



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAIBA
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS LETRAS E ARTES
DEPARTAMENTO DE PSICOLOGIA BACHARELADO
EM PSICOLOGIA

VANESSA SOARES DIAS

**PADRONIZAÇÃO DE UMA TAREFA DE
RECONHECIMENTO E DISCRIMINAÇÃO DE OBJETOS
COM MÚLTIPLAS SESSÕES**

João Pessoa
2020

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

D541p Dias, Vanessa Soares.	Padronização de
uma tarefa de reconhecimento e	discriminação de
objetos com múltiplas sessões /	Vanessa Soares
Dias. - João Pessoa, 2020.	36 f. : il.

Orientação: Flavio Freitas Barbosa.
TCC (Especialização) - UFPB/CCHLA.

1. Memória; Reconhecimento de Objetos. 2.
Discriminação de Objetos; Múltiplas sessões. 3. Ratos
Wistar. I. Barbosa, Flavio Freitas. II. Título.

UFPB/CCHLA

Padronização de uma tarefa de reconhecimento e discriminação de objetos com múltiplas sessões

Vanessa Soares Dias

Universidade Federal da Paraíba

Trabalho apresentado como requisito para a obtenção de aprovação na disciplina Trabalho de Conclusão de Curso II, no Curso de Psicologia, na Universidade Federal da Paraíba.

Professor (a) orientador (a): Dr.
Flávio Freitas Barbosa

João Pessoa

2020

Agradecimentos

*In memoriam a **Maria da Salete**, que esteve ao meu lado durante 21 anos e que vou levar no meu coração até o fim da minha vida. Eu sinto a sua falta todos os dias e sinto muito por você não poder estar comigo nesse momento, mas vai ser pensando em você que eu vou viver todas as minhas conquistas. Te agradeço por ter me mostrado através do seu olhar que o amor faz valer a pena mesmo os momentos mais difíceis.*

*À minha família. Agradeço aos dois anjos da minha vida, meus avós **Isabel e Valdemir**. Com vocês eu sinto que posso ser criança, o sentimento é puro e me ajudou a aliviar o peso das responsabilidades. Aos meus pais, **Irene e Fábio**, eu agradeço por serem tão humanos. Meus exemplos, porque apesar de todas as dificuldades vocês resistem. Obrigada por não me deixarem desistir e trancar o curso (mais de uma vez). É injusto tentar descrever tanto sentimento em poucas palavras, mas saibam que eu os amo. E que seja a partir dessa formação que eu possa ser o apoio de vocês, assim como vocês são o meu.*

*Agradeço aos meus colegas de classe, que se tornaram amigos essenciais na minha vida – **Osório, Amanda, Pedro, Marcela, Lina, Bianca, Vinícius e João**. O que vivemos nesses 5 anos foi loucura, mas valeu a pena por estarmos juntos. Que os nossos caminhos continuem a se cruzar. E um agradecimento especial ao meu espírito conselheiro e mentor em neopets **Victor Hugo**, um dos laços mais sinceros que fiz.*

*Agradeço ao **LEMCOG**, a minha família de coração dentro da universidade. **Karen, Laís, Ana Paula, Ana Luíza, Bruno e Rochele**. Com vocês eu encontrei um sentido quando tudo parecia estar perdido. Aprendi a ser estudante, profissional, pesquisadora, cientista, ter orgulho do meu trabalho, ser forte e ao mesmo tempo humilde. Vocês foram e continuam a ser inspiração, obrigada por terem me acolhido de forma tão bonita e sincera.*

*Agradeço aos meus amigos que conheci fora dos muros da universidade, mas que fazem parte da minha vida e que percorreram esse caminho comigo: **Ingrid** (in memoriam), **Yan, Caio, Catarine, Camila, Ana Beatriz, Rafael, Thaís** e especialmente **Filipe** que me ajudou com a estética desse trabalho. Vocês são o meu refúgio.*

*E eu não poderia deixar de agradecer ao **Dr. Flávio Freitas Barbosa**, meu professor e orientador. Que me ensinou muito além do que é memória episódica, me ajudou a crescer e ser uma pessoa melhor. Eu lembro de ter pensado que não teria a capacidade nem o conhecimento necessário para entrar no laboratório, mas você me mostrou o contrário. Você me mostrou que somos iguais, que construímos e aprendemos juntos, que é preciso ter paciência e coragem, principalmente em tempos de cólera. Se permitir ser afetado e tentar sensibilizar as pessoas ao seu redor me fez ter absoluto respeito e admiração por você. Eu fui feliz e tenho orgulho da minha graduação porque a compartilhei contigo. Obrigada por tudo.*

Resumo

A memória episódica em humanos se refere a uma memória explícita rica em contextos temporais e espaciais, que representa onde e quando um determinado evento aconteceu. Ao que tudo indica, o hipocampo cria um mapa cognitivo do mundo externo a partir do reconhecimento, discriminação de objetos e localização espacial destes. Atualmente, poucas tarefas comportamentais em modelo animal conseguem avaliar a memória de reconhecimento a partir de medidas eletrofisiológicas ou o efeito de substâncias farmacológicas e novas drogas na realização de tarefas com esse tipo de demanda, pois é necessário que se realize mais de um teste por dia. Por isso, no presente trabalho, buscamos adaptar e padronizar um protocolo com múltiplas sessões, possibilitando que esses elementos sejam abarcados num experimento, além de permitir que o número de animais seja consideravelmente reduzido e ter um maior número de dados por animal, sem reduzir o poder estatístico. Foram utilizados 5 ratos *Wistar* machos com aproximadamente 4 meses. Os animais foram submetidos a uma tarefa de reconhecimento de objetos simples (NOR) e discriminação de objetos (DISC) em diferentes níveis de similaridade, entre 25%, 50% e 75%, com múltiplas sessões. As tarefas são compostas por 10 sessões, cada uma composta com fases de amostra e testes. Na amostra o animal foi exposto a três objetos idênticos feitos com peças de lego, em posições específicas, e nos testes um dos objetos apresentados na amostra era substituído. Os resultados apontam que os animais apresentaram índices significativos para o teste de reconhecimento de objetos em todos os dias. Para a tarefa de discriminação, apenas para o nível de similaridade 25% resultados significativos foram encontrados no primeiro dia de teste, para os níveis de similaridade 50% e 75% nenhum valor esteve acima do acaso. Esse experimento parecer ser um modelo promissor como base para protocolos comportamentais.

Palavras-chave: Memória; Reconhecimento de Objetos; Discriminação de Objetos; Múltiplas sessões; Ratos Wistar.

Abstract

The episodic memory in humans refers to an explicit memory rich in temporal and spatial contexts, which represents where and when a given event occurred. Apparently, the hippocampus creates a cognitive map of the external world from the recognition, discrimination of objects and their spatial location. Currently, few behavioral tasks in animal model are able to assess recognition memory using electrophysiological measures or the effect of pharmacological substances and new drugs in performing tasks with this type of demand, since it is necessary to perform more than one test per day. Therefore, in the present work, we seek to adapt and standardize a protocol with multiple sessions, allowing these elements to be included in an experiment, in addition to allowing the number of animals to be considerably reduced and have a greater number of data per animal, without reducing statistical power. Five male *Wistar* rats aged approximately 4 months were used. The animals were submitted to a task of simple object recognition (NOR) and object discrimination (DISC) at different levels of similarity, between 25%, 50% and 75%, with several sessions. The tasks consists of 10 sessions, each composed of sample and test phases. In the sample phase the animal was exposed to three identical objects made with lego pieces, in specific positions, and in the tests, one of the objects presented in the sample was replaced. The results show that the animals presented significant indexes for the object recognition test every day. For the discrimination task, only for the level of similarity 25% significant results were found on the first day of testing, for the levels of similarity 50% and 75% no value was above chance. This experiment appears to be a promising model as a basis for behavioral protocols.

Keywords: Memory; Object Recognition; Discrimination of Objects; Multiple sessions; Wistar Rats.

Sumário

Introdução	6
Métodos	12
1. Aparatos	12
2. Objetos	13
3. Animais	14
4. Procedimentos Comportamentais	14
4.1.1 Manipulação, Habituação e Modelagem	15
4.1.2 Tarefa de Reconhecimento de Objetos (NOR)	16
4.1.3 Tarefa de discriminação de objetos em diferentes níveis de similaridade (DISC)	17
5. Análises	18
Resultados	20
Discussão	26
Conclusão	29
Referências	30
Anexos	35

Introdução

A memória se refere a capacidade de adquirir, consolidar e evocar experiências e informações de forma implícita e/ou explícita. Nesse sentido, permite reviver ou restabelecer o passado em relação ao presente e futuro. Ela é composta por sistemas distintos, porém relacionados entre si, que possibilitam um processo de aprendizagem persistente através do tempo, sendo essa uma função cognitiva complexa essencial para a sobrevivência (Pause et al., 2013).

As memórias implícitas e explícitas podem ser duas classes separadas, mas amplamente equivalentes de aprendizagem (Baddeley, Anderson & Eysenck, 2011). Em relação à memória implícita, podemos defini-la como sendo um conjunto de habilidades adquiridas de forma associativa ou não, que se expressam através de hábitos ou ações automatizadas, ou seja, que não exigem um esforço consciente para sua realização e podem durar a vida toda (Squire, 2004; Clark & Squire, 2010; Squire & Kandel, 2003; Izquierdo, 2018). Essa memória é demonstrada mais pelo desempenho do que por uma evocação consciente, como por exemplo o condicionamento clássico, o *priming* perceptual e a aprendizagem procedural (Baddeley, Anderson & Eysenck, 2011).

Segundo Tulving (2002), a memória explícita pode ser dividida em duas categorias, semântica e episódica. A semântica compreende conhecimentos gerais que formam a percepção de mundo do sujeito, enquanto a episódica é explícita e específica em contextos temporais e espaciais, concebendo quando e onde um determinado evento aconteceu. O termo “viagem mental no tempo” é utilizado por ele para enfatizar que a memória episódica nos permite reviver o passado e a partir disto imaginar o futuro.

Também se discute que esses eventos específicos são os que formam a base da memória semântica, sendo assim difícil conceber essas memórias de forma exclusiva (Baddeley, Anderson & Eysenck, 2011).

Em outros animais, essa memória seria uma memória “similar à episódica”, ou seja, é possível aos animais terem experiências vivenciadas no passado que influenciam o presente e/ou o futuro, mas sem consciência autoconsciente (Clayton, 2003). Assim, podemos pensar que os animais possuem uma forma implícita de memória episódica e que, portanto, possuem habilidades para integrar e lembrar os elementos “quê, quando e onde” de eventos pessoais, o que pode ser percebido em seus comportamentos. Dessa forma, o termo “similar à episódica” é utilizado para inferir, por meio do comportamento, “o quê”, “onde” e “quando” determinado evento ocorreu. Mas para isso, os três componentes devem ser evocados simultaneamente em uma única experiência (Menzel, 1999; Fortin, Wright & Eichenbaum, 2004).

Um exemplo que ilustra esse tipo de memória em animais seria o experimento de Clayton e Dickinson (1999), em que aves tinham que lembrar onde tinham escondido certo tipo de alimento e decidir qual seria melhor comer dependendo do intervalo de tempo entre o esconder e a oportunidade de recuperar. As aves, além de conseguirem lembrar o momento e onde o alimento foi escondido, também escolheram comer as minhocas quando o intervalo de tempo era curto e os amendoins após um intervalo mais longo.

Tanto em seres humanos quanto em animais, estudos demonstram que o hipocampo é a estrutura mais importante no cérebro para o processamento da memória episódica. Com certeza o caso mais famoso que ilustra essa associação em seres humanos é o do paciente H.M., que para tratar sua epilepsia crônica foi submetido à uma lobotomia

temporal medial bilateral completa. Por consequência da remoção do seu hipocampo o paciente passou a sofrer de uma amnésia anterógrada (Baddeley, Anderson & Eysenck, 2011; Sekeres, Winocur & Moscovitch, 2018; Brown & Banks, 2015, Clark & Squire, 2010; Eichenbaum et al., 2007; Augustinack et al., 2014).

Outros tipos de prejuízos na memória são percebidos ao longo da vida, no processo natural de envelhecimento, ou em transtornos neurodegenerativos como na doença de Alzheimer. O hipocampo e as sub-regiões do giro-denteado e CA3 são as principais regiões afetadas, assim como o córtex perirrinal. E assim como em seres humanos, os animais também sofrem com o envelhecimento. Mudanças nas entradas corticais para o hipocampo podem contribuir para um declínio da memória episódica e diminuição da capacidade de manter representações detalhadas de eventos, necessários para uma memória em sua totalidade (Toner et al., 2009; Johnson et al., 2017; Maurer et al., 2017).

Estudos em modelo animais demonstram que ao lesionar o hipocampo de roedores estes passam a ter prejuízos no desempenho em tarefas não espaciais, como por exemplo, a de memória de reconhecimento de objetos (Clark et al. 2000; Fortin, Wright & Eichenbaum, 2004), de associação de odores (Bunsey and Eichenbaum 1996), memória temporal (Fortin, Wright & Eichenbaum, 2004; Kesner et al. 2002) e transmissão social da preferência alimentar (Alvarez et al. 2001).

Ao que tudo indica, o hipocampo cria um mapa cognitivo do mundo externo a partir do reconhecimento, discriminação de objetos e localização espacial destes. E apesar de fazerem parte de uma classificação maior, os componentes da memória episódica (“que, quando e onde”), podem ser estudados de maneira distinta. Por exemplo, Manns e Eichenbaum (2009), desenvolveram uma tarefa de memória de reconhecimento e realizaram um estudo onde encontraram que é possível através desta avaliar o

desempenho de ratos no reconhecimento de objetos (o “que”) e de informações espaciais (o “onde”). Além disso, conseguiram fazer uma correlação com um padrão de atividade no hipocampo, a partir da gravação simultânea de 43 a 61 células piramidais do hipocampo de ratos enquanto realizavam a tarefa. E foi constatado que mesmo o simples reconhecimento de objetos é em parte apoiado pela lembrança de itens no contexto em que ocorreu a experiência (O’Keefe & Dostrovsky, 1971; Zola et al., 2000; Fortin, Wright & Eichenbaum, 2004).

Então, a memória de reconhecimento – que por definição envolve a capacidade de distinguir entre novos estímulos e estímulos familiares – pode ser considerada uma categoria dentro da memória episódica (Kinnavane, Albasser & Aggleton, 2015; Cohen & Stackman, 2015). Dentro da memória de reconhecimento temos a familiaridade e a recordação. Aqui se entende a familiaridade como saber que conhece ou já vivenciou algo (pode ser uma experiência/evento, pessoa ou objeto), mas sem a referência detalhada de como, onde ou quando; ou seja, sem a lembrança consciente dos elementos contextuais. Por sua vez, a recordação é a lembrança com essa referência contextual (Cohen & Stackman, 2015; Eichenbaum, Yonelinas & Ranganath, 2007).

Podemos identificar um fator essencial na codificação e evocação da memória de reconhecimento, que é a separação de padrões. Considerado um processo, a separação de padrões é o que permite a discriminação entre dois estímulos muito parecidos. A partir dessa discriminação é possível criar e armazenar representações únicas de eventos similares, fundamental para a sobrevivência e adaptação de seres humanos e animais, pois a associação e o reconhecimento de uma ameaça à determinado estímulo ou evento vai influenciar comportamentos de preservação – luta ou fuga ou outras estratégias cognitivas (Josey & Brigman, 2015; Gilbert & Kesner, 2006; Miranda et al., 2017).

Uma tarefa referencial para avaliar a memória de reconhecimento em modelo animal é a de Ennaceur e Delacour (1988). Essa tarefa busca utilizar o comportamento exploratório natural do rato para a novidade, sem treinamento para emissão de respostas corretas ou reforço positivo e negativo (Ennaceur & Delacour, 1988; Ennaceur, 2010), sendo possível a partir desta mensurar e avaliar o componente de reconhecimento da memória episódica, o “que”. O importante desta tarefa é a tentativa de fazer com que haja uma aproximação do que seria o comportamento do animal em um ambiente natural dentro de um espaço controlado.

Em comparação com a tarefa “*bow-tie maze*”, Ameen-Ali, Eacott e Easton (2012), desenvolveram um paradigma que permite múltiplas sessões numa tarefa de reconhecimento de objetos. Nesse paradigma, durante a realização da tarefa a localização do objeto pode ser alterada para criar um contexto, enquanto o animal é mantido numa área de retenção. O grande diferencial são as múltiplas sessões, que permite que o número de animais seja consideravelmente reduzido e que haja um maior número de dados por animal, sem reduzir o poder estatístico.

Além disso, pode ser possível diminuir o estresse dos animais, que acaba se tornando um viés nos resultados, pois o manuseio e deslocamento do animal pelo experimentador e no aparato é menor (Hurst & West, 2010). É importante pensar que esse tipo de paradigma pode viabilizar estudos mais rápidos, sem que isso interfira na qualidade dos resultados.

Atualmente, poucas tarefas conseguem avaliar a memória de reconhecimento a partir de medidas eletrofisiológicas ou o efeito de substâncias farmacológicas e novas drogas na realização de tarefas com esse tipo de demanda, pois é necessário que se realize mais de um teste por dia. Por isso, construir um protocolo com múltiplas sessões pode

possibilitar que esses elementos sejam abarcados num experimento (Roloff, Muller & Brown, 2016; Ameen-Ali, Eacott & Easton, 2012).

A perspectiva de ser possível fazer um registro eletrofisiológico em uma tarefa de reconhecimento de objetos com múltiplas sessões é promissora, uma vez que ainda se conhece pouco sobre como a atividade oscilatória do cérebro pode estar relacionada com a memória e seus subtipos, bem como os substratos neurais relacionado aos elementos “que”, “quando” e “onde” (Byun & Lee 2010; Brown & Banks, 2015). Por isso, o presente trabalho teve como objetivo adaptar e padronizar uma tarefa de reconhecimento simples e discriminação com múltiplas sessões baseado no protocolo proposto por Manns e Eichenbaum (2009).

Métodos

1. Aparatos

Foi utilizado um campo aberto com 90 cm de diâmetro e 45 cm de altura. No centro do campo havia uma parede circular com 40 cm de diâmetro e 40 cm de altura, com uma caixa preta opaca no centro (30 cm de comprimento x 15 cm de largura x 40 cm de altura, figura 01) (Manns & Eichenbaum, 2009). A caixa possuía uma porta que abria para uma pista externa de 25 cm de largura. A esquerda da saída da caixa, uma segunda porta foi colocada para impedir que os animais se deslocassem no sentido anti-horário. Ambas as portas funcionavam manualmente; o controle era feito através de uma sala adjacente ao local de experimento. O aparato foi produzido com material acrílico incolor envolto com uma cobertura preta, com o piso preto, dividido em 12 partes iguais, como apresentado na Figura 1. A luminosidade média durante a realização dos procedimentos foi de aproximadamente 7 lux. Também durante todos os procedimentos um ruído branco foi utilizado. O campo, a caixa central e os objetos sempre eram limpos com solução de álcool etílico 5% depois de cada sessão, e ao fim de cada dia de experimento com álcool 70%.

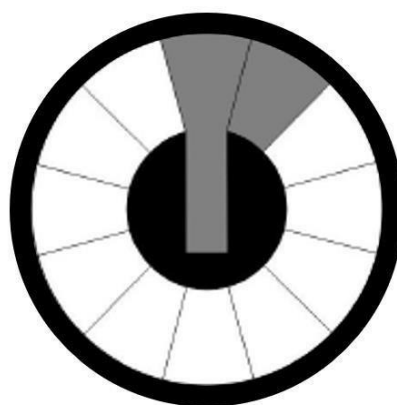


Figura 1. Aparato utilizado durante os experimentos.

2. Objetos

Os objetos foram construídos a partir de peças de lego para todas as tarefas. Os pares de objetos eram correspondentes em volume, forma e textura, variando apenas sistematicamente os recursos visíveis compartilhados. Para a tarefa de reconhecimento de objetos foram utilizados 40 objetos com 20 formas diferentes baseados nos objetos elaborados por Johnson et al. (2017) – os quais medem em torno de 6 a 9 cm de altura, construídos sobre uma base de lego de 6,5cm x 6,5 cm. Para a tarefa de discriminação de objetos foram utilizados 60 objetos, com 40 formas em diferentes níveis de similaridade. Foram estabelecidos os valores sistemáticos (25%, 50 e 75%) de similaridade da forma dos objetos com base no volume e compartilhamento de características 3D (imagem em anexos). A sistematização da sobreposição de recursos da forma entre os objetos novos e familiares foi calculada segundo o protocolo elaborado por Johnson et al. (2017).

Exemplo de objetos utilizados na figura 2.



Figura 2. A e B - Objetos utilizados na tarefa de discriminação. Da esquerda para a direita: Objeto padrão original, objeto com 25% de similaridade, objeto com 50% de similaridade e o objeto de 75% de similaridade.

3. Animais

O estudo recebeu aprovação pelo Comitê de Ética da Universidade Federal da Paraíba (CEUA) sob o nº 3512260918 e os procedimentos realizados estavam de acordo com as diretrizes da legislação brasileira para a utilização de animais em pesquisa (Lei Arouca, nº 11.794/08). A Unidade de Produção Animal – IpeFarM da Universidade Federal da Paraíba disponibilizou os animais.

Foram utilizados 5 ratos machos adultos da linhagem *Wistar* com aproximadamente 4 meses de idade. Os animais foram mantidos em uma sala com controle acústico, de umidade e temperatura ($24 \pm 1^\circ\text{C}$). Submetidos a um ciclo claroescuro de 12:12 horas, e todos procedimentos aconteceram na fase clara do ciclo – entre 10:00 e 18:00 horas. Os animais estavam alocados em duplas em gaiolas com 37 cm de comprimento x 30 cm de largura x 16 cm de altura. Os animais de uma gaiola ficavam separados através de uma divisória acrílica acoplada no meio, dividindo-a em dois compartimentos iguais. A fim de aumentar a exploração espontânea, os ratos passaram por uma restrição alimentar – 13g/dia, para que seus pesos permanecessem em torno de 85% do seu peso em alimentação livre (Miranda et al., 2017; Tomanari, Pine & Silva, 2003). Os animais recebiam recompensas alimentares – glóbulos de açúcar – dispostas ao lado de todos os objetos nas amostras e testes dos experimentos. A pesagem de cada animal era feita todos os dias.

4. Procedimentos Comportamentais

Os animais passaram por procedimentos de manipulação, habituação e modelagem, após esses procedimentos os animais foram submetidos a padronização

das tarefas de reconhecimento de objetos e discriminação de objetos em diferentes níveis de similaridade. Como não seria possível realizar uma tarefa comportamental de forma adequada em apenas 1 dia, devido ao tempo gasto necessário para tal, separou-se cada tarefa em dois dias (bateria 1 e 2), para que uma possível fadiga dos animais não interferisse nos resultados. Houve uma pausa de 1 dia entre as baterias de uma mesma tarefa e de 2 dias para que se começasse uma nova (figura 3). Toda atividade do animal dentro do campo foi gravada por uma WebCam (FaceCam 1020, Genius®) situada a 90cm acima do centro da área, através do software DebutVideo Capture.



Figura 3. Ilustração dos procedimentos comportamentais e seus respectivos dias.

4.1.1. Manipulação, Habituação e Modelagem

Os animais eram levados à sala de experimentos com 30 minutos de antecedência, com o intuito de se habituarem ao espaço e possivelmente diminuir o estresse antes dos procedimentos experimentais. Nesse sentido, os animais também foram manipulados por 15 minutos durante 5 dias pelo experimentador. Em seguida, foram habituados ao aparato experimental, e modelados até aprenderem a percorrer (no sentido horário) todo o campo.

Para isso eles recebiam recompensas alimentares dentro da caixa localizada no centro do aparato. Os ratos foram expostos a objetos durante o treinamento, mas novos objetos foram usados durante as tarefas.

A modelagem ocorreu de forma padrão, independente do experimento: Durante cada volta a porta central era mantida aberta, após a finalização de 1 volta no campo o animal retornava a esta caixa, porém a recompensa era dada apenas após 3 voltas. A recompensa (glóbulos de açúcar) no centro da caixa era oferecida com auxílio de um dispensador de pellets (Insight, Brasil) de acionamento manual, anexa à caixa no centro. Os animais foram considerados modelados quando conseguiam realizar 3 sessões seguidas de 3 voltas corretas e então eram considerados aptos para a realização da tarefa de reconhecimento de objeto e discriminação de objetos em diferentes níveis de similaridade.

4.1.2. Tarefa de Reconhecimento de Objetos (NOR)

Para a padronização dessa tarefa, ela foi composta por duas fases dentro de uma sessão, sendo uma amostra e uma de teste. Os animais deviam realizar 3 voltas na pista circular, enquanto exploravam os objetos para cada fase de amostra e teste. Foi dado intervalos de 3 minutos entre as fases. Ao todo foram realizadas 10 sessões, sendo uma bateria correspondente a 5 sessões por dia (figura 3). O intervalo entre as sessões era de cinco minutos. Na fase de amostra o animal era exposto à três objetos idênticos, em posições diferentes. Então no momento do teste eram dispostas duas cópias idênticas dos objetos apresentados na amostra e um novo objeto totalmente distinto. Todos os objetos foram colocados na mesma posição em que os objetos foram expostos na amostra, de acordo com a figura 4. A posição e formas dos objetos foram contrabalanceados para os animais.

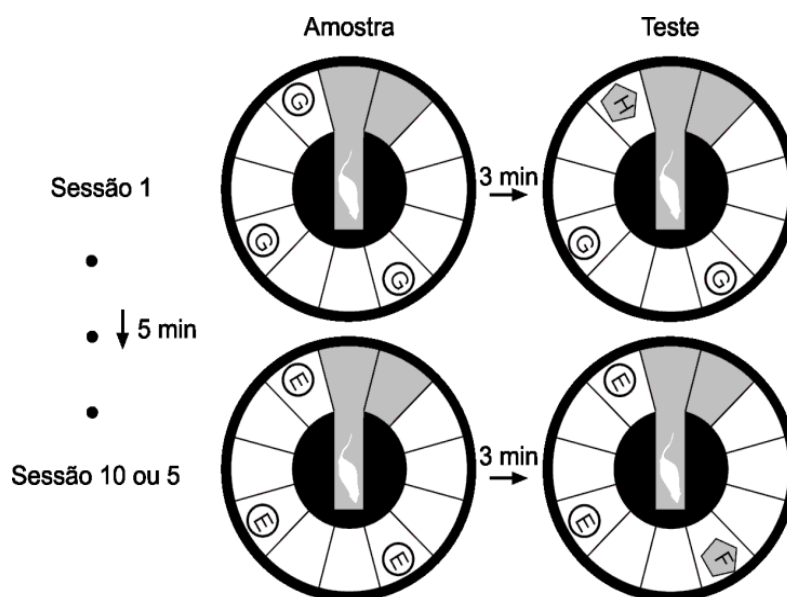


Figura 4. Modelo do desenho experimental de múltiplas sessões. G, H, E e F representam os objetos e suas respectivas posições no aparato.

4.1.3. Tarefa de discriminação de objetos em diferentes níveis de similaridade (DISC)

Essa tarefa foi composta por quatro fases dentro de uma sessão, sendo 1 de amostra e 3 de teste, também com um intervalo de 3 minutos entre elas. Da mesma forma que foi feita a padronização da tarefa anterior, os animais precisavam realizar 3 voltas completas no campo, com exploração dos objetos para cada fase de amostra e teste. Também foram realizadas 10 sessões com cinco minutos de intervalo entre elas, divididas em duas baterias (5 sessões/dia).

Na fase de amostra o animal foi exposto a 3 objetos idênticos, em posições diferentes. No primeiro teste um dos objetos é substituído por um novo que possui um grau de similaridade com o antigo, podendo ser de 25%, 50% ou 75% (3/3). Na configuração do segundo teste temos um objeto da amostra, o objeto recém alterado em grau de similaridade no primeiro teste e um novo objeto com um grau de similaridade diferente do disposto no primeiro teste em relação aos da amostra (2/3). Então no último teste o último objeto com grau de similaridade diferente foi introduzido (1/3), substituindo

o objeto da amostra que permanecia constante nos testes anteriores, ou seja, no último teste nenhum objeto da amostra aparece, apenas os seus equivalentes em grau de similaridade. Durante os 3 testes todos os objetos foram mantidos nos mesmos locais em que apareciam pela primeira vez. A posição, formas dos objetos, lugar e grau de similaridade foram randomizados quanto à ordem de apresentação na tarefa entre os animais (figura 5).

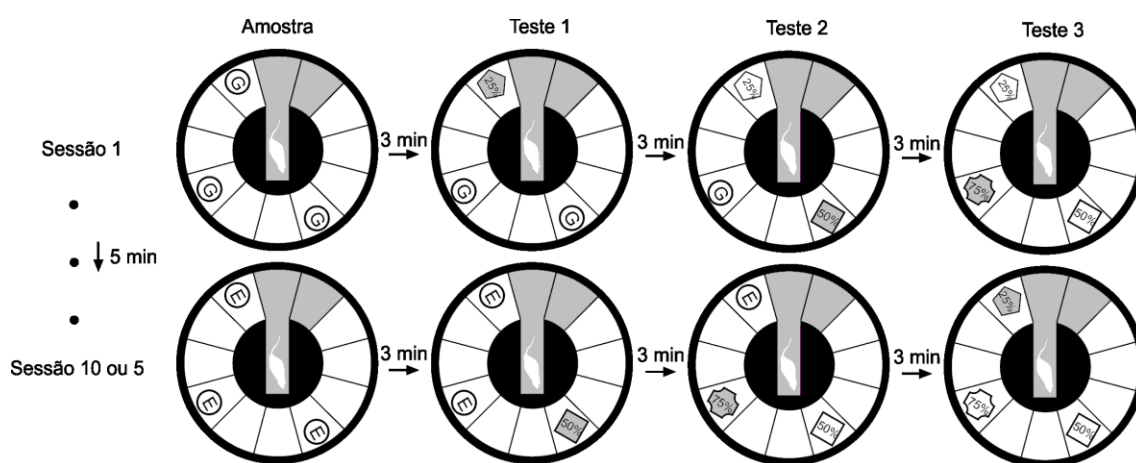


Figura 5. Modelo do desenho experimental de múltiplas sessões. G e E representam os objetos e suas respectivas posições no aparato. % representa o grau de similaridade.

5. Análises

Foi definido como exploração quando o focinho do animal tocava ou estivesse a menos de 1 cm do objeto. Não foi considerado exploração quando o animal se apoiava no objeto para explorar o ambiente, ou quando permanecia com o focinho próximo ao objeto sem atividade exploratória. O levantamento desses dados foi realizado com o auxílio do *EthoWatcher* (Junior et al., 2012). As análises estatísticas foram conduzidas com o programa SPSS (24.0); diferenças foram consideradas estatisticamente significantes com um valor de p menor que 0,05.

Foi analisada a motivação do animal para explorar o objeto novo em comparação com o objeto familiar, sendo assim foi feito um índice do reconhecimento para a novidade.

Foram avaliados os seguintes parâmetros: tempo total de exploração dos três objetos e o índice de discriminação de objetos – através da relação da taxa de exploração do objeto familiar e do objeto novo. A taxa de exploração é uma medida que mostra a exploração de um objeto em relação à exploração de todos os objetos somados. O índice de discriminação é uma medida que demonstra quanto um objeto foi explorado em relação ao outro (figura 6). A taxa de discriminação varia de -1 a +1, com escores negativos indicando preferência pelo objeto familiar e escores positivos significando preferência pelo novo objeto (Inostroza et al, 2013; Ennaceur & Delacour, 1988; Cohen & Stackman, 2015).

$$\begin{array}{c} \textbf{Índice de discriminação} \\ \\ \textbf{N-F} \\ / \\ \textbf{N+F} \\ \\ \textbf{Valor entre -1 e 1} \end{array}$$

Figura 6. Demonstração da construção da medida do índice de discriminação.

A normalidade foi verificada através do teste de Shapiro-Wilk. Para os parâmetros comportamentais foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de medidas repetidas seguida do teste post-hoc de Bonferroni, e quando a comparação foi feita para duas variáveis do mesmo grupo foi utilizado o teste t de Student pareado. O teste t de uma amostra foi utilizado para os índices de discriminação, com valor de acaso em 0. Também foi calculado o tamanho do efeito (T.E) para cada teste estatístico realizado através do software G*Power 3 (Erdfelder, Faul, Buchner & Lang, 2009). O tamanho do efeito pode ser classificado em baixo, médio e alto (Cohen, 1988; Lakens, 2013).

Resultados

Tarefa NOR

Em relação a tarefa NOR, a média do índice de discriminação dos dias 1 e 2 e a média total demonstrou que os ratos apresentaram memória de reconhecimento dos objetos, uma vez que seus índices foram significativos tanto para o dia 1 [$t(4) = 6,04$, $p = 0,004$; $dz = 2,70$] e 2 [$t(4) = 2,90$, $p = 0,04$; $dz = 1,30$] quanto para o total [$t(4) = 4,27$, $p = 0,013$; $dz = 1,91$].

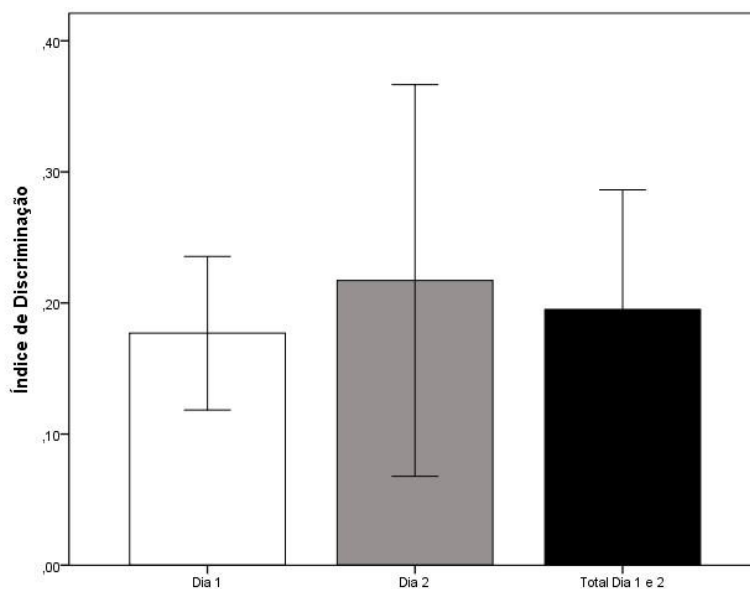


Figura 7. Índice discriminação tarefa NOR por dia e total.

A análise por sessão aponta que apenas a sessão 1 [$t(4) = 4,16$, $p = 0,014$; $dz = 1,86$] e 8 [$t(4) = 2,81$, $p = 0,048$; $dz = 1,26$] obtiveram índices significativos, todas as demais sessões apresentaram índices não diferentes do acaso ($p > 0,05$).

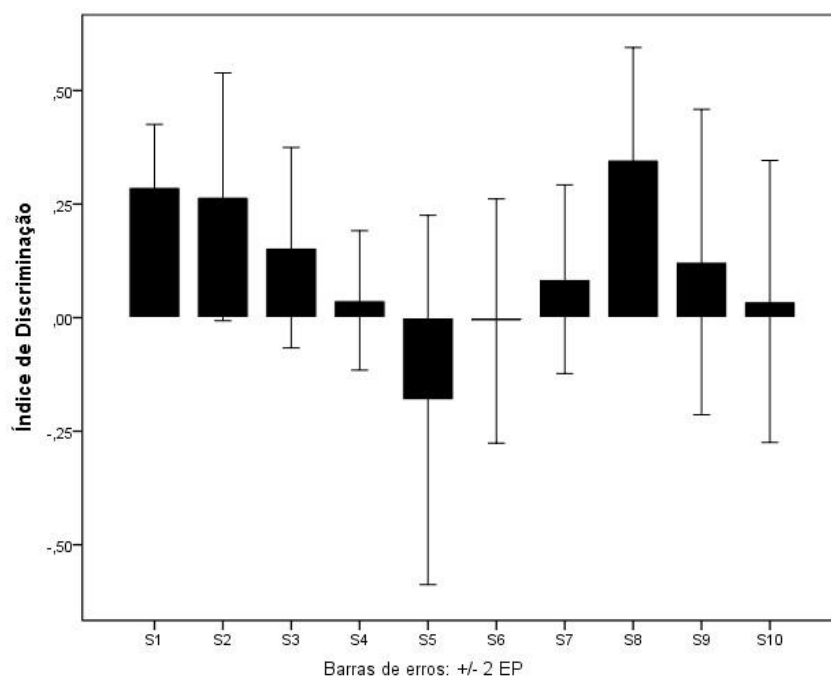


Figura 8. Índice discriminação tarefa NOR por sessão.

Após isso, foi analisada cada volta por dia e o total, onde índices significativos foram encontrados apenas para a volta 1 no primeiro dia [$t(4) = 5,15$, $p = 0,007$; $dz = 2,30$] e total [$t(4) = 5,25$, $p = 0,006$; $dz = 2,35$] (figura 9). A volta 1 correspondente ao dia 2 não apresentou valor acima do acaso, as demais voltas 2 e 3 também não apresentaram valores significativos ($p > 0,05$) em nenhum dos dias.

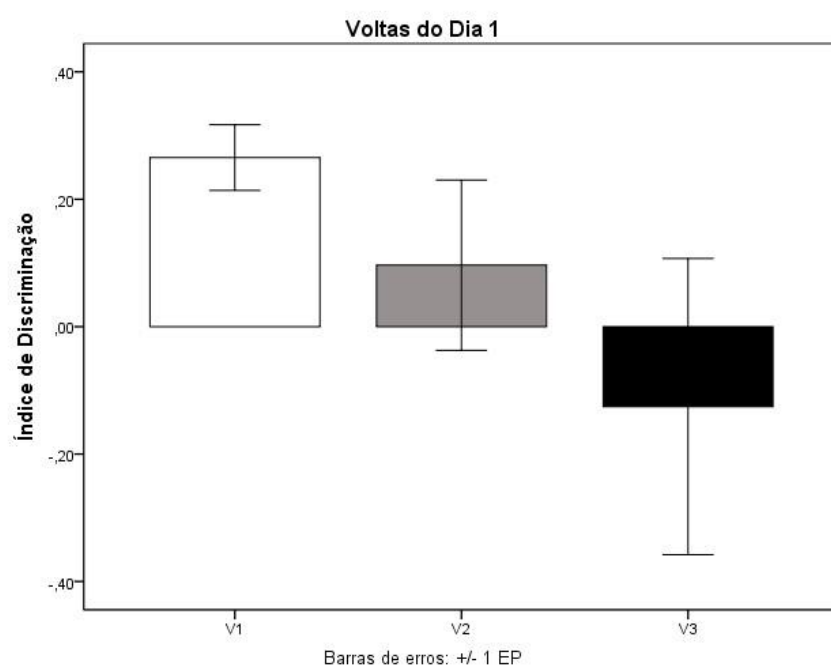


Figura 9. Índice discriminação tarefa NOR voltas do dia 1.

Foi conduzida uma ANOVA de medidas repetidas para verificação do tempo de exploração; a qual apontou não existir diferença significativa entre os níveis de exploração dos testes para cada sessão ($p > 0,05$). Também foi feita uma análise para comparação do nível de exploração dos objetos novos e familiares; o resultado demonstrou que os objetos novos foram significativamente mais explorados que os objetos familiares [$t(4) = 5,30$, $p = 0,006$; $dz = 1,47$] (figura 10).

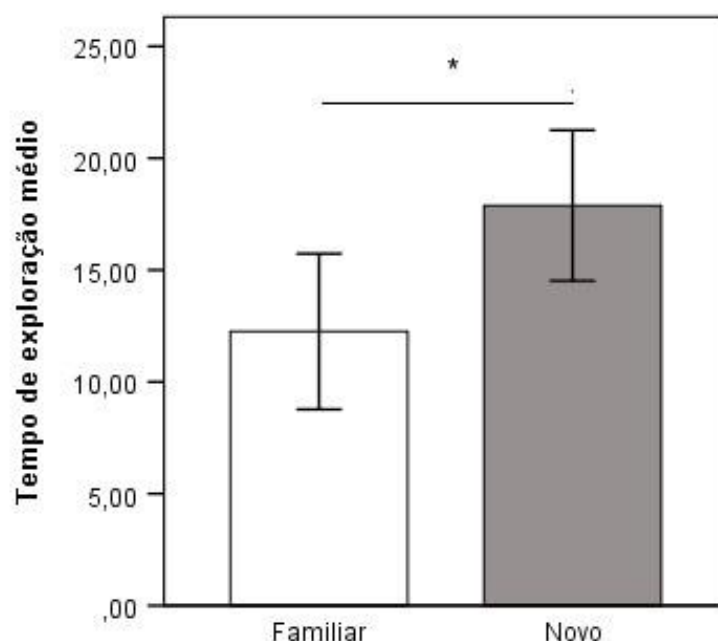


Figura 10. Exploração de objetos novos e familiares na tarefa NOR. *Diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$).

Tarefa DISC

No que se refere ao teste de discriminação, para o nível de similaridade de 25% verificou-se índices significativos no dia 1 [$t(4) = 3,919$, $p = 0,01$; $dz = 1,75$]. Para o dia 2 e total, tais índices não estavam acima do acaso ($p > 0,05$) (figura 11). Para cada sessão de 25% verificou-se que apenas a sessão 3 apresentou um valor significativo [$t(4) = 3,23$, $p = 0,03$; $dz = 1,45$]. A sessão 10 apresentou índice negativo com tendência [$t(4) = -3,08$,

$p = 0,05$; $dz = 1,54$]. As demais sessões não apresentaram valores acima do acaso ($p > 0,05$).

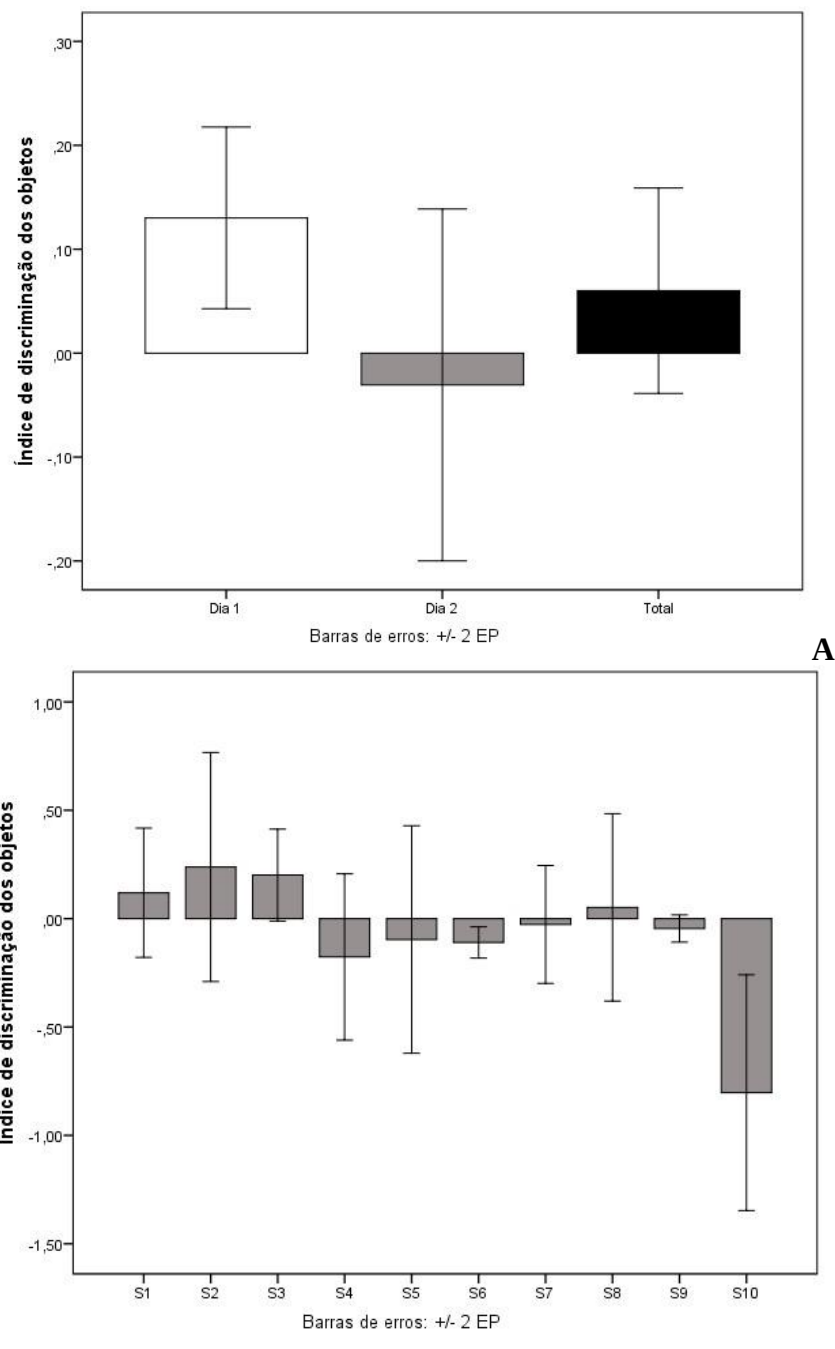


Figura 11. (A) Índice de discriminação por dia, total e por sessão (B) para o nível de similaridade de 25%, tarefa de discriminação.

Para cada volta do nível de 25% de similaridade, verificou-se que os animais discriminaram significativamente apenas na volta 1 do primeiro dia 1 [$t(4) = 3,9$, $p = 0,018$; $dz = 1,74$]. Foi identificada uma tendência positiva na volta 3 do dia 2 [$t(2) = 3,80$,

$p = 0,06$; $dz = 2,19$]. Não foram encontrados valores acima do acaso para as demais voltas em nenhum dia ($p > 0,05$).

No nível de similaridade de 50%, não foram encontrados valores significativos para nenhum dos dias ($p < 0,05$). Não foram verificados valores acima do acaso para as demais sessões ($p > 0,05$) e nem por volta em cada dia ($p > 0,05$).

Para 75% de similaridade também não foram encontrados índices significativos para nenhum dia ($p > 0,05$). Apenas a sessão 5 apresentou um índice negativo significativo [$t(4) = -4,63$, $p = 0,01$; $dz = 2,07$]. Nenhuma volta apresentou valores acima do acaso ($p > 0,05$).

Independentemente do nível de similaridade, verificou-se que apenas para o teste 1, ou seja, no primeiro momento onde o animal se depara com um novo objeto, os índices encontraram-se acima do acaso para o dia 1 [$t(4) = 4,31$, $p = 0,01$; $dz = 1,93$] e uma tendência positiva no total [$t(4) = 2,61$, $p = 0,05$; $dz = 1,19$]. Foi encontrada uma tendência positiva para a sessão 2 [$t(4) = 5,61$, $p = 0,05$; $dz = 2,53$] e 5, obtendo esta última um índice negativo [$t(3) = -4,23$, $p = 0,02$; $dz = 0,42$]. Um índice significativo também foi encontrado para a volta 1 do dia 1 [$t(4) = 3,24$, $p = 0,03$; $dz = 1,45$].

No teste 2 não foram encontrados índices significativos em nenhum dia ($p > 0,05$). Um valor acima do acaso foi observado apenas na sessão 3 [$t(4) = 3,23$, $p = 0,03$; $dz = 1,45$], as demais sessões não obtiveram índices significativos ($p > 0,05$). Nenhuma volta apresentou valores significativos em nenhum dia ($p > 0,05$), apenas uma tendência positiva foi observada para a volta 2 no dia 2 [$t(3) = 3,11$, $p = 0,05$; $dz = 1,56$]. No teste 3, último teste, nenhum índice significativo foi observado para os dias 1, 2 e total ($p > 0,05$). Também nenhuma sessão ou volta apresentou índices significativos ($p > 0,05$).

No que refere aos tempos de exploração para o teste de discriminação, foi realizado uma ANOVA de um fator, que demonstrou não existir diferença significativa entre o tempo de exploração em cada sessão (figura 12). Também foi possível verificar que também não existiu diferença significativa entre o tempo de exploração para as amostras e cada teste da tarefa de discriminação [$F_{(3,12)} = 0,80$; Bonferroni, $p = 0,106$]. Em relação às voltas, encontrou-se uma diferença significativa no tempo de exploração, na qual foi evidenciada a diferença entre as voltas 1 e 2 (Teste de Bonferroni, $p < 0,05$), como também voltas 1 e 3 (Teste de Bonferroni, $p < 0,05$).

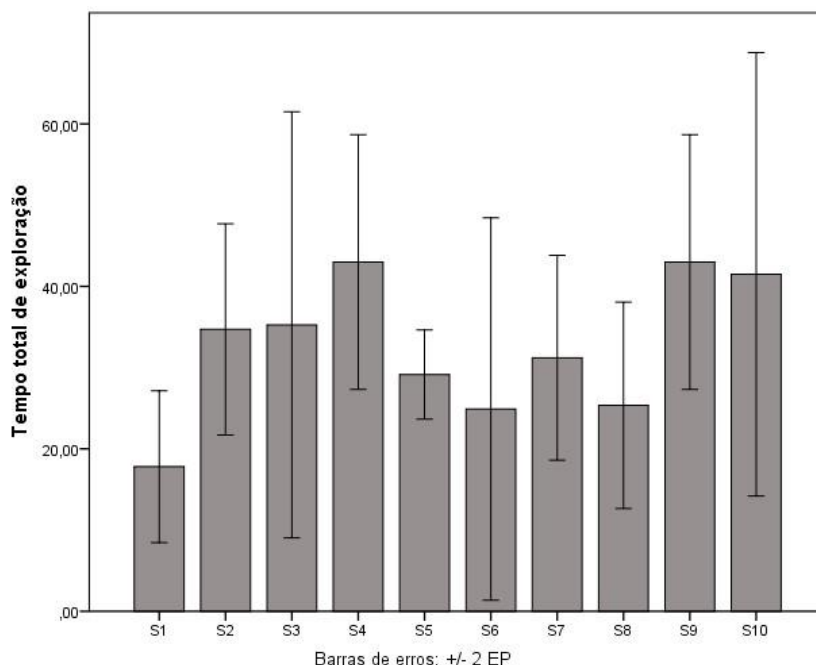


Figura 12. Tempo total de exploração dos objetos por sessão para a tarefa de discriminação.

Discussão

Em relação aos resultados da tarefa de reconhecimento de objetos (NOR), os animais tiveram o desempenho esperado, ou seja, expressaram uma memória de reconhecimento. Apesar dos animais manterem uma exploração constante durante todas as 10 sessões, conseguimos observar a preferência pelo objeto novo em relação ao familiar. Estudos com roedores relatam a existência de uma preferência na motivação dos animais para explorar novos objetos, em comparação com objetos familiares (Ennaucer & Delacour, 1988; Cohen & Stackman, 2015; Blaser & Heyser 2015). Portanto, esse protocolo experimental com múltiplas sessões pode ser considerado adequado para a avaliação desse tipo de memória e é passível de comparação com outras tarefas de reconhecimento espontâneo encontradas na literatura, o que geralmente não acontece em outras tarefas de NOR com múltiplas sessões (Ameen-Ali, Eacott & Easton, 2012).

É importante lembrar que para a padronização das tarefas feitas neste trabalho, algumas modificações foram feitas em relação ao protocolo original de Manns e Eichenbaum (2009). O fator principal é que os animais foram mantidos em restrição alimentar e uma recompensa era colocada ao lado dos objetos, a fim de aumentar o *drive* exploratório. O conjunto de objetos também permanecia no mesmo lugar, sendo trocados com um novo objeto apenas no momento do teste; dessa forma pudemos calcular o índice de exploração para o objeto trocado, sendo este a novidade. Outro fator é que os objetos aqui utilizados foram construídos a partir de legos, que podem ser considerados objetos complexos, com maior ambiguidade, elevando o nível de dificuldade da tarefa (Aggleton et al., 2010; Gámiz & Gallo, 2012).

Sobre os resultados da tarefa de discriminação de objetos em diferentes níveis de similaridade (DISC), verificou-se que apenas para o nível de similaridade 25% resultados

significativos foram encontrados no primeiro dia de teste. Para os demais níveis de similaridade estes resultados não foram encontrados. Além disso, foi observado que o desempenho dos animais parecia diminuir consideravelmente na última sessão de cada dia – os dados apontam isso a partir da sessão 10 no nível de 25% e sessão 5, nos níveis de 50% e 75% de similaridade. A redução do desempenho é uma característica que também foi encontrada em um bloco final do experimento realizado por Ameen-Ali, Eacott e Easton (2012).

Como explicação para essa diminuição no desempenho dos animais, podemos pensar que os animais acabam simplesmente perdendo o interesse na exploração dos objetos, uma vez que pela quantidade de sessões e de voltas esses objetos acabam se tornando familiares, apesar das diferenças sistemáticas. Esses resultados são semelhantes aos encontrados por Manns e Eichenbaum (2009). Entretanto, apesar do número considerável de sessões, o nível de exploração foi mantido, provavelmente pela questão alimentar.

Os resultados também apontam um desempenho significativo apenas no primeiro teste. Provavelmente pelos objetos possuírem recursos semelhantes haja uma interferência no momento em que o animal precise fazer a discriminação no teste 2 e 3 (Aggleton et al., 2010). Essa interferência seria em relação ao intervalo curto de tempo entre os testes, de apenas 3 minutos; que pode fazer com que os animais utilizem informações do teste anterior para comparar com os objetos do teste presente, resultando em padrões confusos de exploração. Assim, o rato acaba classificando objetos que deveriam ser considerados familiares como novos (falso reconhecimento) e objetos novos como familiares (habituação prejudicada). Então, os animais estariam expressando não apenas a exploração e memória do teste presente, mas a interferência e exploração do conjunto de testes realizados. Já o primeiro teste não sofreria tanta interferência, pois é nele que ocorre

o primeiro momento em que o animal se depara com um objeto novo (Hunsaker & Kesner, 2008; Genzel et al., 2019).

Parece existir um padrão de exploração para os roedores, onde eles discriminam os objetos apenas nos primeiros minutos; quando testados em tarefas que demandam o processamento e evocação de memória espacial (contexto/objeto) (Barbosa et al., 2012). Esse padrão de exploração explicaria os índices significativos apenas para as primeiras voltas nos testes.

Ainda, a linhagem dos ratos utilizados no presente estudo talvez possa ter interferido nos resultados, já que é uma linhagem diferente da que geralmente é utilizada em experimentos com múltiplas sessões ou discriminação de objetos. Além da complexidade dos objetos, a linhagem *Wistar* apresenta uma redução na acuidade visual, o que pode tornar os níveis de 50% e 75% de similaridade entre os objetos altamente difíceis de discriminar. Isso significa que além da visão naturalmente comprometida, a motivação basal da linhagem utilizada pode ser um fator importante na hora de se pensar tarefas de múltiplas sessões (Trimper et al., 2017; Manns & Eichenbaum, 2009; Clark et al., 2011; Johnson et al., 2017; Prusky & Douglas, 2005).

Por fim, os objetos desenvolvidos por Johnson et al. (2017) só foram usados em uma tarefa de labirinto em T ou em campo aberto. A utilização desses objetos em uma pista circular é novidade, ou seja, as diferenças entre aparatos e protocolos onde os objetos foram utilizados sugerem que a tarefa proposta neste trabalho seja mais difícil, já que os animais não podiam visualizar todos os objetos ao mesmo tempo e a visualização de um conjunto de objetos pode favorecer o reconhecimento de um novo objeto em meio a um conjunto de objetos conhecidos (Sugar & Moser, 2019).

Conclusão

Os resultados parecem ser promissores, já que se trata de uma primeira tentativa dentro do laboratório de adaptação e padronização de tarefas com múltiplas sessões, com finalidade de registros eletrofisiológicos. Como sugestão para estudos futuros, pode ser que uma redução no número de sessões ou testes por dia melhore o desempenho dos animais e o aumento do intervalo entre as sessões favoreça o reconhecimento e discriminação de objetos. Também pode ser vista a possibilidade de outras linhagens de ratos serem utilizadas, como por exemplo, a linhagem Long-Evans.

Referências

- Ameen-Ali, K. E., Eacott, M. J., & Easton, A. (2012). A new behavioural apparatus to reduce animal numbers in multiple types of spontaneous object recognition paradigms in rats. *Journal of Neuroscience Methods*, 211, 66–76. <<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2012.08.006>>
- Aggleton, J. P., Albasser, M. M., Aggleton, D. J., Poirier, G. L., & Pearce, J. M. (2010). Lesions of the rat perirhinal cortex spare the acquisition of a complex configural visual discrimination yet impair object recognition. *Behavioral neuroscience*, 124(1), 55–68. doi:10.1037/a0018320
- Alvarez, P., Lipton, P. A., Melrose, R., & Eichenbaum, H. (2001). Differential effects of damage within the hippocampal region on memory for a natural, nonspatial Odor-Odor Association. *Learning & memory* (Cold Spring Harbor, N.Y.), 8(2), 79–86. <<https://doi.org/10.1101/lm.38201>>
- Augustinack, J. C., van der Kouwe, A. J. W., Salat, D. H., Benner, T., Stevens, A. A., Annese, J., ... Corkin, S. (2014). H.M.'s contributions to neuroscience: A review and autopsy studies. *Hippocampus*, 24(11), 1267–1286. <<https://doi.org/10.1002/hipo.22354>>
- Baddeley, A., Anderson, M. C., & Eysenck, M. W. (2011). *Memória*. Porto Alegre, Brasil: Artmed.
- Barbosa, F. F., Pontes, I. M. De O., Ribeiro, S., Ribeiro, A. M., & Silva, R. H. (2012). Differential Roles of the Dorsal Hippocampal Regions in the Acquisition of Spatial and Temporal Aspects of Episodic-Like Memory. *Behavioural Brain Research*, 232(1), 269–277. <<http://Doi.Org/10.1016/J.Bbr.2012.04.022>>
- Blaser, R., & Heyser, C. (2015). Spontaneous object recognition: a promising approach to the comparative study of memory. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 9 (July), 1–12. <<https://doi.org/10.3389/fnbeh.2015.00183>>
- Brown, M. W., & Banks, P. J. (2015). In search of a recognition memory engram. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 50, 12–28. <<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.09.016>>
- Bunsey, M., & Eichenbaum, H (1996). Conservation of hippocampal memory function in rats and humans. *Nature*: 379, 255–257. <<https://doi.org/10.1038/379255a0>>
- Byun, J., & Lee, I. (2010). Disambiguation of Similar Object-Place Paired Associations and the Roles of the Brain Structures in the Medial Temporal Lobe. *Experimental Neurobiology*, 19(1), 15. <<https://doi.org/10.5607/en.2010.19.1.15>>
- Clark, R. E., & Squire, L. R. (2010). An animal model of recognition memory and medial temporal lobe amnesia: History and current issues. *Neuropsychologia*, 48(8), 2234–2244. <<https://doi.org/10.1016/j.neuropsychologia.2010.02.004>>
- Cohen, J. (1988). *Statistical power analysis for the behavioral sciences*. Hillsdale, NY: Lawrence Earlbaum Associates.

- Cohen, S. J., & Stackman Jr., R. W. (2015). Assessing rodent hippocampal involvement in the novel object recognition task. A review. *Behavioural Brain Research*, 285, 105–117. <<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.08.002>>
- Clark, R. E., Reinagel, P., Broadbent, N. J., Flister, E. D., & Squire, L. R. (2011). Intact Performance on Feature-Ambiguous Discriminations in Rats with Lesions of the Perirhinal Cortex. *Neuron*, 70(1), 132–140. <<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.03.007>>
- Clark, S. E., Hori, A., Putnam, A., & Martin, T. P. (2000). Group collaboration in recognition memory. *Journal of Experimental Psychology: Learning, Memory, and Cognition*, 26(6), 1578–1588. <<https://doi.org/10.1037/0278-7393.26.6.1578>>
- Clayton, N. S., & Dickinson, A. (1999). Scrub jays (*Aphelocoma coerulescens*) remember the relative time of caching as well as the location and content of their caches. *Journal of Comparative Psychology*, 113(4), 403–416. <<https://doi.org/10.1037/07357036.113.4.403>>
- Clayton, N. S., Bussey, T. J. & Dickinson, A. (2003). Can Animals Recall the Past and Plan for the Future?. *Nature Rev. Neurosci.* 4, 529–539.
- Erdfelder, E., Faul, F., Buchner, A., & Lang, A. G. (2009). Statistical power analyses using G*Power 3.1: Tests for correlation and regression analyses. *Behavior Research Methods*, 41(4), 1149–1160. <https://doi.org/10.3758/BRM.41.4.1149>.
- Ennaceur, A., & Delacour, J. (1988). A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: behavioral data. *Behav Brain Res*, 31, 47–59.
- Eichenbaum, H., Yonelinas, A. P., & Ranganath, C. (2007). The Medial Temporal Lobe and Recognition Memory. *Annual Review of Neuroscience*, 30(1), 123–152. <<https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.30.051606.094328>>
- Ennaceur, A. (2010). One-trial object recognition in rats and mice: Methodological and theoretical issues. *Behav. Brain Res.* <<http://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.12.036>>
- Fortin, N.J.; Wright, S.P.; Eichenbaum, H. (2004). Recollection-like memory retrieval in rats is dependent on the hippocampus. *Nature*, 431(7005): 188–191. <<http://doi.org/10.1038/nature02853>>
- Gamiz, F., & Gallo, M. (2012). Spontaneous object recognition memory in aged rats: Complexity versus similarity. *Learning & Memory*, 19(10), 444–448. doi:10.1101/lm.027003.112
- Genzel, L., Schut, E., Schröder, T., Eichler, R., Khamassi, M., Gomez, A., ... Battaglia, F. (2019). The object space task shows cumulative memory expression in both mice and rats. *PLOS Biology*, 17(6), e3000322.
- Gilbert, P. E., & Kesner, R. P. (2006). The role of the dorsal CA3 hippocampal subregion in spatial working memory and pattern separation. *Behavioural Brain Research*, 169(1), 142–149. <<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2006.01.002>>

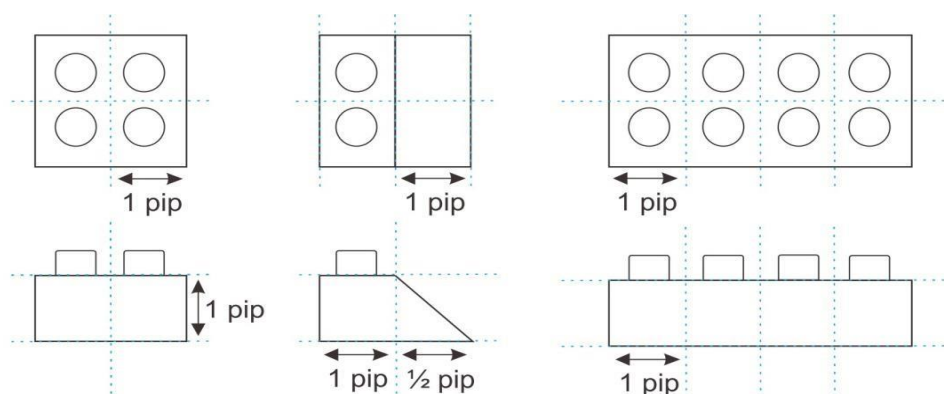
- Hunsaker, M. R., & Kesner, R. P. (2008). Evaluating the differential roles of the dorsal dentate gyrus, dorsal CA3, and dorsal CA1 during a temporal ordering for spatial locations task. *Hippocampus*, 18, 955–964.
- Hurst, J., West, R. (2011). Taming anxiety in laboratory mice. *Nat Methods* 7, 825–826. <<https://doi.org/10.1038/nmeth.1500>>
- Izquierdo, I. (2018). *Memória*. Porto Alegre, Brasil: Artmed.
- Inostroza, M., Brotons-Mas, J. R., Laurent, F., Cid, E., & de la Prida, L. M. (2013). Specific Impairment of “What-Where-When” Episodic-Like Memory in Experimental Models of Temporal Lobe Epilepsy. *Journal of Neuroscience*, 33(45), 17749–17762. <<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0957-13.2013>>
- Johnson, S. A., Turner, S. M., Santacrose, L. A., Carty, K. N., Shafiq, L., Bizon, J. L., ... Burke, S. N. (2017). Rodent age-related impairments in discriminating perceptually similar objects parallel those observed in humans. *Hippocampus*, 27(7), 759–776. <<https://doi.org/10.1002/hipo.22729>>
- Josey, M., & Brigman, J. L. (2015). Loss of hippocampal function impairs pattern separation on a mouse touch-screen operant paradigm. *Neurobiology of Learning and Memory*, 125, 85–92. <<https://doi.org/10.1016/j.nlm.2015.08.002>>
- Junior, C. F., Pederiva, C. N., Bose, R. C., Garcia, V. A., Lino-de-Oliveira, C., MarinoNeto, J. (2012). ETHOWATCHER: validation of a tool for behavioral and videotracking analysis in laboratory animals. *Computers in Biology and Medicine* 42(2), 257–264. <<https://doi.org/10.1016/j.compbiomed.2011.12.002>>
- Lakens, D. (2013). Calculating and reporting effect sizes to facilitate cumulative science: a practical primer for t-tests and ANOVAs. *Frontiers in Psychology*, 4(NOV), 1–12. <<https://doi.org/10.3389/fpsyg.2013.00863>>
- Maurer, A. P., Johnson, S. A., Hernandez, A. R., Reasor, J., Cossio, D. M., Fertal, K. E., ... Burke, S. N. (2017). Age-related Changes in Lateral Entorhinal and CA3 Neuron Allocation Predict Poor Performance on Object Discrimination. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 11(June), 1–16. <<https://doi.org/10.3389/fnsys.2017.00049>>
- Manns, J. R., & Eichenbaum, H. (2009). A cognitive map for object memory in the hippocampus. *Learning and Memory*, 16(10), 616–624. <<https://doi.org/10.1101/lm.1484509>>
- Menzel, C. R. (1999). Unprompted recall and reporting of hidden objects by a chimpanzee (*Pan troglodytes*) after extended delays. *Journal of Comparative Psychology*, 113(4), 426–434. <<https://doi.org/10.1037/0735-7036.113.4.426>>
- Miranda, M., Kent, B. A., Morici, J. F., Gallo, F., Weisstaub, N. V., Saksida, L. M., ... Bekinschtein, P. (2017). Molecular Mechanisms in Perirhinal Cortex Selectively Necessary for Discrimination of Overlapping Memories, but Independent of Memory Persistence. *Eneuro*, 4(5), ENEURO.0293-17.2017. <<https://doi.org/10.1523/ENEURO.0293-17.2017>>

- O'Keefe, J., & Dostrovsky, J. (1971). The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Research*, 34(1), 171– 175. <[http://doi.org/10.1016/0006-8993\(71\)90358-1](http://doi.org/10.1016/0006-8993(71)90358-1)>
- Pause, B. M., Zlomuzica, A., Kinugawa, K., Mariani, J., Pietrowsky, R., & Dere, E. (2013). Perspectives on Episodic-Like and Episodic Memory. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 7(1), 33. <<http://doi.org/10.3389/fnbeh.2013.00033>>
- Prusky, G.T.; Douglas, R.M. (2005). The behavior of the laboratory rat: a handbook with tests. In: WHISHAW, I.Q.; KOLB, B. Oxford University Press, Inc. ISBN 0-19-516285-4. Cap.5, p.55.
- Roloff, E. L., Muller, R. U., & Brown, M. W. (2016). Finding and Not Finding Rat Perirhinal Neuronal Responses to Novelty. *Hippocampus*, 26(8), 1021–1032. <<https://doi.org/10.1002/hipo.22584>>
- Squire, L. R. (2004). Memory systems of the brain: A brief history and current perspective. *Neurobiology of Learning and Memory*, 82(3), 171–177. <<https://doi.org/10.1016/j.nlm.2004.06.005>>
- Squire, L. R., & Kandel, E. R. (2003). *Memória - da Mente às Moléculas*. Porto Alegre, Brasil: Artmed.
- Sekeres, MJ, Winocur, G. e Moscovitch, M. (2018). The hippocampus and related 65 neocortical structures in memory transformation. *Neuroscience Letters*, 680(1), 39- 53. doi: 10.1016 / j.neulet. 2018.05.006
- Sugar, J., & Moser, M.-B. (2019). Episodic memory: Neuronal codes for what, where, and when. *Hippocampus*, 29(12), 1190–1205. <<https://doi.org/10.1002/hipo.23132>>
- Toner, C. K., Pirogovsky, E., Kirwan, C. B., & Gilbert, P. E. (2009). Visual object pattern separation deficits in nondemented older adults. *Learning & Memory*, 16(5), 338–342. <<https://doi.org/10.1101/lm.1315109>>
- Tomanari, G. Y., Pine, A. D. S., & Silva, M. T. A. (2003). Ratos wistar sob regime de restrição hídrica e alimentar. *Revista Brasileira de Terapia Comportamental e Cognitiva*, 5(1), 57–71.
- Trimper, J. B., Galloway, C. R., Jones, A. C., Mandi, K., & Manns, J. R. (2017). Gamma Oscillations in Rat Hippocampal Subregions Dentate Gyrus, CA3, CA1, and Subiculum Underlie Associative Memory Encoding. *Cell Reports*, 21(9), 2419–2432. <<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.10.123>>
- Tulving, E. (2002). Episodic memory: From mind to brain. *Annual Review of Psychology*, 53(1), 1–25. 10.1146 / annurev.psych.53.100901.135114
- Zola, S.M., Squire, L.R., Teng, E., Stefanacci, L., Buffalo, E.A., & Clark, R.E. (2000). Impaired recognition memory in monkeys after damage limited to the hippocampal region. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 20 1, 45163.

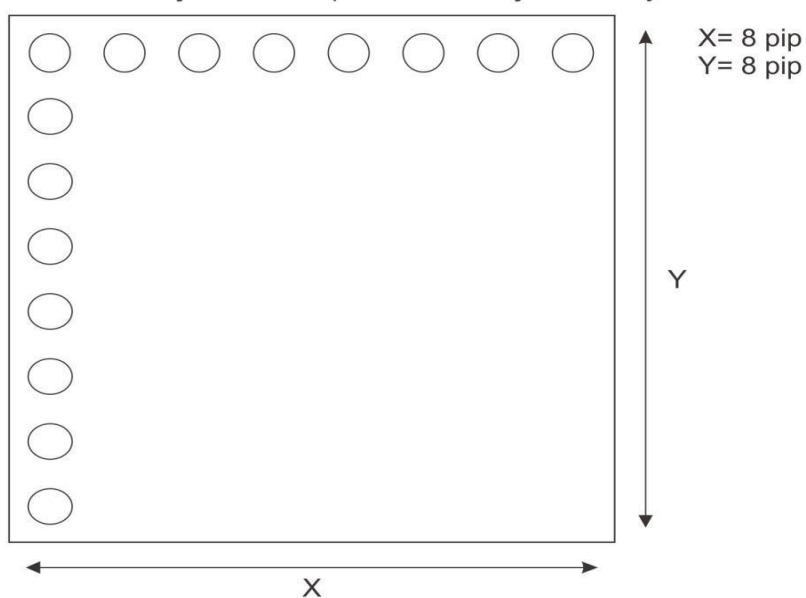
- Kinnavane, L., Albasser, M. M., & Aggleton, J. P. (2015). Advances in the behavioural testing and network imaging of rodent recognition memory. *Behavioural Brain Research*, 285, 67–78. <<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.07.049>>
- Kesner, R. P., Gilbert, P. E., & Barua, L. A. (2002). The role of the hippocampus in memory for the temporal order of a sequence of odors. *Behavioral Neuroscience*, 116(2), 286– 290. <<https://doi.org/10.1037/0735-7044.116.2.286>>

Anexos

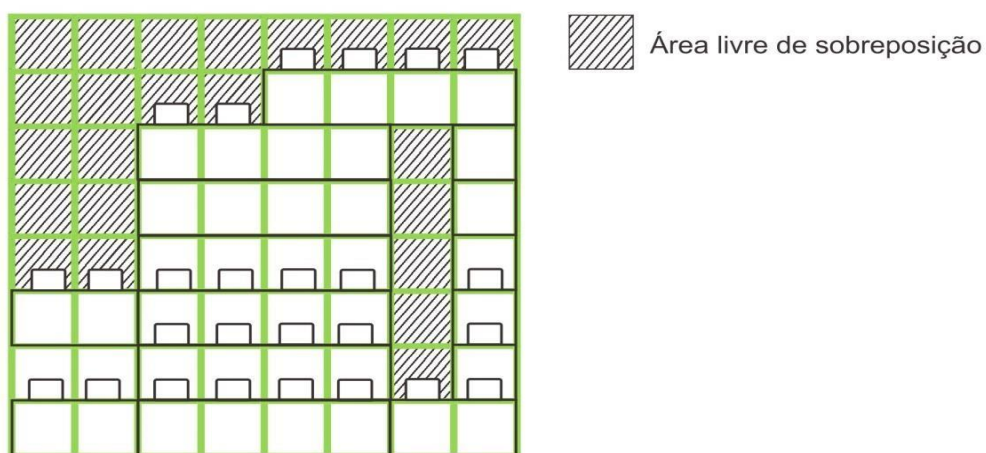
Anexo



Área de distribuição máxima para a construção dos objetos



Esquema ilustrativo da visão frontal para mensurar sobreposição



Esquema ilustrativo que mostra a sistematização da sobreposição de recursos da forma entre os objetos calculada segundo o protocolo elaborado por Johnson et al., (2017).