, o acesso à informação caracteriza a evocação, ou lembrança, quando uma informação armazenada pode ser requisitada para uso em processos cognitivos, emoções ou expressão de um comportamento (IZQUIERDO, 2011; SQUIRE, 2009). Quando a memória é evocada, ela se torna novamente lábil e sofre um processo de re-estabilização, conhecido como reconsolidação (PRZYBYSLAWSKI; SARA, 1997; SARA, 2000; STERN; ALBERINI, 2013).

Georg Muller e Alfons Pilzecker verificaram em experimentos em humanos, no final do século XIX, que durante o período de consolidação a memória é suscetível a agentes que a prejudiquem. Suas observações que as memórias recém formadas são suscetíveis a diversos fatores interferentes foram corroboradas posteriormente por estudos em animais e humanos (SQUIRE, 2009). Nas primeiras horas após a aquisição, as memórias são lábeis e suscetíveis à interferência por diversos fatores, desde traumatismos cranianos, eletrochoque, uso de drogas e até mesmo a ocorrência de novas memórias (DE CARVALHO MYSKIW; BENETTI; IZQUIERDO, 2013; KIM et al., 2012; MCGAUGH, 2000; REICHEL et al., 2011; SARA; DAVID-REMACLE, 1974). Cabe ressaltar ainda que as etapas da formação da memória podem ser moduladas, melhorando ou prejudicando a memória (CAHILL; ALKIRE, 2003; MCGAUGH; ROOZENDAAL, 2002; SACAI et al., 2014). Diversos fatores podem cumprir este papel modulador: o estado de ânimo, as emoções, os níveis de alerta, ansiedade e estresse ou, ainda, a utilização de estimulantes ou depressores do sistema nervoso central (CAHILL; MCGAUGH, 1995; FINSTERWALD; ALBERINI, 2014; MORGAN, 1999; RADULOVIC et al., 1999; REZAYOF et al., 2008). Estes fatores desencadeiam a liberação de diversos hormônios, neuromoduladores e neurotransmissores, que atuarão direta ou indiretamente sobre estruturas sabidamente envolvidas na modulação da memória, como a amígdala basolateral (CAHILL; MCGAUGH, 1995, 1998; GALLAGHER; CHIBA, 1996; IZQUIERDO, 2011; MCGAUGH, 2002).

Uma vez que os processos de armazenamento são dependentes do tempo (MCGAUGH, 1966), as memórias são classificadas quanto à sua duração, sendo divididas em memória de trabalho, memória de curto prazo e memória de longo prazo. A memória de trabalho, ou memória operacional, dura frações de segundos até alguns poucos minutos, não deixa traços, depende fundamentalmente do córtex pré-frontal e envolve o processo de manutenção ativa de quantidade limitada de informações, mantendo *online* a informação que está sendo processada no momento e dando continuidade aos nossos atos (IZQUIERDO, 2011; JENESON; SQUIRE, 2011; SQUIRE, 2009). A memória de curto prazo permanece por minutos até algumas horas, mantendo a informação ativa na mente, o que garante o sentido de continuidade do presente, enquanto a memória de longo prazo é consolidada (IZQUIERDO, 2011; SQUIRE, 2009; STERN; ALBERINI, 2013). Como o próprio nome diz, a memória de longo prazo pode durar de horas até décadas. Diferentemente da memória de curto



prazo, ela necessita obrigatoriamente de síntese de novas proteínas para que seja fixada, através do processo de consolidação (SQUIRE, 2009). Tanto as memórias de curto, quanto as de longo prazo requerem as mesmas estruturas encefálicas para a sua formação, contudo os seus mecanismos moleculares são distintos (IZQUIERDO et al., 1998, 1999).

Em 1890, William James, filósofo americano, descreveu o hábito, como uma ação mecânica e reflexa, e a memória, como algo que envolve a noção consciente do passado. Ao longo do século XX, esses conceitos foram aprimorados, sendo chamados de conhecimento implícito, mais automático e reflexo, envolvendo habilidades motoras, e explícito, envolvendo a recordação consciente do passado e o conhecimento de fatos e eventos (MILNER; SQUIRE; KANDEL, 1998; SQUIRE, 2009). Por fim, através do estudo de pacientes com amnésia em decorrência de lesões cerebrais, foi possível classificar as memórias de acordo com seu conteúdo, sendo divididas em memórias declarativas (ou explícitas) e as memórias não declarativas (ou implícitas) (SQUIRE; ZOLA, 1996).

A memória declarativa se refere à lembrança de fatos e eventos, e é assim nomeada por conter conhecimentos que podem potencialmente ser declarados, ou seja, trazidos à mente de uma forma verbal ou como uma imagem mental (SQUIRE, 2009). Quando utilizamos os termos “memória” e “lembrar” na linguagem comum, geralmente nos referimos a este tipo de memória, como recordar o nome de um amigo de infância, de uma viagem realizada, ou de uma notícia que leu no jornal pela manhã. Ela se refere à lembrança de palavras, objetos, cenas, faces e histórias, e depende do lobo temporal medial, em particular do hipocampo (MAYFORD; SIEGELBAUM; KANDEL, 2012; SQUIRE, 1992; SQUIRE; ZOLA, 1996). Pode ser subdividida em memórias semânticas e memórias episódicas: a primeira se refere a conhecimentos gerais, como história, matemática, enquanto a segunda é autobiográfica, em relação aos episódios da vida de um indivíduo (IZQUIERDO, 2011; SQUIRE, 2009).

A memória não-declarativa compreende uma coleção heterogênea de capacidades de aprendizagem e de memória, que permitem a aquisição de informações implicitamente (SQUIRE; ZOLA-MORGAN, 1988). Inclui informações que são adquiridas durante o aprendizado de habilidades, sejam elas motoras, sensoriais ou cognitivas, de hábitos, de associações simples, aprendizado emocional e de outros conhecimentos que são expressos através de performance ao invés da lembrança (SQUIRE, 1992, 2009). É a memória de como executar tarefas, envolvendo

amplamente o aprendizado motor, como, por exemplo, andar de bicicleta, tocar piano ou fazer tricô. Diferentemente da memória declarativa, depende de estruturas como cerebelo, amígdala e estriado (STERN; ALBERINI, 2013).

Nas desordens que afetam a memória, como as amnésias, doença de Alzheimer e doença de Parkinson, as memórias declarativas costumam falhar primordialmente, enquanto as memórias implícitas são frequentemente poupadas, ou prejudicadas apenas nos últimos estágios da doença (IZQUIERDO, 2011; SQUIRE; ZOLA-MORGAN, 1988; STERN; ALBERINI, 2013). Indivíduos com dificuldade de formar novas memórias ou de acessá-las têm suas vidas seriamente prejudicadas, podendo causar até isolamento social (STERN; ALBERINI, 2013).

Existem ainda outras subdivisões para as memórias declarativas, como a memória espacial, aversiva e de reconhecimento. No presente estudo, daremos enfoque a memória de reconhecimento social, devido à sua indiscutível importância na formação de grupos sociais e suas consequências.

## **1.2. Cérebro social: Memória de reconhecimento social e seus mecanismos**

As memórias de reconhecimento são necessárias para verificar se determinado estímulo foi previamente encontrado, permitindo averiguar se características, elementos, eventos ou indivíduos são familiares ou novos (BERMUDEZ-RATTONI, 2014; BROWN; XIANG, 1998; MANDLER, 1980; WARBURTON; BROWN, 2014). Essa habilidade desenvolvida ao longo da evolução facilita a sobrevivência de muitas espécies (BERMUDEZ-RATTONI, 2014). Humanos e outros animais são capazes de reconhecer diferentes odores, gostos, objetos, faces e indivíduos, e a partir disso decidir o comportamento a ser adotado frente ao estímulo (ENNACEUR; DELACOUR, 1988; FEINBERG et al., 2012; GHEUSI et al., 1994; RUETTI et al., 2014; WILMER; GERMINE; NAKAYAMA, 2014).

Quanto mais evoluída a espécie, maior a necessidade de formar grupos, uma vez que viver em comunidade gera segurança entre seus integrantes (IZQUIERDO, 2011). O reconhecimento social é essencial à formação e estabilidade destes grupos sociais, que moldam as comunidades e sociedades (KOGAN; FRANKLAND; SILVA, 2000; VAN DER KOOIJ; SANDI, 2012). Contudo, ao longo da evolução apenas uma pequena fração de organismos se tornou capaz de formar complexos organizacionais, através da interação com outros membros de sua espécie (GUR; TENDLER;

WAGNER, 2014; NORMAN et al., 2012). Dentre estes, os mamíferos são, em geral, espécies muito sociais e interagem de forma pró-social a fim de se reproduzir, cuidar da cria, caçar e se alimentar (ANACKER; BEERY, 2013).

Os humanos são os mamíferos que formam a maior rede social conhecida, constituída de civilizações e culturas altamente desenvolvidas, em consequência dos seus complexos comportamentos sociais, que induzem à interação social (CACIOPPO; DECETY, 2011). As civilizações humanas sequer existiriam se não houvesse um comportamento coletivo em larga escala, uma característica humana comum (ADOLPHS, 2009). As relações humanas dependem de interações sociais, que necessitam de capacidades importantes para o domínio social efetivo, como a linguagem, a comunicação, as funções executivas, o altruísmo, a empatia e, especialmente, o reconhecimento social (ADOLPHS, 2009; CACIOPPO; DECETY, 2011; INSEL, 2000). O processamento social em humanos depende ainda do reconhecimento da face e da voz, que são processados de forma diferente de objetos inanimados no cérebro (HAXBY; HOFFMAN; GOBBINI, 2000). Estes requisitos gerais são necessários em um amplo espectro de interações sociais, desde um encontro casual entre conhecidos, ao vínculo mãe-bebê e à formação de laços entre amigos e familiares (LIM; BIELSKY; YOUNG, 2005).

Muitas doenças psiquiátricas e neurológicas são caracterizadas por danos relevantes no funcionamento social, impactando profundamente as relações sociais dos pacientes, como ocorre na depressão e na fobia social, em que pode ocorrer isolamento social; na síndrome de Williams, em que há sociabilidade excessiva; e na síndrome de Capgras, em que o indivíduo pensa que o seu cônjuge foi substituído por um impostor idêntico (GUNAYDIN et al., 2014; KENNEDY; ADOLPHS, 2012). Dentre os diversos aspectos da cognição social, o reconhecimento social é sobremaneira afetado na esquizofrenia e no autismo, que causam déficits de comunicação e sociais, possivelmente, em função do processamento deficiente de faces e emoções (EARLS; CURRAN; MITTAL, 2016; FUJISAWA et al., 2014; INSEL; FERNALD, 2004a; LIM; BIELSKY; YOUNG, 2005; MEGREYA, 2016; RADELOFF et al., 2014; WEIGELT; KOLDEWYN; KANWISHER, 2012). Os déficits cognitivos sociais comuns em pacientes com esquizofrenia parecem ocorrer devido a uma interação malsucedida entre o sistema de recompensa dopaminérgico, a amígdala disfuncional e o neurohormônio ocitocina, que juntos geram um meio neural que atribui incorretamente

importância emocional a estímulos do ambiente (ROSENFELD; LIEBERMAN; JARSKOG, 2011).

A memória de reconhecimento social (MRS) é dependente da capacidade de um indivíduo reconhecer e se lembrar de coespecíficos, indivíduos da mesma espécie (GABOR et al., 2012; GHEUSI et al., 1994). Sem esta memória a adaptação social, a reprodução e inclusive a sobrevivência podem ser comprometidas (CACIOPPO; DECETY, 2011; KOGAN; FRANKLAND; SILVA, 2000). Um indivíduo escolhe a resposta comportamental apropriada, como investigação, cooperação, competição, agressividade, dentre outras a serem adotadas frente a outros coespecíficos, em função do comportamento destes, mas também em função de encontros prévios e, conseqüentemente, da lembrança destes (GABOR et al., 2012; NORMAN et al., 2012; THOR; HOLLOWAY, 1982).

Dada a sua importância, os mecanismos subjacentes à construção e manutenção das relações sociais vêm sendo investigados em experimentos de laboratório, por meio de tarefas que permitem controlar os fatores que interferem no estabelecimento dessas relações. A fim de estudar esse tipo de memória em roedores, há mais de 30 anos foi desenvolvido o paradigma de reconhecimento social que reflete a habilidade de um animal identificar um indivíduo previamente apresentado (THOR; HOLLOWAY, 1982). Esta habilidade é medida através do decréscimo dos comportamentos sociais e do tempo de investigação observado em animais reexpostos a um coespecífico familiar (KOGAN; FRANKLAND; SILVA, 2000; THOR; HOLLOWAY, 1982). Ao longo dos anos, diferentes paradigmas para avaliar o reconhecimento social em roedores foram sendo adaptados a partir daquele descrito por Thor e Holloway (Figura 1). O paradigma da habituação/deshabituação, descrito por Dluzen (DLUZEN; KREUTZBERG, 1993) e Winslow (WINSLOW; CAMACHO, 1995), consiste na exposição do sujeito ao animal-estímulo por 4 sessões de 1 minuto, separadas por intervalos de 10 minutos. Na 5ª sessão, o sujeito é exposto a um novo animal estímulo, conseqüentemente o tempo de investigação, que vinha diminuindo até a 4ª sessão, aumenta na presença de um novo estímulo (FERGUSON; YOUNG; INSEL, 2002). Apesar de sua popularidade, esta variante do paradigma apresenta algumas dificuldades na interpretação dos dados, uma vez que a necessidade de várias sessões, pode afetar a motivação para a investigação social (CHOLERIS et al., 2009). Outra variação bastante utilizada é o paradigma de discriminação social, descrito por Engemann (ENGELMANN; WOTJAK; LANDGRAF, 1995), no qual o

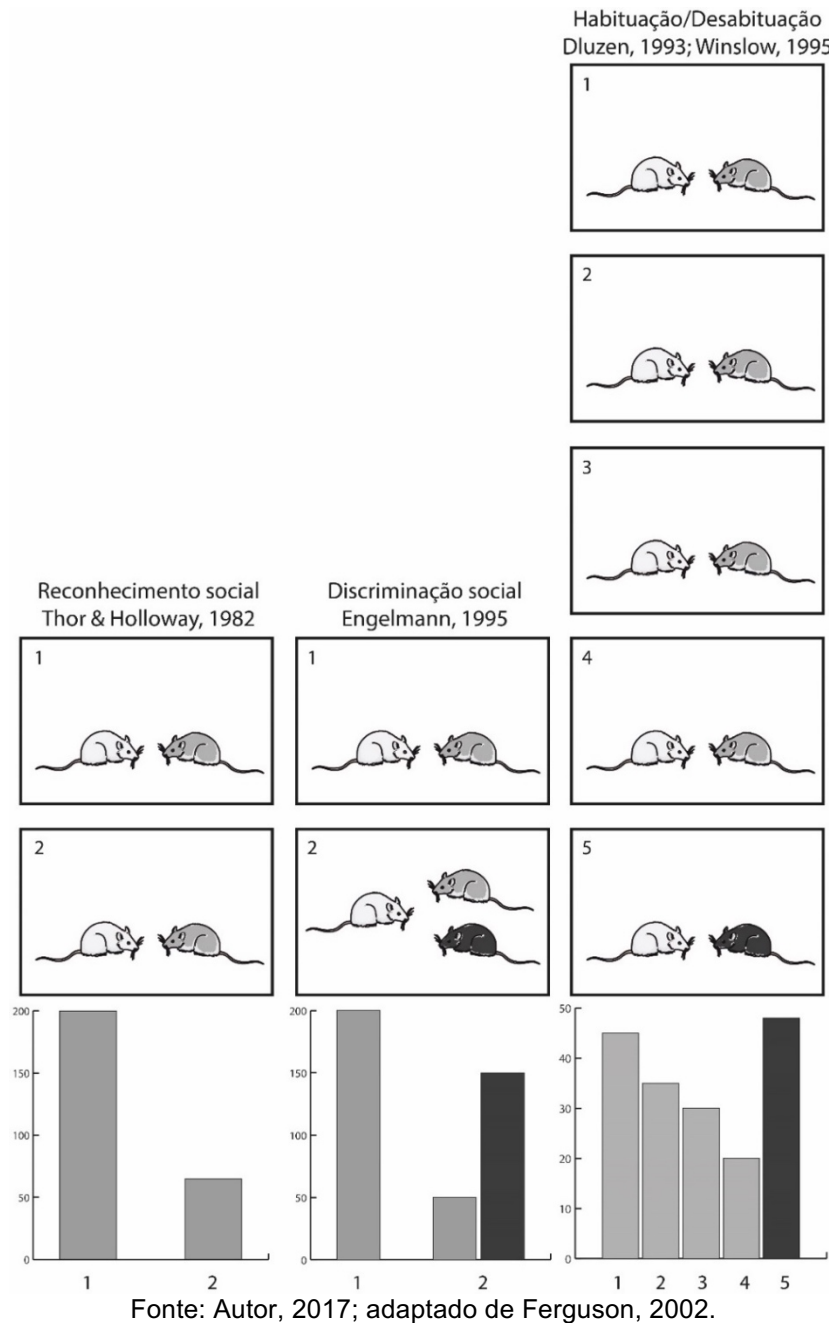
sujeito é exposto a um juvenil na primeira sessão, e na segunda sessão é simultaneamente exposto ao juvenil previamente encontrado e a um novo juvenil. Desta forma o tempo de exploração do juvenil familiar tende a ser menor, enquanto o juvenil novo é explorado por mais tempo, permitindo verificar a diferença nos tempos de investigação entre os estímulos (FERGUSON; YOUNG; INSEL, 2002). Esta variação parece ser mais sensível para mensurar o reconhecimento social do que a tarefa de habituação/desabituação, uma vez que necessita apenas uma única sessão de teste (CHOLERIS et al., 2009; FERGUSON; YOUNG; INSEL, 2002; VAN DER KOOIJ; SANDI, 2012).

Dentre as diversas variáveis que podem influenciar o reconhecimento social, a escolha adequada do animal-estímulo é crítica. Thor e Holloway recomendaram a utilização de animais machos juvenis, por se tratarem de um estímulo relativamente neutro, que provoca minimamente comportamentos agressivos ou sexuais do sujeito em análise. As ratas fêmeas ovariectomizadas têm sido apontadas como outra excelente opção de animal-estímulo, posto que podem ser utilizadas por períodos maiores do que os juvenis (WINSLOW; CAMACHO, 1995).

Uma vez criadas diferentes tarefas comportamentais para avaliar a MRS, a partir do estudo em modelos animais foi possível determinar o papel da ocitocina, da vasopressina e dos hormônios sexuais no reconhecimento social, além de suas ações na regulação do comportamento maternal, no cortejo, defesa de território e cuidados parentais (BLUTHÉ; GHEUSI; DANTZER, 1993; BYCHOWSKI; MENA; AUGER, 2013; EVERTS; KOOLHAAS, 1997; GOODSON; BASS, 2001; POPIK; VAN REE, 1998; POPIK; VETULANI; VAN REE, 1992; VAN WIMERSMA GREIDANUS; MAIGRET, 1996). A ação da ocitocina no reconhecimento social está associada à sua ação na amígdala medial (FERGUSON et al., 2001) e parece agir apenas na aquisição da MRS, enquanto a vasopressina atua nas fases de aquisição e consolidação deste tipo de memória (GABOR et al., 2012). Os estrógenos agem indiretamente, promovendo a síntese da ocitocina e seu respectivo receptor (DELLOVADE; ZHU; PFAFF, 1999). Curiosamente, em fêmeas de ratos e camundongos, a memória social tem um pico quando elas estão no pró-estro, que é o período em que os estrógenos estão em concentração mais elevada (ENGELMANN et al., 1998). O papel da testosterona, por sua vez, parece mais complexo e supõe-se que ela age através do estradiol (PIERMAN et al., 2008). A vasopressina também é regulada pela

testosterona, logo diferentes sistemas parecem estar ligados à ação da testosterona (GABOR et al., 2012).

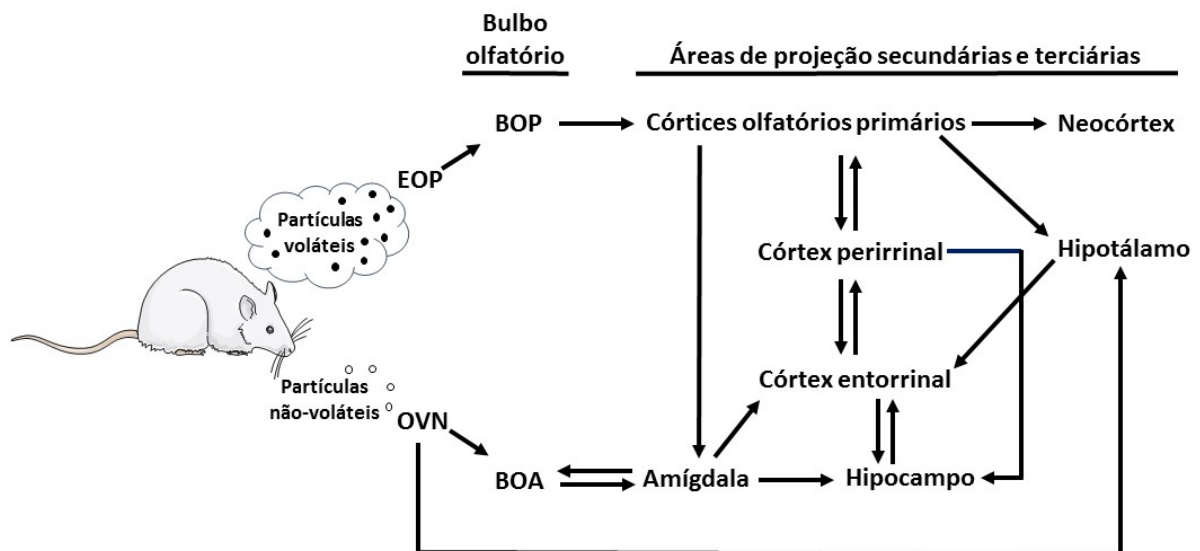
**Figura 1. Paradigmas utilizados para verificar a memória de reconhecimento social**



Em roedores, foi observado que o bulbo olfatório é indispensável à formação da memória de reconhecimento social, uma vez que, através da percepção das pistas químicas que carregam a informação olfativa, fornece o primeiro nível de processamento de informação utilizada para construir as memórias sociais (CAMATS

PERNA; ENGELMANN, 2015). O sistema age através do órgão vomeronasal e do bulbo olfatório acessório, que projetam neurônios para a amígdala – importante estrutura na modulação da memória, especialmente as com teor emocional – e do epitélio olfatório principal, que projeta conexões para o bulbo olfatório principal e deste, para os córtices olfatórios primários (CAMATS PERNA; ENGELMANN, 2015; INSEL; FERNALD, 2004a). A partir destas áreas de projeção secundárias, a informação é enviada a outras estruturas (Figura 2).

**Figura 2. Circuitaria cerebral ativada no processamento das informações olfativas associadas à memória de reconhecimento social em roedores**



Os estímulos não-voláteis são processados principalmente pelo órgão vomeronasal (OVN), que envia projeções ao bulbo olfatório acessório (BOA), transmitindo a informação ao sistema límbico e a áreas corticais essenciais para a formação da memória de reconhecimento social. Os estímulos voláteis, por sua vez, são processados principalmente pelo epitélio olfatório principal (EOP), que projeta ao bulbo olfatório principal (BOP), que envia a informação aos córtices olfatórios primários, de onde será transferida a áreas terciárias, incluindo a amígdala e o hipocampo. Fonte: Autor, 2017; adaptado de Camats Perna & Engelmann, 2015.

O córtex perirrinal, envolvido na discriminação de familiaridade de objetos (HO et al., 2015; OLARTE-SÁNCHEZ et al., 2015), recebe a informação sensorial dos córtices olfatórios e envia ao córtex entorrinal. Estudos que utilizaram lesões em ambas as estruturas, demonstraram prejuízos nas memórias de reconhecimento de odor social e de reconhecimento individual no contexto do efeito de Coolidge, apoiando o papel dessas estruturas no reconhecimento social (FEINBERG et al., 2012; PETRULIS; EICHENBAUM, 2003). Além do córtex perirrinal, o córtex entorrinal recebe projeções da amígdala, tálamo, hipotálamo e outras áreas modulatórias

(CAMATS PERNA; ENGELMANN, 2015). Outra conexão importante do córtex entorrinal se dá com o hipocampo, principal estrutura envolvida na consolidação das memórias declarativas. O córtex entorrinal é a porta de entrada para a formação hipocampal, provendo a principal fonte de acesso cortical a este. Além disso, em conjunto com o subiculum, também recebe a maior saída do hipocampo em direção aos córtices de associação (WITTER et al., 1989). Apesar de sua indiscutível importância no processamento das memórias declarativas – incluindo as memórias sociais –, o papel do hipocampo na memória de reconhecimento social ainda é incerto. Alguns estudos propõem que lesões no hipocampo prejudicam a memória de reconhecimento social (KOGAN; FRANKLAND; SILVA, 2000; STEVENSON; CALDWELL, 2014; UEKITA; OKANOYA, 2011), enquanto outros não observaram nenhum tipo de falha na memória após as lesões (BANNERMAN et al., 2001; FEINBERG et al., 2012; SQUIRES et al., 2006).

Estudos demonstram ainda que o córtex pré-frontal (CPF) participa da memória de reconhecimento social. Esta estrutura cerebral é conhecida pelo seu papel gerenciador na memória de trabalho e está interconectada com regiões envolvidas na regulação da emoção e processo de recompensa e punição. O córtex pré-frontal tem sido associado ao comportamento social desde o caso histórico de Phineas Gage, que no século XIX sofreu um acidente de trabalho, no qual uma barra de ferro atravessou o seu crânio. Felizmente Gage sobreviveu, entretanto sua personalidade mudou drasticamente após o acidente; ele passou de astuto, persistente e respeitável, a profano, caprichoso e não confiável (DAMASIO et al., 1994). A associação entre alterações do comportamento social e danos no córtex pré-frontal tem sido estudada desde então, demonstrando que esta estrutura está envolvida com a interpretação não-verbal de informações sociais em humanos e, na tomada de decisões (ADOLPHS, 2009; EUSTON; GRUBER; MCNAUGHTON, 2012), sendo que o CPF é intimamente associado ao hipocampo (EUSTON; GRUBER; MCNAUGHTON, 2012; WANG; COHEN; VOSS, 2014).

### **1.3. Neurotransmissores envolvidos na formação da memória**

Dentre os diversos sistemas de neurotransmissores envolvidos na formação e manutenção das memórias, destacam-se os sistemas noradrenérgico, dopaminérgico e histaminérgico. Estes sistemas são mediados pelas aminas biogênicas que os



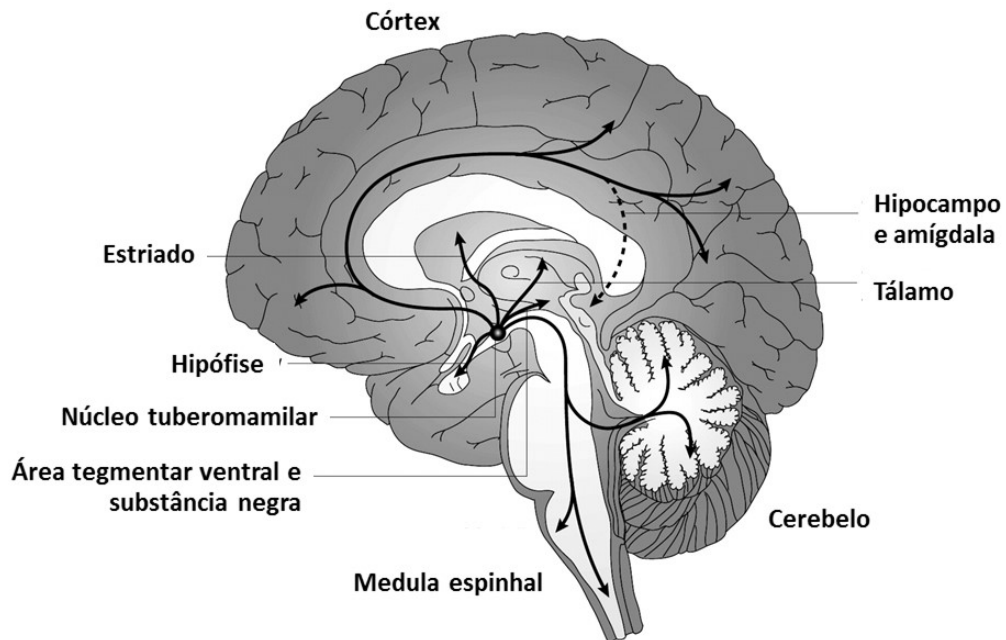
nomeiam, noradrenalina/norepinefrina (NA), dopamina (DA) e histamina, que juntamente com a serotonina (5HT) e acetilcolina, têm papel essencial no sistema nervoso central (SNC) e na modulação da memória (RANG, 2012). As monoaminas estão localizadas em pequenas populações de neurônios com corpos celulares localizados no tronco cerebral e na parte basal do prosencéfalo, projetando-se para áreas corticais e outras regiões. Esses neurônios estão amplamente relacionados a comportamentos de nível elevado, como a emoção, cognição, consciência e memória (IZQUIERDO, 2011; RANG, 2012). Sabe-se, por exemplo, que a memória de trabalho é modulada no córtex pré-frontal por vias dopaminérgicas que agem nos receptores D1 (GOLDMAN-RAKIC, 1996), por outro lado as memórias de curta duração e longa duração, bem como sua evocação, parecem depender de receptores dopaminérgicos D1 e  $\beta$ -adrenérgicos no hipocampo e córtex entorrinal (IZQUIERDO, 2011). Ainda, a histamina, administrada em diversas regiões cerebrais, modula a consolidação da memória em várias tarefas, através dos receptores H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub> e H<sub>3</sub> (DE CARVALHO MYSKIW; FURINI; IZQUIERDO, 2016).

Dada a importância destes neurotransmissores na modulação da memória, via determinados receptores, a seguir será apresentada uma breve revisão da literatura para a melhor compreensão dos mecanismos envolvidos.

### **1.3.1. Histamina**

A imidazol-etilamina é um transmissor do sistema nervoso e uma molécula sinalizadora no intestino, pele e sistema imune, o que gerou seu nome histamina, derivado do grego *histos*, que significa amina presente nos tecidos (HAAS; SERGEEVA; SELBACH, 2008). É conhecida comumente pela sua relação com reações alérgicas e inflamação e chamou a atenção no final do século 20 para o seu possível papel na cognição (ALVAREZ, 2009). A histamina está envolvida em muitas funções neurobiológicas e comportamentais, como o controle do ciclo sono-vigília, consumo de fluídos e alimentos, atividade motora, nocicepção e termoregulação (BLANDINA et al., 2012; HAAS; SERGEEVA; SELBACH, 2008; KÖHLER et al., 2011). Ela é sintetizada nos neurônios do núcleo túberomamilar hipotalâmico, que inervam muitas estruturas importantes como o bulbo olfatório, tálamo, hipocampo e amígdala (Figura 3) (ALVAREZ, 2009).

**Figura 3. Sistema histaminérgico**

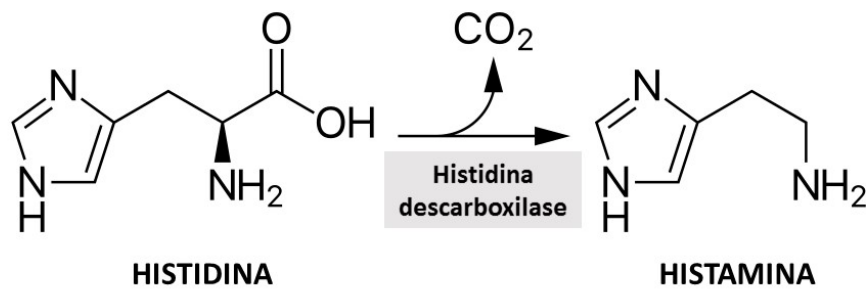


A figura apresenta a inervação do sistema histaminérgico a partir do núcleo tuberomamilar. Fonte: Autor, 2017; adaptado de Haas et al., 2008.

O aminoácido histidina entra na célula através do transportador de L-aminoácido e é então descarboxilado, em uma reação catalisada pela enzima histidina descarboxilase, formando a histamina (Figura 4). O neurotransmissor é então transportado até uma vesícula, pela troca de dois prótons através do transportador vesicular de monoaminas (VMAT), e liberado com a chegada dos potenciais de ação (HAAS; SERGEEVA; SELBACH, 2008). Após sua liberação na fenda sináptica, a inativação da histamina presente no espaço extracelular é realizada por metilação através da enzima neuronal histamina N-metiltransferase (BARNES; HOUGH, 2002; BOWSHER; VERBURG; HENRY, 1983).

Uma vez liberada, a histamina pode exercer suas ações através da ligação à quatro diferentes tipos de receptores acoplados à proteína G (GPCR). Os receptores conhecidos até o momento são H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub> e H<sub>4</sub> (HAAS; PANULA, 2003). Dado que a histamina está envolvida em uma série de processos fisiológicos, seus receptores são alvos terapêuticos importantes.

Figura 4. Síntese da histamina



A histamina é sintetizada a partir da histidina, em uma reação de descarboxilação catalisada pela L-histidina descarboxilase. Fonte: Autor, 2017.

O receptor H<sub>1</sub> é expresso na superfície de uma variedade de tipos celulares, incluindo as células epiteliais, lisas vasculares, endoteliais vasculares, imune, gliais e neuronais. Este receptor é bem conhecido por seu papel nas respostas alérgicas e anafiláticas (BLANDINA; PASSANI, 2016), bem como na vigília, observado através do uso de anti-histamínicos com ação nos receptores H1 e que têm como efeito adverso a sedação (PARSONS; GANELLIN, 2009). Está ligado à proteína G<sub>q/11</sub> e à fosfolipase C que, quando ativadas, levam à formação dos segundos mensageiros diacilglicerol (DAG) e inositoltrifosfato (IP<sub>3</sub>), mediando ações excitatórias sobre a atividade cerebral, incluindo o tronco cerebral, hipotálamo, tálamo, amígdala, hipocampo, bulbo olfatório e córtex (HAAS; SERGEEVA; SELBACH, 2008; HAAS; PANULA, 2003; PASSANI; BLANDINA, 2011).

O receptor H<sub>2</sub> é encontrado em células neuronais, epiteliais, endoteliais, imune e gástricas, e está envolvido na regulação da secreção de ácido gástrico e pressão sanguínea (BLANDINA; PASSANI, 2016). No SNC o receptor H2 é expresso nos gânglios da base, hipocampo, amígdala, células piramidais, núcleo da rafe e substância negra (NADDAFI; MIRSHAFIEY, 2013). Este receptor está acoplado à proteína G<sub>s</sub>, que estimula a adenilil ciclase (AC) e aumenta adenosina monofosfato cíclico (AMPc) intracelular, ativando consequentemente a proteína quinase dependente de AMPc (PKA) e o fator de transcrição CREB, todos reguladores importantes para a fisiologia neuronal e a plasticidade (HAAS; SERGEEVA; SELBACH, 2008). Os agonistas do receptor H<sub>2</sub> potencializam a transmissão sináptica no hipocampo, enquanto animais *knockout* para este receptor apresentam déficits cognitivos, incluindo a memória, e prejuízo na potencialização de longa duração (LTP) hipocampal, mecanismo que, juntamente com a depressão de longa duração (LTD),

potencialmente constitui o processamento mnemônico (DAI et al., 2007; SELBACH; BROWN; HAAS, 1997).

O receptor H<sub>3</sub> está predominantemente expresso no SNC, com alta expressão no córtex cerebral, gânglios da base e hipotálamo (NADDAFI; MIRSHAFIEY, 2013). Está relacionado à vários processos neurofisiológicos, como o ciclo sono-vigília, comportamento alimentar e homeostase. Este receptor está expresso também na periferia, como no sistema cardiovascular e gastrointestinal (BLANDINA; PASSANI, 2016). Ele regula a transdução de sinal predominantemente através da inibição da AC e ativação da via da MAP quinase. Os receptores H<sub>3</sub> estão acoplados à proteína G<sub>i/o</sub> e aos canais de cálcio de alta voltagem, um mecanismo típico para a liberação de transmissores (HAAS; PANULA, 2003). Sendo assim, a ativação deste tipo de receptor nos terminais neuronais histaminérgicos inibe a síntese e liberação da histamina, caracterizando-o como um autorreceptor. O receptor H<sub>3</sub> possui também uma característica muito importante que é seu alto grau de atividade constitutiva *in vivo*, tornando-o espontaneamente ativo. Esta descoberta é relevante para o desenvolvimento de fármacos, uma vez que a habilidade de competir com o estado constitutivo do H<sub>3</sub>, estabelecendo um agonismo inverso, pode ter implicações terapêuticas importantes (PASSANI; BLANDINA, 2011).

O mais recentemente descoberto receptor histaminérgico, o H<sub>4</sub>, possui homologia molecular e farmacológica similar ao do H<sub>3</sub>. É encontrado amplamente nos tecidos e células envolvidas na resposta imune, como baço, linfonodos, medula óssea e leucócitos (BLANDINA; PASSANI, 2016). Algumas subpopulações de neurônios que expressam receptores H<sub>4</sub> se encontram também nos gânglios radiculares dorsais e no corno dorsal da medula espinhal, e em algumas áreas corticais e talâmicas restritas (STRAKHOVA et al., 2009). O receptor H<sub>4</sub> se acopla à proteína G<sub>i/o</sub> e conseqüentemente reduz a sinalização mediada pela PKA.

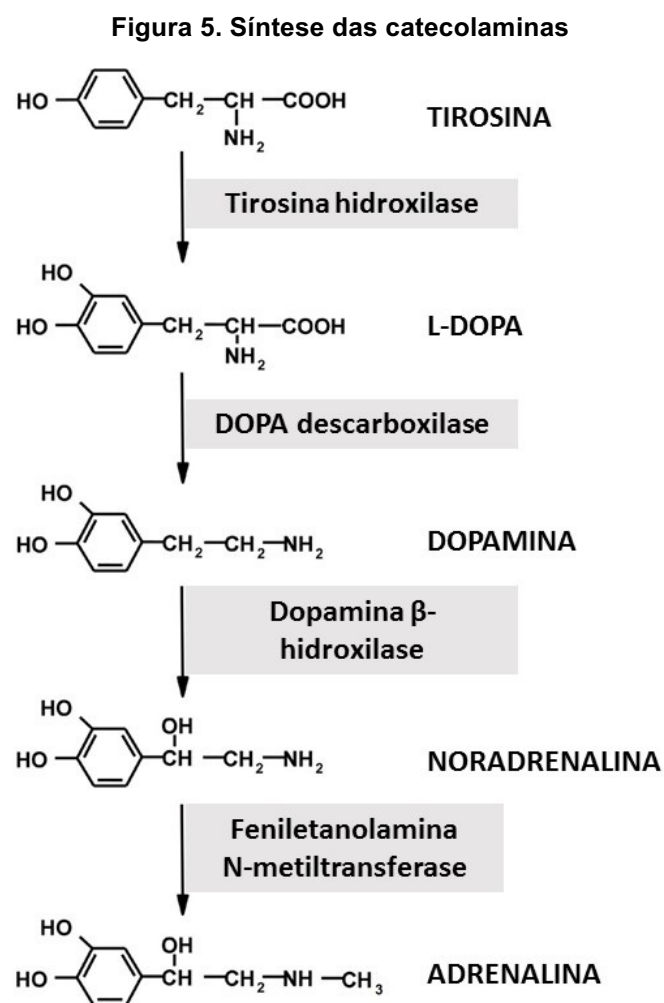
Em geral, os níveis cerebrais de histamina são mais baixos do que das outras monoaminas, porém a sua renovação é consideravelmente mais rápida (na ordem de minutos) (DISMUKES; SNYDER, 1974). Através da técnica de microdiálise foi possível verificar também que os níveis de histamina cerebral apresentam um ritmo circadiano bem marcado (MOCHIZUKI et al., 1992). Além disso, a quantidade de histamina aumenta, enquanto a densidade de seus receptores diminui com o envelhecimento, o que pode contribuir com patologias neurológicas e disfunção na velhice (HIGUCHI et al., 2000; RYU et al., 1995; TERA0 et al., 2004).

O sistema histaminérgico é conhecido por seus efeitos contraditórios sobre a consolidação de diferentes tipos de memórias, como as memórias aversivas, espacial e de reconhecimento de objetos (BENETTI; IZQUIERDO, 2013b; BONINI et al., 2011; DA SILVA et al., 2006; DA SILVEIRA et al., 2013; DERE, 2003; KÖHLER et al., 2011; ONODERA; MIYAZAKI; IMAIZUMI, 1998; ZARRINDAST et al., 2002). O bloqueio da histamina ou a falta do gene que codifica o receptor  $H_1$  prejudicam a performance na tarefa do labirinto radial, enquanto a inativação do mesmo receptor melhora a memória no labirinto aquático de Morris (CHEN; SUGIMOTO; KAMEI, 1999; HASENÖHRL; WETH; HUSTON, 1999; ZLOMUZICA et al., 2009). Por outro lado, a sua ativação facilita o aprendizado, enquanto o bloqueio do receptor  $H_1$  prejudica a consolidação da memória na tarefa de reconhecimento de objetos (DA SILVEIRA et al., 2013; MALMBERG-AIELLO et al., 2003). As áreas cerebrais envolvidas nas memórias espacial e de reconhecimento são diferentes, sendo a primeira predominantemente dependente do hipocampo e a segunda do córtex perirrinal. Desta forma, essa diferença quanto ao papel do receptor  $H_1$  pode depender das densidades distintas do receptor nestas áreas (KÖHLER et al., 2011). As memórias de teor aversivo podem ser prejudicadas ou facilitadas pela administração de histamina (DE ALMEIDA; IZQUIERDO, 1986, 1988; ZARRINDAST et al., 2002) e parecem ter uma modulação negativa pela ativação do receptor  $H_2$  (EIDI et al., 2003; ONODERA; MIYAZAKI; IMAIZUMI, 1998). Contudo, existem poucos estudos abordando o sistema histaminérgico sobre a MRS (DAI et al., 2005; FOX, 2004; JIA et al., 2008; PRAST; ARGYRIOU; PHILIPPU, 1996).

### **1.3.2. Catecolaminas: Dopamina e Noradrenalina**

O aminoácido tirosina é precursor da dopamina, noradrenalina e adrenalina, neurotransmissores que possuem em seus esqueletos químicos a estrutura catecol, o que os torna conhecidos como catecolaminas (KAPCZINSKI; QUEVEDO; IZQUIERDO, 2004). A sua síntese ocorre em neurônios catecolaminérgicos, os quais apresentam a enzima tirosina hidroxilase (TH), enzima limitante para a síntese tanto de DA quanto de NA, uma vez que converte a tirosina em L-diidroxifenilalanina (L-DOPA), que será descarboxilada formando a DA. A DA é transportada para vesículas sinápticas, onde poderá ser convertida em NA pela enzima dopamina  $\beta$ -hidroxilase ( $D\beta H$ ). Por fim a NA pode ser convertida em adrenalina pela enzima fentolamina N-

metiltransferase (FNMT), encontrada principalmente na medula suprarrenal (Figura 5). A adrenalina é a catecolamina menos utilizada como neurotransmissor, desempenhando um papel importante fora do SNC, atuando como hormônio sobre o sistema nervoso autônomo e sendo sintetizada e liberada pela medula adrenal. Considerando que enzimas diferentes são utilizadas em cada etapa da síntese das catecolaminas, o neurônio que utiliza DA como neurotransmissor não expressa a DβH, assim como aquele que utiliza NA não expressa a FNMT (KAPCZINSKI; QUEVEDO; IZQUIERDO, 2004; RANG, 2012).



Síntese das catecolaminas dopamina, noradrenalina e adrenalina a partir do aminoácido tirosina. Fonte: Autor, 2017; adaptado de Rang, 2012.

Parte das catecolaminas liberadas pelos neurônios após sua síntese, são capturadas e empacotadas dentro de vesículas. Estes dois processos de captura das catecolaminas são dependentes de moléculas transportadoras diferentes. O empacotamento dentro de vesículas ocorre através do VMAT, impulsionado pelo

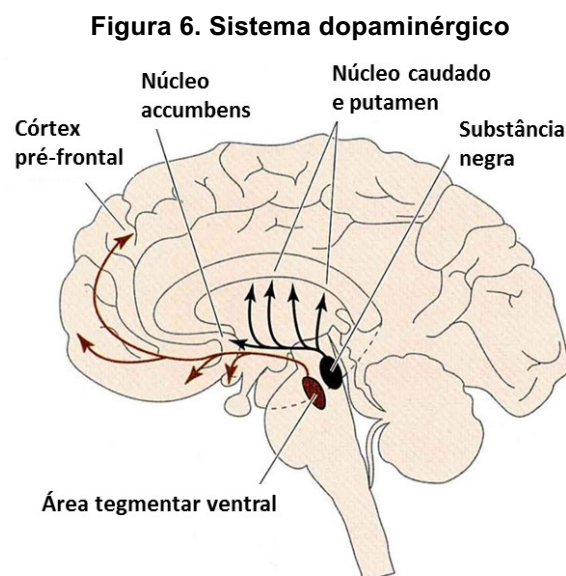
gradiente de prótons entre o citosol e o conteúdo das vesículas. Já a captura neuronal é realizada pelos transportadores de DA e NA, o DAT e o NET, respectivamente, proteínas transportadoras específicas para os diferentes transmissores aminados, presentes na membrana plasmática. Estes transportadores atuam como cotransportadores de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  e utilizam o gradiente eletroquímico para o  $\text{Na}^+$  como força motriz (GOLAN, 2009; RANG, 2012). Os transportadores de monoaminas têm papel crítico no funcionamento normal no cérebro, o que é ressaltado pela ampla gama de medicamentos para depressão, transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH), adição, transtorno obsessivo compulsivo, desordens do sono, etc, que agem sobre estes transportadores (MADRAS; MILLER; FISCHMAN, 2005).

O metabolismo das catecolaminas depende das enzimas monoamino-oxidase (MAO) e catecol-ortometiltransferase: a primeira é uma enzima mitocondrial, expressa na maioria dos neurônios, enquanto a segunda é uma enzima citosólica expressa primariamente no fígado (GOLAN, 2009; RANG, 2012). A redução na atividade da MAO resulta em aumento na concentração de DA, NA e serotonina, nos locais de armazenamento no sistema nervoso central e no sistema nervoso simpático. Devido a esta ação, muitos fármacos inibidores da MAO são utilizados no tratamento da depressão, uma vez que o aumento na disponibilidade de um ou mais neurotransmissores vem sendo relacionada à ação antidepressiva (MORENO; MORENO; SOARES, 1999).

A dopamina foi reconhecida como um neurotransmissor, e não apenas como um precursor da noradrenalina, nos anos 50 (CARLSSON et al., 1958). O interesse sobre o seu papel foi intensificado uma vez percebida a sua importância na patogênese e tratamento de doenças neurodegenerativas, primeiramente na doença de Parkinson e após na esclerose múltipla e doença de Huntington, bem como de desordens psiquiátricas, como o TDAH, síndrome de Tourette, esquizofrenia e depressão. A DA é um dos mais importantes neurotransmissores, participando de diversas funções como a coordenação motora, emoções, memória, mecanismos de recompensa, regulação neuroendócrina, entre outras (RANGEL-BARAJAS; CORONEL; FLORÁN, 2015).

As principais fontes de DA no SNC são as vias nigroestriatal, mesocorticolímbica e tuberoinfundibular, cada uma envolvida em diferentes aspectos neurofisiológicos. A via nigroestriatal está relacionada à função motora, uma vez que a substância negra envia projeções para o estriado dorsal e regula através da DA e

seus receptores a atividade correta dos gânglios da base, o que resulta em movimentos coordenados. Na via mesocorticolímbica, a área tegmentar ventral (VTA) lança projeções para o estriado ventral ou núcleo accumbens, amígdala, bulbo olfatório, hipocampo, giro cingulado e córtex pré-frontal orbital e medial, relacionando-se às funções cognitivas, motivação e emoção. Por fim, na via tuberoinfundibular o hipotálamo lança projeções para a hipófise anterior, liberando DA e controlando funções neuroendócrinas, como a secreção de prolactina (Figura 6) (BEN-JONATHAN, 1985; JACKSON; WESTLIND-DANIELSSON, 1994).



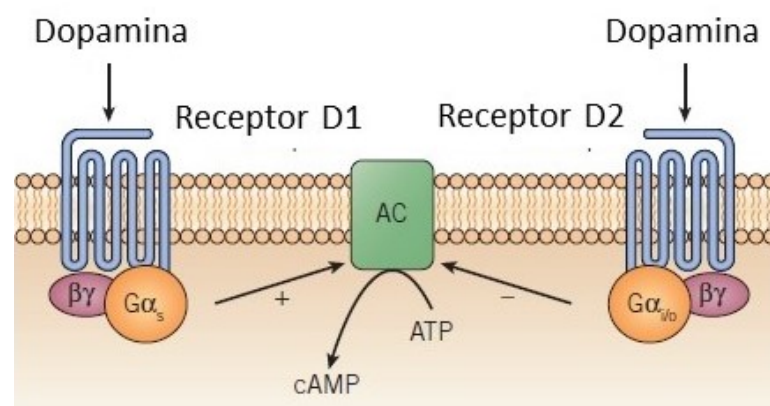
A figura apresenta a inervação do sistema dopaminérgico pelas vias nigroestriatal e mesocorticolímbica. Fonte: Autor, 2017; adaptado de Boron e Boulpaep, 2017.

Os efeitos fisiológicos da DA são mediados por um conjunto de proteínas receptoras acopladas à proteína G, amplamente difundidos no SNC. Os receptores dopaminérgicos são alvo de diversas drogas, como psicoestimulantes e antipsicóticos (RANGEL-BARAJAS; CORONEL; FLORÁN, 2015). Cools e van Rossum através de estudos anatômicos, eletrofisiológicos e farmacológicos, sugeriram que poderia existir mais do que um tipo de receptor para a dopamina no cérebro, sugestão esta que foi confirmada posteriormente por Keabian e Calne, em 1979 (COOLS; VAN ROSSUM, 1976; KEBABIAN; CALNE, 1979). Até o momento foram identificados cinco subtipos diferentes de receptores de DA ( $D_1$ ,  $D_2$ ,  $D_3$ ,  $D_4$  e  $D_5$ ) que podem ser separados em duas famílias, com base em suas propriedades farmacológicas, estruturais e ações biológicas: a família D1 inclui os receptores  $D_1$  e  $D_5$ , os quais estão associados à



proteína  $G_s$ , apresentam uma terminação carboxila intracelular longa e estimulam a enzima AC, levando à formação dos segundos mensageiros AMPc e  $IP_3$  com consequente ativação da PKA; em contraste, as proteínas receptoras da família D2, composta pelos receptores  $D_2$ ,  $D_3$  e  $D_4$ , estão acopladas à proteína  $G_i$  que inibe a AC e, conseqüentemente, o resultado de sua ativação diminui o acúmulo de AMPc, modulando a atividade da PKA e seus efetores (Figura 7) (DALLEY; EVERITT, 2009; RANG, 2012; RANGEL-BARAJAS; CORONEL; FLORÁN, 2015).

**Figura 7. Regulação da adenilil ciclase pelos receptores dopaminérgicos das famílias D1 e D2**



A figura mostra os efeitos da dopamina ao estimular ou inibir a adenil ciclase (AC) através da ativação de um receptor da família D1 acoplado à proteína  $G_s$  ou de um receptor da família D2 acoplado à proteína  $G_i$ . Fonte: Autor, 2017, adaptado de Rang, 2012.

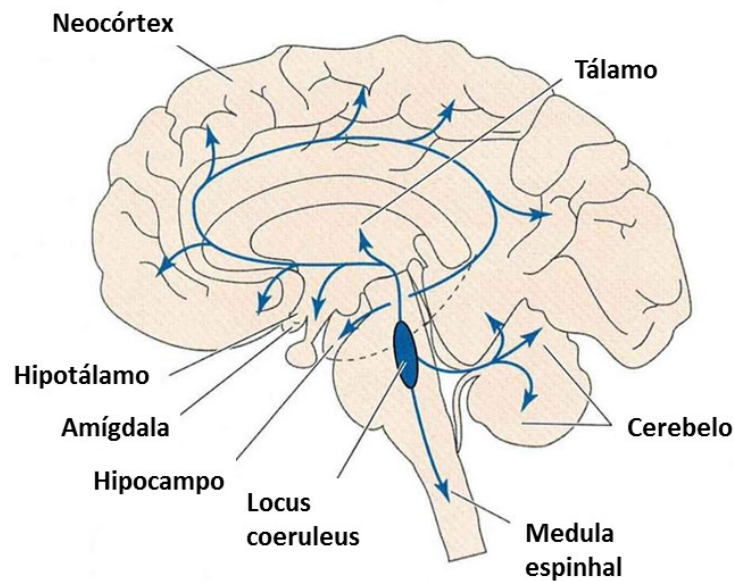
Os receptores  $D_1$  são encontrados, em altos níveis, em regiões inervadas por neurônios dopaminérgicos, como o núcleo caudado e putâmen, substância negra, núcleo accumbens, hipotálamo, tálamo, córtex frontal, enquanto os receptores  $D_5$  têm localização mais restrita, sendo encontrados principalmente no hipocampo, tálamo, estriado e córtex cerebral. Os receptores  $D_1$  e  $D_5$  parecem mediar ações importantes da dopamina, como controle do movimento, sistema de recompensa e funções cognitivas, como aprendizado e memória. Dentre os receptores da família D2, o subtipo  $D_2$  é o mais abundante no cérebro, localizado em regiões ricas em dopamina, como o estriado, núcleo accumbens, bulbo olfatório, enquanto os subtipos  $D_3$  e  $D_4$  são mais escassos, encontrando-se predominantemente nas áreas límbicas. O receptor  $D_2$  é importante por mediar os efeitos da DA sobre o controle do movimento, alguns aspectos comportamentais e a secreção de prolactina pela hipófise. As funções dos receptores  $D_3$  e  $D_4$  ainda são pouco conhecidas, apesar de que suas localizações nas áreas límbicas do cérebro sugerem um envolvimento na cognição, emoções e

comportamento (JACKSON; WESTLIND-DANIELSSON, 1994; RANGEL-BARAJAS; CORONEL; FLORÁN, 2015; VALLONE; PICETTI; BORRELLI, 2000).

A noradrenalina foi descoberta por Ulf Von Euler, em 1946, quando foi identificada como sendo o principal neurotransmissor nas sinapses adrenérgicas, ao invés da adrenalina, como se pensava na época (EULER, 1946). A partir disso, sua distribuição, armazenamento, liberação, recaptação, excreção e quantificação em condições fisiológicas e patológicas foram estudados em seu laboratório, o que, posteriormente, lhe rendeu o Nobel em Medicina (AMINOFF; DAROFF, 2014). Sabe-se que a transmissão noradrenérgica tem papel essencial no sistema de alerta, na regulação da pressão sanguínea e no controle do humor (RANG, 2012). Os neurônios noradrenérgicos centrais apresentam uma difusa arborização axonal. Os corpos celulares se agregam em pequenos núcleos na ponte e no bulbo, sendo o locus coeruleus (LC), localizado na ponte, o mais proeminente, contendo aproximadamente 50% dos neurônios noradrenérgicos (RANG, 2012; SZABADI, 2013). Os neurônios que se originam nesse núcleo inervam amplamente o córtex cerebral, áreas límbicas, hipotálamo, cerebelo, chegando até a medula espinhal (Figura 8), de onde as fibras simpáticas transportam os impulsos nervosos aos órgãos efetores (SZABADI, 2013; VAN STEGEREN, 2008). Diversos estudos sobre o local de ação da NA sobre a memória são direcionados para a amígdala. Contudo, como a circuitaria noradrenérgica é ampla, outras áreas cerebrais também determinam os efeitos da NA sobre a performance mnemônica. Dentre estas, o hipocampo e o CPF, que estão conectados com projeções noradrenérgicas ascendentes provenientes do locus coeruleus e reciprocamente conectados com a amígdala, parecem ter papel fundamental na formação de memórias emocionais dependentes da função noradrenérgica (VAN STEGEREN, 2008).

Os neurônios noradrenérgicos podem conter e liberar outros neurotransmissores além da NA, caracterizando a cotransmissão (CAMPBELL, 1987). Os cotransmissores nos neurônios noradrenérgicos periféricos incluem a adenosina trifosfato (ATP) e o neuropeptídeo Y (NPY), enquanto nos neurônios noradrenérgicos centrais encontram-se o ATP, NPY, glutamato, encefalinas e galanina. A cotransmissão parece modular a ação da NA, tanto na pré-sinapse (liberação), quanto nos sítios pós-sinápticos (neurotransmissão) (SZABADI, 2013).

**Figura 8. Sistema noradrenérgico**



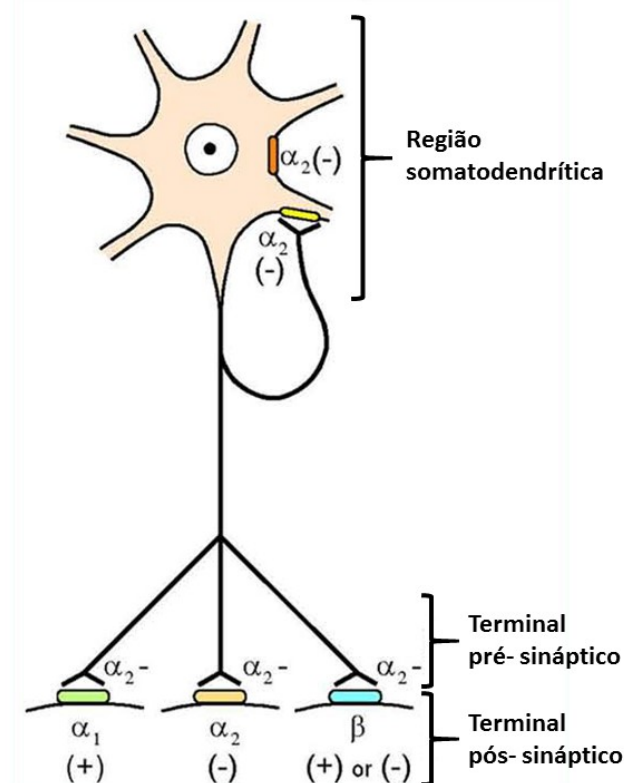
A figura apresenta a inervação do sistema noradrenérgico a partir do seu principal núcleo, o locus coeruleus. Fonte: Autor, 2017; adaptado de Boron e Boulpaep, 2017.

Os receptores adrenérgicos (ou adreno-receptores) são seletivos para a NA e adrenalina, contudo a DA, em condições suprafisiológicas, também pode ativar alguns receptores adrenérgicos. Os adreno-receptores, assim como os receptores dopaminérgicos, são membros da superfamília dos GPCR. Dividem-se em duas classes principais, denominadas  $\alpha$  e  $\beta$  (GOLAN, 2009; RANG, 2012). Essa divisão surgiu quando Ahlquist propôs, em 1948, que a ação da epinefrina era mediada por dois tipos de receptores, uma vez que este transmissor causava vasoconstrição em alguns tecidos e vasodilatação em outros (AHLQUIST, 1948).

Os receptores  $\alpha$ -adrenérgicos se dividem em  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ . Os receptores  $\alpha_1$  se subdividem em  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$  e  $\alpha_{1C}$ , têm localização pós-sináptica e geralmente estão acoplados à proteína  $G_q$ , desta forma, seus efeitos são mediados através da via de sinalização fosfolipase C, o que resulta na ativação da proteína quinase C (PKC) e na liberação intracelular de  $Ca^{+}$ . A NA parece ter maior afinidade pelos receptores  $\alpha_2$ , localizados nas densidades pré-sinápticas. Os receptores  $\alpha_2$  se dividem em  $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$  e  $\alpha_{2C}$  e geralmente estão associados à proteína  $G_i$ , conseqüentemente, sua ativação gera redução de AMPc, através da inibição da AC (RAMOS; ARNSTEN, 2007; SCHMIDT; WEINSHENKER, 2014). Os receptores  $\alpha_{2A}$  e  $\alpha_{2C}$  são encontrados também no corpo celular e no terminal pré-sináptico, atuando como auto-receptores, afim de mediar a inibição da transmissão sináptica por retroalimentação, desta forma agem

como moduladores da função noradrenérgica central (Figura 9) (MACDONALD; KOBILKA; SCHEININ, 1997). A NA têm menor afinidade pelos receptores  $\beta$ , que possuem 3 subtipos:  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  e  $\beta_3$ , sendo que o último ainda é pouco conhecido. Todas as subclasses de  $\beta$ -adrenoceptores são pós-sinápticos (GOLAN, 2009; RAMOS; ARNSTEN, 2007). Apesar de serem tradicionalmente conhecidos por estarem ligados à AC através da proteína estimuladora  $G_s$ , aumentando a sinalização por AMPc, estudos recentes sugerem que os receptores  $\beta$  são capazes de interagir também com proteína  $G_i$ ,  $\beta$ -arrestinas e GPCR-quinases (GRKs), diversificando suas sinalização intracelular (HALL, 2004; RAMOS; ARNSTEN, 2007; SCHMIDT; WEINSHENKER, 2014).

**Figura 9. Sítios farmacologicamente sensíveis do neurônio noradrenérgico**



A noradrenalina liberada pelos terminais axônicos do neurônio podem ativar adrenoceptores nas células-alvo. A ilustração mostra os diversos receptores adrenérgicos pós-sinápticos: receptores  $\alpha_1$  (excitatórios),  $\alpha_2$  (inibitórios) e  $\beta$  (excitatórios ou inibitórios). Existem ainda adrenoceptores no corpo celular, dendritos e no terminal pré-sináptico, os auto-receptores, da família dos receptores  $\alpha_2$ , que são estimulados pela liberação de noradrenalina e inibem a sua liberação. Fonte: Autor, 2017; Adaptado de Szabadi, 2013.

Estudos em animais e humanos demonstraram a presença de todos os tipos de adrenoceptores no SNC: os receptores  $\alpha_1$  foram encontrados no bulbo olfatório, tálamo, hipotálamo, tronco cerebral, córtex cerebral, amígdala, cerebelo, hipófise,

hipocampo e medula espinhal (DAY et al., 1997); os receptores  $\alpha_2$  se encontram amplamente distribuídos no LC, tronco cerebral, córtex, hipotálamo, hipocampo, amígdala, tálamo e gânglios da base (SCHEININ et al., 1994); os receptores  $\beta$  localizam-se no córtex cingulado, córtex cerebral, hipocampo, tálamo, cerebelo, substância negra, tubérculo olfatório, núcleo accumbens, estriado e medula (ATLAS; MELAMED, 1978; JOYCE et al., 1992; RAINBOW; PARSONS; WOLFE, 1984; SUMMERS et al., 1995).

Alterações como ansiedade, irritabilidade e instabilidade emocional parecem ser consequência do excesso de atividade do sistema noradrenérgico central, como foi observado por Holmberg e Gershorn, ao avaliar pacientes submetidos à injeção de ioimbina, um antagonista de receptor  $\alpha_2$  (HOLMBERG; GERSHON, 1961). A disfunção noradrenérgica causa anormalidades nos níveis de alerta e está relacionada com múltiplas desordens psiquiátricas, dentre elas transtornos de ansiedade, como transtorno de estresse pós-traumático, síndrome do pânico e transtorno de ansiedade generalizada; transtornos do humor, como depressão e mania; e esquizofrenia (YAMAMOTO; SHINBA; YOSHII, 2014).

Considerando-se o envolvimento da NA e da DA em distúrbios neurológicos e psiquiátricos, a modulação farmacológica das catecolaminas centrais por diferentes vias (liberação, armazenamento, recaptção) tem sido de grande importância terapêutica. Por exemplo, todas as medicações aprovadas até o momento para o tratamento do TDAH influenciam a transmissão da NA, sendo que a droga mais utilizada, o metilfenidato, bloqueia o transporte de NA e de DA (ARNSTEN, 2011). A levodopa, precursor imediato da dopamina que atravessa a barreira hematoencefálica, é utilizada há mais de 30 anos como o tratamento mais efetivo para a doença de Parkinson (HUOT et al., 2013). Fármacos utilizados no manejo da psicose presente na esquizofrenia, incluem a clorpromazina e o haloperidol, dois antipsicóticos típicos que agem como antagonistas dos receptores  $D_2$ ; dentre os antipsicóticos atípicos, que possuem antagonismo  $D_2$  menos proeminente, encontram-se a clonazina, olanzapina, quetiapina, ziprasidona e risperidona (DI GIOVANNI et al., 2016). As bases biológicas da depressão começaram a ser desvendadas nas décadas de 1940 e 1950, quando foi observado que agentes que atuavam sobre a 5HT, DA e NA possuíam efeitos sobre o humor (DI GIOVANNI et al., 2016; GOLAN, 2009). Tendo em vista que a desregulação da atividade destes neurotransmissores contribui fortemente para o estabelecimento e manutenção da depressão, estabeleceu-se o seu

tratamento baseado em fármacos que modulam o equilíbrio principalmente da 5HT e NA (RESSLER; NEMEROFF, 2000). Dentre estes, os antidepressivos tricíclicos (desipramina, nortriptilina, etc), assim como os inibidores da recaptação de serotonina-noradrenalina (venlafaxina e duloxetina), inibem a recaptação de 5HT e NA na fenda sináptica, através do bloqueio de seus transportadores, afetando também a recaptação de DA (DELL'OSSO et al., 2011).

Posto que tanto o sistema noradrenérgico quanto o dopaminérgico estão envolvidos em uma gama de distúrbios neurológicos e psiquiátricos; que possuem ampla inervação no SNC, agindo sobre estruturas sabidamente envolvidas no processamento e armazenamento da memória, diversos estudos com animais confirmaram a participação destes sistemas nos processos mnemônicos. A adrenalina e seus agonistas administrados após o treino em tarefas de estresse melhoram a performance da memória (CAHILL; MCGAUGH, 1998; IZQUIERDO et al., 1992; LIANG; MCGAUGH, 1983; LIANG; MCGAUGH; YAO, 1990). Por sua vez, a administração simultânea de propranolol, um antagonista  $\beta$ -adrenérgico, bloqueia o efeito positivo da NA intra-amígdala sobre a retenção da memória (LIANG; JULER; MCGAUGH, 1986). Ademais, o uso de isoproterenol, um agonista seletivo dos  $\beta$ -adrenoceptores, facilitou a LTP na região CA1 do hipocampo (THOMAS et al., 1996). Estes resultados sugerem que o efeito benéfico da NA sobre a memória é mediado por receptores  $\beta$ -adrenérgicos. O papel da DA na plasticidade sináptica e no aprendizado há muito foi inferido pelo seu envolvimento na LTP e na LTD, de forma dependente da ativação dos receptores  $D_1/D_5$  (CENTONZE et al., 1999; JAY, 2003; KERR; WICKENS, 2001). Verificou-se também que a DA está implicada nos mecanismos de aprendizados associativos, uma vez que o bloqueio de receptores  $D_1$  no núcleo accumbens prejudica a consolidação de memórias Pavlonianas (DALLEY et al., 2005). Estes mesmos receptores estão envolvidos também na consolidação das memórias de reconhecimento de objetos, aversiva e espacial (FURINI et al., 2014, p. 1; SILVA et al., 2012).

#### **1.4. Transtorno de déficit de atenção e hiperatividade e o seu tratamento: o metilfenidato**

O Transtorno do Déficit de Atenção e Hiperatividade é um transtorno neuropsiquiátrico, na qual o indivíduo apresenta dificuldades em manter a atenção em

atividades muito longas e/ou repetitivas, sendo facilmente distraído por estímulos do ambiente externo e por pensamentos. Ainda, outras características apresentadas pelo indivíduo com TDAH são a hiperatividade, a impulsividade e a dificuldade de manter relacionamentos sociais (DICKSTEIN et al., 2006; GALVAN et al., 2006; SEMRUD-CLIKEMAN et al., 2010; TRIPP; WICKENS, 2009). Esses sintomas geralmente aparecem antes dos 7 anos de idade e cursam de forma intensa e persistente ao longo da vida, causando prejuízos funcionais significativos (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION; AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2000; BARKLEY, 2006; GARRETT et al., 2008; KRAIN; CASTELLANOS, 2006). No Brasil, estima-se que a prevalência de TDAH é de 5,8% a 19,9% entre crianças e adolescentes (ANSELMINI et al., 2010; PASTURA; MATTOS; ARAÚJO, 2007; POLANCZYK et al., 2010; ROHDE et al., 1999).

Apesar dos critérios para o diagnóstico do TDAH já estarem estabelecidos, ainda não estão claros quais são os fatores que levam à doença. Alguns pesquisadores consideram os fatores genéticos como sendo os principais causadores do TDAH (AKUTAGAVA-MARTINS et al., 2013; FARAONE et al., 2005; THAPAR; O'DONOVAN; OWEN, 2005), enquanto outros acreditam que os fatores ambientais, tais como o uso de tabaco, álcool e cocaína durante a gravidez, sofrimento fetal ou nascimento prematuro também podem contribuir (THOMSEN; PLESSEN; HOUMANN, 2014; TRIDAS, 2007). Talvez a doença não tenha um fator único causal, mas seja o reflexo da interação entre genes e ambiente (THAPAR; O'DONOVAN; OWEN, 2005).

Indivíduos com TDAH apresentam prejuízos cognitivos, baixa concentração, baixo desempenho escolar, inquietude e comportamento social inapropriado (CUNILL; CASTELLS, 2014), podendo exibir dificuldades em relacionamentos sociais, processamento emocional e reconhecimento de emoções faciais, bem como, prejuízo nas funções executivas (BARKLEY, 1997; GAU; SHANG, 2010; HUANG-POLLOCK et al., 2007; KOFLEER et al., 2011; RINSKY; HINSHAW, 2011; WILLCUTT et al., 2008) levando a graves implicações sociais, acadêmicas e ocupacionais (REINHARDT; REINHARDT, 2013).

Dentre as estruturas cerebrais envolvidas na modulação das funções que se encontram prejudicadas no TDAH, destaca-se a participação do córtex pré-frontal e do hipocampo. O CPF utiliza a memória de trabalho para guiar o comportamento e a atenção, bem como, para inibir comportamentos, pensamentos e sentimentos

inapropriados (ARNSTEN, 2006), sendo a estrutura cerebral responsável pelas funções executivas (NIEDERMEYER; NAIDU, 1997; SIEVER, 2008; UMHAU et al., 2012). Estudos de neuro-imagem evidenciaram anormalidades morfológicas no CPF e no hipocampo em indivíduos com TDAH (ALMEIDA et al., 2010; BATTY et al., 2010; MAKRIS et al., 2007, 2012; PERLOV et al., 2008; PLESSEN et al., 2006; SHAW et al., 2007; SOWELL et al., 2003). Além disso, existem também anormalidades estruturais e funcionais em diversas redes neurais, incluindo os circuitos frontoestriatais, frontoparietal temporal, frontocerebelar e frontolímbicas (RUBIA; ALEGRIA; BRINSON, 2014).

Fatores neuroquímicos também apresentam-se alterados no TDAH, sendo o mais marcante deles o sistema catecolaminérgico, em que os neurotransmissores dopaminérgicos e noradrenérgicos encontram-se alterados (LEVY, 2009). Visando restabelecer os níveis de liberação destes neurotransmissores, as drogas empregadas para o TDAH incluem inibidores da recaptção de dopamina e noradrenalina, agonistas  $\alpha$ 2-adrenérgicos, e também inibidores da monoaminoxidase, dentre outros (MTA COOPERATIVE GROUP, 2004).

Dentre as diferentes drogas existentes, o tratamento farmacológico mais utilizado em crianças e adultos com TDAH é o metilfenidato (MPH) (BALCIOGLU et al., 2009), um estimulante leve do sistema nervoso central, derivado da piperidina, que estruturalmente e farmacologicamente se assemelha a anfetamina. O MPH é um psicoestimulante utilizado desde os anos 50, quando foi descrito como menos potente que a anfetamina, porém mais potente que a cafeína (WOOD et al., 2013). A potência do MPH é mais baixa comparada a da anfetamina, pois além de inverter a direção do transportador de DA, a anfetamina ainda libera a reserva de DA vesicular, diferentemente do MPH (EASTON et al., 2007).

Sua nomenclatura segundo a IUPAC é cloridrato de metil  $\alpha$ -fenil-2-acetato de piperidina, apresentando a fórmula molecular  $C_{14}H_{19}NO_2$ , com peso molecular de 233,31 g/mol (WENTHUR, 2016). Inicialmente o MPH era comercializado como uma mistura dos racematos eritro e treo na proporção de 80:20. Entretanto, estudos subsequentes mostraram que o racemato treo era o responsável pela ação da mistura racêmica no SNC, enquanto ambos racematos eram equipotentes na produção de efeitos hipertensivos indesejados e toxicidade (PATRICK et al., 1987; SZPORNY; GOROG, 1961). Na tentativa de melhorar o efeito terapêutico e diminuir a toxicidade, o racemato eritro foi removido da mistura e o MPH passou a ser comercializado como



uma mistura 50:50 dos racematos enantiômeros D-treo- e L-treo-MPH(D,L-MPH) e vendida pelo nome comercial Ritalina® e Concerta® (KIMKO; CROSS; ABERNETHY, 1999). Está disponível em versões de liberação imediata, prolongada e controlada. A concentração máxima ( $C_{max}$ ) é atingida após aproximadamente 2 horas para as formulações de liberação imediata; sua meia-vida plasmática também é de 2 horas (WENTHUR, 2016).

Farmacologicamente, o MPH atua bloqueando DAT e NET, agindo como um agonista indireto das catecolaminas, aumentando os níveis extracelulares de DA e NA do cérebro através da inibição de sua recaptação (MINNEMAN et al., 2006; TAUKULIS et al., 2014; VANDERSCHUREN et al., 2008). Rowley e colaboradores, demonstraram em roedores, que o aumento dos níveis desses neurotransmissores já pode ser observado 15 minutos após a administração intraperitoneal de MPH (ROWLEY et al., 2014). Vale ressaltar que a NA e a DA estão intimamente relacionadas à memória emocional, principalmente através dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos e D1/D5 dopaminérgicos (BARROS et al., 2001; BERLAU; MCGAUGH, 2006; FIORENZA et al., 2012; FURINI et al., 2014), entretanto, a participação desses receptores na formação da memória de reconhecimento social ainda não foi estudada.

O mecanismo exato pelo qual o MPH exerce o seu efeito terapêutico ainda é desconhecido, entretanto, acredita-se que seu efeito positivo sobre a cognição é devido ao aumento na liberação das catecolaminas em estruturas cerebrais envolvidas nos processos de aprendizagem e memória, tais como o córtex pré-frontal, hipocampo e amígdala. No CPF o MPH é capaz de induzir o aumento da liberação de DA e NA, e uma melhora da memória de trabalho e da atenção em roedores (BERRIDGE et al., 2006; MEHTA et al., 2000). Ainda, estudos de imagem funcional em humanos indicam que o MPH altera a atividade neuronal do CPF em indivíduos com ou sem TDAH (MEHTA et al., 2000; VAIDYA et al., 1998).

Ao longo do tempo, o MPH se tornou o pilar do tratamento do TDAH, uma vez que reduz a impulsividade e melhora a função cognitiva, incluindo a memória (CARMACK et al., 2014a). Além disso, melhora a atenção, a concentração e a capacidade de ficar acordado (BEYER; STAUNTON; MOODLEY, 2014). Tendo em vista seus efeitos sobre a cognição, o uso do MPH para fins recreativos aumentou significativamente nos últimos anos, principalmente entre os adolescentes (YUAN; MCCANN; RICAURTE, 1997). O MPH tem sido utilizado indiscriminadamente por estudantes com a finalidade de melhorar a atenção durante o estudo e, obter melhor

desempenho escolar, ato que ficou conhecido como *doping* acadêmico ou “uso cosmético” de drogas controladas. Contudo, os efeitos do uso do MPH por indivíduos saudáveis não são assegurados, enquanto que os seus benefícios cognitivos em pacientes de TDAH já foram testados e comprovados clinicamente (BEYER; STAUNTON; MOODLEY, 2014; MASLEN; FAULMULLER; SAVULESCU, 2014).

Existem diferentes formas farmacêuticas: tabletes, comprimidos, cápsula, solução, comprimido mastigável e adesivo transdérmico, sendo que no Brasil as apresentações farmacêuticas encontradas são apenas o comprimido simples de 10mg, o comprimido revestido de liberação controlada de 18mg, 36mg e 54mg e a cápsula gelatinosa dura com microgrânulos de liberação modificada de 20mg, 30mg e 40mg (MOTA; OLIVEIRA, 2012; WENTHUR, 2016). Independentemente da formulação escolhida, a maioria dos fármacos comercializados contendo MPH possui uma ampla variação de dosagens aceitáveis e a individualização é necessária. Ademais, estudos recentes têm indicado que o peso do paciente pode ser utilizado como base para a dosagem, com 1 mg/kg como a dose média eficaz nas populações pediátrica, adolescente e adulta (WENTHUR, 2016).

Apesar da falta de consenso científico sobre o mecanismo pelo qual o MPH age no cérebro e induz as modificações comportamentais observadas, ele ainda é considerado o tratamento mais efetivo para os sintomas do TDAH (THE MTA COOPERATIVE GROUP, 1999). Estudos realizados em humanos mostram que o uso do MPH é capaz de reduzir a impulsividade (ARON et al., 2003; TANNOCK et al., 1989), melhorar a atenção (HAWK et al., 2003; OVERTOOM et al., 2003; SOLANTO; WENDER; BARTELL, 1997) e a função cognitiva (CARMACK et al., 2014a; MEHTA; GOODYER; SAHAKIAN, 2004) em pacientes com e sem o TDAH (MEHTA et al., 2000; PIETRAS et al., 2003; VOLKOW et al., 2004).

### **1.5. Metilfenidato e reconhecimento social em roedores**

Inúmeros estudos foram realizados nos últimos anos com o objetivo de investigar os efeitos do MPH sobre o processamento mnemônico. Infelizmente, devido à discrepância entre os resultados, ainda não está claro quais são as consequências do seu uso sobre os diferentes tipos de memória (CARMACK et al., 2014b; GUO et al., 2012; LEBLANC-DUCHIN; TAUKULIS, 2009; SCHERER et al., 2010). Os efeitos do uso do MPH verificados nos estudos variam quanto à dose, o tempo de duração

do tratamento, a idade do animal, a via de administração, o ciclo circadiano e a presença de restrição alimentar. Com relação às variações dos resultados quanto à dose, estudos verificaram que baixas doses de MPH estão associadas a uma melhora da memória, enquanto altas doses levam a um prejuízo (CARMACK et al., 2014b). Quanto ao tempo de duração do tratamento, a administração aguda acarreta uma melhora na atenção, aprendizado e memória ao passo que, a administração crônica pode levar a mudanças fisiológicas e comportamentais negativas (BRITTON, 2012; CARMACK et al., 2014b; LEBLANC-DUCHIN; TAUKULIS, 2009; TAUKULIS et al., 2014). Ainda, pesquisas a respeito do efeito do metilfenidato sobre a memória em diferentes tarefas comportamentais também apresentam discordâncias, uma vez que o seu uso crônico pode levar tanto ao prejuízo, quanto à melhora da memória espacial (CARMACK et al., 2014b; GUO et al., 2012; SCHERER et al., 2010) e de reconhecimento de objetos (LEBLANC-DUCHIN; TAUKULIS, 2009; TAUKULIS et al., 2014).

Além disso, em todas as publicações supracitadas que realizaram tratamentos crônicos de MPH, os animais foram testados na ausência da droga, logo o resultado obtido pode ser em decorrência desta ausência, o que configuraria uma dependência de estado. A dependência de estado se refere a substâncias exógenas ou endógenas, que são capazes de modular a memória em dois momentos: durante a consolidação e durante a evocação. Neste processo, a recordação de determinadas memórias somente é possível se o sujeito estiver em um contexto sensorial e estado fisiológico muito semelhante ao que ocorreu durante a fase de aquisição/consolidação (IZQUIERDO, 2011; MUELLER; CAHILL, 2010), ou seja, quando o conjunto das alterações endógenas (estado neuro-humoral e hormonal) provocadas no momento em que estas foram adquiridas se repete.

## **1.6. Justificativa**

A psicopatologia do TDAH não se manifesta apenas no comportamento relativo às tarefas escolares, mas também nas interações sociais, levando ao padrão de relacionamentos instáveis, desemprego e comportamento criminoso. O metilfenidato é o principal fármaco para tratamento desta patologia, atuando sobre os níveis de dopamina e noradrenalina. Entretanto, seu uso não se restringe apenas ao tratamento de patologias, uma vez que se popularizou devido a sua ação sobre a concentração,

o aprendizado e a memória. Inúmeros estudantes têm feito uso desse medicamento como *doping* acadêmico, porém os efeitos decorrentes de seu uso indiscriminado ainda não foram estabelecidos, sobretudo quanto às alterações neuroquímicas e comportamentais, em indivíduos sem diagnóstico de TDAH.

Dito isto, verificar o efeito do metilfenidato, sobre a formação da memória de reconhecimento social, bem como investigar quais os seus mecanismos e estruturas cerebrais envolvidos, em decorrência das administrações aguda e crônica sobre esta memória, são passos fundamentais para a compreensão da neurobiologia da memória social e para o uso consciente deste fármaco.

*CAPÍTULO II:*

*MODULAÇÃO DA CONSOLIDAÇÃO  
DA MEMÓRIA DE RECONHECIMENTO  
SOCIAL NO HIPOCAMPO DORSAL E  
AMÍGDALA BASOLATERAL*

## 2. Introdução

A memória de reconhecimento social é crucial para a reprodução, formação de grupos sociais e sobrevivência das espécies. Apesar de sua importância, a MRS ainda é pouco estudada. Sabe-se que em roedores o bulbo olfatório é indispensável na formação da MRS (INSEL; FERNALD, 2004b), contudo o papel do núcleo basolateral da amígdala e do hipocampo ainda são incertos. Ferguson observou que a amígdala medial era importante para o reconhecimento social (FERGUSON et al., 2001). Em seu estudo o autor verificou que camundongos knockout para o gene que codifica a ocitocina não foram capazes de reconhecer animais coespecíficos familiares após exposições repetidas, apesar de sua habilidade olfativa estar intacta. Contudo quando estes animais receberam ocitocina diretamente na amígdala medial, a MRS foi completamente restaurada (FERGUSON et al., 2001). Outros estudos também suportam a hipótese da participação da amígdala medial na MRS (GUR; TENDLER; WAGNER, 2014; WANG et al., 2014). Apesar do já conhecido envolvimento do hipocampo na consolidação de várias memórias, os estudos são contraditórios a respeito de sua participação na MRS: alguns estudos propõem que lesões no hipocampo prejudicam a memória (KOGAN; FRANKLAND; SILVA, 2000; STEVENSON; CALDWELL, 2014; UEKITA; OKANOYA, 2011), enquanto outros não foram capazes de ver nenhum prejuízo (BANNERMAN et al., 2001; FEINBERG et al., 2012; SQUIRES et al., 2006).

Tem sido sugerido que a ocitocina, que está fortemente ligada a MRS, induz a liberação de dopamina (SKUSE; GALLAGHER, 2011). Dentre os receptores dopaminérgicos, sabe-se que os receptores D1/D5 dopaminérgicos estão implicados na memória espacial e de reconhecimento de objetos (DA SILVA et al., 2012; DE LIMA et al., 2011; FURINI et al., 2014). A noradrenalina, principalmente através de sua ação nos receptores  $\beta$ -adrenérgicos, está envolvida na aquisição e consolidação da memória. Este papel da NA foi observado em diferentes áreas cerebrais incluindo o hipocampo e amígdala (SARA, 2009; TULLY; BOLSHAKOV, 2010). O sistema histaminérgico é conhecido pelos seus efeitos contraditórios na consolidação de diferentes tipos de memórias, como as memórias aversiva, espacial e de reconhecimento de objetos (ONODERA; MIYAZAKI; IMAIZUMI, 1998; ZARRINDAST et al., 2002; BENETTI; IZQUIERDO, 2013a; BONINI et al., 2011; KÖHLER et al., 2011; DA SILVA et al., 2006; DERE, 2003; DA SILVEIRA et al., 2013). Entretanto, quanto à

MRS, poucos estudos abordam o sistema histaminérgico, e nenhum destes estudou o papel do receptor histaminérgico H<sub>2</sub>, que é de extrema importância na modulação da memória (DAI et al., 2005; FOX, 2004; JIA et al., 2008; PRAST; ARGYRIOU; PHILIPPU, 1996).

Nossa hipótese é que os sistemas dopaminérgico, noradrenérgico e histaminérgico desempenham um papel importante na consolidação da memória social, através da ativação de determinados receptores no hipocampo e na amígdala. Sendo assim, este estudo teve como objetivo determinar o envolvimento da região CA1 do hipocampo dorsal e a do núcleo basolateral da amígdala na consolidação da MRS e investigar a participação dos receptores D1/D5 dopaminérgico,  $\beta$ -adrenérgico e H<sub>2</sub> histaminérgico nestas estruturas sobre este tipo de memória. Dada a importância da cognição social para o desenvolvimento das espécies, o melhor entendimento dos mecanismos neurais subjacentes à MRS pode ser útil para compreender doenças que prejudicam o comportamento social.

## **2.1. Objetivos**

### **2.1.1. Objetivo geral**

Avaliar o papel dos sistemas noradrenérgico, dopaminérgico e histaminérgico na memória de longo prazo do reconhecimento social em duas áreas cerebrais distintas: a região CA1 do hipocampo dorsal e a amígdala basolateral.

### **2.1.2. Objetivos específicos**

1. Investigar a participação da região CA1 do hipocampo e da amígdala basolateral na consolidação da memória de reconhecimento social;
2. Verificar a participação dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos em CA1 e na BLA sobre a consolidação da memória de reconhecimento social;
3. Verificar a participação dos receptores D1/D5 dopaminérgicos em CA1 e na BLA sobre a consolidação da memória de reconhecimento social;
4. Verificar a participação dos receptores H<sub>2</sub> histaminérgicos em CA1 e na BLA sobre a consolidação da memória de reconhecimento social.



## **2.2. Metodologia**

### **2.2.1. Animais Experimentais**

Foram utilizados ratos *Wistar (Cr/Cembe:WI)* machos juvenis, de 22 a 30 dias de idade, e adultos, de 3 meses de idade (aproximadamente 330g), alojados em caixas moradia em número de 4 animais por caixa. Os animais foram adquiridos do Centro de Modelos Biológicos Experimentais (CEMBE) da PUCRS e mantidos no biotério do Centro de Memória, localizado no Prédio 64 da PUCRS, sob ciclo claro/escuro de 12 horas, com água e comida a vontade e temperatura ambiente constante de 23°C. Os experimentos foram conduzidos durante o período claro do ciclo. Todos os procedimentos foram realizados somente após a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS, sob o registro CEUA 13/00363, e estiveram de acordo com as normas da Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica do CONCEA.

### **2.2.2. Cirurgia Estereotáxica**

Os animais adultos foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação bilateral de cânulas-guia na região CA1 do hipocampo dorsal (CA1; anterior, -4.2 mm; lateral,  $\pm 3.0$  mm; ventral, -1.8 mm) ou na amígdala basolateral (BLA; anterior -2.4, lateral  $\pm 5.1$ , ventral -7.5 mm), seguindo as coordenadas do atlas de Paxinos e Watson (PAXINOS; WATSON, 1986). Todo o procedimento foi realizado com os animais previamente anestesiados com cetamina, juntamente com xilazina, um sedativo/miorrelaxante/analgésico, ambos administrados intraperitonealmente (i.p.), nas doses de 75 mg/Kg e 10 mg/Kg respectivamente. Como analgésico pós-cirúrgico os animais receberam nas primeiras 24 horas o anti-inflamatório Meloxicam, de 8 em 8 horas.

### **2.2.3. Manipulação**

Nos três dias anteriores aos experimentos, e pelo menos 5 dias após a cirurgia estereotáxica, os animais adultos foram submetidos a sessões diárias de

manipulação. Os juvenis foram manipulados durante dois dias previamente aos experimentos comportamentais. Durante cada sessão os animais eram levados do biotério até a sala de manipulação, retirados da caixa-moradia e manuseados durante 2 minutos. Após 24 horas da última sessão de manipulação os animais foram submetidos aos paradigmas comportamentais.

#### **2.2.4. Paradigma de Discriminação Social**

O paradigma de discriminação social foi realizado em uma caixa retangular de campo aberto medindo 60 x 40 x 50 cm, colocada em uma sala com iluminação fraca e indireta. Duas gaiolas cilíndricas idênticas, feitas em acrílico transparente, medindo 9 cm de diâmetro e 13 cm de altura, foram colocadas na caixa próximas aos cantos. As gaiolas possuíam pequenos orifícios de 1 cm de diâmetro, espaçados a cada 1 cm em sua parede, permitindo a passagem de odores (pistas olfativas), porém prevenindo a interação direta entre o animal adulto e o juvenil. Um copo de Béquer repleto de água (500 mL) foi colocado em cima de cada gaiola para prevenir que os animais adultos movessem ou subissem na gaiola. O campo, as gaiolas e os béqueres eram limpos com uma solução de álcool 70% entre a passagem de cada animal para garantir a ausência de pistas olfativas.

Os animais adultos passaram por um processo de habituação ao dispositivo experimental, com duração de 4 dias e que consistiu em uma sessão comportamental diária de 20 minutos, na qual os animais foram colocados individualmente no campo aberto contendo as duas gaiolas, sem nenhum juvenil, para que o explorassem livremente. Vinte e quatro horas antes da sessão de treino, sem a presença dos animais adultos, os juvenis foram colocados dentro das gaiolas, e permaneceram lá por um período de 20 minutos, para se habituarem a situação de estar em um espaço restrito, que é o cilindro de acrílico.

Vinte e quatro horas após a última sessão de habituação ao aparato experimental, durante a sessão de treino (primeiro encontro), o animal adulto era colocado no centro do campo e exposto a um juvenil dentro de uma gaiola e a uma gaiola vazia (aleatoriamente selecionados e contrabalanceados para cada grupo), durante 1 hora. A fim de avaliar a memória de longa duração, a sessão de teste (segundo encontro) ocorria 24h após a sessão de treino, e consistia na reexposição do animal adulto por 5 minutos ao mesmo juvenil (familiar) apresentado no dia anterior,

durante a sessão de treino, e a um juvenil desconhecido (novo), selecionado de acordo com diferentes combinações previamente determinadas (Figura 10). Durante a sessão de teste foi quantificado o tempo que o animal adulto passava explorando cada um dos juvenis. O comportamento social exploratório foi definido como cheirar os juvenis com o focinho através dos orifícios do cilindro e cheirar a parede das gaiolas. Permanecer ao redor dele não foi considerado como comportamento exploratório. O tempo gasto explorando cada juvenil foi medido por um avaliador, com o auxílio de um cronômetro, e expresso como porcentagem do tempo total de exploração.

Em ambos os encontros, os juvenis foram mantidos nas gaiolas a fim de evitar agressão do adulto para com eles, e também para garantir que o adulto iniciasse a exploração. Os dois juvenis (familiar e novo) eram provenientes de diferentes caixas-moradia, assim seus odores eram diferentes para o animal adulto.

**Figura 10. Representação esquemática do protocolo experimental da tarefa de discriminação social**



(Fonte: Autor, 2016)

### 2.2.5. Intervenção Farmacológica

As intervenções farmacológicas ocorreram imediatamente após a sessão de treino na tarefa de discriminação social. Para a realização dos diferentes tratamentos farmacológicos utilizamos uma cânula de infusão (0,05 mm de diâmetro), conectada a uma microseringa Hamilton por meio de um tubo de polietileno acoplado a uma agulha de infusão; o fármaco a ser administrado foi colocado dentro do tubo e a agulha acoplada então à cânula guia de infusão, previamente implantada nas regiões alvo, através da cirurgia estereotáxica; em seguida, foi dispensado o fármaco ou veículo, ambos administrados obedecendo a uma média de velocidade de infusão de 1 $\mu$ L/60

s. Após o término da infusão intracérebro a guia de infusão foi mantida por mais 60 s dentro da cânula guia para evitar o refluxo de líquido, e após, cuidadosamente retirada, colocada na outra cânula e o processo foi repetido. O volume de infusão utilizado para a região CA1 do hipocampo dorsal foi de 1  $\mu$ L por lado, enquanto na amígdala basolateral o volume utilizado foi de 0.5  $\mu$ L por lado.

Utilizamos neste trabalho os seguintes fármacos e doses:

- Anisomicina (100  $\mu$ g/lado) – inibidor da síntese protéica;
- Isoproterenol (10  $\mu$ g/lado) – agonista do receptor  $\beta$ -adrenérgico;
- Timolol (1  $\mu$ g/lado) – antagonista do receptor  $\beta$ -adrenérgico;
- SKF38393 (12.5  $\mu$ g/lado) – agonista do receptor D1/D5 dopaminérgico;
- SCH23390 (1.5  $\mu$ g/lado) – antagonista do receptor D1/D5 dopaminérgico;
- Dimaprit (2.3  $\mu$ g/lado) – agonista do receptor H<sub>2</sub> histaminérgico;
- Ranitidina (17.5  $\mu$ g/lado) – antagonista do receptor H<sub>2</sub> histaminérgico.

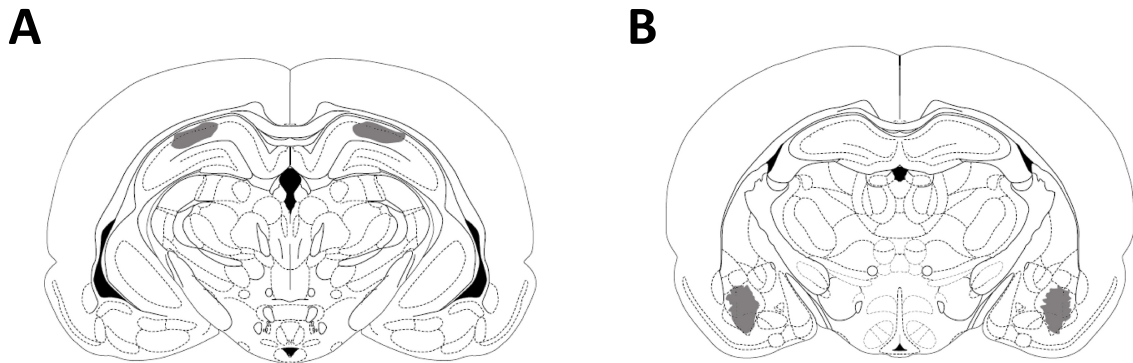
As drogas utilizadas neste estudo foram adquiridas da empresa Sigma-Aldrich (St. Luis, MO, USA). As doses empregadas foram baseadas em estudos prévios na literatura, em que seu efeito sobre a memória e/ou outras variáveis comportamentais e fisiológicas foi estabelecido (FIORENZA et al., 2012; MELLO-CARPES; IZQUIERDO, 2013; QI et al., 2008; ZHANG et al., 2001). Todas as drogas foram dissolvidas em solução salina 0.9%, veículo que foi administrado ao grupo controle.

#### **2.2.6. Análise histológica**

Após o término dos experimentos comportamentais os animais previamente operados foram avaliados histologicamente quanto à colocação de suas cânulas e as regiões cerebrais atingidas pela infusão, visando assim garantir que apenas os dados comportamentais de animais que efetivamente receberam a administração correta das drogas fossem incluídos na análise estatística final. Para isso, após os procedimentos comportamentais os animais foram submetidos à infusão bilateral de uma solução de azul de metileno a 4% através das cânulas guia; quinze minutos depois foram eutanasiados com uma overdose do anestésico tiopental sódico (100 mg/kg) e então

decapitados. Seus cérebros foram removidos e colocados em uma solução de formol 4% por um período de quatro dias, quando então foi realizada a análise histológica, considerando somente os animais com a localização das cânulas dentro de 2 mm<sup>2</sup> dos locais desejados (Figura 11).

**Figura 11. Desenho esquemático dos locais de microinfusão**



Desenho esquemático do cérebro de rato mostrando o local de implantação das cânulas de infusão na região CA1 do hipocampo dorsal (A) e na amígdala basolateral (B). (Fonte: Adaptado de Fiorenza *et al.*, 2012).

### **2.2.7. Análise estatística**

A análise estatística foi realizada com o *software* Prism Graph-Pad 5.1. Os dados obtidos na tarefa de discriminação social foram convertidos em porcentagem do tempo total de exploração, e expressos como média  $\pm$  erro padrão. Para a análise estatística dos dados foi utilizado o teste *t* de *Student*, considerando a média teórica de 50%, a fim de comparar a diferença entre os tempos de exploração entre o juvenil familiar e o novo em um mesmo grupo, e a ANOVA de uma seguida do Teste de Comparação Múltipla de Bonferroni foi utilizada para verificar diferenças entre os grupos. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

## 2.3. Artigo científico



# Major neurotransmitter systems in dorsal hippocampus and basolateral amygdala control social recognition memory

Carolina Garrido Zinn<sup>a</sup>, Nicolas Clairis<sup>b</sup>, Lorena Evelyn Silva Cavalcante<sup>a</sup>, Cristiane Regina Guerino Furini<sup>a</sup>, Jociane de Carvalho Myskiw<sup>a,1,2</sup>, and Ivan Izquierdo<sup>a,1,2</sup>

<sup>a</sup>Memory Center, Brain Institute of Rio Grande do Sul, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, 90610-000 Porto Alegre, RS, Brazil; and <sup>b</sup>Département de Biologie, Ecole Normale Supérieure de Lyon, 69007 Lyon, France

Contributed by Ivan Izquierdo, June 21, 2016 (sent for review May 23, 2016; reviewed by Federico Bermudez-Rattoni and Julietta Frey)

**Social recognition memory (SRM) is crucial for reproduction, forming social groups, and species survival. Despite its importance, SRM is still relatively little studied. Here we examine the participation of the CA1 region of the dorsal hippocampus (CA1) and the basolateral amygdala (BLA) and that of dopaminergic, noradrenergic, and histaminergic systems in both structures in the consolidation of SRM. Male Wistar rats received intra-CA1 or intra-BLA infusions of different drugs immediately after the sample phase of a social discrimination task and 24-h later were subjected to a 5-min retention test. Animals treated with the protein synthesis inhibitor, anisomycin, into either the CA1 or BLA were unable to recognize the previously exposed juvenile (familiar) during the retention test. When infused into the CA1, the  $\beta$ -adrenoreceptor agonist, isoproterenol, the D1/D5 dopaminergic receptor antagonist, SCH23390, and the H2 histaminergic receptor antagonist, ranitidine, also hindered the recognition of the familiar juvenile 24-h later. The latter drug effects were more intense in the CA1 than in the BLA. When infused into the BLA, the  $\beta$ -adrenoreceptor antagonist, timolol, the D1/D5 dopamine receptor agonist, SKF38393, and the H2 histaminergic receptor agonist, ranitidine, also hindered recognition of the familiar juvenile 24-h later. In all cases, the impairment to recognize the familiar juvenile was abolished by the coinfusion of agonist plus antagonist. Clearly, both the CA1 and BLA, probably in that order, play major roles in the consolidation of SRM, but these roles are different in each structure vis-à-vis the involvement of the  $\beta$ -noradrenergic, D1/D5-dopaminergic, and H2-histaminergic receptors therein.**

social memory | basolateral amygdala | hippocampus | norepinephrine | dopamine

**S**ocial recognition memory (SRM) is essential for social interaction, adaptive social behavior, reproduction, and survival (1–6). In rodents, SRM is assessed by using their natural tendency to investigate unfamiliar conspecifics more persistently than familiar ones in what has become known as the social-discrimination paradigm (3, 5, 7–9). This discrimination relies largely on odor recognition by rodents, called by many “social odor” (10). Other sensory are deemed much less important for social recognition (10, 11).

To establish whether a given brain structure or cellular ensemble is important for a given type of behavior, the effect of protein synthesis inhibition in that structure on the particular behavior is often measured; if a deleterious effect is found, then the structure is assumed to play a role in that behavior (for example, see refs. 3 and 12). After this process, some key biochemical processes related to protein synthesis would be studied (13, 14). In the case of SRM, Kogan et al. (3) showed that, in mice, SRM is dependent upon protein synthesis and cyclic adenosine monophosphate responsive-element-binding protein (CREB) function in the hippocampus. Given the fact that the hippocampus and the basolateral amygdala (BLA) work in close association in the making and the regulation of many types of memory (13–17), we decided to study the participation of both

structures in SRM. Historically, the next step to ascertain a putative brain mechanism in a behavior is to examine the eventual role of known neurotransmitters in those structures within the mechanism (13, 15).

Classic neurotransmitters, such as norepinephrine, dopamine, and histamine, have been suggested to play a role on SRM; the pharmacological elevation or depletion of norepinephrine in the central nervous system, respectively, enhances or disrupts social recognition in rats (18). The direct infusion of the norepinephrine reuptake inhibitor, nisoxetine, into the olfactory bulb improves the ability of rats to identify conspecifics (19) and dopamine  $\beta$ -hydroxylase knockout mice that are unable to synthesize norepinephrine show a SRM deficit (20). These findings suggest that norepinephrine plays an important role in the formation of SRM but there is a notable lack of knowledge about the role of the norepinephrine receptors involved, especially the  $\beta$ -adrenoreceptors, which have been shown to be important for other types of recognition memory: for example, object recognition (21–24) and odor recognition (25–29).

There is also evidence that SRM can be modulated by dopamine. During social interaction dopaminergic neurotransmission in the nucleus accumbens is enhanced (30, 31). Systemic administration and direct infusion into the nucleus accumbens or into the frontal cortex of D1 dopamine receptor agonist improves SRM (32, 33) but systemic injection of D1 dopamine receptor antagonist disrupts social learning (32, 34). Evidence

### Significance

**The hippocampus and basolateral amygdala—modulated by  $\beta$ -noradrenergic, D1/D5 dopaminergic, and H2-histaminergic receptors—control memory processing of many memories, but their role in social recognition memory (SRM) has been little studied. SRM is fundamental for the establishment of social relationships and, consequently, for the formation and stability of social groups. The social deficits of psychiatric disorders, such as autism and schizophrenia, are believed to be caused by alterations in SRM processing by the hippocampus and amygdala. Here we examine the involvement of the hippocampus and basolateral amygdala—and  $\beta$ -noradrenergic, D1/D5 dopaminergic, and H2-histaminergic receptors therein—in SRM consolidation. The results suggest an important and complex modulation of this process, which may help to elucidate the basis of inappropriate social behavior in psychiatric patients.**

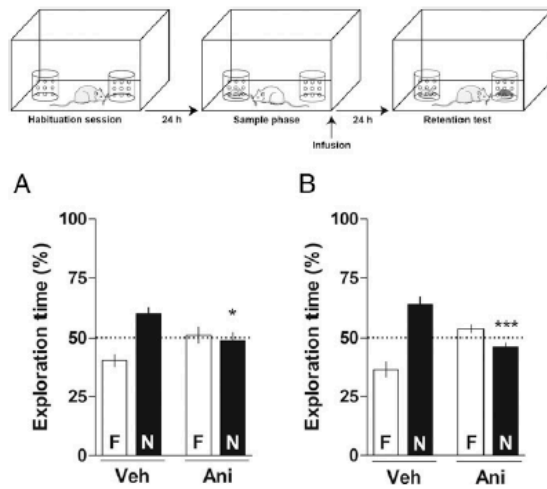
Author contributions: C.G.Z., N.C., C.R.G.F., J.d.C.M., and I.I. designed research; C.G.Z., N.C., L.E.S.C., and C.R.G.F. performed research; C.G.Z., N.C., L.E.S.C., C.R.G.F., J.d.C.M., and I.I. analyzed data; and C.G.Z., J.d.C.M., and I.I. wrote the paper.

Reviewers: F.B.-R., National University of Mexico; and J.F., Lunds University.

The authors declare no conflict of interest.

<sup>1</sup>J.d.C.M. and I.I. contributed equally to this work.

<sup>2</sup>To whom correspondence may be addressed. Email: jociane\_carvalho@hotmail.com or izquierdo@terra.com.br.



**Fig. 1.** Effect of Ani given into the CA1 or BLA on the consolidation of SRM. The schematic representation on the top of the figure shows the behavioral protocol used in this and in the following experiments. Animals were subjected to a social discrimination task and, immediately after the sample phase, received intra-CA1 (A; 1  $\mu$ L per side) or intra-BLA (B; 0.5  $\mu$ L per side) infusions of vehicle (Veh) or Ani (100  $\mu$ g per side). Twenty-four hours later, animals were subjected to a 5-min retention test in the presence of the familiar juvenile (F) and a novel one (N). Dots indicate the theoretical mean of 50%. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n = 8$ –10 animals per group) and presented as percentage of total exploration time. \* $P < 0.05$  and \*\*\* $P < 0.001$  Veh-N vs. Ani-N, Bonferroni's Multiple Comparison test after one-way ANOVA.

shows that the dopamine type 1 receptor is important for social interaction (35) and object-recognition memory (21). H1, H2, and H3 histamine receptors are important for object-recognition memory (36). Furthermore, the intracerebroventricular infusion of histamine, histidine, and H3 histamine receptor agonist improves SRM, whereas the central inhibition of neuronal synthesis of histamine and H3 histamine receptor antagonist hinders this memory (37).

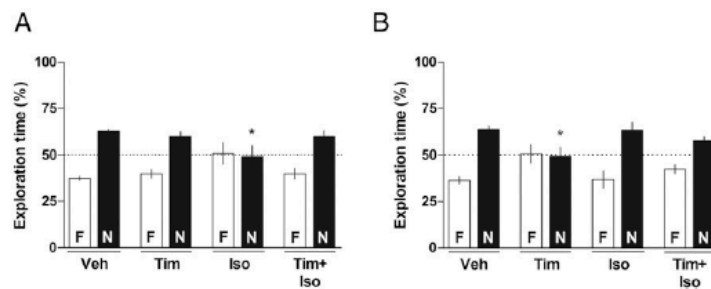
In view of the above considerations, the present study addresses two issues: the first concerns the role of the CA1 region

of the dorsal hippocampus and the BLA, and the second addresses the role of the major norepinephrine, dopamine, and histamine receptors in those structures in the consolidation of SRM. We investigated first the effect of the protein synthesis inhibitor, anisomycin (Ani), on SRM when infused into the CA1 or the BLA. Subsequently, we studied the participation of  $\beta$ -adrenergic, D1/D5 dopamine, and H2 histamine receptors on the consolidation of SRM by infusing their agonists and antagonists into the CA1 or BLA.

## Results

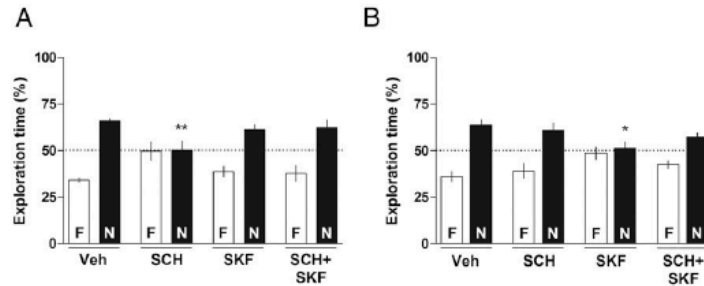
**Effect of Ani Given into the CA1 or the BLA on the Consolidation of SRM.** Animals received intra-CA1 or intra-BLA microinfusions of vehicle (Veh) or Ani (100  $\mu$ g per side) immediately after the sample phase of a social discrimination task and 24-h later were subjected to a 5-min retention test. As shown in Fig. 1, animals that received Veh into the CA1 (Fig. 1A) or the BLA (Fig. 1B) immediately after the sample phase were able to recognize the familiar juvenile 24-h later [one-sample  $t$  test: (Fig. 1A) Veh  $t_{(9)} = 3.577$ ,  $P < 0.01$ ; (Fig. 1B) Veh  $t_{(8)} = 4.124$ ,  $P < 0.01$ ]. In contrast, animals that received intra-CA1 infusions of Ani spent about the same time exploring the novel (N) and the familiar (F) juveniles [one-sample  $t$  test: (Fig. 1A) Ani  $t_{(9)} = 0.3542$ ,  $P > 0.1$ ] during the retention test. Additionally, animals that received Ani into the BLA spent more time exploring the familiar juvenile than the novel one [one-sample  $t$  test: (Fig. 1B) Ani  $t_{(7)} = 2.306$ ,  $P > 0.05$ ] during the retention test. These results suggest that animals treated with Ani in either structure were unable to recognize the familiar juvenile 24-h after the sample phase. One-way ANOVA showed significant differences among groups [CA1:  $F_{(3, 36)} = 6.952$ ,  $P < 0.001$ ; BLA:  $F_{(3, 30)} = 18.95$ ,  $P < 0.0001$ ]. Bonferroni posttest revealed significant differences between Veh-N and Ani-N groups on the retention test when infused with intra-CA1 ( $P < 0.05$ ) or intra-BLA ( $P < 0.001$ ) immediately after the sample phase. The results obtained using Ani infusions suggest that the CA1 and BLA are both involved in the consolidation of SRM.

**Effect of  $\beta$ -Adrenoreceptor Antagonist and Agonist Given into the CA1 or the BLA on the Consolidation of SRM.** Immediately after the sample phase of the social discrimination task, animals received infusions of Veh, Timolol (Tim, 1.0  $\mu$ g per side), or Iso-terenol (Iso, 10.0  $\mu$ g per side),  $\beta$ -adrenoreceptor antagonist, and agonist, respectively, intra-CA1 or intra-BLA. Twenty-four



**Fig. 2.** Effect of  $\beta$ -adrenoreceptor antagonist and agonist infused into the CA1 or into the BLA on the consolidation of social recognition memory. Animals were subjected to a social discrimination task and immediately after the sample phase received intra-CA1 (A; 1  $\mu$ L per side) or intra-BLA (B; 0.5  $\mu$ L per side) infusions of vehicle (Veh), Tim (1.0  $\mu$ g per side), or Iso (10.0  $\mu$ g per side) or coinfusion of Timolol plus Isoproterenol (Tim+Iso). Twenty-four hours later, animals were subjected to a 5-min retention test in the presence of the familiar juvenile (F) and a novel one (N). Dots indicate the theoretical mean of 50%. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n = 8$ –12 animals per group) and presented as percentage of total exploration time. \* $P < 0.05$  Veh-N vs. Iso-N (CA1), Veh-N vs. Tim-N (BLA), Bonferroni's Multiple Comparison test after one-way ANOVA. In this and in Fig. 3, note that the drug effects were more intense in the CA1 than in BLA, probably indicating a larger importance of the former in modulation of this behavior both by noradrenergic receptors (this figure) and dopaminergic receptors (Fig. 3).

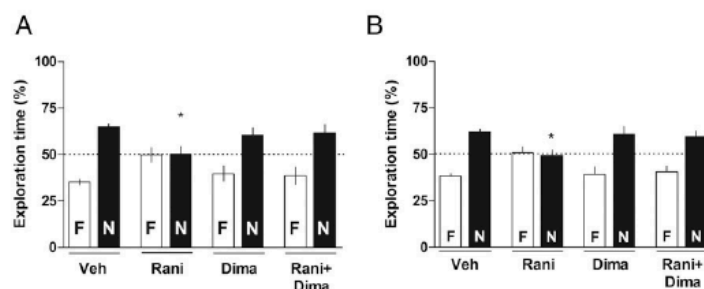




**Fig. 3.** Effect of D1/D5 dopamine receptors antagonist and agonist infused into the CA1 or into the BLA on the consolidation of social recognition memory. Animals were subjected to a social discrimination task and immediately after the sample phase received intra-CA1 (A; 1  $\mu$ L per side) or intra-BLA (B; 0.5  $\mu$ L per side) infusions of vehicle (Veh), SCH23390 (SCH; 1.50  $\mu$ g per side) or SKF38393 (SKF; 12.5  $\mu$ g per side), or coinfusion of SCH23390 plus SKF38393 (SCH+SKF). Twenty-four hours later, animals were subjected to a 5-min retention test in the presence of the familiar juvenile (F) and a novel one (N). Dots indicate the theoretical mean of 50%. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n = 9$ –12 animals per group) and presented as percentage of total exploration time. \* $P < 0.05$  Veh-N vs. SKF-N (BLA); \*\* $P < 0.01$  Veh-N vs. SCH-N, Bonferroni's Multiple Comparison test after one-way ANOVA.

hours later, the animals were subjected to a 5-min retention test. As shown in Fig. 2, animals that received intra-CA1 or intra-BLA infusion of Veh or infusions of Tim intra-CA1 [one-sample  $t$  test: (Fig. 2A) Tim  $t_{(11)} = 4.329$ ,  $P < 0.01$ ] or infusions of Iso intra-BLA [one-sample  $t$  test: (Fig. 2B)  $t_{(7)} = 2.873$ ,  $P < 0.05$ ] were able to recognize the familiar juvenile [one-sample  $t$  test: (Fig. 2A) Veh  $t_{(10)} = 11.56$ ,  $P < 0.0001$ ; (Fig. 2B) Veh  $t_{(8)} = 7.195$ ,  $P < 0.0001$ ] during the retention test. On the other hand, animals that received infusions of Iso intra-CA1 [one-sample  $t$  test: (Fig. 2A) Iso  $t_{(9)} = 0.1482$ ,  $P > 0.05$ ] or Tim intra-BLA [one-sample  $t$  test: (Fig. 2B) Tim  $t_{(7)} = 0.1401$ ,  $P > 0.05$ ] were unable to recognize the previously exposed juvenile during the retention test. This impairment in the ability to discriminate between familiar and novel juveniles was abolished by the coinfusion of Tim plus Iso into the CA1 [one-sample  $t$  test: (Fig. 2A) Tim+Iso  $t_{(7)} = 3.416$ ,  $P < 0.05$ ] or into the BLA [one-sample  $t$  test: (Fig. 2B) Tim+Iso  $t_{(8)} = 3.142$ ,  $P < 0.05$ ]. One-way ANOVA showed significant differences between groups [CA1:  $F_{(3, 37)} = 3.145$ ,  $P < 0.05$ ; BLA:  $F_{(3, 30)} = 3.459$ ,  $P < 0.05$ ]. Bonferroni posttest revealed significant differences between Veh-N and Iso-N groups in CA1 ( $P < 0.05$ ) and between Veh-N and Tim-N in the BLA ( $P < 0.05$ ) on the retention test. The effects of the drugs in the CA1 were larger than those in the BLA, suggesting a higher importance of the former in the regulation of this behavior.

**Effect of D1/D5 Dopamine Receptor Antagonist and Agonist Given into the CA1 or the BLA on the Consolidation of SRM.** Animals received intra-CA1 or intra-BLA infusions of Veh, D1/D5 dopamine receptor antagonist SCH23390 (SCH, 1.50  $\mu$ g per side), or D1/D5 dopamine receptors agonist SKF38393 (SKF, 12.5  $\mu$ g per side) or coinfusion of SCH23390 plus SKF38393 (SCH+SKF) immediately after the sample phase of a social discrimination task and were subjected to a retention test 24-h later. As shown in Fig. 3, animals that received intra-CA1 or intra-BLA infusions of Veh [one-sample  $t$  test: (Fig. 3A) Veh  $t_{(11)} = 13.18$ ,  $P < 0.0001$ ; (Fig. 3B) Veh  $t_{(11)} = 4.955$ ,  $P < 0.001$ ], intra-CA1 infusion of SKF38393 [one-sample  $t$  test: (Fig. 3A) SKF  $t_{(10)} = 4.037$ ,  $P < 0.01$ ], or intra-BLA infusion of SCH23390 [one-sample  $t$  test: (Fig. 3B) SCH  $t_{(11)} = 2.696$ ,  $P < 0.05$ ] were able to recognize the previously exposed juvenile 24-h after the sample phase. However, animals that received infusion of SCH23390 intra-CA1 [one-sample  $t$  test: (Fig. 3A) SCH  $t_{(8)} = 0.04324$ ,  $P > 0.05$ ] or SKF38393 intra-BLA [one-sample  $t$  test: (Fig. 3B) SKF  $t_{(11)} = 0.4073$ ,  $P > 0.05$ ] spent a similar amount of time exploring the novel and the familiar juveniles during the retention test. This inability to discriminate between familiar and novel juvenile was abolished by the combined infusion of SCH23390 plus SKF38393 into the CA1 [one-sample  $t$  test: (Fig. 3A) SCH+SKF  $t_{(11)} = 3.026$ ,  $P < 0.05$ ] or into the BLA [one-sample  $t$  test: (Fig. 3B) SCH+SKF  $t_{(11)} = 3.556$ ,  $P < 0.01$ ]. One-way ANOVA indicated



**Fig. 4.** Effect of H2 histamine receptors antagonist and agonist infused into the CA1 or into the BLA on the consolidation of social recognition memory. Animals were subjected to a social discrimination task and immediately after the sample phase received intra-CA1 (A; 1  $\mu$ L per side) or intra-BLA (B; 0.5  $\mu$ L per side) infusions of vehicle (Veh), Rani (17.5  $\mu$ g per side), or Dima (2.3  $\mu$ g per side), or coinfusion of Rani plus Dima (Rani+Dima). Twenty-four hours later, animals were subjected to a 5-min retention test in the presence of the familiar juvenile (F) and a novel one (N). Dots indicate the theoretical mean of 50%. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n = 8$ –12 animals per group) and presented as percentage of total exploration time. \* $P < 0.05$  Veh-N vs. Rani-N, Bonferroni's Multiple Comparison test after one-way ANOVA.



difference between groups [CA1:  $F_{(3, 40)} = 3.592, P < 0.05$ ; BLA:  $F_{(3, 45)} = 3.155, P < 0.05$ ]. Bonferroni's posttest revealed differences between Veh-N and SCH-N in the CA1 ( $P < 0.01$ ) and between Veh-N and SKF-N in the BLA ( $P < 0.05$ ) on the retention test. Again, drug effects in the CA1 were larger than those in the BLA, suggesting that the former is probably more important than the latter in the regulation of this behavior.

**Effect of H2 Histamine Receptor Antagonist and Agonist Given into the CA1 or the BLA on the Consolidation of SRM.** Animals received intra-CA1 or intra-BLA infusions of Veh or of an antagonist and an agonist of the H2 histamine receptor, Ranitidine (Rani, 17.5  $\mu\text{g}$  per side) and Dimaprit (Dima, 2.3  $\mu\text{g}$  per side), respectively, immediately after the sample phase of a social discrimination task. Twenty-four hours later animals were subjected to a 5-min retention test. As shown in Fig. 4, animals that received infusions intra-CA1 or intra-BLA of Veh [one-sample  $t$ -test: (Fig. 4A) Veh  $t_{(10)} = 9.382, P < 0.0001$ ; (Fig. 4B) Veh  $t_{(11)} = 7.303, P < 0.0001$ ] or Dima [one-sample  $t$  test: (Fig. 4A) Dima  $t_{(9)} = 2.549, P < 0.05$ ; (Fig. 4B) Dima  $t_{(11)} = 2.708, P < 0.05$ ] spent significantly more time exploring the novel juvenile than the familiar one during the retention test. However, animals that received infusion of Rani [one-sample  $t$  test: (Fig. 4A) Rani  $t_{(9)} = 0.06443, P > 0.05$ ; (Fig. 4B) Rani  $t_{(7)} = 0.2364, P > 0.05$ ] into the CA1 or into the BLA were unable to recognize the familiar juvenile 24-h after the sample phase. However, when animals received coinfusion of Rani plus Dima [one-sample  $t$  test: (Fig. 4A) Rani+Dima  $t_{(10)} = 2.524, P < 0.05$ ; (Fig. 4B) Rani+Dima  $t_{(7)} = 3.218, P < 0.05$ ] intra-CA1 or intra-BLA explored the novel juvenile for longer than the familiar one during the retention test. One-way ANOVA showed significant differences among groups [CA1:  $F_{(3, 38)} = 2.872, P < 0.05$ ; BLA:  $F_{(3, 36)} = 3.075, P < 0.05$ ]. Bonferroni's posttest revealed differences between groups Veh-N and Rani-N in CA1 and BLA on the retention test ( $P < 0.05$ ). These results suggest that H2 histaminergic receptors in both the CA1 and BLA are involved in the consolidation of SRM.

Importantly, no differences were found between the CA1 groups [ $F_{(10, 136)} = 1.740, P = 0.0778$ ] and BLA groups [ $F_{(10, 130)} = 1.837, P = 0.0603$ ] in total exploration time during the retention test (Table 1). These results suggest that the doses of the drugs used did not affect motor skills or basal motivation to explore the juveniles.

## Discussion

Concerning whether the CA1 and BLA play a role in SRM, our findings show that Ani given into the CA1 region of the dorsal hippocampus or into the BLA impairs the consolidation of SRM. Given the connections between the various amygdala subnuclei

(38), our data fit with those of Gur et al. (39), showing that Ani given into the medial amygdala disrupts SRM, and with those of Wang et al. (40), who showed that lesion of the medial or basolateral amygdala impairs social but not other types of recognition in mice.

The data of Figs. 2–4 lead to several conclusions on the role of  $\beta$ -adrenoreceptors, D1/D5 dopamine receptors, and H2 histamine receptors in the modulation of SRM consolidation. In the CA1, Iso inhibits SRM, but because Tim has no effect of its own in that structure, the modulation of SRM by  $\beta$ -adrenoreceptors probably does not occur physiologically. In contrast, in the BLA, the data suggest that  $\beta$ -adrenoreceptors are probably useful to sustain SRM physiologically, because Tim on its own is depressant, even though Iso given alone seems without effect (Fig. 2). Concerning dopamine D1/D5 modulation of SRM in the CA1, the inhibitory effect of SCH suggests that this modulation may take place physiologically, but SKF has no action on its own in that structure (Fig. 3). At any rate, the effects of drugs acting on  $\beta$ - and on D1/D5 receptors show that concerning these receptors, the CA1 and BLA do not act in unison but instead play differential modulatory functions. Such differences between structures are not uncommon with  $\beta$ -adrenoreceptors (see ref. 41) as well as with D1/D2 receptor actions (see refs. 32 and 33). The data on H2 histamine receptor regulation of SRM suggest that it exists physiologically in both the CA1 and BLA (Fig. 4), as is the case with the modulation by H2 histamine receptors of several other types of memory in these and in other brain structures (42).

Wang et al. (40) demonstrated the participation of the dorsal hippocampus and the BLA in SRM. As will be seen, although our results generally agree with this finding, they suggest different roles for each of these structures. Despite the fact that some studies have failed to show any contribution of the hippocampus to social memory (43–45), a recent review of optogenetic studies showed that a connection between the BLA and hippocampus is strongly involved in SRM and social behaviors (46). Indeed, a recent optogenetic study in mice showed that activation of the BLA–medial prefrontal cortex pathway reduced social interaction in the resident-intruder test, whereas inhibition facilitated social interaction. These results establish a causal relationship between activity in the BLA–medial prefrontal cortex pathway in the bidirectional modulation of anxiety-related and social behaviors (47).

Stevenson and Caldwell (48) and Hitti and Siegelbaum (49) demonstrated that the CA2 region of the hippocampus is important for SRM. The CA2 region serves as a link between CA1 and CA3 (50) and it would seem likely that perhaps the whole hippocampus may be necessary for the formation of social memory; further research is required. Thirty years ago Corkin et al. (51) suggested a role for the hippocampus in social recognition in humans.

Findings on animal social behavior are often taken to bear on the study of human autism and other disorders involving social behavior (see, for example, ref. 46). Our results may bear on studies on autism reporting a link of impaired facial recognition (52), which has been attributed to abnormalities in the volume of the amygdala and so very probably in its microscopic organization, leading to dysregulated activity (53–59). Some have shown that autistic individuals may present a reduction of the volume of the amygdala during development but not in adulthood, in contrast with the increased hippocampus volume in autistic individuals at all ages compared with nonautistic individuals (59).

Other studies relying on localized brain lesions instead of the regional infusion of Ani point to roles for other brain structures in SRM: the olfactory bulb (which is to be expected because SRM, as studied by most authors, involves obviously mainly olfactory cues) and the septal nuclei (60, 61).

Other neurotransmitter or neuromodulator systems have also been studied: infusion of the selective 5-HT1A receptor agonist,

**Table 1. Total exploration time during the 5-min retention test of the social discrimination task**

Treatment	Total exploration time (s)	
	CA1	BLA
Vehicle	95.5 $\pm$ 4.0	90.8 $\pm$ 4.1
Anisomycin	78.2 $\pm$ 7.2	95.7 $\pm$ 6.2
Isoproterenol	94.5 $\pm$ 12.1	92.8 $\pm$ 7.0
Timolol	101.3 $\pm$ 7.4	71.1 $\pm$ 5.2
Timolol+Isoproterenol	77.5 $\pm$ 11.5	83.8 $\pm$ 8.1
SKF38393	82.4 $\pm$ 7.2	91.3 $\pm$ 7.0
SCH23390	94.9 $\pm$ 5.7	87.0 $\pm$ 8.0
SCH23390+SKF38393	79.45 $\pm$ 4.1	74.0 $\pm$ 5.7
Dimaprit	96.5 $\pm$ 9.6	103.1 $\pm$ 9.8
Ranitidine	89.1 $\pm$ 6.0	69.9 $\pm$ 11.5
Ranitidine+Dimaprit	72.2 $\pm$ 8.1	76.5 $\pm$ 8.8

Means  $\pm$  SEM are shown; one-way ANOVA analysis.

8-OH-DPAT, into the BLA decreased levels of social investigation (62). Oxytocin and vasopressin, which in the brain purportedly act as neuromodulators and are found in the hippocampus and amygdala, among other places (6), have been well and amply studied (60, 63–67). Oxytocin has been linked to social recognition in the medial region of the amygdala (68) and seems to play a role only in the acquisition of SRM, whereas vasopressin acts in the acquisition and consolidation of SRM (6). Estrogens promote the synthesis of oxytocin and its receptor (69). Interestingly, in female rats and mice, social memory has a peak during the proestrous phase, which is when estrogens are in higher concentration (70). In addition to their role in social behavior, oxytocin stimulates the release of dopamine, and the interaction of both neuromodulators might promote social interactions (2, 71).

Further research will no doubt clear up the relation of the present findings with those in the literature. Meanwhile, it can be concluded from the present data that the CA1 region of the dorsal hippocampus and the BLA are key participants in the regulation of SRM in rats, and that norepinephrine acting on  $\beta$ -receptors, dopamine acting on D1/D5 receptors, and histamine acting on H2 receptors in these two brain regions play a pivotal role in social recognition measured in a standard social discrimination paradigm. The roles of the catecholamines (14, 18, 38), and to an extent that of histamine (16, 36), appear peculiarly interesting because they probably affect this (3) and other forms of memory (14) by actions in the hippocampus and BLA, mediated by the enhanced synthesis of the nuclear CREB (3, 16, 38), which is related to protein synthesis, here shown to be necessary for SRM, as previously posited by Kogan et al. (3).

#### Materials and Methods

**Animals.** Adult (3-mo-old, 300–330 g) and juvenile (22–30 postnatal days) male Wistar rats purchased from Centro de Modelos Biológicos Experimentais of the Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (our regular provider) were used. Adults were housed four to a cage and juveniles were housed two to a cage, with free access to food and water and under a 12/12-h light/dark cycle (lights on at 7:00 AM). The behavioral experiments were conducted during the light phase of the cycle. All procedures were approved by the Animal Committee on Ethics in the Care and Use of Laboratory Animals of the Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, in compliance with National Institutes of Health guidelines for the care and use of laboratory animals.

**Surgery.** Adult animals were implanted bilaterally with stainless steel 22-gauge guide cannulae under deep anesthesia (75 mg/kg ketamine plus 10 mg/kg xylazine, i.p.) by stereotaxic procedures. The tips of the cannulae were aimed 1-mm above the CA1 region of the dorsal hippocampus (anterior,  $-4.2$  mm; lateral,  $\pm 3.0$  mm; ventral,  $-1.8$  mm; from Bregma) or the basolateral complex of the amygdala (anterior,  $-2.4$  mm; lateral,  $\pm 5.1$  mm; ventral  $-7.5$  mm; from Bregma) according to the atlas by Paxinos and Watson (72). The guide cannulae were fixed to the skull with dental acrylic cement. All animals were allowed 7 d for recovery from surgery before behavioral procedures. All animals were handled daily for 3 d before the behavioral experiments.

**Pharmacological Treatments.** The drugs were purchased from Sigma–Aldrich. The doses used were derived from previous data in the literature in which their effect on memory variables was established (41, 73–75). The doses were: for the protein synthesis inhibitor, Anis, 100  $\mu$ g per side; for  $\beta$ -adrenoreceptor agonist, Iso, 10.0  $\mu$ g per side; for the  $\beta$ -blocker, Tim, 1.0  $\mu$ g per side; for the D1/D5 dopamine receptor agonist, SKF, 12.5  $\mu$ g per side; for the D1/D5 dopamine receptors antagonist, SCH, 1.5  $\mu$ g per side; for the agonist of the H2 histamine receptor, Dima, 2.3  $\mu$ g per side; and for the H2 blocker, Rani, 17.5  $\mu$ g per side.

All drugs were dissolved in sterile saline 0.9% (Veh), which was administered to the control groups. Infusion volume used was 0.5  $\mu$ L per side into the BLA and 1.0  $\mu$ L per side into the CA1 region of the dorsal hippocampus.

At the time of the microinfusion, a tight-fitting 30-gauge infusion cannula connected to a Hamilton microsyringe by polyethylene tubing was introduced into the guide cannula. The infusion cannula extended 1.0-mm beyond the cannula tip. Infusion was carried out over 60 s and the infusion cannula was left in place for an additional 60 s to maximize diffusion and to prevent backflow of the drug, and then carefully withdrawn and placed on the other side, after which the procedure was repeated.

**Social Discrimination Paradigm.** The apparatus used was a white wooden open-field arena (60 cm  $\times$  40 cm  $\times$  50 cm) placed in a dimly illuminated room. Two identical transparent Plexiglas cylindrical cages (9-cm diameter  $\times$  13-cm high) were kept inside the arena near to the corners. The cylinder cages had small holes (1-cm diameter spaced by 1 cm diameter) on the wall, allowing the passage of odors (olfactory cues) while preventing the direct interaction between adults and juveniles. A clear cup filled with water (500 mL) was placed on top of each cylinder to prevent adults from moving or climbing it. The arena and the cylinder cages were cleaned with 70% (vol/vol) ethanol before and after each use.

Adult animals were individually habituated to the open-field arena for 20 min per day for 4 consecutive days. The empty cylinder cages were kept inside the arena during the habituation session. Juveniles were habituated to being placed in the cylinder cages for 20 min 24-h before the sample phase. The sample phase took place 24-h after the last habituation session. The adults were individually placed in the center of the arena and allowed, for 1 h, to freely explore an unfamiliar juvenile placed in one of the cylinder cages (randomly selected and counterbalanced for each group) and an empty cylinder. The retention test occurred 24-h later, the adults were placed again in the same arena with the previously presented juvenile (familiar) and a second juvenile (novel) that had no prior contact with the adult, placed in the cylinder that had been empty during the sample phase, and allowed to freely explore the set-up for 5 min, after which they were returned to their home cages. The two juveniles were from different home cages to prevent the redundancy of olfactory cues. During the retention test the exploration time of each juvenile (familiar and novel) was measured. Social exploratory behavior was defined as sniffing and touching the cylinder cages. The micro-injections into the CA1 or BLA were carried out immediately after the sample phase.

**Histology.** As usual in our laboratory (12, 41, 75, 76), cannulae placements were determined by infusing 4% (vol/vol) methylene blue into the cannulae 2 d after the last behavioral procedure. The spread of the dye was taken as an estimate of the drug infusions in the same animal. Placements were considered correct when the spread was 1 mm<sup>2</sup> or less from the intended infusion sites. Only data from animals with correct cannulae implants were analyzed.

**Statistical Analysis.** Data obtained in social discrimination task were converted in percentage of total exploration time of the juveniles, expressed as means and SE, and analyzed using one-sample Student's *t* test, considering the theoretical mean equal to 50% to compare the difference between familiar and novel juvenile exploration time in the same group. One-way ANOVA followed by Bonferroni's Multiple Comparison Test was performed to assess differences between percentages of exploration time of novel juveniles on the retention test. The one-way ANOVA was used to verify differences in total time of exploration between the different treatments. GraphPad Prism software was used to analyze the data.  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

**ACKNOWLEDGMENTS.** This work was supported by research grants from the National Council of Research of Brazil, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazil.

- Lai W-S, Ramiro L-LR, Yu HA, Johnston RE (2005) Recognition of familiar individuals in golden hamsters: A new method and functional neuroanatomy. *J Neurosci* 25(49):11239–11247.
- Cacioppo JT, Decety J (2011) Social neuroscience: Challenges and opportunities in the study of complex behavior. *Ann N Y Acad Sci* 1224(1):162–173.
- Kogan JH, Frankland PW, Silva AJ (2000) Long-term memory underlying hippocampus-dependent social recognition in mice. *Hippocampus* 10(1):47–56.
- Norman GJ, Hawkey LC, Cole SW, Bemton GG, Cacioppo JT (2012) Social neuroscience: The social brain, oxytocin, and health. *Soc Neurosci* 7(1):18–29.

- Thor DH, Holloway WR (1982) Social memory of the male laboratory rat. *J Comp Physiol Psychol* 96(6):1000–1006.
- Gabor CS, Phan A, Clipperton-Allen AE, Kavaliers M, Choleris E (2012) Interplay of oxytocin, vasopressin, and sex hormones in the regulation of social recognition. *Behav Neurosci* 126(1):97–109.
- Engelmann M, Wotjak CT, Landgraf R (1995) Social discrimination procedure: An alternative method to investigate juvenile recognition abilities in rats. *Physiol Behav* 58(2):315–321.
- Gheusi G, Bluthé RM, Goodall G, Dantzer R (1994) Social and individual recognition in rodents: Methodological aspects and neurobiological bases. *Behav Processes* 33(1–2):59–87.



9. Moura PJ, Meirelles ST, Xavier GF (2010) Long-term social recognition memory in adult male rats: Factor analysis of the social and non-social behaviors. *Braz J Med Biol Res* 43(7):663–676.
10. Wacker DW, Engelmann M, Tobin VA, Meddle SL, Ludwig M (2011) Vasopressin and social odor processing in the olfactory bulb and anterior olfactory nucleus. *Ann N Y Acad Sci* 1220:106–116.
11. Wacker DW, Ludwig M (2012) Vasopressin, oxytocin, and social odor recognition. *Horm Behav* 61(3):259–265.
12. de Carvalho Myskiw J, Furini CRG, Benetti F, Izquierdo I (2014) Hippocampal molecular mechanisms involved in the enhancement of fear extinction caused by exposure to novelty. *Proc Natl Acad Sci USA* 111(12):4572–4577.
13. Izquierdo I, et al. (2006) Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. *Trends Neurosci* 29(9):496–505.
14. Izquierdo I, Medina JH (1997) Memory formation: The sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol Learn Mem* 68(3):285–316.
15. Izquierdo I, et al. (1992) Neurotransmitter receptors involved in post-training memory processing by the amygdala, medial septum, and hippocampus of the rat. *Behav Neural Biol* 58(1):16–26.
16. Benetti F, et al. (2015) Histamine in the basolateral amygdala promotes inhibitory avoidance learning independently of hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA* 112(19):E2536–E2542.
17. Izquierdo LA, et al. (2007) A link between role of two prefrontal areas in immediate memory and in long-term memory consolidation. *Neurobiol Learn Mem* 88(2):160–166.
18. Griffin MG, Taylor GT (1995) Norepinephrine modulation of social memory: Evidence for a time-dependent functional recovery of behavior. *Behav Neurosci* 109(3):466–473.
19. Shang Y, Dluzen DE (2001) Nisoxetine infusion into the olfactory bulb enhances the capacity for male rats to identify conspecifics. *Neuroscience* 104(4):957–964.
20. Marino MD, Bourdrelat-Parks BN, Cameron Liles L, Weinschenker D (2005) Genetic reduction of noradrenergic function alters social memory and reduces aggression in mice. *Behav Brain Res* 161(2):197–203.
21. Furini CRG, Myskiw JC, Schmidt BE, Marcondes LA, Izquierdo I (2014) D1 and D5 dopamine receptors participate on the consolidation of two different memories. *Behav Brain Res* 271:212–217.
22. Roozendaal B, Okuda S, Van der Zee EA, McGaugh JL (2006) Glucocorticoid enhancement of memory requires arousal-induced noradrenergic activation in the basolateral amygdala. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(17):6741–6746.
23. Roozendaal B, Castello NA, Vedana G, Bareggyan A, McGaugh JL (2008) Noradrenergic activation of the basolateral amygdala modulates consolidation of object recognition memory. *Neurobiol Learn Mem* 90(3):576–579.
24. Dornelles A, et al. (2007) Adrenergic enhancement of consolidation of object recognition memory. *Neurobiol Learn Mem* 88(1):137–142.
25. Dluzen DE, Muraoka S, Engelmann M, Ebner K, Landgraf R (2000) Oxytocin induces preservation of social recognition in male rats by activating alpha-adrenoreceptors of the olfactory bulb. *Eur J Neurosci* 12(2):760–766.
26. Guérin D, Peace ST, Didier A, Linster C, Cleland TA (2008) Noradrenergic neuromodulation in the olfactory bulb modulates odor habituation and spontaneous discrimination. *Behav Neurosci* 122(4):816–826.
27. Lévy F (2002) Neurobiological mechanisms involved in recognition of olfactory signature of the young in sheep. *J Soc Biol* 196(1):77–83.
28. Miranda MI, Ortiz-Godina F, Garcia D (2009) Differential involvement of cholinergic and beta-adrenergic systems during acquisition, consolidation, and retrieval of long-term memory of social and neutral odors. *Behav Brain Res* 202(1):19–25.
29. Veyrac A, Nguyen V, Marien M, Didier A, Jourdan F (2007) Noradrenergic control of odor recognition in a nonassociative olfactory learning task in the mouse. *Learn Mem* 14(12):847–854.
30. Gonzalez LE, et al. (2000) Medial prefrontal transection enhances social interaction. I: Behavioral studies. *Brain Res* 887(1):7–15.
31. Tucci S, et al. (2000) Medial prefrontal transection enhances social interaction. II: Neurochemical studies. *Brain Res* 887(2):259–265.
32. Di Cara B, et al. (2007) Activation of dopamine D1 receptors enhances cholinergic transmission and social cognition: A parallel dialysis and behavioural study in rats. *Int J Neuropsychopharmacol* 10(3):383–399.
33. Loiseau F, Millan MJ (2009) Blockade of dopamine D(3) receptors in frontal cortex, but not in sub-cortical structures, enhances social recognition in rats: Similar actions of D(1) receptor agonists, but not of D(2) antagonists. *Eur Neuropsychopharmacol* 19(1):23–33.
34. Choleis E, Clipperton-Allen AE, Gray DG, Diaz-Gonzalez S, Welzman RG (2011) Differential effects of dopamine receptor D1-type and D2-type antagonists and phase of the estrous cycle on social learning of food preferences, feeding, and social interactions in mice. *Neuropsychopharmacology* 36(8):1689–1702.
35. Okada R, et al. (2015) Involvement of dopaminergic and cholinergic systems in social isolation-induced deficits in social affiliation and conditional fear memory in mice. *Neuroscience* 299:134–145.
36. da Silveira OKB, Furini CRG, Benetti F, Monteiro SdaC, Izquierdo I (2013) The role of histamine receptors in the consolidation of object recognition memory. *Neurobiol Learn Mem* 103:64–71.
37. Prast H, Argriou A, Philippu A (1996) Histaminergic neurons facilitate social memory in rats. *Brain Res* 734(1–2):316–318.
38. Izquierdo I, Furini CRG, Myskiw JC (2016) Fear memory. *Physiol Rev* 96(2):695–750.
39. Gur R, Tendler A, Wagner S (2014) Long-term social recognition memory is mediated by oxytocin-dependent synaptic plasticity in the medial amygdala. *Biol Psychiatry* 76(5):377–386.
40. Wang Y, Zhao S, Liu X, Fu Q (2014) Effects of the medial or basolateral amygdala upon social anxiety and social recognition in mice. *Turk J Med Sci* 44(3):353–359.
41. Fiorenza NG, Rosa J, Izquierdo I, Myskiw JC (2012) Modulation of the extinction of two different fear-motivated tasks in three distinct brain areas. *Behav Brain Res* 232(1):210–216.
42. Myskiw JC, Furini CRG, Izquierdo I (2016) Modulation of memory consolidation by brain histamine. *Histamine Receptors: Preclinical and Clinical Aspects*, eds Blandina P, Passari MB (Springer, New York).
43. Bannerman DM, Lemaire M, Beggs S, Rawlins JNP, Iversen SD (2001) Cytotoxic lesions of the hippocampus increase social investigation but do not impair social-recognition memory. *Exp Brain Res* 138(1):100–109.
44. Feinberg LM, Allen TA, Ly D, Fortin NJ (2012) Recognition memory for social and non-social odors: Differential effects of neurotoxic lesions to the hippocampus and perirhinal cortex. *Neurobiol Learn Mem* 97(1):7–16.
45. Squires AS, Peddle R, Milway SJ, Harley CW (2006) Cytotoxic lesions of the hippocampus do not impair social recognition memory in socially housed rats. *Neurobiol Learn Mem* 85(1):95–101.
46. Allsp SA, Vander Weele CM, Wichmann R, Tye KM (2014) Optogenetic insights on the relationship between anxiety-related behaviors and social deficits. *Front Behav Neurosci* 8:241.
47. Felix-Ortiz AC, Burgos-Robles A, Bhagat ND, Leppa CA, Tye KM (2016) Bidirectional modulation of anxiety-related and social behaviors by amygdala projections to the medial prefrontal cortex. *Neuroscience* 321:197–209.
48. Stevenson EL, Caldwell HK (2014) Lesions to the CA2 region of the hippocampus impair social memory in mice. *Eur J Neurosci* 40(9):3294–3301.
49. Hitti FL, Siegelbaum SA (2014) The hippocampal CA2 region is essential for social memory. *Nature* 508(7494):88–92.
50. Sekino Y, Obata K, Tanifuji M, Mizuno M, Murayama J (1997) Delayed signal propagation via CA2 in rat hippocampal slices revealed by optical recording. *J Neurophysiol* 78(2):1662–1668.
51. Corkin S, Sullivan EV, Carr FA (1984) Prognostic factors for life expectancy after penetrating head injury. *Arch Neurol* 41(9):975–977.
52. Weigelt S, Koldewyn K, Kanwisher N (2013) Face recognition deficits in autism spectrum disorders are both domain specific and process specific. *PLoS One* 8(9):e74541.
53. Abell F, et al. (1999) The neuroanatomy of autism: A voxel-based whole brain analysis of structural scans. *Neuroreport* 10(8):1647–1651.
54. Aylward EH, et al. (1999) MRI volumes of amygdala and hippocampus in non-mentally retarded autistic adolescents and adults. *Neurology* 53(9):2145–2150.
55. Baron-Cohen S, et al. (1999) Social intelligence in the normal and autistic brain: an fMRI study. *Eur J Neurosci* 11(6):1891–1898.
56. Kemper TL, Bauman ML (1993) The contribution of neuropathologic studies to the understanding of autism. *Neurolog Clin* 11(1):175–187.
57. Morgan JT, Berger N, Amaral DG, Schumann CM (2014) Stereological study of amygdala glial populations in adolescents and adults with autism spectrum disorder. *PLoS One* 9(10):e110356.
58. Radeloff D, et al. (2014) Structural alterations of the social brain: A comparison between schizophrenia and autism. *PLoS One* 9(9):e106539.
59. Schulkin J (2007) Autism and the amygdala: An endocrine hypothesis. *Brain Cogn* 65(1):87–99.
60. Bluthé RM, Gheusi G, Dantzer R (1998) Gonadal steroids influence the involvement of arginine vasopressin in social recognition in mice. *Psychoneuroendocrinology* 18(4):323–335.
61. Maaswinkel H, Baars AM, Gispen WH, Spruijt BM (1996) Roles of the basolateral amygdala and hippocampus in social recognition in rats. *Physiol Behav* 60(1):55–63.
62. Gonzalez LE, Andrews N, File SE (1996) 5-HT1A and benzodiazepine receptors in the basolateral amygdala modulate anxiety in the social interaction test, but not in the elevated plus-maze. *Brain Res* 732(1–2):145–153.
63. Bychowski ME, Mena JD, Auger CJ (2013) Vasopressin infusion into the lateral septum of adult male rats rescues progesterone-induced impairment in social recognition. *Neuroscience* 246:52–58.
64. Everts HG, Koolhaas JM (1997) Lateral septal vasopressin in rats: Role in social and object recognition? *Brain Res* 760(1–2):1–7.
65. Popik P, van Ree JM (1998) Neurohypophysial peptides and social recognition in rats. *Prog Brain Res* 119:415–436.
66. Popik P, Vetulani J, van Ree JM (1992) Low doses of oxytocin facilitate social recognition in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 106(1):71–74.
67. van Wimersma Greidanus TB, Mairget C (1996) The role of limbic vasopressin and oxytocin in social recognition. *Brain Res* 713(1–2):153–159.
68. Lim MM, Bielsky IF, Young LJ (2005) Neuropeptides and the social brain: Potential rodent models of autism. *Int J Dev Neurosci* 23(2–3):235–243.
69. Dellovade TL, Zhu YS, Pfaff DW (1999) Thyroid hormones and estrogen affect oxytocin gene expression in hypothalamic neurons. *J Neuroendocrinol* 11(1):1–10.
70. Engelmann M, Ebner K, Wotjak CT, Landgraf R (1998) Endogenous oxytocin is involved in short-term olfactory memory in female rats. *Behav Brain Res* 90(1):89–94.
71. Insel TR, Young LJ (2001) The neurobiology of attachment. *Nat Rev Neurosci* 2(2):129–136.
72. Paxinos G, Watson C (1986) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* (Academic, San Diego).
73. Qi X-L, Zhu B, Zhang X-H, Li B-M (2008) Are beta-adrenergic receptors in the hippocampal CA1 region required for retrieval of contextual fear memory? *Biochem Biophys Res Commun* 368(2):186–191.
74. Zhang HT, Frith SA, Wilkins J, O'Donnell JM (2001) Comparison of the effects of isoproterenol administered into the hippocampus, frontal cortex, or amygdala on behavior of rats maintained by differential reinforcement of low response rate. *Psychopharmacology (Berl)* 159(1):89–97.
75. Mello-Carpes PB, Izquierdo I (2013) The Nucleus of the Solitary Tract → Nucleus Paragigantocellularis → Locus Coeruleus → CA1 region of dorsal hippocampus pathway is important for consolidation of object recognition memory. *Neurobiol Learn Mem* 100:56–63.
76. Furini CRG, et al. (2015) The relationship between protein synthesis and protein degradation in object recognition memory. *Behav Brain Res* 294:17–24.

## 2.4. Conclusões

Os resultados obtidos neste trabalho permitem afirmar que ambas as estruturas cerebrais, região CA1 do hipocampo dorsal e amígdala basolateral, participam da consolidação da memória de reconhecimento social, sendo moduladas pelos sistemas noradrenérgico, dopaminérgico e histaminérgico, através dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos, D1/D5 dopaminérgicos e H<sub>2</sub> histaminérgicos.

O sistema noradrenérgico atua sobre a consolidação da MRS através da ativação de receptores  $\beta$ -adrenérgicos na BLA, contudo a ativação destes receptores em CA1 prejudica a consolidação da memória. Diferentemente, o sistema dopaminérgico participa da estabilização da MRS através da ativação dos receptores D1/D5 em CA1, mas não na BLA. Por outro lado, a consolidação da MRS é modulada pela ativação dos receptores H<sub>2</sub> histaminérgicos em ambas as estruturas.

Desta forma, é possível concluir que a consolidação da MRS decorre de uma complexa modulação da circuitaria cerebral, que transpõe o mecanismo dependente de ocitocina, vasopressina e hormônios sexuais, já conhecido.

*CAPÍTULO III:*  
*METILFENIDATO INDUZ*  
*DEPENDÊNCIA DE ESTADO NA*  
*MEMÓRIA DE RECONHECIMENTO*  
*SOCIAL*

### 3. Introdução

O transtorno neuropsiquiátrico conhecido como Transtorno do Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH) apresenta hiperatividade, impulsividade e dificuldades em manter relacionamentos sociais, além do déficit cognitivo (DICKSTEIN et al., 2006; GALVAN et al., 2006; SEMRUD-CLIKEMAN et al., 2010; TRIPP; WICKENS, 2009). O tratamento desta patologia consiste em uma abordagem multimodal que combina opções farmacológicas e não-farmacológicas. Apesar da existência das opções não-farmacológicas, como a terapia cognitivo comportamental, o *neurofeedback* e as intervenções alimentares, as medicações estimulantes ainda são a principal conduta terapêutica para o TDAH (VAN DER SCHANS et al., 2017). A droga de primeira escolha no tratamento farmacológico do TDAH é o metilfenidato (MPH), princípio ativo dos medicamentos comercializados no Brasil sob os nomes comerciais Ritalina® e Concerta® (LANGE et al., 2010; VAN DER SCHANS et al., 2017). O mecanismo completo pelo qual o MPH exerce seus efeitos cognitivos e comportamentais permanece desconhecido. Estudos indicam que o MPH se liga aos transportadores de dopamina (DAT) e aos transportadores de noradrenalina (NET), na membrana celular do terminal pré-sináptico, bloqueando a recaptação destas monoaminas, e resultando no aumento dos seus níveis no meio extracelular (BUSARDÒ et al., 2016; KUCZENSKI; SEGAL, 2002; MOTAGHINEJAD et al., 2015).

O MPH é semelhante estrutural, funcional e farmacologicamente à metanfetamina, o que o torna em uma substância com alto potencial de abuso e dependência, apesar de ser menos potente e ter uma duração mais longa quando comparado a esta droga (MOTAGHINEJAD; MOTEVALIAN; SHABAB, 2016a; TAGAYA, 2010). Considerando o risco de abuso e dependência, a prescrição deste fármaco é autorizada apenas para tratar pessoas com transtornos ou doenças, sob controle especial (BARROS; ORTEGA, 2011). Contudo, o aumento dramático da utilização do MPH nas últimas duas décadas resultou no crescente emprego *off-label* do estimulante, ou seja para usos não médicos, como: o recreativo, a fim de aumentar o tempo de vigília e disposição; o estético, para facilitar o emagrecimento; e o aprimoramento cognitivo, com o intuito de melhorar o desempenho cognitivo profissional e acadêmico (ALBERTSON et al., 2016; BARROS; ORTEGA, 2011; VOLKOW, 2005).

O aprimoramento cognitivo – neuroaprimoramento, *doping* acadêmico ou cerebral, como também é chamado – é acarretado pelo aumento na capacidade de concentração, atenção e estado de alerta, proporcionado pelo fármaco (BEYER; STAUNTON; MOODLEY, 2014; DILLER, 1996). O emprego deste método é cada vez mais crescente no ambiente acadêmico, empresarial e militar (WHETSTINE, 2015). O neuroaprimoramento é mais prevalente nos Estados Unidos do que na Europa, contudo, em ambas as regiões, o MPH é o fármaco mais utilizado (MAIER et al., 2015).

O uso de agentes farmacológicos a fim de impulsionar os processos cognitivos, tem sido um dos tópicos mais discutidos e polêmicos na neurociência, filosofia e mídia. Existem visões antagônicas sobre o uso das chamadas “*smart drugs*” por indivíduos neurotípicos (MOHAMED, 2014). Alguns estudiosos são defensores firmes do aprimoramento cognitivo farmacológico, enquanto outros se opõem completamente a ele (BELL; LUCKE; HALL, 2012; FORLINI; RACINE, 2009; GREELY et al., 2008). Diversas questões éticas surgem a partir desta prática. Este aprimoramento resulta apenas em melhores notas e melhor performance no trabalho, ou significa também melhora no bem-estar dos indivíduos? É vantajoso submeter indivíduos livres de desordens clínicas aos efeitos colaterais associados a esses medicamentos, incluindo o risco de adição, a fim de obter melhor desempenho intelectual? Pode esta prática causar algum tipo de injustiça na sociedade, como resultado da desigualdade de acesso a essas drogas? Seria o neuroaprimoramento uma forma de trapaça? Poderiam estas drogas serem empregadas de forma coercitiva no ambiente escolar e profissional? Estas e muitas outras perguntas devem ser debatidas a fundo, a fim de avaliar a questão ética do aprimoramento cognitivo farmacológico (MEULEN; MOHAMED; HALL, 2017; MOHAMED, 2014; WHETSTINE, 2015).

Além disso, deve-se levar em consideração que estudos com psicoestimulantes têm resultados mistos sobre a cognição, e todas as melhorias parecem ser modestas e de curto prazo na população normal. Elliot e colaboradores observaram que o MPH melhorou a performance em tarefas de memória de trabalho e de planejamento, porém não teve efeito sobre o nível de atenção (ELLIOTT et al., 1997). Posteriormente, Mehta et al. verificaram que a melhora na memória de trabalho era acompanhada de alterações no fluxo sanguíneo cerebral no córtex pré-frontal dorsolateral e no córtex parietal posterior (MEHTA et al., 2000). Os efeitos do MPH sobre as memórias incidentalmente e formalmente adquiridas foram avaliados por Izquierdo e colaboradores (IZQUIERDO et al., 2008). Neste estudo, o MPH tornou ambos os tipos

de memórias mais persistentes e reverteu o declínio da persistência da memória incidental relacionada com a idade. Ademais, um estudo de meta-análise apontou uma melhora na memória produzida pelo MPH, mas sem evidências consistentes sobre outros domínios da cognição (REPANTIS et al., 2010). Por outro lado, outros estudos não constataram benefícios do uso do MPH em indivíduos saudáveis, especialmente no que concerne à memória (BATISTELA et al., 2016; CLATWORTHY et al., 2009; STUDER et al., 2010; TOMASI et al., 2011). É importante ressaltar que uma série de fatores fazem com que os possíveis benefícios cognitivos dos estimulantes sobre essa população sejam difíceis de serem acessados, por exemplo, a heterogeneidade da população sem TDAH, as diferentes tarefas cognitivas utilizadas e a falta de replicação dos estudos.

Embora as pesquisas em humanos sem qualquer diagnóstico clínico sejam limitadas, a pesquisa em animais saudáveis é mais abundante. Isto se deve em grande parte à falta de um modelo animal ideal de TDAH, o que resultou na tendência de usar ratos saudáveis em estudos com MPH. No entanto, as descobertas nestes animais também são inconsistentes. Foram relatados efeitos positivos do MPH sobre a memória espacial no labirinto radial (ZHU; WEEDON; DOW-EDWARDS, 2007), retenção e extinção da memória de medo condicionado ao contexto (BETHANCOURT; CAMARENA; BRITTON, 2009; FURINI et al., 2017), e mecanismos de potencialização e depressão de longa duração (DOMMETT et al., 2008). Contudo não foram relatados efeitos sobre tarefas complexas de discriminação de estímulo (GALIZIO et al., 2009), ou sobre o desempenho no labirinto aquático (MCFADYEN; BROWN; CARREY, 2002). Além disso, Chuhan e Taukulis observaram comprometimento da memória de reconhecimento de objetos (CHUHAN; TAUKULIS, 2006). Rostron também observou efeitos prejudiciais do MPH sobre a memória espacial, porém quando o fármaco estava presente tanto na sessão de treino quanto de teste não foi verificado prejuízo, sugerindo um efeito de dependência de estado (ROSTRON et al., 2013). Além das alterações comportamentais, o MPH pode causar alterações celulares e teciduais. Estudos em ratos demonstraram que as administrações aguda e crônica de MPH podem induzir estresse oxidativo e neurodegeneração em regiões cerebrais como o hipocampo, amígdala e córtex (MARTINS et al., 2006; MOTAGHINEJAD et al., 2017; RÉUS et al., 2014). Considerando os resultados controversos apresentados, tanto em animais quanto em



humanos, pesquisas robustas precisam ser conduzidas e replicadas a fim de delinear os benefícios e danos do uso do MPH em indivíduos saudáveis.

Como mencionado anteriormente, o MPH afeta os níveis de DA e NA. Dada a inervação difusa das fibras de monoaminas, os efeitos sobre o cérebro provavelmente são generalizados (ROSTRON et al., 2013). No entanto, o córtex pré-frontal e o hipocampo foram o foco de estudos usando o MPH em doses relevantes para o ser humano. Estes estudos revelaram que o MPH administrado de forma aguda aumentou a DA no PFC (BERRIDGE et al., 2006) e a NA no hipocampo (KUCZENSKI; SEGAL, 2002). Em ambos os casos, o aumento do neurotransmissor foi detectado após 20 minutos e persistiu por pelo menos mais 20 minutos. Dada essa informação, parece provável que tarefas cognitivas que dependem dessas regiões cerebrais e que possam ser conduzidas durante o aumento da neurotransmissão pelo MPH, sejam sensíveis ao fármaco.

A memória de reconhecimento social é um componente básico do comportamento social e é utilizada para discriminar sujeitos familiares e novos (TANIMIZU et al., 2017). O processamento da informação social requer uma complexa circuitaria (CAMATS PERNA; ENGELMANN, 2015; WACKER et al., 2011). Estudos prévios mostraram a importância de regiões cerebrais como o PFC e o hipocampo (GARRIDO ZINN et al., 2016; KOGAN; FRANKLAND; SILVA, 2000; OKUYAMA et al., 2016; RADELOFF et al., 2014). Um estudo recente demonstrou ainda que a MRS é consolidada através da expressão gênica mediada por CREB no hipocampo, córtex pré-frontal medial, córtex cingulado anterior e amígdala (TANIMIZU et al., 2017). O mesmo autor evidenciou, através de análises computacionais, que essas estruturas formam uma rede cerebral que apresenta conectividade funcional com outras regiões, sendo que o hipocampo funciona como um centro para integrar as redes cerebrais e gerar a MRS, enquanto que o córtex cingulado anterior e a amígdala são importantes para coordenar a atividade cerebral quando a interação social é iniciada, através da conexão com outras regiões cerebrais.

Considerando a problemática do uso *off-label* do MPH, o aumento de DA e NA no hipocampo e CPF causado pelo uso da droga, a necessidade destas estruturas na consolidação da MRS e a inexistência de dados sobre os efeitos dessa droga sobre a MRS, este trabalho tem como objetivo preencher essa lacuna do conhecimento. Para isso verificaremos o efeito sistêmico e localizado do MPH sobre a MRS, com tratamento agudo e crônico, em ratos saudáveis.

### **3.1. Objetivos**

#### **3.1.1. Objetivo geral**

Avaliar o efeito dos tratamentos agudo e crônico com metilfenidato sobre a memória de reconhecimento social.

#### **3.1.2. Objetivos específicos**

1. Investigar o efeito do tratamento agudo sistêmico com MPH sobre a memória de reconhecimento social.
2. Verificar se a administração aguda sistêmica de metilfenidato causa dependência de estado da memória de reconhecimento social.
3. Verificar o efeito da infusão intra-CA1 ou intra-CPF do MPH sobre a memória de reconhecimento social.
4. Investigar se o efeito do MPH sobre a MRS se deve à inibição da recaptção de dopamina e/ou noradrenalina no hipocampo e/ou no córtex pré-frontal.
5. Investigar o efeito do tratamento crônico com MPH sobre a MRS.

## **3.2. Metodologia**

### **3.2.1. Animais Experimentais**

Foram utilizados ratos *Wistar (Cr/Cembe:WI)* machos juvenis, de 22 a 30 dias de idade, e adultos, de 3 meses de idade (aproximadamente 330g), mantidos em caixas moradia em número de 2 e 4 por caixa, respectivamente. Os animais foram adquiridos do Centro de Modelos Biológicos Experimentais (CEMBE) da PUCRS e mantidos no biotério do Centro de Memória, localizado no Prédio 64 da PUCRS, sob ciclo claro/escuro de 12 horas, com água e comida a vontade e temperatura ambiente constante de 23°C. Os experimentos foram conduzidos durante o período claro do ciclo. Todos os procedimentos foram realizados somente após a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS, sob o registro CEUA 14/00429, e estiveram de acordo com as normas do Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica do CONCEA.

### **3.2.2. Cirurgia Estereotáxica**

Para os experimentos relativos aos objetivos 3 e 4, os animais adultos foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação bilateral de cânulas-guia na região CA1 do hipocampo dorsal (CA1; anterior, -4.2 mm; lateral,  $\pm 3.0$  mm; ventral, -1.8 mm) ou no córtex pré-frontal medial (CPF; anterior +3.2, lateral  $\pm 0,8$ , ventral -3.0 mm), seguindo as coordenadas do atlas de Paxinos e Watson (PAXINOS; WATSON, 1986). Todo o procedimento foi realizado com os animais previamente anestesiados com cetamina, juntamente com xilazina, um sedativo/miorrelaxante/analgésico, ambos administrados intraperitonealmente (i.p.), nas doses de 75 mg/Kg e 10 mg/Kg respectivamente. Como analgésico pós-cirúrgico os animais receberam nas primeiras 24 horas o anti-inflamatório Meloxicam, de 8 em 8 horas.

### **3.2.3. Manipulação**

Nos três dias anteriores aos experimentos, e pelo menos 5 dias após a cirurgia

estereotáxica, os animais adultos foram submetidos a sessões diárias de manipulação. Os juvenis foram manipulados durante dois dias previamente aos experimentos comportamentais. Durante cada sessão os animais eram levados do biotério até a sala de manipulação, retirados da caixa-moradia e manuseados durante 2 minutos. Após 24 horas da última sessão de manipulação os animais foram submetidos aos paradigmas comportamentais.

#### **3.2.4. Paradigma de Discriminação Social**

O paradigma de discriminação social foi realizado em uma caixa retangular de campo aberto medindo 60 x 40 x 50 cm, colocada em uma sala com iluminação fraca e indireta. Duas gaiolas cilíndricas idênticas, feitas em acrílico transparente, medindo 9 cm de diâmetro e 13 cm de altura, foram colocadas na caixa próximas aos cantos. As gaiolas possuíam pequenos orifícios de 1 cm de diâmetro, espaçados a cada 1 cm em sua parede, permitindo a passagem de odores (pistas olfativas), porém prevenindo a interação direta entre o animal adulto e o juvenil. Um copo de Béquer repleto de água (500 mL) foi colocado em cima de cada gaiola para prevenir que os animais adultos movessem ou subissem na gaiola. O campo, as gaiolas e os béqueres eram limpos com uma solução de álcool 70% entre a passagem de cada animal para garantir a ausência de pistas olfativas.

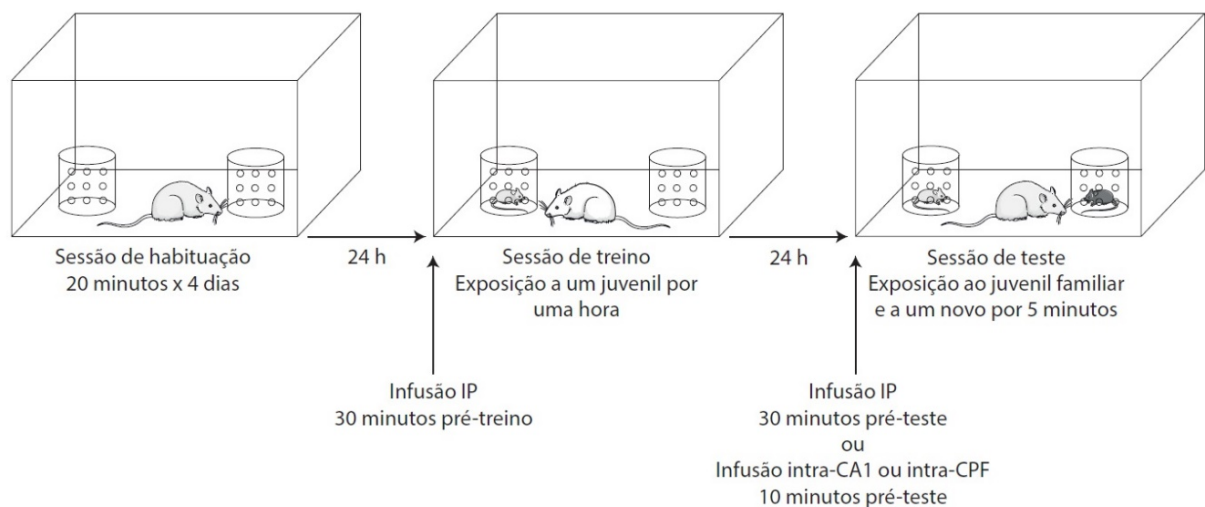
Os animais adultos passaram por um processo de habituação ao dispositivo experimental, com duração de 4 dias e que consistiu em uma sessão comportamental diária de 20 minutos, na qual os animais foram colocados individualmente no campo aberto contendo as duas gaiolas, sem nenhum juvenil, para que o explorassem livremente. Vinte e quatro horas antes da sessão de treino, sem a presença dos animais adultos, os juvenis foram colocados dentro das gaiolas, e permaneceram lá por um período de 20 minutos, para se habituarem a situação de estar em um espaço restrito, que é o cilindro de acrílico.

Vinte e quatro horas após a última sessão de habituação ao aparato experimental, durante a sessão de treino (primeiro encontro), o animal adulto era colocado no centro do campo e exposto por uma hora a um juvenil dentro de uma gaiola e a uma gaiola vazia (aleatoriamente selecionados e contrabalanceados para cada grupo). A fim de avaliar a memória de longa duração, a sessão de teste (segundo encontro) ocorria 24h após a sessão de treino, e consistia na reexposição do animal

adulto por 5 minutos ao mesmo juvenil (familiar) apresentado no dia anterior, durante a sessão de treino, e a um juvenil desconhecido (novo), selecionado de acordo com diferentes combinações previamente determinadas (Figura 12). Durante a sessão de teste foi quantificado o tempo que o animal adulto passava explorando cada um dos juvenis. O comportamento social exploratório foi definido como cheirar os juvenis com o focinho através dos orifícios do cilindro e cheirar a parede das gaiolas. Permanecer ao redor dele não foi considerado como comportamento exploratório. O tempo gasto explorando cada juvenil foi medido por um avaliador, com o auxílio de um cronômetro, e expresso como porcentagem do tempo total de exploração.

Em ambos os encontros, os juvenis foram mantidos nas gaiolas a fim de evitar agressão do adulto para com eles, e também para garantir que o adulto iniciasse a exploração. Os dois juvenis (familiar e novo) eram provenientes de diferentes caixas-moradia, assim seus odores eram diferentes para o animal adulto.

**Figura 12. Representação esquemática do protocolo experimental da tarefa de discriminação social e das intervenções farmacológicas**



(Fonte: Autor)

Verificou-se em experimentos prévios (dados não publicados) que a MRS dura pelo menos 7 dias após o treino de 1 hora. Por outro lado, o treino com exposição do juvenil por apenas 5 minutos forma uma memória mais fraca. Considerando este dado, uma variação da tarefa, com o treino de 5 minutos, foi utilizada a fim de avaliar a persistência da MRS, no tratamento crônico.

### 3.2.5. Caracterização Farmacológica do Metilfenidato

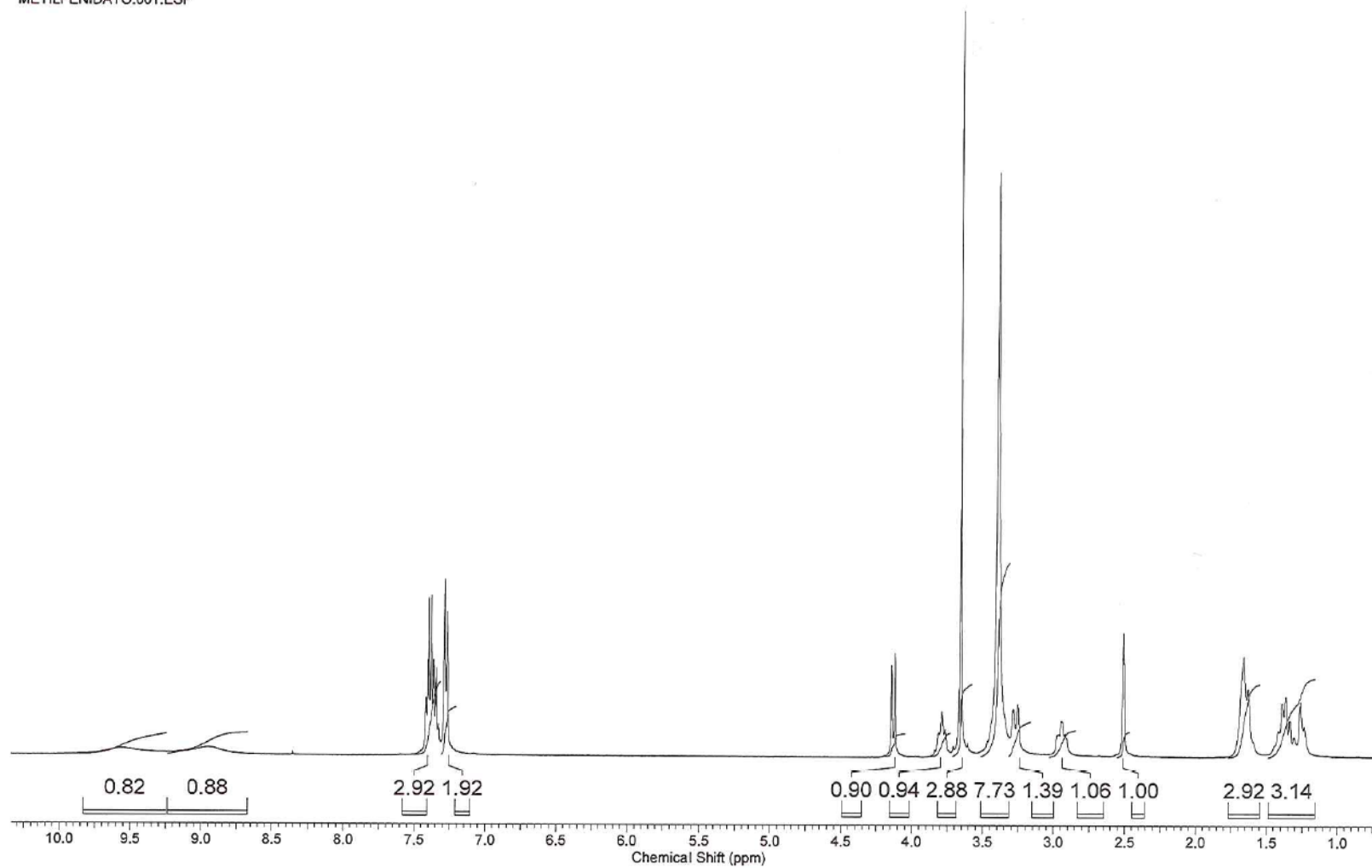
O fármaco utilizado neste estudo foi o cloridrato de metilfenidato (Ritalina, Novartis), um inibidor dos transportadores de recaptção de dopamina e noradrenalina, que acarreta um aumento da concentração extracelular destes neurotransmissores. A partir das drágeas, o princípio ativo, metilfenidato, foi extraído e analisado previamente a cada experimento, pela Prof. Dra. Mara Lise Zanini, no Laboratório de Química LASINE da PUCRS, de acordo o procedimento descrito por (BÖCKELMANN, 2004) e descrito abaixo.

Éter dietílico e clorofórmio foram adquiridos da Merck e utilizados sem purificação prévia. Foram amassados 20 comprimidos da droga contendo metilfenidato ( $m = 2,7824\text{g}$ ), transferidos para um tubo Falcon de 50 mL e adicionados 35 mL de  $\text{CHCl}_3$ . A mistura foi agitada no Vortex durante 10 minutos e centrifugada durante 15 minutos a 3600 rpm. Após a centrifugação, o  $\text{CHCl}_3$  foi removido com uma pipeta Pasteur para um balão de 250 mL. O procedimento foi repetido e as fases do clorofórmio foram unidas e secas no evaporador rotatório. Foram adicionados ao balão 10 mL de éter dietílico e filtrado o sólido por meio de funil de Büchner. Os cristais foram lavados com 2 mL adicionais de éter dietílico e deixados secar em dessecador. O material extraído é sólido branco, solúvel em água e 9% de soro fisiológico. O rendimento é de 5% da massa inicial.

A fim de determinar a estrutura química do produto obtido após a extração, foram realizadas as técnicas de espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio, ( $^1\text{H}$ -RMN) e a espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier, (FTIR). Na técnica de espectroscopia de RMN de Hidrogênio (Figura 13), o metilfenidato, sólido branco, foi dissolvido em DMSO- $\text{D}_6$ , dimetilssulfóxido deuterado, colocado em tubo de RMN e colocado em equipamento de RMN de 300MHz, na Central Analítica do Instituto de Química da UFRGS. Na espectroscopia de infravermelho (Figura 14), o espectro do metilfenidato foi obtido através da técnica de UATR, em espectrofotômetro Perkin-Elmer, onde foi adicionado puro, após secagem em estufa. O espectrofotômetro de Infravermelho está localizado na Faculdade de Química da PUCRS. Em ambos os espectros, os picos se referem aos grupos químicos existentes na molécula e foram comparados aos espectros de referência das Figuras 15 e 16 (BÖCKELMANN, 2004).

Figura 13. Espectro de RMN de Hidrogênio do produto obtido após a extração de metilfenidato das drágeas de Ritalina

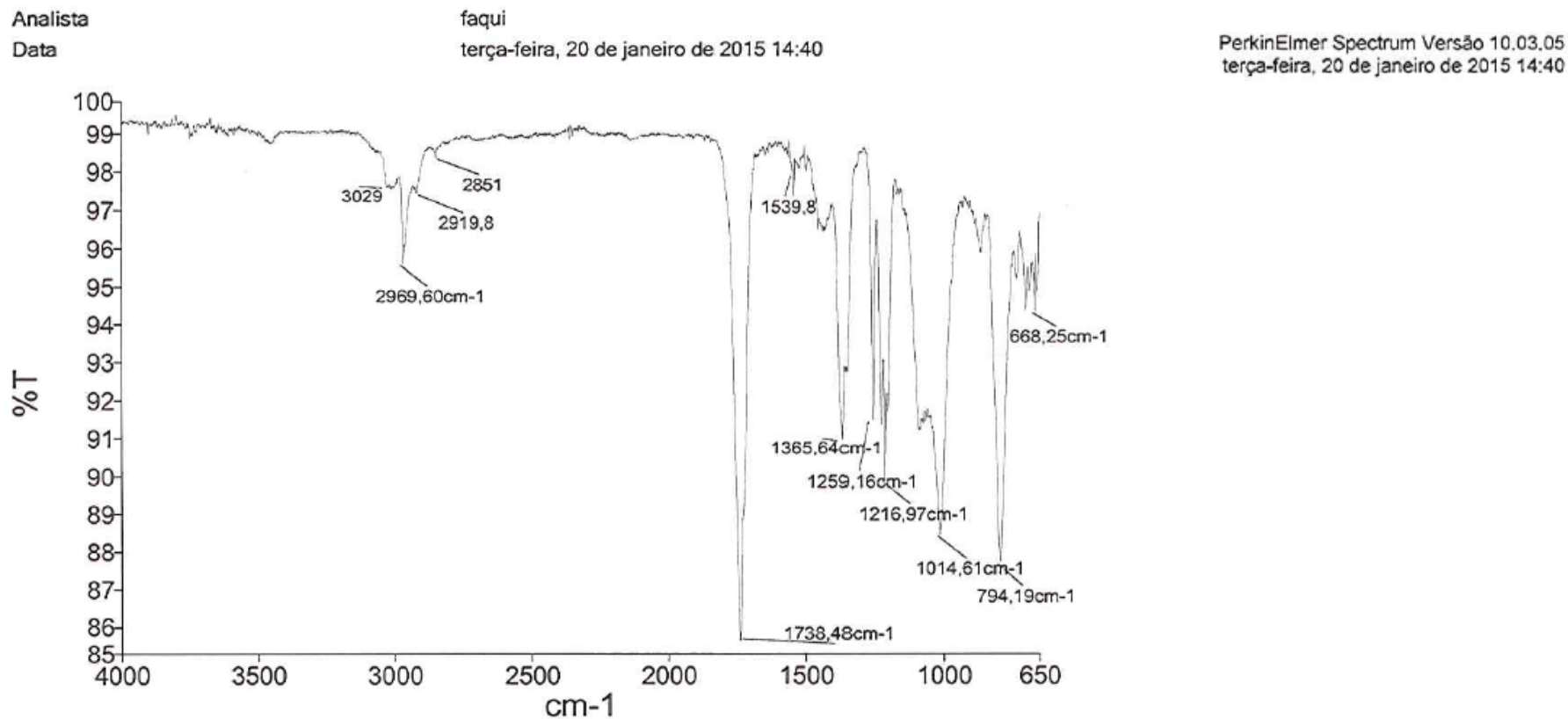
This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to [www.acdlabs.com/nmrproc/](http://www.acdlabs.com/nmrproc/)  
METILFENIDATO.001.ESP



D:\USERS\COELHO\DESKTOP\METILFENIDATO.001.ESP

Fonte: Autor, 2015.

Figura 14. Espectro de infravermelho do produto obtido após a extração de metilfenidato das drágeas de Ritalina



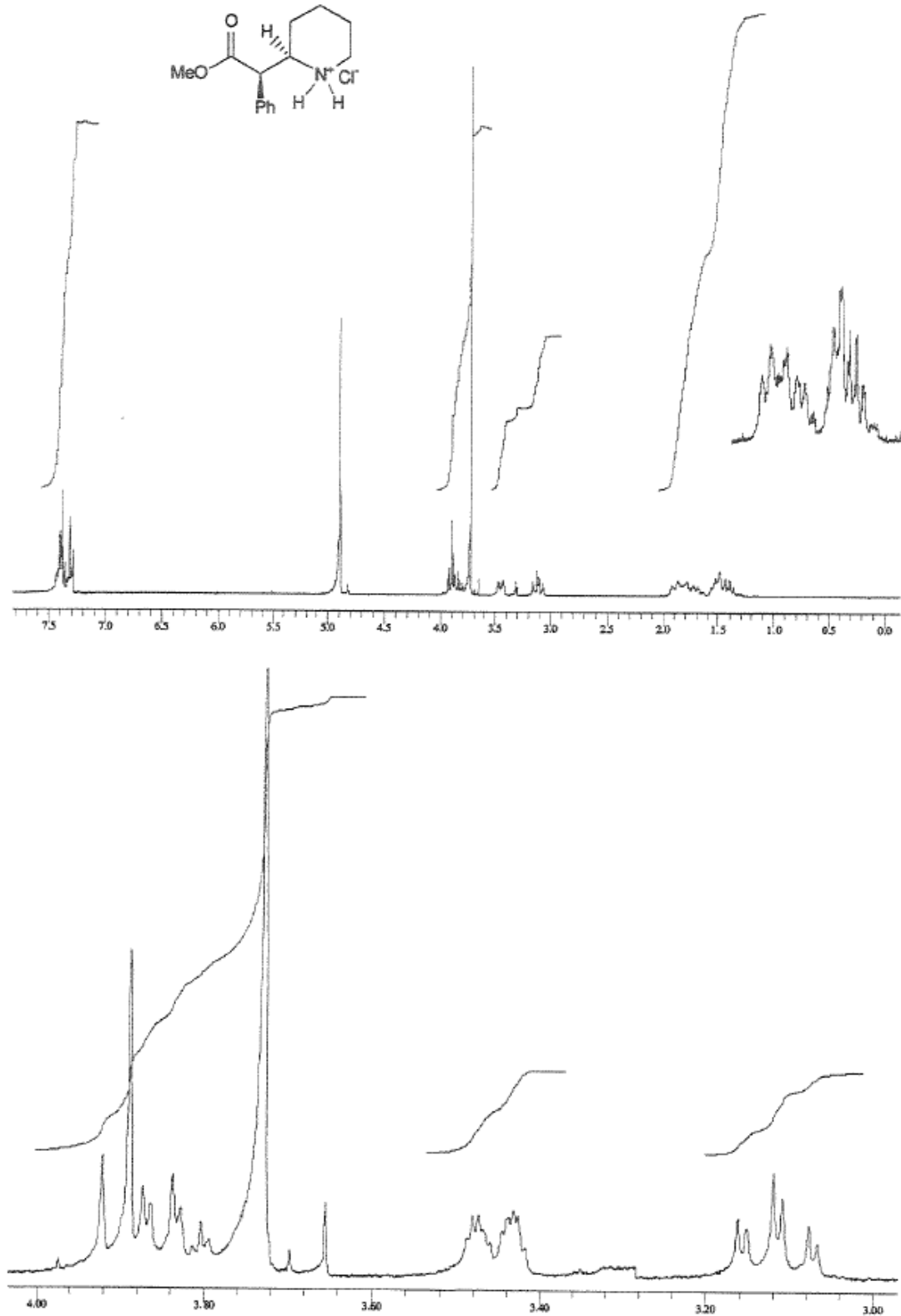
Nome da amostra	Descrição
MePhenidato	Amostra 003 por faqui data terça-feira, janeiro 20 2015

Fonte: Autor, 2015



Figura 15. Espectro de RMN de hidrogênio utilizado como referência para a extração do metilfenidato

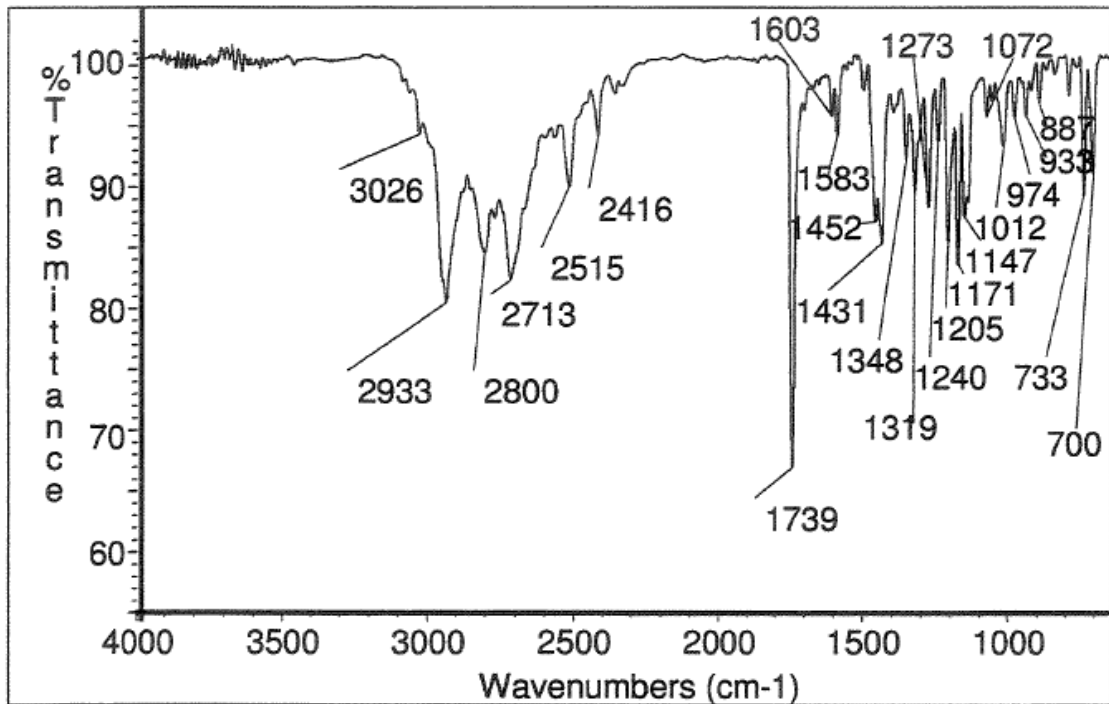
Espectro de RMN-<sup>1</sup>H do composto **207** (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD):



Fonte: Böckelmann, 2004.

Figura 16. Espectro de infravermelho utilizado como referência para a extração do metilfenidato

Infravermelho do composto **207** (filme,  $\text{cm}^{-1}$ ):



Fonte: Böckelmann, 2004.

### 3.2.6. Intervenção Farmacológica

Após a confirmação da estrutura química do produto obtido, o MPH, bem como o seu veículo de dissolução (solução salina 0,9%), foram administrados via intraperitoneal (i.p.) na dose de 2 mg/kg (BRITTON, 2012; GOMES et al., 2009; SCHERER et al., 2010) ou diretamente na região CA1 do hipocampo ou no córtex pré-frontal medial na dose de 12.5  $\mu\text{g}/\text{lado}$  (TYE et al., 2010a) de acordo com o objetivo em estudo. As administrações ocorreram em diferentes momentos: quando da administração sistêmica, esta era realizada sempre 30 minutos antes da sessão de treino ou de teste, tempo este necessário para garantir que o MPH atinja o sistema nervoso central e altere as concentrações de dopamina e noradrenalina (ROWLEY et al., 2014); as administrações intracerebrais ocorreram sempre 10 minutos antes da sessão de teste. Foram realizadas também infusões intracerebrais, 10 minutos antes

das sessões de teste, de Nisoxetina (10 µg/lado; (TYE et al., 2010b), um inibidor seletivo dos transportadores de noradrenalina, e GBR12909 (7,85 µg/lado; (TYE et al., 2010b), um inibidor seletivo dos transportadores de dopamina, ambos adquiridos da Tocris.

Para a administração i.p. dos compostos farmacológicos foi utilizada uma seringa hipodérmica com agulha estéril de 1 ml (27,5G x ½”) da marca BD Biosciences. Para realizar o procedimento, o animal foi cuidadosamente imobilizado com uma compressa estéril e a agulha foi introduzida no quadrante inferior esquerdo do abdômen do animal, fazendo um ângulo de 20-45° com a parede abdominal. Antes de dispensar o fármaco foi aspirado o conteúdo para verificar se a agulha não atingiu bexiga, intestinos ou algum vaso, estando a agulha em local certo, foi executada a injeção do fármaco. Para a infusão farmacológica intracerebral uma guia de 30 G foi acoplada a um tubo de polietileno (0,15” x 0,43” x 10’) e este sistema foi acoplado a uma microseringa adquirida da empresa Hamilton Company, Estados Unidos, modelo 95 RN SYR, ideal para dispensar volumes de 0,5 µL até 5 µL. No momento da infusão o animal foi cuidadosamente imobilizado com uma compressa estéril e a guia de 30 G foi introduzida na cânula guia de 22 G implantada na calota craniana dos animais anteriormente mediante cirurgia estereotáxica, e então dispensado o fármaco ou salina, ambos administrados obedecendo a uma média de velocidade de infusão de 1µL/60 s. Após o término da infusão intracerebral a guia de infusão foi mantida por mais 60 s dentro da cânula guia para evitar o refluxo de líquido, e após, cuidadosamente retirada, colocada na outra cânula e o processo foi repetido. O volume de infusão utilizado para a região CA1 do hipocampo dorsal e para o CPFvm foi de 1 µL por lado.

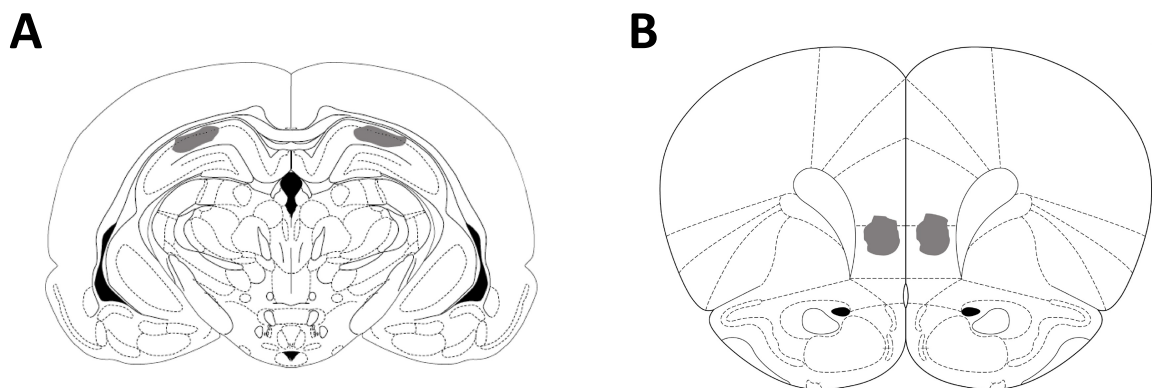
O tratamento agudo consistiu na administração de uma ou duas doses do MPH ou do seu veículo, enquanto que o tratamento crônico consistiu na administração de MPH ou seu veículo por 21 até 28 dias consecutivos, incluindo os dias de habituação e sessões de treino e de teste, nos quais a administração ocorreu sempre 30 minutos antes de cada sessão.

Com o intuito de avaliar se o MPH possuía algum efeito residual sobre a MRS, realizou-se um período de *wash out*, que consiste no período necessário para que a concentração da droga seja negligenciável, depois de suspenso o tratamento.

### 3.2.7. Análise histológica

Após o término dos experimentos comportamentais os animais previamente operados foram avaliados histologicamente quanto à colocação de suas cânulas e as regiões cerebrais atingidas pela infusão, visando assim garantir que apenas os dados comportamentais de animais que efetivamente receberam a administração correta das drogas fossem incluídos na análise estatística final. Para isso, após os procedimentos comportamentais os animais foram submetidos à infusão bilateral de uma solução de azul de metileno a 4% através das cânulas guia; quinze minutos depois foram eutanasiados com uma overdose do anestésico tiopental sódico (100 mg/kg) e então decapitados. Seus cérebros foram removidos e colocados em uma solução de formol 4% por um período de quatro dias, quando então foi realizada a análise histológica, considerando somente os animais com a localização das cânulas dentro de 2 mm<sup>2</sup> dos locais desejados (Figura 17).

Figura 17. Desenho esquemático dos locais de microinfusão



Desenho esquemático do cérebro de rato mostrando o local de implantação das cânulas de infusão na região CA1 do hipocampo dorsal (à esquerda) e no córtex pré-frontal medial (à direita). (Fonte: Adaptado de Fiorenza et al., 2012)

### 3.2.8. Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o *software* Prism Graph-Pad 5.1. Os dados obtidos na tarefa de discriminação social foram convertidos em porcentagem do tempo total de exploração, e expressos como média  $\pm$  erro padrão. Para a análise estatística dos dados foi utilizado o teste *t* de *Student*, considerando a média teórica de 50%, a fim de comparar a diferença entre os tempos de exploração entre o juvenil

familiar e o novo em um mesmo grupo, e a ANOVA de uma seguida do Teste de Comparação Múltipla de Bonferroni foi utilizada para verificar diferenças entre os grupos. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

### **3.3. Resultados**

Esta sessão é dividida em duas partes: a primeira apresenta os resultados obtidos a partir do tratamento agudo com MPH, na forma de artigo científico, submetido ao periódico *Neurobiology of Learning and Memory*, sob o número NLM-17-185 (APÊNDICE A); a segunda parte corresponde aos resultados obtidos a partir do tratamento crônico com MPH, que irão gerar outro artigo científico.

### 3.3.1. Parte I: Tratamento agudo com metilfenidato – Artigo original

#### **METHYLPHENIDATE INDUCES STATE-DEPENDENCY OF SOCIAL RECOGNITION LEARNING: CENTRAL COMPONENTS.**

**Carolina Garrido Zinn<sup>1</sup>, Leticia Bühler<sup>1</sup>, Lorena Evelyn Cavalcante<sup>1</sup>, Scheila Daiane Schmidt<sup>1</sup>, Flávia Fagundes Ferreira<sup>1</sup>, Mara Lise Zanini<sup>3</sup>, Cristiane Regina Guerino Furini<sup>1, 2</sup>, Jociane de Carvalho Myskiw<sup>1, 2\*</sup>, Ivan Izquierdo<sup>1, 2\*</sup>**

<sup>1</sup> Memory Center, Brain Institute of Rio Grande do Sul, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS), Av. Ipiranga, 6690–2nd Floor, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>2</sup> National Institute for Translational Neuroscience (INNT), National Research Council of Brazil, Brazil

<sup>3</sup> College of Chemistry, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS), Av. Ipiranga, 6681, 90619-900. Porto Alegre, RS, Brazil

\*To whom correspondence may be addressed.

E-mail: jociane\_carvalho@hotmail.com; izquier@terra.com.br

Memory Center, Brain Institute of Rio Grande do Sul, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS), Av. Ipiranga, 6690 – 2<sup>nd</sup> floor, phone (+55 51) 3320 3336; 90610-000. Porto Alegre, RS, Brazil.

**Abstract**

Methylphenidate (MPH) is a widely prescribed drug for the treatment of attention-deficit hyperactivity disorder. Findings in the literature suggest that the effects of MPH on memory may result from increased extracellular levels of norepinephrine (NE) and dopamine (DA). Here, we report that the systemic administration of MPH before the acquisition phase in a social discrimination task impaired the retrieval of the social recognition memory (SRM), but made it state-dependent: another administration of MPH before the retention test recovered the SRM. We observed that the induction of state dependency by MPH relies on the ventromedial prefrontal cortex (vmPFC), but not on the CA1 region of the hippocampus (CA1). Also, the inhibitors of NE and DA, nisoxetine and GBR12909, respectively, restored the SRM when infused into the vmPFC. Only the GBR12909 was able to restore the SRM in the CA1, whereas nisoxetine could not restore and even caused an impairment on memory retrieval when infused alone before the retention test. The data suggest that the state-dependence of SRM induced by MPH depends on an influence of both catecholamines on the vmPFC, while NE inhibits the retrieval of SRM on the hippocampus.

**Keywords:** Social recognition memory; Methylphenidate; Hippocampus; Prefrontal cortex; State-dependent learning.



## 1 Introduction

Increases in the brain and peripheral norepinephrine (NE) and dopamine (DA) levels have powerful effects on the learning of a variety of tasks and behaviors, including acquisition and extinction of fear memory (Ivan Izquierdo, Furini, & Myskiw, 2016; Rosa, Myskiw, Furini, Sapiras, & Izquierdo, 2013; Sara, 2009). Locus coeruleus (LC) neurons project to brain memory areas, including: hippocampus, basolateral amygdala and prefrontal cortex (Clayton & Williams, 2000; Mello-Carpes & Izquierdo, 2013; Sara, 2009) where it releases either NE (Rosa et al., 2013; Sara, 2009) or DA (Devoto & Flore, 2006; Takeuchi et al., 2016), or both (Devoto & Flore, 2006). Many conditions, such as stress (Rosa et al., 2013) and pharmacological treatments can alter the balance of these catecholamines (Devoto & Flore, 2006). In the reflex activation of brain catecholamine levels and release, the pathway afferent vagal fibers-Nucleus of the Solitary Tract-Nucleus Paragigantocellularis-Locus Coeruleus-regions involved in early memory processing (CA1 region of the dorsal hippocampus, ventromedial prefrontal cortex [vmPFC]) is of paramount importance (Clayton & Williams, 2000; Mello-Carpes & Izquierdo, 2013).

Among the various drugs that affect the catecholamines levels and release, methylphenidate (MPH) stands out for several reasons. It is the most commonly prescribed drug for treatment of the attention-deficit and hyperactivity disorder (Nyberg, 2014). It is also widely used in relatively low doses as a memory enhancer both in rodents (Tye et al., 2010) and humans (Busardò, Kyriakou, Cipolloni, Zaami, & Frati, 2016; Iván Izquierdo et al., 2008). Its extensive use as a recreational drug by part of the population is linked to its memory facilitatory properties (Nyberg, 2014). MPH actions are believed to result from the increase of extracellular NE and DA levels in the vmPFC (Berridge et al., 2006), hippocampus (Ronald Kuczenski & Segal, 2002), lateral amygdala (Tye et al., 2010) and other brain regions known to be involved in memory formation (Arnsten & Dudley, 2005; Devilbiss & Berridge, 2006; Russell, de Villiers, Sagvolden, Lamm, & Taljaard, 1998). MPH action is attributed to the reuptake inhibition of NE and DA by their transporters, NET and DAT (Busardò et al., 2016; Ronald Kuczenski & Segal, 2002). The central catecholamine increase by MPH systemic administration has been measured using microdialysis: it is importantly augmented in both vmPFC and hippocampus (Berridge et al., 2006; R. Kuczenski & Segal, 1997; Rowley et al., 2014; Weikop, Yoshitake, & Kehr, 2007).

Social information processing requires a complex circuitry (Camats Perna & Engelmann, 2015; Wacker, Engelmann, Tobin, Meddle, & Ludwig, 2011), which includes the activation of prefrontal cortex and hippocampus (Kogan, Frankland, & Silva, 2000; Radeloff et al., 2014; Tanimizu et al., 2017). Social recognition memory (SRM) is crucial for to reproduce and to form social groups (Camats Perna & Engelmann, 2015; Garrido Zinn et al., 2016). SRM is studied by measuring the time spent by rats exploring an unknown versus a known conspecific. It relies on sniffing and thus perceiving olfactory cues that distinguish both subjects, which is regulated by oxytocin in the lateral septum linked with anandamide signaling in the nucleus accumbens and by vasopressin in the olfactory bulb and anterior olfactory nucleus (Camats Perna & Engelmann, 2015; Guzmán et al., 2014; Mesic et al., 2015; Wacker et al., 2011; Wei et al., 2015). It was recently reported that SRM is modulated by  $\beta$ -noradrenergic, D1-dopaminergic and H2-histaminergic receptors in the hippocampus and basolateral amygdala (Garrido Zinn et al., 2016). Thus, SRM involves a complex set of behaviors dependent on the interrelated activity of several brain structures and some neurohumoral variables interacting with one another.

State-dependency occurs when a memory becomes dependent on a substance effect or a behavioral circumstance that causes a state (eg., a mood) during its acquisition and/or consolidation (Dell, 1961; Ivan Izquierdo, 1965; Merlo & Izquierdo, 1965; Overton, 1978; Rosa et al., 2013), and its retrieval is best when the subject is again exposed to that state. NE and DA have been shown to be involved in state-dependent fear memories (Piri, Rostampour, Nasehi, & Zarrindast, 2013; Rosa et al., 2013). Furthermore, a previous report has suggested a facilitator state-dependent learning in children using MPH (Swanson & Kinsbourne, 1976), while other studies antagonize this hypothesis (Aman & Sprague, 1974; Steinhausen & Kreuzer, 1981; Stephens, Pelham, & Skinner, 1984), raising a question: would the effects of improved cognition conferred to MPH be a result of a state dependent learning?

The current study objects to verify the effect of MPH systemic administration, its mechanisms and brain structures involved in SRM acquisition and retrieval.

## **2 Materials and Methods**

### **2.1 Animals**

Adult (3-month-old, 300–330 g) and juvenile (22–30 postnatal days) male Wistar rats (CrlCembe: WI) from the Centro de Modelos Biologicos Experimentais (CeMBE) of the Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS – our regular provider) were used. The animals were housed four to a cage with food and water ad libitum, maintained under a 12/12-h light/dark cycle (lights on at 7:00 a.m.). The behavioral experiments were conducted during the light phase of the cycle. All procedures were approved by the Animal Committee on Ethics for the Care and Use of Laboratory Animals of PUCRS, in compliance with National Institutes of Health guidelines for the care and use of laboratory animals.

### **2.2 Surgery**

Adult animals were implanted bilaterally with stainless steel 22- gauge guide cannulae under deep anesthesia (75 mg/kg ketamine plus 10 mg/kg xylazine, i.p.) through stereotaxic procedures, when necessary. The tips of the cannulae were aimed 1 mm above the CA1 region of the dorsal hippocampus (CA1; anterior, -4.2 mm; lateral,  $\pm$ 3.0 mm; ventral, -1.8 mm; relative to Bregma) or the ventromedial prefrontal cortex (vmPFC; anterior, +3.2, lateral,  $\pm$ 0,8, ventral, -3.0 mm; relative to Bregma) according to Paxinos and Watson (Paxinos, 1986). The guide cannulae were fixed to the skull with dental acrylic cement. All animals were allowed seven days for recovery from surgery before behavioral procedures. They were handled daily for three days before the behavioral experiments.

### **2.3 Pharmacological treatments**

Methylphenidate (MPH), GBR 12909 (GBR) and Nisoxetine (Niso) were purchased from Novartis, Tocris and Sigma–Aldrich, respectively. The doses used were derived from previous data in the literature (Britton, 2012; Gomes et al., 2009; Scherer et al., 2010; Tye et al., 2010). All drugs were dissolved in sterile saline 0.9%, which was administered to the control groups. MPH was administered intraperitoneally (i.p.) at a dose of 2 mg/kg (Britton, 2012; Gomes et al., 2009; Scherer et al., 2010) at a volume of 1 mL/kg of body weight. Control group received an equivalent volume of saline 0.9%

solution. MPH (12.5 µg/side) was also injected directly into CA1 region of hippocampus or vmPFC (Tye et al., 2010). Nisoxetine (10 µg/side), a selective inhibitor of noradrenaline transporter, and GBR12909 (7.85 µg/side), a selective inhibitor of the dopamine transporter, were also infused into the CA1 region or the vmPFC (Tye et al., 2010). Administrations have occurred at different times: systemic injection was always performed 30 minutes before the sample phase and/or before the retention test, time necessary to ensure that MPH reaches the central nervous system and changes the concentrations of DA and NE (Rowley et al., 2014); while CA1 and vmPFC microinfusions always occurred 10 minutes before the retention test. Microinfusion volume used was 1.0 µL per side. At microinfusion, a tight-fitting 30-gauge infusion cannula connected to a Hamilton microsyringe by polyethylene tubing was introduced into the guide cannula. The infusion cannula extended 1.0 mm beyond the cannula tip. The infusion was carried out over 60 s and the infusion cannula was left in place for an additional 60 s to maximize diffusion and to prevent backflow of the drug, and then carefully withdrawn and placed on the other side, after which the procedure was repeated. For the i.p. injection, animals were gently immobilized, and the needle was introduced in the left lower quadrant of the abdomen of the animal, at an angle of 20-45° with the abdominal wall.

#### **2.4 Social Discrimination Paradigm**

Social recognition memory was accessed by using the social discrimination paradigm as described by Garrido-Zinn et al. (Garrido Zinn et al., 2016). The apparatus used was a white wooden open-field arena with a frontal glass wall (60 cm × 40 cm × 40 cm) placed in a dimly illuminated room (Garrido Zinn et al., 2016). Two identical transparent Plexiglas cylindrical cages (9 cm diameter × 13 cm high) were kept inside the arena near to the corners. The cylinder cages had small holes (1 cm diameter spaced by 1 cm diameter) on the wall, allowing the passage of olfactory cues while preventing the direct interaction between adults and juveniles. The arena and the cylinder cages were cleaned with 70% v/v ethanol before and after each use. Adult animals were individually habituated to the open field arena for 20 min per day for four consecutive days. The empty cylinder cages were kept inside the arena during the habituation session. Juveniles were habituated to being placed in the cylinder cages for 20 min 24 h before the sample phase. The sample phase took place 24 h after the last habituation

session. The adults were individually placed in the center of the arena and allowed, for 1 h, to freely explore an unfamiliar juvenile placed in one of the cylinder cages (randomly selected and counterbalanced for each group) and an empty cylinder. The retention test occurred 24 h later, the adults were placed again in the open-field arena with the previously introduced juvenile (familiar) and a second juvenile (novel) that had no prior contact with the adult, placed in the cylinder that had been empty during the sample phase, and allowed to freely explore the set-up for 5 min, after which they were returned to their home cages. The two juveniles were from different home cages to prevent the redundancy of olfactory cues. During the retention test, familiar and novel juvenile exploration time was measured. Social exploratory behavior was defined as sniffing and touching the cylinder cages.

## **2.5 Histology**

Cannula placements were verified by infusing 4% methylene blue solution into the cannulae two days after the last behavioral procedure. The spread of the dye was taken as an estimate of the drug infusions in the same animal. Placements were considered correct when the spread was 1 mm<sup>3</sup> or less from the intended infusion sites (Garrido Zinn et al., 2016; Rosa et al., 2013). Only data from animals with correct cannulae implants were analyzed.

## **2.6 Statistical Analysis**

Data from social discrimination task were analyzed by using one-sample Student's *t*-test considering the theoretical mean equal to 50% to compare the difference between familiar and novel juveniles exploration time in the same group. One-way ANOVA followed by Bonferroni's Multiple Comparison Test was performed to assess differences between percentages of exploration time of novel juveniles on the retention test. One-way ANOVA followed by Bonferroni's Multiple Comparison Test was also used to verify differences in total exploration time between the different treatments. GraphPad Prism software was used to analyze the data.  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

### 3 Results

#### 3.1 Effects of MPH given systemically before the sample phase and the retention test on social recognition memory.

Animals received i.p injections of vehicle (Veh) or MPH (2 mg/kg) 30 minutes before the sample phase on a social discrimination task and 24 h later were subjected to a 5-min retention test. As shown in Fig. 1A, animals that received vehicle (Veh) before the sample phase spent less time investigating the familiar juvenile (F) than the novel one (N) during the retention test (one sample *t*-test: Fig. 1A, Veh  $t_{(8)}=2.691$ ,  $p<0.05$ ). In contrast, animals that received MPH systemically spent a similar amount of time investigating the F and the N juveniles (one sample *t*-test: Fig. 1A, Veh  $t_{(7)}=0.817$ ,  $p>0.05$ ) during the retention test. One-way ANOVA showed a significant difference between groups ( $F_{(3,30)}=5.750$ ,  $p<0.01$ ) and the Bonferroni's Multiple Comparison test showed a difference between Veh-N and MPH-N groups in the retention test ( $p<0.05$ ). Thus, MPH given systemically 30 min before the social discrimination task hindered SRM.

Since NE and DA may cause state dependency (Piri et al., 2013, p. 201; Rosa et al., 2013) and the role of MPH in this process is still uncertain (Aman & Sprague, 1974; Steinhausen & Kreuzer, 1981; Swanson & Kinsbourne, 1976), we investigated whether MPH could cause state-dependent SRM, presumably by increasing both neurotransmitters. Animals received i.p. injections of Veh or MPH (2 mg/kg) 30 min before the sample phase and before the retention test of a social discrimination task. The deleterious effect of the pre-sample phase injection of MPH was counteracted by the pre-test i.p. administration of the same substance at the same dose (one sample *t*-test: Fig. 1B, MPH-MPH  $t_{(9)}=3.537$ ,  $p<0.01$ ). Additionally, the pre-test i.p administration of MPH had no effect on its own on retrieval performance of the task (one sample *t*-test: Fig. 1B, Veh-MPH  $t_{(7)}=4.054$ ,  $p<0.01$ ). This is characteristic of state-dependency (Rosa et al., 2013; Stephens et al., 1984).

#### 3.2 Can the pre-test infusion of MPH intra-CA1 or intra-vmPFC reverse the amnesic effect of the pre-sample systemic injection of MPH?

To find out whether MPH induced SRM state dependency by an influence on the dorsal hippocampus or on the vmPFC, or both, animals with bilateral cannulae implanted in the CA1 region of the dorsal hippocampus or in the vmPFC were subjected to a social

discrimination task. Thirty min before the sample phase animals received i.p. injections of Veh or MPH (2 mg/kg), and 10 min before the retention test they received infusions of Veh or MPH (12 µg/side) into the CA1 or into the vmPFC (Fig. 2). Animals that received pre-sample Veh i.p. and pre-test Veh intra-CA1 or intra-vmPFC (one sample *t*-test: Fig. 2, Veh-Veh CA1  $t_{(8)}=5.516$ ,  $p<0.001$ ; Veh-Veh vmPFC  $t_{(9)}=2.266$ ,  $p<0.05$ ), as well as those that received pre-sample Veh i.p. plus pre-test MPH intra-CA1 or intra-vmPFC (one sample *t*-test: Fig. 2, Veh-MPH CA1  $t_{(8)}=2.807$ ,  $p<0.05$ ; Veh-MPH vmPFC  $t_{(7)}=2.871$ ,  $p<0.05$ ) and the ones receiving pre-sample MPH i.p. plus pre-test MPH intra-vmPFC (one sample *t*-test: Fig. 2, MPH-MPH vmPFC  $t_{(8)}=3.110$ ,  $p<0.05$ ) spent more time investigating the novel juvenile during the retention test; hence, they were able to recognize the familiar juvenile. In contrast, animals that were exposed to the systemic and to the intra-CA1 MPH infusions were unable to recognize the familiar juvenile (one sample *t*-test: Fig. 2, MPH-MPH CA1  $t_{(8)}=0.477$ ,  $p>0.05$ ), investigating both juveniles for a similar amount of time during retention test. One-way ANOVA revealed significant differences between groups ( $F_{(11,96)}=9.374$ ,  $p<0.0001$ ) and the Bonferroni's Multiple Comparison test showed differences between Veh-Veh-N and MPH-MPH CA1-N groups on the retention test ( $p<0.05$ ). Pre-test infusion of MPH into the vmPFC reverted the amnesic effect of pre-sample phase MPH, but that into CA1 did not. Also, MPH did not affect SRM retrieval when infused into CA1 or vmPFC before the retention test.

### **3.3 Is the reversal of pre-sample MPH effects by pre-test MPH mimicked by pre-test blockade of brain NE or DA transporters?**

Nisoxetine and GBR12909 are NE and DA transporters inhibitors, respectively, leading to the cerebral increase of either NE or DA, unlike MPH (Tye et al., 2010). Since MPH is believed to act on those carriers inhibiting both NE and DA reuptake (Busardò et al., 2016), we examined whether its effect on SRM could be due to the increase of one of these two specific neurotransmitters, or both; in addition to checking whether their blockade had any effect on retrieval. Animals received injections of Veh or MPH (2 mg/kg) i.p. 30 min before the sample phase on the social discrimination task. Ten minutes before the retention test, conducted 24h following the sample phase, animals received infusions of Veh, nisoxetine (Niso, 10 µg/side) or GBR12909 (GBR, 7.85 µg/side) intra-vmPFC (Figure 3). Animals that received injections of Veh, as well as the animals treated with MPH i.p. and Niso or GBR intra-vmPFC were able to recognize

the familiar juvenile during the retention test (one sample *t*-test: Fig. 3, Veh-Veh  $t_{(8)}=3.615$ ,  $p<0.01$ ; MPH-Niso  $t_{(9)}=4.206$ ,  $p<0.01$ ; MPH-GBR  $t_{(7)}=3.977$ ,  $p<0.01$ ). Fig. 3 also shows that animals receiving pre-test infusion of Niso or GBR intra-vmPFC were able to recognize the familiar juvenile (one sample *t*-test: Fig. 3, Veh-Niso  $t_{(7)}=2.732$ ,  $p<0.05$ ; Veh-GBR  $t_{(8)}=2.395$ ,  $p<0.05$ ) in the retention test, suggesting that blockade of neither NE or DA transporters has effect on SRM retrieval. The results strongly suggest that the MPH-induced state dependency does not rely on each catecholamine separately, but rather on both of them concomitantly in the vmPFC.

### **3.4 Should be the effect of MPH on CA1 region of hippocampus a result from the increase of NE or DA, or both?**

Considering that the catecholamine can have different effects on memory depending on the brain structure they act, we investigated if the deleterious effect of MPH on SRM, when infused into the CA1 region of dorsal hippocampus, was an effect of the rise of NE or DA, or both. Therefore, animals received injections of Veh or MPH (2 mg/kg) i.p. 30 min before the sample phase on the social discrimination task. Ten min prior to the retention test, animals received infusions of Veh, nisoxetine (Niso, 10 µg/side) or GBR12909 (GBR, 7.85 µg/side) intra-CA1 (Figure 4). Both animals that received injections of Veh and those treated with MPH i.p. and GBR intra-CA1 spent more time investigating the novel juvenile during the retention test (one sample *t*-test: Fig. 4, Veh-Veh  $t_{(10)}=8.080$ ,  $p<0.0001$ ; MPH-GBR  $t_{(9)}=2.649$ ,  $p<0.05$ ), ergo they were able to recognize the familiar juvenile. Fig. 4 also shows that animals that received pre-test infusion of GBR intra-CA1 were able to recognize the familiar juvenile in the retention test, (one sample *t*-test: Fig. 4, Veh-GBR  $t_{(8)}=3.593$ ,  $p<0.01$ ) while the animals treated with Veh i.p plus Niso pre-test (one sample *t*-test: Fig. 4, Veh-Niso  $t_{(9)}=0.936$ ,  $p>0.05$ ) and the animals treated with MPH i.p. plus Niso pre-test (one sample *t*-test: Fig. 4, MPH-Niso  $t_{(9)}=0.975$ ,  $p>0.05$ ) did not, since the two latter groups investigated both juveniles for a similar amount of time during retention test. One-way ANOVA revealed significant differences between groups ( $F_{(9,99)}=13.50$ ,  $p<0.0001$ ) and the Bonferroni's Multiple Comparison test showed differences between Veh-Veh-N and MPH-Niso-N groups and Veh-Veh-N and Veh-Niso-N groups in the retention test ( $p<0.05$ ). These results suggest that the blockade of DAT has no effect on retrieval, whereas the blockade of NET impaired the retrieval of SRM and the state dependency in CA1.



Importantly, no differences were found between the treatment groups versus the control group in total exploration time during the retention test through analysis with one-way ANOVA followed by Bonferroni's Multiple Comparison Test (Table 1). These results suggest that the doses of the drugs used did not affect motor skills or basal motivation to explore the juveniles. Therefore, the treatments effects on SRM shown in Figs. 1 to 4 can safely be attributed to influences upon SRM processes, as concluded from the corresponding experiments.

#### **4 Discussion**

In a previous study on fear extinction (Rosa et al., 2013) the effector pathway involved both at the time of training and at the time of retrieval was shown to be the projection of the LC to the CA1 region of the dorsal hippocampus.

Thus, the present results illustrate one more case of endogenous state dependency involving catecholamine; this time concerning a non-fearful memory (SRM) and a final set of fibers projecting from that circuit to the vmPFC rather than the hippocampus. Both sets of results fit with the former proposal of the central catecholamine roles in memory modulation heralded long ago by Dell (Dell, 1961), Merlo and Izquierdo (Merlo & Izquierdo, 1965), Izquierdo (Ivan Izquierdo, 1965), Gold and van Buskirk (Gold & van Buskirk, 1978), Frey (Frey, Schroeder, & Matthies, 1990), McGaugh (McGaugh, 2013), Sara (Sara, 2009) and others, but further studies suggest that at the level of the effector side of the pathway initiated by the Nucleus of the Solitary Tract (Clayton & Williams, 2000; Mello-Carpes & Izquierdo, 2013), different memories or behaviors preferentially use different branches of the LC efferents: the one that goes to CA1 in the case of fear memory (Rosa et al., 2013), and the one that goes to the vmPFC for SRM (here).

When the present results are put together with those of Garrido-Zinn et al. recent paper on SRM modulation by multiple neurotransmitter systems in the basolateral amygdala and the hippocampus (Garrido Zinn et al., 2016), it is clear that the general regulation of SRM is far more complex than hitherto suspected (Camats Perna & Engelmann, 2015; Guzmán et al., 2014; Mesic et al., 2015; Wacker et al., 2011; Wei et al., 2015). It involves top-down regulation by several neurotransmitter pathways acting in the hippocampus, as shown by Rosa et al. (Rosa et al., 2013), or the vmPFC, as demonstrated here.

Further, the present findings indicate that both NE and DA are involved in the effects of MPH on memory, as suggested by DeVilbiss and Berridge a decade ago (DeVilbiss & Berridge, 2006). In view of our results with Niso and GBR it would not be warranted to attribute the central effects of MPH mainly to one of the two catecholamines mentioned, as some authors do (Gvirts et al., 2016; Iván Izquierdo et al., 2008). It is relevant to recall that the LC projects both noradrenergic and dopaminergic fibers to the brain areas it innervates which include both the vmPFC and the hippocampus (Takeuchi et al., 2016). However, the increase of the noradrenergic tonus in the latter seems to be detrimental for the recall of SRM, which is in accordance with the findings of Garrido-Zinn et al. that found that the  $\beta$ -agonist isoproterenol impaired the consolidation of SRM (Garrido Zinn et al., 2016), but goes against the literature about emotional and spatial memories that depends on adrenergic signaling (Gibbs & Summers, 2002; Murchison et al., 2004; van Stegeren, 2008).

The effect of MPH described here might be related to the recreational use of the drug, which may become addictive. Other drugs that modulate the reuptake of NE and DA at brain synapses (cocaine, amphetamines) lead to addiction. It is conceivable that the addiction results from the search for a brain state on which to become dependent (Ivan Izquierdo & McGaugh, 1995). In the case of MPH and other drugs leading to high brain NE and/or DA levels, the state could be such effect and/or the accompanying cognitive change.

The present findings side with those of Swanson and Kinsbourne (Swanson & Kinsbourne, 1976) who described state-dependency by MPH in children using stimulant doses of the drug, and not with those of others who failed to find that (Aman & Sprague, 1974; Becker-Mattes, Mattes, Abikoff, & Brandt, 1985; Steinhausen & Kreuzer, 1981; Stephens et al., 1984).

To conclude: The present results show that SRM can be made state dependent on MPH, and that this effect results from the induction of increased NE and DA extracellular levels in vmPFC, but not in the CA1 region of dorsal hippocampus, both at sample phase and at retrieval time. The effect presumably involves the reflex activation of the brain NE (and DA), (Devoto & Flore, 2006; Takeuchi et al., 2016) system that projects to the vmPFC.

**FUNDING AND DISCLOSURE**

The work was supported by grants from the National Council of Research of Brazil, CNPq and CAPES, Brazil. The authors declare no conflict of interest.

**ACKNOWLEDGMENTS**

A special thanks is due to Prof. Débora Montenegro Pasin, who was responsible for reviewing the English version.

## References

- Aman, M. G., & Sprague, R. L. (1974). The state-dependent effects of methylphenidate and dextroamphetamine. *The Journal of Nervous and Mental Disease*, *158*(4), 268–279.
- Arnsten, A. F., & Dudley, A. G. (2005). Methylphenidate improves prefrontal cortical cognitive function through alpha2 adrenoceptor and dopamine D1 receptor actions: Relevance to therapeutic effects in Attention Deficit Hyperactivity Disorder. *Behavioral and Brain Functions: BBF*, *1*(1), 2. <https://doi.org/10.1186/1744-9081-1-2>
- Becker-Mattes, A., Mattes, J. A., Abikoff, H., & Brandt, L. (1985). State-dependent learning in hyperactive children receiving methylphenidate. *The American Journal of Psychiatry*, *142*(4), 455–459. <https://doi.org/10.1176/ajp.142.4.455>
- Berridge, C. W., Devilbiss, D. M., Andrzejewski, M. E., Arnsten, A. F. T., Kelley, A. E., Schmeichel, B., ... Spencer, R. C. (2006). Methylphenidate preferentially increases catecholamine neurotransmission within the prefrontal cortex at low doses that enhance cognitive function. *Biological Psychiatry*, *60*(10), 1111–1120. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2006.04.022>
- Britton, G. B. (2012). Cognitive and emotional behavioural changes associated with methylphenidate treatment: a review of preclinical studies. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, *15*(1), 41–53. <https://doi.org/10.1017/S1461145711000472>
- Busardò, F. P., Kyriakou, C., Cipolloni, L., Zaami, S., & Frati, P. (2016). From Clinical Application to Cognitive Enhancement: The Example of Methylphenidate. *Current Neuropharmacology*, *14*(1), 17–27.

- Camats Perna, J., & Engelmann, M. (2015). Recognizing Others: Rodent's Social Memories. *Current Topics in Behavioral Neurosciences*. [https://doi.org/10.1007/7854\\_2015\\_413](https://doi.org/10.1007/7854_2015_413)
- Clayton, E. C., & Williams, C. L. (2000). Adrenergic activation of the nucleus tractus solitarius potentiates amygdala norepinephrine release and enhances retention performance in emotionally arousing and spatial memory tasks. *Behavioural Brain Research*, *112*(1–2), 151–158.
- Dell, P. (1961). Intervention of an Adrenergic Mechanism During Brain Stem Reticular Activation. In G. E. W. Wolstenholme & M. O'Connor (Eds.), *Novartis Foundation Symposia* (pp. 393–409). Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. Retrieved from <http://doi.wiley.com/10.1002/9780470719206.ch38>
- Devilbiss, D. M., & Berridge, C. W. (2006). Low-dose methylphenidate actions on tonic and phasic locus coeruleus discharge. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *319*(3), 1327–1335. <https://doi.org/10.1124/jpet.106.110015>
- Devoto, P., & Flore, G. (2006). On the origin of cortical dopamine: is it a co-transmitter in noradrenergic neurons? *Current Neuropharmacology*, *4*(2), 115–125.
- Frey, U., Schroeder, H., & Matthies, H. (1990). Dopaminergic antagonists prevent long-term maintenance of posttetanic LTP in the CA1 region of rat hippocampal slices. *Brain Res*, *522*, 69–75.
- Garrido Zinn, C., Clairis, N., Silva Cavalcante, L. E., Furini, C. R. G., de Carvalho Myskiw, J., & Izquierdo, I. (2016). Major neurotransmitter systems in dorsal hippocampus and basolateral amygdala control social recognition memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(33), E4914-4919. <https://doi.org/10.1073/pnas.1609883113>

- Gibbs, M. E., & Summers, R. J. (2002). Role of adrenoceptor subtypes in memory consolidation. *Progress in Neurobiology*, 67(5), 345–391. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(02\)00023-0](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(02)00023-0)
- Gold, P. E., & van Buskirk, R. (1978). Posttraining brain norepinephrine concentrations: Correlation with retention performance of avoidance training and with peripheral epinephrine modulation of memory processing. *Behavioral Biology*, 23(4), 509–520. [https://doi.org/10.1016/S0091-6773\(78\)91614-0](https://doi.org/10.1016/S0091-6773(78)91614-0)
- Gomes, K. M., Souza, R. P., Valvassori, S. S., Réus, G. Z., Inácio, C. G., Martins, M. R., ... Quevedo, J. (2009). Chronic methylphenidate-effects over circadian cycle of young and adult rats submitted to open-field and object recognition tests. *Current Neurovascular Research*, 6(4), 259–266.
- Guzmán, Y. F., Tronson, N. C., Sato, K., Mesic, I., Guedea, A. L., Nishimori, K., & Radulovic, J. (2014). Role of oxytocin receptors in modulation of fear by social memory. *Psychopharmacology*, 231(10), 2097–2105. <https://doi.org/10.1007/s00213-013-3356-6>
- Gvirts, H. Z., Mayseless, N., Segev, A., Lewis, D. Y., Feffer, K., Barnea, Y., ... Shamay-Tsoory, S. G. (2016). Novelty-seeking trait predicts the effect of methylphenidate on creativity. *Journal of Psychopharmacology (Oxford, England)*. <https://doi.org/10.1177/0269881116667703>
- Izquierdo, I. (1965). The effect of catecholamines on learning. In *Symposium on Pharmacology of Conditioning, Learning, and Retention, II International Pharmacological Meeting* (pp. 127–131). M Michelson.
- Izquierdo, I., Bevilaqua, L. R., Rossato, J. I., Lima, R. H., Medina, J. H., & Cammarota, M. (2008). Age-dependent and age-independent human memory persistence is enhanced by delayed posttraining methylphenidate administration. *Proceedings*

- of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(49), 19504–19507. <https://doi.org/10.1073/pnas.0810650105>
- Izquierdo, I., Furini, C. R. G., & Myskiw, J. C. (2016). Fear Memory. *Physiological Reviews*, 96(2), 695–750. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2015>
- Izquierdo, I., & McGaugh, J. L. (1995). Effects of drugs and alcohol on memory. In *The Encyclopedia of Drugs and Alcohol* (Vol. 2, pp. 666–669). New York: Macmillan Publishing Company.
- Kogan, J. H., Frankland, P. W., & Silva, A. J. (2000). Long-term memory underlying hippocampus-dependent social recognition in mice. *Hippocampus*, 10(1), 47–56.
- Kuczenski, R., & Segal, D. S. (1997). Effects of methylphenidate on extracellular dopamine, serotonin, and norepinephrine: comparison with amphetamine. *Journal of Neurochemistry*, 68(5), 2032–2037.
- Kuczenski, R., & Segal, D. S. (2002). Exposure of adolescent rats to oral methylphenidate: preferential effects on extracellular norepinephrine and absence of sensitization and cross-sensitization to methamphetamine. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22(16), 7264–7271. <https://doi.org/20026690>
- McGaugh, J. L. (2013). Making lasting memories: remembering the significant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110 Suppl 2, 10402–10407. <https://doi.org/10.1073/pnas.1301209110>
- Mello-Carpes, P. B., & Izquierdo, I. (2013). The Nucleus of the Solitary Tract-Nucleus Paragigantocellularis-Locus Coeruleus-CA1 region of dorsal hippocampus pathway is important for consolidation of object recognition memory.

- Neurobiology of Learning and Memory*, 100, 56–63.  
<https://doi.org/10.1016/j.nlm.2012.12.002>
- Merlo, A. B., & Izquierdo, I. (1965). EFFECTS OF INHIBITORS OF O-METHYLTRANSFERASE AND OF ADRENERGIC BLOCKING AGENTS ON CONDITIONING AND EXTINCTION IN RATS. *Medicina Et Pharmacologia Experimentalis. International Journal of Experimental Medicine*, 13, 217–226.
- Mesic, I., Guzman, Y. F., Guedea, A. L., Jovasevic, V., Corcoran, K. A., Leaderbrand, K., ... Radulovic, J. (2015). Double Dissociation of the Roles of Metabotropic Glutamate Receptor 5 and Oxytocin Receptor in Discrete Social Behaviors. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 40(10), 2337–2346.  
<https://doi.org/10.1038/npp.2015.81>
- Murchison, C. F., Zhang, X.-Y., Zhang, W.-P., Ouyang, M., Lee, A., & Thomas, S. A. (2004). A distinct role for norepinephrine in memory retrieval. *Cell*, 117(1), 131–143.
- Nyberg, F. (2014). Structural plasticity of the brain to psychostimulant use. *Neuropharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.07.004>
- Overton, D. A. (1978). Basic mechanisms of state-dependent learning. *Psychopharmacology Bulletin*, 14(1), 67–68.
- Paxinos, G., Watson, C. (1986). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. (2nd ed). Sydney: Academic Press.
- Piri, M., Rostampour, M., Nasehi, M., & Zarrindast, M. R. (2013). Blockade of the dorsal hippocampal dopamine D1 receptors inhibits the scopolamine-induced state-dependent learning in rats. *Neuroscience*, 252, 460–467.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.08.003>



- Radeloff, D., Ciaramidaro, A., Siniatchkin, M., Hainz, D., Schlitt, S., Weber, B., ... Freitag, C. M. (2014). Structural alterations of the social brain: a comparison between schizophrenia and autism. *PloS One*, 9(9), e106539. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106539>
- Rosa, J., Myskiw, J. C., Furini, C. R. G., Sapiras, G. G., & Izquierdo, I. (2013). Fear extinction can be made state-dependent on peripheral epinephrine: Role of norepinephrine in the nucleus tractus solitarius. *Neurobiology of Learning and Memory*. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2013.09.018>
- Rowley, H. L., Kulkarni, R. S., Gosden, J., Brammer, R. J., Hackett, D., & Heal, D. J. (2014). Differences in the neurochemical and behavioural profiles of lisdexamfetamine methylphenidate and modafinil revealed by simultaneous dual-probe microdialysis and locomotor activity measurements in freely-moving rats. *Journal of Psychopharmacology*, 28(3), 254–269. <https://doi.org/10.1177/0269881113513850>
- Russell, V., de Villiers, A., Sagvolden, T., Lamm, M., & Taljaard, J. (1998). Differences between electrically-, ritalin- and D-amphetamine-stimulated release of [3H]dopamine from brain slices suggest impaired vesicular storage of dopamine in an animal model of Attention-Deficit Hyperactivity Disorder. *Behavioural Brain Research*, 94(1), 163–171.
- Sara, S. J. (2009). The locus coeruleus and noradrenergic modulation of cognition. *Nature Reviews Neuroscience*, 10(3), 211–223. <https://doi.org/10.1038/nrn2573>
- Scherer, E. B. S., da Cunha, M. J., Matté, C., Schmitz, F., Netto, C. A., & Wyse, A. T. S. (2010). Methylphenidate affects memory, brain-derived neurotrophic factor immunocontent and brain acetylcholinesterase activity in the rat. *Neurobiology*

- of Learning and Memory*, 94(2), 247–253.  
<https://doi.org/10.1016/j.nlm.2010.06.002>
- Steinhausen, H. C., & Kreuzer, E. M. (1981). Learning in hyperactive children: are there stimulant-related and state-dependent effects? *Psychopharmacology*, 74(4), 389–390.
- Stephens, R. S., Pelham, W. E., & Skinner, R. (1984). State-dependent and main effects of methylphenidate and pemoline on paired-associate learning and spelling in hyperactive children. *Journal of Consulting and Clinical Psychology*, 52(1), 104–113.
- Swanson, J. M., & Kinsbourne, M. (1976). Stimulant-related state-dependent learning in hyperactive children. *Science (New York, N.Y.)*, 192(4246), 1354–1357.
- Takeuchi, T., Duzskiewicz, A. J., Sonneborn, A., Spooner, P. A., Yamasaki, M., Watanabe, M., ... Morris, R. G. M. (2016). Locus coeruleus and dopaminergic consolidation of everyday memory. *Nature*, 537(7620), 357–362.  
<https://doi.org/10.1038/nature19325>
- Tanimizu, T., Kenney, J. W., Okano, E., Kadoma, K., Frankland, P. W., & Kida, S. (2017). Functional Connectivity of Multiple Brain Regions Required for the Consolidation of Social Recognition Memory. *The Journal of Neuroscience*, 37(15), 4103–4116. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3451-16.2017>
- Tye, K. M., Tye, L. D., Cone, J. J., Hekkelman, E. F., Janak, P. H., & Bonci, A. (2010). Methylphenidate facilitates learning-induced amygdala plasticity. *Nature Neuroscience*, 13(4), 475–481. <https://doi.org/10.1038/nn.2506>
- van Stegeren, A. H. (2008). The role of the noradrenergic system in emotional memory. *Acta Psychologica*, 127(3), 532–541.  
<https://doi.org/10.1016/j.actpsy.2007.10.004>

- Wacker, D. W., Engelmann, M., Tobin, V. A., Meddle, S. L., & Ludwig, M. (2011). Vasopressin and social odor processing in the olfactory bulb and anterior olfactory nucleus. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1220*, 106–116. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05885.x>
- Wei, D., Lee, D., Cox, C. D., Karsten, C. A., Peñagarikano, O., Geschwind, D. H., ... Piomelli, D. (2015). Endocannabinoid signaling mediates oxytocin-driven social reward. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(45), 14084–14089. <https://doi.org/10.1073/pnas.1509795112>
- Weikop, P., Yoshitake, T., & Kehr, J. (2007). Differential effects of adjunctive methylphenidate and citalopram on extracellular levels of serotonin, noradrenaline and dopamine in the rat brain. *European Neuropsychopharmacology*, *17*(10), 658–671. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2007.02.014>

## LEGENDS TO FIGURES

**Figure 1. Methylphenidate induces state-dependent SRM.** A) Thirty min before the 1-hour sample phase on social discrimination task animals received i.p. injections of saline solution 0,9% (Veh) or methylphenidate (MPH, 2 mg/kg). Twenty-four hours later animals were submitted to a 5-min retention test in the presence of the familiar juvenile (F) and to a new one (N). B) Same protocol; but animals also received i.p injections of Veh or MPH (2 mg/kg) 30 minutes before the retention test. Dots indicate the theoretical mean of 50%. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM (n=8-11 animals per group) and presented as percentage of total exploration time. \*P<0.05 Veh-N vs. MPH-N, one-way ANOVA followed by Bonferroni's Multiple Comparison test.

**Figure 2. The state-dependency of SRM caused by MPH relies on prefrontal cortex, but not on dorsal hippocampus.** Animals with cannulae implanted into the CA1 or into the vmPFC were subjected to the social discrimination task. Thirty min before the sample phase, animals received i.p. injections of saline solution (Veh) or MPH (2 mg/kg) and 10 min before the retention test, animals received intra-CA1 or intra-vmPFC infusions of Veh or MPH (12  $\mu$ g/side). In the retention test, animals were presented to the juvenile previously met, the familiar juvenile (F), and to a novel one (N), during 5 min. Dots indicate the theoretical mean of 50%. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM (n=8-10 animals per group) and presented as percentage of total exploration time. \*P<0.05 Veh-Veh CA1 N vs. MPH-MPH CA1 N, Bonferroni's Multiple Comparison test after one-way ANOVA.

**Figure 3. The state-dependency effect of MPH on SRM relies on both NE and DA, at least for the vmPFC.** Animals with cannulae implanted into vmPFC were subjected to the social discrimination task. Thirty min before the sample phase, animals received i.p. administration of saline solution (Veh) or MPH (2 mg/kg). Ten min before the retention test, conducted 24 hours after the training session, animals received intra-vmPFC infusion of Veh or Nisoxetine (Niso, 10  $\mu$ g/side) or GBR12909 (GBR, 7.85  $\mu$ g/side). In the retention test, animals were presented to the juvenile previously met, the familiar juvenile (F), and to a novel one (N), during 5 min. Dots indicate the theoretical mean of 50%. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM (n=8-10 animals per group) and presented as percentage of total exploration time.

**Figure 4. The state-dependency effect of MPH on SRM does not occur in CA1 because of blockade of NE transporter.** Animals with cannulae implanted into the CA1 region were subjected to the social discrimination task. Thirty min before the sample phase, animals received i.p. administration of saline solution (Veh) or MPH (2 mg/kg). Ten min before the retention test, conducted 24 hours after the training session, animals received intra-CA1 infusion of Veh or Nisoxetine (Niso, 10 µg/side) or GBR12909 (GBR, 7.85 µg/side). In the retention test, animals were presented to the juvenile previously met, the familiar juvenile (F), and to a novel one (N), during 5 min. Dots indicate the theoretical mean of 50%. Data are expressed as mean ± SEM (n=8-10 animals per group) and presented as percentage of total exploration time. \*P<0.05 Veh-Veh N vs. MPH-Niso N and Veh-Veh N vs. Veh-Niso N Bonferroni's Multiple Comparison test after one-way ANOVA.

**Table 1. Total exploration time during the 5-min retention test.** Means ± SEM are shown; one-way ANOVA analysis followed by Bonferroni's Multiple Comparison Test.

Figure 1

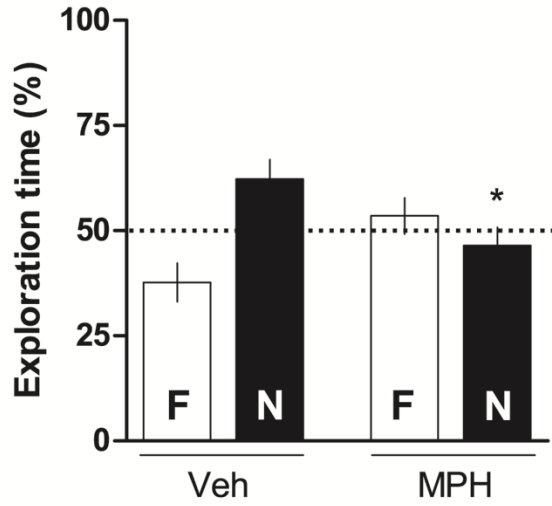
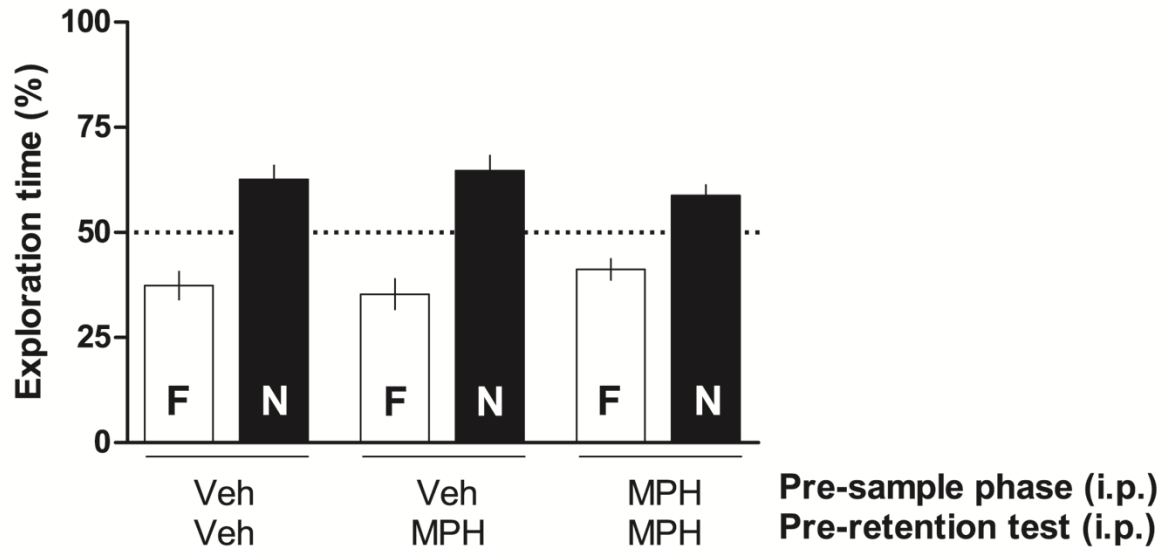
**A****B**

Figure 2

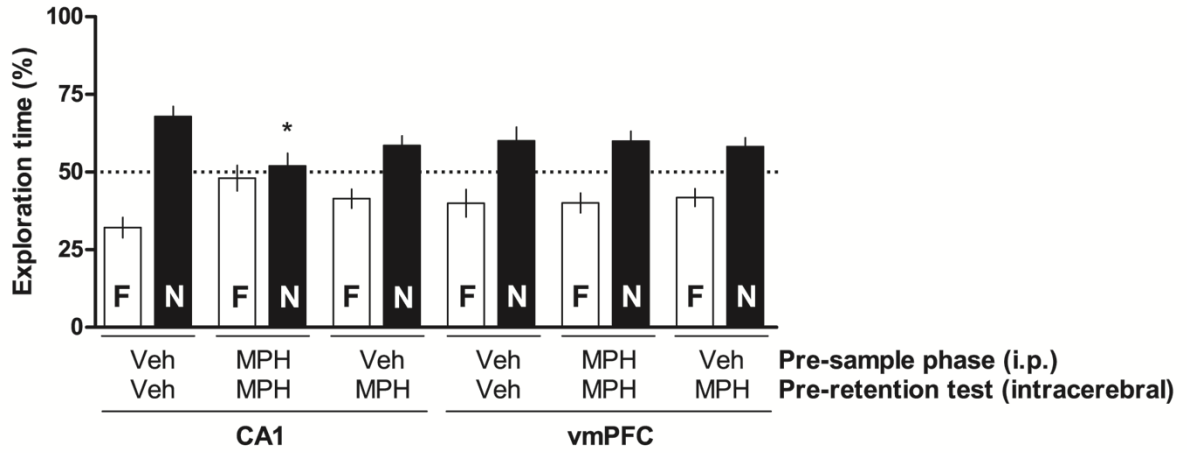


Figure 3

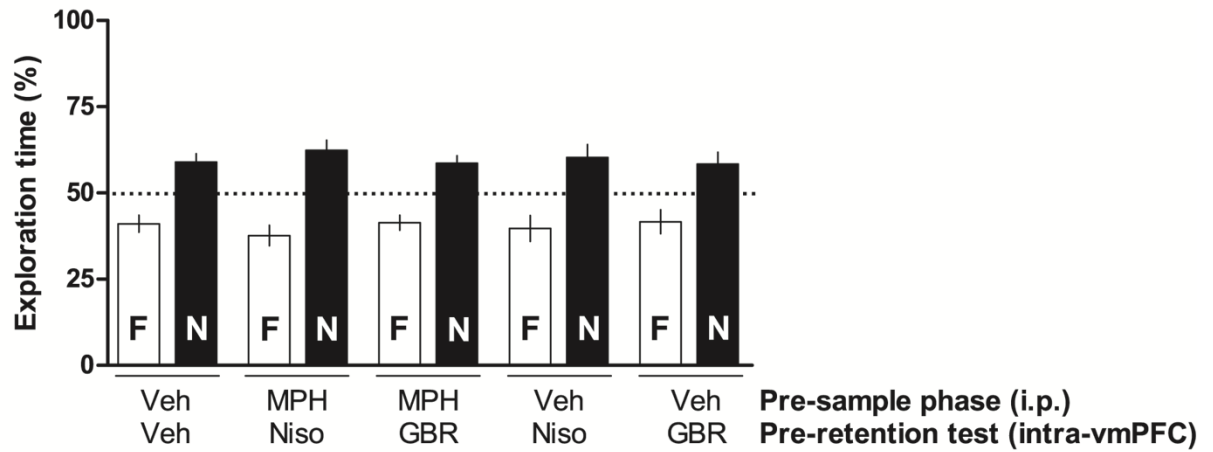
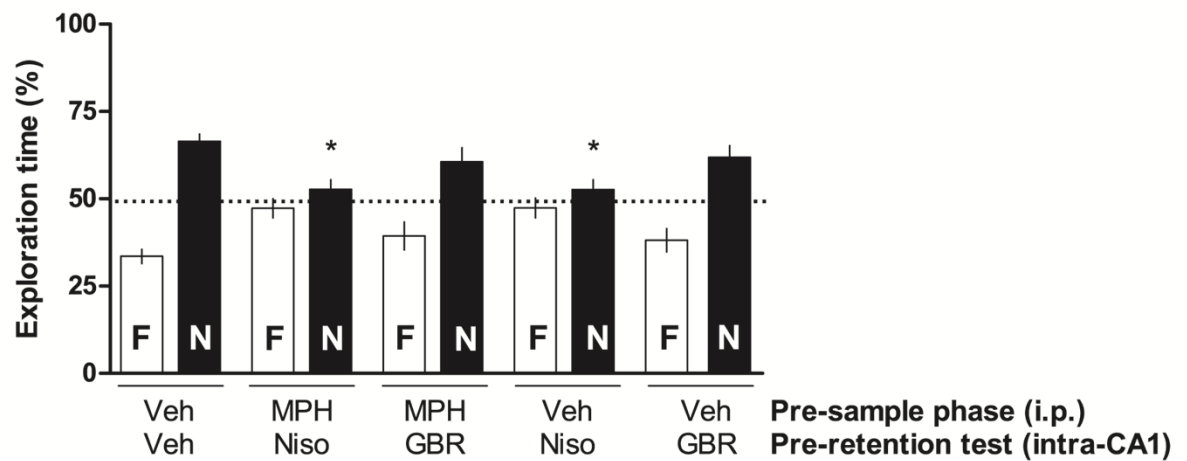


Figure 4



**Table 1. Total exploration time during the 5-min retention test.** Means  $\pm$  SEM are shown; One-way ANOVA analysis followed by Bonferroni's Multiple Comparison Test.

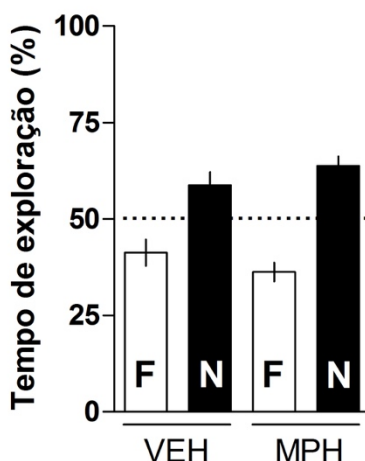
Group	Total exploration time (s)
Veh	85.35 $\pm$ 3.38
MPH i.p.	91.86 $\pm$ 4.07
Veh i.p. - MPH i.p.	71.89 $\pm$ 10.43
MPH i.p. - MPH i.p.	91.15 $\pm$ 8.06
MPH i.p. - MPH intra-CA1	68.00 $\pm$ 4.67
MPH i.p. - MPH intra-CPF	80.65 $\pm$ 9.21
Veh i.p. - MPH intra-CPF	71.88 $\pm$ 11.57
MPH i.p. - GBR intra-CPF	67.70 $\pm$ 5.39
MPH i.p. - Niso intra-CPF	70.05 $\pm$ 6.58
Veh i.p. - GBR intra-CPF	68.13 $\pm$ 8.35
Veh i.p. - Niso intra-CPF	84.74 $\pm$ 7.97
MPH i.p. - GBR intra-CA1	80.57 $\pm$ 6.16
MPH i.p. - Niso intra CA1	85.09 $\pm$ 7.22
Veh i.p. - GBR intra-CA1	71.90 $\pm$ 4.42
Veh i.p. - Niso intra-CA1	65.20 $\pm$ 4.91



### 3.3.2. Parte II: Tratamento crônico com metilfenidato

Com o objetivo de verificar o efeito do tratamento crônico com metilfenidato sobre o processo de formação da memória de reconhecimento social, animais adultos receberam diariamente solução salina 0,9% (VEH) ou MPH (2 mg/kg), via intraperitoneal, durante 21 dias. Nos dias de habituação, treino e teste no paradigma de discriminação social, os animais receberam a injeção 30 minutos antes da sessão experimental. Na sessão de treino houve a exposição do animal adulto a um juvenil desconhecido por 1 hora. Vinte e quatro horas após a sessão de treino, os animais foram submetidos a sessão de teste, com exposição ao juvenil familiar e a um juvenil novo, durante 5 minutos.

**Figura 18. Efeito do tratamento crônico com metilfenidato sobre a memória de reconhecimento social**



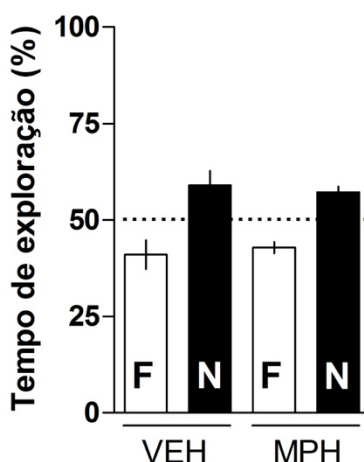
Os animais adultos receberam injeções intraperitoneais de solução salina 0,9% (Veh) ou metilfenidato (MPH, 2 mg/kg) durante 21 dias, sempre 30 minutos antes de qualquer sessão experimental. Na sessão de treino, os animais adultos foram expostos a um juvenil desconhecido por 1 hora. Vinte e quatro horas após, os animais foram submetidos à sessão de teste, no qual foram apresentados ao juvenil previamente encontrado na sessão de treino, o juvenil familiar (F), e a um juvenil novo (N), durante 5 minutos. Os pontos indicam a média teórica de 50%. Os dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão e apresentados em porcentagem do tempo total de exploração.  $n=12$  animais por grupo.

Como pode ser observado na figura 18, os animais de ambos os grupos de tratamento foram capazes de reconhecer o juvenil familiar durante a sessão de teste, uma vez que passaram mais tempo explorando o juvenil novo do que o familiar (one sample  $t$ -test: Fig. 18, Veh  $t(11)=2.574$ ,  $p<0.05$ ; MPH  $t(11)=5.598$ ,  $p<0.01$ ). A ANOVA de uma via demonstrou diferença significativa entre os grupos ( $F_{(3, 44)} = 20.19$ ,  $p<0.001$ ). O teste de comparações múltiplas de Bonferroni revelou diferença apenas

intra-grupo (VEH F vs. VEH N e MPH F vs. MPH N) na sessão de teste ( $p < 0.001$ ). Esses resultados estão de acordo com os resultados do tratamento agudo, demonstrando que a dependência de estado se mantém com o tratamento prolongado.

Os mesmos animais foram treinados e testados novamente, com diferentes juvenis, após 14 dias sem qualquer tratamento, a fim de verificar se existia algum efeito residual do MPH sobre a MRS, a longo prazo (Figura 19). Da mesma forma que no experimento anterior, tanto o grupo controle quanto o grupo tratado com MPH obtiveram performance normal no teste de discriminação social, sendo capazes de reconhecer o juvenil familiar (one sample  $t$ -test: Fig. 19, Veh  $t(11)=2.382$ ,  $p < 0.05$ ; MPH  $t(11)=4.856$ ,  $p < 0.01$ ). A ANOVA de uma via demonstrou diferença significativa entre os grupos ( $F_{(3, 44)} = 10.76$ ,  $p < 0.001$ ) e o teste de comparações múltiplas de Bonferroni revelou diferença apenas intra-grupo (VEH F vs. VEH N e MPH F vs. MPH N) na sessão de teste ( $p < 0.01$ ). Os dados sugerem que o MPH não produz nenhuma consequência que afete a MRS, até 14 dias após o fim do tratamento.

**Figura 19. O metilfenidato não causa efeito a longo prazo sobre a MRS, até 14 dias após o fim do tratamento**



Quatorze dias após o fim do tratamento com solução salina 0,9% (Veh) ou metilfenidato (MPH, 2 mg/kg), os animais foram treinados novamente na tarefa de discriminação social, com juvenis diferentes do primeiro experimento, e 24 h depois foram testados. Os pontos indicam a média teórica de 50%. Os dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão e apresentados em porcentagem do tempo total de exploração.  $n=12$  animais por grupo.

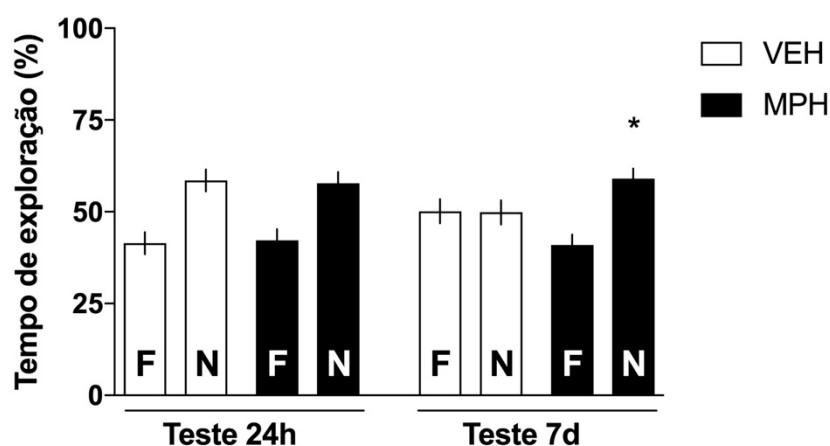
Baseados em experimentos pilotos, sabia-se que a MRS, obtida através da sessão de treino de 1 hora, durava por pelo menos 7 dias, contudo o treino de 5 minutos não (dados não mostrados). Não é possível avaliar um período maior que 7

dias em função do crescimento dos juvenis. Uma vez que não observamos nenhum efeito aparente do tratamento crônico com o MPH sobre a MRS e, considerando os diferentes efeitos dessa droga descritos na literatura, decidimos investigar se poderia haver alguma consequência sobre a persistência da memória. Para tanto, os animais foram tratados com Veh ou MPH, por 21 dias. No 20º dia de tratamento os animais foram treinados no paradigma de discriminação social, sendo expostos a um coespecífico juvenil, por somente 5 minutos. Vinte e quatro horas após, foram testados sob a apresentação do juvenil familiar e de um novo indivíduo. Como pode ser visto na figura 20, ambos os grupos experimentais apresentaram a habilidade de reconhecer o juvenil familiar preservada (one sample *t*-test: Fig. 20, Veh  $t(11)=2.856$ ,  $p<0.05$ ; MPH  $t(11)=2.542$ ,  $p<0.05$ ) no teste 24 h após. Os animais continuaram recebendo as injeções diárias de Veh ou MPH por mais 7 dias, quando foram testados novamente, na presença do mesmo juvenil familiar apresentado anteriormente e de um juvenil novo. Os animais que receberam salina não foram capazes de reconhecer o juvenil familiar (one sample *t*-test: Fig. 20, Veh  $t(11)=0.024$ ,  $p=0.98$ ), enquanto que os animais tratados com MPH despenderam mais tempo explorando o juvenil novo, o que permite inferir que evocaram a memória original (one sample *t*-test: Fig. 20, MPH  $t(11)=3.206$ ,  $p<0.01$ ). A ANOVA de uma via mostrou diferença significativa entre os grupos ( $F_{(7, 88)}=6.456$ ;  $p<0.001$ ). O teste de comparações múltiplas de Bonferroni revelou diferenças intra-grupo (VEH F 24h vs. VEH N 24h; MPH F 24h vs. MPH N 24h e MPH F 7d vs. MPH N 7d;  $p<0.01$ ), e entre grupos (VEH F 24h vs. MPH N 24h; VEH N 24h vs. MPH F 24h; MPH F 24 h vs. MPH N 7d; MPH N 24 h vs. MPH F 7d; VEH F 24h vs. MPH N 7d e VEH N 24h vs. MPH F 7d,  $p<0.001$ ), contudo não apontou diferença entre os grupos VEH e MPH no teste 7 dias após. Estes resultados sugerem que o MPH pode ter um efeito facilitador na persistência da memória.

A fim de verificar se este possível efeito perdurava, mesmo na ausência da droga, os animais foram submetidos ao tratamento com Veh ou MPH por 21 dias, sem passar por nenhuma tarefa comportamental; após 7 dias de *wash out*, foi dado início ao protocolo de discriminação social (Figura 21). Na primeira sessão de teste, 24 h após o treino de 5 minutos, tanto os animais tratados com Veh, como os com MPH, foram capazes de reconhecer o juvenil familiar (one sample *t*-test: Fig. 21, Veh  $t(13)=2.644$ ,  $p<0.05$ ; MPH  $t(13)=3.214$ ,  $p<0.01$ ). Já na segunda sessão de teste, realizada após 7 dias, ambos os grupos de animais exploraram igualmente os juvenis familiar e novo (one sample *t*-test: Fig. 21, Veh  $t(13)=0.114$ ,  $p=0.91$ ; MPH  $t(13)=0.241$ ,

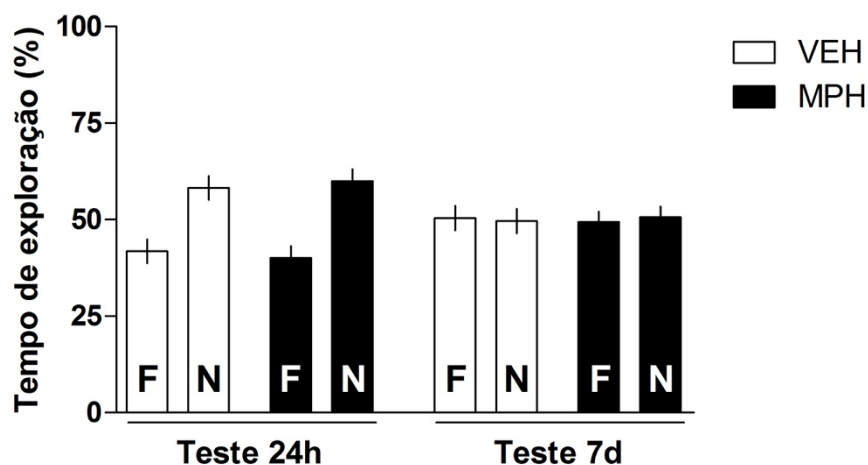
$p=0.81$ ), indicando a incapacidade de evocar a MRS. A ANOVA de uma via mostrou diferença significativa entre os grupos ( $F_{(7, 104)}=5.231$ ;  $p<0.001$ ). O teste de comparações múltiplas de Bonferroni revelou diferenças apenas intra-grupo (VEH F 24h vs. VEH N 24h; MPH F 24h vs. MPH N 24h,  $p<0.001$ ) e entre os grupos (VEH F 24h vs. MPH N 24h; VEH N 24h vs. MPH F 24h,  $p<0.001$ ) no teste 24h. Os resultados obtidos indicam que o MPH não produz efeitos sobre a MRS que perduram na ausência da droga.

**Figura 20. O tratamento crônico com metilfenidato facilita a persistência da memória de reconhecimento social.**



Os animais adultos receberam injeções intraperitoneais de solução salina 0,9% (Veh) ou metilfenidato (MPH, 2 mg/kg) durante 28 dias, sempre 30 minutos antes de qualquer sessão experimental. No 20º dia os animais foram submetidos a sessão de treino, na qual foram expostos a um juvenil desconhecido por 5 minutos. Vinte e quatro horas após, os animais foram submetidos à sessão de teste, no qual foram apresentados ao juvenil previamente encontrado, o juvenil familiar (F), e a um juvenil novo (N), e o tempo de exploração foi medido durante 5 minutos. No 28º dia os animais foram submetidos a uma nova sessão de teste, no qual foram submetidos ao juvenil familiar e a um novo juvenil. Os pontos indicam a média teórica de 50%. Os dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão e apresentados em porcentagem do tempo total de exploração.  $n=12$  animais por grupo; \* $p<0.05$ .

**Figura 21. O efeito facilitador do tratamento crônico com metilfenidato não perdura na ausência da droga.**



Os animais adultos foram submetidos ao tratamento com solução salina 0,9% (Veh) ou metilfenidato (MPH, 2 mg/kg) durante 21 dias. Após o fim do tratamento, passaram por um período de *wash out* de 7 dias, para então serem submetidos à tarefa de discriminação social com sessão de treino de 5 minutos. Vinte e quatro horas após o treino, os animais foram submetidos à primeira sessão de teste, no qual foram apresentados ao juvenil previamente encontrado na sessão de treino, o juvenil familiar (F), e a um juvenil novo (N), e o tempo de exploração foi medido durante 5 minutos. Após 7 dias, os animais foram submetidos a uma nova sessão de teste, no qual foram submetidos ao juvenil familiar e a um novo juvenil. Os pontos indicam a média teórica de 50%. Os dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão e apresentados em porcentagem do tempo total de exploração. n=14 animais por grupo.

A ANOVA de uma via não apontou diferenças significativas nos tempos de exploração durante as sessões de treino de 5 minutos, (Tabela 1;  $F_{(3, 48)}=0.864$ ;  $p=0.46$ ), nem durante as sessões de teste (Tabela 2;  $F_{(11, 140)}=1.15$ ;  $p=0.32$ ), entre os grupos, demonstrando que o MPH não exerce nenhum efeito sobre o comportamento exploratório.

**Tabela 1. Tempo total de exploração durante o treino de 5 minutos.** Dados apresentados como média  $\pm$  erro padrão.

Grupo	Tempo de exploração (s)
Veh sem <i>wash out</i>	113.0 $\pm$ 8.80
MPH sem <i>wash out</i>	129.8 $\pm$ 9.08
Veh com <i>wash out</i>	115.7 $\pm$ 7.00
MPH com <i>wash out</i>	116.1 $\pm$ 6.78

**Tabela 2. Tempo total de exploração durante o teste.** Dados apresentados como média  $\pm$  erro padrão.

<b>Grupo</b>	<b>Tempo de exploração (s)</b>
Veh 21 dias	84.6 $\pm$ 4.60
MPH 21 dias	90.6 $\pm$ 6.91
Veh 14 dias sem tratamento	88.7 $\pm$ 7.54
MPH 14 dias sem tratamento	86.4 $\pm$ 7.30
Veh sem <i>wash out</i> – Teste 24h	90.5 $\pm$ 6.44
MPH sem <i>wash out</i> – Teste 24h	92.8 $\pm$ 7.81
Veh sem <i>wash out</i> – Teste 7d	81.1 $\pm$ 3.75
MPH sem <i>wash out</i> – Teste 7d	91.2 $\pm$ 5.26
Veh com <i>wash out</i> – Teste 24h	100.9 $\pm$ 8.23
MPH com <i>wash out</i> – Teste 24h	106.2 $\pm$ 4.39
Veh com <i>wash out</i> – Teste 7d	89.1 $\pm$ 7.34
MPH com <i>wash out</i> – Teste 7d	87.2 $\pm$ 6.54

### 3.4. Discussão

Tomados em conjunto, nossos dados revelam que a memória de reconhecimento social é dependente do aumento dos níveis de dopamina e noradrenalina, causado pela administração aguda ou crônica de metilfenidato, caracterizando o fenômeno conhecido como dependência de estado. Para que ocorra a evocação da MRS, este fenômeno é dependente do córtex pré-frontal ventromedial, mas não da região CA1 do hipocampo dorsal, e do aumento dos níveis de noradrenalina e dopamina na primeira estrutura. O efeito negativo do MPH sobre o hipocampo parece ser decorrente do prejuízo que o aumento de noradrenalina causa sobre a evocação da MRS.

A dependência de estado é caracterizada por estímulos endógenos ou exógenos (drogas, hormônios, estimulação elétrica, dor, contexto ambiental, etc) capazes de modular a memória durante a consolidação e a evocação, fazendo a recordação de determinada informação possível somente se o sujeito estiver em um estado sensorial e fisiológico muito semelhante àquele em que ocorreu a aquisição/consolidação (EICH, 1980; IZQUIERDO, 2011; JAMALI-RAEUFY et al., 2011; OVERTON, 1978; RADULOVIC; JOVASEVIC; MEYER, 2017). Postula-se que esses estímulos servem como pistas para posterior evocação (IZQUIERDO, 2011).

Em humanos e roedores, o aprendizado dependente de estado é frequentemente relatado com o uso de psicoestimulantes, como a anfetamina, cocaína e cafeína (BUSTAMANTE et al., 1970; ROMIEU; LUCAS; MAURICE, 2006; SANDAY et al., 2013). Estudos das décadas de 70 e 80 apresentaram resultados controversos sobre a existência de dependência de estado por MPH, posto que relatos sugeriam que o fármaco causava o fenômeno em crianças hiperativas (SHEA, 1982; SWANSON; KINSBOURNE, 1976), enquanto uma série de outros estudos não apoiavam essa hipótese (AMAN; SPRAGUE, 1974; BECKER-MATTES et al., 1985; STEINHAUSEN; KREUZER, 1981; STEPHENS; PELHAM; SKINNER, 1984). O assunto ficou então esquecido por mais de duas décadas, até Rostron e colaboradores observarem que o MPH causava um prejuízo sobre a memória espacial, contudo este era revertido quando o fármaco estava presente em ambas as sessões de treino e teste, sugerindo um efeito de dependência de estado (ROSTRON et al., 2013). Este estudo está de acordo com os nossos achados, uma vez que

também verificamos um prejuízo da MRS, com a administração de uma dose de MPH previamente à sessão de treino, que foi revertida ao administrarmos a droga previamente à aquisição e evocação.

Rosa et al. verificou a ocorrência de dependência de estado no processo de extinção da memória de esquiva inibitória com envolvimento de noradrenalina e da via Núcleo do trato solitário → Locus coeruleus → Hipocampo (ROSA et al., 2013). O presente trabalho ilustra mais um caso de dependência de estado endógena envolvendo catecolaminas, porém desta vez compreendendo uma memória não aversiva, e um conjunto de fibras, provenientes do circuito acima citado, direcionado ao córtex pré-frontal. Ambos os estudos se encaixam na proposta, há muito descrita, de que as catecolaminas centrais figuram papéis importantes na modulação da memória (DELL, 1961; FREY; SCHROEDER; MATTHIES, 1990; GOLD; VAN BUSKIRK, 1978; IZQUIERDO, 1965; MCGAUGH, 2013; MERLO; IZQUIERDO, 1965; SARA, 2009).

Os resultados obtidos com GBR e Nisoxetina, inibidores do DAT e NET, respectivamente, indicam que ambos os neurotransmissores, DA e NA, estão envolvidos nos efeitos do MPH sobre a memória, como sugerido por DeVilbiss e Berridge (DEVILBISS; BERRIDGE, 2006). Já foi proposto anteriormente que os efeitos centrais do MPH seriam atribuídos principalmente a uma das duas catecolaminas mencionadas (GVIRTS et al., 2016; IZQUIERDO et al., 2008), contudo este trabalho refuta esta hipótese. É importante lembrar que o locus coeruleus, o maior núcleo produtor de NA do SNC, projeta fibras que inervam várias áreas cerebrais, incluindo o córtex pré-frontal e o hipocampo, e, também liberam DA (DEVOTO; FLORE, 2006; TAKEUCHI et al., 2016). Contudo, observamos que o aumento do tônus noradrenérgico na última estrutura parece ser prejudicial para a evocação da MRS, o que está de acordo com os nossos achados prévios de que o agonista  $\beta$ -adrenérgico, isoproterenol, impede a consolidação da MRS (GARRIDO ZINN et al., 2016). Estes dados divergem da literatura, que aponta que vários tipos de memória dependem da sinalização adrenérgica (GIBBS; SUMMERS, 2002; MURCHISON et al., 2004; VAN STEGEREN, 2008). No entanto, analisando os resultados obtidos aqui, juntamente àqueles descritos no Capítulo II, que mostram a modulação da MRS por diferentes sistemas de neurotransmissores na amígdala e no hipocampo (GARRIDO ZINN et al., 2016), fica claro que a regulação da MRS é muito mais complexa do que



até então se suspeitava (CAMATS PERNA; ENGELMANN, 2015; GUZMÁN et al., 2014; MESIC et al., 2015; WACKER et al., 2011; WEI et al., 2015).

Apesar de alguns estudos terem verificado prejuízo sobre as memórias espacial e de reconhecimento de objetos (LEBLANC-DUCHIN; TAUKULIS, 2007, 2009; SCHERER et al., 2010) e alterações estruturais e celulares (MOTAGHINEJAD; MOTEVALIAN; SHABAB, 2016b; RÉUS et al., 2014; SCHERER et al., 2010; VAN DER MAREL et al., 2015) com o tratamento crônico com MPH, no presente trabalho não observamos nenhum efeito deletério do tratamento sobre a avaliação comportamental da MRS, mesmo após 14 dias do fim deste. Pelo contrário, observamos um aumento da persistência da MRS que, no entanto, não se manteve na ausência do MPH. O aumento da persistência da MRS pelo MPH é apoiado pelo trabalho de Izquierdo e colaboradores, no qual memórias incidentalmente e formalmente adquiridas se tornaram mais persistentes com o uso do MPH (IZQUIERDO et al., 2008). Duas hipóteses podem ser levantadas a partir dos resultados aqui obtidos: 1) o tratamento crônico com MPH possui um efeito benéfico sobre a MRS, diferentemente de outros tipos de memórias; 2) os efeitos são resultado da dependência de estado. A segunda opção parece ser plausível, baseado na dependência de estado observada com o tratamento agudo, contudo mais estudos são necessários para descartar a primeira opção.

Os efeitos do MPH aqui descritos podem estar relacionados ao uso *off-label* da droga, por exemplo para o neuroaprimoramento cognitivo, que pode se tornar viciante. Outras drogas que alteram a recaptação celular de NA e/ou DA, como a cocaína e as anfetaminas, levam à adição. É possível que o vício resulte da busca por um “estado” cerebral para se tornar dependente (IZQUIERDO; MCGAUGH, 1995). No caso do MPH e outros medicamentos que levam a altos níveis de NA e/ou DA, este estado pode ser um efeito cognitivo que o acompanha.

A dependência de estado, observada no presente estudo, pode explicar em parte a suposta melhora cognitiva observada em seres humanos. Explica também o grande número de dados divergentes sobre os efeitos do MPH sobre a memória. Apesar de levarmos sempre em consideração a variedade de doses e formas de administração do fármaco, dos testes cognitivos empregados, da espécie e idade dos sujeitos estudados, dentre os diversos fatores que contribuem para essa variabilidade, elucidar o mecanismo de ação do MPH sobre a memória em indivíduos saudáveis

continuará sendo um tópico importante para novas pesquisas, principalmente por seu papel na saúde pública atual.

## CONCLUSÕES

Os resultados desta tese de doutorado indicam que:

- 1) A região CA1 do hipocampo dorsal, a amígdala basolateral e o córtex pré-frontal ventromedial são participantes básicos na regulação da memória de reconhecimento social;
- 2) A memória de reconhecimento social é modulada, de diferentes maneiras, pela ação da noradrenalina, dopamina e histamina sobre os receptores  $\beta$ -adrenérgicos, D1/D5 dopaminérgicos e H<sub>2</sub> histaminérgicos, na região CA1 do hipocampo dorsal e na amígdala basolateral:
  - a. A atividade normal dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos é necessária para a consolidação da MRS na BLA, enquanto que a sua ativação, na região CA1, impede a consolidação deste tipo de memória;
  - b. O bloqueio dos receptores D1/D5 na região CA1 impede a consolidação da MRS, ao passo que na BLA, o bloqueio destes receptores não possui efeito sobre a MRS;
  - c. Os receptores H<sub>2</sub> são essenciais em ambas as estruturas cerebrais para a consolidação da MRS.
- 3) O MPH, administrado de forma sistêmica aguda, previamente à aquisição da informação, bloqueia a MRS;
- 4) O bloqueio é revertido pela administração de MPH no momento da aquisição e da evocação da informação social, caracterizando o fenômeno conhecido como dependência de estado;
- 5) O aprendizado dependente de estado, associado ao uso de MPH, requer a participação do CPFvm, mas não de CA1;
- 6) O aumento de noradrenalina em CA1 prejudica a evocação da MRS;
- 7) O tratamento crônico de 21 dias com MPH causa uma maior persistência da MRS;
- 8) O efeito do MPH sobre a persistência da MRS não perdura na ausência da droga, mais uma vez sugerindo que seus efeitos sobre a MRS são decorrentes do fenômeno de dependência de estado.

Desta forma, é possível concluir que o processamento da MRS decorre de uma complexa modulação da circuitaria cerebral, que se utiliza dos sistemas noradrenérgico e dopaminérgico no hipocampo dorsal, córtex pré-frontal e amígdala basolateral, transpondo o mecanismo dependente de ocitocina, vasopressina e hormônios sexuais, já conhecido.

## REFERÊNCIAS

- ADOLPHS, R. The Social Brain: Neural Basis of Social Knowledge. **Annual Review of Psychology**, v. 60, n. 1, p. 693–716, jan. 2009.
- AHLQUIST, R. P. A study of the adrenotropic receptors. **The American Journal of Physiology**, v. 153, n. 3, p. 586–600, jun. 1948.
- AKUTAGAVA-MARTINS, G. C. et al. Genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder: current findings and future directions. **Expert Review of Neurotherapeutics**, v. 13, n. 4, p. 435–445, abr. 2013.
- ALBERTSON, T. E. et al. The Changing Drug Culture: Use and Misuse of Cognition-Enhancing Drugs. **FP essentials**, v. 441, p. 25–29, fev. 2016.
- ALMEIDA, L. G. et al. Reduced right frontal cortical thickness in children, adolescents and adults with ADHD and its correlation to clinical variables: A cross-sectional study. **Journal of Psychiatric Research**, v. 44, n. 16, p. 1214–1223, dez. 2010.
- ALVAREZ, E. O. The role of histamine on cognition. **Behavioural Brain Research**, v. 199, n. 2, p. 183–189, maio 2009.
- AMAN, M. G.; SPRAGUE, R. L. The state-dependent effects of methylphenidate and dextroamphetamine. **The Journal of Nervous and Mental Disease**, v. 158, n. 4, p. 268–279, abr. 1974.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION; AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-IV-TR**. 4th ed., text revision ed. Washington, DC: American Psychiatric Association, 2000.
- AMINOFF, M. J.; DAROFF, R. B. **Encyclopedia of the neurological sciences**. [s.l: s.n.].
- ANACKER, A. M. J.; BEERY, A. K. Life in groups: the roles of oxytocin in mammalian sociality. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 7, 2013.
- ANSELMINI, L. et al. Early determinants of attention and hyperactivity problems in adolescents: the 11-year follow-up of the 1993 Pelotas (Brazil) birth cohort study. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 26, n. 10, p. 1954–1962, out. 2010.
- ARNSTEN, A. F. T. Stimulants: Therapeutic actions in ADHD. **Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 31, n. 11, p. 2376–2383, nov. 2006.
- ARNSTEN, A. F. T. Catecholamine Influences on Dorsolateral Prefrontal Cortical Networks. **Biological Psychiatry**, v. 69, n. 12, p. e89–e99, jun. 2011.
- ARON, A. R. et al. Methylphenidate improves response inhibition in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder. **Biological Psychiatry**, v. 54, n. 12, p. 1465–1468, 15 dez. 2003.
- ATLAS, D.; MELAMED, E. Direct mapping of beta-adrenergic receptors in the rat central nervous system by a novel fluorescent beta-blocker. **Brain Research**, v. 150, n. 2, p. 377–385, 14 jul. 1978.
- BALCIOGLU, A. et al. Plasma and brain concentrations of oral therapeutic doses of methylphenidate and their impact on brain monoamine content in mice. **Neuropharmacology**, v. 57, n. 7–8, p. 687–693, dez. 2009.

- BANNERMAN, D. M. et al. Cytotoxic lesions of the hippocampus increase social investigation but do not impair social-recognition memory. **Experimental Brain Research**, v. 138, n. 1, p. 100–109, 17 abr. 2001.
- BARCKLEY, R. A. Behavioral inhibition, sustained attention, and executive functions: constructing a unifying theory of ADHD. **Psychological Bulletin**, v. 121, n. 1, p. 65–94, jan. 1997.
- BARCKLEY, R. A. **Attention-deficit hyperactivity disorder: a handbook for diagnosis and treatment**. 3rd ed ed. New York: Guilford Press, 2006.
- BARNES, W. G.; HOUGH, L. B. Membrane-bound histamine N-methyltransferase in mouse brain: possible role in the synaptic inactivation of neuronal histamine. **Journal of Neurochemistry**, v. 82, n. 5, p. 1262–1271, set. 2002.
- BARROS, D. M. et al. Simultaneous modulation of retrieval by dopaminergic D(1), beta-noradrenergic, serotonergic-1A and cholinergic muscarinic receptors in cortical structures of the rat. **Behavioural brain research**, v. 124, n. 1, p. 1–7, 28 set. 2001.
- BARROS, D.; ORTEGA, F. Metilfenidato e aprimoramento cognitivo farmacológico: representações sociais de universitários. **Saúde e Sociedade**, v. 20, n. 2, p. 350–362, jun. 2011.
- BATISTELA, S. et al. Methylphenidate as a cognitive enhancer in healthy young people. **Dementia & Neuropsychologia**, v. 10, n. 2, p. 134–142, jun. 2016.
- BATTY, M. J. et al. Cortical gray matter in attention-deficit/hyperactivity disorder: a structural magnetic resonance imaging study. **Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry**, v. 49, n. 3, p. 229–238, mar. 2010.
- BECKER-MATTES, A. et al. State-dependent learning in hyperactive children receiving methylphenidate. **The American Journal of Psychiatry**, v. 142, n. 4, p. 455–459, abr. 1985.
- BELL, S. K.; LUCKE, J. C.; HALL, W. D. Lessons for Enhancement From the History of Cocaine and Amphetamine Use. **AJOB Neuroscience**, v. 3, n. 2, p. 24–29, abr. 2012.
- BENETTI, F.; IZQUIERDO, I. Histamine infused into basolateral amygdala enhances memory consolidation of inhibitory avoidance. **The International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 16, n. 7, p. 1539–1545, 11 jan. 2013a.
- BENETTI, F.; IZQUIERDO, I. Histamine infused into basolateral amygdala enhances memory consolidation of inhibitory avoidance. **The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (CINP)**, v. 16, n. 7, p. 1539–1545, ago. 2013b.
- BEN-JONATHAN, N. Dopamine: a prolactin-inhibiting hormone. **Endocrine Reviews**, v. 6, n. 4, p. 564–589, 1985.
- BERLAU, D. J.; MCGAUGH, J. L. Enhancement of extinction memory consolidation: the role of the noradrenergic and GABAergic systems within the basolateral amygdala. **Neurobiology of learning and memory**, v. 86, n. 2, p. 123–132, set. 2006.
- BERMUDEZ-RATTONI, F. The forgotten insular cortex: Its role on recognition memory formation. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 109, p. 207–216, mar. 2014.
- BERRIDGE, C. W. et al. Methylphenidate preferentially increases catecholamine neurotransmission within the prefrontal cortex at low doses that enhance cognitive function. **Biological Psychiatry**, v. 60, n. 10, p. 1111–1120, 15 nov. 2006.

- BETHANCOURT, J. A.; CAMARENA, Z. Z.; BRITTON, G. B. Exposure to oral methylphenidate from adolescence through young adulthood produces transient effects on hippocampal-sensitive memory in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 202, n. 1, p. 50–57, 24 ago. 2009.
- BEYER, C.; STAUNTON, C.; MOODLEY, K. The implications of Methylphenidate use by healthy medical students and doctors in South Africa. **BMC Medical Ethics**, v. 15, n. 1, p. 20, 2014.
- BLANDINA, P. et al. Histamine neurons in the tuberomamillary nucleus: a whole center or distinct subpopulations? **Frontiers in Systems Neuroscience**, v. 6, 2012.
- BLANDINA, P.; PASSANI, M. B. **Histamine Receptors: Preclinical and Clinical Aspects**. Cham: Springer International Publishing, 2016.
- BLUTHÉ, R. M.; GHEUSI, G.; DANTZER, R. Gonadal steroids influence the involvement of arginine vasopressin in social recognition in mice. **Psychoneuroendocrinology**, v. 18, n. 4, p. 323–335, 1993.
- BÖCKELMANN, M. A. **Adição Diastereosseletiva de Enolatos de Titânio a Íons N-Acilimínio Cíclicos. Estudos Visando a Síntese de Alcalóides e a Síntese Assimétrica do Fármaco Cloridrato de (+)-Fenidato de Metila**. Campinas, SP: Universidade Estadual de Campinas, 2004.
- BONINI, J. S. et al. Histamine facilitates consolidation of fear extinction. **The International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 14, n. 9, p. 1209–1217, 7 jan. 2011.
- BORON, W. F.; BOULPAEP, E. L. (EDS.). **Medical physiology**. Third Edition ed. Philadelphia, PA: Elsevier, 2017.
- BOWSER, R. R.; VERBURG, K. M.; HENRY, D. P. Rat histamine N-methyltransferase. Quantification, tissue distribution, purification, and immunologic properties. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 258, n. 20, p. 12215–12220, 25 out. 1983.
- BRITTON, G. B. Cognitive and emotional behavioural changes associated with methylphenidate treatment: a review of preclinical studies. **The International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 15, n. 1, p. 41–53, fev. 2012.
- BROWN, M. W.; XIANG, J. Z. Recognition memory: neuronal substrates of the judgement of prior occurrence. **Progress in Neurobiology**, v. 55, n. 2, p. 149–189, jun. 1998.
- BUSARDÒ, F. P. et al. From Clinical Application to Cognitive Enhancement: The Example of Methylphenidate. **Current Neuropharmacology**, v. 14, n. 1, p. 17–27, 2016.
- BUSTAMANTE, J. A. et al. State dependent learning in humans. **Physiology & Behavior**, v. 5, n. 7, p. 793–796, jul. 1970.
- BYCHOWSKI, M. E.; MENA, J. D.; AUGER, C. J. Vasopressin infusion into the lateral septum of adult male rats rescues progesterone-induced impairment in social recognition. **Neuroscience**, v. 246, p. 52–58, ago. 2013.
- CACIOPPO, J. T.; DECETY, J. Social neuroscience: challenges and opportunities in the study of complex behavior: Social neuroscience. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1224, n. 1, p. 162–173, abr. 2011.
- CAHILL, L.; ALKIRE, M. T. Epinephrine enhancement of human memory consolidation: interaction with arousal at encoding. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 79, n. 2, p. 194–198, mar. 2003.

- CAHILL, L.; MCGAUGH, J. L. A Novel Demonstration of Enhanced Memory Associated with Emotional Arousal. **Consciousness and Cognition**, v. 4, n. 4, p. 410–421, dez. 1995.
- CAHILL, L.; MCGAUGH, J. L. Mechanisms of emotional arousal and lasting declarative memory. **Trends in neurosciences**, v. 21, n. 7, p. 294–299, jul. 1998.
- CAMATS PERNA, J.; ENGELMANN, M. Recognizing Others: Rodent's Social Memories. **Current Topics in Behavioral Neurosciences**, 8 dez. 2015.
- CAMPBELL, G. Cotransmission. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 27, p. 51–70, 1987.
- CARLSSON, A. et al. On the Presence of 3-Hydroxytyramine in Brain. **Science**, v. 127, n. 3296, p. 471–471, 28 fev. 1958.
- CARMACK, S. A. et al. Animal model of methylphenidate's long-term memory-enhancing effects. **Learning & Memory**, v. 21, n. 2, p. 82–89, 16 jan. 2014a.
- CARMACK, S. A. et al. Methylphenidate enhances acquisition and retention of spatial memory. **Neuroscience Letters**, v. 567, p. 45–50, maio 2014b.
- CENTONZE, D. et al. Unilateral dopamine denervation blocks corticostriatal LTP. **Journal of Neurophysiology**, v. 82, n. 6, p. 3575–3579, dez. 1999.
- CHEN, Z.; SUGIMOTO, Y.; KAMEI, C. Effects of intracerebroventricular injection of alpha-fluoromethylhistidine on radial maze performance in rats. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 64, n. 3, p. 513–518, nov. 1999.
- CHOLERIS, E. et al. Neuroendocrinology of social information processing in rats and mice. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 30, n. 4, p. 442–459, out. 2009.
- CHUHAN, Y. S.; TAUKULIS, H. K. Impairment of single-trial memory formation by oral methylphenidate in the rat. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 85, n. 2, p. 125–131, mar. 2006.
- CLATWORTHY, P. L. et al. Dopamine release in dissociable striatal subregions predicts the different effects of oral methylphenidate on reversal learning and spatial working memory. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 29, n. 15, p. 4690–4696, 15 abr. 2009.
- COOLS, A. R.; VAN ROSSUM, J. M. Excitation-mediating and inhibition-mediating dopamine-receptors: a new concept towards a better understanding of electrophysiological, biochemical, pharmacological, functional and clinical data. **Psychopharmacologia**, v. 45, n. 3, p. 243–254, 2 fev. 1976.
- CUNILL, R.; CASTELLS, X. Trastorno por déficit de atención con hiperactividad. **Medicina Clínica**, abr. 2014.
- DA SILVA, W. C. et al. Histamine enhances inhibitory avoidance memory consolidation through a H2 receptor-dependent mechanism. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 86, n. 1, p. 100–106, jul. 2006.
- DA SILVA, W. C. et al. D1/D5 dopamine receptors modulate spatial memory formation. **Neurobiol Learn Mem**, v. 97, p. 271–5, fev. 2012.
- DA SILVEIRA, C. K. B. et al. The role of histamine receptors in the consolidation of object recognition memory. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 103, p. 64–71, jul. 2013.
- DAI, H. et al. Blockage of histamine H1 receptor attenuates social isolation-induced disruption of prepulse inhibition: a study in H1 receptor gene knockout mice.



**Psychopharmacology**, v. 183, n. 3, p. 285–293, 20 out. 2005.

DAI, H. et al. Selective cognitive dysfunction in mice lacking histamine H1 and H2 receptors. **Neuroscience Research**, v. 57, n. 2, p. 306–313, fev. 2007.

DALLEY, J. W. et al. Time-limited modulation of appetitive Pavlovian memory by D1 and NMDA receptors in the nucleus accumbens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 17, p. 6189–6194, 26 abr. 2005.

DALLEY, J. W.; EVERITT, B. J. Dopamine receptors in the learning, memory and drug reward circuitry. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 20, n. 4, p. 403–410, jun. 2009.

DAMASIO, H. et al. The return of Phineas Gage: clues about the brain from the skull of a famous patient. **Science**, v. 264, n. 5162, p. 1102–1105, 20 maio 1994.

DAY, H. E. et al. Distribution of alpha 1a-, alpha 1b- and alpha 1d-adrenergic receptor mRNA in the rat brain and spinal cord. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 13, n. 2, p. 115–139, jul. 1997.

DE ALMEIDA, M. A.; IZQUIERDO, I. Memory facilitation by histamine. **Archives internationales de pharmacodynamie et de thérapie**, v. 283, n. 2, p. 193–198, out. 1986.

DE ALMEIDA, M. A.; IZQUIERDO, I. Intracerebroventricular histamine, but not 48/80, causes posttraining memory facilitation in the rat. **Archives internationales de pharmacodynamie et de thérapie**, v. 291, p. 202–207, fev. 1988.

DE CARVALHO MYSKIW, J.; BENETTI, F.; IZQUIERDO, I. Behavioral tagging of extinction learning. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 3, p. 1071–1076, 15 jan. 2013.

DE CARVALHO MYSKIW, J.; FURINI, C. R. G.; IZQUIERDO, I. Modulation of Memory Consolidation, Retrieval and Extinction by Brain Histamine. In: BLANDINA, P.; PASSANI, M. B. (Eds.). . **Histamine Receptors**. Cham: Springer International Publishing, 2016. p. 327–340.

DE LIMA, M. N. et al. Modulatory influence of dopamine receptors on consolidation of object recognition memory. **Neurobiol Learn Mem**, v. 95, p. 305–10, mar. 2011.

DELL, P. Intervention of an Adrenergic Mechanism During Brain Stem Reticular Activation. In: WOLSTENHOLME, G. E. W.; O'CONNOR, M. (Eds.). . **Novartis Foundation Symposia**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd., 1961. p. 393–409.

DELL'OSSO, B. et al. The noradrenergic action in antidepressant treatments: pharmacological and clinical aspects. **CNS neuroscience & therapeutics**, v. 17, n. 6, p. 723–732, dez. 2011.

DELLOVADE, T. L.; ZHU, Y. S.; PFAFF, D. W. Thyroid hormones and estrogen affect oxytocin gene expression in hypothalamic neurons. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 11, n. 1, p. 1–10, jan. 1999.

DERE, E. Histidine-Decarboxylase Knockout Mice Show Deficient Nonreinforced Episodic Object Memory, Improved Negatively Reinforced Water-Maze Performance, and Increased Neo- and Ventro-Striatal Dopamine Turnover. **Learning & Memory**, v. 10, n. 6, p. 510–519, 1 nov. 2003.

DEVILBISS, D. M.; BERRIDGE, C. W. Low-dose methylphenidate actions on tonic and phasic locus coeruleus discharge. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 319, n. 3, p. 1327–1335, dez. 2006.

- DEVOTO, P.; FLORE, G. On the origin of cortical dopamine: is it a co-transmitter in noradrenergic neurons? **Current Neuropharmacology**, v. 4, n. 2, p. 115–125, abr. 2006.
- DI GIOVANNI, G. et al. Monoaminergic and Histaminergic Strategies and Treatments in Brain Diseases. **Frontiers in Neuroscience**, v. 10, p. 541, 2016.
- DICKSTEIN, S. G. et al. The neural correlates of attention deficit hyperactivity disorder: an ALE meta-analysis. **Journal of Child Psychology and Psychiatry, and Allied Disciplines**, v. 47, n. 10, p. 1051–1062, out. 2006.
- DILLER, L. H. The run on Ritalin. Attention deficit disorder and stimulant treatment in the 1990s. **The Hastings Center Report**, v. 26, n. 2, p. 12–18, abr. 1996.
- DISMUKES, K.; SNYDER, S. H. Histamine turnover in rat brain. **Brain Research**, v. 78, n. 3, p. 467–481, 4 out. 1974.
- DLUZEN, D. E.; KREUTZBERG, J. D. 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) disrupts social memory/recognition processes in the male mouse. **Brain Research**, v. 609, n. 1–2, p. 98–102, 23 abr. 1993.
- DOMMETT, E. J. et al. Methylphenidate amplifies long-term plasticity in the hippocampus via noradrenergic mechanisms. **Learning & Memory**, v. 15, n. 8, p. 580–586, 6 ago. 2008.
- DOYLE, M.; KIEBLER, M. A. Mechanisms of dendritic mRNA transport and its role in synaptic tagging. **The EMBO journal**, v. 30, n. 17, p. 3540–3552, 31 ago. 2011.
- DUDAI, Y. How big is human memory, or on being just useful enough. **Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)**, v. 3, n. 5, p. 341–365, fev. 1997.
- EARLS, H. A.; CURRAN, T.; MITTAL, V. Deficits in Early Stages of Face Processing in Schizophrenia: A Systematic Review of the P100 Component. **Schizophrenia Bulletin**, v. 42, n. 2, p. 519–527, mar. 2016.
- EASTON, N. et al. Effects of amphetamine isomers, methylphenidate and atomoxetine on synaptosomal and synaptic vesicle accumulation and release of dopamine and noradrenaline in vitro in the rat brain. **Neuropharmacology**, v. 52, n. 2, p. 405–414, fev. 2007.
- EICH, J. E. The cue-dependent nature of state-dependent retrieval. **Memory & Cognition**, v. 8, n. 2, p. 157–173, 1 mar. 1980.
- EIDI, M. et al. Effects of histamine and cholinergic systems on memory retention of passive avoidance learning in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 465, n. 1–2, p. 91–96, 28 mar. 2003.
- ELLIOTT, R. et al. Effects of methylphenidate on spatial working memory and planning in healthy young adults. **Psychopharmacology**, v. 131, n. 2, p. 196–206, maio 1997.
- ENGELMANN, M. et al. Endogenous oxytocin is involved in short-term olfactory memory in female rats. **Behavioural Brain Research**, v. 90, n. 1, p. 89–94, jan. 1998.
- ENGELMANN, M.; WOTJAK, C. T.; LANDGRAF, R. Social discrimination procedure: an alternative method to investigate juvenile recognition abilities in rats. **Physiology & Behavior**, v. 58, n. 2, p. 315–321, ago. 1995.
- ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. **Behav Brain Res**, v. 31, p. 47–59, nov. 1988.
- EULER, U. S. V. A Specific Sympathomimetic Ergone in Adrenergic Nerve Fibres (Sympathin) and its Relations to Adrenaline and Nor-Adrenaline. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 12, n. 1, p. 73–97, maio 1946.

- EUSTON, D. R.; GRUBER, A. J.; MCNAUGHTON, B. L. The Role of Medial Prefrontal Cortex in Memory and Decision Making. **Neuron**, v. 76, n. 6, p. 1057–1070, dez. 2012.
- EVERTS, H. G.; KOOLHAAS, J. M. Lateral septal vasopressin in rats: role in social and object recognition? **Brain Research**, v. 760, n. 1–2, p. 1–7, 20 jun. 1997.
- FARAONE, S. V. et al. Molecular genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder. **Biological Psychiatry**, v. 57, n. 11, p. 1313–1323, 1 jun. 2005.
- FEINBERG, L. M. et al. Recognition memory for social and non-social odors: Differential effects of neurotoxic lesions to the hippocampus and perirhinal cortex. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 97, n. 1, p. 7–16, jan. 2012.
- FERGUSON, J. N. et al. Oxytocin in the medial amygdala is essential for social recognition in the mouse. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 21, n. 20, p. 8278–8285, 15 out. 2001.
- FERGUSON, J. N.; YOUNG, L. J.; INSEL, T. R. The neuroendocrine basis of social recognition. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 23, n. 2, p. 200–224, abr. 2002.
- FINSTERWALD, C.; ALBERINI, C. M. Stress and glucocorticoid receptor-dependent mechanisms in long-term memory: from adaptive responses to psychopathologies. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 112, p. 17–29, jul. 2014.
- FIORINZA, N. G. et al. Modulation of the extinction of two different fear-motivated tasks in three distinct brain areas. **Behavioural Brain Research**, v. 232, n. 1, p. 210–216, jun. 2012.
- FORLINI, C.; RACINE, E. Autonomy and Coercion in Academic “Cognitive Enhancement” Using Methylphenidate: Perspectives of Key Stakeholders. **Neuroethics**, v. 2, n. 3, p. 163–177, nov. 2009.
- FOX, G. B. Pharmacological Properties of ABT-239 [4-(2-(benzofuran-5-yl)benzimidazole)] II. Neurophysiological Characterization and Broad Preclinical Efficacy in Cognition and Schizophrenia of a Potent and Selective Histamine H3 Receptor Antagonist. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 313, n. 1, p. 176–190, 10 nov. 2004.
- FREY, U.; SCHROEDER, H.; MATTHIES, H. Dopaminergic antagonists prevent long-term maintenance of posttetanic LTP in the CA1 region of rat hippocampal slices. **Brain Res**, v. 522, p. 69–75, jul. 1990.
- FUJISAWA, T. X. et al. Visual attention for social information and salivary oxytocin levels in preschool children with autism spectrum disorders: an eye-tracking study. **Frontiers in Neuroscience**, v. 8, p. 295, 2014.
- FURINI, C. R. G. et al. D1 and D5 dopamine receptors participate on the consolidation of two different memories. **Behavioural Brain Research**, v. 271, p. 212–217, set. 2014.
- FURINI, C. R. G. et al. Extinction memory is facilitated by methylphenidate and regulated by dopamine and noradrenaline receptors. **Behavioural Brain Research**, v. 326, p. 303–306, maio 2017.
- GABOR, C. S. et al. Interplay of oxytocin, vasopressin, and sex hormones in the regulation of social recognition. **Behavioral Neuroscience**, v. 126, n. 1, p. 97–109, 2012.
- GALIZIO, M. et al. Effects of MDMA, methamphetamine and methylphenidate on repeated acquisition and performance in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 94, n. 2, p. 305–311, dez. 2009.
- GALLAGHER, M.; CHIBA, A. A. The amygdala and emotion. **Current Opinion in**

**Neurobiology**, v. 6, n. 2, p. 221–227, abr. 1996.

GALVAN, A. et al. Earlier development of the accumbens relative to orbitofrontal cortex might underlie risk-taking behavior in adolescents. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 26, n. 25, p. 6885–6892, 21 jun. 2006.

GARRETT, A. et al. Neuroanatomical abnormalities in adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder. **Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry**, v. 47, n. 11, p. 1321–1328, nov. 2008.

GARRIDO ZINN, C. et al. Major neurotransmitter systems in dorsal hippocampus and basolateral amygdala control social recognition memory. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 33, p. E4914–4919, 16 ago. 2016.

GAU, S. S.-F.; SHANG, C.-Y. Executive functions as endophenotypes in ADHD: evidence from the Cambridge Neuropsychological Test Battery (CANTAB). **Journal of Child Psychology and Psychiatry, and Allied Disciplines**, v. 51, n. 7, p. 838–849, jul. 2010.

GHEUSI, G. et al. Social and individual recognition in rodents: Methodological aspects and neurobiological bases. **Behavioural Processes**, v. 33, n. 1–2, p. 59–87, dez. 1994.

GIBBS, M. E.; SUMMERS, R. J. Role of adrenoceptor subtypes in memory consolidation. **Progress in Neurobiology**, v. 67, n. 5, p. 345–391, ago. 2002.

GOLAN, D. E. **Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

GOLD, P. E.; VAN BUSKIRK, R. Posttraining brain norepinephrine concentrations: Correlation with retention performance of avoidance training and with peripheral epinephrine modulation of memory processing. **Behavioral Biology**, v. 23, n. 4, p. 509–520, ago. 1978.

GOLDMAN-RAKIC, P. S. Regional and cellular fractionation of working memory. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 24, p. 13473–13480, 26 nov. 1996.

GOMES, K. M. et al. Chronic methylphenidate-effects over circadian cycle of young and adult rats submitted to open-field and object recognition tests. **Current Neurovascular Research**, v. 6, n. 4, p. 259–266, nov. 2009.

GOODSON, J. L.; BASS, A. H. Social behavior functions and related anatomical characteristics of vasotocin/vasopressin systems in vertebrates. **Brain Research. Brain Research Reviews**, v. 35, n. 3, p. 246–265, jul. 2001.

GREELY, H. et al. Towards responsible use of cognitive-enhancing drugs by the healthy. **Nature**, v. 456, n. 7223, p. 702–705, 11 dez. 2008.

GUNAYDIN, L. A. et al. Natural neural projection dynamics underlying social behavior. **Cell**, v. 157, n. 7, p. 1535–1551, 19 jun. 2014.

GUO, T. et al. A comparative study of the effects of ABT-418 and methylphenidate on spatial memory in an animal model of ADHD. **Neuroscience Letters**, v. 528, n. 1, p. 11–15, out. 2012.

GUR, R.; TENDLER, A.; WAGNER, S. Long-Term Social Recognition Memory Is Mediated by Oxytocin-Dependent Synaptic Plasticity in the Medial Amygdala. **Biological Psychiatry**, mar. 2014.

GUZMÁN, Y. F. et al. Role of oxytocin receptors in modulation of fear by social memory.

**Psychopharmacology**, v. 231, n. 10, p. 2097–2105, maio 2014.

GVIRTS, H. Z. et al. Novelty-seeking trait predicts the effect of methylphenidate on creativity. **Journal of Psychopharmacology (Oxford, England)**, 13 set. 2016.

HAAS, H. L.; SERGEEVA, O. A.; SELBACH, O. Histamine in the Nervous System. **Physiological Reviews**, v. 88, n. 3, p. 1183–1241, 1 jul. 2008.

HAAS, H.; PANULA, P. The role of histamine and the tuberomamillary nucleus in the nervous system. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 4, n. 2, p. 121–130, fev. 2003.

HALL, R. A. Beta-adrenergic receptors and their interacting proteins. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 15, n. 3, p. 281–288, jun. 2004.

HASENÖHRL, R. U.; WETH, K.; HUSTON, J. P. Intraventricular infusion of the histamine H(1) receptor antagonist chlorpheniramine improves maze performance and has anxiolytic-like effects in aged hybrid Fischer 344xBrown Norway rats. **Experimental Brain Research**, v. 128, n. 4, p. 435–440, out. 1999.

HAWK, L. W. et al. The effects of methylphenidate on prepulse inhibition during attended and ignored prestimuli among boys with attention-deficit hyperactivity disorder. **Psychopharmacology**, v. 165, n. 2, p. 118–127, jan. 2003.

HAXBY, NULL; HOFFMAN, NULL; GOBBINI, NULL. The distributed human neural system for face perception. **Trends in Cognitive Sciences**, v. 4, n. 6, p. 223–233, jun. 2000.

HIGUCHI, M. et al. Histamine H(1) receptors in patients with Alzheimer's disease assessed by positron emission tomography. **Neuroscience**, v. 99, n. 4, p. 721–729, 2000.

HO, J. W. et al. Bidirectional Modulation of Recognition Memory. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 35, n. 39, p. 13323–13335, 30 set. 2015.

HOLMBERG, G.; GERSHON, S. Autonomic and psychic effects of yohimbine hydrochloride. **Psychopharmacologia**, v. 2, p. 93–106, 1961.

HUANG-POLLOCK, C. L. et al. ADHD subtype differences in motivational responsivity but not inhibitory control: evidence from a reward-based variation of the stop signal paradigm. **Journal of Clinical Child and Adolescent Psychology: The Official Journal for the Society of Clinical Child and Adolescent Psychology, American Psychological Association, Division 53**, v. 36, n. 2, p. 127–136, jun. 2007.

HUOT, P. et al. The pharmacology of L-DOPA-induced dyskinesia in Parkinson's disease. **Pharmacological Reviews**, v. 65, n. 1, p. 171–222, jan. 2013.

INSEL, T. Neuropeptides and the evolution of social behavior. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 10, n. 6, p. 784–789, 1 dez. 2000.

INSEL, T. R.; FERNALD, R. D. How the brain processes social information: searching for the social brain. **Annual Review of Neuroscience**, v. 27, p. 697–722, 2004a.

INSEL, T. R.; FERNALD, R. D. HOW THE BRAIN PROCESSES SOCIAL INFORMATION: Searching for the Social Brain\*. **Annual Review of Neuroscience**, v. 27, n. 1, p. 697–722, 21 jul. 2004b.

IZQUIERDO, I. The effect of catecholamines on learning. In: **Symposium on Pharmacology of Conditioning, Learning, and Retention, II International Pharmacological Meeting**. [s.l.] M Michelson, 1965. p. 127–131.

IZQUIERDO, I. et al. Neurotransmitter receptors involved in post-training memory

processing by the amygdala, medial septum, and hippocampus of the rat. **Behavioral and Neural Biology**, v. 58, n. 1, p. 16–26, jul. 1992.

IZQUIERDO, I. et al. Mechanisms for memory types differ. **Nature**, v. 393, n. 6686, p. 635–636, 18 jun. 1998.

IZQUIERDO, I. et al. Separate mechanisms for short- and long-term memory. **Behavioural Brain Research**, v. 103, n. 1, p. 1–11, ago. 1999.

IZQUIERDO, I. et al. Age-dependent and age-independent human memory persistence is enhanced by delayed posttraining methylphenidate administration. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 49, p. 19504–19507, 9 dez. 2008.

IZQUIERDO, I. **Memória**. 2<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

IZQUIERDO, I.; MCGAUGH, J. L. Effects of drugs and alcohol on memory. In: JAFFE, J. et al. (Eds.). **The Encyclopedia of Drugs and Alcohol**. New York: Macmillan Publishing Company, 1995. v. 2p. 666–669.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. **Neurobiology of learning and memory**, v. 68, n. 3, p. 285–316, 1997.

JACKSON, D. M.; WESTLIND-DANIELSSON, A. Dopamine receptors: molecular biology, biochemistry and behavioural aspects. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 64, n. 2, p. 291–370, 1994.

JAMALI-RAEUFY, N. et al. Cross state-dependency of learning between WIN55, 212-2 and scopolamine in rat dorsal hippocampus. **Neuroscience Letters**, v. 491, n. 3, p. 227–231, 24 mar. 2011.

JAY, T. M. Dopamine: a potential substrate for synaptic plasticity and memory mechanisms. **Prog Neurobiol**, v. 69, p. 375–90, abr. 2003.

JENESON, A.; SQUIRE, L. R. Working memory, long-term memory, and medial temporal lobe function. **Learning & Memory**, v. 19, n. 1, p. 15–25, 16 dez. 2011.

JIA, F. et al. Blocking Histamine H1 Improves Learning and Mnemonic Dysfunction in Mice With Social Isolation Plus Repeated Methamphetamine Injection. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 107, n. 2, p. 167–174, 2008.

JOYCE, J. N. et al. Distribution of beta-adrenergic receptor subtypes in human post-mortem brain: alterations in limbic regions of schizophrenics. **Synapse (New York, N.Y.)**, v. 10, n. 3, p. 228–246, mar. 1992.

KANDEL, E. R.; DUDAI, Y.; MAYFORD, M. R. The Molecular and Systems Biology of Memory. **Cell**, v. 157, n. 1, p. 163–186, mar. 2014.

KAPCZINSKI, F.; QUEVEDO, J.; IZQUIERDO, I. **Bases biológicas dos transtornos psiquiátricos**. Porto Alegre: Artmed, 2004.

KEBABIAN, J. W.; CALNE, D. B. Multiple receptors for dopamine. **Nature**, v. 277, n. 5692, p. 93–96, 11 jan. 1979.

KENNEDY, D. P.; ADOLPHS, R. The social brain in psychiatric and neurological disorders. **Trends in Cognitive Sciences**, v. 16, n. 11, p. 559–572, nov. 2012.

KERR, J. N.; WICKENS, J. R. Dopamine D-1/D-5 receptor activation is required for long-term potentiation in the rat neostriatum in vitro. **Journal of Neurophysiology**, v. 85, n. 1, p.

117–124, jan. 2001.

KIM, J. et al. A perfusion fMRI study of the neural correlates of sustained-attention and working-memory deficits in chronic traumatic brain injury. **Neurorehabilitation and Neural Repair**, v. 26, n. 7, p. 870–880, set. 2012.

KIMKO, H. C.; CROSS, J. T.; ABERNETHY, D. R. Pharmacokinetics and clinical effectiveness of methylphenidate. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 37, n. 6, p. 457–470, dez. 1999.

KOFLER, M. J. et al. Working memory deficits and social problems in children with ADHD. **Journal of Abnormal Child Psychology**, v. 39, n. 6, p. 805–817, ago. 2011.

KOGAN, J. H.; FRANKLAND, P. W.; SILVA, A. J. Long-term memory underlying hippocampus-dependent social recognition in mice. **Hippocampus**, v. 10, n. 1, p. 47–56, 2000.

KÖHLER, C. A. et al. Histaminergic Mechanisms for Modulation of Memory Systems. **Neural Plasticity**, v. 2011, p. 1–16, 2011.

KRAIN, A. L.; CASTELLANOS, F. X. Brain development and ADHD. **Clinical Psychology Review**, v. 26, n. 4, p. 433–444, ago. 2006.

KUCZENSKI, R.; SEGAL, D. S. Exposure of adolescent rats to oral methylphenidate: preferential effects on extracellular norepinephrine and absence of sensitization and cross-sensitization to methamphetamine. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 22, n. 16, p. 7264–7271, 15 ago. 2002.

LANGE, K. W. et al. The history of attention deficit hyperactivity disorder. **ADHD Attention Deficit and Hyperactivity Disorders**, v. 2, n. 4, p. 241–255, dez. 2010.

LEBLANC-DUCHIN, D.; TAUKULIS, H. K. Chronic oral methylphenidate administration to periadolescent rats yields prolonged impairment of memory for objects. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 88, n. 3, p. 312–320, out. 2007.

LEBLANC-DUCHIN, D.; TAUKULIS, H. K. Chronic oral methylphenidate induces post-treatment impairment in recognition and spatial memory in adult rats. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 91, n. 3, p. 218–225, mar. 2009.

LEVY, F. Dopamine vs noradrenaline: inverted-U effects and ADHD theories. **The Australian and New Zealand Journal of Psychiatry**, v. 43, n. 2, p. 101–108, fev. 2009.

LIANG, K. C.; JULER, R. G.; MCGAUGH, J. L. Modulating effects of posttraining epinephrine on memory: involvement of the amygdala noradrenergic system. **Brain Research**, v. 368, n. 1, p. 125–133, 12 mar. 1986.

LIANG, K. C.; MCGAUGH, J. L. Lesions of the stria terminalis attenuate the enhancing effect of post-training epinephrine on retention of an inhibitory avoidance response. **Behavioural Brain Research**, v. 9, n. 1, p. 49–58, jul. 1983.

LIANG, K. C.; MCGAUGH, J. L.; YAO, H. Y. Involvement of amygdala pathways in the influence of post-training intra-amygdala norepinephrine and peripheral epinephrine on memory storage. **Brain Research**, v. 508, n. 2, p. 225–233, 5 fev. 1990.

LIM, M. M.; BIELSKY, I. F.; YOUNG, L. J. Neuropeptides and the social brain: potential rodent models of autism. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 23, n. 2–3, p. 235–243, abr. 2005.

MACDONALD, E.; KOBILKA, B. K.; SCHEININ, M. Gene targeting--homing in on alpha

- 2-adrenoceptor-subtype function. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 18, n. 6, p. 211–219, jun. 1997.
- MADRAS, B. K.; MILLER, G. M.; FISCHMAN, A. J. The Dopamine Transporter and Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. **Biological Psychiatry**, v. 57, n. 11, p. 1397–1409, jun. 2005.
- MAIER, L. J. et al. Pharmacological Cognitive Enhancement in Healthy Individuals: A Compensation for Cognitive Deficits or a Question of Personality? **PLOS ONE**, v. 10, n. 6, p. e0129805, 24 jun. 2015.
- MAKRIS, N. et al. Cortical thinning of the attention and executive function networks in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder. **Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)**, v. 17, n. 6, p. 1364–1375, jun. 2007.
- MAKRIS, N. et al. Further understanding of the comorbidity between Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder and bipolar disorder in adults: an MRI study of cortical thickness. **Psychiatry Research**, v. 202, n. 1, p. 1–11, 30 abr. 2012.
- MALMBERG-AIELLO, P. et al. Pro-cognitive effect of a selective histamine H1-receptor agonist, 2-(3-trifluoromethylphenyl)histamine, in the rat object recognition test. **Inflammation Research: Official Journal of the European Histamine Research Society ... [et AL.]**, v. 52 Suppl 1, p. S33-34, abr. 2003.
- MANDLER, G. Recognizing: The judgment of previous occurrence. **Psychological Review**, v. 87, n. 3, p. 252–271, 1980.
- MARTINS, M. R. et al. Methylphenidate treatment induces oxidative stress in young rat brain. **Brain Research**, v. 1078, n. 1, p. 189–197, mar. 2006.
- MASLEN, H.; FAULMULLER, N.; SAVULESCU, J. Pharmacological cognitive enhancement—how neuroscientific research could advance ethical debate. **Frontiers in Systems Neuroscience**, v. 8, 11 jun. 2014.
- MAYFORD, M.; SIEGELBAUM, S. A.; KANDEL, E. R. Synapses and Memory Storage. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 4, n. 6, p. a005751–a005751, 1 jun. 2012.
- MCFADYEN, M. P.; BROWN, R. E.; CARREY, N. Subchronic methylphenidate administration has no effect on locomotion, emotional behavior, or water maze learning in prepubertal mice. **Developmental Psychobiology**, v. 41, n. 2, p. 123–132, set. 2002.
- MCGAUGH, J. L. Time-dependent processes in memory storage. **Science**, v. 153, p. 1351–8, set. 1966.
- MCGAUGH, J. L. Memory--a century of consolidation. **Science**, v. 287, p. 248–51, jan. 2000.
- MCGAUGH, J. L. Memory consolidation and the amygdala: a systems perspective. **Trends in Neurosciences**, v. 25, n. 9, p. 456–461, set. 2002.
- MCGAUGH, J. L. Making lasting memories: remembering the significant. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110 Suppl 2, p. 10402–10407, 18 jun. 2013.
- MCGAUGH, J. L. Consolidating Memories. **Annual Review of Psychology**, v. 66, n. 1, p. 1–24, 3 jan. 2015.
- MCGAUGH, J. L.; ROOZENDAAL, B. Role of adrenal stress hormones in forming lasting memories in the brain. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 12, n. 2, p. 205–210, abr. 2002.



- MEGREYA, A. M. Face perception in schizophrenia: a specific deficit. **Cognitive Neuropsychiatry**, v. 21, n. 1, p. 60–72, jan. 2016.
- MEHTA, M. A. et al. Methylphenidate enhances working memory by modulating discrete frontal and parietal lobe regions in the human brain. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 20, n. 6, p. RC65, 15 mar. 2000.
- MEHTA, M. A.; GOODYER, I. M.; SAHAKIAN, B. J. Methylphenidate improves working memory and set-shifting in AD/HD: relationships to baseline memory capacity. **Journal of Child Psychology and Psychiatry, and Allied Disciplines**, v. 45, n. 2, p. 293–305, fev. 2004.
- MELLO-CARPES, P. B.; IZQUIERDO, I. The Nucleus of the Solitary Tract-Nucleus Paragigantocellularis-Locus Coeruleus-CA1 region of dorsal hippocampus pathway is important for consolidation of object recognition memory. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 100, p. 56–63, fev. 2013.
- MERLO, A. B.; IZQUIERDO, I. EFFECTS OF INHIBITORS OF O-METHYLTRANSFERASE AND OF ADRENERGIC BLOCKING AGENTS ON CONDITIONING AND EXTINCTION IN RATS. **Medicina Et Pharmacologia Experimentalis. International Journal of Experimental Medicine**, v. 13, p. 217–226, 1965.
- MESIC, I. et al. Double Dissociation of the Roles of Metabotropic Glutamate Receptor 5 and Oxytocin Receptor in Discrete Social Behaviors. **Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 40, n. 10, p. 2337–2346, set. 2015.
- MEULEN, R. H. J. TER; MOHAMED, A. D.; HALL, W. (EDS.). **Rethinking cognitive enhancement**. Oxford New York, NY: Oxford University Press, 2017.
- MILNER, B.; SQUIRE, L. R.; KANDEL, E. R. Cognitive neuroscience and the study of memory. **Neuron**, v. 20, n. 3, p. 445–468, mar. 1998.
- MINNEMAN, K. P. et al. **Brody - farmacologia humana**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.
- MOCHIZUKI, T. et al. Circadian rhythm of histamine release from the hypothalamus of freely moving rats. **Physiology & Behavior**, v. 51, n. 2, p. 391–394, fev. 1992.
- MOHAMED, A. D. Neuroethical issues in pharmacological cognitive enhancement: Neuroethical issues. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Cognitive Science**, v. 5, n. 5, p. 533–549, set. 2014.
- MORENO, R. A.; MORENO, D. H.; SOARES, M. B. DE M. Psicofarmacologia de antidepressivos. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 21, p. 24–40, maio 1999.
- MORGAN, M. J. Memory deficits associated with recreational use of “ecstasy” (MDMA). **Psychopharmacology**, v. 141, n. 1, p. 30–36, jan. 1999.
- MOTA, D. M.; OLIVEIRA, M. G. Prescrição e consumo de metilfenidato no Brasil: Identificando riscos para o monitoramento e controle sanitário. **Boletim de Farmacoepidemiologia do SNGPC - ANVISA**, v. 2, p. 1–14, jul. 2012.
- MOTAGHINEJAD, M. et al. Protective effects of forced exercise against methylphenidate-induced anxiety, depression and cognition impairment in rat. **Advanced Biomedical Research**, v. 4, n. 1, p. 134, 2015.
- MOTAGHINEJAD, M. et al. Effects of acute doses of methylphenidate on inflammation and oxidative stress in isolated hippocampus and cerebral cortex of adult rats. **Journal of Neural Transmission**, v. 124, n. 1, p. 121–131, jan. 2017.

- MOTAGHINEJAD, M.; MOTEVALIAN, M.; SHABAB, B. Neuroprotective effects of various doses of topiramate against methylphenidate induced oxidative stress and inflammation in rat isolated hippocampus. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 43, n. 3, p. 360–371, mar. 2016a.
- MOTAGHINEJAD, M.; MOTEVALIAN, M.; SHABAB, B. Effects of chronic treatment with methylphenidate on oxidative stress and inflammation in hippocampus of adult rats. **Neuroscience Letters**, v. 619, p. 106–113, abr. 2016b.
- MTA COOPERATIVE GROUP. National Institute of Mental Health Multimodal Treatment Study of ADHD follow-up: 24-month outcomes of treatment strategies for attention-deficit/hyperactivity disorder. **Pediatrics**, v. 113, n. 4, p. 754–761, abr. 2004.
- MUELLER, D.; CAHILL, S. P. Noradrenergic modulation of extinction learning and exposure therapy. **Behavioural Brain Research**, v. 208, n. 1, p. 1–11, 17 mar. 2010.
- MURCHISON, C. F. et al. A distinct role for norepinephrine in memory retrieval. **Cell**, v. 117, n. 1, p. 131–143, 2 abr. 2004.
- NADDAFI, F.; MIRSHAFIEY, A. The Neglected Role of Histamine in Alzheimer's Disease. **American Journal of Alzheimer's Disease and Other Dementias**, v. 28, n. 4, p. 327–336, 15 maio 2013.
- NIEDERMEYER, E.; NAIDU, S. B. Attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD) and frontal-motor cortex disconnection. **Clinical EEG (electroencephalography)**, v. 28, n. 3, p. 130–136, jul. 1997.
- NORMAN, G. J. et al. Social neuroscience: The social brain, oxytocin, and health. **Social Neuroscience**, v. 7, n. 1, p. 18–29, jan. 2012.
- OKUYAMA, T. et al. Ventral CA1 neurons store social memory. **Science (New York, N.Y.)**, v. 353, n. 6307, p. 1536–1541, 30 2016.
- OLARTE-SÁNCHEZ, C. M. et al. Perirhinal cortex lesions impair tests of object recognition memory but spare novelty detection. **The European Journal of Neuroscience**, v. 42, n. 12, p. 3117–3127, dez. 2015.
- ONODERA, K.; MIYAZAKI, S.; IMAIZUMI, M. Cognitive involvement by negative modulation of histamine H2 receptors in passive avoidance task in mice. **Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology**, v. 20, n. 4, p. 307, 1998.
- OVERTON, D. A. Basic mechanisms of state-dependent learning. **Psychopharmacology bulletin**, v. 14, n. 1, p. 67–68, jan. 1978.
- OVERTOOM, C. C. E. et al. Effects of methylphenidate, desipramine, and L-dopa on attention and inhibition in children with Attention Deficit Hyperactivity Disorder. **Behavioural Brain Research**, v. 145, n. 1–2, p. 7–15, 17 out. 2003.
- PARSONS, M. E.; GANELLIN, C. R. Histamine and its receptors: Histamine and its receptors. **British Journal of Pharmacology**, v. 147, n. S1, p. S127–S135, 2 fev. 2009.
- PASSANI, M. B.; BLANDINA, P. Histamine receptors in the CNS as targets for therapeutic intervention. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 32, n. 4, p. 242–249, abr. 2011.
- PASTURA, G.; MATTOS, P.; ARAÚJO, A. P. DE Q. C. [Prevalence of attention deficit hyperactivity disorder and its comorbidities in a sample of school-aged children]. **Arquivos De Neuro-Psiquiatria**, v. 65, n. 4A, p. 1078–1083, dez. 2007.
- PATRICK, K. S. et al. Pharmacology of the enantiomers of threo-methylphenidate. **The**

**Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 241, n. 1, p. 152–158, abr. 1987.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. San Diego: Academic Press, 1986.

PERLOV, E. et al. Hippocampus and amygdala morphology in adults with attention-deficit hyperactivity disorder. **Journal of psychiatry & neuroscience: JPN**, v. 33, n. 6, p. 509–515, nov. 2008.

PETRULIS, A.; EICHENBAUM, H. The perirhinal–entorhinal cortex, but not the hippocampus, is critical for expression of individual recognition in the context of the Coolidge effect. **Neuroscience**, v. 122, n. 3, p. 599–607, jan. 2003.

PIERMAN, S. et al. Activational effects of estradiol and dihydrotestosterone on social recognition and the arginine-vasopressin immunoreactive system in male mice lacking a functional aromatase gene. **Hormones and Behavior**, v. 54, n. 1, p. 98–106, jun. 2008.

PIETRAS, C. J. et al. Effects of methylphenidate on impulsive choice in adult humans. **Psychopharmacology**, v. 170, n. 4, p. 390–398, dez. 2003.

PLESSEN, K. J. et al. Hippocampus and amygdala morphology in attention-deficit/hyperactivity disorder. **Archives of General Psychiatry**, v. 63, n. 7, p. 795–807, jul. 2006.

POLANCZYK, G. et al. ADHD in a representative sample of the Brazilian population: estimated prevalence and comparative adequacy of criteria between adolescents and adults according to the item response theory. **International Journal of Methods in Psychiatric Research**, v. 19, n. 3, p. 177–184, set. 2010.

POPIK, P.; VAN REE, J. M. Neurohypophyseal peptides and social recognition in rats. **Progress in brain research**, v. 119, p. 415–436, 1998.

POPIK, P.; VETULANI, J.; VAN REE, J. M. Low doses of oxytocin facilitate social recognition in rats. **Psychopharmacology**, v. 106, n. 1, p. 71–74, 1992.

PRAST, H.; ARGYRIOU, A.; PHILIPPU, A. Histaminergic neurons facilitate social memory in rats. **Brain Research**, v. 734, n. 1–2, p. 316–318, set. 1996.

PRZYBYSLAWSKI, J.; SARA, S. J. Reconsolidation of memory after its reactivation. **Behavioural Brain Research**, v. 84, n. 1–2, p. 241–246, mar. 1997.

QI, X.-L. et al. Are beta-adrenergic receptors in the hippocampal CA1 region required for retrieval of contextual fear memory? **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 368, n. 2, p. 186–191, 4 abr. 2008.

RADELOFF, D. et al. Structural alterations of the social brain: a comparison between schizophrenia and autism. **PLoS One**, v. 9, n. 9, p. e106539, 2014.

RADULOVIC, J. et al. Modulation of learning and anxiety by corticotropin-releasing factor (CRF) and stress: differential roles of CRF receptors 1 and 2. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 19, n. 12, p. 5016–5025, 15 jun. 1999.

RADULOVIC, J.; JOVASEVIC, V.; MEYER, M. A. Neurobiological mechanisms of state-dependent learning. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 45, p. 92–98, ago. 2017.

RAINBOW, T. C.; PARSONS, B.; WOLFE, B. B. Quantitative autoradiography of beta 1- and beta 2-adrenergic receptors in rat brain. **Proceedings of the National Academy of**

- Sciences of the United States of America**, v. 81, n. 5, p. 1585–1589, mar. 1984.
- RAMOS, B. P.; ARNSTEN, A. F. T. Adrenergic pharmacology and cognition: focus on the prefrontal cortex. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 113, n. 3, p. 523–536, mar. 2007.
- RANG, H. P. **Rang & Dale farmacologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.
- RANGEL-BARAJAS, C.; CORONEL, I.; FLORÁN, B. Dopamine Receptors and Neurodegeneration. **Aging and Disease**, v. 6, n. 5, p. 349–368, set. 2015.
- REICHEL, C. M. et al. Loss of object recognition memory produced by extended access to methamphetamine self-administration is reversed by positive allosteric modulation of metabotropic glutamate receptor 5. **Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 36, n. 4, p. 782–792, mar. 2011.
- REINHARDT, M. C.; REINHARDT, C. A. U. Attention deficit-hyperactivity disorder, comorbidities, and risk situations. **Jornal de Pediatria**, v. 89, n. 2, p. 124–130, mar. 2013.
- REPANTIS, D. et al. Modafinil and methylphenidate for neuroenhancement in healthy individuals: A systematic review. **Pharmacological Research**, v. 62, n. 3, p. 187–206, set. 2010.
- RESSLER, K. J.; NEMEROFF, C. B. Role of serotonergic and noradrenergic systems in the pathophysiology of depression and anxiety disorders. **Depression and Anxiety**, v. 12 Suppl 1, p. 2–19, 2000.
- RÉUS, G. Z. et al. Brain apoptosis signaling pathways are regulated by methylphenidate treatment in young and adult rats. **Brain Research**, v. 1583, p. 269–276, 2 out. 2014.
- REZAYOF, A. et al. Modulation of ethanol state-dependent learning by dorsal hippocampal NMDA receptors in mice. **Alcohol (Fayetteville, N.Y.)**, v. 42, n. 8, p. 667–674, dez. 2008.
- RINSKY, J. R.; HINSHAW, S. P. Linkages between childhood executive functioning and adolescent social functioning and psychopathology in girls with ADHD. **Child Neuropsychology: A Journal on Normal and Abnormal Development in Childhood and Adolescence**, v. 17, n. 4, p. 368–390, 2011.
- ROHDE, L. A. et al. ADHD in a school sample of Brazilian adolescents: a study of prevalence, comorbid conditions, and impairments. **Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry**, v. 38, n. 6, p. 716–722, jun. 1999.
- ROMIEU, P.; LUCAS, M.; MAURICE, T.  $\sigma$ 1 Receptor Ligands and Related Neuroactive Steroids Interfere with the Cocaine-Induced State of Memory. **Neuropsychopharmacology**, v. 31, n. 7, p. 1431–1443, jul. 2006.
- ROSA, J. et al. Fear extinction can be made state-dependent on peripheral epinephrine: Role of norepinephrine in the nucleus tractus solitarius. **Neurobiology of learning and memory**, 23 out. 2013.
- ROSENFELD, A. J.; LIEBERMAN, J. A.; JARSKOG, L. F. Oxytocin, dopamine, and the amygdala: a neurofunctional model of social cognitive deficits in schizophrenia. **Schizophrenia Bulletin**, v. 37, n. 5, p. 1077–1087, set. 2011.
- ROSTRON, C. L. et al. The effects of methylphenidate on cognitive performance of healthy male rats. **Frontiers in Neuroscience**, v. 7, 2013.
- ROWLEY, H. L. et al. Differences in the neurochemical and behavioural profiles of lisdexamfetamine methylphenidate and modafinil revealed by simultaneous dual-probe microdialysis and locomotor activity measurements in freely-moving rats. **Journal of**

- Psychopharmacology**, v. 28, n. 3, p. 254–269, 1 mar. 2014.
- RUBIA, K.; ALEGRIA, A. A.; BRINSON, H. Brain abnormalities in attention-deficit hyperactivity disorder: a review. **Revista De Neurologia**, v. 58, n. S01, p. S3–S18, 24 fev. 2014.
- RUETTI, E. et al. Corticosterone and propranolol's role on taste recognition memory. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 127, p. 37–41, dez. 2014.
- RYU, J. H. et al. Ontogenetic development of histamine receptor subtypes in rat brain demonstrated by quantitative autoradiography. **Brain Research. Developmental Brain Research**, v. 87, n. 2, p. 101–110, 14 jul. 1995.
- SACAI, H. et al. The impairment in spatial learning and hippocampal LTD induced through the PKA pathway in juvenile-onset diabetes rats are rescued by modulating NMDA receptor function. **Neuroscience research**, 16 fev. 2014.
- SANDAY, L. et al. Role of state-dependent learning in the cognitive effects of caffeine in mice. **The International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 16, n. 7, p. 1547–1557, ago. 2013.
- SARA, S. J. Retrieval and reconsolidation: toward a neurobiology of remembering. **Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)**, v. 7, n. 2, p. 73–84, abr. 2000.
- SARA, S. J. The locus coeruleus and noradrenergic modulation of cognition. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 10, n. 3, p. 211–223, 4 fev. 2009.
- SARA, S. J.; DAVID-REMACLE, M. Recovery from electroconvulsive shock-induced amnesia by exposure to the training environment: pharmacological enhancement by piracetam. **Psychopharmacologia**, v. 36, n. 1, p. 59–66, 21 mar. 1974.
- SCHACTER, D. L. The cognitive neuroscience of memory: perspectives from neuroimaging research. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, v. 352, n. 1362, p. 1689–1695, 29 nov. 1997.
- SCHEININ, M. et al. Distribution of alpha 2-adrenergic receptor subtype gene expression in rat brain. **Brain Research. Molecular Brain Research**, v. 21, n. 1–2, p. 133–149, jan. 1994.
- SCHERER, E. B. S. et al. Methylphenidate affects memory, brain-derived neurotrophic factor immunocontent and brain acetylcholinesterase activity in the rat. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 94, n. 2, p. 247–253, set. 2010.
- SCHMIDT, K. T.; WEINSHENKER, D. Adrenaline Rush: The Role of Adrenergic Receptors in Stimulant-Induced Behaviors. **Molecular Pharmacology**, v. 85, n. 4, p. 640–650, 28 fev. 2014.
- SELBACH, O.; BROWN, R. E.; HAAS, H. L. Long-term increase of hippocampal excitability by histamine and cyclic AMP. **Neuropharmacology**, v. 36, n. 11–12, p. 1539–1548, dez. 1997.
- SEMRUD-CLIKEMAN, M. et al. Executive functioning in children with Asperger syndrome, ADHD-combined type, ADHD-predominately inattentive type, and controls. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, v. 40, n. 8, p. 1017–1027, ago. 2010.
- SHAW, P. et al. Attention-deficit/hyperactivity disorder is characterized by a delay in cortical maturation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 49, p. 19649–19654, 4 dez. 2007.
- SHEA, V. T. State-dependent learning in children receiving methylphenidate.

**Psychopharmacology**, v. 78, n. 3, p. 266–270, 1982.

SIEVER, L. J. Neurobiology of aggression and violence. **The American Journal of Psychiatry**, v. 165, n. 4, p. 429–442, abr. 2008.

SILVA, W. C. N. DA et al. D1/D5 dopamine receptors modulate spatial memory formation. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 97, n. 2, p. 271–275, fev. 2012.

SKUSE, D. H.; GALLAGHER, L. Genetic influences on social cognition. **Pediatric research**, v. 69, p. 85R–91R, 2011.

SOLANTO, M. V.; WENDER, E. H.; BARTELL, S. S. Effects of methylphenidate and behavioral contingencies on sustained attention in attention-deficit hyperactivity disorder: a test of the reward dysfunction hypothesis. **Journal of Child and Adolescent Psychopharmacology**, v. 7, n. 2, p. 123–136, 1997.

SOWELL, E. R. et al. Cortical abnormalities in children and adolescents with attention-deficit hyperactivity disorder. **Lancet**, v. 362, n. 9397, p. 1699–1707, 22 nov. 2003.

SQUIRE, L. R. Declarative and nondeclarative memory: multiple brain systems supporting learning and memory. **Journal of Cognitive Neuroscience**, v. 4, n. 3, p. 232–243, 1992.

SQUIRE, L. R. **Memory: from mind to molecules**. 2nd ed ed. Greenwood Village, Colo: Roberts & Co, 2009.

SQUIRE, L. R.; ZOLA, S. M. Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 24, p. 13515–13522, 26 nov. 1996.

SQUIRE, L. R.; ZOLA-MORGAN, S. Memory: brain systems and behavior. **Trends in neurosciences**, v. 11, n. 4, p. 170–175, abr. 1988.

SQUIRES, A. S. et al. Cytotoxic lesions of the hippocampus do not impair social recognition memory in socially housed rats. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 85, n. 1, p. 95–101, jan. 2006.

STEINHAUSEN, H. C.; KREUZER, E. M. Learning in hyperactive children: are there stimulant-related and state-dependent effects? **Psychopharmacology**, v. 74, n. 4, p. 389–390, 1981.

STEPHENS, R. S.; PELHAM, W. E.; SKINNER, R. State-dependent and main effects of methylphenidate and pemoline on paired-associate learning and spelling in hyperactive children. **Journal of Consulting and Clinical Psychology**, v. 52, n. 1, p. 104–113, fev. 1984.

STERN, S. A.; ALBERINI, C. M. Mechanisms of memory enhancement. **Wiley interdisciplinary reviews. Systems biology and medicine**, v. 5, n. 1, p. 37–53, fev. 2013.

STEVENSON, E. L.; CALDWELL, H. K. Lesions to the CA2 region of the hippocampus impair social memory in mice. **The European Journal of Neuroscience**, v. 40, n. 9, p. 3294–3301, nov. 2014.

STRAKHOVA, M. I. et al. Localization of histamine H4 receptors in the central nervous system of human and rat. **Brain Research**, v. 1250, p. 41–48, 23 jan. 2009.

STUDER, P. et al. ERP effects of methylphenidate and working memory load in healthy adults during a serial visual working memory task. **Neuroscience Letters**, v. 482, n. 2, p. 172–176, set. 2010.

SUMMERS, R. J. et al. Expression of beta 3-adrenoceptor mRNA in rat brain. **British Journal of Pharmacology**, v. 116, n. 6, p. 2547–2548, nov. 1995.

- SWANSON, J. M.; KINSBOURNE, M. Stimulant-related state-dependent learning in hyperactive children. **Science (New York, N.Y.)**, v. 192, n. 4246, p. 1354–1357, 25 jun. 1976.
- SZABADI, E. Functional neuroanatomy of the central noradrenergic system. **Journal of Psychopharmacology**, v. 27, n. 8, p. 659–693, ago. 2013.
- SZPORNY, L.; GOROG, P. Investigations into the correlations between monoamine oxidase inhibition and other effects due to methylphenidate and its stereoisomers. **Biochemical Pharmacology**, v. 8, p. 263–268, 1961.
- TAGAYA, H. [Methylphenidate: pharmacology, indication and potential of abuse]. **Nihon Rinsho. Japanese Journal of Clinical Medicine**, v. 68, n. 8, p. 1550–1555, ago. 2010.
- TAKEUCHI, T. et al. Locus coeruleus and dopaminergic consolidation of everyday memory. **Nature**, v. 537, n. 7620, p. 357–362, 7 set. 2016.
- TANIMIZU, T. et al. Functional Connectivity of Multiple Brain Regions Required for the Consolidation of Social Recognition Memory. **The Journal of Neuroscience**, v. 37, n. 15, p. 4103–4116, 12 abr. 2017.
- TANNOCK, R. et al. Effects of methylphenidate on inhibitory control in hyperactive children. **Journal of Abnormal Child Psychology**, v. 17, n. 5, p. 473–491, out. 1989.
- TAUKULIS, H. K. et al. Object memory impairment at post-drug Day 15 but not at Day 1 after a regimen of repeated treatment with oral methylphenidate. **Neuroscience Letters**, v. 566, p. 252–256, abr. 2014.
- TERAO, A. et al. Age-related changes in histamine receptor mRNA levels in the mouse brain. **Neuroscience Letters**, v. 355, n. 1–2, p. 81–84, 23 jan. 2004.
- THAPAR, A.; O'DONOVAN, M.; OWEN, M. J. The genetics of attention deficit hyperactivity disorder. **Human Molecular Genetics**, v. 14 Spec No. 2, p. R275–282, 15 out. 2005.
- THE MTA COOPERATIVE GROUP. A 14-month randomized clinical trial of treatment strategies for attention-deficit/hyperactivity disorder. The MTA Cooperative Group. Multimodal Treatment Study of Children with ADHD. **Archives of General Psychiatry**, v. 56, n. 12, p. 1073–1086, dez. 1999.
- THOMAS, M. J. et al. Activity-dependent beta-adrenergic modulation of low frequency stimulation induced LTP in the hippocampal CA1 region. **Neuron**, v. 17, n. 3, p. 475–482, set. 1996.
- THOMSEN, P. H.; PLESSEN, K. J.; HOUMANN, T. [ADHD in children and adults.]. **Ugeskrift for Laeger**, v. 176, n. 28, 7 jul. 2014.
- THOR, D. H.; HOLLOWAY, W. R. Social memory of the male laboratory rat. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 96, n. 6, p. 1000, 1982.
- TOMASI, D. et al. Methylphenidate enhances brain activation and deactivation responses to visual attention and working memory tasks in healthy controls. **NeuroImage**, v. 54, n. 4, p. 3101–3110, fev. 2011.
- TRIDAS, E. Q. (ED.). **From ABC to ADHD: what parents should know about dyslexia and attention problems**. Baltimore, Md: International Dyslexia Association, 2007.
- TRIPP, G.; WICKENS, J. R. Neurobiology of ADHD. **Neuropharmacology**, v. 57, n. 7–8, p. 579–589, dez. 2009.

- TULLY, K.; BOLSHAKOV, V. Y. Emotional enhancement of memory: how norepinephrine enables synaptic plasticity. **Molecular brain**, v. 3, n. 1, p. 15, 2010.
- TYE, K. M. et al. Methylphenidate facilitates learning-induced amygdala plasticity. **Nature Neuroscience**, v. 13, n. 4, p. 475–481, abr. 2010a.
- TYE, K. M. et al. Methylphenidate facilitates learning-induced amygdala plasticity. **Nature Neuroscience**, v. 13, n. 4, p. 475–481, abr. 2010b.
- UEKITA, T.; OKANOYA, K. Hippocampus lesions induced deficits in social and spatial recognition in *Octodon degus*. **Behavioural Brain Research**, v. 219, n. 2, p. 302–309, jun. 2011.
- UMHAU, J. C. et al. The physician's unique role in preventing violence: a neglected opportunity? **BMC medicine**, v. 10, p. 146, 2012.
- VAIDYA, C. J. et al. Selective effects of methylphenidate in attention deficit hyperactivity disorder: a functional magnetic resonance study. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 24, p. 14494–14499, 24 nov. 1998.
- VALLONE, D.; PICETTI, R.; BORRELLI, E. Structure and function of dopamine receptors. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 24, p. 125–32, jan. 2000.
- VAN DER KOOIJ, M. A.; SANDI, C. Social memories in rodents: methods, mechanisms and modulation by stress. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 36, n. 7, p. 1763–1772, ago. 2012.
- VAN DER MAREL, K. et al. Effects of long-term methylphenidate treatment in adolescent and adult rats on hippocampal shape, functional connectivity and adult neurogenesis. **Neuroscience**, v. 309, p. 243–258, 19 nov. 2015.
- VAN DER SCHANS, J. et al. Methylphenidate use and school performance among primary school children: a descriptive study. **BMC Psychiatry**, v. 17, n. 1, dez. 2017.
- VAN STEGEREN, A. H. The role of the noradrenergic system in emotional memory. **Acta Psychologica**, v. 127, n. 3, p. 532–541, mar. 2008.
- VAN WIMERSMA GREIDANUS, T. B.; MAIGRET, C. The role of limbic vasopressin and oxytocin in social recognition. **Brain research**, v. 713, n. 1, p. 153–159, 1996.
- VANDERSCHUREN, L. J. M. J. et al. Methylphenidate Disrupts Social Play Behavior in Adolescent Rats. **Neuropsychopharmacology**, v. 33, n. 12, p. 2946–2956, nov. 2008.
- VOLKOW, N. D. et al. Evidence that methylphenidate enhances the saliency of a mathematical task by increasing dopamine in the human brain. **The American Journal of Psychiatry**, v. 161, n. 7, p. 1173–1180, jul. 2004.
- VOLKOW, N. D. Prescription drugs: Abuse and addiction. **National Institute on Drug Abuse**, 2005.
- WACKER, D. W. et al. Vasopressin and social odor processing in the olfactory bulb and anterior olfactory nucleus. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1220, p. 106–116, mar. 2011.
- WANG, J. X.; COHEN, N. J.; VOSS, J. L. Covert rapid action-memory simulation (CRAMS): A hypothesis of hippocampal–prefrontal interactions for adaptive behavior. **Neurobiology of Learning and Memory**, abr. 2014.
- WANG, Y. et al. Effects of the medial or basolateral amygdala upon social anxiety and social recognition in mice. **Turkish Journal of Medical Sciences**, v. 44, n. 3, p. 353–359, 2014.



- WARBURTON, E. C.; BROWN, M. W. Neural circuitry for rat recognition memory. **Behavioural Brain Research**, 11 out. 2014.
- WEI, D. et al. Endocannabinoid signaling mediates oxytocin-driven social reward. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 45, p. 14084–14089, 10 nov. 2015.
- WEIGELT, S.; KOLDEWYN, K.; KANWISHER, N. Face identity recognition in autism spectrum disorders: A review of behavioral studies. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 36, n. 3, p. 1060–1084, mar. 2012.
- WENTHUR, C. J. Classics in Chemical Neuroscience: Methylphenidate. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 7, n. 8, p. 1030–1040, 17 ago. 2016.
- WHETSTINE, L. M. Cognitive Enhancement: Treating or Cheating? **Seminars in Pediatric Neurology**, v. 22, n. 3, p. 172–176, set. 2015.
- WILLCUTT, E. G. et al. Recent Developments in Neuropsychological Models of Childhood Psychiatric Disorders. In: BANASCHEWSKI, T.; ROHDE, L. A. (Eds.). **Advances in Biological Psychiatry**. Basel: KARGER, 2008. p. 195–226.
- WILMER, J. B.; GERMINE, L. T.; NAKAYAMA, K. Face recognition: a model specific ability. **Frontiers in Human Neuroscience**, v. 8, 10 out. 2014.
- WINSLOW, J. T.; CAMACHO, F. Cholinergic modulation of a decrement in social investigation following repeated contacts between mice. **Psychopharmacology**, v. 121, n. 2, p. 164–172, set. 1995.
- WITTER, M. P. et al. Functional organization of the extrinsic and intrinsic circuitry of the parahippocampal region. **Progress in Neurobiology**, v. 33, n. 3, p. 161–253, 1989.
- WOOD, S. et al. Psychostimulants and Cognition: A Continuum of Behavioral and Cognitive Activation. **Pharmacological Reviews**, v. 66, n. 1, p. 193–221, 16 dez. 2013.
- YAMAMOTO, K.; SHINBA, T.; YOSHII, M. Psychiatric symptoms of noradrenergic dysfunction: A pathophysiological view: Noradrenaline symptoms. **Psychiatry and Clinical Neurosciences**, v. 68, n. 1, p. 1–20, jan. 2014.
- YUAN, J.; MCCANN, U.; RICAURTE, G. Methylphenidate and brain dopamine neurotoxicity. **Brain Research**, v. 767, n. 1, p. 172–175, 29 ago. 1997.
- ZARRINDAST, M.-R. et al. Effects of  $\alpha$ -adrenoceptor agonists and antagonists on histamine-induced impairment of memory retention of passive avoidance learning in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 454, n. 2–3, p. 193–198, nov. 2002.
- ZHANG, H. T. et al. Comparison of the effects of isoproterenol administered into the hippocampus, frontal cortex, or amygdala on behavior of rats maintained by differential reinforcement of low response rate. **Psychopharmacology**, v. 159, n. 1, p. 89–97, dez. 2001.
- ZHU, N.; WEEDON, J.; DOW-EDWARDS, D. L. Oral methylphenidate improves spatial learning and memory in pre- and periadolescent rats. **Behavioral Neuroscience**, v. 121, n. 6, p. 1272–1279, 2007.
- ZLOMUZICA, A. et al. Histamine H1 receptor knockout mice exhibit impaired spatial memory in the eight-arm radial maze: Memory impairment in H1 receptor-KO mice. **British Journal of Pharmacology**, v. 157, n. 1, p. 86–91, 8 abr. 2009.

## ANEXO A – CARTA DE SUBMISSÃO DO ARTIGO

Elsevier Editorial System(tm) for  
Neurobiology of Learning and Memory  
Manuscript Draft

Manuscript Number: NLM-17-185

Title: METHYLPHENIDATE INDUCES STATE-DEPENDENCY OF SOCIAL RECOGNITION  
LEARNING: CENTRAL COMPONENTS

Article Type: Research paper

Keywords: Social recognition memory; Methylphenidate; Hippocampus;  
Prefrontal cortex; State-dependent learning.

Corresponding Author: Dr. IVAN A IZQUIERDO, MD, PhD

Corresponding Author's Institution: PUCRS, Instituto do Cerebro

First Author: Carolina G Zinn

Order of Authors: Carolina G Zinn; Leticia Bühler; Lorena E Cavalcante;  
Scheila D Schmidt; Flávia F Ferreira; Mara L Zanini; Cristiane R G  
Furini; Jociane C Myskiw; Ivan Izquierdo

Abstract: Methylphenidate (MPH) is a widely prescribed drug for the treatment of attention-deficit hyperactivity disorder. Findings in the literature suggest that the effects of MPH on memory may result from increased extracellular levels of norepinephrine (NE) and dopamine (DA). Here, we report that the systemic administration of MPH before the acquisition phase in a social discrimination task impaired the retrieval of the social recognition memory (SRM), but made it state-dependent: another administration of MPH before the retention test recovered the SRM. We observed that the induction of state dependency by MPH relies on the ventromedial prefrontal cortex (vmPFC), but not on the CA1 region of the hippocampus (CA1). Also, the inhibitors of NE and DA, nisoxetine and GBR12909, respectively, restored the SRM when infused into the vmPFC. Only the GBR12909 was able to restore the SRM in the CA1, whereas nisoxetine could not restore and even caused an impairment on memory retrieval when infused alone before the retention test. The data suggest that the state-dependence of SRM induced by MPH depends on an influence of both catecholamines on the vmPFC, while NE inhibits the retrieval of SRM on the hippocampus.

Suggested Reviewers: Mario Engelmann  
mario.engelmann@med.ovgu.de

Professor Engelmann has extensive experience in the study of social recognition memory, and has developed the paradigm that we use in this research. Thus he is highly recommended to evaluate this work

Federico Bermúdez-Rattoni  
fbermude@ifc.unam.mx

Professor Bermúdez-Rattoni has high expertise on the study of recognition memory.

Considering his ample knowledge on the molecular and structural mechanisms in the memory formation processes, his contributions in this work will be of great value.

Jelena Radulovic  
Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, Northwestern  
University, Chicago, Illinois, USA  
j-radulovic@northwestern.edu

Benno Roozendaal  
Department of Cognitive Neuroscience  
Benno.Roozendaal@radboudumc.nl