



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS LETRAS E ARTES  
DEPARTAMENTO DE PSICOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIA  
COGNITIVA E COMPORTAMENTO**



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

Ana Paula de Castro Araujo

João Pessoa  
Fevereiro 2020

Ana Paula de Castro Araujo

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

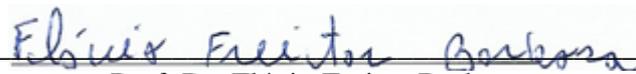
Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Neurociência Cognitiva e Comportamento na Universidade Federal da Paraíba, em defesa do grau de mestre em Neurociência Cognitiva e Comportamento, na linha de pesquisa: Psicobiologia: Processos Psicológicos Básicos e Neuropsicologia, sob orientação do Prof. Dr. Flávio Freitas Barbosa.

João Pessoa  
Fevereiro de 2020

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

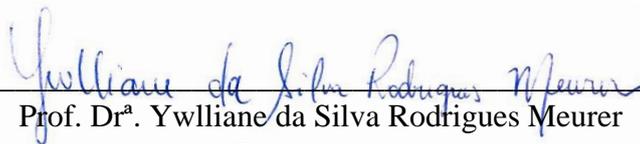
Ana Paula de Castro Araujo

Assinatura da banca examinadora atestando que a presente dissertação foi defendida e aprovada em 28/02/2020



---

Prof. Dr. Flávio Freitas Barbosa



---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Ywilliane da Silva Rodrigues Meurer



---

Prof. Dr. Hindiael Aeraf Belchior

**Catálogo na publicação**  
**Seção de Catalogação e Classificação**

A663p Araujo, Ana Paula de Castro.  
Padronização de uma tarefa de reconhecimento de objetos  
e discriminação de objetos similares com múltiplas  
sessões / Ana Paula de Castro Araujo. - João Pessoa,  
2020.  
69 f. : il.

Orientação: Flávio Freitas Barbosa.  
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCHLA.

1. Memória. 2. Reconhecimento de Objetos. 3.  
Discriminação. I. Barbosa, Flávio Freitas. II. Título.

UFPB/BC

“O homem que já viveu em muitos lugares tem menos possibilidade de ser enganado pelos erros de seu local de origem”

C. S. LEWIS

## **Agradecimentos**

*Por que Dele, por Ele e para Ele são todas as coisas. Ao dono do meu coração, Jesus, o meu melhor amigo, dedico todo esse trabalho. Reconheço sua presença e cuidado em cada momento vivido para a elaboração desse trabalho, tornando esta construção mais leve e prazerosa. Em cada parte desse trabalho vejo a sua mente inspiradora me instruindo e me capacitando para aprender e explorar o inexplorado. O que sou e quero ser é apenas um reflexo do que vejo Nele. Minha mente apenas recebe Dele o necessário para ir além dos meus limites. Todos os dias é uma aventura caminhar pelo desconhecido sabendo que em cada passo descubro sobre Ele.*

*Agradeço (in memoriam) a **Ap. Faustino Otaviano Neto**, um pai, sonhador e impulsionador. Lembro-me que antes de tudo isso você já me chamava de sua doutora. Você com certeza foi uma das pessoas q mais acreditou nesse sonho e me impulsionou a realiza-lo. Obrigada por cada conversa, cada palavra de encorajamento, obrigada por enxergar em mim o que eu não via. Obrigada por me apresentar a João Pessoa, obrigada por me fazer conhecer o mar, obrigada por um dia dizer que o primeiro lugar era meu, e que tudo já estava pronto. Obrigada por ser o maior exemplo de humano que eu pude conhecer. Definitivamente pessoas como você são capazes de mudar o nosso destino. Obrigada por me trazer esperança, você com certeza viu isso tudo antes de se tornar real. Agradeço imensamente a sua família que também é minha família em nome da doce **Ap. Marta**. Agradeço também a minha grande irmã, filha, intercessora **Heloiza vitória**, sem seus memes e risadas esse trabalho teria sido mais cansativo. Você é alguém que me inspira e me impulsiona, com certeza esse sonho é seu também.*

*Agradeço a minha família em nome das minhas tias **Deilta Araujo, Lourdinha Lira e Fátima Vieira** e em nome do meu pai **Francisco Araujo** e mãe **Ivany Vieira**. Agradeço ao meu irmão **João Paulo Castro** que desde pequeno me incentivou a ser professora, e que sempre me ensinou a lutar (literalmente) e sempre esteve ao meu lado nos trancos e barrancos, nas aventuras e rebeldias. Nas reposições e fugidas de casa. Muito Obrigada por você ser o meu maior exemplo de homem! Obrigada a minha família por todo investimento em todos os níveis da minha vida, por todas as renúncias que vocês fizeram por mim. Pelo tempo cedido para essa construção e ausências necessárias, por toda presença que precisou ser abdicada. Obrigada por todo nível de compreensão e reconhecimento. Tenho certeza que um dia retribuirei tudo isso.*

***Gabriela** a você devo muito do que sou hoje, 15 anos de investimento e muita amizade fizeram de mim alguém melhor. Não há o que dizer diante de tudo o que você já fez por mim. Com certeza os meus passos não seriam os mesmos se você não fizesse parte de minha vida, obrigada por tornar alguém improvável em um sonho real. Obrigada por não parar e não desistir, obrigada por ressurgir quando tudo parecia desistência. **Reyson** meu irmão mais novo, porém de um coração incrível e uma maturidade sem tamanho, obrigada por ser um exemplo de vulnerabilidade e perseverança pra mim, você também construiu muito dentro de mim. **Reyson** você é alguém que eu amo muito, alguém que tem acesso ao meu coração e que muito me ensina, obrigada por matar leões e insistir quando ninguém acreditava em você! O que vocês dois significam pra mim vai muito além do que qualquer palavra que eu pode-se colocar aqui.*

Agradeço a **Lanna** por todo o companheirismo nessa caminhada, nossos passos foram distintos, mas no caminho a gente se cruzou, você foi uma companheira que me segurou quando pensei que não tinha mais forças. Obrigada pela sua incrível habilidade de escuta e por ter o coração mais incrível que eu já conheci, você foi uma conexão muito importante para a minha vida e uma das coisas mais incríveis que posso dizer que aconteceu na minha vida, eu amo você!

Falando em conexão gostaria de agradecer a Deus pela conexão mais nova que ele me deu, **Karol e Luana**, vocês foram respostas de minhas orações. Encontrei aqui através de vocês forças pra continuar e uma família pra compartilhar a minha vida loca, loca como vocês. Vocês me trouxeram novas perspectivas e me fizeram ressignificar muitas coisas da vida, obrigada por todos os dias me ensinarem a ser leve, em especial Lu, obrigada por mostrar que tudo pode ficar mais leve e divertido. Obrigada por me ensinarem mais sobre pessoas, sobre entender o outro, alinhar as diferenças e conhecer o novo, tem sido muito incrível tudo o que estamos vivendo, rindo, chorando e construindo! Obrigada pelas noites em claro, pelos momentos que parecia que ninguém ia aguentar mais e deu tudo certo. JÚNIOR a gente conseguiu! Muito obrigada mesmo! através de vocês eu ganhei uma família! Karol você foi um presente muito valioso que Deus colocou em minhas mãos, me sinto muito privilegiada por poder hoje caminhar com você e construir coisas em você. Obrigada por abrir a sua casa, sua família, sua vida e permitir que eu enstra-se de uma forma tão intensa. Obrigada por não ter reservas nessa aventura, tenho certeza que os propósitos dessa amizade já estavam definidos a muito tempo, tem sido muito incrível. Seu coração é incrível, admiro o seu amor e cuidado com pessoas e como você transmite isso! Agradeço imensamente a sua família que com um amor sem explicação me acolheu e me acolhe sempre que preciso.

Agradeço ainda a todos os meus amigos que de alguma forma me ajudaram e aqui me visitaram. **Cleanny Martins, Adillis Alcantara, Sarah Cavalcanti, Abraão Gomes, Quitéria Tavarez**. Vocês são pessoas que me inspiram e em tudo acrescentam na minha vida. Com certeza a caminhada ficou mais leve com vocês! Existem muitos amigos que aqui não caberiam, mas gostaria de agradecer por cada um que de uma forma única tocam a minha vida e me tornam alguém melhor, que me ajudam, me inspiram, me irritam e me engordam. Vocês são o motivo de eu estar aqui, AMIGOS!

Agradeço a todos os grandes Mestres que de alguma forma marcaram a minha caminhada. **Maria Gadelha** obrigada por ensinar sobre a vida não ser fácil, ensinar que sempre é possível ir um pouco mais além, que a superação sempre será maior que a queda. Obrigada por desbravar nos corredores, trazendo a alunos como eu a possibilidade de sonhar e acreditar, que o impossível é para os que querem torna-lo possível! Obrigada por toda paciência, pelas palavras de incentivo, de confronto. Obrigada **Silvana Queiroga** por ser alguém que também permitiu que esse caminho se torna-se mais fácil e possível, você me apresentou uma psicologia que a sala de aula não pode mostrar, obrigada por não se limitar como professora e sempre ser excelente no seu olhar, ouvir e executar. Agradeço a **Maria Aparecida** por cada conversa, por sempre se importar, por acreditar em mim. Você é com certeza uma voz que sempre escuto dentro de mim quando tudo parece difícil. Obrigada por não se limitar a ser uma professora comum, e tocar todos os seus alunos com o seu jeito e olhar especial, é muito bom te ouvir e aprender com você, tenho uma carinho imensurável por você que eu nem sei

*explicar, mas existem pessoas que arrancam isso de nós, você é assim, uma flor facilmente admirável!*

*Agradeço imensamente ao Laboratório de Estudos em Memória e Cognição (LEMCOG) por ter me acolhido de uma forma tão e verdadeira! Com certeza vocês me faziam superar as dificuldades desconhecidas da cidade grande só pelo prazer de todos os dias encontrar pessoas tão incríveis em um ambiente onde eu de fato me sinto em casa. Agradeço a **Laís** por ser uma parceira tão incrível de pesquisa, parece q foi ontem que duas estanhas se encontravam em uma seleção e a gente nem imaginava a amizade e parceria que nasceria daí. por ter um coração tão humano e ter me aguentado em momentos de choro e estresse, abrir a porta de sua casa para me receber sempre que precisei. Nós de fato somos um equilíbrio! Você muito me ensina a ser pessoa, mulher e pesquisadora! Agradeço a **Maria Augusta** por todas as caronas que nos torariam grandes amigas. Obrigada por ser amiga, irmã e mãe em cada momento que eu precisei desabafar, e falar das minhas dificuldades. Obrigada por expressar tanto cuidado e amor sobre a minha vida, não tenho palavras para expressar como a sua presença fez diferença e minha vida aqui. Agradeço a **Rochelle** por sempre me encorar e acreditar nos meus sonhos, você é uma mulher inspiradora para a ciência, agradeço pelo seu carinho e cuidado, por sempre se dispor a cuidar de mim, você me faz sentir família. Agradeço a todos os demais companheiros de laboratório em nome de **Vanessa** (a melhor IC) por tudo o que vocês representam porá mim, sem vocês esse trabalho não seria possível.*

*Agradeço imensamente ao cara que torna tudo isso possível a esse professor e homem inspirador, **Dr. Flávio Freitas**. Obrigada por acreditar em mim e abrir as portas da sua segunda casa para uma estranha entrar. Você é o grande responsável por tudo o que esse laboratório tem construído, e se esse é um ambiente onde crescemos em todos os níveis é por que você facilita esse caminho, obrigada portanto me ensinar, não só através de suas palavras, mas das ações não ditas. Obrigada por não se limitar a ciência como o único assunto comum aqui, obrigada por provocar reflexões tão pertinentes em cada tarde, em cada café, obrigada por tornar a sua mesa não apenas uma banca fria extensão de um laboratório, mas torna-la um lugar onde pessoas podem ser pessoas, onde também se escuta sobre aquilo que não é confortável falar e ouvir. Obrigada por todos os dias não só produzir ciência, mas acima de tudo esperança. Obrigada por acreditar nos meus sonhos e nas minhas loucuras, com certeza ter suas palavras de incentivo foram algo decisivo nesse caminho. Admiro muito por todo o conhecimento que tens, mas acima de tudo pela sua postura simples, humilde e humana, levarei comigo essa postura e toda a parte brincalhona também, você é uma referência e um modelo de pessoa e docente que levo dentro de mim. Segundo C. S. LEWIS a tarefa do educador moderno não é derrubar florestas, mas irrigar desertos, e de fato você é esse educador que não torna o seu laboratório um lugar apático aquilo que é humano, mas o torna um lugar sensível o suficiente para sermos vulneráveis, e tudo isso se deve a quem você é!*

*“Existem sempre muitos rivais para o nosso trabalho. Estamos sempre nos apaixonando ou discutindo, procurando emprego ou com medo de perde-lo, adoecendo e recuperando saúde, acompanhando acontecimentos públicos. Se deixarmos isso para nós mesmos, estaremos sempre na expectativa de que alguma distração termine, antes mesmo de realmente sermos capazes de continuar no nosso trabalho. Nunca existirão condições*

*favoráveis. Há momentos, é claro, em que a pressão é tão grande que somente um domínio próprio sobre-humano pode resistir. Elas vem tanto na guerra quanto na paz. Precisamos fazer nosso melhor” (C. S. LEWIS)*

*Que venha o Doutorado!*

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b> .....   | 18 |
| 1.1 Memória.....   | 18 |
| 1.2 Memória de reconhecimento em humanos e roedores.....   | 20 |
| 1.2.1 Tarefa de Reconhecimento de Objetos .....  | 20 |
| 1.3 Memória de reconhecimento nas tarefas de discriminação de objetos em diferentes graus de similaridade, contribuições para a memória episódica..... | 22 |
| 1.4 Mecanismos neurais para a memória de reconhecimento e discriminação de objetos.....  | 24 |
| <b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....  | 32 |
| <b>3. OBJETIVOS</b> .....  | 33 |
| 3.1 Geral.....   | 33 |
| 3.2 Específico.....  | 33 |
| <b>4. MATERIAL E MÉTODO</b> .....  | 34 |
| 4.1 Animais.....   | 34 |
| 4.2 Aparato experimental.....  | 34 |
| 4.3 Objetos .....  | 35 |
| 4.4 Procedimentos comportamentais gerais.....  | 36 |
| 4.4.1 Manipulação, Habituação e modelagem.....   | 36 |
| 4.4.2 Padronização da Tarefa de reconhecimento de objetos.....   | 36 |
| 4.4.3 Padronização da tarefa de discriminação de objetos em diferentes níveis de similaridade.....   | 37 |
| 4.5 Análise comportamental e estatística.....  | 38 |
| <b>5. PROCEDIMENTOS E RESULTADOS ESPECÍFICOS DE CADA EXPERIMENTO</b> .....   | 40 |
| 5.1 Experimento 1- Padronização da tarefa de reconhecimento e discriminação de objetos com múltiplas sessões com 10 sessões e 3 voltas .....           | 40 |
| 5.1.1 Animais.....   | 40 |
| 5.1.2 Modelagem .....  | 40 |
| 5.1.3 Delineamento experimental .....  | 40 |
| 5.1.4 Análise .....  | 41 |
| 5.1.5 Resultados.....  | 41 |
| 5.2 Experimento 2- Padronização da tarefa de reconhecimento e discriminação de objetos com múltiplas sessões com 10 sessões e 1 volta .....            | 48 |
| 5.2.1 Animais.....   | 48 |
| 5.2.2 Modelagem .....  | 49 |
| 5.2.3 Delineamento experimental .....  | 49 |

|   |           |
|---|-----------|
| 5.2.4 Análise .....   | 49        |
| 5.2.5 Resultados.....   | 50        |
| 5.3 Experimento 3- Padronização da tarefa de reconhecimento e discriminação de objetos com múltiplas sessões com 5 sessões e 2 voltas ..... | 52        |
| 5.3.1 Animais.....  | 52        |
| 5.3.2 Modelagem .....   | 52        |
| 5.3.3 Delineamento experimental .....   | 52        |
| 5.3.4 Análise .....   | 53        |
| 5.3.5 Resultados.....   | 53        |
| <b>6. DISCUSSÃO .....</b>   | <b>57</b> |
| <b>7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>   | <b>63</b> |
| <b>8. REFERÊNCIAS.....</b>  | <b>64</b> |
| <b>9. MATERIAL SUPLEMENTAR.....</b>   | <b>70</b> |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| <b>FIGURA 1.</b> ESQUEMA ILUSTRATIVO SIMPLIFICADO DA RELAÇÃO FUNCIONAL ENTRE DIFERENTES ÁREAS CEREBRAIS E OS TIPOS DE MEMÓRIA RELACIONADAS AO CONTEÚDO. EXTRAÍDO DE SOUZA (2015).  | 19 |
| <b>FIGURA 2.</b> REPRESENTAÇÃO SIMPLIFICADA DE INPUTS AFERENTES DA REGIÃO PARA-HIPOCAMPAL PARA A FORMAÇÃO HIPOCAMPAL. A COR EM AZUL DEMONSTRA AS ESTRADAS PARA A VIA “OQUE” E A COR VERMELHA REPRESENTA DAS ENTRADAS PARA A VIA “ONDE”.  | 26 |
| <b>FIGURA 3.</b> APARATO EXPERIMENTAL UTILIZADO NOS EXPERIMENTOS DE MÚLTIPLAS SESSÕES.   | 35 |
| <b>FIGURA 4.</b> OBJETOS UTILIZADOS NA TAREFA DE DISCRIMINAÇÃO. O PRIMEIRO OBJETO DA ESQUERDA PARA A DIREITA APRESENTA 25% DE SIMILARIDADE, SEGUIDO O OBJETO COM 50% DE SIMILARIDADE, O OBJETO PADRÃO E O OBJETO DE 75% DE SIMILARIDADE.   | 36 |
| <b>FIGURA 5.</b> MODELO DO DESENHO EXPERIMENTAL DE MÚLTIPLAS SESSÕES. G, H, E E F REPRESENTAM OS OBJETOS E SUAS RESPECTIVAS POSIÇÕES NO APARATO.   | 37 |
| <b>FIGURA 6.</b> MODELO DO DESENHO EXPERIMENTAL DE MÚLTIPLAS SESSÕES. G E E REPRESENTAM OS OBJETOS E SUAS RESPECTIVAS POSIÇÕES NO APARATO. % REPRESENTA O GRAU DE SIMILARIDADE.  | 38 |
| <b>FIGURA 7.</b> DEMONSTRAÇÃO DA CONSTRUÇÃO DA MEDIDA DO ÍNDICE DE DISCRIMINAÇÃO. N CORRESPONDE AO TEMPO DE EXPLORAÇÃO DO OBJETO NOVO E F CORRESPONDE A MÉDIA DE EXPLORAÇÃO DOS OBJETOS FAMILIARES.  | 39 |
| <b>FIGURA 8.</b> ILUSTRAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS COMPORTAMENTAIS E SEUS RESPECTIVOS DIAS  | 41 |
| <b>FIGURA 9.</b> ÍNDICE DE DISCRIMINAÇÃO NA TAREFA NOR POR BATERIA E TOTAL *COMPARAÇÕES SIGNIFICATIVAS CONSIDERANDO-SE $P < 0,05$ . TESTE T DE UMA AMOSTRA ( $N=5$ ); $\pm$ ERRO PADRÃO DA MÉDIA.  | 42 |
| <b>FIGURA 10.</b> ÍNDICE DISCRIMINAÇÃO TAREFA NOR POR SESSÃO. *COMPARAÇÕES SIGNIFICATIVAS CONSIDERANDO-SE $P < 0,05$ . TESTE T DE UMA AMOSTRA ( $N=5$ ); $\pm$ ERRO PADRÃO DA MÉDIA.   | 42 |
| <b>FIGURA 11.</b> EXPLORAÇÃO DE OBJETOS NOVOS E FAMILIARES NA TAREFA NOR. *DIFERENÇAS ESTATISTICAMENTE SIGNIFICANTES ( $P < 0,05$ ). TESTE T DE MEDIDAS REPETIDAS ( $N=5$ ); $\pm$ ERRO PADRÃO DA MÉDIA.   | 43 |
| <b>FIGURA 12.</b> ÍNDICE DE DISCRIMINAÇÃO POR BATERIA, TOTAL E POR SESSÃO PARA O NÍVEL DE SIMILARIDADE DE 25%, TAREFA DE DISCRIMINAÇÃO. *COMPARAÇÕES SIGNIFICATIVAS CONSIDERANDO-SE $P < 0,05$ . TESTE T DE UMA AMOSTRA (BATERIA 1, $N=5$ ; BATERIA 2, $N=4$ ; SESSÃO 1 A 5, $N=5$ ; SESSÃO 6 A 10, $N=4$ ); $\pm$ ERRO PADRÃO DA MÉDIA. | 44 |
| <b>FIGURA 13.</b> ÍNDICE DE DISCRIMINAÇÃO POR BATERIA, TOTAL E POR SESSÃO PARA O NÍVEL DE SIMILARIDADE DE 50%, TAREFA DE   |    |

|   |    |
|---|----|
| DISCRIMINAÇÃO. *COMPARAÇÕES SIGNIFICATIVAS CONSIDERANDO-SE P<0,05. TESTE T DE UMA AMOSTRA (BATERIA 1, N=5; BATERIA 2, N=4; SESSÃO 1 A 5, N=5; SESSÃO 6 A 10, N=4); ± ERRO PADRÃO DA MÉDIA.....  | 45 |
| <b>FIGURA 14.</b> ÍNDICE DE DISCRIMINAÇÃO POR BATERIA, TOTAL E POR SESSÃO PARA O NÍVEL DE SIMILARIDADE DE 75%, TAREFA DE DISCRIMINAÇÃO. *COMPARAÇÕES SIGNIFICATIVAS CONSIDERANDO-SE P<0,05. (BATERIA 1, N=5; BATERIA 2, N=4; SESSÃO 1 A 5, N=5; SESSÃO 6 A 10, N=4); ± ERRO PADRÃO DA MÉDIA. .... | 45 |
| <b>FIGURA 15.</b> ÍNDICE DE DISCRIMINAÇÃO BATERIA 1 E 2 E TOTAL PARA CADA TESTE *COMPARAÇÕES SIGNIFICATIVAS CONSIDERANDO-SE P<0,05. B= BATERIA. TESTE T DE UMA AMOSTRA (BATERIA 1, N=5; BATERIA 2, N=4); ± ERRO PADRÃO DA MÉDIA. ....   | 46 |
| <b>FIGURA 16.</b> ÍNDICE DE DISCRIMINAÇÃO POR SESSÃO PARA CADA TESTE. *COMPARAÇÕES SIGNIFICATIVAS CONSIDERANDO-SE P<0,05. T= TESTE. TESTE T DE UMA AMOSTRA; (T1 T2 T3, N=5); ± ERRO PADRÃO DA MÉDIA.  | 47 |
| <b>FIGURA 17.</b> TEMPO TOTAL DE EXPLORAÇÃO DOS OBJETOS POR SESSÃO PARA A TAREFA DE DISCRIMINAÇÃO. ANOVA DE MEDIDAS REPETIDAS; N=5. ± ERRO PADRÃO DA MÉDIA. ....  | 48 |
| <b>FIGURA 18.</b> TEMPO TOTAL DE EXPLORAÇÃO DOS OBJETOS POR VOLTA PARA A TAREFA DE DISCRIMINAÇÃO. *COMPARAÇÕES SIGNIFICATIVAS CONSIDERANDO-SE P<0,05. V=VOLTA. ANOVA DE MEDIDAS REPETIDAS; N=5. ± ERRO PADRÃO DA MÉDIA. ....  | 48 |
| <b>FIGURA 19.</b> ÍNDICE DISCRIMINAÇÃO TAREFA NOR POR DIA E TOTAL. TESTE T DE UMA AMOSTRA (N=5). ± ERRO PADRÃO DA MÉDIA.....  | 50 |
| <b>FIGURA 20.</b> TEMPO DE EXPLORAÇÃO MÉDIO DOS OBJETOS NOVOS E FAMILIARES NA TAREFA NOR. TESTE T DE DUAS AMOSTRAS (N=5). ± ERRO PADRÃO DA MÉDIA. ....  | 50 |
| <b>FIGURA 21.</b> ÍNDICE DA TAREFA DE DISCRIMINAÇÃO PARA CADA NÍVEL DE SIMILARIDADE. TESTE T DE UMA AMOSTRA (N=5). ± ERRO PADRÃO DA MÉDIA. ....   | 51 |
| <b>FIGURA 22.</b> TEMPO TOTAL DE EXPLORAÇÃO DOS OBJETOS PARA CADA SESSÃO DA TAREFA DE DISCRIMINAÇÃO. ANOVA DE MEDIDAS REPETIDAS (N=5). ± ERRO PADRÃO DA MÉDIA. ....   | 52 |
| <b>FIGURA 23.</b> ÍNDICE DISCRIMINAÇÃO TAREFA NOR POR SESSÃO. TESTE T DE UMA AMOSTRA (S1, N=5; S2 A S5, N=5). ± ERRO PADRÃO DA MÉDIA. ...   | 53 |
| <b>FIGURA 24.</b> TEMPO MÉDIO DE EXPLORAÇÃO DOS OBJETOS NOVOS E FAMILIARES DA TAREFA NOR. TESTE T DE DUAS AMOSTRAS (N=5). ± ERRO PADRÃO DA MÉDIA. ....  | 54 |
| <b>FIGURA 25.</b> ÍNDICES DA TAREFA DE DISCRIMINAÇÃO POR NÍVEL DE SIMILARIDADE. TESTE T DE UMA AMOSTRA (N=5). ± ERRO PADRÃO DA MÉDIA. ....  | 55 |

|  |    |
|--|----|
| <b>FIGURA 26.</b> VOLTAS 1 PARA CADA SESSÃO DO TESTE 2 *COMPARAÇÕES SIGNIFICATIVAS CONSIDERANDO-SE $P < 0,05$ . TESTE T DE UMA AMOSTRA (N=5). $\pm$ ERRO PADRÃO DA MÉDIA. .... | 55 |
| <b>FIGURA 27.</b> TEMPO TOTAL DE EXPLORAÇÃO DOS OBJETOS POR SESSÃO NA TAREFA DE DISCRIMINAÇÃO. ANOVA DE MEDIDAS REPETIDAS (N=5). $\pm$ ERRO PADRÃO DA MÉDIA. ....              | 56 |

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

**HM-** HENRY MOLASION

**LTM-** LOBO TEMPORAL MEDIAL

**CA1-** REGIÃO DO CORNO DE AMON

**CA3-** REGIÃO DO CORNO DE AMON

**CE-** CÓRTEX ENTORRINAL

**LEC-** CÓRTEX ENTORRINAL LATERAL

**MEC-** CÓRTEX ENTORRINAL MEDIAL

**DG-** GIRO DENTEADO

**SD-** SUBICULO DORSAL

**AP5** - DO INGLÊS “ ((2R)-AMINO-5-PHOSPHONOVALERIC ACID; (2R)-AMINO-5 PHOSPHONOPENTANOATE)”, ANTAGONISTA SELETIVO NMDA.

**DNMS-** AMOSTRA NÃO CONJUGADA TARDIA

**NOR-** TAREFA DE RECONHECIMENTO DE OBJETO

**PMFC-** MODELO DE CONJUNÇÃO MNEMÔNICA-PERCEPTUAL

**TE-** TAMANHO DO EFEITO

**ANOVA-** ANÁLISE DE VARIÂNCIA

**CEUA-** COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

**UFPB-** UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

## RESUMO

O reconhecimento, um subtipo de memória explícita/declarativa, envolve a capacidade de distinguir estímulos novos de familiares, estacionários e deslocados. Essa forma de memória é compartilhada entre diversas espécies animais, o reconhecimento pode se dar por meio de processos de lembrança e familiaridade. Um processo subjacente ao reconhecimento envolve as representações únicas de eventos similares, que são menos confusos e podem ser associados a resultados diferentes, através de um processo chamado separação de padrões. Muitos são os esforços para a padronização de tarefas que avaliem estes tipos de memórias em modelos animais. Somando-se a necessidade de uma maior aquisição de dados, para viabilização de registro eletrofisiológicos, estudos tem direcionado tais esforços ao desenvolvimento de protocolos que permitam a realização de vários testes por dia. Neste trabalho buscamos adaptar uma tarefa de reconhecimento simples e discriminação com múltiplas sessões. Para tal, foram utilizados 15 ratos *Wistar* machos de 3 a 4 meses. Sendo 5 animais utilizados no primeiro experimento, 5 no experimento 2 e 5 no experimento 3. Os animais foram submetidos a uma tarefa de reconhecimento de objetos e discriminação de objetos com múltiplas sessões. A tarefa de reconhecimento de objetos é composta por duas sessões, sendo uma amostra e um teste. A tarefa de discriminação de objetos em diferentes níveis de similaridade é composta por quatro sessões, sendo 1 de amostra e três de teste com intervalo de 3 minutos entre eles. Na fase de amostra o animal foi exposto a três objetos LEGOS idênticos, em posições específicas. Ao longo de cada um dos três testes, cada um dos objetos apresentados na amostra foi substituído por um objeto novo com um grau de similaridade de 25%, 50% ou 75%. Para o experimento 1 os animais realizaram 3 voltas para cada tentativa de amostra e teste, dentro de 10 sessões. Para o experimento 2 os animais realizaram 1 volta para cada tentativa de amostra e teste, dentro de 10 sessões. Já para o experimento 3 os animais realizaram 2 voltas para cada tentativa de amostra e teste, dentro de 5 sessões. Os resultados apontam que para o experimento 1 os animais apresentaram índices acima do acaso para o teste de reconhecimento de objetos em todos os dias. Para a tarefa de discriminação foram observados valores acima do acaso para o nível de similaridade de 25% no dia 1, o mesmo foi observado para o teste 1, porém para os níveis de similaridade 50% e 75% nenhum valor esteve acima do acaso. Para o experimento 2 e experimento 3 nenhum valor significativo foi encontrado, seja para o teste de reconhecimento ou para o teste de discriminação. Portanto mediante o exposto o experimento 1 apresenta-se como um modelo promissor como base para protocolos comportamentais, porém também deve-se considerar as alterações que aqui foram feitas para o experimento 2 e 3 em futuros estudos que busquem viabilizar o registro eletrofisiológico.

**Palavras-chave:** Memória; Reconhecimento de Objetos; Discriminação de Objetos; múltiplas sessões

## ABSTRACT

Recognition memory, a subtype of explicit/declarative memory, is the capacity of distinguishing new from familiar stimuli. This ubiquitous type of memory is shared among different species, and recognition might occur through recollection or familiarity. A process underlying recognition is pattern separation, the ability to form unique representations of similar events, providing less confusing memory representation, which can lead to different behavioral outputs. There has been significant effort towards the development of appropriate tasks to evaluate these types of memory in animal models. Considering the need for faster data accumulation, in order to implement electrophysiological recordings, some studies have been devising protocols with multiple tests a day. In this work, we sought to adapt a recognition and object discrimination memory task with multiple sessions. We used 15 Wistar adult rats (3-4 months old) overall, in which 5 rats were used in Experiment 1, 5 rats were used in Experiment 2 and 5 rats were used in Experiment 3. Animals underwent a recognition task and an object discrimination memory task with multiple sessions. The recognition memory task presents 2 sessions, comprising a sample session and a test session. The discrimination task used objects that varied in their similarity, and comprised 4 sessions: a sample session and 3 test sessions, applying a 3-minute intersession interval. The objects were created from LEGO blocks, with different degree of features overlap. In the sample session, rats were exposed to three identical copies of an object, in specific positions of the circular track. The test sessions included 2 equal objects, originally presented in sample sessions, and a similar object that shared 25%, 50% or 75% degree of features overlap. In Experiment 1, rats performed 3 laps around the circular track in each sample and test sessions, up to 10 sessions a day. In Experiment 2, rats performed 1 lap around the circular track in each sample and test sessions, up to 10 sessions a day. In Experiment 3, however, rats performed 2 laps around the circular track in each sample and test sessions, up to 5 sessions a day. Results showed that in Experiment 1 rats consistently presented significant discrimination indexes in the recognition task. In the discrimination task, rats discriminated objects presenting 25% degree of features overlap, but animals could not discriminate objects presenting 50% or 75% degree of features overlap. Both Experiments 2 and 3 provided non-significant results for recognition and discrimination tasks. Therefore, our findings indicate that Experiments 1 offers a promising model for memory evaluations, but we recommend that the protocols explored in Experiment 2 and 3 should be analyzed and improved in future studies, in order to enable electrophysiological recordings.

**Keywords:** Memory; Object recognition; Object discrimination; Multiple sessions

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Memória

A memória é uma função cognitiva importante para a sobrevivência que permite armazenar e recuperar informações codificadas, indicando que a aprendizagem permaneceu ao longo do tempo (Pause *et al.*, 2013). Compreende-se que as memórias são formadas e firmadas através de três processos distintos. Codificação refere-se ao processo de obtenção inicial da memória. Em seguida, por meio da fase de consolidação, a memória é preservada e armazenada para posterior evocação. Por fim, a recuperação é o processo pelo qual as memórias armazenadas anteriormente são reativadas (Cohen & Stackman, 2015).

O trabalho com o paciente Henry Molaison (HM) contribuiu para um aumento nas investigações acerca da memória e dos seus substratos neurais. O neurocirurgião William Beecher Scoville executou uma operação experimental em HM, na esperança de curar sua epilepsia farmacologicamente intratável. HM teve convulsões a partir dos 10 anos que se agravaram a partir do seu 15º aniversário (Augustinack *et al.*, 2014). Henry tomou grandes doses de drogas antiepilépticas que foram ineficientes na redução dos ataques epiléticos. Tendo a cirurgia como uma tentativa de sanar ou amenizar suas crises, HM foi o primeiro paciente a passar pela lobotomia temporal medial bilateral completa, posteriormente Scoville renomeou a operação de ressecção bilateral do lobo temporal medial (LTM). Nos 55 anos seguintes, HM ficou preso no presente devido à profunda amnésia anterógrada (Augustinack *et al.*, 2014).

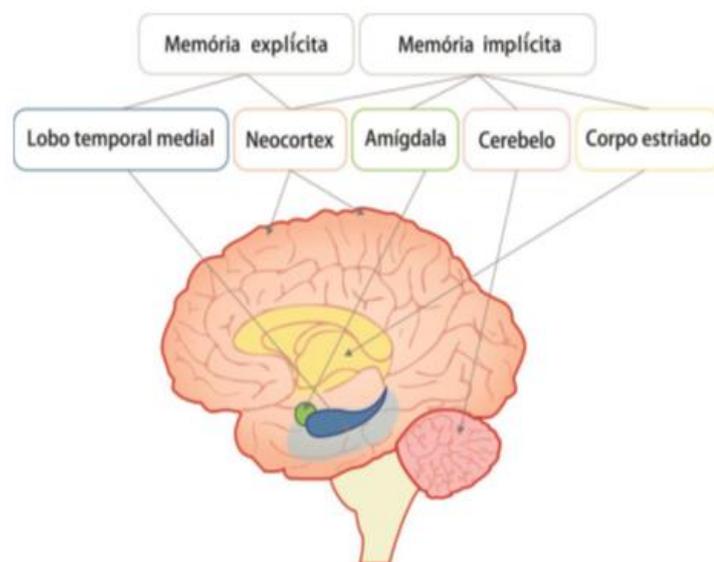
Milner mais tarde introduziu a ideia de que alguns tipos de memória (implícitas - aprendizagem de habilidades motoras, condicionamento clássico e preparação de repetição) não eram dependentes do hipocampo, sugerindo uma organização para diferentes tipos de memória. Desde então, a neuropsicologia cognitiva tem demonstrado que a memória não é um sistema único, mas um conjunto de diferentes substratos neuroanatômicos (Squire & Kandel, 2003).

A memória pode ser compreendida a partir de duas condições básicas. A primeira é a sua categorização baseada no tempo (curto prazo / trabalho e de longo prazo). A memória de curto prazo pode ser evocada em curtos períodos, não requerendo síntese proteica (Izquierdo, 2018). A memória de longo prazo pode ser evocada após longos intervalos de tempo, de horas a anos, sendo caracterizada por sua labilidade e

requerimento de síntese de proteínas para consolidação (Izquierdo, 2018). Além disso, a memória também é subdividida em sistemas baseados em conteúdo (explícito e implícito). As memórias explícitas podem durar alguns minutos ou horas, ou alguns dias ou meses, ou muitas décadas. As memórias implícitas geralmente duram toda a vida (Izquierdo, 2018; Squire & Kandel, 2003).

A memória explícita está disponível para acesso consciente a fatos e eventos, seu funcionamento é prejudicado quando as estruturas do LTM são danificadas. Memória implícita é um termo abrangente que inclui várias habilidades que não são acessíveis ao conhecimento consciente, mas são expressas através do desempenho de hábitos e de aprendizagem associativa e não associativa, e dependem de diferentes sistemas cerebrais (Squire, 2004; Clark & Squire, 2010).

Segundo proposto por Tulving (2002), a memória explícita pode ser dividida em duas categorias, semântica e episódica. O subtipo semântico contém informações de conhecimentos gerais, responsável pela formação de conceitos sobre o mundo a sua volta, contendo informações de fatos gerais. A memória episódica caracteriza-se por ser uma habilidade de recuperar eventos específicos vivenciados e localizados temporal e espacialmente. Veja figura 1 para esquematização dos subtipos.



**Figura 1.** Esquema ilustrativo simplificado da relação funcional entre diferentes áreas cerebrais e os tipos de memória relacionadas ao conteúdo. Extraído de Souza (2015).

## **1.2 Memória de reconhecimento em humanos e roedores**

O reconhecimento, um subtipo de memória explícita/declarativa, envolve a capacidade de distinguir novos estímulos de familiares. Essa forma onipresente de memória é compartilhada entre diversas espécies animais (Kinnavane, Albasser & Aggleton, 2015; Cohen & Stackman, 2015). Existem dois processos subjacentes a memória de reconhecimento que são comumente experimentadas durante um teste de recuperação de informação, isto é, familiaridade e lembrança. A familiaridade é a sensação imediata de que um evento, indivíduo ou item foi encontrado anteriormente. Essa experiência, chamada de “saber”, não envolve a lembrança consciente de detalhes da experiência anterior. Por exemplo, “Eu sei que já vi essa pessoa (ou item) antes; porém não lembro onde ou quando”. O “lembrar”, por outro lado, envolve um processo mais lento, pelo qual a atenção total aos estímulos presentes (se houver) induz um retorno intencional ou consciente dos detalhes contextuais do evento ou experiência anterior - isto é, informações específicas sobre onde e quando a experiência original ocorreu (Cohen & Stackman, 2015; Eichenbaum, Yonelinas & Ranganath, 2007)

Ainda não está claro, no entanto, se a lembrança e a familiaridade são apoiadas por processos cerebrais distintos ou, em vez disso, emergem de um único mecanismo neural. Em particular, estudiosos debatem como esses tipos de memória são suportados por regiões nos LTM. Estudos da memória humana indicaram que a lembrança e a familiaridade refletem dois processos de memória funcionalmente distintos. Embora a evidência dessa distinção venha de uma variedade de paradigmas experimentais diferentes (Eichenbaum, *et al.*, 2007). Por outro lado, estudos demonstram que esses dois processos tem uma semelhança a nível anatômico significativa que apontaria para um único modelo de processo (Kinnavane *et al.*, 2015). A compreensão dos conceitos primários de saber e lembrar, torna-se fundamental para compreensão da memória de reconhecimento em humanos e roedores.

### **1.2.1 Tarefa de Reconhecimento de Objetos**

Um dos maiores desafios na pesquisa sobre memória de reconhecimento tem sido o problema de criar um teste comportamental realizado em animais que mimetiza a memória de reconhecimento em humanos. O primeiro teste deste tipo foi a amostra não conjugada tardia (DNMS), realizada com macacos (Mishkin & Delacour, 1975). Sua aplicação em roedores se deu através de um labirinto em Y, no qual ratos deveriam escolher objetos a partir do reconhecimento de corrida, na qual cada corrida posterior

deveria ser em direção ao braço com o novo objeto (Kinnavane *et al.*, 2015). Consequentemente o novo estímulo para uma tentativa tornou-se o estímulo familiar para a próxima tentativa. Apenas eram reforçadas escolhas do braço com conteúdo novo. Outras variações dessa tarefa foram elaboradas (Mumby, Pinel & Wood, 1990; Kinnavane *et al.*, 2015). O uso desse tipo de tarefa necessita de um treinamento considerável, o que pode ser comprometido por intervenções neurais afetando assim o desempenho na tarefa, não por afetar a capacidade de distinguir estímulos novos e familiares, mas pela dificuldade ou déficit de aplicação e aprendizado de uma regra no processo de condicionamento, portanto existia a necessidade de que essas tarefas fossem substituídas por tarefas mais simples (Kinnavane *et al.*, 2015).

A avaliação da memória de reconhecimento foi revolucionada pela introdução de testes de preferência espontânea a partir da exploração do animal. Primariamente proposta por Ennaceur e Delacour (1988), a nova tarefa de reconhecimento de objeto (NOR), baseada na tendência inata de explorar novos objetos mais do que familiares, tem sido amplamente utilizada para explorar habilidades de memória em roedores (Cohen & Stackman, 2015). A NOR tornou-se um método popular para o estudo da memória, porque não há necessidade de restrição alimentar ou de água, e vários desfechos comportamentais podem ser rapidamente obtidos, incluindo atividade geral, reatividade a novidade e aprendizagem (Blaser & Heyser 2015).

Embora haja uma variabilidade considerável entre os laboratórios nos procedimentos de NOR utilizados, a maioria conduz o teste em uma arena familiar retangular ou circular, sem ou com sinais espaciais distribuídos de forma proximal e/ou distal. Durante o que é referido como a sessão de treinamento ou amostra, o roedor explora dois objetos novos idênticos encontrados em uma arena familiar. A codificação de memória de objeto é definida operacionalmente como ocorrendo durante a sessão de amostra. Após a conclusão da sessão de amostra, o animal é removido da arena durante um determinado período de tempo (isto é, retardo de retenção). Para a sessão de testes subsequente, o roedor é retornado para a mesma arena, contendo uma réplica do objeto familiar e um novo objeto, como um teste de recuperação da memória de objetos, medidas são elaboradas a partir do comportamento exploratório do animal (Cohen & Stackman, 2015).

Assumindo que vieses de confusão e preferências de objetos são descartados, qualquer discriminação em um teste entre um objeto novo e familiar por definição indica

alguma forma de memória (Bevins & Besheer, 2006). Porém, vários fatores relevantes devem ser considerados e provavelmente examinados em estudos-pilotos. Essas considerações incluem: seleção de objetos, medidas comportamentais, duração do teste, estímulos ou grupos de controle e análise estatística. Apesar disso, diversas variantes dessa tarefa foram usadas para estudar processos cognitivos mais específicos. No entanto, ainda há muito a ser aprendido sobre os mecanismos cognitivos pelos quais a discriminação ocorre nas variantes dessa tarefa (Blaser & Heyser, 2015).

Ameen-Ali, Eacott e Easton (2012) desenvolveram um protocolo de múltiplas sessões com uma tarefa de reconhecimento de objetos, por meio do qual o animal podia explorar em diferentes momentos duplas de objetos novos e familiares, sem a necessidade de manipulação, para manter a motivação o animal recebia recompensas distribuídas igualmente do lado dos objetos. Porém, alguns ensaios envolveram o objeto familiar que aparece em um local novo, enquanto em outros ele foi visto no mesmo local que anteriormente, isso pode levar a um viés no índice de discriminação, podendo, portanto, adicionar ruído aos dados. Considerando-se essa tarefa e a necessidade de avaliação da memória de reconhecimento, realizando-se mais de um teste por dia, para um maior acúmulo de dados possível por animais, estabelecer um protocolo que contorne todos esses aspectos é fundamental., portanto aqui se propõe uma adaptação da tarefa proposta por Manns e Eichenbaum, (2009) como uma possibilidade que viabiliza o registro eletrofisiológico em uma tarefa de reconhecimento com múltiplas sessões (Roloff, Muller & Brown, 2016).

### **1.3 Memória de reconhecimento nas tarefas de discriminação de objetos em diferentes graus de similaridade, contribuições para a memória episódica**

A capacidade de codificar e discriminar com sucesso estímulos ambientais distintos é essencial para a sobrevivência, dois estímulos semelhantes podem ser associados a duas experiências muito diferentes: um gato dentro de sua casa pode ser amigável, enquanto um puma pode ameaçar sua vida. Além de simplesmente reconhecer, acredita-se que o cérebro cria representações únicas de eventos similares, que são menos confusos e podem ser associados a resultados diferentes, através de um processo chamado separação de padrões (Gilbert & Kesner, 2006; Josey & Brigman, 2015; Miranda *et al.*, 2017).

Como a memória episódica envolve a lembrança de eventos únicos, a separação de experiências semelhantes é proposta como um componente essencial para o

armazenamento de representações não confusas desses episódios e tem sido estudada principalmente no hipocampo. Com o envelhecimento, défices da memória episódica podem estar associados a uma redução na capacidade de manter ricos detalhes contextuais (Johnson *et al.*, 2017; Miranda *et al.*, 2017).

A partir do teste de reconhecimento de objeto espontâneo foi proposta a introdução de múltiplos componentes na tarefa e a necessidade de discriminar estímulos que compartilham características, portanto a tarefa foi adaptada para permitir a investigação dos efeitos da crescente ambiguidade de recurso no reconhecimento espontâneo de objetos. Isso foi tentado em alguns estudos, seja em arenas abertas ou labirintos em T, onde descobriram que as lesões do fórnix não impediam a capacidade dos ratos de distinguir entre um objeto familiar e versões de objetos familiares nos quais as características originais haviam sido reconfiguradas (Ennaceur & Aggleton, 1994; Norman & Eacott, 2004; Johnson *et al.*, 2017). No entanto, os efeitos das lesões do córtex perirrinal em tal tarefa se mostraram controversos (Ahn & Lee, 2015). Muitos dos resultados associados a discriminação de objetos similares são oriundos de pesquisas a partir de um modelo de conjunção mnemônica-perceptual (PMFC), que sugere funções perceptivas ao córtex perirrinal (Ahn & Lee, 2015; Ahn & Lee, 2017; Byun & Lee, 2010; Bartko *et al.*, 2007; Johnson *et al.*, 2017). Quanto mais a identificação de estímulos individuais depender da configuração de características, mais grave será a deterioração prevista. Tal visão prediz que o perirrinal é importante não apenas para as tarefas mnemônicas, mas também para as discriminações concorrentes que fazem (Ahn & Lee, 2017).

Porém, os resultados da tarefa de discriminação de duas escolhas não podem definitivamente decidir entre uma deficiência perceptual e uma deficiência mnemônica. Muitas das tarefas que foram usadas para avaliar habilidades perceptivas não excluíram um papel para a aprendizagem e a memória, além disso, animais com lesões perirrinais podem ter sido prejudicados não por causa de dificuldades com a percepção visual, mas por causa do comprometimento da aprendizagem visual associativa (Suzuki, 2009). Pacientes com lesão hipocampal ou lesões maiores em LTM realizaram normalmente a tarefa de discriminação por singularidade, na qual os animais são expostos simultaneamente a estímulos similares e devem escolher o estímulo mais distinto (singular) em detrimento dos semelhantes, realizando, portanto, discriminação imediata

de um objeto. Não houve diferenças entre os grupos, e todos os grupos realizaram acima do acaso (Hales *et al.*, 2015).

Além disso, em outro estudo, ratos com lesões perirrinalis estavam intactos em fazer discriminações difíceis e ambíguas, apesar de estarem comprometidas em uma tarefa de memória de reconhecimento padrão (Hales *et al.*, 2015; Clark *et al.*, 2011). Pacientes com lesões de LTM que incluíam o córtex perirrinal apresentavam prejuízo significativo quando testados em sua capacidade de identificar o objeto único entre pares de objetos que tinham um alto grau de sobreposição de características (similaridade), (Knutson *et al.*, 2013). Os resultados em uma tarefa de singularidade são consistentes com o papel conhecido do córtex perirrinal e do hipocampo na formação da memória de longo prazo, contrapondo o papel perceptivo proposto ao córtex perirrinal (Hales *et al.*, 2015).

Por conseguinte, é difícil distinguir a aprendizagem prejudicada e a memória da percepção prejudicada. Um novo paradigma comportamental para o rato permitiu separar a avaliação das funções da memória da avaliação das funções perceptivas. Os animais receberam treinamento extensivo em uma tarefa de discriminação automatizada de duas opções e, em seguida, mantiveram seu desempenho de memória em um alto nível, enquanto testes de exploração interpolados testaram a capacidade de percepção visual. Os testes de exploração variaram sistematicamente o grau de ambiguidade característica entre os estímulos, de modo que as funções perceptivas pudessem ser testadas ao longo de catorze diferentes níveis de dificuldade. As lesões bilaterais do córtex perirrinal pouparam totalmente a capacidade de fazer discriminações de características semelhantes, e o desempenho de animais lesionados e intactos era indistinguível em todos os níveis de dificuldade. Em contraste, as lesões perirrinalis prejudicaram a memória de reconhecimento (Clark *et al.*, 2011).

#### **1.4 Mecanismos neurais para a memória de reconhecimento e discriminação de objetos**

Pelo menos 50 anos de evidências estabeleceram a importância de estruturas dentro do LTM como críticas para a memória declarativa. Estudos anatômicos identificaram as principais sub-regiões do LTM em humanos, macacos e roedores e sugeriram uma organização funcional hipotética para o processamento da memória (Eichenbaum *et al.*, 2007). As estruturas importantes provaram ser o hipocampo e os córtices entorrinal, perirrinal e para-hipocampal adjacentes, que compõem grande parte

do giro para-hipocampal. Porém, o LTM não pode ser o local de armazenamento final para a memória de longo prazo (Squire & Wixted, 2011).

As memórias, primariamente ligadas pelo hipocampo à codificação, são estabelecidas como um conjunto de ligações hipocampais e neocorticais (traço de memória ou engrama). Os neurônios do hipocampo esparsamente codificados fazendo referência e ativando os neurônios neocorticais, criam o conteúdo de uma experiência. Assim o hipocampo serve apenas temporariamente para essa função integrativa ou de ligação, mediando a codificação inicial, retenção e recuperação, enquanto promove a consolidação da memória no neocórtex (Sekeres, Winocur & Moscovitch, 2018).

Tem-se demonstrado que o hipocampo e suas estruturas subjacentes possuem um papel determinante para a memória episódica e de reconhecimento (Brown & Banks, 2015, Clark & Squire, 2010). A formação hipocampal é uma estrutura em forma de C que se estende no assoalho do corno temporal do ventrículo lateral. O hipocampo propriamente dito consiste em três subcampos principais (CA1-CA3). As outras regiões da formação hipocampal consistem no giro dentado (DG), no complexo subicular e no córtex entorrinal (CE). Com base em sua conectividade extrínseca, a formação hipocampal recebe uma vasta quantidade de informação sensorial multimodal altamente processada que é canalizada principalmente pelo CE (Schultz & Engelhardt, 2014).

Em princípio, o fluxo intrínseco da informação do hipocampo segue um caminho serial e em grande parte unidirecional e glutamatérgico (excitatório) que, em última análise, faz parte de um circuito fechado. Nesta cadeia intrínseca de conexões, o giro dentado representa o primeiro grande portal. O giro dentado recebe a entrada principal das células da camada II do CE através do chamado caminho perfurante. O caminho perfurante percorre caudalmente a partir do CE (via feixe angular) e perfura o subículo e o hipocampo. Especificamente, os neurônios da camada II entorrinal projetam-se para os dois terços exteriores da camada molecular do giro dentado e do estrato lacunosum-moleculare de CA3, enquanto os neurônios da camada III entorrinal se projetam para o CA1 e o subículo. As células granulares dentadas se projetam através de seus distintos axônios, as fibras musgosas, sobre as células da camada polimórfica dentada subjacente e - mais importante - sobre os dendritos proximais dos neurônios piramidais CA3. A conectividade precisa dos neurônios heterogêneos da camada polimórfica é amplamente desconhecida. No entanto, esses neurônios dão origem a projeções locais e associativas. Uma classe de célula, a célula musgosa, dá origem a um sistema associativo



córtex pósrrinal em roedores) vem de áreas que processam informações espaciais polimodais (“onde”), o córtex entorrinal medial (MEC) é compreendido como uma extensão do fluxo de processamento dorsal para esse tipo de informação (onde). O hipocampo funciona, portanto, como uma central de integra as informações ‘o que’ e ‘onde’ para formar representações flexíveis e conjuntivas do ‘o que aconteceu onde’, veja figura 2 (Knierim, Neunuebel & Deshmukh, 2018; Eichenbaum *et al.*, 2007).

Essa evidência anatômica sugere as seguintes hipóteses sobre como a informação é codificada e recuperada durante o processamento da memória. Durante a codificação, representações de itens distintos (por exemplo, pessoas, objetos, eventos) são formadas no córtex perirrinal e no cortex entorrinal lateral. Essas representações, juntamente com as projeções posteriores aos caminhos do “o quê” do neocórtex, podem apoiar julgamentos subsequentes de familiaridade. Além disso, durante a codificação, informações de itens são combinadas com representações contextuais (“onde”) que são formadas no córtex para-hipocampal e córtex entorrinal medial, e o hipocampo associa itens e seu contexto (Eichenbaum *et al.*, 2007).

Descobertas como as *place cells*, células hipocampais que codificam um lugar específico (O’keefe & Dostrovsky, 1971) e as “células em grade” que disparam em um padrão de grade com o papel de segregação de informações espaciais (Fyhn, Molden, Witter, Moser & Moser, 2004), tem contribuído de forma significativa para a compreensão da memória episódica uma vez que através das “células em grade” do MEC pode apoiar uma representação do contexto espaço-temporal que contribui para a distinção de rotas e episódios experimentais em conjunto com as “celular de lugar” que representam a série de lugares onde os eventos ocorrem em sequências que compõem memórias “episódicas” distintas (Eichenbaum, Sauvage, Fortin, Komorowski, Lipton & 2012).

As funções atribuídas às sub-regiões hipocampais para codificação de memórias episódicas incluem a separação dos padrões de atividade propagados do CE para o DG e completamento do padrão na região CA3 (Poli, Wheeler, DeMarse, Brewer, 2018). Foi implicado um mecanismo duplo para separação de padrões, no qual os sinais do CE podem ser influenciados tanto por mudanças nos padrões de coincidência no giro dentado quanto pelo recrutamento de conjuntos de células não sobrepostas em CA3 (Leutgeb, Leutgeb, Moser & Moser, 2007).

Portanto, um papel dos estágios iniciais do hipocampo na separação de padrões sugere que um conjunto duplo de mecanismos de rede está envolvido. Esses mecanismos, implementados no giro dentado e CA3, são capazes de, de diferentes maneiras, ortogonalizar completamente o padrão de disparo coletivo de conjuntos de células em CA3 (Leutgeb *et al.* 2007). Juntos, eles fornecem um potencial substrato neuronal para a desambiguação de memórias sobrepostas no hipocampo. Qual mecanismo é recrutado depende da natureza das mudanças em entradas para o hipocampo. Quando o ambiente é apenas ligeiramente modificado, em uma localização espacial fixa, a separação de padrões é expressa no giro dentado e CA3 como uma mudança no padrão de atividade correlacionada dentro da assembleia da célula ativa (Leutgeb *et al.* 2007). Em humanos, o desempenho da discriminação por objetos mostrou uma relação positiva com o volume do hipocampo, especificamente os subcampos de DG e CA3 combinados e o subículo, apontando mais uma vez para o papel de separação de padrões dessas estruturas, comportamentalmente relacionado a discriminação de objetos (Stark & Stark 2017).

O córtex perirrinal ocupa uma posição central na via “o quê”, pois transmite informações dos objetos de alta resolução para o CE e o hipocampo, além de sinalizar a novidade / familiaridade dessa mesma informação (Kinnavane *et al.*, 2016). Portanto, há evidências convincentes para indicar que o perirrinal, em vez de armazenar recursos simples de objetos, armazena representações conjuntivas que podem ser usadas posteriormente para desambiguar objetos específicos durante a recuperação da memória (Miranda *et al.*, 2017). Nesse sentido, o perirrinal poderia ser pensado como uma estrutura que atua como um “separador de padrões” para representações de objetos, desambiguando informações sobrepostas em representações separadas e menos confusas. De fato, gravações de unidades individuais do perirrinal mostraram populações de neurônios cuja taxa de disparo mudou gradualmente à medida que os objetos originalmente aprendidos foram ambigualmente transformados em graus variados, e outros neurônios cuja taxa de disparo mudou abruptamente de acordo com as categorias de respostas recompensadas associadas aos objetos (Miranda *et al.*, 2017; Ahn & Lee, 2017).

Tem se tornado cada vez mais evidente que lesões no córtex perirrinal prejudicam testes de memória de reconhecimento de objetos, em alguns estudos apesar de lesões do córtex perirrinal prejudicarem o reconhecimento, a detecção de novidade parece ter sido poupada (Olarite-Sánchez, Amim, Warburton, Aggleton, 2015; Cohen & Stackman,

2015). As lesões perirrinalis parecem também afetar a desambiguação de padrões mediante apresentação de objetos similares. (Clark *et al.*, 2011, Johnson *et al.*, 2017; Kinnavane, Amin, Olarte-Sánchez & Aggleton, 2016). Estudos demonstram que atividade neuronal perirrinal se alterou quando o rato estava próximo a um objeto, fornecendo evidências de “campos de objetos” (Roloff, Muller & Brown, 2016; Deshmukh, Johnson & Knierim, 2012).

Por ligação do córtex perirrinal com o CA3, DG e subículo dorsal (SD), estudos anteriores realizados revelaram repetidamente duas vias entorrinalis, uma ligada a discriminação do novo a partir de objetos familiares, envolve preferencialmente projeções entorrinalis ao DG / CA3, através da via perfurante (Kinnavane *et al.*, 2016). Em contraste, objetos familiares envolvem preferencialmente as projeções entorrinalis diretas ao CA1, através da via temporoamônica. Esta última via também tem sido relacionada à manutenção de memórias espaciais familiares. Ratos com lesões do córtex perirrinal tratam comportamentalmente novos estímulos como familiares, ou seja, reduziram a exploração de novos objetos Kinnavane *et al.*, (2016).

Dentro das áreas associadas ao córtex perirrinal, estudos tem demonstrado que, apesar do giro denteado e CA3 apresentarem padrões para discriminações espaciais, também foi observado uma relação entre atividade CA3/Giro denteado e desempenho em uma tarefa para objetos (Johnson *et al.*, 2017). Tem-se apontado o papel do DG em vincular informações espaciais derivadas de informações espaciais e não-espaciais, tais como objetos externos e eventos, no processo de codificação da memória episódica. Portanto, é provável que o DG desempenhe um papel mais geral na codificação da memória episódica do que meramente formar um contexto espacial distinto para cada ambiente, podendo também estar envolvido na desambiguação de componentes não espaciais (Byun & Lee 2010; Kim, *et al.*, 2015). Estudos de neuroimagem funcional sugerem que as sub-regiões do hipocampo DG e CA3 humanas apoiam a separação de padrões com base na sobreposição de características do objeto em conjunto com o córtex perirrinal (Toner, Pirogovsky, Kirwan, Gilbert, 2009). Animais colocados em caixa preta, na ausência de qualquer pista, com lesões no giro denteado são claramente prejudicados no reconhecimento de objetos no teste de 24 h em comparação com grupo controle (Dees, Kesner, 2013). As infusões de naloxona no DG romperam tanto a detecção de novidade de uma localização espacial quanto um objeto visual (Hunsaker, Mooy, Swift & Kesner, 2007).

No que se refere ao CA3, infusões de naloxona ou AP5 no CA3 interromperam tanto a detecção de novidade de uma localização espacial quanto um objeto visual (Hunsaker, Mooy, Swift & Kesner, 2007). Os déficits de memória relacionados à idade correlacionam-se com a disfunção na sub-região CA3 do hipocampo, que inclui tanto a hiperatividade quanto os padrões de atividade excessivamente rígidos, sugere-se que o LEC contribui para a hiperatividade observada em CA3 de animais idosos com déficits de discriminação de objeto (Maurer *et al.*, 2017). Ratos lesionados em CA3 exibiram prejuízo em uma função de completamento de padrão para pistas de objeto (Kesner, Kirk, Yu, Polansky & Musso, 2015).

No fim dessa conexão estrutural encontra-se a ligação com o subículo, o SD também está reciprocamente conectado aos córtices perirrinal. Chang e Huerta (2012), realizaram uma tarefa de reconhecimento com camundongos, nesta tarefa foram identificados correlatos neurofisiológicos de ondas teta claramente associados ao reconhecimento dentro do SD, tanto para níveis de rede e de unidade individuais, sugerindo fortemente que ele participa da codificação de sinais relacionados ao reconhecimento. Apesar dos poucos estudos em torno do SD, alguns sugerem que o subículo pode desempenhar um papel no reconhecimento de estímulos e processamento de memória que não depende do campo CA1 (Chang & Huerta 2012). Especificamente, quando examinados no nível da população, os neurônios com campos únicos no subículo parecem cobrir épocas críticas (escolha e recompensa) de uma tarefa de memória, de modo esquemático, esses disparos padronizados no subículo não podem simplesmente originar-se de fracas propriedades de disparo espacial, ao contrário de campos mais específicos ligados à localização no hipocampo (Lee, Lee & Lee, 2018). Além disso, tem sido sugerido que o subículo é o terceiro gerador gama espontâneo na formação do hipocampo, além da área CA3 e do CE, por que as oscilações gama foram observadas mesmo no subículo isolado (Matsumoto, Kitanishi & Mizuseki, 2018). Por fim, Trimper *et al.*, (2017) relatou a presença de atividade oscilatória (teta, gama-lenta, gama-rápida) no hipocampo relacionada a memória de reconhecimento de objetos nas áreas do DG, CA3 e subículo. Portanto é sugestível que estas áreas estejam envolvidas no processamento de informações relacionadas a objetos, em virtude de seus padrões neurais e de comprometimento.

A separação de padrões e as tarefas de similaridade podem influenciar a memória de modo a aumentar a demanda de memória, devido ao aprendizado de maior quantidade

de detalhes. Levando-se em consideração diversos protocolos disponíveis para modelos de uma visão unicamente perceptiva (Norman & Eacott 2004; Johnson *et al.*, 2017) ou mnemônica Clark *et al.*, (2011). Aqui propõe-se uma adaptação da tarefa proposta por o Manns e Eichenbaum, (2009) como uma possibilidade que viabiliza o registro eletrofisiológico em uma tarefa de discriminação de objetos em diferentes graus de similaridade com múltiplas sessões (Roloff, Muller & Brown, 2016).

## 2. JUSTIFICATIVA

Alterações da memória são percebidas ao longo da vida, uma região primária do cérebro afetada pelo envelhecimento normal é o hipocampo em humanos. No entanto, as sub-regiões do hipocampo podem ser diferencialmente afetadas pelo envelhecimento normal. O córtex perirrinal e as sub-regiões do DG, CA3 podem ser particularmente suscetíveis a mudanças relacionadas à idade tanto em humanos como em animais (Johnson *et al.*, 2017; Maurer *et al.*, 2017). Associado a todos esses défices, mudanças nas entradas corticais (CE) para o hipocampo podem contribuir para um declínio da memória episódica e diminuição da capacidade de manter detalhes de cada evento, necessários para uma memória íntegra (Toner *et al.*, 2009; Johnson *et al.*, 2017; Maurer *et al.*, 2017).

Apesar das diversas tarefas de reconhecimento de objetos e da necessidade de avaliação da memória de reconhecimento a partir de medidas eletrofisiológicas, que necessitam de mais de um teste por dia, poucas tarefas buscaram investigar o registro do reconhecimento de objetos com a possibilidade de vários testes por dia, portanto estabelecer um protocolo que contorne todos esses aspectos é fundamental (Roloff, Muller & Brown, 2016).

Faz-se necessário o uso de tarefas que viabilizem o registro eletrofisiológico em uma tarefa de reconhecimento de objetos com múltiplas sessões, 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 relacionados às especificidades para “o que”, “onde” e “quando”. Além disso também é necessário testar animais em situações em que muitos objetos diferentes ou semelhantes precisam ser discriminados na ausência de informação espacial (Byun & Lee 2010; Brown & Banks, 2015).

Considerando-se o esforço direcionado à redução do uso de animais para um número mínimo possível, tarefas que propiciem múltiplos testes podem ser um recurso promissor que viabiliza o uso de um menor número de animais, com menor número de manipulações possível e uma maior quantidade de dados obtidos dentro do mesmo teste (Russel & Burch, 1959; Balls, Zeller & Halder, 2000).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Geral**

- Estabelecer uma tarefa de reconhecimento simples e discriminação com múltiplas sessões

#### **3.2 Específico**

- Adaptar uma tarefa de reconhecimento simples com múltiplas sessões
- Adaptar uma tarefa de discriminação com diferentes níveis de similaridade com múltiplas sessões
- Avaliar se os animais conseguem discriminar objetos com níveis de 25%, 50% e 75% de similaridade.

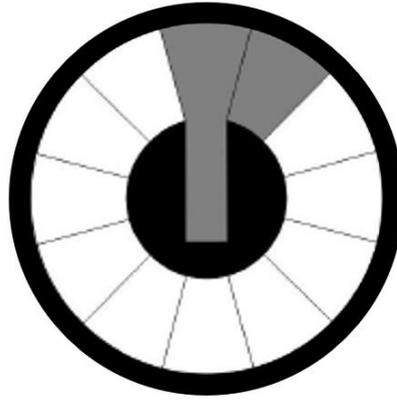
## **4. MATERIAL E MÉTODO**

### **4.1 Animais**

Foram utilizados 15 ratos Wistar machos com idade aproximada de 3 meses, mantidos em uma sala com controle acústico, de umidade e temperatura ( $24 \pm 1^\circ\text{C}$ ). Os ratos foram submetidos a um ciclo claro-escuro de 12:12 horas e todos procedimentos foram realizados na fase clara do ciclo, entre 10:00 horas e 18:00 horas. Para controle da restrição alimentar cada animal foi alocado para um compartimento da gaiola de polietileno (Medidas por gaiola: 37 cm de comprimento x 30 cm de largura x 16 cm de altura), os compartimentos foram estabelecidos a partir de uma divisória acrílica acoplada no meio da gaiola, dividindo-a em dois compartimentos iguais.

### **4.2 Aparato experimental**

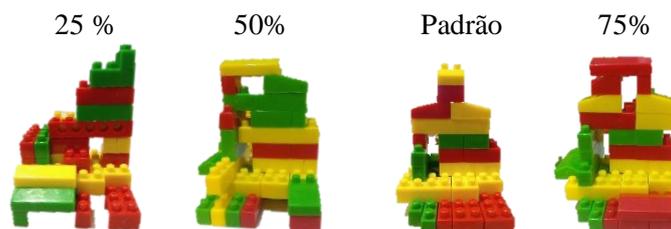
O aparato experimental consistiu em um campo aberto com 90 cm de diâmetro, paredes com 45 cm de altura, e no centro uma parede circular com 40 cm de diâmetro e 40 cm de altura, com uma caixa preta opaca no centro (30 cm de comprimento x 15 cm de largura x 40 cm de altura) (Manns & Eichenbaum, 2009), com uma porta ligando a uma pista externa de 25 cm de largura. A esquerda da saída da caixa, uma segunda porta foi colocada para impedir que os animais caminhem no sentido anti-horário. Ambas as portas possuem acionamento manual, realizado 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 3. A luminosidade média durante a realização dos procedimentos foi de aproximadamente 7 lux. Um ruído branco foi utilizado durante todos os procedimentos comportamentais. O aparato experimental e os objetos foram sempre limpos com solução de álcool etílico a 5% depois de cada sessão, e ao fim de cada dia de experimento com álcool a 70%.



**Figura 3.** Aparato experimental utilizado nos experimentos de múltiplas sessões.

### 4.3 Objetos

Os objetos foram construídos a partir de LEGOS® para todas as tarefas. Os pares de objetos foram correspondidos para volume, forma e textura gerais, enquanto variam 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 em diferentes níveis de similaridade foram utilizados 60 objetos com 40 formas diferentes. Foram estabelecidos os valores sistemáticos (~25% a ~75%) da similaridade da forma dos objetos com base no volume e compartilhamento de características visíveis. 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). Primeiro, como um fator de volume 3D total de bloco "bits", onde um bit é a unidade do bloco LEGO® correspondente a um único pip (quadrado) 3D, veja Anexo 1. A sobreposição também foi calculada como um fator de recursos de superfície compartilhada na parte frontal de cada objeto, visível para os ratos (Johnson *et al.*, 2017). Veja exemplo de objetos utilizados na figura 4.



**Figura 4.** Objetos utilizados na tarefa de discriminação. O primeiro objeto da esquerda para a direita apresenta 25% de similaridade, seguido o objeto com 50% de similaridade, o objeto padrão e o objeto de 75% de similaridade.

#### **4.4 Procedimentos comportamentais gerais**

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. A padronização das tarefas se deu a partir da realização de três experimentos comportamentais, posteriormente descritos. Tanto as sessões de habituação quanto as sessões do teste foram gravadas pela WebCam (FaceCam 1020, Genius®) situada a 90cm acima do centro da área, através do *software* DebutVideo Capture.

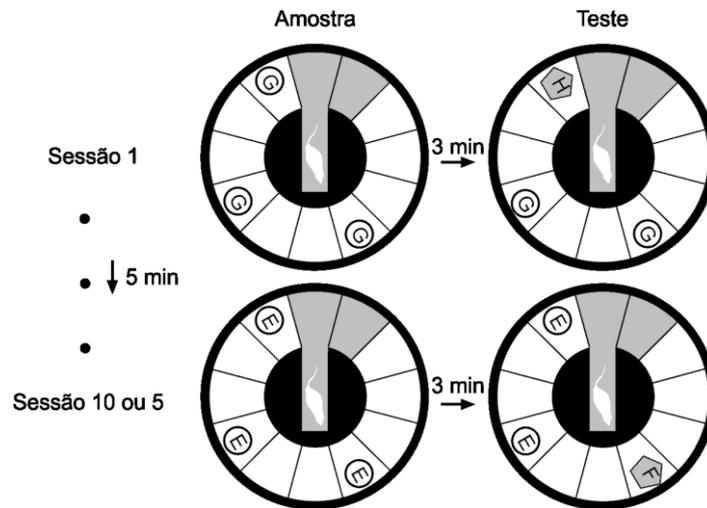
##### **4.4.1 Manipulação, Habituação e modelagem.**

Os animais foram alocados na sala de experimentos com 30 minutos de antecedência para sua ambientação antes de qualquer procedimento comportamental. A fim de garantir a redução do estresse animal e manter a familiaridade com o experimentador, antes de iniciar a testagem, os animais foram manipulados por 15 minutos durante 5 dias pelo experimentador. Em seguida foram habituados ao aparato experimental e modelados comportamentalmente, até aprenderem a percorrer, no sentido horário, todo o campo, recebendo 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 o teste.

##### **4.4.2 Padronização da Tarefa de reconhecimento de objetos.**

A tarefa de reconhecimento de objetos é composta por duas tentativas, sendo uma amostra e um teste. Os animais davam três voltas na pista circular para exploração dos objetos para cada tentativa de amostra e teste, com intervalos de três minutos entre as tentativas. Foram realizados 10 sessões de exploração, com cinco minutos de intervalo entre elas, divididas em duas baterias (5 sessões/ dia). Na amostra o animal foi exposto a três objetos LEGOS idênticos, em posições específicas. No momento do teste são dispostas duas cópias idênticas dos objetos apresentados na amostra e um novo objeto LEGO totalmente distinto, todos os objetos foram colocados no mesmo local em que os objetos foram expostos na amostra, de acordo com a figura 5. A posição e formas dos

objetos LEGO's foram contrabalanceados para os animais. Os objetos foram sempre mantidos na mesma posição ao longo das tentativas e sessões.



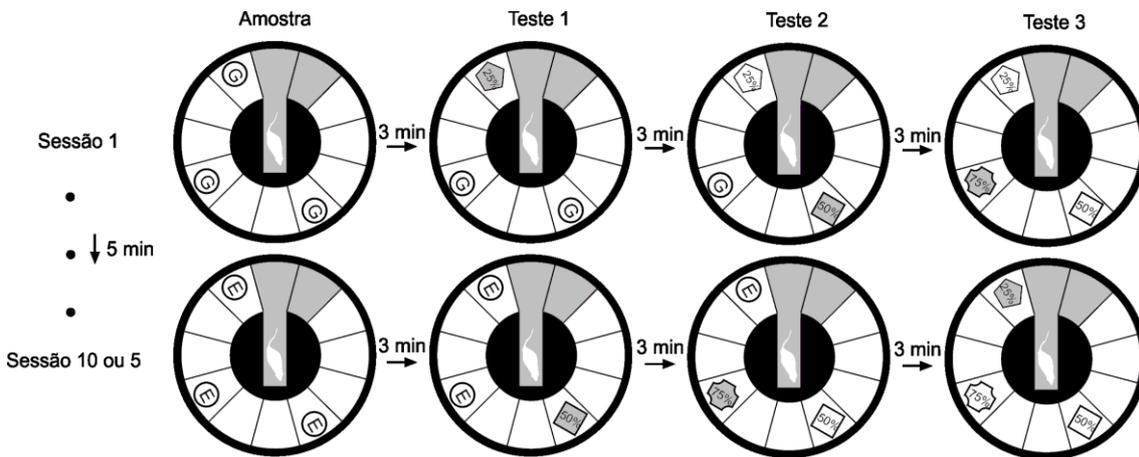
**Figura 5.** Modelo do desenho experimental de múltiplas sessões. G, H, E e F representam os objetos e suas respectivas posições no aparato.

#### **4.4.3 Padronização da tarefa de discriminação de objetos em diferentes níveis de similaridade.**

A tarefa de discriminação de objetos em diferentes níveis de similaridade é composta por quatro tentativas, sendo 1 de amostra e três de teste com intervalo de 3 minutos entre eles. Os animais realizaram três voltas na pista circular para exploração dos objetos para cada tentativa de amostra e teste. Foram realizados 10 sessões de exploração, com cinco minutos de intervalo entre elas, divididas em duas baterias (5 tentativas/ dia).

Na fase de amostra o animal foi exposto a três objetos LEGOS idênticos, em posições específicas. Ao longo de cada um dos três testes, cada um dos objetos apresentados na amostra foi substituído por um objeto novo com um grau de similaridade específico 25%, 50% ou 75%. No primeiro teste são dispostas duas cópias idênticas dos objetos apresentados na amostra, um novo objeto LEGO, com um grau de similaridade com o antigo objeto, é apresentando. No segundo teste são dispostas duas cópias idênticas dos objetos apresentados no primeiro teste (objeto da primeira amostra e objeto recém alterado em grau de similaridade), um novo objeto LEGO, com um grau de similaridade com o antigo objeto, é apresentando, assim como no primeiro teste. No último teste são dispostas duas cópias idênticas dos objetos apresentados no segundo teste (objetos alterados no primeiro e segundo teste em grau de similaridade), um novo objeto LEGO, com grau de similaridade com o antigo objeto ainda inalterado, é apresentado. Durante

os três testes todos os objetos foram mantidos no mesmo local em que suas cópias exatas ou similares foram expostas na amostra. A posição, formas dos objetos LEGO's, lugar e ordem do grau de similaridade foram contrabalanceados para os animais, veja figura 6.



**Figura 6.** Modelo do desenho experimental de múltiplas sessões. G e E representam os objetos e suas respectivas posições no aparato. % representa o grau de similaridade.

#### 4.5 Análise comportamental e estatística

Os dados foram analisados com o auxílio do *EthoWatcher* (Junior *et al.*, 2012), software de rastreamento etológico, no qual o experimentador faz o comando de quando o animal aproximou-se de um objeto e explorou, através de comandos manuais. Foi definido como exploração quando o focinho do animal tocar ou estiver a menos de 1 cm do objeto. Não foi considerado exploração quando o animal se apoiava no objeto para explorar o ambiente, ou permanência do focinho próximo ao objeto sem atividade exploratória. Somado a isso, foram realizadas análises da distância total percorrida e velocidade média para cada animal, através do *Autotyping*, um toolbox utilizado para análises comportamentais (Patel *et al.*, 2014).

Foi avaliado o engajamento do animal para explorar o objeto novo em comparação aos objetos familiares, como forma de índice do reconhecimento para a novidade. Para isso 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. (Veja figura 7). O índice 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).

Índice de discriminação

$$\frac{N-F}{N+F}$$

Valor entre -1 e 1

**Figura 7.** Demonstração da construção da medida do índice de discriminação. N corresponde ao tempo de exploração do objeto novo e F corresponde a média de exploração dos objetos familiares.

Os procedimentos estatísticos foram conduzidos com o programa SPSS (24.0) e diferenças foram consideradas estatisticamente significantes com um valor de p igual ou menor que 0,05. A normalidade foi verificada através do teste de *Shapiro-Wilk*. Para a comparação dos tempos de exploração entre tentativas e sessões foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de medidas repetidas seguida do teste *post-hoc* de Bonferroni, para os casos que a esferecidade foi violada utilizou-se a correção de Greenhouse e Geisser e quando a comparação foi feita entre objetos novos e familiares 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).

## **5. PROCEDIMENTOS E RESULTADOS ESPECÍFICOS DE CADA EXPERIMENTO**

Cada experimento foi construído pensando-se a necessidade e objetivo aqui proposto, por tanto foram especificados os procedimentos adotados para cada delineamento experimental proposto, bem como os resultados obtidos a partir deles.

### **5.1 Experimento 1- Padronização da tarefa de reconhecimento e discriminação de objetos com múltiplas sessões com 10 sessões e 3 voltas**

#### **5.1.1 Animais**

Foram utilizados 5 ratos machos *Wistar* adultos com aproximadamente 4 meses de idade nas condições experimentais anteriormente descritas, mantidos com água e comida *ad libitum*, até serem transferidos para gaiolas individuais para início da restrição alimentar. A fim de aumentar a exploração espontânea os ratos foram colocados em uma dieta restrita 13g/dia para que seus pesos permanecessem em torno de 85% do seu peso de alimentação livre (Miranda *et al.*, 2017; Tomanari, Pine & Silva, 2003). Os animais receberam recompensa disposta ao lado de todos os objetos nos treinos e teste. Antecedendo o experimento os ratos foram pesados para garantir o controle do peso.

#### **5.1.2 Modelagem**

Durante cada volta a porta central era mantida aberta, portanto após a finalização de 1 volta o animal retornava a esta caixa, porém a recompensa apenas era dada ao fim de 3 voltas. A recompensa (glóbulos de sacarose) no centro da caixa era oferecida com auxílio de um dispensador de pellets (Insight, Brasil) de acionamento manual, anexa à caixa no centro. Como critério, os animais foram considerados modelados quando realizaram três sessões seguidas de três voltas corretas. Após essas etapas os ratos estavam aptos para a realização da tarefa de reconhecimento de objeto e discriminação de objetos em diferentes níveis de similaridade.

#### **5.1.3 Delineamento experimental**

Para cada amostra e teste os animais realizavam três voltas, permitindo assim que o animal possua três encontros com os objetos em cada amostra e teste dentro das sessões. Ocorreram duas baterias de cinco sessões para cada tarefa (NOR e Discriminação), totalizando 10 tentativas por animal em cada tarefa, com 48 horas de intervalo entre as baterias e 72h entre as duas tarefas, no intuito de reduzir a força do traço da memória para

o protocolo, bem como evitar a fadiga. A figura 8 ilustra como os procedimentos comportamentais foram distribuídos em dias.



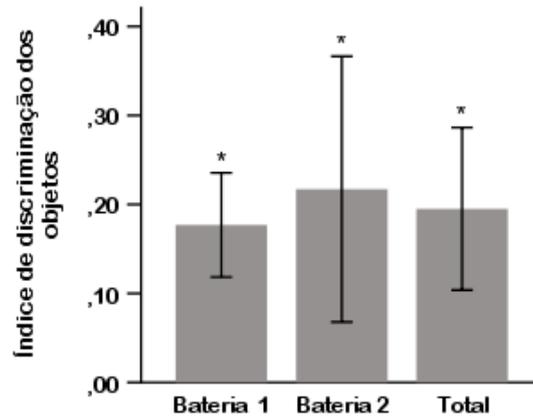
**Figura 8.** Ilustração dos procedimentos comportamentais e seus respectivos dias

#### 5.1.4 Análise

Além das análises anteriormente relatadas, também foi realizada uma análise alternativa para a tarefa NOR, na qual foram comparados os tempos de exploração entre os objetos novos e familiares de todas as sessões, com critério de exploração mínima de três segundos durante a amostra (N=5). Um dos animais não conseguiu realizar as sessões do dia 2 para o teste de discriminação, portanto este foi excluído das análises para o dia 2. Deve-se considerar que para algumas sessões e voltas o número de sujeitos foi reduzido devido à ausência de exploração seja na volta ou sessão analisada.

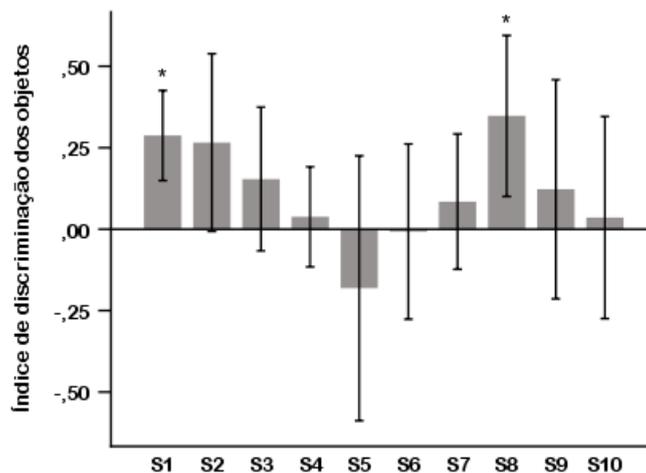
#### 5.1.5 Resultados

As primeiras análises direcionadas a tarefa NOR demonstram que os animais apresentaram memória para a identidade dos objetos, uma vez que os animais exploraram significativamente mais o objeto novo, seus índices de discriminação foram significativamente maiores que 0 tanto para a bateria 1 [ $t(4) = 6,04$ ,  $p = 0,004$ ;  $dz = 2,70$ ] e 2 [ $t(4) = 2,90$ ,  $p = 0,04$ ;  $dz = 1,30$ ], como para o total veja figura 9. [ $t(4) = 4,27$ ,  $p = 0,013$ ;  $dz = 1,91$ ].



**Figura 9.** Índice de discriminação na tarefa NOR por bateria e total \*Comparações significativas considerando-se  $p < 0,05$ . Teste t de uma amostra ( $N=5$ );  $\pm$  Erro Padrão da média.

A análise por sessão aponta que apenas as sessões 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 quando comparados a 0, todas as demais sessões apresentaram índices não diferentes do acaso ( $p > 0,05$ ), conforme figura 10.

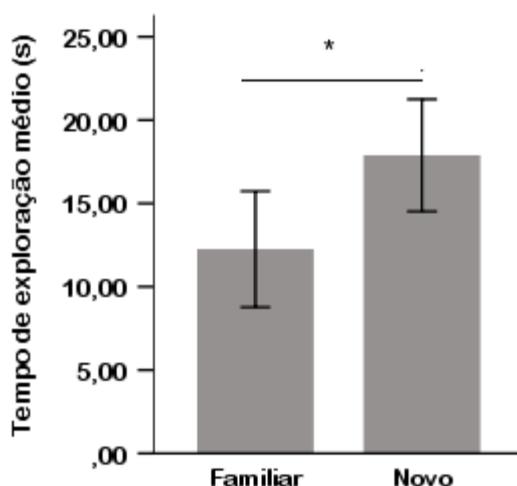


**Figura 10.** Índice discriminação tarefa NOR por sessão. \*Comparações significativas considerando-se  $p < 0,05$ . Teste t de uma amostra ( $N=5$ );  $\pm$  Erro Padrão da média.

Para cada volta por bateria e total verificou-se índices significativos apenas para a volta 1 na primeira bateria [ $t(4)= 5,15$ ,  $p= 0,007$ ;  $dz=2,30$ ] e total [ $t(4)= 5,25$ ,  $p= 0,006$ ;  $dz= 2,35$ ]. A volta 1 correspondente a bateria 2 não apresentou valor acima do acaso, as demais voltas 2 e 3 também não apresentaram valores significativos ( $p > 0,05$ ) em nenhuma das baterias. Dados ilustrados no suplemento 1.

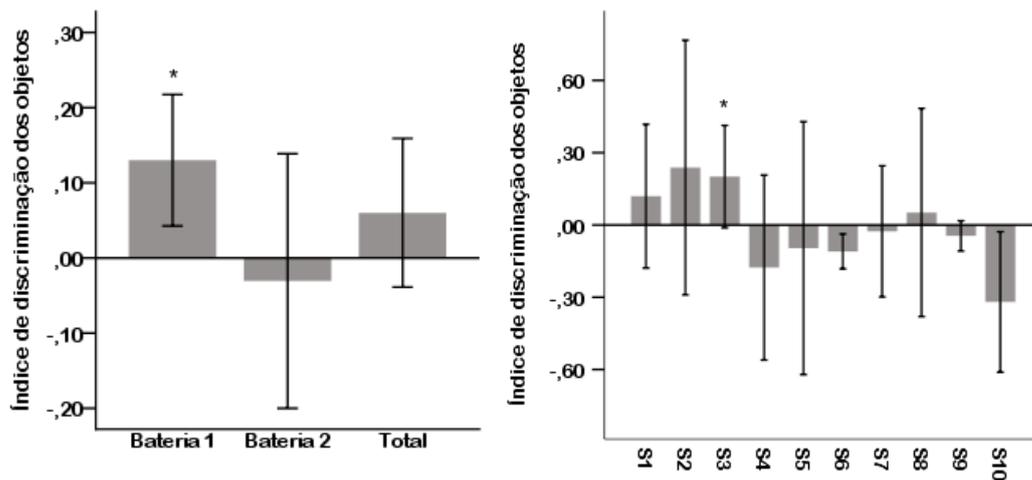
Foi conduzida uma ANOVA de medidas repetidas para verificação do tempo de exploração, a qual apontou não existir diferença significativa entre os níveis de exploração dos testes para cada sessão [ $F_{(9, 36)}=0,97$ ;  $p=0,41$ ] veja suplemento 2.

Uma comparação entre os valores médios das 10 sessões para o tempo de exploração dos objetos novos e familiares demonstrou que os objetos novos foram significativamente mais explorados que os objetos familiares [ $t(4)=5,30$ ,  $p=0,006$ ,  $dz=1,47$ ], como ilustrado na figura 11.



**Figura 11.** Exploração de objetos novos e familiares na tarefa NOR. \*Diferenças estatisticamente significantes ( $p<0,05$ ). Teste t de medidas repetidas ( $N=5$ );  $\pm$  Erro Padrão da média.

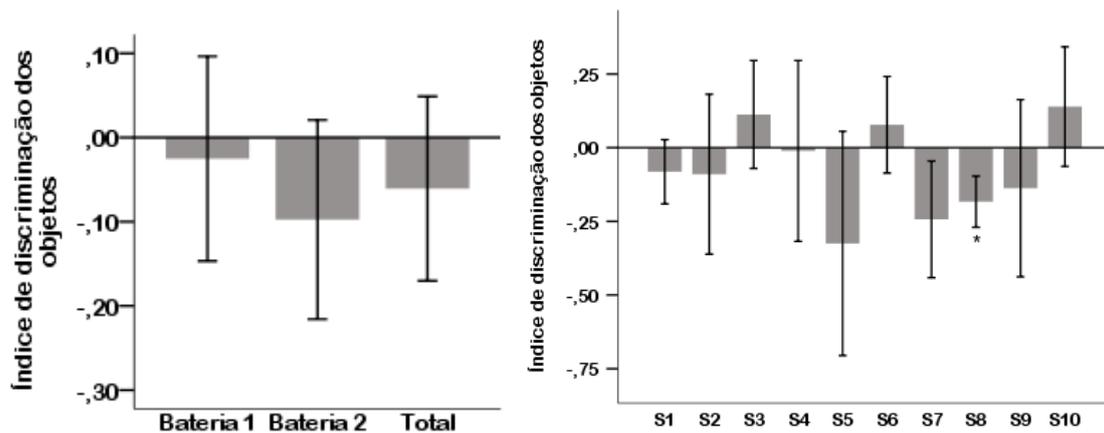
No que se refere ao teste de discriminação, para o nível de similaridade de 25% verificou-se que os animais exploraram mais o objeto novo que o familiar na bateria 1, os índices de discriminação foram significativamente maiores que 0 para esta bateria [ $t(4)=3,919$ ,  $p=0,017$ ;  $dz=1,75$ ]. Para a bateria 2 e total tais índices não foram acima do acaso ( $p>0,05$ ). Para cada sessão de 25% foi verificado que apenas a sessão 3 apresentou índice acima do acaso [ $t(4)=3,23$ ,  $p=0,03$ ;  $dz=1,45$ ]. As demais sessões não apresentaram valores acima do acaso ( $p>0,05$ ), veja figura 12.



**Figura 12.** Índice de discriminação por bateria, total e por sessão para o nível de similaridade de 25%, tarefa de discriminação. \*Comparações significativas considerando-se  $p < 0,05$ . Teste t de uma amostra (Bateria 1,  $N=5$ ; Bateria 2,  $N=4$ ; Sessão 1 a 5,  $N=5$ ; Sessão 6 a 10,  $N=4$ );  $\pm$  Erro Padrão da média.

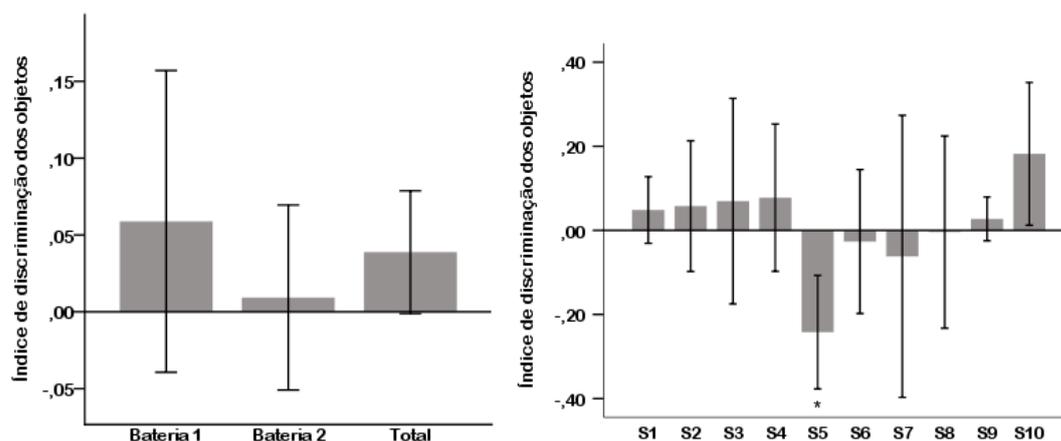
Para cada volta do nível de 25% de similaridade, verificou-se que os animais discriminaram significativamente apenas na volta 1 da bateria 1 [ $t(4)=3,9$ ,  $p=0,018$ ,  $dz=1,74$ ], a bateria 2 e o total não apresentaram índices significativos ( $p > 0,05$ ). Para a volta 3 foi identificada uma tendência na bateria 2 [ $t(2)=3,80$ ,  $p=0,06$ ,  $dz=2,19$ ]. Não foram encontrados valores acima do acaso para as demais voltas em nenhuma bateria ( $p > 0,05$ ). Dados ilustrados no suplemento 3.

No nível de similaridade de 50% os animais não discriminaram o objeto novo em relação ao familiar. Não foram encontrados valores diferentes do acaso para nenhuma das baterias ( $p > 0,05$ ) veja figura 13. Não foram verificados valores acima do acaso para as sessões ( $p > 0,05$ ), com exceção da sessão 8, que apresentou índice negativo [ $t(3)=4,23$ ,  $p=0,02$ ;  $dz=2,12$ ]. Para cada volta por bateria também não se obteve valores significativos ( $p > 0,05$ ), veja suplemento 4.



**Figura 13.** Índice de discriminação por bateria, total e por sessão para o nível de similaridade de 50%, tarefa de discriminação. \*Comparações significativas considerando-se  $p < 0,05$ . Teste t de uma amostra (Bateria 1,  $N=5$ ; Bateria 2,  $N=4$ ; Sessão 1 a 5,  $N=5$ ; Sessão 6 a 10,  $N=4$ );  $\pm$  Erro Padrão da média.

Para 75% de similaridade também não foram encontrados índices significativos para nenhuma bateria ( $p > 0,05$ ), veja figura 14. Apenas a sessão 5 apresentou um índice negativo, significativo [ $t(4)=4,63$ ,  $p=0,01$ ;  $d_z=2,07$ ]. Nenhuma volta apresentou valores acima do acaso ( $p > 0,05$ ), suplemento 5. No geral, os animais não apresentaram memória para os objetos com 75% de similaridade.

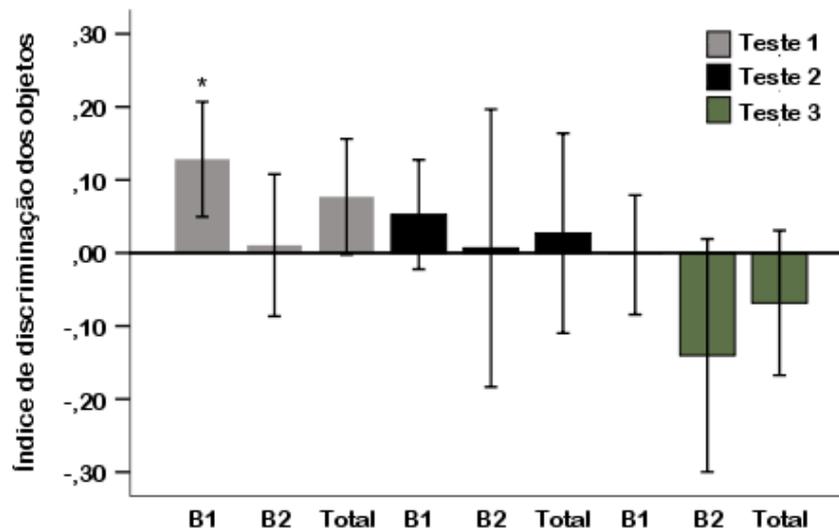


**Figura 14.** Índice de discriminação por bateria, total e por sessão para o nível de similaridade de 75%, tarefa de discriminação. \*Comparações significativas considerando-se  $p < 0,05$ . (Bateria 1,  $N=5$ ; Bateria 2,  $N=4$ ; Sessão 1 a 5,  $N=5$ ; Sessão 6 a 10,  $N=4$ );  $\pm$  Erro Padrão da média.

Considerando-se cada teste na tarefa de discriminação, independentemente do nível de similaridade verificou-se que para o Teste 1, primeiro momento que o animal se

encontra com um objeto novo, os índices encontraram-se acima do acaso na bateria 1 [t(4)=4,31, p=0,01; dz=1,93] e uma tendência para total [t(4)=2,61, p=0,057; dz=1,19], veja figura 15. Para cada sessão foram encontrados índices significativos para a sessão 2 [t(4)=5,61, p=0,05; dz=2,53] e 8, obtendo esta última um índice negativo [t(3)=-4,23, p=0,02; dz=0,42], veja figura 16. Um índice significativo também foi encontrado para a volta 1 da bateria 1 [t(4)=3,24, p=0,03, dz=1,45]. Os animais parecem apresentaram memória para os objetos novos na primeira bateria, para o teste 1.

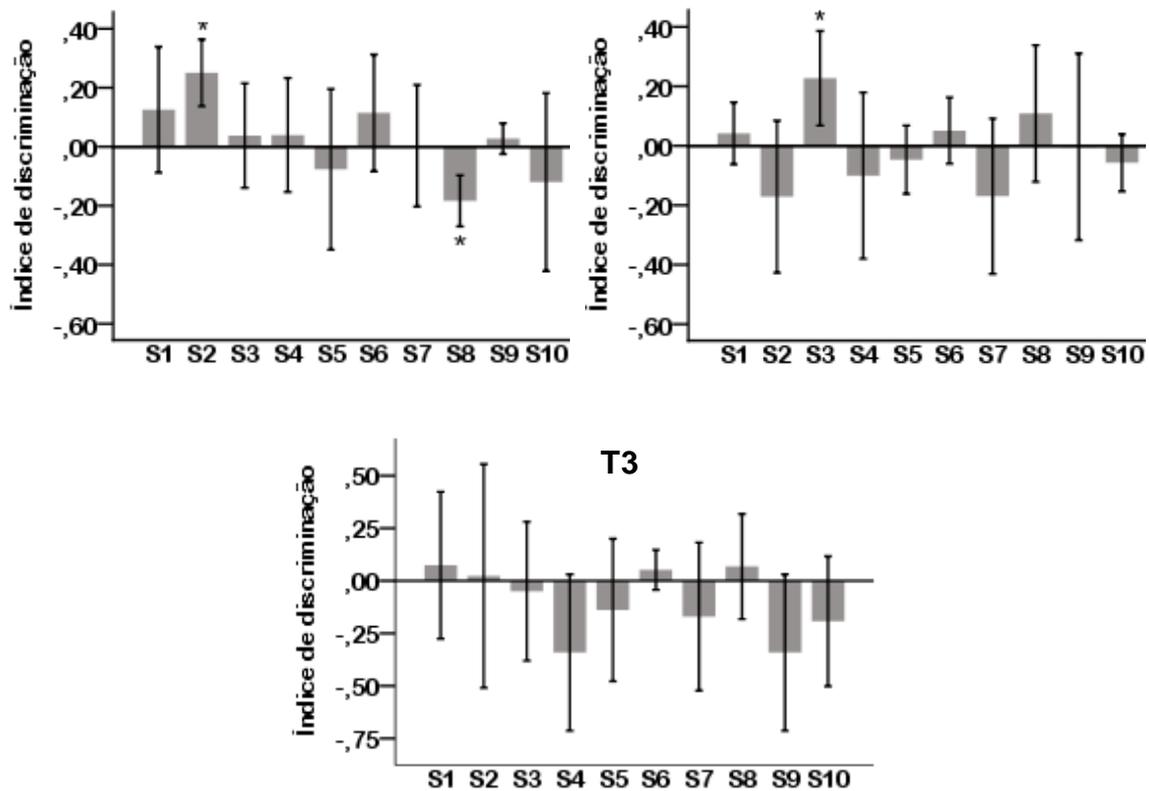
Para o Teste 2 não foram encontrados índices significativos em nenhuma bateria (p>0,05). Um valor acima do acaso foi observado apenas na sessão 3 [t(4)=3,23, p=0,03; dz=1,45], as demais sessões não obtiveram índices significativos (p>0,05). Nenhuma volta apresentou valores significativos em nenhuma bateria (p>0,05), apenas uma tendência foi observada para a volta 2 na bateria 2 [t(3)=3,11, p=0,053; dz=1,56]. No teste 3, último teste, nenhum índice significativo foi observado em nenhuma bateria (p>0,05). Nenhuma sessão ou volta apresentou índices significativos (p>0,05). No geral os ratos não discriminaram os objetos novos dos familiares no teste 2 e 3.



**Figura 15.** Índice de discriminação bateria 1 e 2 e total para cada teste \*Comparações significativas considerando-se p<0,05. B= Bateria. Teste t de uma amostra (Bateria 1, N=5; Bateria 2, N=4); ± Erro Padrão da média.

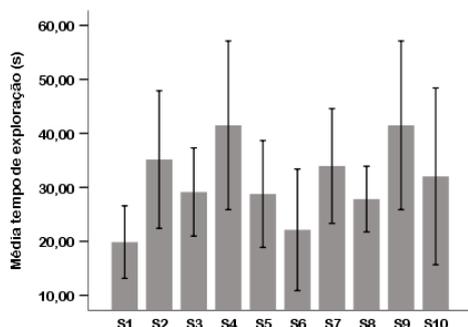
**T1**

**T2**

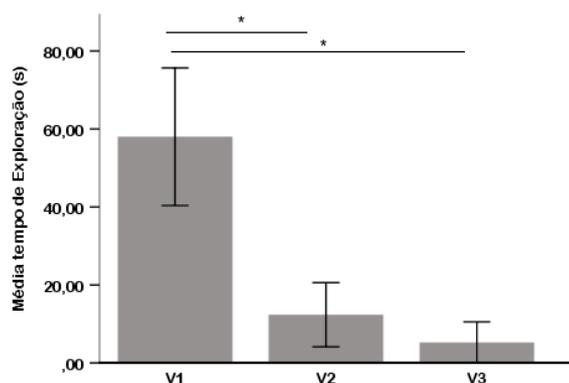


**Figura 16.** Índice de discriminação por sessão para cada teste. \*Comparações significativas considerando-se  $p < 0,05$ . T= Teste. Teste t de uma amostra; (T1 T2 T3, N=5);  $\pm$  Erro Padrão da média.

No que se refere aos tempos de exploração para o teste de discriminação, verificou-se a partir de uma ANOVA de um fator que não existe diferença significativa entre o tempo de exploração em cada sessão [ $F_{(9, 18)}=5,78, p=0,106$ ], veja figura 17. A partir de outra ANOVA de um fator foi possível verificar que também não existiu diferença significativa entre o tempo de exploração para as amostras e cada teste da tarefa de discriminação [ $F_{(3,12)}=0,80; p=0,51$ ]. Quanto as voltas a ANOVA de um fator encontrou uma diferença significativa no tempo de exploração, considerando-se a violação da esfericidade ( $p < 0,05$ ), foi realizada a correção dos graus de liberdade por meio de Greenhouse-Geisser [ $F_{(2, 8)}= 54,76, p=0,001$ ], na qual foi evidenciada que a volta 1 obteve um valor significativamente maior que a volta 2 (Teste de Bonferroni,  $p=0,004$ ), a volta 1 também apresentou valor significativamente maior que a volta 3 (Teste de Bonferroni,  $p=0,006$ ), veja figura 18.



**Figura 17.** Tempo total de exploração dos objetos por sessão para a tarefa de discriminação. ANOVA de medidas repetidas; N=5.  $\pm$  Erro Padrão da média.



**Figura 18.** Tempo total de exploração dos objetos por volta para a tarefa de discriminação. \*Comparações significativas considerando-se  $p < 0,05$ . V=volta. ANOVA de medidas repetidas; N=5.  $\pm$  Erro Padrão da média.

## 5.2 Experimento 2- Padronização da tarefa de reconhecimento e discriminação de objetos com múltiplas sessões com 10 sessões e 1 volta

Considerando-se a ineficiência das voltas 2 e 3 e as reduções estatisticamente significantes nas mesmas, algumas alterações foram feitas no protocolo experimental afim de se verificar como o desempenho dos animais se daria realizando-se apenas uma volta. Além disso levando em conta que o objetivo dos protocolos aqui propostos é o futuro uso para registro eletrofisiológicos, optou-se por remover a recompensa que se encontrava do lado dos objetos, afim de se evitar possíveis ruídos durante o registro e consequente perda de dados.

### 5.2.1 Animais

Participaram desse experimento 5 ratos machos Wistar adultos com aproximadamente 4 meses de idade nas condições experimentais anteriormente descritas, mantidos com água e comida *ad libitum*, até serem transferidos para gaiolas individuais

para início da restrição alimentar. A fim de aumentar a exploração espontânea os ratos foram colocados em uma dieta restrita 13g/dia para que seus pesos permanecessem em torno de 85% do seu peso de alimentação livre (Miranda *et al.*, 2017; Tomanari, Pine & Silva, 2003). Diferente do experimento 1 os animais não receberam recompensa disposta ao lado de todos os objetos nos treinos e teste. Antecedendo e durante o experimento os ratos foram pesados para garantir o controle do peso.

### **5.2.2 Modelagem**

Durante cada volta a porta central era mantida aberta, portanto após a finalização de 1 volta o animal retornava a esta caixa, onde recebia recompensa. A recompensa (glóbulos para homeopatia – sacarose) 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 realizaram 20 voltas corretas dentro de 15 minutos. Após essas etapas os ratos estavam aptos para a realização da tarefa de reconhecimento de objeto e discriminação de objetos em diferentes níveis de similaridade.

### **5.2.3 Delineamento experimental**

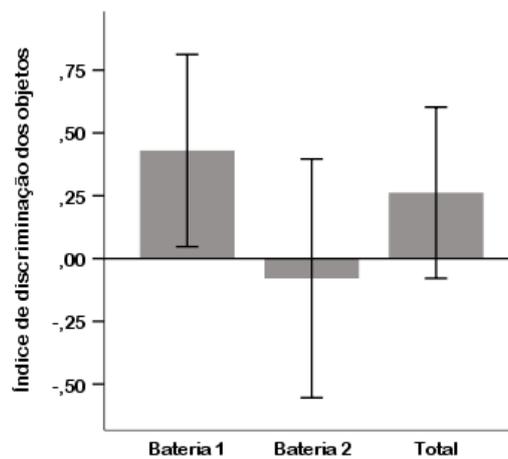
Para cada amostra e teste os animais realizavam 1 volta, permitindo assim que o animal tivesse apenas 1 encontro com os objetos em cada amostra e teste dentro das sessões, além disso foi adicionada uma volta vazia no início de cada sessão. Foram realizadas 10 sessões para cada tarefa (NOR e Discriminação), a realização das sessões era dependente da motivação do animal, totalizando 10 tentativas por animal em cada tarefa, com 24 horas de intervalo entre as baterias e 48h entre as duas tarefas, no intuito de reduzir a força do traço da memória para o protocolo, bem como evitar a fadiga. Como apenas 1 animal conseguiu realizar as 10 sessões do experimento de discriminação, a bateria 2 foi excluída, concentrando-se as análises apenas na bateria 1.

### **5.2.4 Análise**

Também foi realizada uma análise alternativa para a tarefa NOR, na qual foram comparados os tempos de exploração entre os objetos novos e familiares de todas as sessões. Deve-se considerar que para algumas sessões e voltas o número de sujeitos foi reduzido devido à ausência de exploração seja na volta ou sessão analisada.

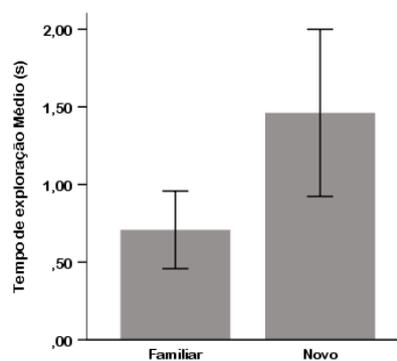
### 5.2.5 Resultados

Analisados os dados para a tarefa NOR não foram encontrados índices significativos para nenhuma bateria: bateria 1 [ $t(4)=2,24$ ,  $p=0,08$ ;  $dz=1,0$ ]; bateria 2 [ $t(4)=-0,33$ ,  $p=0,75$ ;  $dz=0,14$ ] e total [ $t(4)=1,53$ ,  $p=0,19$ ;  $dz=0,68$ ], veja figura 19. Nenhum resultado significativo foi encontrado na análise por sessão veja suplemento 6. A ANOVA de um fator não encontrou diferenças significativas entre os tempos de exploração para cada sessão [ $F_{(9, 36)}= 1,45$ ,  $p=0,29$ ].



**Figura 19.** Índice discriminação tarefa NOR por dia e total. Teste t de uma amostra (N=5).  $\pm$  Erro padrão da média.

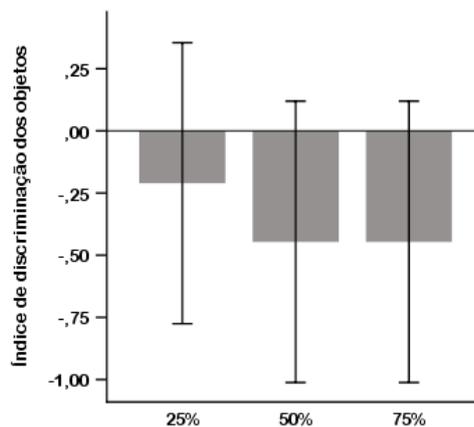
Uma comparação foi feita entre as médias do tempo de exploração dos objetos novos e familiares de todas as sessões, porém nenhuma diferença significativa foi encontrada ( $p>0,05$ ). Pode-se verificar o tempo de exploração dos objetos a partir da figura 20.



**Figura 20.** Tempo de exploração médio dos objetos novos e familiares na tarefa NOR. Teste T de duas amostras (N=5).  $\pm$  Erro padrão da média.

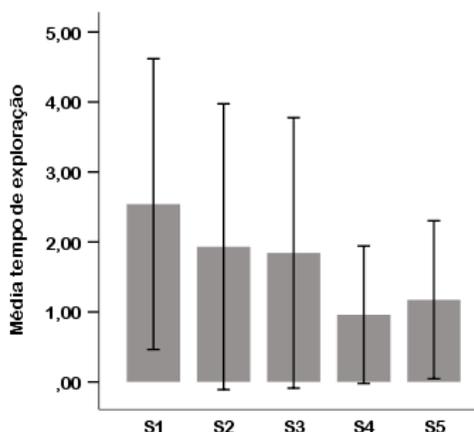
Para o teste de discriminação também não foram observados índices significativos para nenhum dos níveis de similaridade: 25% [ $t(4)=-0,74$ ,  $p=0,49$ ;  $dz=0,33$ ]; 50% [ $t(4)=-$

1,57,  $p=0,19$ ;  $d_z=0,70$ ]; 75% [ $t(4)=-1,48$ ,  $p=0,21$ ;  $d_z=0,66$ ], dados ilustrados na figura 21. Quando analisados por sessão foi verificado que para o nível 25% a sessão 3 apresentou índice negativo significativo [ $t(3)=-5,08$ ,  $p=0,01$ ;  $d_z=2,54$ ] (Suplemento 7). Para 50% de similaridade uma tendência foi observada na primeira sessão, com índice negativo [ $t(3)=-2,63$ ,  $p=0,078$ ;  $d_z=1,31$ ] (Suplemento 8). Por fim, o nível de 75% apresentou índice negativo significativo na primeira sessão [ $t(4)=-3,07$ ,  $p=0,03$ ;  $d_z=1,37$ ] (Suplemento 9). Nenhum valor significativo foi observado nas comparações feitas entre o acaso e os índices dos testes 1 [ $t(4)=-1,48$ ,  $p=0,21$ ], 2 [ $t(4)=-2,32$ ,  $p=0,8$ ] e 3 [ $t(4)=-0,34$ ,  $p=0,74$ ].



**Figura 21.** Índice da tarefa de discriminação para cada nível de similaridade. Teste t de uma amostra ( $N=5$ ).  $\pm$  Erro padrão da média.

A ANOVA de um fator não identificou diferença significativa no tempo de exploração das amostras e cada teste [ $F(3,12)=0,35$ ]. Comparando-se os tempos de exploração entre cada sessão foi observada uma diferença significativa [ $F(4,16)=3,08$ , Bonferroni,  $p<0,05$ ], veja figura 22.



**Figura 22.** Tempo total de exploração dos objetos para cada sessão da tarefa de discriminação. ANOVA de medidas repetidas (N=5).  $\pm$  Erro padrão da média.

### **5.3 Experimento 3- Padronização da tarefa de reconhecimento e discriminação de objetos com múltiplas sessões com 5 sessões e 2 voltas**

A partir dos resultados encontrados no experimento 2, onde não havia recompensa do lado dos objetos, pode-se verificar uma redução considerável na exploração total dos animais, bem como uma desmotivação ao longo das sessões, o que por sua vez resultou em tempos de exploração baixos. Portanto para o experimento 3 foram propostas duas voltas para cada momento de amostra e teste, além da implementação de recompensas líquidas ao lado dos objetos, afim de aumentar a motivação dos animais com base em uma recompensa que não interferisse em possíveis registros eletrofisiológicos. Além disso a porta central foi mantida fechada para evitar o retorno dos animais para a mesma, em virtude de suas características naturalmente recompensadoras, por se tratar de um lugar similar a uma “Home base” (Dorfman, Nielbo & Eilam, 2016).

#### **5.3.1 Animais**

Participaram desse experimento 5 ratos machos Wistar adultos com aproximadamente 4 meses de idade nas condições experimentais anteriormente descritas, mantidos com água e comida *ad libitum*. Os animais receberam recompensa disposta ao lado de todos os objetos nos treinos e teste. A recompensa tratava-se de uma gota de água contendo açúcar em uma concentração de 1g/ml.

#### **5.3.2 Modelagem**

Durante cada volta a porta central era mantida fechada, portanto, somente após a finalização de 2 voltas o animal retornava a esta caixa, onde recebia recompensa de forma intermitente. A recompensa (gotas de água com sacarose) no centro da caixa era oferecida de forma manual com o auxílio de uma seringa. Os animais foram considerados modelados quando realizarem três sessões seguidas de duas voltas corretas. Após essas etapas os ratos estavam aptos para a realização da tarefa de reconhecimento de objeto e discriminação de objetos em diferentes níveis de similaridade.

#### **5.3.3 Delineamento experimental**

Para cada amostra e teste os animais realizavam duas voltas, permitindo assim que o animal tivesse dois encontros com os objetos em cada amostra e teste dentro das sessões,

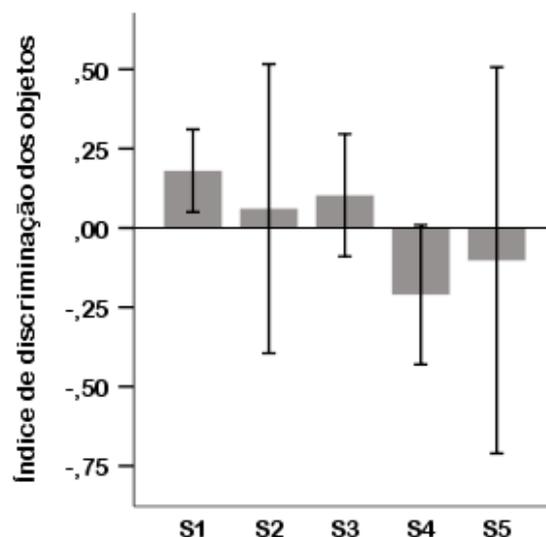
além disso foi adicionada uma volta vazia no início de cada sessão. Foram realizadas 5 sessões para cada tarefa (NOR e Discriminação), a realização das sessões era dependente da motivação do animal, totalizando 5 tentativas por animal em cada tarefa, com 48h de intervalo entre as duas tarefas, no intuito de reduzir a força do traço da memória para o protocolo, bem como evitar a fadiga.

### 5.3.4 Análise

Foi realizada uma análise alternativa para a tarefa NOR, na qual foram comparados os tempos de exploração entre os objetos novos e familiares de todas as sessões, considerando-se o critério de três segundos de exploração durante a amostra. Um dos animais não conseguiu realizar as sessões do dia 2 para o teste de discriminação, portanto este foi excluído das análises para o dia 2. Deve-se considerar que para algumas sessões e voltas o número de sujeitos foi reduzido devido a ausência de exploração seja na volta ou sessão analisada.

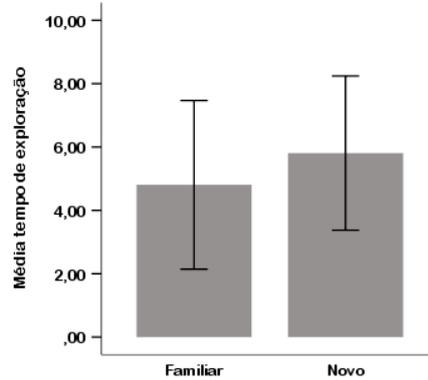
### 5.3.5 Resultados

Considerando-se os dados para o teste NOR, não foram encontrados índices significativos para o total [ $t(4)=1,73$ ,  $p=0,159$ ;  $dz=0,77$ ], dados ilustrados na figura 23. Nenhuma sessão apresentou índice significativo, porém foi observada uma tendência para a sessão 1 [ $t(3)=2,76$ ,  $p=0,07$ ;  $dz=1,38$ ]. Quanto as voltas, nenhum valor acima do acaso foi observado ( $p>0,05$ ), veja suplemento 10, 11 12.



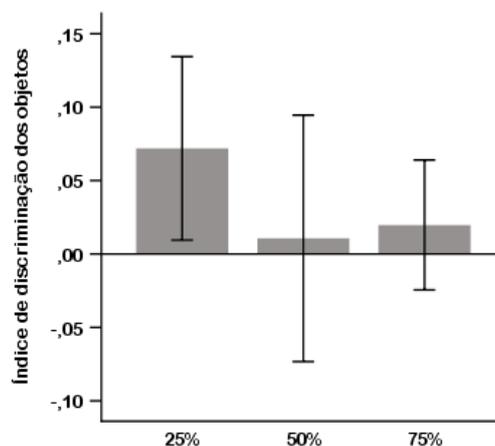
**Figura 23.** Índice discriminação tarefa NOR por sessão. Teste t de uma amostra (S1, N=5; S2 a S5, N=5). ± Erro padrão da média.

Uma análise alterativa foi realizada afim de se verificar se existia diferença na média do tempo de exploração entre os objetos novos e familiares em todas as sessões, porém não foram encontradas diferenças estatísticas significativas [ $t(4)=1,030$ ,  $p=0,35$ ], veja figura 24.



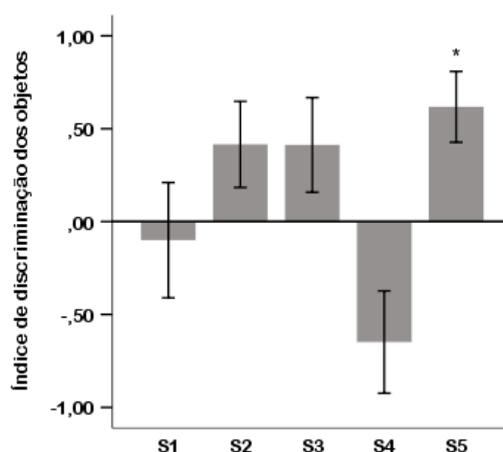
**Figura 24.** Tempo médio de exploração dos objetos novos e familiares da tarefa NOR. Teste t de duas amostras (N=5).  $\pm$  Erro padrão da média.

Para o teste de discriminação não foram observados índices significativos para nenhum dos níveis de similaridade: 25% [ $t(4)=1,15$ ,  $p=0,31$ ;  $dz=0,51$ ]; 50% [ $t(4)=0,12$ ,  $p=0,90$ ;  $dz=0,05$ ]; 75% [ $t(4)=0,44$ ,  $p=0,67$ ;  $dz=0,20$ ], conforme figura 25. Quando analisados por sessão foi verificado que para o nível 25% a sessão 5 apresentou índice negativo significativo [ $t(4)=-3,36$ ,  $p=0,02$ ;  $dz=1,51$ ], veja suplemento 13. Para a volta 1 e 2 não foram obtidos valores acima do acaso ( $p>0,05$ ) (suplemento 14). Para 50% de similaridade nenhuma sessão ou volta apresentou índices significativos ( $p>0,05$ ), ilustrado em suplementos 15 e 16. Os mesmos resultados foram encontrados para o nível de 75% de similaridade ( $p>0,05$ ), veja suplementos 17 e 18.



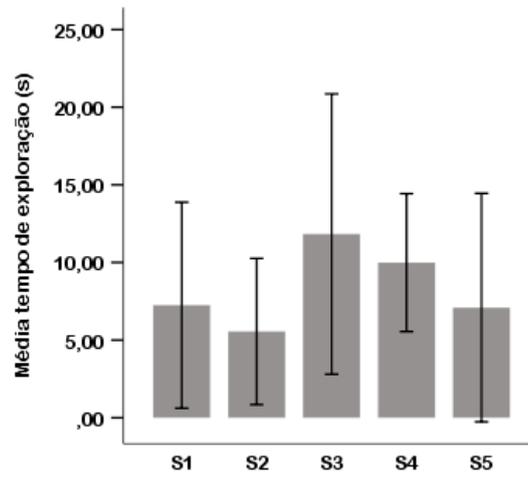
**Figura 25.** Índices da tarefa de discriminação por nível de similaridade. Teste t de uma amostra (N=5).  $\pm$  Erro padrão da média.

Quando analisado por testes também não foram observados índices significativos, seja para o teste 1 [t(4)=-1,5, p=0,20; dz=0,68], 2 [t(4)=0,55, p=0,60; dz=0,25] ou 3 [t(4)=2,17, p=0,09; dz=0,97]. Ao se verificar os testes por sessão, nenhum valor significativo foi encontrado (p>0,05). Analisando-se os testes por volta, encontrou-se que a volta 1 apresentou valor significativo dentro da sessão 5 do teste 2 [t(3)=3,23, p=0,048, dz=1,62]. As demais voltas não apresentaram valores diferentes do acaso (p>0,05), veja figura 26.



**Figura 26.** Voltas 1 para cada sessão do teste 2 \*Comparações significativas considerando-se p<0,05. Teste t de uma amostra (N=5).  $\pm$  Erro padrão da média.

A partir da ANOVA verificou-se não existir diferenças significativas no tempo de exploração entre cada sessão na tarefa de discriminação [F(4,16)=0,68, p=0,61], veja figura 27, porém foi encontrada uma diferença significativa nos tempos de exploração entre a amostra e os testes [F(3,12)=6,16, p=0,009]. O teste post hoc bonferroni encontrou uma tendência para diferença entre a amostra e o último teste, sendo o tempo de exploração maior durante a fase de amostra (p=0,08). Analisando-se o tempo de exploração por volta verificou-se uma tendência a diferença entre as voltas 1 e 2 [t(4)=2,45, p=0,07].



**Figura 27.** Tempo total de exploração dos objetos por sessão na tarefa de discriminação. ANOVA de medidas repetidas (N=5).  $\pm$  Erro padrão da média.

## 6. DISCUSSÃO

Considerando-se a tendência natural dos roedores pela exploração de novidade, diversos paradigmas foram desenvolvidos afim de se avaliar a memória em animais. Diversos estudos tem demonstrando que os roedores apresentam uma preferência significativa por objetos novos quando comparado com objetos familiares (Ennaucer & Delacour, 1988; Cohen & Stackman, 2015; Blaser & Heyser 2015). Baseado nesse tipo de comportamento o presente trabalho procurou padronizar uma tarefa que envolvia o reconhecimento simples de objetos e a discriminação de objetos similares em um protocolo com múltiplas sessões, baseado no modelo proposto por Manns e Eichenbaum (2009).

Nos protocolos aqui propostos observou-se uma diferença considerável no desempenho dos animais para reconhecimento e discriminação de objetos. No primeiro modelo, o animal realizava três voltas em cada momento de amostra e teste, além disso este obtinha recompensa no primeiro encontro com cada objeto. Neste foi percebido que os animais conseguiam realizar o reconhecimento dos objetos, e também a discriminação no nível mais baixo de similaridade, e no primeiro teste realizado. No segundo modelo o animal realizava apenas uma volta em cada momento de amostra e teste, e não recebia recompensa no encontro com os objetos, apenas no centro do campo. Para esse modelo os animais não apresentaram memória para a tarefa de reconhecimento ou discriminação. No terceiro experimento o rato realizava duas voltas em cada momento dentro da sessão, uma recompensa em forma de gota foi colocada ao lado de cada objeto, a qual o animal encontrava geralmente na primeira volta. A recompensa no centro do campo foi intermitente. Apesar das modificações feitas não foram encontradas diferenças significativas para reconhecimento ou discriminação.

No primeiro experimento, em que ocorreu um maior número de encontros (voltas) com os objetos e recompensa, pode-se verificar que os animais obtiveram o padrão esperado para a tarefa de reconhecimento de objetos, os quais apresentaram uma tendência a explorar mais o objeto novo em relação ao objeto familiar (Ennaucer & Delacour, 1988). Além disso, é evidente que os animais continuaram a explorar ao longo das 10 sessões. Portanto, o protocolo pode ser considerado adequado para a avaliação da memória de reconhecimento com múltiplas sessões.

Deve-se enfatizar que neste protocolo existem algumas diferenças do que foi proposto por Manns & Echenbauer (2009). Primeiramente, existe uma recompensa ao lado dos objetos, o conjunto de objetos permanece no mesmo lugar e com um número fixo de objetos, sendo trocado apenas 1 objeto no momento do teste, isto nos permitiu calcular o índice de exploração para este objeto novo específico. Outro fator importante 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). Destaca-se que esta tarefa permite comparação com as tarefas de reconhecimento espontâneo na literatura, que normalmente têm uma fase de amostra antes de cada fase de teste, o que geralmente não acontece em outras tarefas de NOR com múltiplas sessões (Ameen-Ali *et al.*, 2012).

Quanto a tarefa de discriminação no experimento 1 verificou-se que para o nível de similaridade 25% os animais discriminaram o objeto novo no primeiro dia de teste. Porém, para os demais níveis de similaridade estes resultados não foram encontrados. Tais resultados podem ser justificados por algumas razões. A primeira delas é que o desempenho dos animais parecia diminuir consideravelmente na última sessão de cada dia, isso pode ser verificado 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 *et al.*, (2012).

Outro fator que pode explicar tal comprometimento é que o uso de várias tentativas leva a altos níveis de interferência proativa entre as características semelhantes nos vários objetos de teste (Aggleton *et al.*, 2010). Isso também poderia explicar os resultados que foram encontrados no teste 1, 2 e 3 de discriminação, uma vez que os resultados encontrados apontam que os animais reconheceram o objeto novo apenas no primeiro teste, sendo, portanto, o teste dois e três afetados por essa interferência. O teste um não sofreria tamanha interferência uma vez que esse é o primeiro momento em que o animal se encontra com um objeto novo (Hunsaker & Kesner, 2008).

Portanto, faz-se necessário pensar meios para reduzir essa interferência, possivelmente modificando-se o intervalo entre os testes, uma vez que o intervalo curto (3 minutos) pode ter interferido na exploração dos objetos, fazendo com que os animais utilizassem informações do teste anterior para comparar com os objetos do teste presente, resultando em padrões confusos de exploração, assim a exploração no teste anterior

também poderia influenciar no teste seguinte, fazendo com que o animal trate objetos que deveriam ser considerados familiares como novos (falso reconhecimento), e objetos novos como familiares (habituação prejudicada) (Burke & Barnes, 2015). Tais considerações poderiam explicar os índices que apresentaram-se significativamente invertidos (sessão 10 em 25%, sessão 8 em 50% e sessão 5 em 75%), uma vez que estes poderiam estar expressando não apenas a exploração e memória do teste presente, mas a interferência e exploração do conjunto de testes realizados (Genzel et al., 2019).

Além disso, o componente de exploração natural dos animais também pode exercer influência sobre a tarefa uma vez que discriminações mais precisas são estabelecidas nos primeiros momentos da exploração (Dix & Aggleton, 1999). O estudo realizado por Barbosa et al., (2012) encontrou esse padrão de exploração direcionado para a memória espacial, no qual foi verificado que os animais do grupo controle apresentaram um padrão de discriminação espacial da memória episódica apenas no primeiro minuto da sessão de teste, o que não ocorria nos minutos seguintes do teste. Parece de fato que os animais distinguem os objetos apenas no primeiro e no segundo minuto do teste quando testados em uma tarefa de localização de objetos e tarefas de contexto-objeto (Mumby *et al.*, 2002). O bom desempenho dos animais apenas para as primeiras voltas poderiam ser interpretados a partir dessa perspectiva, uma vez que as voltas dois e três poderiam expressar o padrão de exploração menos discriminativo. Tais aspectos também poderiam justificar os resultados que foram encontrados no experimento 3.

Os níveis de exploração significativamente diferentes entre as voltas representam que ao longo das voltas realizadas no mesmo teste o animal acaba perdendo o interesse na exploração dos objetos, uma vez que esses objetos tornam-se cada vez mais familiares, esses resultados são semelhantes aos encontrados por Manns e Eichenbaum (2009). Apesar do número considerável de sessões, o nível de exploração foi mantido, provavelmente pelo valor motivador da recompensa utilizada.

Para o experimento dois os animais não discriminaram o objeto novo. Alguns fatores podem ser reavaliados e devem ser destacados. O primeiro deles é que possivelmente a ausência de recompensa do lado dos objetos reduziu consideravelmente o tempo de exploração dos objetos, como também reduziu significativamente o tempo de exploração ao longo das sessões, sendo necessário excluir todas as análises do dia dois do teste de discriminação. Considerando-se que a tarefa NOR é a mais simples e que não foram encontrados resultados significativos para ela, deve-se refletir que a redução no

tempo de exploração dos objetos pode ter prejudicado a retenção da informação, uma vez que o intervalo de exposição da amostra é um fator crítico que afeta o desempenho (Hatakeyama, Sugita, Yamada & Ichitani, 2018). Um critério de exploração mínima durante a fase de amostra deve ser estabelecido afim de garantir que de fato um traço de memória foi estabelecido para os objetos, portanto apenas uma volta não seja suficiente para alcançar um bom critério. A redução da exploração pode resultar diretamente em uma falha no índice propiciando que o animal trate o objeto familiar como novo, não reduzindo o tempo de exploração do objeto familiar na sessão de teste em consequência de uma baixa exploração no momento da aquisição (Cohen & Stackman, 2015; Burke & Barnes, 2015).

O estudo realizado por Trimper et al., (2017) executou o mesmo protocolo do experimento dois, estabelecendo um critério de 1,5 s de exploração mínimo para cada objeto, porém as suas análises foram conduzidas levando-se em consideração apenas a comparação do tempo de exploração. No estudo aqui realizado, poucos animais atingiriam esse critério o que inviabilizou tal análise com recorte de tempos de 1,5s por objeto. Existem duas diferenças entre o estudo de Trimper et al., (2017) e o experimento dois, a primeira delas é que aqui havia uma maior quantidade de objetos, o que acaba por distribuir mais o tempo de exploração, exigindo maior motivação. A segunda, trata-se da linhagem utilizada, uma vez que eles utilizaram Long-Evans, linhagem com um *drive* exploratório consideravelmente maior que Wistars utilizados nesse estudo (Lorenzini, Bucherelli, Giachetti & Tassoni, 1987).

Para o experimento 3 não foram verificados índices significativos no total. Porém, ao se avaliar os índices por sessão pode-se verificar um perfil similar ao encontrado no experimento um, uma vez que uma tendência foi observada para a sessão um e uma piora foi encontrada na última sessão, também similar ao encontrado por Ameen-Ali *et al.*, (2012). Para os testes de discriminação, nenhum índice foi significativo, seja para os níveis de similaridade ou para os testes separadamente. Apenas em uma sessão do teste 2 a volta 1 apresentou índice significativo. Além dos aspectos já discutidos no experimento um e dois, existem algumas considerações que aqui devem ser destacadas. A primeira delas trata-se da redução da exploração ao longo do experimento, destacada pela diferença no tempo de exploração entre a fase de amostra e o último teste. Além disso, a tendência de diferença entre as voltas mais uma vez aponta para a desmotivação encontrada ao longo dos encontros com o objeto (Manns & Eichenbaum, 2009). Apesar de uma

recompensa ter sido utilizada, os animais não estavam sob restrição, o que pode ter reduzido o *drive* exploratório dos animais, o que por sua vez pode ter prejudicado a fase de retenção (Cohen & Stackman, 2015; Aggleton et al., 2010). Os fatores de interferência e intervalos também devem ser levados em consideração nesse experimento (Aggleton et al., 2010; Burke & Barnes, 2015; Hunsaker & Kesner, 2008).

Algumas considerações gerais devem ser destacadas afim de se compreender os resultados encontrados nos três experimentos. Primeiramente, a linhagem de animais aqui utilizada é distinta das linhagem utilizadas em experimentos com múltiplas sessões ou discriminação, portanto 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). Além disso, talvez os níveis de 50% e 75% sejam altamente difíceis de discriminar pela linhagem aqui utilizada, uma vez que esta apresenta uma redução na acuidade visual (Prusky West & Douglas, 2005).

No que diz respeito à tarefa de discriminação em diferentes níveis de similaridade, apesar dos objetos aqui construídos serem baseados no proposto por Johnson et al., (2017) e os resultados apontados por este apresentarem menor quantidade de erros de discriminação para ratos jovens, deve-se pensar que a tarefa trata-se de um labirinto em T, na qual o animal precisava escolher um objeto alvo em detrimento da distração, tais diferenças de aparato e protocolo pode sugerir que a tarefa aqui proposta seja mais difícil, uma vez que existe um maior número de objetos que não são visualizados simultaneamente, o que poderia demandar mais de processos mnemônicos. Aqui utilizamos um trajeto circular em vez de um campo aberto ou labirinto em T, portanto os animais não podiam visualizar todos os objetos de uma só vez, e estavam sujeitos a uma ordem de visualização a medida que se realizava a volta. Apesar da ausência de pistas espaciais, a visualização de um conjunto de objetos pode favorecer o reconhecimento de um novo objeto em detrimento dos objetos que compunham o conjunto, além disso a estratégia egocêntrica também pode ser utilizada para identificação de um objeto em detrimento da posição do animal (Sugar & Moser, 2019).

Comparando-se os três experimentos pode-se verificar que o protocolo estabelecido no primeiro experimento torna-se o mais promissor, uma vez que mesmo com as limitações apresentadas esse mostrou-se capaz de avaliar o reconhecimento de objetos em múltiplas sessões. O reconhecimento de objetos é uma tarefa amplamente

utilizada que requer um número considerável de animais, ser capaz de oferecer um paradigma aplicável que reduza o número de animais, com menor nível de estresse consequente de um menor manuseio, pode facilitar a obtenção de uma quantidade de dados com menor ruído de estresse (Hurst e West, 2010). Além disso, a tarefa de reconhecimento de objetos é uma tarefa de memória bastante utilizada para a testagem de substâncias e novos fármacos com efeitos amnésicos ou promnésicos e, com a implementação do aparato de sessões contínuas, o uso de animais nesses estudos pode ser consideravelmente reduzido (Ameen-Ali, *et al.*, 2012).

Apesar das limitações apresentadas pelos experimentos aqui realizados, pode-se estabelecer alguns pontos, pelos quais outras tarefas de múltiplas sessões podem se orientar com base no objetivo proposto. Cabe destacar que todas as alterações feitas ao longo das tarefas tinham como fim viabilizar estudos por meio de registro eletrofisiológico. Porém, mais estudos são necessários para avaliar o efeito da redução do número de sessões ou testes por dia. Verificar a realização da tarefa por outras linhagens de rato, como Long-Evans, além de avaliar se o aumento do intervalo entre as sessões pode favorecer o reconhecimento e discriminação de objetos.

## **7. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Nosso estudo revelou que o primeiro experimento é uma adaptação promissora do protocolo proposto por Manns e Eichenbaum (2009) para a realização de tarefas de reconhecimento e discriminação de objetos em níveis baixos de similaridade, portanto viabiliza um estudo de separação de padrões em níveis elevados de diferenciação. Favorecendo também para um menor número de animais a serem utilizados, com menor manipulação e conseqüentemente redução de eventos estressores. Apesar do nosso protocolo não conseguir gerar índices de discriminação para níveis de similaridade mais altos é sugerido que novos estudos utilizem outras linhagens de ratos e apliquem diferentes intervalos entre as sessões, de forma que um melhor padrão de discriminação seja encontrado.

Portanto, entende-se que nosso protocolo comportamental dá passos iniciais, afim de se avaliar a memória de reconhecimento e a separação de padrões para objetos por meio de múltiplas sessões. Permite-se a partir dos protocolos aqui apresentados estabelecer possibilidades e caminhos para que futuros protocolos se orientem sob as condições metodológicas a serem adotadas e venham a estudar a neurobiologia da aquisição, consolidação e recuperação da memória de reconhecimento e discriminação de objetos por meio do registro eletrofisiológico.

## 8. REFERÊNCIAS

- 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
- Ahn, J. R., & Lee, I. (2015). Neural Correlates of Object-Associated Choice Behavior in the Perirhinal Cortex of Rats. *Journal of Neuroscience*, *35*(4), 1692–1705. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3160-14.2015>
- Ahn, J. R., & Lee, I. (2017). Neural Correlates of Both Perception and Memory for Objects in the Rodent Perirhinal Cortex. *Cerebral Cortex*, *27*(7), 3856–3868. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhx093>
- 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>
- 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>
- Balls, M., Zeller, A. M., & Halder, M. (2000). "Progress in the reduction, refinement and replacement of animal experimentation". Proceedings of the 3rd World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, 31A, 1ed, Netherlands, Elsevier, 886p.
- Barbosa, F. F., de Oliveira Pontes, I. M., 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. doi:10.1016/j.bbr.2012.04.022
- Bartko, S. J., Winters, B. D., Cowell, R. A., Saksida, L. M., & Bussey, T. J. (2007). Perirhinal cortex resolves feature ambiguity in configural object recognition and perceptual oddity tasks. *Learning & Memory*, *14*(12), 821–832. <https://doi.org/10.1101/lm.749207>
- Bevins, R. A., & Besheer, J. (2006). Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study "recognition memory." *Nature Protocols*, *1*(3), 1306–1311. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.205>
- 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>
- 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>

- Chang, E. H., & Huerta, P. T. (2012). Neurophysiological correlates of object recognition in the dorsal subiculum. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 6(July), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2012.00046>
- 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>
- 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>
- 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>
- Dees, R. L., & Kesner, R. P. (2013). The role of the dorsal dentate gyrus in object and object-context recognition. *Neurobiology of Learning and Memory*, 106, 112–117. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2013.07.013>
- Deshmukh S. S., Johnson J. L., & Knierim J. J. (2012). Perirhinal cortex represents nonspatial, but not spatial, information in rats foraging in the presence of objects: Comparison with lateral entorhinal cortex. *Hippocampus*, 22(1), 2045–2058.
- Dix S.L. & Aggleton J.P. (1999). Extending the spontaneous preference test of recognition: evidence of object-location and object-context recognition. *Behavioural Brain Research*. 99 191–200.
- Dorfman, A., Nielbo, K. L., & Eilam, D. (2016). Traveling Companions Add Complexity and Hinder Performance in the Spatial Behavior of Rats. *PLOS ONE*, 11(1), e0146137. doi:10.1371/journal.pone.0146137
- Eichenbaum, H., Sauvage, M., Fortin, N., Komorowski, R., & Lipton, P. (2012). Towards a functional organization of episodic memory in the medial temporal lobe. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 36(7), 1597–1608. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2011.07.006>
- 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, Aggleton JP. (1994). Spontaneous recognition of object configurations in rats: effects of fornix lesions. *Exp Brain Res*. 100(1), 85-92.
- Ennaceur, A., & Meliani, K. (1988). A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: behavioral data. *Behav Brain Res*, 31, 47–59.
- 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>
- Fyhn, M., Molden, S., Witter, M. P., Moser E. L. & Moser M. B. (2004). Spatial

- Representation in the Entorhinal Cortex. *Science*, 305(5688), 1258–1264.  
<https://doi.org/10.1126/science.1099901>
- 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. doi:10.1371/journal.pbio.3000322
- 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>
- Hales, J. B., Broadbent, N. J., Velu, P. D., Squire, L. R., & Clark, R. E. (2015). Hippocampus, perirhinal cortex, and complex visual discriminations in rats and humans. *Learning & Memory*, 22(2), 83–91.  
<https://doi.org/10.1101/lm.035840.114>
- Hatakeyama, T., Sugita, M., Yamada, K., & Ichitani, Y. (2018). Temporal order memory of the rat in spontaneous object recognition: effects of number of items, exposure interval, and retention time. *Learning & Memory*, 25(11), 574–579.  
 doi:10.1101/lm.048215.118
- 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.
- Hunsaker, M. R., Mooy, G. G., Swift, J. S., & Kesner, R. P. (2007). Dissociations of the medial and lateral perforant path projections into dorsal DG, CA3, and CA1 for spatial and nonspatial (visual object) information processing. *Behavioral Neuroscience*, 121(4), 742–750. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.121.4.742>
- 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>
- Izquierdo, I. (2018). *Memória*. Porto Alegre, Brasil: Artmed.
- 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., Marino-Neto, J. (2012). ETHOWATCHER: validation of a tool for behavioral and video-tracking analysis in laboratory animals. *Computers in Biology and Medicine* 42(2), 257-264. <https://doi.org/10.1016/j.combiomed.2011.12.002>
- Kesner, R. P., Kirk, R. A., Yu, Z., Polansky, C., & Musso, N. D. (2015). Dentate gyrus

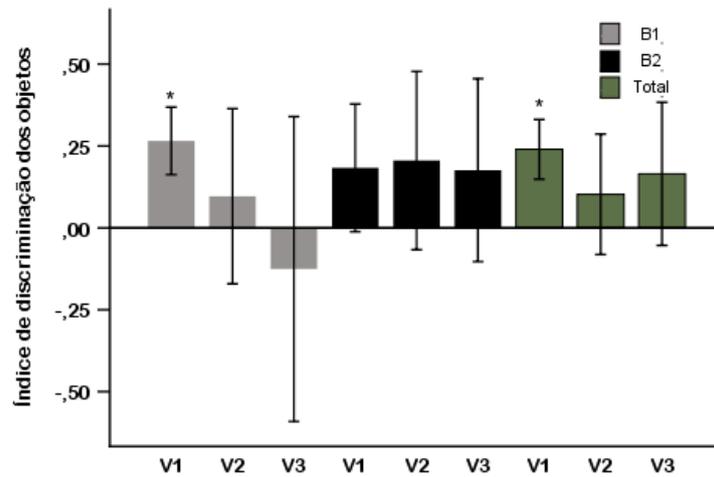
- supports slope recognition memory, shades of grey-context pattern separation and recognition memory, and CA3 supports pattern completion for object memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, 129(August), 29–37. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2015.08.010>
- Kim, W. R., Lee, J. W., Sun, W., Lee, S.-H., Choi, J.-S., & Jung, M. W. (2015). Effect of dentate gyrus disruption on remembering what happened where. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 9(June), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2015.00170>
- 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>
- Kinnavane, L., Amin, E., Olarte-Sánchez, C. M., & Aggleton, J. P. (2016). Detecting and discriminating novel objects: The impact of perirhinal cortex disconnection on hippocampal activity patterns. *Hippocampus*, 26(11), 1393–1413. <https://doi.org/10.1002/hipo.22615>
- Knierim, J.J., Neunuebel, J.P.; Deshmukh, S.S (2013). Correlatos funcionais do córtex entorrinal lateral e medial: objetos, integração de caminhos e referenciais locais-globais. *Transações Filosóficas da Sociedade Real B: Ciências Biológicas*, 369 (1635), 20130369–20130369. doi: 10.1098 / rstb.2013.0369
- Knutson, A. R., Hopkins, R. O., & Squire, L. R. (2013). A pencil rescues impaired performance on a visual discrimination task in patients with medial temporal lobe lesions. *Learning & Memory*, 20(11), 607–10. <https://doi.org/10.1101/lm.032490.113>
- 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>
- Lee, H.-W., Lee, S.-M., & Lee, I. (2018). Neural firing patterns are more schematic and less sensitive to changes in background visual scenes in the subiculum than in the hippocampus. *The Journal of Neuroscience*, 0156-18. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0156-18.2018>
- Leutgeb, J. K., Leutgeb, S., Moser, M.-B., & Moser, E. I. (2007). Pattern Separation in the Dentate Gyrus and CA3 of the Hippocampus. *Science*, 315(5814), 961–966. <https://doi.org/10.1126/science.1135801>
- 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>
- Matsumoto, N., Kitanishi, T., & Mizuseki, K. (2018). The subiculum: Unique hippocampal hub and more. *Neuroscience Research*. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2018.08.002>
- 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>

- 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>
- Mishkin M., Delacour J. (1975). An analysis of short-term visual memory in the monkey. *J Exp Psychol: Anim Behav Process*, 1(4), 326–334
- Mumby D. G., Gaskin S., Glenn M.J., Schramek T.E. & Lehmann H. (2002). Hippocampal damage and exploratory preferences in rats: memory for objects, places, and contexts. *Learning and Memory*. 9 49–57.
- Mumby, D. G., Pinel, J. P. J., & Wood, E. R. (1990). Nonrecurring-items delayed nonmatching-to-sample in rats: A new paradigm for testing nonspatial working memory. *Psychobiology*, 18(3), 321–326. <https://doi.org/10.3758/BF03327250>
- Norman, G., & Eacott, M. . (2004). Impaired object recognition with increasing levels of feature ambiguity in rats with perirhinal cortex lesions. *Behavioural Brain Research*, 148(1–2), 79–91. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(03\)00176-1](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(03)00176-1)
- 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)
- Olarte-Sánchez, C. M., Amin, E., Warburton, E. C., & Aggleton, J. P. (2015). Perirhinal cortex lesions impair tests of object recognition memory but spare novelty detection. *European Journal of Neuroscience*, 42(12), 3117–3127. <https://doi.org/10.1111/ejn.13106>
- Patel, TP, Gullotti, DM, Hernandez, P., O'Brien, WT, Capehart, BP, Morrison, B.,... Meaney, DF (2014). Uma caixa de ferramentas de código aberto para fenotipagem automatizada de ratos em tarefas comportamentais. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* , 8(1), 349. <http://doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00349>
- 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>
- Poli, D., Wheeler, B. C., DeMarse, T. B., & Brewer, G. J. (2018). Pattern separation and completion of distinct axonal inputs transmitted via micro-tunnels between co-cultured hippocampal dentate, CA3, CA1 and entorhinal cortex networks. *Journal of Neural Engineering*, 15(4), 046009. <https://doi.org/10.1088/1741-2552/aabc20>
- 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>
- Russel, W. M. S., & Burch, R. L. (1959). *The principles of human experimentation techniques*. London: Methuen.
- Schultz, C., & Engelhardt, M. (2014). Anatomy of the Hippocampal Formation. In *The Hippocampus in Clinical Neuroscience* (Vol. 34, pp. 6–17). <https://doi.org/10.1159/000360925>
- Sekeres, MJ, Winocur, G. e Moscovitch, M. (2018). The hippocampus and related

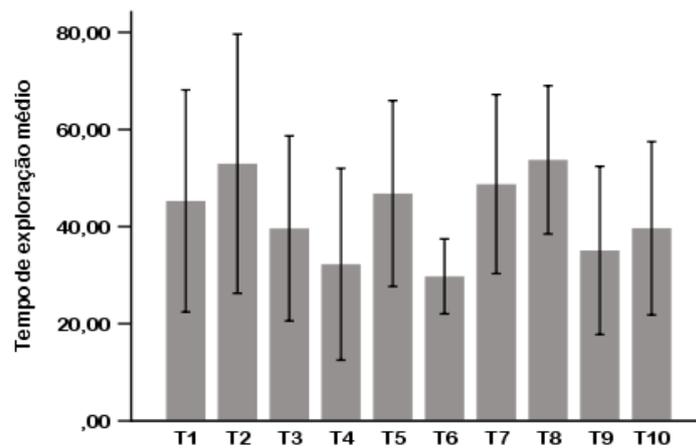
- neocortical structures in memory transformation. *Neuroscience Letters*, 680(1), 39-53. doi: 10.1016 / j.neulet.2018.05.006
- Sousa, I. B. (2015). Prejuízo na memória do tipo episódica induzido por Cetamina: diferenças funcionais na expressão de c-Fos em sub-regiões do hipocampo. *Dissertação de mestrado*, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brasil.
- 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.
- Squire, L. R., & Wixted, J. T. (2011). The Cognitive Neuroscience of Human Memory Since H.M. *Annual Review of Neuroscience*, 34(1), 259–288. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-061010-113720>
- Stark, S. M., & Stark, C. E. L. (2017). Age-related deficits in the mnemonic similarity task for objects and scenes. *Behavioural Brain Research*, 333, 109–117. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.06.049>
- Suzuki, W. A. (2009). Perception and the Medial Temporal Lobe: Evaluating the Current Evidence. *Neuron*, 61(5), 657–666. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.02.008>
- 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.
- 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>
- 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>
- Trimper, J. B., Stefanescu, R. A., & Manns, J. R. (2014). Recognition memory and theta-gamma interactions in the hippocampus. *Hippocampus*, 24(3), 341–353. <https://doi.org/10.1002/hipo.22228>
- Tulving, E. (2002). Episodic memory: From mind to brain. *Annual Review of Psychology*, 53(1), 1–25. 10.1146 / annurev.psych.53.100901.135114
- Witter, M. P., Doan, T. P., Jacobsen, B., Nilssen, E. S., & Ohara, S. (2017). Architecture of the Entorhinal Cortex A Review of Entorhinal Anatomy in Rodents with Some Comparative Notes. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 11(June), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2017.00046>

## 9. MATERIAL SUPLEMENTAR

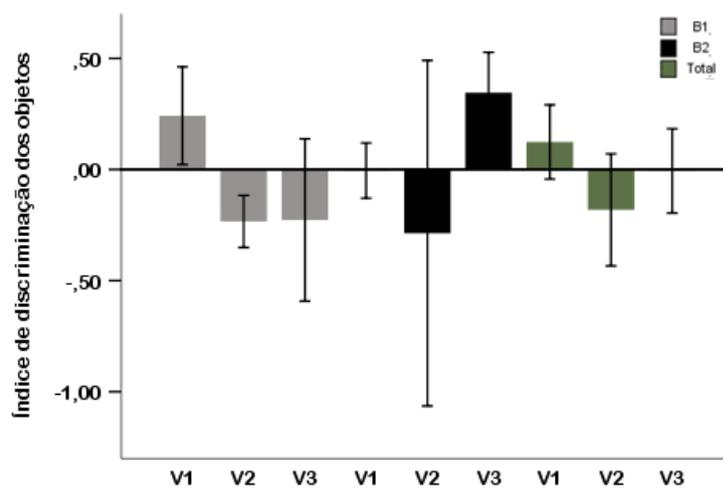
**Suplemento 1-** Índice de discriminação da tarefa NOR, por volta para cada dia



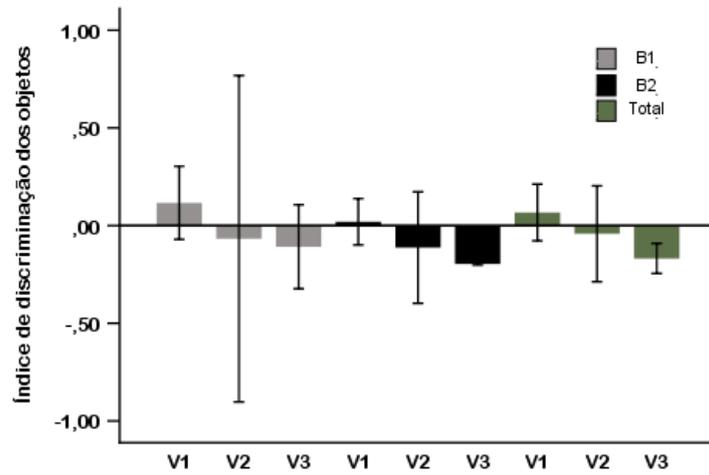
**Suplemento 2-** Tempo de exploração da tarefa NOR para cada teste



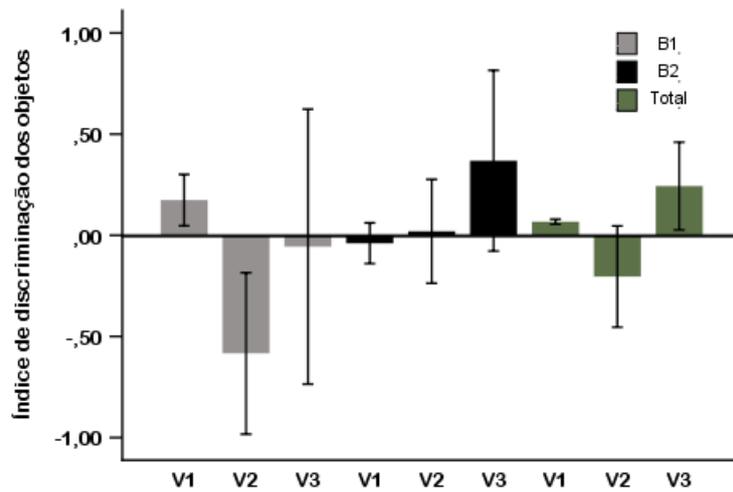
**Suplementar 3-** Índice de discriminação para o nível de 25% de similaridade, voltas por dia.



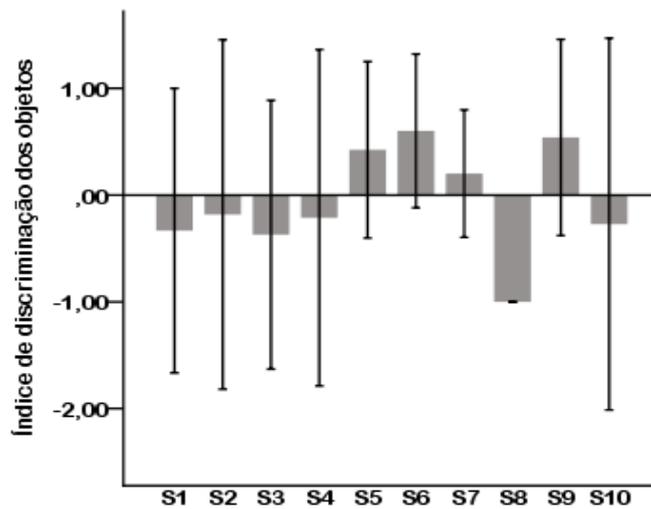
**Suplementar 4-** Índice de discriminação para o nível de 50% de similaridade, voltas por dia.



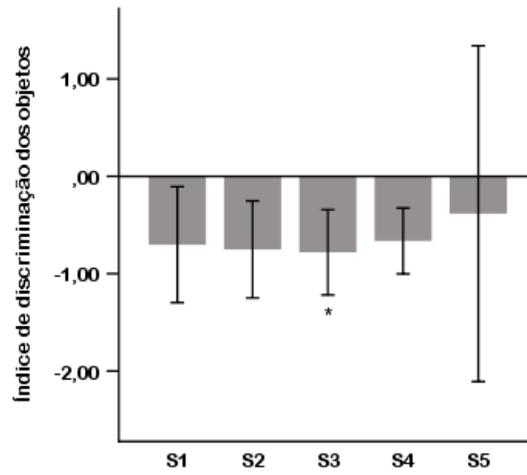
**Suplemento 5-** Índice de discriminação para o nível de 75% de similaridade, voltas por dia.



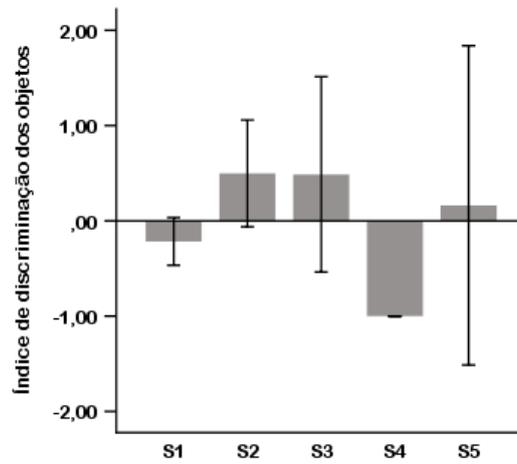
**Suplemento 6-** Índice de discriminação na tarefa NOR por sessão



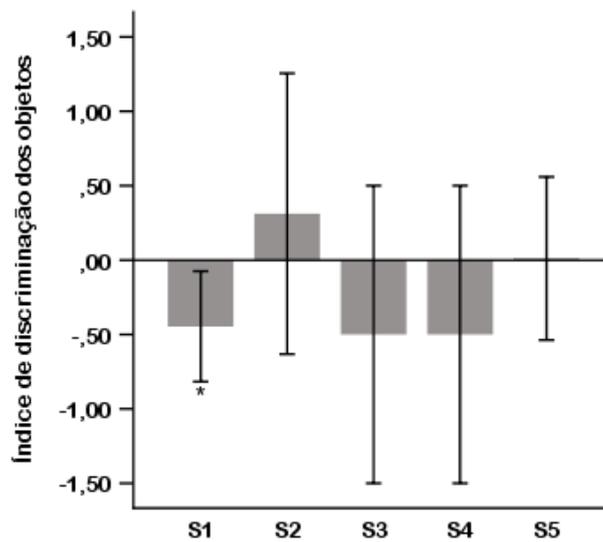
**Suplemento 7-** Índice de discriminação para o nível de 25% de similaridade, por sessão



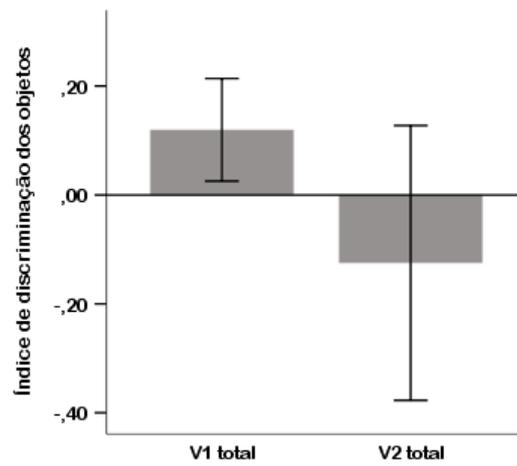
**Suplemento 8-** Índice de discriminação para o nível de 50% de similaridade, por sessão



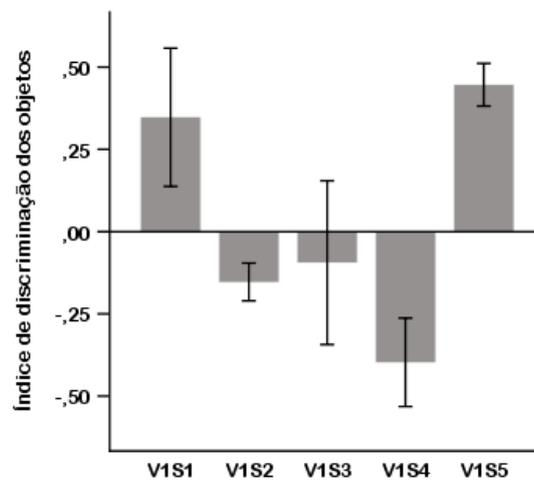
**Suplemento 9-** Índice de discriminação para o nível de 75% de similaridade, por sessão



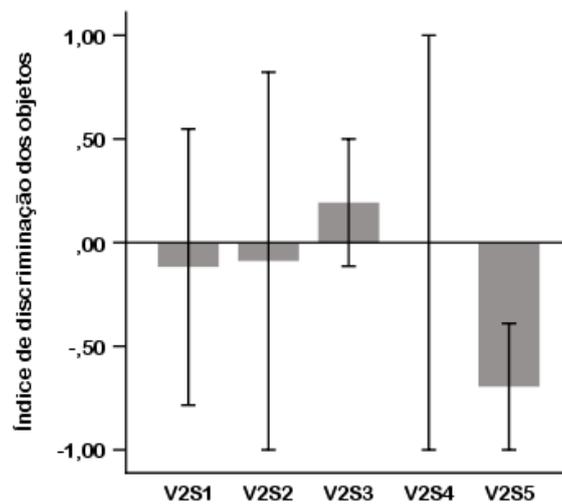
**Suplemento 10-** Índice de discriminação na tarefa NOR, por volta.



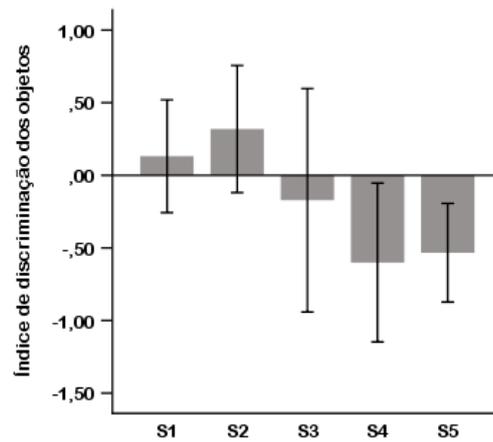
**Suplemento 11-** Índice de discriminação na tarefa NOR, volta 1 por sessão.



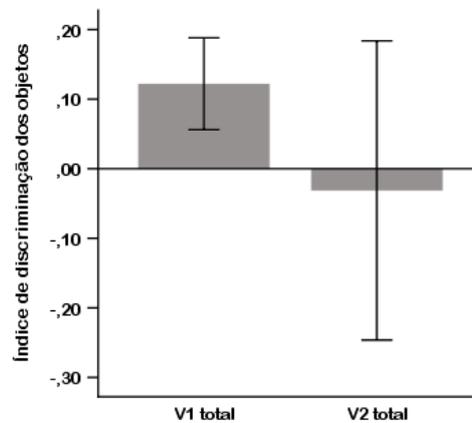
**Suplemento 12-** Índice de discriminação na tarefa NOR, volta 2 por sessão.



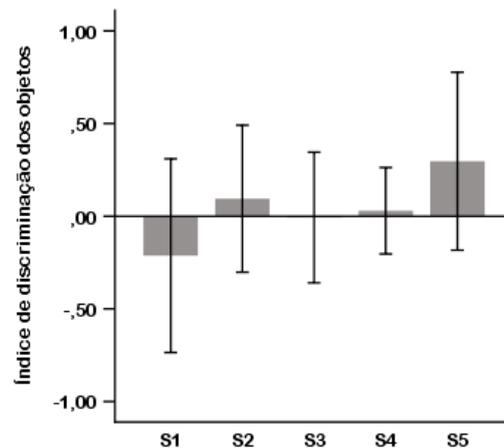
**Suplemento 13-** Índice por sessão para o nível de similaridade de 25% na tarefa de discriminação



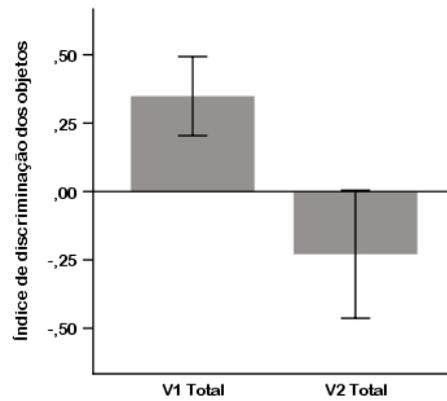
**Suplemento 14-** Índice por volta para o nível de similaridade de 25% na tarefa de discriminação.



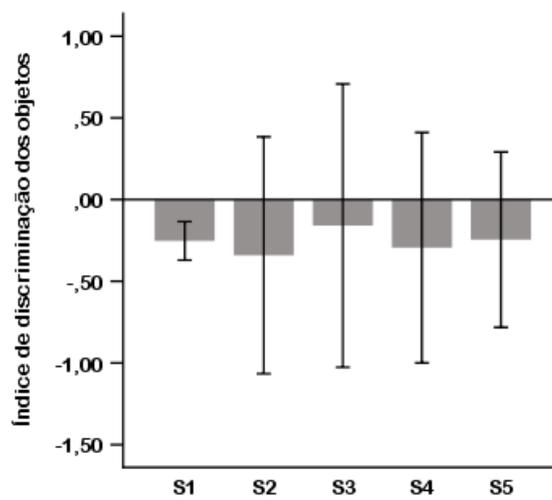
**Suplemento 15-** Índice por sessão para o nível de similaridade de 50% na tarefa de discriminação.



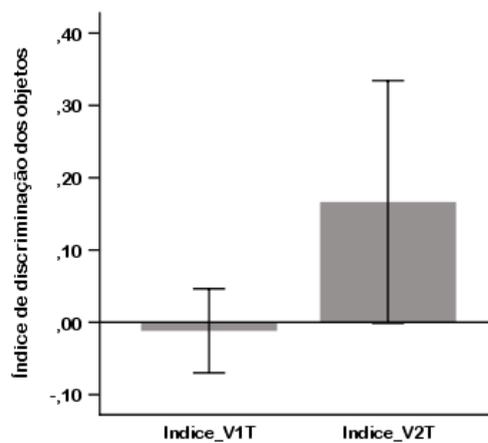
**Suplemento 16-** Índice por volta para o nível de similaridade de 50% na tarefa de discriminação.



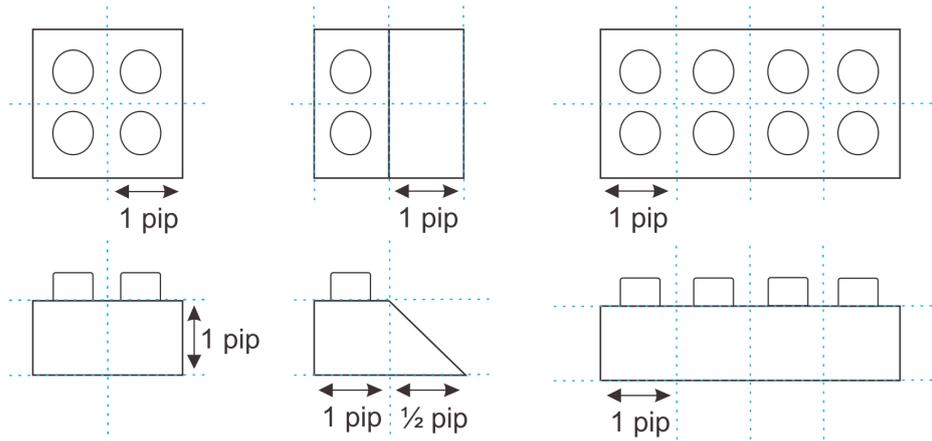
**Suplemento 17-** Índice por sessão para o nível de similaridade de 75% na tarefa de discriminação.



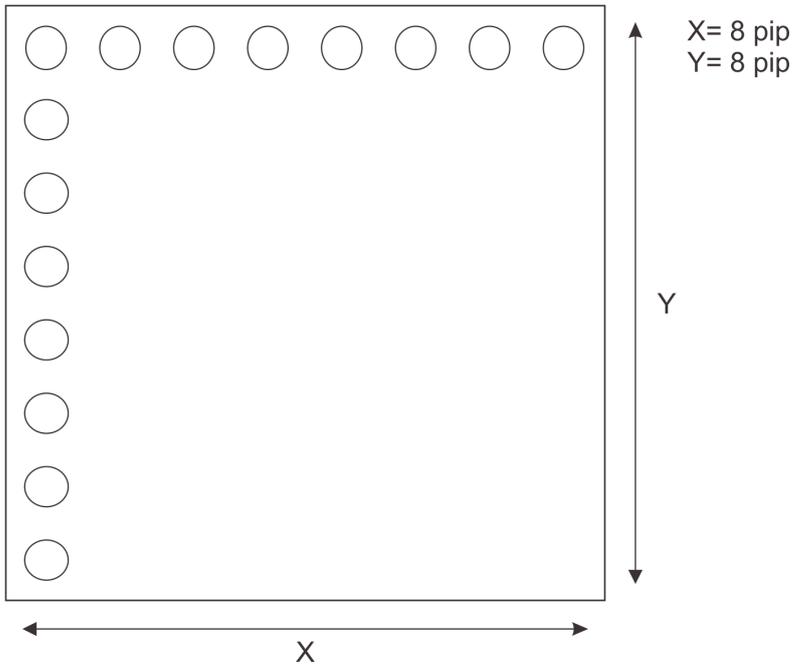
**Suplemento 18-** Índice por volta para o nível de similaridade de 75% na tarefa de discriminação.



## ANEXO A



Área de distribuição máxima para a construção dos objetos



Esquema ilustrativo da visão frontal para mensurar sobreposição



## ANEXO B



Universidade  
Federal da  
Paraíba

Comissão de Ética no  
Uso de Animais



### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Correlatos eletrofisiológicos da memória de reconhecimento [o quê?] em uma tarefa de reconhecimento de objetos e discriminação de objetos similares com múltiplas sessões", protocolada sob o CEUA nº 3512260918 (ID 000417), sob a responsabilidade de **Flávio Freitas Barbosa e equipe; ANA PAULA DE CASTRO ARAUJO** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA/UFPB) na reunião de 01/11/2018.

We certify that the proposal "Electrophysiological correlates of the "what?" Recognition memory in a task of object recognition and discrimination of similar objects with multiple sessions", utilizing 38 Heterogenics rats (38 males), protocol number CEUA 3512260918 (ID 000417), under the responsibility of **Flávio Freitas Barbosa and team; ANA PAULA DE CASTRO ARAUJO** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Paraíba (CEUA/UFPB) in the meeting of 11/01/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **09/2018** a **03/2020** Área: **Psicologia**

Origem: **Unidade de Produção Animal IPeFarM**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **2 a 3 meses**

N: **38**

Linhagem: **Rattus Norvegicus - Wistar**

Peso: **250 a 400 g**

Local do experimento: **Laboratório de Psicofarmacologia (IPeFarm); Laboratório de estudos em memória e cognição (CCHLA/UFPB)**

João Pessoa, 08 de novembro de 2018

Prof. Dra. Islania Gisela Albuquerque Gonçalves  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal da Paraíba

Prof. Dr. Ricardo Romão Guerra  
Vice-Cordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal da Paraíba