



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



**Circuitos neurais e mecanismos moleculares subjacentes à separação de padrões
de objetos em uma tarefa de múltiplas tentativas**

Ana Paula de Castro Araujo

João Pessoa
Fevereiro de 2025

Ana Paula de Castro Araujo

Circuitos neurais e mecanismos moleculares subjacentes a separação de padrões de objetos em uma tarefa de múltiplas tentativas

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Neurociência Cognitiva e Comportamento na Universidade Federal da Paraíba, em defesa do grau de Doutora 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 2025

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

A663c Araujo, Ana Paula de Castro.

Circuitos neurais e mecanismos moleculares subjacentes à separação de padrões de objetos em uma tarefa de múltiplas tentativas / Ana Paula de Castro Araujo. - João Pessoa, 2025.

121 f. : il.

Orientação: Flávio Freitas Barbosa.
Tese (Doutorado) - UFPB/CCHLA.

1. Memória. 2. Padronização da tarefa. 3. Reconhecimento de objetos. 4. Análise de rede. 5. Separação de Padrões. I. Barbosa, Flávio Freitas. II. Título.

UFPB/BC

CDU 159.953(043)

Elaborado por RUSTON SAMMEVILLE ALEXANDRE MARQUES DA SILVA -
CRB-15/0386

Documento assinado digitalmente
 **HINDIAEL AERAF BELCHIOR**
Data: 28/02/2025 10:57:45-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. Hindiael Aeraf Belchior (Membro Externo à Instituição)

Documento assinado digitalmente
 **MARIA CAROLINA GONZALEZ**
Data: 06/03/2025 15:52:16-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Maria Carolina Gonzalez (Membro Externo à Instituição)

Documento assinado digitalmente
 **GRACE SCHENATTO PEREIRA MORAES**
Data: 28/02/2025 20:32:08-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Grace Schenatto Pereira Moraes (Membro Externo à Instituição)

Agradecimentos

Tudo é para tua glória, tudo é pra o teu nome, tudo é pra Tua glória, Sejas o primeiro em tudo que eu fizer, tens proeminência em tudo que eu fizer. Somente tu és digno de exaltação e as coisas desse mundo ante a ti perdem o valor. 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. Se a realidade criada tem as impressões digitais do seu criador. Nada disso seria possível sem a certeza de que você é aquele que me capacitou a fazer todas essas coisas. A Ciência é a exegese da criação para expressar a glória de Deus. A hermenêutica da realidade que nós ajuda a ver e ouvir a glória de Deus, que todos os dias eu possa trilhar pelos caminhos desconhecidos da ciência tendo a certeza que te encontrarei em cada detalhe.

*Agradeço (in memoriam) a **Ap. Faustino Otaviano Neto** por tudo o que ele representou não apenas na minha vida, mas sobre uma geração. Definitivamente pessoas como você são capazes de mudar o nosso destino.*

*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**, por todo apoio, suporte, serviço, provisão, cuidado e compreensão, sem vocês sendo uma grande rede de apoio que literalmente me segurou e sustentou nos momentos difíceis, eu não teria chegado até aqui. Agradeço ao meu irmão **João Paulo Castro e Jessica Castro** que desde pequeno me incentivou a ser professora, 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. Amo vocês!*

***Claudio**, meu amor, obrigada por ter chegado nessa reta final e ter sido um grande braço e ombro em quem pude me apoiar e sustentar, obrigada por toda compreensão, carinho, cuidado, segurança e dedicação, mesmo em meio a uma tese, pé quebrado, tramites de pós doc... você se manteve calmo, sempre tranquilo e paciente, cuidando de mim, orando comigo e chorando comigo, sendo abrigo. Obrigada por cada surpresa, lanche e carinho que foram símbolos e demonstrações do seu amor, sua Ana te ama.*

*Agradeço imensamente a minha grande amiga e escudeira, **Bia**, você cuidou de mim de uma forma muito especial, mais que um ombro amigo, você é família, você é símbolo de amor e graça, serviço e cuidado. Obrigada por cada ato de amor na minha direção, desde de uma tela para me ajudar, até um momento para rirmos e chorar, com certeza eu lembrarei de tudo o que você fez por mim, e é bom saber que ainda tenho muito pra viver contigo! Também não poderia deixar de agradecer a minha grande amiga **Bruna**, por seu imenso cuidado, sua disposição em ajudar, estar sempre disponível, me socorrendo literalmente, amiga você tem sido um grande presente de Deus para mim.*

***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.*

*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.*

*Agradeço a célula Lírio por ser um lugar de comunhão e compartilhar, por todas as terças ou quintas me ouvir falar dos meus experimentos, ratos e tese. Vocês são abrigo e cuidado de Deus para mim, é muito bom compartilhar a caminhada com vocês: **Marina, Fabricia, Rafinha, Clarinha, Stephany, Luanny, Bia e anexos (Izza e Vitória)**. Também agradeço ao meu grupo amado, CAT, em especial ao CAT Woman (**Evinha, Ju seixas e Jess**), por todo apoio, cuidado e incentivo, de fato existem amigos mais chegados que irmãos, é bom compartilhar memes, arte, leitura, teologia e cafês com vocês, a caminhada se torna bem mais leve e rica.*

*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. Maria é alguém que ama pra valer e está sempre disposta a dar o braço para aqueles que ela ama, você fez tanto por mim, e ainda que eu fale, jamais posso expressar a minha grande gratidão. 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! Agradeço a **Maria Aparecida** por cada conversa, por sempre se importar, por acreditar em mim. Suas palavras tem poderes infinitos sobre aqueles que as seguram. 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 um 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. Muito obrigada **Calline** por toda parceria e dedicação em fazer a ciência acontecer, foi bom construir tudo isso junto com você. Agradeço a **Rochele** por sempre me encorajar 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 contribui muito para que o LEMCOG seja o que tem se tornado, excelente e um lar acolhedor. Muito obrigada **Jeanderson, Arthur, Sofia, Breno e João** por viabilizarem esse trabalho, mas também*

por serem grandes parceiros e parceiras que muito ensinam e inspiram, com certeza vocês vão muito mais longe.

*Agradeço imensamente a pessoa que torna a família LEMCOG possível a esse professor e homem inspirador, **Dr. Flávio Freitas**. Obrigada por investir em mim, mesmo sem saber muito de onde eu vinha. Você é o grande responsável por tudo o que esse laboratório tem construído, é bom saber que podemos conversar com um orientador que acima de demandas burocráticas também é gente, sente, compartilha e se importa, nem nas minhas melhores ideias de orientador eu poderia esperar por uma postura como a sua. Sei que a carreira acadêmica tem seus desafios, mas você tem sustentando esse lugar de forma exemplar. Obrigada por não se limitar a ciência como o único assunto comum aqui, falar sobre a história do jazz, compartilhar música, em cada café, torna esse ambiente leve, quebra os estigmas que tanto paralisam a academia. Obrigada por todos os dias não só produzir ciência, mas empatia e humanidade, até aqui foi bom saber que no laboratório e na sua mesa há um espaço onde podemos ser ouvidos, podemos expressar momentos difíceis e encontramos com quem contar. Em muitos momentos a realidade foi dura (os dois últimos anos não foram fáceis kkkk), mas com você pude compartilhar um pouco dessas dores e ali no LEMCOG/LACOP encontrar alguém disposto a confortar, ajudar. Obrigada por acreditar nos meus sonhos e nas minhas loucuras, com certeza ter suas palavras de incentivo foram algo decisivo nesse caminho. Admiro muito o pesquisador que você é, mas acima de tudo pela sua postura simples, humilde e humana, levarei comigo essa postura e toda a parte brincalhona também, com certeza será sempre um privilégio dizer que fui orientada de Flávio Freitas.*

“Andar com fé eu vou, que a fé não costuma faiar”

Epígrafe

Não há presente a menos que passado e o futuro o habitem [...]. Sem o passado no presente, cada dia seria uma tabula rasa [...]. Semelhantemente, sem o futuro habitando meu presente, sou limitado. Não tenho nada a fazer por que não tenho aonde ir, nenhum lugar aonde queira ir. Passado, presente e futuro são irredutivelmente diferentes. Existem como tempos distintos, mas somente por causa de sua relação com outros tempos, por que cada um habita o outro” (Leithart)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
3. OBJETIVOS	45
3.1 Geral	45
3.2 Específico	45
4. MATERIAL E MÉTODO	46
4.1 Animais	46
4.2 Aparato experimental	47
4.3 Objetos	47
4.4 Procedimentos Comportamentais	48
4.4.1 Delineamento experimental para cada grupo.	49
4.4.2 Manipulação, Habituação e modelagem.	50
4.4.3 Padronização da Tarefa de reconhecimento de objetos.	52
4.4.4 Padronização da tarefa de discriminação de objetos em diferentes níveis de similaridade.....	52
4.4.5 Padronização da tarefa de discriminação de objetos em diferentes níveis de similaridade protocolo para imunofluorescência.	54
4.4.6 Processamento imunofluorescência.	54
4.4.7 Captação de dados.	55
4.5 Análise de grafos	57
4.6 Procedimentos em imunofluorescência	59
4.6.1 Perfusão e microtomia.	59
4.7 Análise comportamental e estatística	60
5. RESULTADOS	62
5.1 Piloto comportamental:	62
5.1.1 Ratos lembram de objetos novos completamente diferentes em tarefa de múltiplas tentativas.	62
5.1.2 Ratos lembram de objetos novos com graus de similaridades baixos e médios, mas não lembram de objetos com altos graus de similaridade em uma tarefa com múltiplas tentativas.	63
5.2 Comportamento grupo imunofluorescência	65
5.2.1 Ratos do grupo NOR da imunofluorescência lembram de objetos novos completamente diferentes em tarefa de múltiplas tentativas.	65
5.2.2 Ratos do grupo DIST da imunofluorescência lembram de objetos com diferentes níveis de similaridade em tarefa de múltiplas tentativas.	67
5.2.3 Ratos da imunofluorescência lembram de objetos com baixos níveis de similaridade (25%).....	69

5.2.4 Ratos da imunofluorescência lembram de objetos com níveis médios de similaridade (50%).....	71
5.2.5 Ratos da imunofluorescência lembram de objetos com níveis altos de similaridade (75%).....	73
5.3 Imunofluorescência.....	75
5.3.1 A expressão de c-fos no CA3cR e HilosR é aumentada no hipocampo rostral para as condições de memória com maiores níveis de similaridade.	75
5.3.2 A expressão de c-Fos não muda no hipocampo medial entre condições de memória com diferentes níveis de similaridade.	78
5.3.3 A expressão de c-Fos não muda no hipocampo caudal entre condições de memória com diferentes níveis de similaridade.	79
5.3.4 A expressão de c-Fos não muda no hipocampo ventral entre condições de memória com diferentes níveis de similaridade.	80
5.3.5 A expressão de c-Fos é maior em camadas profundas do PHR 36 em uma condição de média similaridade.....	81
5.4 A rede parahipocampal-hipocampo anteroposterior interage de forma distinta e mais integrada à depender do nível de similaridade da tarefa de reconhecimento	83
6. DISCUSSÃO	88
7. Conclusão	88
8. REFERÊNCIAS	94
MATERIAL SUPLEMENTAR	106

Lista de Tabelas

Tabela 1. Regiões do hipocampo e córtex e subregiões de interesse para medição morfológica e neuroquímica.....	55
---	----

Lista de Figuras

Figura 1. Protocolos de múltiplas tentativas utilizados em tarefas de reconhecimento e separação de padrões de objetos.....	26
Figura 2. Representação simplificada de inputs aferentes da região para-hipocampal para a formação hipocampal.....	33
Figura 3. Organização anatômica do sistema DG/CA3.	36
Figura 4. Campo aberto circular utilizado nos experimentos de múltiplas tentativas...	47
Figura 5. Ilustração da medida “pip”. Objetos utilizados na tarefa de discriminação..	48
Figura 6. Ilustração dos procedimentos comportamentais e seus respectivos dias, para o grupo comportamento.....	49
Figura 7. Ilustração dos procedimentos comportamentais e seus respectivos dias para o grupo de imunofluorescência	50
Figura 8. Modelo do desenho experimental de múltiplas tentativas para a tarefa NOR. B e D representam os objetos novos e suas respectivas posições no aparato.	52
Figura 9. Modelo do desenho experimental de múltiplas tentativas para o grupo que realiza todos os níveis de similaridade simultaneamente (DIST).....	53
Figura 10. Modelo do desenho experimental para uso em grupos de imunofluorescência com múltiplas tentativas para cada grupo com diferentes níveis de similaridade (G25%, G50%, G75%).	54
Figura 11. Delimitação das subregiões do hipocampo anteroposterior, córtex e subregiões de interesse para medição morfométrica e neuroquímica.	57
Figura 12. Representação gráfica de passos para realização da análise de grafos	59
Figura 13. Demonstração da construção das medidas D1 e D2 para cada sessão.....	61
Figura 14. A. Índice de discriminação por sessão para a tarefa NOR.....	62
Figura 15. Tempo de exploração em segundos para cada minuto ao longo das tentativas.	63
Figura 16. Índice de discriminação para cada condição (25%, 50% e 75%) por sessão na tarefa de discriminação.....	64
Figura 17. Tempo de exploração por sessão para a tarefa de discriminação em diferentes níveis de similaridade..	64
Figura 18. Tempo de exploração em segundos para cada minuto ao longo das tentativas	65
Figura 19. A. Índice de discriminação por sessão para a tarefa NOR. B. Tempo de exploração por sessão para a tarefa de discriminação. C. D2 para cada minuto dentro da mesma sessão para a tarefa de discriminação com diferentes níveis de similaridade. ...	66

Figura 20. Tempo de exploração em segundos para cada minuto ao longo das tentativas da tarefa NOR.....	67
Figura 21. A. Índice de discriminação por sessão para a tarefa de discriminação com diferentes níveis de similaridade. B. Tempo de exploração por sessão para a tarefa de discriminação. C. D2 para cada minuto dentro da mesma sessão para a tarefa de discriminação com diferentes níveis de similaridade.	68
Figura 22. Tempo de exploração em segundos para cada minuto ao longo das tentativas para a condição com diferentes níveis de similaridade (25%, 50% e 75%).....	69
Figura 23. A. Índice de discriminação por sessão para tarefa de discriminação com 25% de similaridade. B. Tempo de exploração por sessão para a tarefa de discriminação. C. D2 para cada minuto dentro da mesma sessão para a tarefa de discriminação com diferentes níveis de similaridade.	70
Figura 24. Tempo de exploração em segundos para cada minuto ao longo das tentativas para a condição de 25%.....	71
Figura 25. A. Índice de discriminação por sessão para a tarefa de discriminação com 50% de similaridade. B. Tempo de exploração por sessão para a tarefa de discriminação. C. D2 para cada minuto dentro da mesma sessão para a tarefa de discriminação com diferentes níveis de similaridade.	72
Figura 26. Tempo de exploração em segundos para cada minuto ao longo das tentativas para a condição de 50%.....	73
Figura 27. A. Índice de discriminação por sessão para a tarefa de discriminação com 75% de similaridade. B. Tempo de exploração por sessão para a tarefa de discriminação. C. D2 para cada minuto dentro da mesma sessão para a tarefa de discriminação com diferentes níveis de similaridade	74
Figura 28. Tempo de exploração em segundos para cada minuto ao longo das tentativas para a condição de 75%.....	75
Figura 29. Fotos montadas da imunofluorescência com marcação de c-Fos e tripla marcação (c-Fos, PV e DAPI), para cada grupo controle e experimental.....	76
Figura 30. A. Expressão de c-fos normalizada em subáreas do hipocampo rostral para diferentes condições de reconhecimento e discriminação de objetos. B. Contrastes planejados para comparação da expressão de c-fos no hilos, entre as condições	77
Figura 31. Expressão de c-fos normalizada em subáreas do hipocampo medial para diferentes condições de reconhecimento e discriminação de objetos.....	79
Figura 32. Expressão de c-fos normalizada em subáreas do hipocampo caudal para diferentes condições de reconhecimento e discriminação de objetos.....	80
Figura 33. Expressão de c-fos normalizada em subáreas do hipocampo ventral para diferentes condições de reconhecimento e discriminação de objetos.....	81

Figura 34. Expressão de c-fos normalizada em subáreas e camadas do córtex temporal para diferentes condições de reconhecimento e discriminação de objetos.....	82
Figura 35. Matriz de correlação construída a partir da correlação de Pearson entre as áreas para hipocampais e diferentes níveis do hipocampo anteroposterior, para cada grupo controle e experimental.	83
Figura 36. A-Grafos construídos para cada grupo controle e experimental.....	84
Figura 37. Modularidade dos clusters para cada condição.....	88

Lista de abreviatura

CA1- CA1 caudal
CA1M- CA1 Medial
CA1R- CA1 Rostral
CA1V- CA1 Ventral
CA2M- CA3 Medial
CA2R- CA2 Rostral
CA3- CA3 caudal
CA3aM- CA3a Medial
CA3aR- CA3a Rostral
CA3bM- CA3b Medial
CA3bR- CA3b Rostral
CA3cM- CA3c Medial
CA3cR- CA3c Rostral
CA3V- CA3 Ventral
Células em Cesta Dormentes -BCs
Córtex Entorrinal- CE
D1- Índice de discriminação
D2- Discriminação Cumulativo
DIST- Discriminação todos os níveis
Giro Denteado-DG
GranC- Granular Caudal
GranM- Granular Medial
GranR- Granular Rostral
GranV- Granular Ventral
HilosC- Hilos Caudal
HilosM- Hilos Medial
HilosR- Hilos Rostral
HilosV- Hilos Ventral
immediate expression gene -IEG
KW -Kruskal Wallis
Lateral Entorhinal Cortex- LEC

LECP- Córtex Entorrinal profundo
LECS- Córtex Entorrinal superficial
LEMCOG - Laboratório de Estudos em Memória e Cognição
Lobo temporal medial- LTM
Medial Entorhinal Córtex- MEC
MLG - modelo linear geral
NOR- Novel object recognition
Perirrinal-PRH
PRH-35P- Perirrinal 35 Profundo
PRH-35S - Perirrinal 35 Superficial
PRH-36P- Perirrinal 36 Profundo
PRH-36S- Perirrinal 36 Superficial
SimBA - Simple Behavioral Analysis
UEPB- Universidade Estadual da Paraíba

RESUMO

As bases neurais envolvidas no processamento da memória de reconhecimento têm sido alvo de diversos estudos moleculares. Estudos tem apontado a função de separação de padrões para informações espaciais e de objeto em estruturas subjacentes do córtex (Perirrinal e córtex entorrinal lateral) e hipocampo (Giro Denteado e CA3), destaca-se que este é um dos primeiros circuitos a sofrer alterações no envelhecimento. Apesar disso, não se sabe de que forma o eixo anteroposterior do hipocampo e córtex parahipocampal estão engajado para resolver processos que envolvem o reconhecimento e a separação de objetos para objetos. Além disso, existe uma necessidade de padronização de tarefas que permitam coletar maior quantidade de dados, principalmente para estudos direcionados a eletrofisiologia. Desse modo, este trabalho tem como objetivo padronizar uma tarefa de reconhecimento de objetos e discriminação de objetos com múltiplas tentativas e investigar a expressão de c-Fos em regiões do córtex temporal e nas subregiões do hipocampo, considerando-o ao longo do eixo anteroposterior. Inicialmente, foi realizado um piloto comportamental para padronização da tarefa, com 6 animais. Posterior a isso, animais divididos em 5 grupos para imunofluorescência realizaram: uma tarefa reconhecimento de Objetos (C1), n=8, tarefa de discriminação com todos os níveis de similaridade (C2), n=8, e uma tarefa de discriminação em um grau de similaridade específico (25%, 50% e 75%), com 7, 7 e 6 animais respectivamente. A tarefa consiste em 4 tentativas, contendo uma fase de amostra e outra de teste cada. Durante cada tentativa um novo conjunto de objeto foi utilizado. Em cada amostra dois pares idênticos de objetos construídos a partir de Legos. Durante a fase de teste, um dos objetos era trocado por um objeto diferente, variando a sua similaridade a depender do grupo experimental. Para controlar a similaridade dos objetos um plano cartesiano foi construído, afim de que a quantidade de sobreposição entre eles fosse quantificada e as características compartilhadas controladas. Os cortes foram submetidos a um protocolo de imunofluorescência para marcação de c-Fos. A contagem foi feita de forma manual utilizando-se imageJ. Para os dados comportamentais, índices cumulativos (D2) foram calculados ao longo das tentativas. Para os dados da imunoflorescência, ANOVA para medidas independentes e contrastes planejados foram feitos. Foram feitos Teste de Kruskal-Wallis e post hoc Dunn. Análises de grafos foram orientadas por meio do pacote igrph. Nossos resultados apontam que para o piloto comportamental, os animais discriminam objetos novos dos diferentes e com graus de similaridade de 25% e 50%. Para imunofluorescência, houve diferenças significativas na expressão de c-Fos nas distintas porções do eixo horizontal do CA3R e Hilos R, sendo as condições de maior similaridade as de maior expressão de c- Fos, não havendo diferença entre as condições de maior similaridade (50% e 75%). Além disso, em condições de maior similaridade a expressão de c-Fos em diferentes regiões do hipocampo esteve fortemente correlacionada com o índice de discriminação. A análise de grafo mostrou que o funcionamento da rede hipocampal é altamente dinâmico a depender da condição. À medida que o nível de similaridade aumenta, também aumentam as interconexões da rede, portanto as redes são mais densamente interconectadas e mais eficientes para condições de alta similaridade. Além disso, a depender do nível de similaridade, diferentes formas de organização e divisão de cluster são encontradas. Portanto, o hilosR e CA3cR são ativados de forma distinta a depender do nível de similaridade, tendo, portanto, papel central na separação de padrões. O hipocampo trabalha como uma rede mais densamente integrada à medida

que a demanda de sobreposição entre as memórias aumenta. Esses achados contribuem para elucidar os mecanismos em torno das bases neurobiológicas da memória de reconhecimento e separação de padrões.

Palavras-chave: Padronização de tarefa. Análise de rede; Reconhecimento de Objetos; Separação de padrões

ABSTRACT

The neural bases involved in the processing of recognition memory have been the focus of various molecular studies. Research has pointed to the pattern separation function for spatial and object information in underlying structures of the cortex (Perirhinal and Lateral Entorhinal Cortex) and hippocampus (Dentate Gyrus and CA3). It is noteworthy that this is one of the first circuits to undergo changes during aging. However, it remains unclear how the anteroposterior axis of the hippocampus and parahippocampal cortex are engaged in solving processes involving the recognition and separation of objects. Additionally, there is a need for standardizing tasks that allow for the collection of a larger amount of data, particularly for studies focused on electrophysiology. Thus, this study aims to standardize an object recognition and discrimination task with multiple trials and investigate c-Fos expression in regions of the temporal cortex and hippocampal subregions, considering them along the anteroposterior axis. Initially, a behavioral pilot study was conducted to standardize the task, with 6 animals. Following this, animals divided into 5 groups for immunofluorescence underwent: an Object Recognition task (C1), n=8; a discrimination task with all levels of similarity (C2), n=8; and a discrimination task with a specific similarity degree (25%, 50%, and 75%), with 7, 7, and 6 animals respectively. The task consists of 4 trials, each containing a sample phase and a test phase. During each trial, a new set of objects was used. In each sample, two identical pairs of objects constructed from Legos were presented. During the test phase, one of the objects was replaced by a different object, varying its similarity depending on the experimental group. To control object similarity, a Cartesian plane was constructed so that the amount of overlap between them could be quantified and shared features controlled. Sections were subjected to an immunofluorescence protocol for c-Fos labeling. Counting was performed manually using ImageJ. For behavioral data, cumulative indices (D2) were calculated throughout the trials. For immunofluorescence data, ANOVA for independent measures and planned contrasts were performed. Kruskal-Wallis tests and post hoc Dunn tests were also conducted. Graph analyses were guided by the igraph package. Our results indicate that for the behavioral pilot, animals discriminate new objects from different ones with similarity degrees of 25% and 50%. For immunofluorescence, significant differences were found in c-Fos expression in different portions of the horizontal axis of CA3R and Hilos R, with higher similarity conditions showing greater c-Fos expression, with no difference between the higher similarity conditions (50% and 75%). Moreover, under higher similarity conditions, c-Fos expression in different hippocampal regions was strongly correlated with the discrimination index. Graph analysis showed that the functioning of the hippocampal network is highly dynamic depending on the condition. As the level of similarity increases, so do the network interconnections; therefore, the networks are more densely interconnected and more efficient for high similarity conditions. Furthermore, depending on the level of similarity, different forms of organization and cluster division are found. Therefore, HilosR and CA3cR are activated differently depending on the level of similarity, having a central role in pattern separation. The hippocampus functions as a more densely integrated network as the demand for overlap between memories increases. These findings contribute to elucidating the mechanisms surrounding the neurobiological bases of recognition memory acquisition, consolidation, and pattern separation.

Keywords: Task Standardization; Network Analysis; Object Recognition; Pattern Separation.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Memória

A memória é uma função cognitiva necessária para a sobrevivência que permite armazenar e recuperar uma informação, indicando que a aprendizagem persistiu através do tempo (Pause et al., 2013). Em geral, as memórias são formadas e estabilizadas através de três processos distintos: consolidação, armazenamento e evocação. A codificação refere-se à aquisição inicial do traço de uma memória. Através da consolidação, a memória é preservada e armazenada para posterior evocação. Finalmente, a recuperação é o processo pelo qual as memórias armazenadas anteriormente são reativadas (Cohen & Stackman, 2015).

Para além das fases de consolidação, 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. 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. 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 lobo temporal medial são danificadas. Memória implícita é um termo abrangente que inclui várias habilidades adquiridas, as quais não são acessíveis ao conhecimento consciente. Estas memórias 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 à 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.

1.2 Memória de reconhecimento em roedores

O reconhecimento, um subtipo de memória explícita/declarativa, envolve a capacidade de distinguir novos estímulos de familiares. A capacidade de detectar quando um estímulo é novo ajuda um animal a atender aos eventos no ambiente que potencialmente sinalizam novas ameaças ou novas oportunidades. Conseqüentemente, é importante que os sistemas neurais sejam preparados para um aprendizado eficaz sobre esses novos estímulos. (Kinnavane, Albasser & Aggleton, 2015; Cohen & Stackman, 2015; Aggleton, Brown & Albasser, 2012). A detecção de novidades por animais pode ser subdividida em duas grandes categorias. A primeira categoria, reconhecimento de item, refere-se a se um item individual é novo ou familiar (*Saber/Know*). Saber é a sensação imediata de que um evento, indivíduo ou item foi encontrado anteriormente (Aggleton, Brown & Albasser, 2012).

A categoria de reconhecimento associativo, *Lembrar/Remember*, envolve a reorganização espacial ou temporal de elementos familiares para formar um novo conjunto de elementos familiares. Esta segunda categoria, portanto, depende da capacidade de combinar e recombinar elementos de estímulo. Além disso, envolve um processo mais lento, sendo que as informações sobre o alvo podem ser testadas subjetivamente pela lembrança de informações associadas ao alvo. Assim, pode-se evocar informações específicas sobre onde e quando a experiência original ocorreu (Cohen & Stackman, 2015; Eichenbaum, Yonelinas & Ranganath, 2007; Aggleton et al., 2012).

É altamente plausível que os processos de lembrar e saber (*Remember e Know*) sejam fenômenos relacionados. Ao mesmo tempo, deve-se enfatizar que o reconhecimento associativo e a memória episódica (a capacidade de recordar eventos específicos no tempo e no espaço) não são equivalentes. Embora ambos os processos possam envolver a marcação de informações semelhantes a eventos específicos, a memória episódica também envolve a recordação ativa. Em contraste, o reconhecimento associativo é diretamente suscitado pelos estímulos-alvo (Aggleton et al., 2012).

1.2.1 Tarefa de Reconhecimento de objetos e protocolos de múltiplas tentativas

Estudos com animais não humanos são fundamentais para entender a base biológica da memória e seus distúrbios. Um desafio é criar testes que imitem a memória de reconhecimento em humanos. A exploração espontânea de objetos em estudos de roedores é um modelo animal simples, usado para investigar a memória de reconhecimento. Este teste é baseado na tendência natural de muitas espécies de explorar novos estímulos (Chao, Silva, Yang & Huston, 2020). Considerando-se essa preferência, foi criada a tarefa de reconhecimento de objeto novo - novel object recognition (NOR) (Ennaceur & Delacour, 1988). A NOR revolucionou os estudos em reconhecimento de objetos e tem sido amplamente utilizada para explorar habilidades de memória em roedores (Cohen & Stackman, 2015). Esta tarefa tornou-se um dos paradigmas comportamentais mais utilizados nas áreas da neurobiologia, psicofarmacologia e neurociência comportamental nas últimas duas décadas (Chao et al., 2020).

A NOR geralmente é feita em uma arena familiar retangular ou circular, sem sinais espaciais polarizados. Esta é composta por duas fases. Durante o que é referido como a fase de treinamento ou amostra, o roedor explora dois objetos novos idênticos encontrados em uma arena familiar (Ennaceur & Aggleton, 1994). A codificação de memória de objeto é definida operacionalmente como ocorrendo durante a fase de amostra. Após a conclusão da fase de amostra, o animal é removido da arena durante um determinado período. Na fase de teste, o roedor é exposto a uma réplica do objeto familiar e a um novo objeto. Posteriormente, medidas são elaboradas a partir do comportamento exploratório do animal (Cohen & Stackman, 2015).

Vários fatores devem ser considerados ao se pensar na utilização da NOR. Chao et al. (2020) destacaram alguns desses fatores. O primeiro trata-se da habituação, uma vez que essa pode amenizar fatores estressantes antes do teste. A duração da exploração dos objetos também é algo importante, estudos mostraram que uma duração mínima de exploração do objeto (alcance de 10 a 20 segundos em ratos e camundongos) é essencial para testar o NOR tanto na amostra quanto nas fases de teste. Alternativamente, os animais podem ser excluídos se a duração da exploração do objeto estiver abaixo de um certo nível, por exemplo, menos de 10s em 5 min. Outro fator importante trata-se da natureza do objeto, uma vez que a duração da exploração do objeto está associada às características dos objetos: peso, forma, tamanho, textura. A neofobia em relação a

objetos, especialmente ao encontrá-los pela primeira vez, pode ser outro fator potencial que afeta a exploração de objetos. Por fim, o desempenho do NOR é variável e dependente do intervalo de tempo entre o aprendizado e as fases de teste. Portanto, a combinação de diferentes durações de exploração de objetos e intervalos de retenção pode ser usada para criar diferentes intensidades de memória (Chao et al., 2020).

As tarefas de memória de reconhecimento de objetos foram inicialmente aplicadas usando uma abordagem de uma tentativa (ou seja, amostra seguida por um teste). No entanto, muitos estudos exigem um grande número de animais para resultados significativos, levando ao desenvolvimento de protocolos mais recentes que realizam múltiplas tentativas com o mesmo animal. (Ameen-Ali, Eacott e Easton, 2012; Albasser et al., 2010; Araujo et al., 2021; Araujo et al., 2025). Os designs de tarefas de uma e de várias tentativas apresentam vantagens e desvantagens e podem servir para finalidades diferentes. O uso de um baixo número de tentativas pode levar a uma grande quantidade de variância nos dados por causa da variabilidade naturalmente alta do comportamento espontâneo dos ratos (Araujo et al., 2021). Várias tentativas promovem o acúmulo mais rápido de dados, diminuem o potencial de estresse de manuseio e espera-se que a variância geral seja menor como consequência da probabilidade reduzida de efeitos aleatórios no comportamento. No entanto, protocolos de múltiplos ensaios são demorados e podem induzir interferência proativa, sobrepondo informações dos eventos consecutivos (Seel et al., 2018; Ameen-Ali et al., 2015).

Albasser et al., 2010, elaborou um labirinto em forma de gravata borboleta, que combina recursos de tarefas de reconhecimento espontâneo de objetos com tarefas que envolvem recompensas. O labirinto *Bow-tie* consiste em dois compartimentos em cada extremidade, que podem conter objetos. O rato é colocado inicialmente em um compartimento do labirinto com um objeto. O animal então vai para o compartimento oposto, que contém dois objetos - um que é familiar, visto no compartimento anterior, e outro que é novo, nunca visto. O animal então retorna para o primeiro compartimento, que agora contém o objeto visto anteriormente, o qual se tornou familiar, e um novo objeto. Isso produz uma sequência de testes para cada animal em uma única bateria de teste (veja parte A da figura 1).

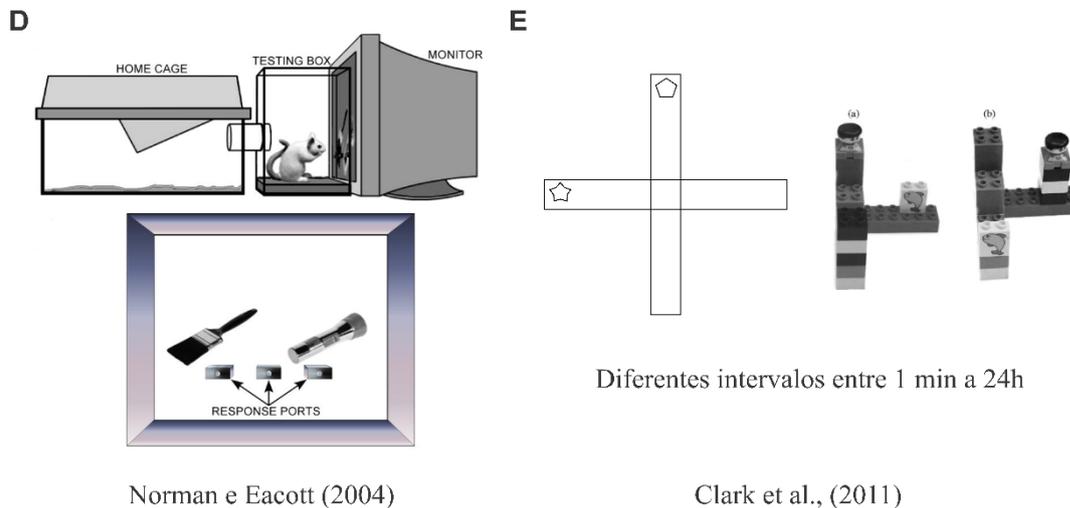
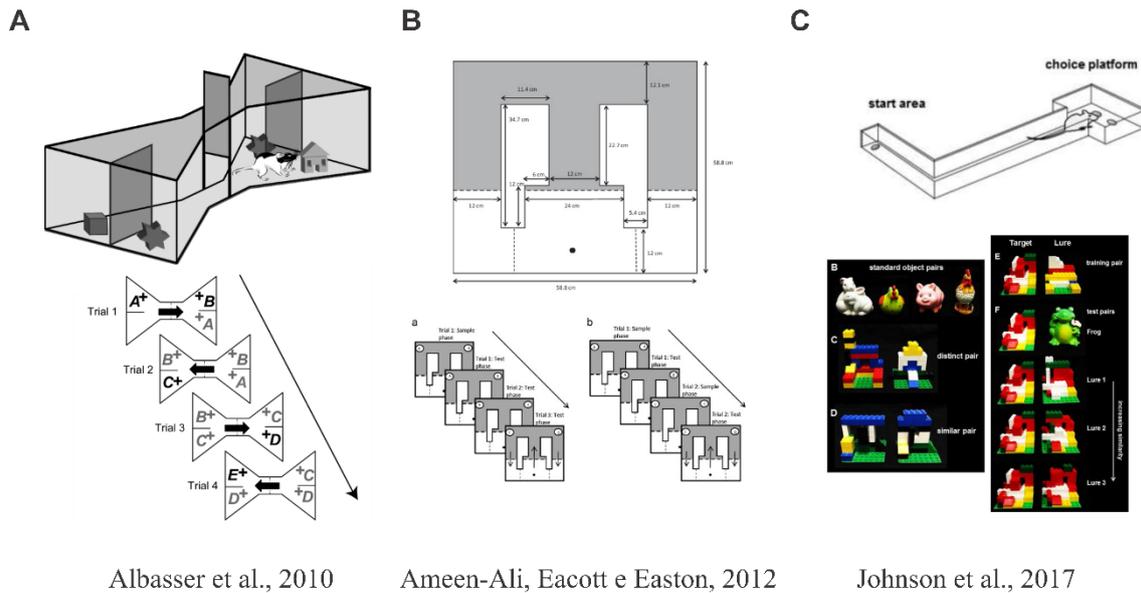


Figura 1. Protocolos de múltiplas tentativas utilizados em tarefas de reconhecimento e separação de padrões de objetos.

O Labirinto Bow-tie é uma tarefa de reconhecimento espontâneo de objetos que usa a exploração da novidade como medida de reconhecimento. Uma vantagem é que ele permite várias tentativas em um único momento, resultando assim em um acúmulo de dados mais rápido. Outras vantagens dessa tarefa são: aumentar o número de testes executados por animal, diminuir o estresse potencial de manuseio e reduzir a variabilidade no desempenho dos animais que está associada às tarefas de reconhecimento padrão. A tarefa Bow-tie maze aprimora o paradigma de reconhecimento de objetos espontâneo e é usada em diversos estudos de lesão e expressão gênica (Ameen-Ali et al., 2015; Albasser et al., 2010; Aggleton et al., 2012; Albasser, Poirier & Aggleton, 2010; Albasser et al.,

2015). Deve-se considerar, porém, que as fases de amostra e teste se sobrepõem, uma vez que o teste anterior acaba sendo uma fase de evocação, mas também uma fase de consolidação para o teste subsequente. Assim, você não consegue investigar separadamente processos de consolidação e evocação. Além disso, 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.

Ameen-Ali, Eacott e Easton (2012) desenvolveram um protocolo de múltiplas tentativas com uma tarefa de reconhecimento de objetos, por meio do qual o rato 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. O intervalo de exploração entre as tentativas era de 1 min. Há nesse protocolo um compartimento de espera, onde o animal é colocado antes e depois de cada sessão. As medidas de reconhecimento e exploração em reconhecimento de objeto espontâneo, as características do protocolo em geral eram comparáveis a estudos anteriores que usaram o paradigma de um ensaio por dia (veja parte B da figura 1). Este protocolo foi utilizado também para avaliar a função do perirrinal em diferentes níveis de familiaridade (Ameen-Ali et al., 2021). Um ponto a destacar é que a limitação espacial do aparato pode gerar um viés de direção do animal, uma vez que roedores podem apresentar uma preferência de lateralidade, e o modelo do aparato exige que essa escolha seja feita. O aprendizado de uma nova regra no processo de modelagem e na discriminação pode ser influenciado por esse viés (Johnson et al., 2017).

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 (Josey & Brigman, 2015; Gilbert & Kesner, 2006; Miranda et al., 2017).

A memória episódica está relacionada à recordação de eventos únicos e específicos, e a distinção entre experiências semelhantes é considerada um componente essencial para evitar a interferência entre essas representações. Esse processo, denominado separação de padrões, tem sido amplamente investigado no hipocampo, uma estrutura fundamental para a codificação e armazenamento das memórias. O hipocampo exerce um papel central na preservação da fidelidade das recordações, assegurando que eventos distintos sejam representados de maneira não sobreposta, garantindo assim a integridade e a organização das memórias episódicas (Miranda et al., 2017). Com o envelhecimento, déficits da memória episódica podem estar associados a uma redução na capacidade de manter ricos detalhes contextuais (Johnson et al., 2017; Miranda et al., 2017). Estudos em humanos indicam que, em déficits relacionados à idade, a perda de informação é mais pronunciada na identificação de objetos semelhantes do que em tarefas com alta interferência espacial, onde itens são posicionados em espaços próximos distintos a serem discriminados (Reagh et al., 2016; Reagh et al., 2018).

A partir do teste de reconhecimento de objeto espontâneo, foi proposta a introdução de múltiplos recursos na tarefa e a necessidade de discriminar estímulos que compartilham características, portanto a tarefa foi adaptada para permitir a investigação dos efeitos da crescente sobreposição de características entre objetos, 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), veja parte C e D da figura 1. No entanto, os efeitos das lesões do córtex perirrinal em tal tarefa se mostraram ambíguos. Muitos dos resultados associados à 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 o fazem (Ahn & Lee, 2017).

Porém, os resultados da tarefa de discriminação de duas escolhas não podem definitivamente diferenciar 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). Em contraste com os achados em ratos, humanos com lesão hipocampal ou lesões maiores em lobo temporal medial (LTM) realizaram normalmente a tarefa de discriminação com apresentação simultânea, na qual os animais são expostos simultaneamente a estímulos similares e devem escolher o estímulo mais distinto em detrimento dos semelhantes, realizando, portanto, discriminação imediata. Não houve diferenças entre os grupos, e todos os grupos realizaram acima do acaso (Hales et al., 2015).

Em outro estudo, ratos com lesões perirrinais não tiveram prejuízos em fazer discriminações difíceis e ambíguas, apesar de essas habilidades estarem comprometidas em uma tarefa de memória de reconhecimento padrão (Hales et al., 2015; Clark et al., 2011), veja parte E da figura 1. Pacientes com lesões do LTM que incluíam o córtex perirrinial foram testados quanto à 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 de outros estudos são consistentes com o papel conhecido do córtex perirrinial e do hipocampo na formação da memória de longo prazo, contrapondo o papel perceptivo proposto ao córtex perirrinial (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 perirrinial pouparam totalmente a capacidade de fazer discriminações ambíguas de

características, e o desempenho de animais lesionados e intactos era indistinguível em todos os níveis de dificuldade. Em contraste, as lesões peririnais prejudicaram a memória de reconhecimento (Clark et al., 2011).

Seguindo esta linha de investigação, Johnson et al. (2017) elaboraram um protocolo que avalia a discriminação de objetos com níveis distintos de similaridade. O aparato em formato de Y possui uma pista pela qual o animal pode correr. Ao final dessa pista, o animal se encontra com um objeto novo e outro familiar. Os ratos foram ensinados que um dos dois objetos apresentados simultaneamente no par era o alvo (S+), sinalizando uma recompensa alimentar, enquanto o objeto alternativo no par nunca foi recompensado (S-). Em cada tentativa, o rato saiu da área de largada e atravessou o braço até a plataforma de escolha. Diversas limitações dessa tarefa incluem sua complexidade de condicionamento a nível de escolha e medida de memória baseada em acerto e erro.

Pensando-se no quanto 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 (modelos de uma visão perceptiva) Norman e Eacott (2004), Johnson et al. (2017) ou mnemônica Clark et al. (2011), aqui propõe-se a padronização de uma tarefa de reconhecimento e discriminação de objetos como uma possibilidade que viabiliza o registro eletrofisiológico em uma tarefa de discriminação de objetos em diferentes graus de similaridade com múltiplas tentativas.

1.4 Mecanismos neurais e moleculares para a memória de reconhecimento e discriminação de objetos

1.4.1 Mecanismos neurais para a memória de reconhecimento e discriminação de objetos.

O hipocampo é uma estrutura do lobo temporal medial, que está criticamente envolvida na memória episódica e de reconhecimento e navegação espacial (Strange, Witter, Lein & Moser, 2014; Brown & Banks, 2015, Clark & Squire, 2010). O hipocampo é uma estrutura em forma de C que se estende no assoalho do corno temporal do ventrículo lateral, este consiste em três subcampos principais (CA1, CA2 e CA3), além do giro denteado (DG), subículo e córtex entorrinal (CE). Com base em sua

conectividade extrínseca, a formação do hipocampo recebe uma vasta quantidade de informação sensorial multimodal altamente processada que é canalizada para a formação hipocampal, principalmente pelo CE (Schultz & Engelhardt, 2014).

Descobertas recentes identificaram células hipocampais envolvidas na codificação do espaço, como as células de lugar, que disparam em locais específicos (O'Keefe & Dostrovsky, 1971), e as células em grade, que disparam em um padrão de grade e desempenham um papel na segregação de informações espaciais (Fyhn, Molden, Witter, Moser & Moser, 2004). Tais descobertas têm contribuído de forma significativa para a compreensão da memória episódica. As “células em grade” do córtex entorrinal medial (medial entorhinal cortex - MEC) podem atuar na representação do contexto espaço-temporal, contribuindo para a distinção de rotas e episódios experimentais. As “células de lugar”, por sua vez, representam a série de lugares onde os eventos ocorrem em sequências que compõem memórias “episódicas” distintas (Eichenbaum, Sauvage, Fortin, Komorowski, Lipton & 2012).

Considerando as evidências que estabeleceram a importância de estruturas dentro do LTM como essenciais para a memória, a hipótese de uma segregação entre informações espaciais e não espaciais nessa região, proposta inicialmente por Mishkin et al. (1983), teve grande influência na conceituação da função da memória (Beer, Chwiesko, Kitsukawa & Sauvage, 2013). O córtex pós-rinal (POR) e o córtex perirrinal, que pertencem ao LTM, recebem grandes projeções dos fluxos visuais dorsal e ventral, que carregam informações espaciais e não espaciais, respectivamente, também têm sido consideradas estruturas importantes para a memória (Mishkin et al., 1983; Wang et al., 2011; Beer, Chwiesko, Kitsukawa & Sauvage, 2013).

Apesar de apresentar um papel fundamental de integração da memória, deve-se considerar que o LTM não pode ser o local de armazenamento final para a memória de longo prazo (Squire & Zola-Morgan, 2011). A partir de uma conexão direta com o neocórtex, neurônios do hipocampo, codificados de forma esparsa, fazem referência e ativam neurônios neocorticais para recriar o conteúdo de uma experiência, gerando assim o engrama. Desse modo, o hipocampo serve temporariamente para essa função integrativa ou de ligação, mediando a codificação inicial, retenção e recuperação, enquanto promove a consolidação da memória no neocórtex, por meio de feixes de saídas através do subículo (Szekeres, Winocur & Moscovitch, 2018).

A informação processada no hipocampo percorre um caminho serial, predominantemente unidirecional e glutamatérgico (excitatório), que, em última análise, integra um circuito fechado. Nesta cadeia intrínseca de conexões, o giro denteado representa o primeiro grande portal, este 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. Os neurônios da camada II do córtex entorrinal projetam-se para os dois terços externos da camada molecular do giro denteado e para o estrato lacunosum-moleculare da área CA3. Já os neurônios da camada III do córtex entorrinal projetam-se para a área CA1 e o subículo. As células granulares do giro denteado se projetam através de seus distintos axônios, as fibras musgosas, sobre as células do hilos subjacente e - mais importante - sobre os dendritos proximais dos neurônios piramidais CA3. A conectividade dos neurônios do hilos é amplamente desconhecida. No entanto, esses neurônios dão origem a projeções locais e associativas. Uma classe de célula, as células musgosas, dá origem a um sistema associativo glutamatérgico de fibras que termina no terço interno da camada molecular denteada. Essa projeção pode ajudar a conectar diferentes níveis rostrocaudais do giro dentado, veja figura 3 (Schultz & Engelhardt, 2014).

Colaterais de células piramidais CA3 isoladas projetam-se para outros níveis de CA3, bem como para regiões CA1 e subcorticais. É importante ressaltar que as células da região CA3 do hipocampo também são responsáveis pela principal via de entrada para a região CA1, por meio dos colaterais de Schaffer. Esses colaterais se projetam e terminam em todo o estrato radiatum e no estrato oriens da área CA1. Em contraste com CA3, as células piramidais de CA1 não se projetam significativamente para outros níveis de CA1. Em vez disso, as células piramidais CA1 projetam-se predominantemente para o subículo. O subículo, por sua vez, se projeta para o pré e para-subículo, e finalmente os três (subículo, pré e para-subículo) se projetam para o CE (Schultz & Engelhardt, 2014).

Para que a informação chegue ao hipocampo, ela deve primeiro percorrer o córtex perirrinal e o córtex pós-rinal. Essas estruturas recebem informações sensoriais do neocórtex e estão densamente interconectadas de forma recíproca. Elas são responsáveis por transmitir informações ao córtex entorrinal (CE) e são frequentemente descritas como parte de dois sistemas corticais distintos e de grande escala. O primeiro sistema é uma rede temporal anterior, funcionalmente associada às entradas no córtex perirrinal, sendo

essencial para o processamento de informações sobre itens e características não espaciais. Esse tipo de informação ("o que") é processado predominantemente pela via ventral, passando pelo córtex entorrinal lateral - Lateral entorhinal cortex (LEC). A segunda rede é medial posterior e desempenha um papel fundamental no processamento de informações espaciais e de cena. O MEC é considerado uma extensão do fluxo de processamento dorsal, especializado nesse tipo de informação ("onde") (Burke et al., 2018; Eichenbaum et al., 2007).

Nessa visão, perirrinal e POR enviam projeções para o LEC e MEC, respectivamente, mantendo um relativo isolamento de informações espaciais e não espaciais (Burke et al., 2018). Os neurônios LEC e MEC camada II, então, projetam-se para as sub-regiões do giro denteado (DG) / CA3 da HPC através da via perfurante para integrar essas correntes de informação ao longo do eixo longitudinal do hipocampo, o qual funciona como uma central que integra as informações “o que” e “onde”, formando assim representações flexíveis e conjuntivas do “o que e onde aconteceu”, veja figura 2 (Knierim, Neunuebel & Deshmukh, 2018; Eichenbaum *et al.*, 2007).

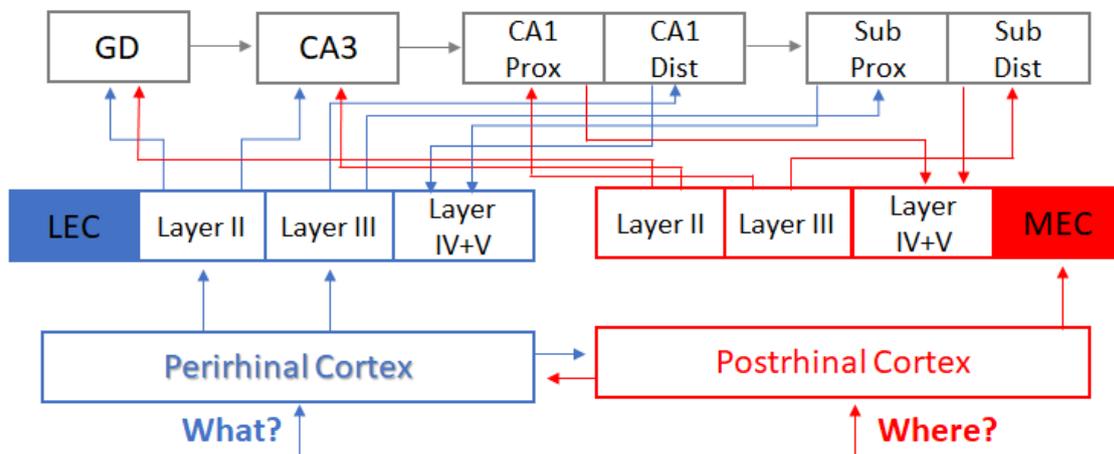


Figura 2. Representação simplificada de inputs aferentes da região para-hipocampal para a formação hipocampal. A cor em azul demonstra as estradas para a via “o que” e o vermelho representa das entradas para a via “onde”. Autoria própria.

As evidências anatômicas sugerem algumas hipóteses sobre como a informação é codificada e recuperada durante o processamento da memória. Uma hipótese é que, durante a codificação, representações de itens distintos (por exemplo, pessoas, objetos, eventos) são formadas no córtex perirrinal e no córtex entorrinal lateral. Essas

representações, juntamente com as projeções do neocórtex específicas para "o quê", 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 pós-hipocampal e na área entorrinal medial. O hipocampo, então, associa os itens ao seu contexto (Eichenbaum et al., 2007).

Deve-se considerar que alguns estudos que focaram na função do LEC relatam algum tipo de informação espacial, confirmando que estas redes não são dissociadas, mas intercomunicantes (Beer et al., 2013). Foi verificado que células LEC disparam seletivamente em locais relativos a objetos, porém lesões LEC também demonstram prejudicar o processamento espacial na memória de reconhecimento espontâneo de objetos (Deshmukh e Knierim, 2011; Van Cauter et al., 2013). Também em desacordo com as previsões do modelo, outro estudo de lesão descobriu que o MEC desempenha um papel crítico na memória de reconhecimento não espacial (Sauvage et al., 2010). Em uma revisão realizada por Beer (2013), que destaca contrastes com as previsões do modelo, estudos recentes em humanos e animais indicam que o córtex pós-rinal não processa apenas informações espaciais, mas também associações contextuais de estímulos, que desempenham um papel crucial no processo de recordação (Yonelinas, 1997; Bar e Aminoff, 2003; Aminoff et al., 2007; Bar et al., 2008; Sauvage et al., 2008; Furtak et al., 2012).

Diversos dados anatômicos demonstram que as informações provenientes do córtex temporal anterior (relacionadas ao 'o que') e do córtex medial posterior (relacionadas ao 'onde') são integradas antes de chegarem ao hipocampo (Binicewicz, Strien, Wadman, Heuvel & Cappaert, 2016; Zhuo et al., 2016; Lavenex, Suzuki & Amaral, 2004; Strien, Cappaert & Witter, 2009). Estudos anatômicos sobre a conectividade de memória de longo prazo (LTM) em ratos identificaram o córtex pós-rinal como um 'hub' conector, o que significa que essa região está altamente conectada com outras áreas da rede LTM, incluindo o córtex perirrinal, o LEC e o MEC. Além disso, tanto o LEC quanto o MEC foram agrupados com o hipocampo, o córtex perirrinal e o córtex pós-rinal. Assim, não há um isolamento completo da entrada sensorial dentro da rede LTM (Binicewicz, 2016; Burke et al., 2018). Em vez de ter uma visão puramente orientada para o conteúdo da especialização regional dentro do LTM, Burke et al. (2018) propuseram um modelo atualizado baseado no processo das contribuições desta região

para a cognição. Sob essa hipótese, tanto o perirrinal quanto o pós-rinal contribuem para as duas redes. Uma rede se projeta através do CE para o hipocampo para apoiar a formação de representações gerais de cenas ou ambientes. A segunda rede projeta diretamente para a HPC, a qual adiciona detalhes refinados de estímulos relevantes à representação mais ampla.

A rede de representações gerais envolve projeções do perirrinal e pós-rinal que se conectam a camadas superficiais do LEC e MEC, que são as origens do *input* da via perfurante para DG / CA3, muito semelhante ao circuito anterior proposto para “o que”. A rede detalhada é composta pela entrada direta do perirrinal e pós-rinal para o CA1. As redes detalhadas e grosseiras podem atuar como dois circuitos interativos, envolvidos no processamento de objetos dentro de uma cena, funcionando como uma unidade integrada. A rede grosseira calcula uma representação holística, mas relativamente semelhante à essência, com base nas entradas do perirrinal e pós-rinal para DG / CA3 através de CE (Burke et al., 2018).

Essa representação grosseira pode ser utilizada para inferir o contexto semântico de um espaço, para identificar se um espaço é familiar ou novo e para auxiliar na detecção rápida e antecipada de objetos. Diante de uma sobreposição ou similaridade entre estímulos sensoriais, detalhes adicionais podem ser necessários para desambiguar componentes sobrepostos, o que envolve a rede de detalhes. Também é mais provável que a resolução da ambiguidade envolva processos decisórios e avaliativos mediados por córtices pré-frontais e ventromediais. Além disso, o circuito trissináptico clássico, através de DG / CA3, pode permitir a separação de padrões ou a conclusão de padrões de diferentes episódios ao longo do tempo, com base nas características globais gerais (Burke et al., 2018).

As células granulares, as principais células de saída da DG, enviam axônios (fibras musgosas) para CA3 e inervam um pequeno número de células piramidais e um número desproporcionalmente grande de interneurônios (Acsády et al., 1998; Henze et al., 2002). As células piramidais de CA3 então formam uma rede excitatória recorrente e enviam axônios para CA1. Trabalhos teóricos, bem como experimentos anatômicos, fisiológicos e comportamentais, apoiam a ideia de que o sistema DG-CA3 realiza a separação de padrões e o completamento de padrões das entradas para o hipocampo, operações necessárias para codificação e recuperação de memória. Mais especificamente, presume-

se que o GD está envolvido no espaçamento do padrão de entrada da camada 2 do córtex entorrinal (separação do padrão) e a rede recorrente CA3 está envolvida no completamento do padrão, veja figura 3 (Senzai, 2018, Kang & Toyozumi, 2024).

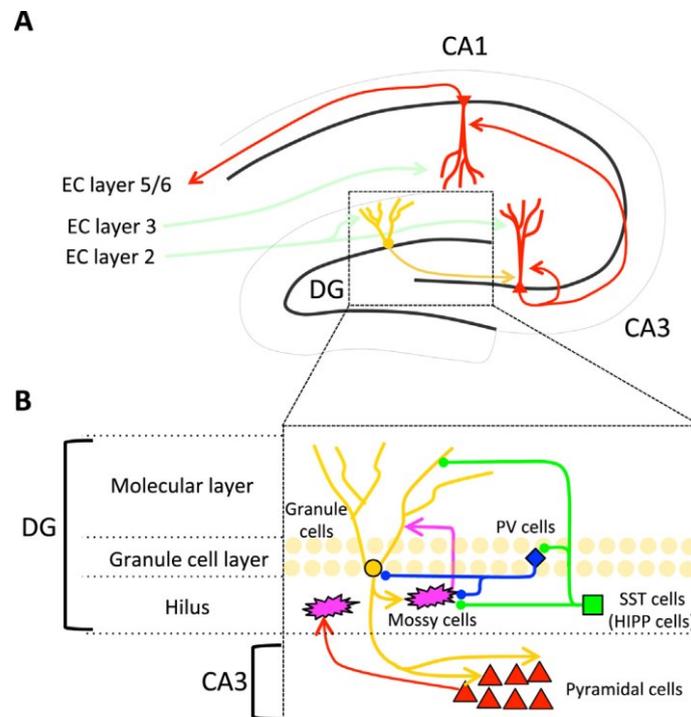


Figura 3. Organização anatômica do sistema DG/CA3. (A) Via trissináptica clássica no hipocampo. Amarelo: células granulares; vermelho: células piramidais. (B) Circuitos locais no sistema DG-CA3. Amarelo: células granulares, rosa: células musgosas, vermelho: células piramidais CA3, azul: células positivas para PV, verde: células positivas para somatostatina (células do hilos). (Senzai et al., 2018)

Por causa das propriedades autoassociativas da rede recorrente CA3, cada padrão inteiro armazenado na rede recorrente pode ser recuperado e concluído a partir de apenas uma pequena parte do padrão (complementação do padrão). Para maximizar a capacidade armazenada na rede autoassociativa, sugere-se que a conectividade recorrente esparsa é importante. Tem-se percebido que a conexão recorrente entre as células piramidais CA3 é realmente esparsa e pode atuar nessa função (Brunel, 2016). Além disso, estudos têm destacado as diferenças funcionais desempenhadas ao longo do eixo horizontal do CA3, através do qual o CA3 estaria envolvido na separação e complementação de padrões de forma distinta ao longo do seu eixo (Lee et al., 2022; Berdugo-Veja, Dhingra & Calegari, 2023).

Modelos teóricos e computacionais propuseram que um papel crítico do GD é apoiar a ortogonalização de entradas das regiões corticais parahipocampais, minimizando a interferência. Esta função é historicamente atribuída à atividade relativamente esparsa no DG, por meio de controle inibitório rigoroso das populações de interneurônios adjacentes e à organização anatômica das projeções do córtex entorrinal, onde poucos neurônios aferentes se projetam em muitas células granulares, portanto camadas diferentes do DG recebem diferentes projeções do EC, assim essas podem trabalhar de maneira distinta na separação de padrões (Johnson et al., 2019; Rolls, 2013; Guzman et al., 2016; Senzai, 2018). É interessante notar que, no trabalho realizado por Fernandez-Ruiz et al. (2022), a atividade de células classificadas como células musgosas estava mais direcionada para a tarefa de reconhecimento de objetos. Além disso, é a atividade advinda de entradas do LEC que está mais associada a NOR, sendo esse um possível circuito para reconhecimento e discriminação de objetos.

Acredita-se que existe uma função de driver das células musgosas no remapeamento. Jung et al. (2019) mostraram que, quando há mudanças no ambiente, como as usadas para induzir o remapeamento, a resposta das células musgosas precede a mudança de atividade nas células granulares. As células musgosas poderiam alterar a atividade das células granulares principalmente por meio da ativação de interneurônios (PV+), tendo assim um efeito indireto de inibição sobre as células granulares, hipótese de “células em cesta dormentes (BCs)” (Morales et al, 2020). As células musgosas podem modular a resposta das células granulares por inibição indireta ou ativação direta, assim as células musgosas podem fazer parte dos circuitos que detectam e codificam as informações não sobrepostas, enquanto as células granulares podem codificar as informações sobrepostas (Morales et al., 2020). Deve-se notar que uma complexa inervação ocorre entre camadas do giro denteado ventral e dorsal, uma vez que a maior parte das células do hilos dorsal projetam-se para a camada molecular média do giro denteado ipsilateral e ventral. Já a camada do hilos ventral projeta-se para a camada molecular interna do hilos ipsilateral e dorsal (Botterill et al., 2021, Houser et al., 2021).

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 correlação de atividades dentro da assembleia da célula ativa (Leutgeb et al. 2007). Em humanos, o desempenho da discriminação de objetos mostrou

uma relação positiva com o volume do hipocampo, especificamente os subcampos de giro denteado (DG) e CA3 combinados e o subículo, apontando mais uma vez para o papel de separação de padrões dessas estruturas, comportamentalmente relacionado à discriminação de objetos (Stark & Stark 2017). Além disso, uma redução de conectividade dentro do circuito EC/DG/CA3 em humanos compromete primordialmente funções de discriminação de objetos, gerando hipoatividade de córtex entorrinal anterolateral e hiperatividade de regiões do GD e CA3 (Reagh et al., 2018). Camundongos com DG silenciado por meio de optogenética tiveram prejuízo em uma tarefa de discriminação espacial (van Dijk & Fenton, 2018).

Os déficits de memória e discriminação 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. Além disso, sugere-se que a LEC contribui para a hiperatividade observada em CA3 de animais idosos com déficits de discriminação de objeto (Maurer et al., 2017). Johnson *et al.*, 2019, encontrou que a infusão de muscimol promove uma hiperatividade na atividade do GD/CA3, e que essa alteração está associada a prejuízos em tarefas de discriminação nas quais os objetos iscas são novos, mas não quando esses objetos são familiares. Portanto, o GD/CA3 parece desempenhar uma função temporária para a discriminação de estímulos sobrepostos, podendo essa função ser atribuída a outros sistemas corticais, à medida que os objetos se tornam familiares.

O córtex perirrinal ocupa uma posição central na via “o quê”, pois transmite informações de alta resolução dos objetos 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 (Olarte-Sánchez, Amim, Warburton, Aggleton, 2015; Cohen & Stackman, 2015). As lesões perirrinais 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 a atividade neuronal peririnal 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 anteriormente realizados revelaram repetidamente duas vias entorrinais distintas. A discriminação do novo a partir de objetos familiares envolve preferencialmente projeções entorrinais ao GD / CA3, através da via perfurante (Kinnavane et al., 2016). Em contraste, objetos familiares envolvem preferencialmente as projeções entorrinais 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).

Estudos têm demonstrado que, apesar do giro denteado e CA3 apresentarem-se ligados a discriminações espaciais, também foi observada uma relação entre atividade CA3/Giro denteado e desempenho em uma tarefa para objetos (Johnson et al., 2017). Tem-se apontado o papel do GD em vincular informações espaciais derivadas de informações não-espaciais, tais como objetos externos e eventos, no processo de codificação da memória episódica. Portanto, é provável que o GD desempenhe um papel mais geral na codificação da memória episódica do que meramente formar um contexto espacial distinto para cada ambiente (Kim et al., 2015). Estudos de neuroimagem funcional sugerem que as sub-regiões do hipocampo DG e CA3 humanos 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 uma caixa 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 de um objeto visual (Hunsaker, Mooy, Swift & Kesner, 2007). Ratos lesionados em dCA3 exibiram prejuízo em uma função de completamento de padrão para pistas de objeto (Kesner et al., 2015). Além de essa ser uma rede extremamente conectada entre as subáreas do hipocampo, diversos estudos têm demonstrado uma densa interconectividade ao longo do eixo anteroposterior do hipocampo, trazendo implicações funcionais distintas para essas subáreas dorsais e caudais (Houser, et al., 2021; Botterill et al., 2021).

1.4.2 Bases moleculares para a separação de padrões de objetos.

O gene *c-Fos* codifica uma proteína nuclear chamada Fos (embora sua ativação seja alterada pela adição de um grupo fosfato mediado por cinases). Os membros da família c-Fos dimerizam com a proteína c-Jun para formar o fator de transcrição AP-1, que ativa a transcrição de uma gama de genes numerosos e diversos que estão relacionados à diferenciação e proliferação celular, aprendizagem, controle motor e cognição (Othmane, 2016). Uma das principais desvantagens no uso do c-Fos trata-se de que tanto o gene quanto a proteína podem ser ativados por um elevado número de vias de sinalização, sua expressão não fornece informações específicas sobre uma determinada via (Othmane, 2016).

Portanto, a expressão dos genes de expressão imediata (*immediate expression gene* - IEG) reflete o processamento de informações no hipocampo durante o comportamento, o que pode ser relevante ou irrelevante para a tarefa (Guzowski 2002). Os estudos de imagem de IEG podem identificar estruturas candidatas associadas a um comportamento, mas intervenções locais, como a interrupção específica da região da expressão de IEG, são necessárias para confirmar um papel necessário para essas estruturas (Kubik, Miyashita & Guzowski, 2007). Nesta linha, um estudo recente demonstrou a importância do c-Fos na seleção de neurônios de um engrama, estando seu

aumento diretamente vinculado ao aumento anterior e posterior de CREB (Miyashita, 2018).

Apesar das limitações da técnica, devido à praticidade e custo, o c-Fos é um gene amplamente utilizado e associado com a memória. Diversos estudos têm relatado o aumento da sua expressão em tarefas espaciais e de reconhecimento (Barbosa & Silva, 2018, Aggleton et al. 2012, Barbosa et al., 2013). A memória de reconhecimento de objeto está associada a aumentos de c-Fos no córtex perirrinal. Quando os ratos exploram novos objetos, o caminho do córtex perirrinal ao córtex entorrinal lateral e, em seguida, ao giro denteado e CA3 é ativado (Kinnavane et al., 2015).

Em um estudo realizado por Mendez, Arias & Arias (2015), os animais apresentaram mais núcleos c-Fos positivos nas regiões CA1 e CA3 quando estavam em uma tarefa espacial do que não espacial, enquanto no córtex perirrinal, os animais apresentaram mais núcleos c-Fos positivos quando estavam em uma tarefa não espacial do que espacial. Um papel para c-Fos em processos de consolidação subjacentes à memória de reconhecimento de longo prazo para objetos foi estabelecido, além disso, interferir em sua expressão no perirrinal prejudica a memória de reconhecimento (Seoane, Tinsley & Brown, 2012). Tem também sido encontradas diferenças na expressão de Arc nas diferentes camadas do LEC e córtex Perirrinal, como também ao longo do eixo horizontal do CA3 em roedores, durante uma tarefa que avalia a habilidade de lembrar objetos com diferentes níveis de similaridade, e qual deles está ligado à recompensa (Moer et al., 2017; Burke et al., 2012).

Um outro estudo encontrou que, após lesionar o perirrinal, a sensibilidade comportamental à novidade era preservada, porém havia prejuízo na capacidade espontânea de reconhecer objetos novos de familiares. Em um estudo em que o perirrinal foi lesionado, os padrões distintos de atividade c-Fos do hipocampo estavam presentes para novos estímulos, além disso, foi relatada uma maior expressão de c-Fos em camadas entorrinais (II e III) durante reconhecimento de novidade (Kinnavane et al., 2016).

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 a padronização de uma tarefa de reconhecimento e discriminação de objetos em diferentes graus de similaridade com múltiplas tentativas, como um meio que possibilita uma coleta recorrente de dados comportamentais, juntamente com outras medidas como o registro eletrofisiológico e investigações moleculares da separação de padrões de objetos (Roloff, Muller & Brown, 2016).

2. JUSTIFICATIVA

Poucas tarefas buscaram investigar o reconhecimento de objetos com a possibilidade de vários testes por dia, portanto, estabelecer um protocolo que realize o teste de reconhecimento de objetos utilizando-se de múltiplas tentativas é fundamental (Roloff, Muller & Brown, 2016). A elaboração de um protocolo de múltiplas tentativas permite a investigação da memória por meio de vários ensaios contínuos, os quais permitem a aquisição de uma grande quantidade de dados de forma mais rápida. Uma vez que existe uma limitação de amostras coletadas em condições de exploração espontânea de objetos, torna-se importante uma tarefa que permita a coleta recorrente de sinais neurais à medida que o animal executa repetidas vezes a mesma tarefa. Assim, esses sinais podem ser promediados, aumentando a relação sinal/ruído, a confiabilidade e diminuindo a variabilidade dos dados eletrofisiológicos. Além disso, uma tarefa de múltiplas tentativas pode aumentar a relação sinal/ruído em estudos com expressão de genes imediatos (Albasser, Poirier & Aggleton, 2010). Uma maior quantidade de tentativas pode aumentar o poder estatístico do teste (Ameen-Ali *et al.*, 2015; Araujo *et al.*, 2025). Além disso, o uso de múltiplas tentativas pode ajudar a produzir um sinal detectável por imagens de IEG, produzindo uma expressão mensurável de c-Fos ao mesmo tempo em que gera medidas comportamentais claras de discriminação de novidade (Albasser *et al.*, 2010).

Destaca-se que a tarefa aqui proposta 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 não acontece em outras tarefas de NOR com múltiplas tentativas (Ameen-Ali *et al.*, 2012; Albasser *et al.*, 2010). O aparato da tarefa consiste em um campo aberto, o qual permite uma exploração livre do animal, outras tarefas utilizam câmaras de retenção ou áreas espaciais restritas. Outra vantagem deste protocolo é o tipo de reforço utilizado. Quando comparado com recompensas alimentares que geram ruído,

o uso da restrição hídrica permite manter o animal motivado, sem gerar ruídos durante a tarefa.

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. As sub-regiões do giro denteado (DG), CA3 e perirrinal 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 déficits, mudanças nas entradas corticais para o hipocampo podem contribuir para um declínio da memória episódica como consequência de alterações nas entradas inibitórias, diminuindo assim a capacidade de manter ricos detalhes de cada evento, necessários para uma memória íntegra (Toner et al., 2009; Johnson et al., 2017; Maurer et al., 2017). É necessário entender como as subáreas ao longo do eixo anteroposterior do hipocampo contribuem para o processo de separação de padrões, mais especificamente como o giro denteado e CA3 dorsal e ventral interagem para a formação e evocação de novas memórias. Isso ainda é algo desconhecido, porém, dada a sua ampla interconectividade, faz-se necessário a compreensão de como essas conexões contribuem para a memória de reconhecimento e separação de padrões (Moer et al., 2017).

Alterações na cascata molecular também podem estar envolvidas nesses déficits, além disso, estudos têm demonstrado a importância de genes imediatos e proteínas como o c-Fos que são expressas durante a decodificação e consolidação da memória de reconhecimento e separação de padrões (Albasser et al., 2013, Bekinschtein et al., 2014). Apesar das diversas tarefas de reconhecimento de objetos, pensando-se em todas essas considerações e necessidade de avaliação da memória de reconhecimento, realizando-se mais de um teste por dia, estabelecer um protocolo que contorne todos esses aspectos é fundamental. Faz-se necessário o uso de tarefas como uma possibilidade de coleta de um maior volume de dados no registro eletrofisiológico em uma tarefa de reconhecimento com múltiplas tentativas, 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 a suas 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 pistas distais ou proximais (Byun & Lee, 2010; Brown & Banks, 2015). Podendo-se investigar assim de que forma as regiões hipocampais e parahipocampais podem ser recrutadas na separação de padrões para objetos. Faz-se relevante propor aqui a investigação dos mecanismos moleculares envolvidos em tarefas de reconhecimento e discriminação de objetos com diferentes graus de similaridade. No contexto de uma tarefa em que a memória é medida em várias tentativas, usar itens com altos níveis de similaridade pode aumentar a demanda de memória quando comparada a uma tarefa de reconhecimento com estímulos consideravelmente diferentes, porém não se sabe como os circuitos hipocampal e parahipocampal são engajados nesta demanda.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

- Padronizar uma tarefa de reconhecimento de objetos com diferentes níveis de similaridade, utilizando-se de múltiplas tentativas e investigar a expressão de c-Fos em regiões do córtex parahipocampal (PRH e LEC), e nas subregiões do hipocampo ao longo do eixo anteroposterior considerando diferentes camadas do DG e diferentes porções do eixo horizontal do CA3.

3.2 Específico

- Avaliar o comportamento dos animais em uma tarefa de reconhecimento de objetos com diferentes níveis de similaridade, utilizando-se de múltiplas tentativas
- Medir a expressão de c-Fos no hipocampo rostral, medial, caudal e ventral. Considerando as áreas do Subículo, CA1, CA2, CA3a, CA3b, CA3c e camadas granular e hilos, após a realização de uma tarefa de reconhecimento de objetos com diferentes níveis de similaridade, utilizando-se de múltiplas tentativas
- Medir a expressão de c-Fos no córtex parahipocampal considerando as subáreas PRH-36-Superficial (PRH-36S), PRH-36-Profundo (PRH-36P), PRH-35-Superficial (PRH-35S), PRH-35-Profundo (PRH-35P), LEC superficial (LECS) e LEC profundo (LECP) na tarefa de reconhecimento de objetos com diferentes níveis de similaridade, utilizando-se de múltiplas tentativas
- Identificar as áreas hubs da rede do circuito hipocampal e parahipocampal, por meio de análise de grafos, para a tarefa de reconhecimento de objetos com diferentes níveis de similaridade, utilizando-se de múltiplas tentativas.
- Caracterizar a eficiência de rede do circuito hipocampal e parahipocampal, por meio de análise de grafos, para a tarefa de reconhecimento de objetos com diferentes níveis de similaridade, utilizando-se de múltiplas tentativas.

4. MATERIAL E MÉTODO

4.1 Animais

Foram utilizados 66 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. Os animais foram submetidos a privação hídrica por 23h antes da realização do experimento a fim de aumentar a motivação do animal e seu drive exploratório (Polo-Castillo *et al.*, 2018). Estes foram alojados em gaiolas individuais de polietileno (30 cm de comprimento x 20 cm de largura x 19 cm de altura).

O “n” experimental foi pensado com base em estudos anteriores de memória avaliada por meio de objetos, a exemplo dos trabalhos de Ennaceur e Delacour (1988), Hannesson, Howland e Phillips (2004), Dere, Houston & De Souza Silva (2005a, b), Dere, Kartteke, Huston, De Souza Silva (2006) e Robbins, Ryan, Marriott e Doucette (2013), que utilizaram no mínimo 10 animais por condição experimental. Estudos como o de Masuoka, Fujii e Kamei (2006), que teve como parte do método a neurocirurgia, utilizaram uma amostra de 10 animais. A análise estatística principal é o cálculo do tamanho da amostra, considerando o tamanho do efeito igual a 1.2, $\alpha = 0.05$ e um poder (power) de 0,95, de acordo com o Programa G*Power 3.1.9.2, o tamanho da amostra é 12. Portanto, o número de animais por etapa deveria ser: (E1) Padronização da tarefa (12 animais); (E2) Grupo para imunofluorescência (40 animais), sendo 8 para o grupo controle 1 (NOR) (Tarefa de reconhecimento de objeto), 8 para o Discriminação todos os níveis (DIST) (Tarefa de discriminação fazendo-se todos os níveis de similaridade simultaneamente) e 8 para cada nível de similaridade 25%, 50% e 75%, (G25%, G50%, G75%).

Para o teste piloto demonstrou-se que 6 animais foram suficientes para apresentar dados significativos. Após testes comportamentais rodados com 60 animais, para o grupo de imunofluorescência (E2), só foram incluídos os animais com D2 acima do acaso, ou seja, aqueles animais que tiveram índice de discriminação maior que 0. Portanto foram excluídos dessas análises 24 animais, restando 36 animais para análises comportamentais (NOR=8, DIST=8, 25%=7, 50%=7 e 75%=6). Ao final da imunofluorescência foram excluídos 2 animais do grupo NOR, 1 animal do grupo DIST e 1 animal do grupo 25% devido a degradação no tecido.

Todos os animais foram fornecidos pelo Biotério Prof. Eduardo Barbosa Beserra da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB). Todos os protocolos estão de acordo com as diretrizes da legislação brasileira para a utilização de animais em pesquisa (Lei Arouca, nº 11.794/08), visando sobretudo reduzir ao mínimo possível o estresse, dor e desconforto dos animais (CEUA número de protocolo: 5276130921).

4.2 Aparato experimental

O aparato experimental consistiu em um campo aberto com 90 cm de diâmetro, paredes com 45 cm de altura, com uma caixa preta opaca acoplada a sua lateral interna (30 cm de comprimento x 15 cm de largura x 40 cm de altura), com uma porta ligando a caixa a área aberta do campo. A porta foi acionada de forma manual de uma sala externa ao experimento. O campo foi dividido com uma parede acrílica envolta com cobertura preta afim de reduzir pistas distais ou proximais, como apresentado na Figura 4. A luminosidade média durante a realização dos procedimentos foi de entre 7 e 11 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%.

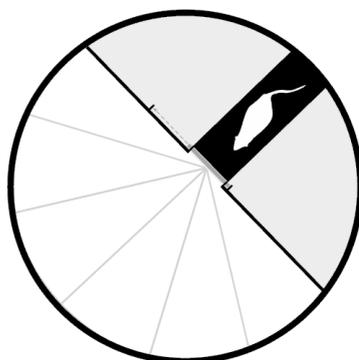


Figura 4. Campo aberto circular utilizado nos experimentos de múltiplas tentativas.

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 visuais 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 "pips", onde um pip é a unidade do bloco LEGO® correspondente a um único quadrado 3D. A quantidade total de "pip" de um objeto era somada, nos dando o valor total de pips de um objeto, em seguida era feito um cálculo para descobrir a quantos "pip" correspondia 25%, 50% ou 75%, desse valor total, logo era construído um novo objeto controlando a quantidade de sobreposição dos "pips" considerando o valor da porcentagem. 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 figura 5 e anexo A.

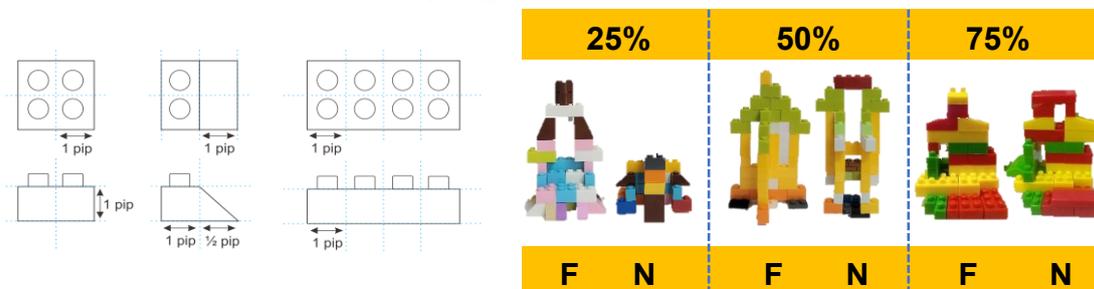


Figura 5. Ilustração da medida “pip”. Objetos utilizados na tarefa de discriminação. A primeira dupla de objetos da esquerda para a direita apresenta 25% de similaridade, seguido a dupla de objetos com 50% de similaridade e a dupla de objetos com 75% de similaridade. F corresponde ao objeto familiar apresentado na amostra com 2 cópias. N corresponde ao objeto novo apresentado na fase do teste junto com uma cópia do familiar.

4.4 Procedimentos Comportamentais

Os animais passaram por procedimentos de manipulação, habituação e modelagem (habituação junto com a 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. Tanto as fases de habituação quanto as fases 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 Delineamento experimental para cada grupo.

5.4.1.1 Grupo padronização da tarefa (E1)

Para a realização dos pilotos os animais foram divididos em grupos A (n=3) e B (n=3), para aplicação da tarefa ao longo dos dias. Ocorreram duas baterias de 6 tentativas para cada tarefa, totalizando 12 tentativas. Com intuito de reduzir a força do traço da memória para o protocolo, bem como evitar a fadiga, foi utilizado um intervalo de 48 horas entre as baterias e as duas tarefas, veja sessões 4.4.3. e 4.4.4 para detalhamento das tarefas. O uso deste intervalo também está baseado no estudo de Mitchell e Laiacona (1998), onde os autores indicaram que os animais não são capazes de discriminar temporalmente os objetos apresentados com intervalos iguais ou superiores a 48 horas. Embora a tarefa de discriminação tenha incluído 12 tentativas no total, cada nível de similaridade contou com apenas 4 tentativas. Isso ocorre porque as 12 tentativas foram divididas igualmente entre os três níveis de similaridade, resultando em 4 tentativas para cada nível. A figura 6 ilustra como os procedimentos comportamentais foram distribuídos em dias, veja figura 8 e 9 para mais detalhes.



Figura 6. Ilustração dos procedimentos comportamentais e seus respectivos dias, para o grupo comportamento

4.4.1.2 Grupo Imunofluorescência (E2)

Para o grupo de imunofluorescência o grupo controle 1 (NOR) realizou 1 bateria de 4 tentativas para a tarefa NOR. O grupo discriminação todos os níveis (DIST) realizou a tarefa de discriminação seguindo o protocolo semelhante ao comportamento do piloto, com 1 bateria de 4 tentativas (ver sessão 5.4.4, figura 7). Este grupo se encontrava com diferentes níveis de similaridade (25%, 50% e 75%) a cada tentativa. Já o grupo 3 teve subgrupos que passaram por um protocolo separado para cada nível de similaridade 25%,

50% e 75% (G25%, G50% e G75%), cada um deles passou por uma bateria de 4 tentativas, vê sessão 4.4.5, figura 10 para maiores detalhes. A figura 7 ilustra como os procedimentos comportamentais foram distribuídos em dias.

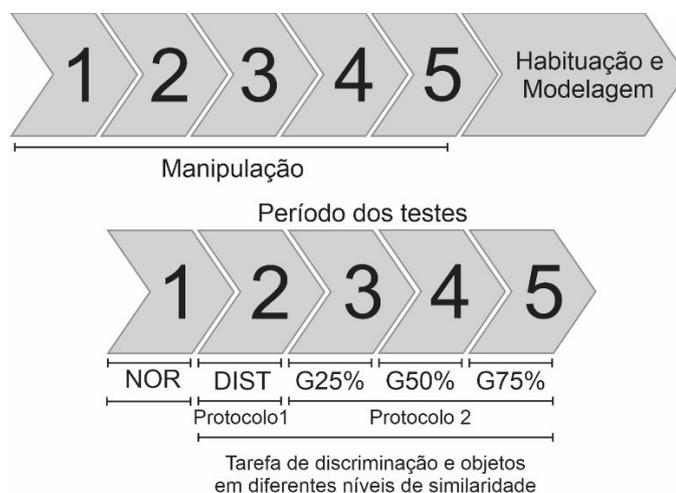


Figura 7. Ilustração dos procedimentos comportamentais e seus respectivos dias para o grupo de imunoflorescência

4.4.2 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.

A restrição hídrica era sempre feita 23h antes da modelagem ou tarefa comportamental. Para iniciar o processo de modelagem 12 gotas de água (colocadas com uma seringa se insulina ~ 0,05 ml) eram espalhadas pela área de modo a incentivar a saída do animal da caixa e exploração do meio do campo e futuros locais onde objetos seriam inseridos. O animal era colocado na caixa central, após 1 minuto a porta era aberta e esperava-se o rato sair da caixa, após ele sair a porta era fechada. Na primeira exposição do animal a arena deixava-se que o animal explorasse livremente a área por um período de 5 min ou até que o animal tomasse todas as recompensas. Após isso a caixa era aberta e uma recompensa era colocada no fundo do compartimento central para incentivar o seu retorno, sendo fechada a porta assim que o animal entrasse.

Caso o animal tivesse tomado todas as gotas de água, eram espalhadas 9 gotas de água. Somente se reduzia a quantidade de gotas se o rato tomasse todas as recompensas

disponíveis na exposição anterior. Esperava-se 3 min e novamente o animal era exposto a arena com gotas espalhadas estrategicamente para motivar a saída da caixa e a exploração das regiões centrais do campo, onde futuramente objetos serão inseridos. Nesta segunda exposição, após 3 min ou após o rato tomar todas as recompensas, a porta da caixa era aberta e o animal poderia retornar para a caixa central (sempre contendo uma recompensa no final da caixa), onde o rato sempre permanece por 3min.

A quantidade de recompensas (gotas de água) espalhadas pelo campo era gradativa e sistematicamente reduzida nas exposições subsequentes para: 6, 4 e 2. Mantendo-se sempre as recompensas centrais. Sempre duas recompensas devem ser posicionadas a frente das futuras posições dos 2 objetos, de modo que sempre que o objeto aparecer haja uma gota de água a frente dele. Portanto quanto apenas 2 recompensas estiverem disponíveis no campo, serão especificamente as recompensas alocadas de frente aos objetos.

A última etapa da modelagem consistia na apresentação de objetos. Para ser exposto a objetos era necessário que o animal estivesse na fase de ser exposto a apenas 4 recompensas. Quando apenas 4 recompensas estavam disponíveis no campo, foram adicionados dois objetos idênticos, afim de reduzir a neofobia e fazer com que o animal entendesse que sempre haveria um objeto e recompensas próximas a ele. O animal passava por essa exposição durante 3 min e novamente retornava para a caixa. Após um intervalo de 3 min o animal se encontrava agora com um objeto idêntico ao anterior e um novo objeto, também contendo, o qual ele também era exposto por 3 min. Por fim o animal era exposto a duas recompensas posicionadas a frente de uma nova dupla de objetos que ele podia explorar durante 3 min, retornava a caixa central por 3 min (com recompensa). Em seguida o animal era exposto a uma cópia do objeto e um novo objeto com 2 recompensas a frente deles, durante 3 min. O animal era considerado modelado quando ele realizava essa última etapa da modelagem (apresentação de objetos) em até 20min. Além disso outro critério usado é a latência de saída e entrada na caixa nessa etapa, não devendo demorar mais que 10s. Devendo sempre sair, entrar e sair da caixa em um intervalo de ~6 minutos.

Após essas etapas, os ratos estarão aptos para a realização da tarefa de reconhecimento de objeto e discriminação de objetos em diferentes níveis de similaridade.

4.4.3 Padronização da Tarefa de reconhecimento de objetos.

A tarefa de reconhecimento de objetos foi composta por duas fases, sendo uma amostra e um teste, com duração de 3 minutos cada e intervalos de três minutos entre as tentativas. Foram realizadas 12 ou 6 tentativas de exploração (a depender do grupo), com cinco minutos de intervalo entre cada sessão, divididas em dois dias (6 tentativas/dia). Com o animal posicionado na caixa central, a porta da caixa era aberta, o rato saía e a porta era fechada, assim dava-se início a fase de amostra. Na amostra o animal foi exposto a dois objetos LEGOS idênticos, em posições específicas durante 3 minutos. Após esse intervalo a porta da caixa se abria e o animal retornava para a caixa, a porta era fechada e o rato aguardava por um intervalo de 3 min. A porta da caixa novamente se abria e dava-se início ao momento do teste. No teste eram apresentadas uma cópia idêntica do objeto 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 8. A posição e formas dos objetos LEGOS foram contrabalanceados para os animais nesta e na tarefa subsequente.

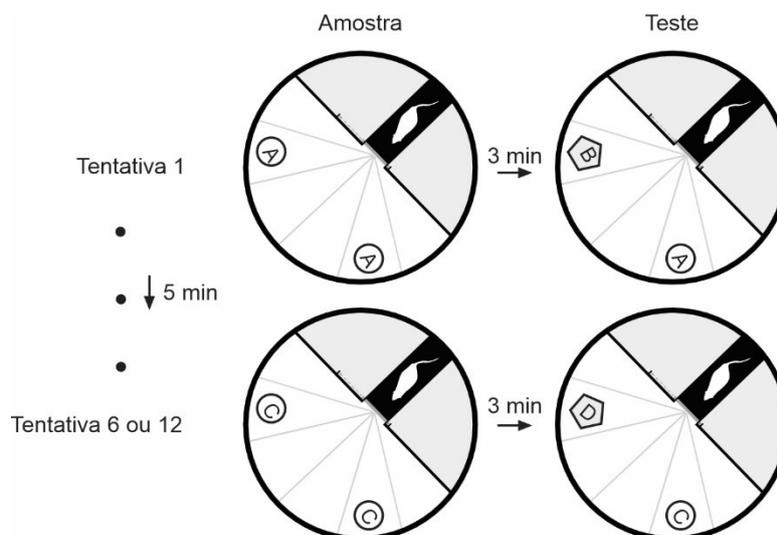


Figura 8. Modelo do desenho experimental de múltiplas tentativas para a tarefa NOR. B e D representam os objetos novos e suas respectivas posições no aparato.

4.4.4 Padronização da tarefa de discriminação de objetos em diferentes níveis de similaridade.

A tarefa de discriminação de objetos em diferentes níveis de similaridade foi composta por 2 fases, sendo 1 de amostra e 1 de teste, com duração de 3 minutos cada e intervalo de 3 minutos entre elas. Foram realizadas 12 tentativas de exploração, com cinco minutos de intervalo entre elas, divididas em dois dias (6 tentativas/ dia).

Com o animal posicionado na caixa central, a porta da caixa era aberta, o rato saía e a porta era fechada, assim dava-se início a fase de amostra. Na fase de amostra o animal foi exposto a dois objetos LEGOS idênticos, em posições específicas, durante 3 min. Após esse intervalo a porta da caixa se abria e o animal retornava para a caixa, a porta era fechada e o rato aguardava por um intervalo de 3 min. A porta da caixa novamente se abria e dava-se início ao momento do teste. Na fase de teste um dos objetos apresentados na amostra foi substituído por um objeto novo com um grau de similaridade específico 25%, 50% ou 75%. O grau de similaridade foi trocado em cada teste e aleatorizado ao longo das tentativas. 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 9.

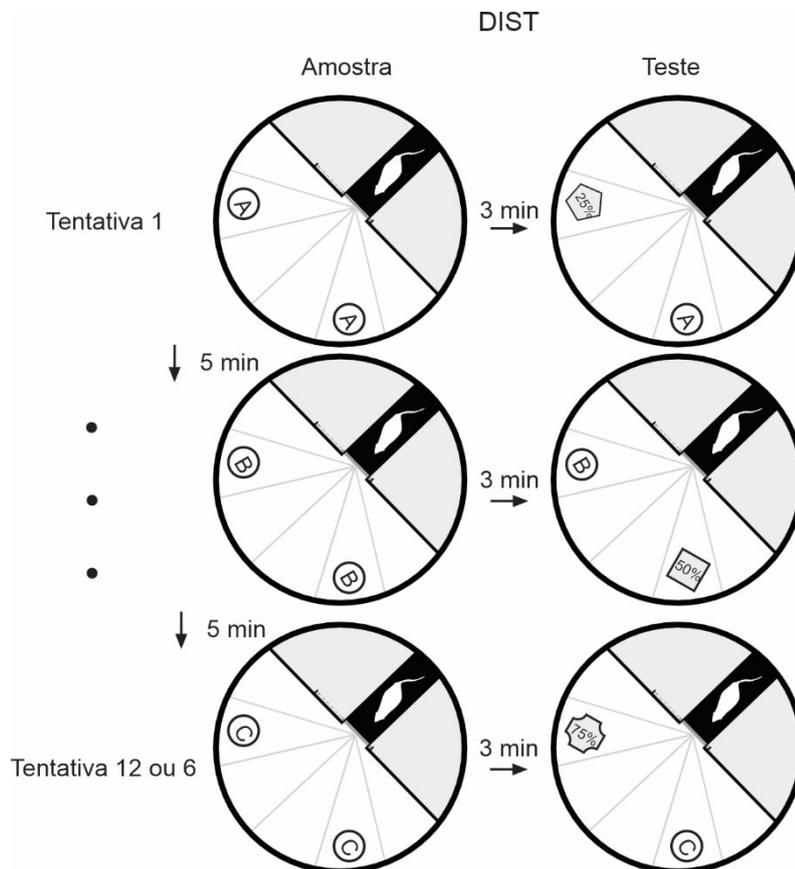


Figura 9. Modelo do desenho experimental de múltiplas tentativas para o grupo que realiza todos os níveis de similaridade simultaneamente (DIST). 25%, 50% e 75% representam os objetos novos e suas respectivas posições no aparato. % representa o grau de similaridade.

4.4.5 Padronização da tarefa de discriminação de objetos em diferentes níveis de similaridade protocolo para imunofluorescência.

A tarefa de discriminação de objetos em diferentes níveis de similaridade foi composta por 2 fases, sendo 1 de amostra e 1 de teste, com duração de 5 minutos cada e intervalo de 3 minutos entre elas. Foram realizadas 4 tentativas de exploração, com cinco minutos de intervalo entre elas, divididas por nível de similaridade em 3 dias (4 tentativas/dia).

Com o animal posicionado na caixa central, a porta da caixa era aberta, o rato saía e a porta era fechada, assim dava-se início a fase de amostra. Na fase de amostra o animal foi exposto a dois objetos LEGOS idênticos, em posições específicas, durante 3 min. Após esse intervalo a porta da caixa se abria e o animal retornava para a caixa, a porta era fechada e o rato aguardava por um intervalo de 3 min. A porta da caixa novamente se abria e dava-se início ao momento do teste. Na fase de teste um dos objetos apresentados na amostra foi substituído por um objeto novo com um grau de similaridade específico 25%, 50% ou 75%, a depender do subgrupo que o animal está. Os animais de cada subgrupo sempre se encontravam com o mesmo nível de similaridade ao longo dos testes e tentativas. A posição, formas dos objetos LEGO's, lugar foram contrabalanceados para os animais, veja figura 10

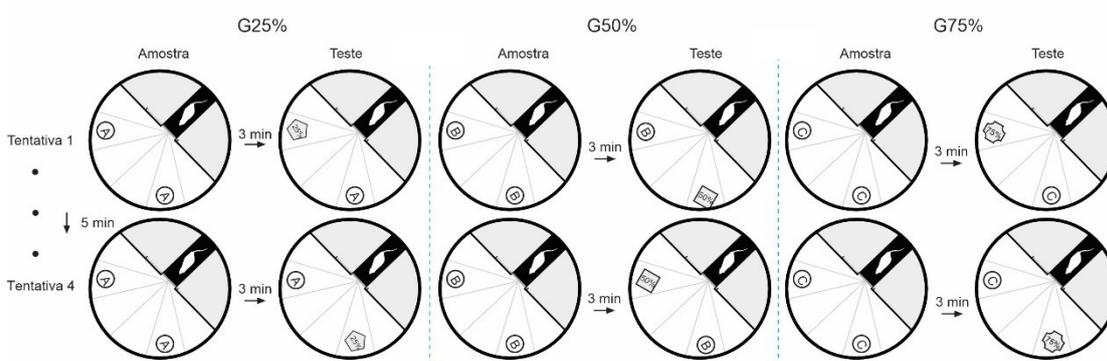


Figura 10. Modelo do desenho experimental para uso em grupos de imunofluorescência com múltiplas tentativas para cada grupo com diferentes níveis de similaridade (G25%, G50%, G75%). 25%, 50% e 75% representam os objetos novos e suas respectivas posições no aparato. % representa o grau de similaridade.

4.4.6 Processamento imunofluorescência.

Séries diferentes foram submetidas à análise imunofluorescência, de dupla marcação. Nesta análise, anticorpos específicos foram usados para identificar a expressão

do gene imediato C-fos e tipo celular de neurônios PV+. As secções de um compartimento de cada vez foram lavadas (4 vezes de 5 minutos) com tampão fosfato (PB) 0,1 M, pH 7,4, sob agitação automática. Em seguidas os cortes foram colocados em solução de bloqueio (leite molíco ® a 5%) por 1h. Os cortes foram colocados em contato com os dois anticorpos específicos primários (C-fos Rabbit e PV goat) diluído em PB contendo Triton-X 100 a 0,3% e durante 18h (25°C). Em seguida, as secções foram colocadas em contato com os anticorpo secundários fluorescentes de forma separada, sendo inserido primeiro o anticorpo secundário alexa 594 anti-goat donkey Abcam (para PV) diluído em Triton-X 100 a 0,3%, por 90 minutos. Em seguida foi incubado o secundário alexa 488 anti rabbit donkey Abcam (para C-fos).

4.4.7 Captação de dados.

Os cortes foram inseridos em tampão fosfato (PB) 0,1 M, pH 7,4, contendo uma concentração de 2% de DAPI. Em seguida foram montados em lâmina gelatinizadas utilizando-se o meio de montagem Fluoroshield da Sigma. A avaliação dos resultados imunofluorescentes foi feita com o auxílio de um microscópio. Para visualizar os marcadores, foi aplicado o laser com comprimento de onda de 358 (DAPI), 488 (c-Fos), 594 nm (PV). As localizações das áreas foram determinadas usando o atlas de Paxinos e Watson (2013) (Barbosa et al., 2013)

5.4.7.1 Delimitação e Medição morfométrica e neuroquímica

Para cada rato, 2 ou 3 cortes de: hipocampo (rostral, medial, caudal) e córtex foram tirados contendo cada subregião de interesse. Foram consideradas para as análises subregiões dorsais em diferentes níveis anteroposteriores (Rostral, medial e caudal) e ventrais (ventral) do hipocampo (ver tabela 1). Todas as imagens do hipocampo foram retiradas considerando as seguintes coordenadas posteriores ao bregma: hipocampo rostral (-3,72 e -3,96 mm); Hipocampo medial (-4,36 e -4,56); Hipocampo caudal (-5,64 e -5,88). Todos os cortes de córtex.

Tabela 1. Regiões do hipocampo e córtex e subregiões de interesse para medição morfométrica e neuroquímica.

Regiões do hipocampo Dorsais			Região do hipocampo ventral	Córtex
Rostral	Medial	Caudal	Ventral	
CA1 (CA1R)	CA1 (CA1M)	CA1 (CA1C)	CA1 (CA1V)	Perihinal 36 superficial (PRH-36S)

CA2 (CA2R)	CA2 (CA2M)	CA3 (CA3C)	CA3 (CA3V)	Perihinal 36 profunda (PRH-36P)
CA3a (CA3aR)	CA3a (CA3aM)	Hilos (Hilos C)	Hilos (Hilos V)	Perihinal 35 superficial (PRH-35S)
CA3b (CA3bR)	CA3b (CA3bM)	Granular (GranC)	Granular (GranV)	Perihinal 35 profunda (PRH-35P)
CA3c (CA3cR)	CA3c (CA3cM)			LEC superficial (LECS)
Hilos (HilosR)	Hilos (HilosM)			LEC profundo (LECP)
Granular (GranR)	Granular (GranM)			

Para delimitação das áreas tomou-se como base além do Paxinos (2013), diversos trabalhos que tem demonstrado diferenças funcionais ao longo do eixo anteroposterior do hipocampo e dorsoventrais. Aqui levou-se em consideração as diferenças funcionais apontadas por estudos envolvendo CA3a, CA3b e CA3c (Lee et al., 2023). Além disso, também foi considerada a subdivisão das camadas do DG (granular e hilos) (Houser et al 2021). Também foi feita uma avaliação de forma distinta das regiões dorso ventrais do hipocampo caudal, uma vez que diferentes estudos têm apontado as especificações funcionais e de projeções dessas regiões, dividindo-se portanto em regiões caudais (CA1C, CA3C, HilosC e GraC) e ventrais (CA1V, CA3V HilosV e GranV) (Houser et al 2021; Malhotra, Cross & van der Meer, 2012; López-Oropeza, Duran & Martínez-Canabal, 2022; Ding et al., 2019; Van Strien, Cappaert, & Witter, 2009; Fanselow & Dong, 2009). Por fim, uma subdivisão foi feita considerando-se a especialização de diferentes porções do Perihinal (PRH 36 e PRH35), como também as diferentes camadas do córtex Perirrinal (PRH) e córtex Entorrinal Lateral (LEC) e sua conectividade especializada de entrada (camadas II e III) e saída (IV a VI) do hipocampo, aqui denominadas respectivamente camadas superficial (S) e profundas (P), para cada Região: PRH-36S, (veja figura 11 para melhor entendimento). (Sugar, Witter, van Strien, & Cappaert, 2011; Sethumadhavan, Strauch, Hoang, Manahan-Vaughan, 2022; Van Strien, Cappaert, & Witter, 2009)

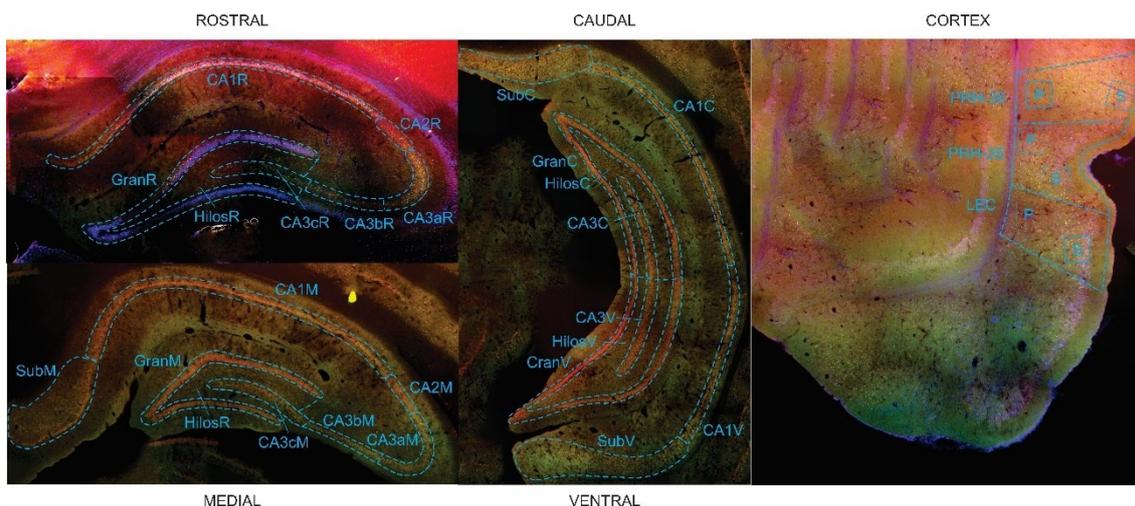


Figura 11. Delimitação das subregiões do hipocampo anteroposterior, córtex e subregiões de interesse para medição morfométrica e neuroquímica.

Usando os programas Image J (versão 1.46i, NIH) e Icy® foram feitas contagens de células das áreas do PRH, LEC (Relacionadas a decodificação de objetos e separação de padrões) hipocampo anteroposterior- rostral medial, caudal e ventral -(relacionada ao processamento de memória) e a contagem de neurônios positivos para c-Fos, marcadores de memória e plasticidade neural (Miranda et al, 2017; Miranda et al, 2019, Miranda et al, 2020; Barbosa et al., 2013). Eram consideradas células positivas para c-Fos aquelas que obtivessem tamanhos próximos ao do núcleo do neurônio, maior fluorescência para a cor verde e duplamente marcadas com o marcador nuclear DAPI. A contagem de neurônios c-Fos+ ocorreu também de forma manual mediante amostragem por conglomerados, na qual foi selecionada aleatoriamente uma subpopulação representativa para as regiões do córtex: PRH-36S, PRH-36P, PRH-35-S, PRH-35-P, LECS E LECP). Após medição dos dados, foi realizada a normalização da quantidade de expressão c-Fos a partir da seguinte fórmula= (valor individual/ média de todos os grupos) *100.

4.5 Análise de grafos

Redes cerebrais foram construídas usando correlações de Spearman significativas positivas e negativas ($p \leq 0,05$) em cada grupo experimental e controles, caracterizado quantitativamente com medidas teóricas de grafos, sendo o total de 5 áreas e 25 correlações. Para isso foi utilizado o software R studio, com o pacote “corrplot”. Comparações entre as matrizes gerada foram feitas utilizando-se a transformação de Z score de fisher (pacote “DescTools”) (Fisher, 1925). Cada área cerebral foi representada por um nó com um determinado tamanho, denominado grau, que reflete o número de

regiões cerebrais coativadas com esse nó. Todas as correlações significativas de c-Fos entre duas áreas do cérebro são representadas por conexões entre nós, e a espessura da conexão é proporcional à força da correlação.

Para análises de grafo foi utilizado o R studio, com o pacote *igraph*, com rotinas construídas pelo próprio laboratório- Laboratório de Estudos em Memória e Cognição (LEMCOG). Um dos principais objetivos da teoria dos grafos é identificar nós centrais, revelando assim o seu papel crítico nos fluxos de informação dentro de uma rede. Para isso, foram calculadas três medidas de centralidade para cada nó: o grau, a força e a centralidade de intermediação. A força de um nó corresponde à soma de todas as covariações significativas numa área. Quanto maior for esse valor, mais central foi a área na rede. A centralidade de intermediação refere-se ao número de caminhos mais curtos entre outros nós que um determinado nó cruza. No presente estudo, esta métrica reflete até que ponto uma região do cérebro atua como intermediária entre outras áreas do cérebro. Embora as métricas de grau e força reflitam a centralidade estática dos nós, a centralidade de intermediação reflete a importância dos nós na comunicação dentro da rede. Para definir que uma área era hub inicialmente foi verificado os valores dos graus, centralidade e força respectivamente, as áreas com maior graus eram definidas como hubs, as áreas que possuíam valores altos de centralidade também foram consideradas hubs. Por fim era verificado se esse valor se encontrava acima do acaso, somente áreas com valores significativos foram consideradas hubs.

Outro objetivo da teoria dos grafos é caracterizar a eficiência de toda a rede. A eficiência da rede é alta quando os nós estão bem conectados, com caminhos curtos entre eles. Por outro lado, redes com conexões mais dispersas e caminhos mais longos tendem a ter menor eficiência, redes mais eficientes podem ser mais rápidas e eficazes na transmissão de sinais neurais (Fornito, Alesky & Bullmore, 2016). Duas medidas foram calculadas para avaliar a eficiência: o coeficiente de agrupamento global e a eficiência global. O coeficiente de agrupamento global mede a segregação da rede com base na probabilidade de dois nós estarem conectados se tiverem um vizinho comum. O coeficiente de eficiência global mede a integração da rede e reflete a velocidade da troca de informações dentro da rede, ou seja, o quão bem as informações podem ser transmitidas entre todos os nós da rede, considerando o caminho mais curto entre eles (Rubinov & Sporns, 2010).

Também utilizamos a média da força de toda a rede para verificar a eficiência da rede. Para que fosse possível a comparação estatística entre os grupos, utilizamos análises de bootstrap clássica. 100 amostragens foram feitas sobre a matriz de correlação original. O modelo aleatório foi calculado embaralhando a linha e a coluna da matriz de correlação mantendo a diagonal principal intacta (de forma que cada estrutura permaneça a mesma no modelo aleatório). Após calcular os modelos aleatórios, testes de bootstrap foram realizados e por fim testes de kruskal wallis (KW) foram direcionados para comparar as redes entre si, caso significativas as diferenças, eram rodados teste de post hoc de Dunn, veja figura 12.

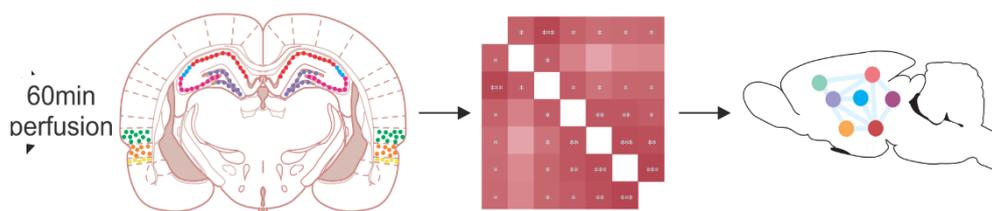


Figura 12. Representação gráfica de passos para realização da análise de grafos.

4.6 Procedimentos em imunofluorescência

4.6.1 Perfusão e microtomia.

Todos os animais do grupo imunofluorescência foram anestesiados por tiopental sódico (40mg/kg, i.p.) associado a cloridrato de lidocaína (4,4mg/kg, i.p.) e eutanasiados através de perfusão transcardíaca 1h a pós a realização de cada teste (NOR, DIST, 25%, 50% e 75%), veja figura 9. Este intervalo foi necessário visando os picos de expressão de Arc, BDNF e c-Fos (Bisler et al., 2002; Ramírez-Amaya et al., 2005). Foi utilizada a impulsão de solução salina a 0,9% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4 com heparina (Liquemine, Lilly, 2 ml/1000ml de solução salina) no intuito de lavar o sistema circulatório do animal prevenindo a formação de coágulos e promovendo uma melhor penetração do fixador nos tecidos. Em seguida foi introduzido solução fixadora (paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4, acrescido de ácido picrico a 0,2% e glutaraldeído a 0,2%) através de uma bomba peristáltica. Os encéfalos foram retirados da cavidade craniana, por fratura dos ossos da calota craniana, posteriormente fixados na mesma solução fixadora, acrescida de sacarose a 30% por 4 horas e então colocados em outra solução de sacarose a 30% em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4 até microtomia. Cada cérebro foi cortado em série no plano coronal em seções de 50 μ m de espessura com um micrótomo criostato (Leica, Alemanha) a uma temperatura de -20° C. As tentativas foram distribuídas sequencialmente em 5 compartimentos, em um meio

líquido contendo tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4. Cada um desses compartimentos terá 1 de 5 secções, de maneira que a distância entre uma secção e a seguinte seja de aproximadamente 150 μ m. Posteriormente, os cortes foram armazenados em uma solução anti-congelante à base de etileno-glicol e tampão fosfato (Barbosa et al., 2013).

4.7 Análise comportamental e estatística

Os dados do piloto comportamental foram analisados com o auxílio do *EthoWatcher* (Touitou, 2013), 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. Os dados comportamentais da imunofluorescência foram analisados utilizando o software de código aberto DeepLabCut, por meio de códigos construídos no google Colab (Nath, et al., 2019). Um conjunto de dados inicial com 200 frames foi utilizado para treinar a rede. Uma rede resnet50 foi treinada para 100 mil interações. Em seguida, os quadros discrepantes foram refinados e integrados ao conjunto de frames iniciais. Por fim, os dados foram inseridos em um pacote de código aberto (Simple Behavioral Analysis, SimBA), a partir do qual foi extraído o tempo que o focinho do animal estava em contato com a região de interesse-ROI (objetos), entradas e saídas da ROI (Nilson, et al. 2020). Foi definido como exploração quando o focinho do animal tocou ou estava a menos de 1 cm do objeto. Não foi considerado exploração quando o animal se apoiou no objeto para explorar o ambiente, ou permanência do focinho próximo ao objeto sem atividade exploratória.

Foi avaliado o engajamento do animal para explorar o objeto novo em comparação do objeto familiar, como forma de indício do reconhecimento para a novidade. Para isso foram avaliados os seguintes parâmetros: tempo total de exploração dos objetos, bem como o índice de discriminação cumulativo (D2) da exploração dos objetos, o qual é aplicado a partir da fórmula do índice de discriminação (D1). D1 é uma medida que demonstra quanto um objeto foi explorado em relação ao outro. O D2 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). O D2 é calculado de forma semelhante ao D1 porém a seu cálculo se dá a partir da soma prévia do tempo de exploração dos objetos ao longo de cada sessão dos teste. Ou seja, para a sessão 1 o D2 é resultado de todo o tempo de exploração para cada objeto presente ali, porém para a sessão 2 o D2 é a soma do tempo de exploração dos objetos presentes na sessão 1 e 2, e assim sucessivamente. O D2 também foi calculado utilizando-se a soma dos minutos dentro do mesmo teste, para todas

as tentativas, ou seja, verificamos dentro das tentativas de forma isolada, como o D2 se apresenta ao longo dos minutos somados, gerando assim um D2 para cada minuto, veja figura 13.

D1	D2	D2	...
Índice de discriminação	Índice de discriminação	Índice de discriminação	
$\frac{N1-F1}{N1+F1}$	$\frac{(N1 + N2) - (F1 + F2)}{(N1+N2) + (F1+ F2)}$	$\frac{(N1 + N2+N3) - (F1 + F2+F3)}{(N1+N2+N3) + (F1+ F2+F4)}$	
Valor entre -1 e 1	Valor entre -1 e 1	Valor entre -1 e 1	
Sessão 1	Sessão 2	Sessão 3	

Figura 13. Demonstração da construção das medidas D1 e D2 para cada sessão. F corresponde ao tempo de exploração do objeto familiar. N corresponde ao tempo de exploração do objeto novo.

Os procedimentos estatísticos foram conduzidos com o programa SPSS (26.0) ou R (pacotes: “dunn.test” e “PMCMRplus”), diferenças foram consideradas estatisticamente significantes com um valor de p menor que 0,05. A normalidade foi verificada através do teste de *Shapiro-Wilk*. Quando os dados eram normais ou não tinham normalidade eram apresentados em gráficos de barra e boxplot respectivamente. Para os parâmetros comportamentais foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de medidas repetidas e independentes seguida de contrastes planejados ortogonais, ou Anova de Friedman. Teste de Kruskal-Wallis para medidas independentes, seguida do teste *post-hoc* de Dunn. Quando a comparação foi feita para duas variáveis do mesmo grupo foi utilizado o teste t de Student pareado. O teste t de uma amostra foi utilizado para os índices de discriminação, com valor de acaso em 0. Também foi calculado o tamanho do efeito (T.E) para cada teste estatístico realizado através do software G*Power 3 ou R (Erdfelder, Faul, Buchner, & Lang, 2009). Para ANOVAS o tamanho do efeito utilizado foi o ômega (ω^2): <0,01 Pequeno efeito, <0,06 médio efeito, >0,14 grande efeito (Cohen, J. 1988). O tamanho do efeito utilizado para comparações diretas foi o g de Hedges (g), este pode ser classificado como: g < 0.2: Pequeno efeito – Indica que a diferença entre os grupos é pequena e, na prática, pode ser quase imperceptível, $0,2 \leq g, < 0,5$: Efeito médio e $g \geq 0,5$: Grande efeito. Um valor grande de g de Hedges indica uma diferença importante e potencialmente significativa entre os grupos em termos práticos (Hedges, 1985).

5. RESULTADOS

5.1 Piloto comportamental:

5.1.1 Ratos lembram de objetos novos completamente diferentes em tarefa de múltiplas tentativas.

As primeiras análises do piloto comportamental direcionadas para 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. Os índices de discriminação cumulativos foram significativamente maiores que 0 para todas as tentativas [$t(5)=10,95$ $p=0,001$], com exceção da sessão 2 [$t(5)=2,30$, $p=0,061$]. Veja tabela suplementar 1 para verificar o índice de cada sessão. A Figura 13 A ilustra os valores cumulativos para as medidas de discriminação. No que se refere aos tempos de exploração para a tarefa NOR, verificou-se a partir de uma ANOVA de um fator que não existe diferença significativa entre o tempo de exploração de cada tentativa [$F(11, 66)=1,22$, $p=0,28$], veja figura 14 B. Em conjunto esses resultados sugerem que o animal forma uma memória para objeto familiar.

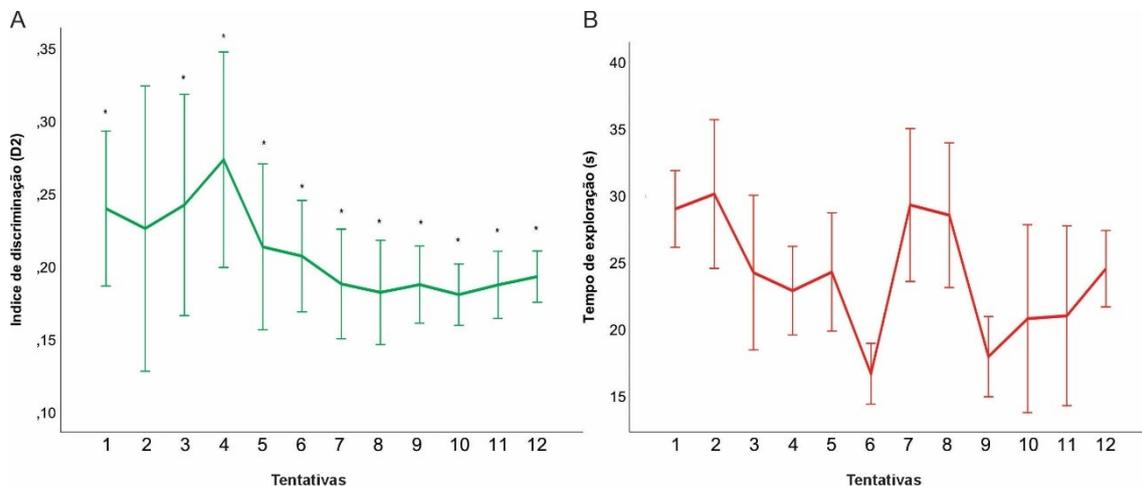


Figura 14. A. Índice de discriminação por sessão para a tarefa NOR. Teste t de uma amostra. B. Tempo de exploração por sessão para a tarefa NOR, Anova de uma via. *Comparações significativas considerando-se $p<0,05$; $N=7$; \pm Erro Padrão da média.

Quando avaliamos o índice de discriminação de forma cumulativa para cada minuto dentro da mesma sessão, verificou-se que apenas para a sessão 1 todos os minutos se encontraram acima do acaso, minuto 1= [$t(6)=3,37$, $p=0,01$], minuto 2= [$t(6)=3,28$, $p=0,01$], minuto 3=[$t(6)=4,50$, $p=0,004$]. Além da sessão 1, apenas a sessão 8 apresentou

um minuto (minuto 2) significativo [$t(6)=2,62$, $p=0,04$]. Todas as demais tentativas e minutos não foram significativas, veja tabela suplementar 2. O modelo linear geral tendo como fatores o teste e o minuto para o tempo de exploração, verificou que existe diferença no tempo de exploração entre os minutos [$F(2, 12)=8,70$, $p=0,02$] (correção de Greenhouse-Geisser). O teste post hoc sidak apontou que houve mais que no minuto 3. Não foi encontrada influência do teste [$F(11, 66)=1,39$, $p=0,26$], nem interação entre o teste e o minuto [$F(22, 132)=1,06$, $p=0,39$] para o tempo de exploração (veja figura 15). Em conjunto esses achados apontam que apenas os minutos cumulativos dentro da sessão 1 parecem ser significativos. Por fim a exploração do animal decai entre o minuto 1 e minuto 3.

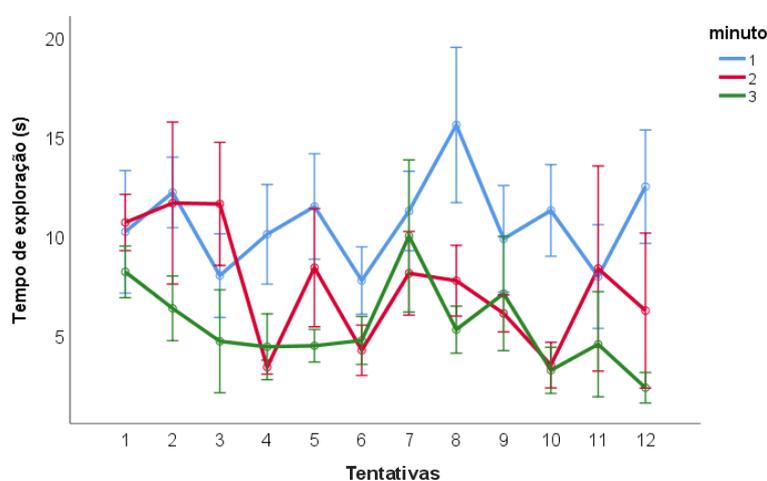


Figura 15. Tempo de exploração em segundos para cada minuto ao longo das tentativas. N=7; \pm Erro Padrão da média.

5.1.2 Ratos lembram de objetos novos com graus de similaridades baixos e médios, mas não lembram de objetos com altos graus de similaridade em uma tarefa com múltiplas tentativas.

No que se refere ao teste de discriminação, observou-se que nos níveis de similaridade de 25% e 50% os animais ao final de todas as tentativas exploraram mais o objeto novo que o familiar. Os índices de discriminação para 25% [$t(5)= 2,91$, $p= 0,03$] e 50% [$t(5)= 3,19$, $p= 0,02$] foram significativamente maiores que 0. O mesmo não aconteceu para o nível de 75% [$t(5)= -0,22$, $p= 0,83$]. Todas as condições por sessão, são ilustradas na figura 16, ver tabela suplementar 1. Pode-se afirmar que para condições de baixa e média similaridade os ratos formam memória para o objeto familiar, o mesmo não ocorre para condições que compartilham mais características sobrepostas (75%).

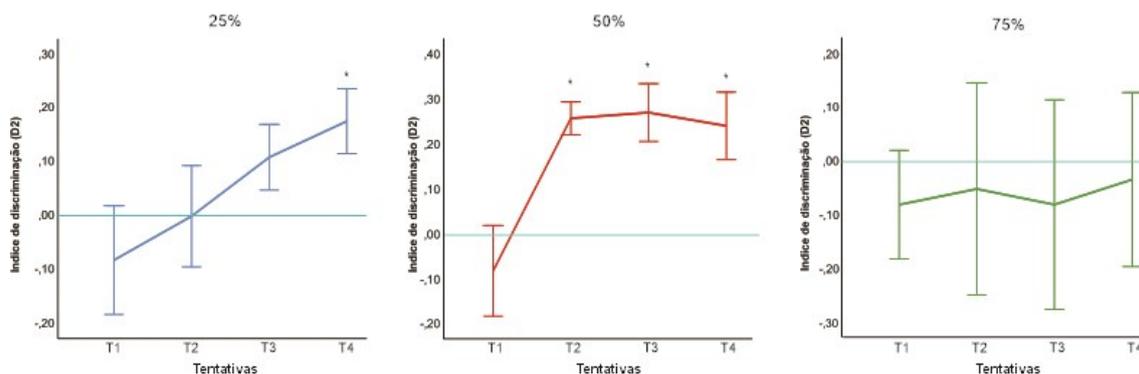


Figura 16. Índice de discriminação para cada condição (25%, 50% e 75%) por sessão na tarefa de discriminação. *Comparações significativas considerando-se $p < 0,05$. S= tentativas. Teste t de uma amostra; N=6; \pm Erro Padrão da média.

Quanto ao tempo de exploração a ANOVA identificou que existe diferença no tempo de exploração a depender da sessão [F(11, 66)=2,68 , $p=0,007$]. O teste post hoc sidak não identificou entre quais tentativas essa diferença ocorria. Veja figura 17. Portanto, não existe influência da sessão sobre a exploração do animal.

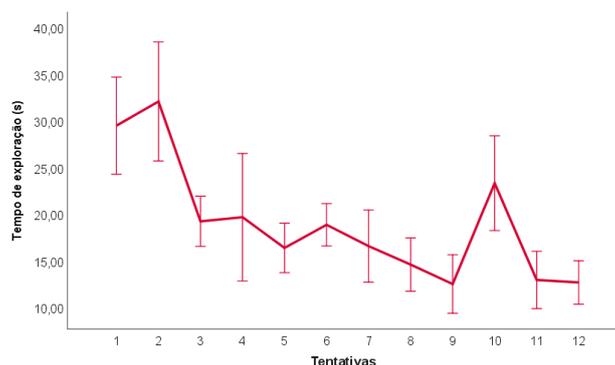


Figura 17. Tempo de exploração por sessão para a tarefa de discriminação em diferentes níveis de similaridade. Anova de uma via. *Comparações significativas considerando-se $p < 0,05$; N=7; \pm Erro Padrão da média.

A análise do D2 para cada minuto dentro da mesma sessão revelou que, para a condição de 25% de similaridade, somente a sessão 3 apresentou valores significativos: minuto 1= [t(6)=4,90, $p=0,03$], minuto 2= [t(6)=4,65, $p=0,03$], minuto 3= [t(6)=4,63, $p=0,04$]. Para a condição de 50% de similaridade, a sessão 1 apresentou o D2 significativo para o minuto 2 [t(6)=6,28, $p=0,001$] e 3 [t(6)=6,82, $p=0,001$]. A sessão 2 obteve também D2 significativo para os minutos 2 [t(6)=3,78, $p=0,009$] e 3 [t(6)=3,01, $p=0,02$]. Nenhum minuto foi significativo dentro de cada sessão para a condição de 75% de similaridade. Esses resultados sugerem que diferentes tentativas isoladas podem

contribuir para um D2 acima do acaso, além disso os minutos 2 e 3 contribuem para a discriminação, veja tabela suplementar 3.

O modelo linear geral (com correção de Greenhouse-Geisser), tendo como fatores o teste e o minuto para o tempo de exploração, verificou que existe diferença no tempo de exploração entre os minutos [$F(2, 10)=30,20$, $p=0,01$]. O teste post hoc sidak apontou que o minuto 1 é significativamente mais explorado que o minuto 3. Não foi encontrada influência do teste [$F(11, 55)=2,47$, $p=0,09$], nem interação entre o teste e o minuto [$F(22, 110)=1,62$, $p=0,227$] para o tempo de exploração (veja figura 18). Este achado aponta que a exploração do animal decai entre o minuto 1 e minuto 3.

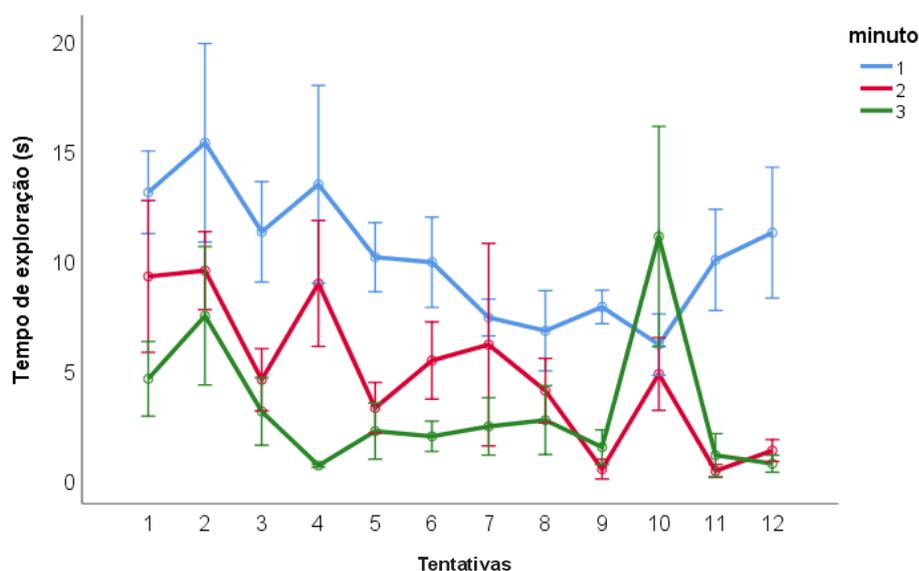


Figura 18. Tempo de exploração em segundos para cada minuto ao longo das tentativas. N=7; \pm Erro Padrão da média.

5.2 Comportamento grupo imunofluorescência

5.2.1 Ratos do grupo NOR da imunofluorescência lembram de objetos novos completamente diferentes em tarefa de múltiplas tentativas.

Nos resultados para a tarefa NOR todas as tentativas apresentaram índice D2 acima do acaso: sessão 1=[$t(7)=3,22$, $p=0,01$], sessão 2=[$t(7)=2,69$, $p=0,03$], sessão 4=[$t(7)=3,19$, $p=0,01$], sessão 3=[$t(7)=3,21$, $p=0,01$] (figura 19), veja tabela suplementar 4. Considerando-se a ausência de normalidade dos dados, aplicou-se a Anova de Friedman não constatou diferenças nos tempos de exploração entre as tentativas [$F(8, 3)=3$; $p=0,39$]. Avaliando-se o D2 de cada minuto dentro da mesma sessão, verificou-se que na sessão 1 o minuto 3 estava acima do acaso [$t(7)=3,22$, $p=0,01$]. O minuto 3 também apresentou D2 significativo na sessão 3 [$t(7)=2,75$, $p=0,02$]. Pode-se afirmar que os

animais formaram memória para o objeto familiar, com maior drive exploratório na primeira sessão. Além disso o minuto 3 foi importante em algumas tentativas para a formação da memória, quando observando-se tentativas isoladas, veja tabela suplementar 5.

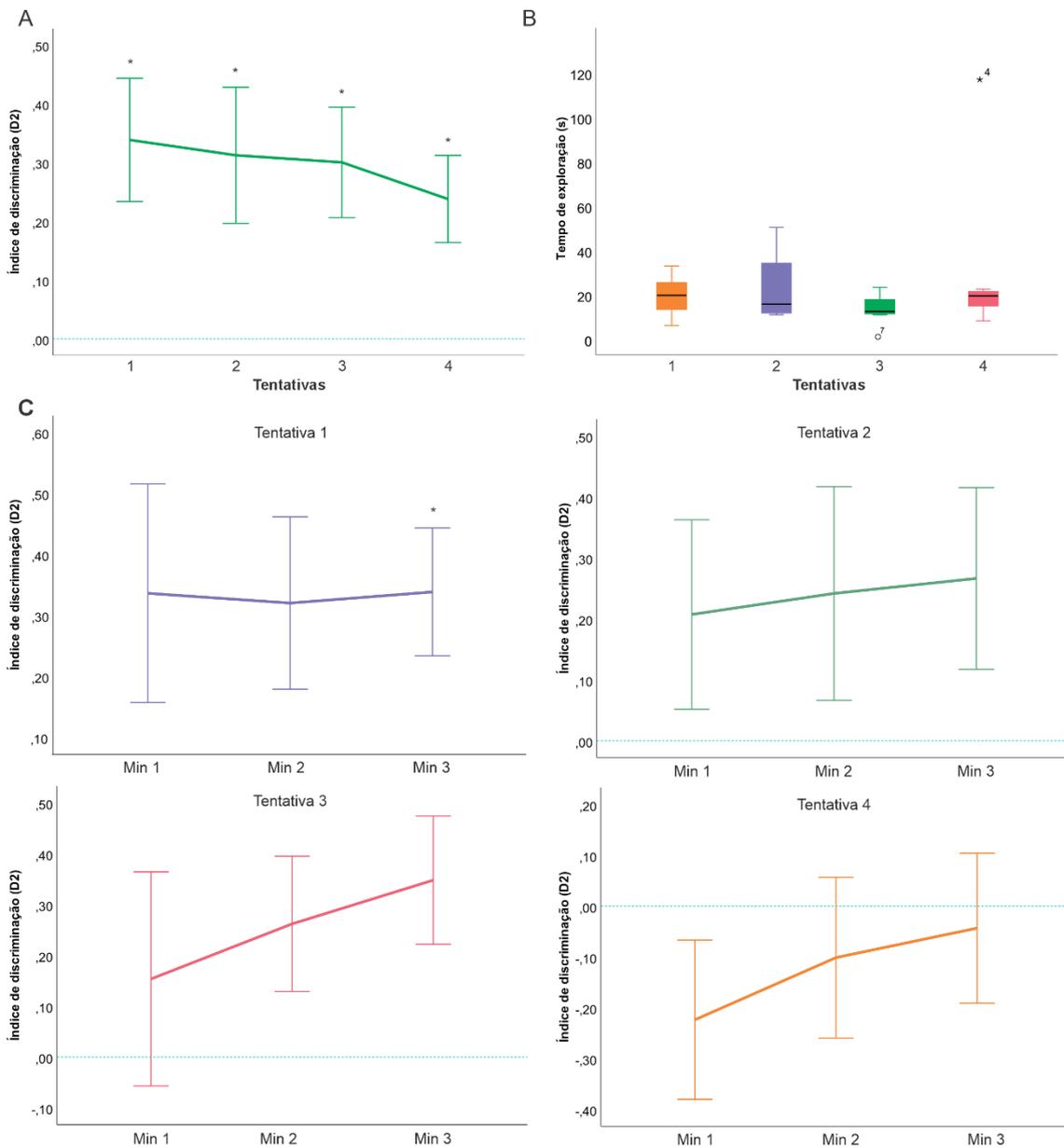


Figura 192. A. Índice de discriminação por sessão para a tarefa NOR. *Comparações significativas considerando-se $p < 0,05$. Teste t de uma amostra. B. Tempo de exploração por sessão para a tarefa de discriminação. Anova de Friedman. C. D2 para cada minuto dentro da mesma sessão para a tarefa de discriminação com diferentes níveis de

similaridade, Teste t de uma amostra. *Comparações significativas considerando-se $p < 0,05$; $N=8$. \pm Erro Padrão da média.

O modelo linear geral (MLG) (com correção de Green-house Geisser) apontou que não existe diferença entre os tempos de exploração para cada minuto [$F_{(2, 14)}=1,42$; $p=0,27$] ou sessão de exploração [$F_{(3, 21)}=0,77$; $p=0,43$]. Também não foi identificada interação entre sessão e minuto de exploração [$F_{(6, 42)}=1,18$; $p=0,33$]. Veja figura 20.

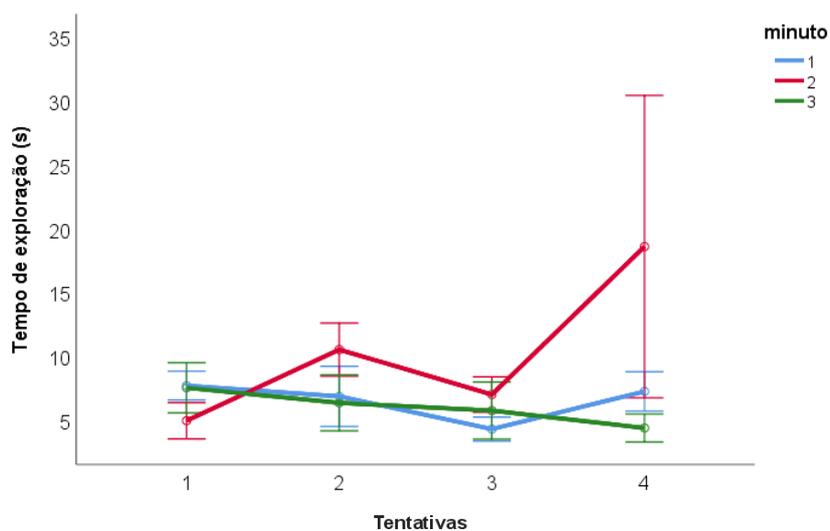


Figura 203. Tempo de exploração em segundos para cada minuto ao longo das tentativas da tarefa NOR. $N=8$; \pm Erro Padrão da média.

5.2.2 Ratos do grupo DIST da imunofluorescência lembram de objetos com diferentes níveis de similaridade em tarefa de múltiplas tentativas.

Na tarefa que os animais eram expostos a objetos com diferentes níveis de similaridade, as duas últimas tentativas apresentaram índice D2 significativos, sendo a sessão 3 [$t(7)=2,80$, $p=0,02$] e 4 [$t(7)=2,63$, $p=0,03$] (figura 21), veja tabela suplementar 4. A anova de uma via com correção de Greenhouse-geisser, identificou que não houve diferença no tempo de exploração entre as tentativas, [$F_{(3, 21)}=2,30$; $p=0,62$]. Análises feitas para o D2 de cada minuto dentro da mesma sessão, constatou-se que nenhum D2 por minuto estava acima do acaso em nenhuma das tentativas (ver tabela suplementar 5, e figura 21), isso sugere que tentativas isoladas não favorecem a evocação da memória.

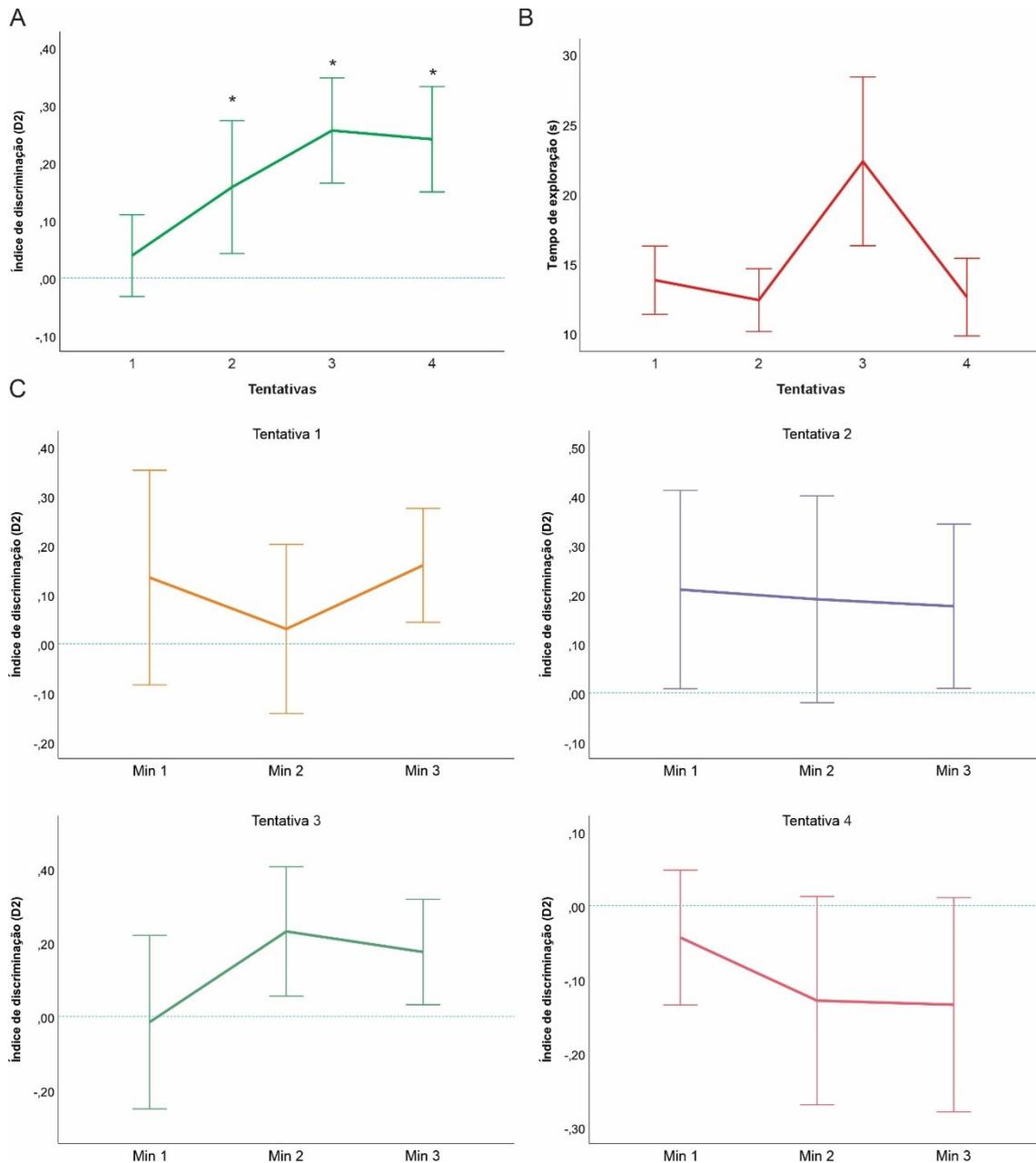


Figura 41. A. Índice de discriminação por sessão para a tarefa de discriminação com diferentes níveis de similaridade. Teste t de uma amostra. B. Tempo de exploração por sessão para a tarefa de discriminação. Modelo Linear Geral. C. D2 para cada minuto dentro da mesma sessão para a tarefa de discriminação com diferentes níveis de similaridade, Teste t de uma amostra. *Comparações significativas considerando-se $p < 0,05$.; $N=8$. \pm Erro Padrão da média.

O modelo linear geral (com correção de Greenhouse Geisser) apontou que não existe diferença entre os tempos de exploração para cada minuto [$F_{(2, 14)}=1,01$; $p=0,93$]

ou sessão de exploração [$F_{(3, 21)}=2,23$; $p=0,15$]. Também não foi identificada interação entre sessão e minuto de exploração [$F_{(6, 42)}=0,38$; $p=0,66$]. Veja figura 22.

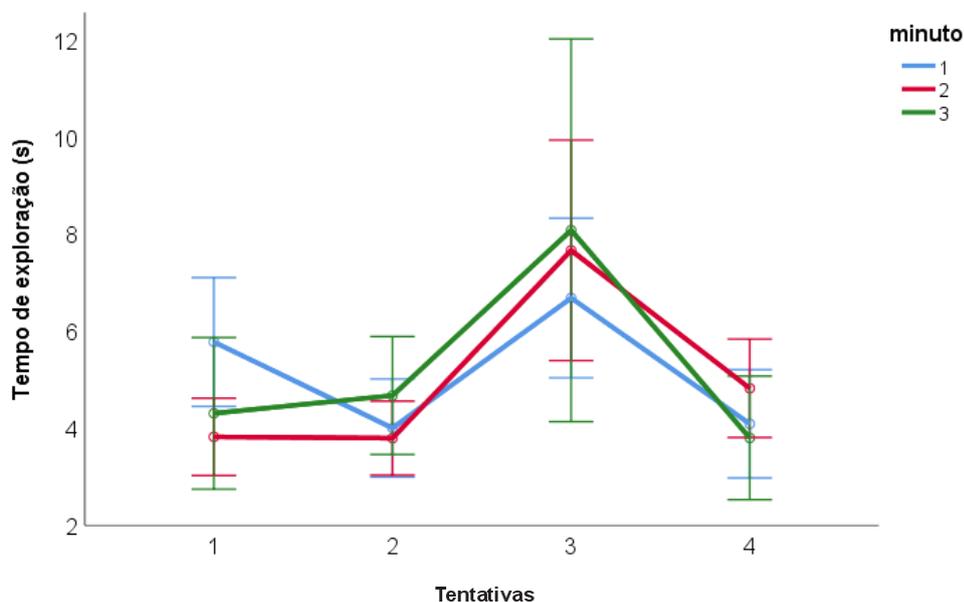


Figura 225. Tempo de exploração em segundos para cada minuto ao longo das tentativas para a condição com diferentes níveis de similaridade (25%, 50% e 75%). $N=8$; \pm Erro Padrão da média.

5.2.3 Ratos da imunofluorescência lembram de objetos com baixos níveis de similaridade (25%).

Para a condição de 25% de similaridade na tarefa de discriminação de objetos, os ratos apresentaram D2 acima do acaso ao final de todas as tentativas [$t(6)=3,73$, $p=0,014$] (Figura 23), veja tabela suplementar 4. A Anova de Friedman mostrou que houve uma diferença no tempo de exploração dos objetos entre as tentativas [$F_{(3, 7)}=13,11$; $p=0,004$]. Especificamente o post hoc mostrou que a sessão 1 é significativamente mais explorada que a sessão 2 e 4 ($p<0,05$). Não foi encontrado D2 significativo quando observamos os minutos dentro de cada sessão da condição de 25%. Tomados em conjunto esses dados apontam que os ratos lembram do objeto familiar, com um maior drive exploratório durante a sessão 1 quando comparada a sessão 2 e 4 (tabela suplementar 5).

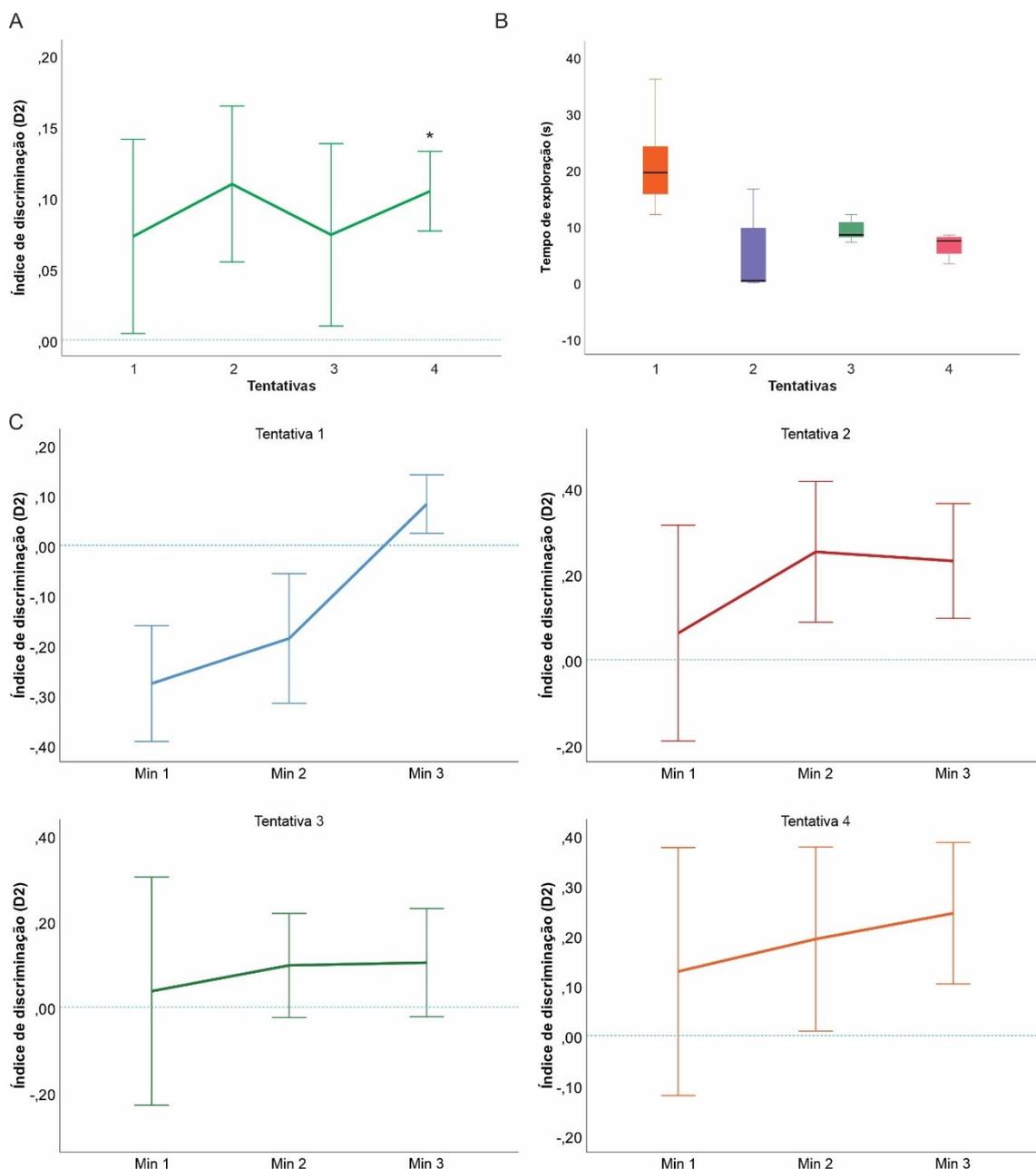


Figura 23. A. Índice de discriminação por sessão para tarefa de discriminação com 25% de similaridade. Teste t de uma amostra. B. Tempo de exploração por sessão para a tarefa de discriminação. Anova de Friedman. C. D2 para cada minuto dentro da mesma sessão para a tarefa de discriminação com diferentes níveis de similaridade, Teste t de uma amostra. *Comparações significativas considerando-se $p < 0,05$.; $N = 7$. \pm Erro Padrão da média.

Não foram encontradas diferença entre os tempos de exploração para cada minuto [$F(2, 10) = 0,83$; $p = 0,46$] ou sessão de exploração [$F(3, 15) = 2,41$; $p = 0,10$]. Também não foi

identificada interação entre sessão e minuto de exploração [$F_{(6, 30)}=0,45$; $p=0,83$]. Veja figura 24.

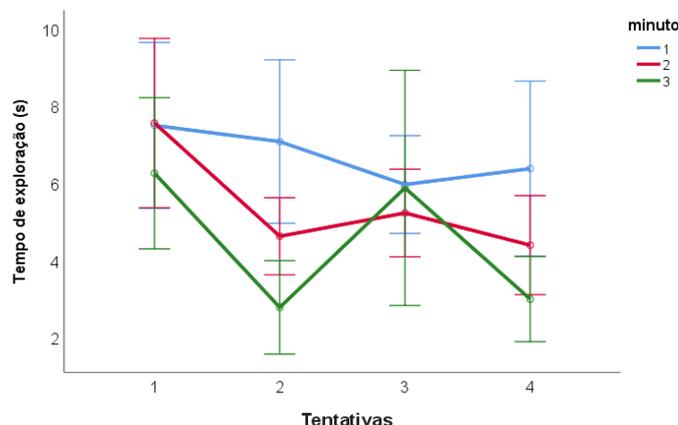


Figura 24. Tempo de exploração em segundos para cada minuto ao longo das tentativas para a condição de 25%. $N=7$; \pm Erro Padrão da média.

5.2.4 Ratos da imunofluorescência lembram de objetos com níveis médios de similaridade (50%).

Para a tarefa de discriminação que envolvia um nível de 50% de similaridade entre os objetos, verificou-se que o D2 encontrou-se acima do acaso para as 2 tentativas finais da tarefa, sessão 3 [$t(6)=2,48$, $p=0,04$] e 4 [$t(6)=3,01$, $p=0,02$], veja tabela suplementar 4. A anova de uma via identificou que não houve diferença no tempo de exploração entre as tentativas [$F_{(3, 18)}=1,94$; $p=0,86$], veja figura 25. A análise do D2 para cada minuto dentro da mesma sessão revelou que apenas para a sessão 3 minuto 2 [$t(6)=3,02$, $p=0,02$] e sessão 4 minuto 1 [$t(6)=2,68$, $p=0,03$] os dados estavam acima do acaso. Esses resultados apontam que os animais formam memória para objetos com 50% de sobreposição de suas características.

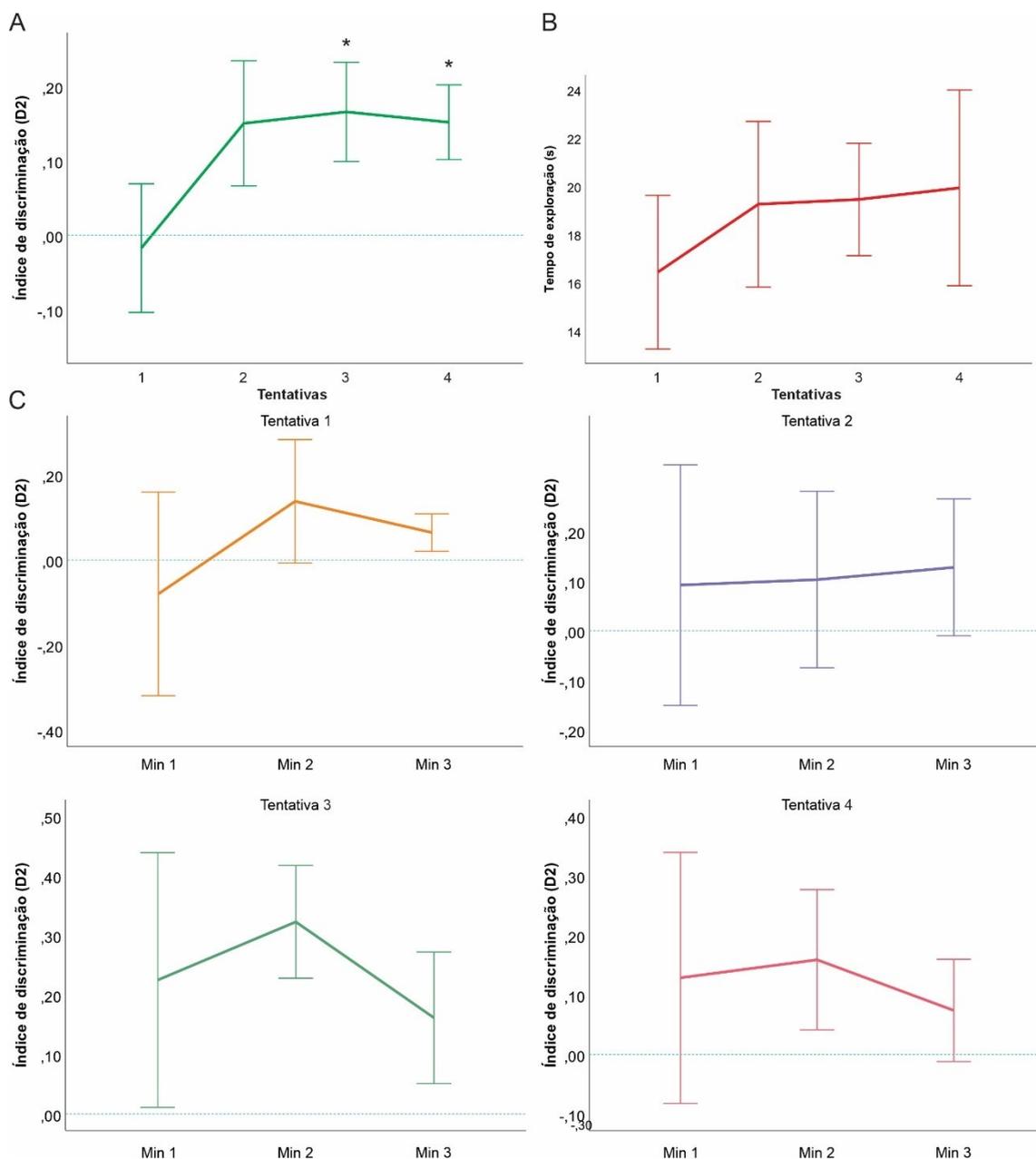


Figura 25. A. Índice de discriminação por sessão para a tarefa de discriminação com 50% de similaridade. Teste t de uma amostra. B. Tempo de exploração por sessão para a tarefa de discriminação. Modelo Linear Geral. C. D2 para cada minuto dentro da mesma sessão para a tarefa de discriminação com diferentes níveis de similaridade, Teste t de uma amostra. *Comparações significativas considerando-se $p < 0,05$; $N = 7$. \pm Erro Padrão da média.

O MLG apontou que não existe diferença entre os tempos de exploração para cada minuto [$F_{(2, 12)} = 1,73$; $p = 0,21$] ou sessão de exploração [$F_{(3, 18)} = 2,18$; $p = 0,88$]. Também não foi identificada interação entre sessão e minuto de exploração [$F_{(6, 36)} = 0,72$; $p = 0,53$]. Veja figura 26.

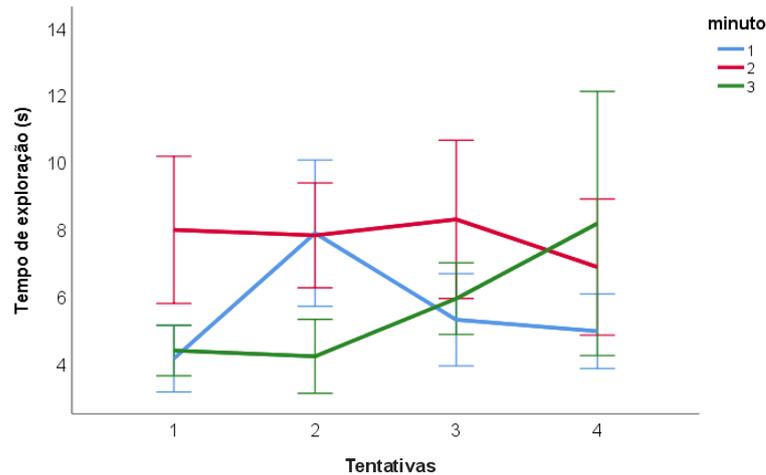


Figura 26. Tempo de exploração em segundos para cada minuto ao longo das tentativas para a condição de 50%. N=7; \pm Erro Padrão da média.

5.2.5 Ratos da imunofluorescência lembram de objetos com níveis altos de similaridade (75%).

Para a tarefa de discriminação que envolvia um nível de 75% de similaridade entre os objetos, verificou-se que o D2 encontrou-se acima do acaso para as tentativas 1 [$t(5)=3,94$, $p=0,01$], sessão 3 [$t(5)=2,71$, $p=0,04$] e 4 [$t(5)=2,80$, $p=0,03$], veja tabela suplementar 4. A anova de uma via identificou que não houve diferença no tempo de exploração entre as tentativas [$F(3, 15)=0,25$; $p=0,88$], veja figura 27. Para o D2 por minuto dentro de cada sessão, foram significativas apenas o minuto 3 da sessão 3 [$t(5)=2,74$, $p=0,04$] e o minuto 1 da sessão 4 [$t(5)=2,60$, $p=0,48$]. Pode-se afirmar que os ratos formam memória para objetos mesmo em condições de 75% de similaridade entre eles.

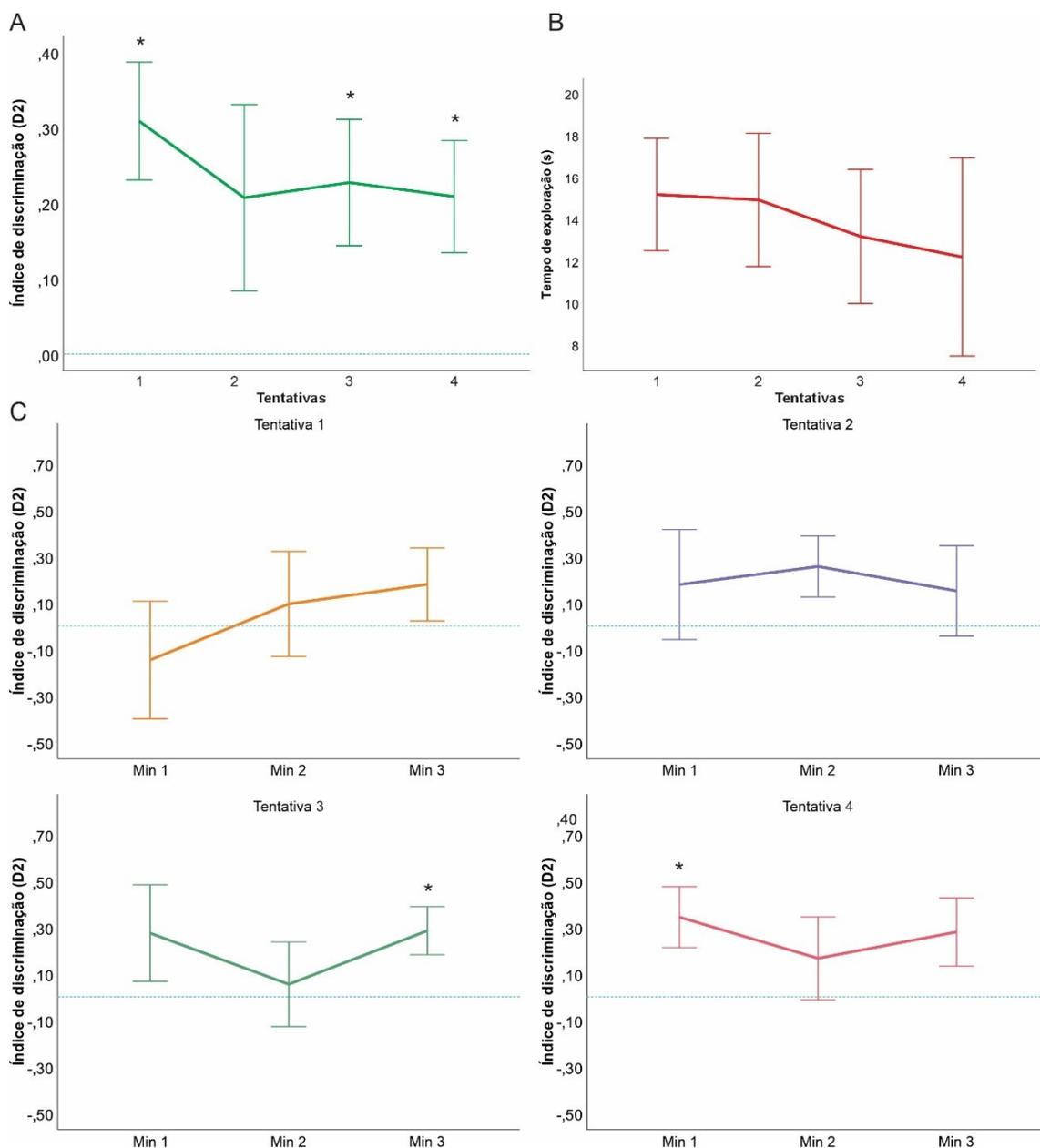


Figura 27; A. Índice de discriminação por sessão para a tarefa de discriminação com 75% de similaridade. Teste t de uma amostra. B. Tempo de exploração por sessão para a tarefa de discriminação. Modelo Linear Geral. C. D2 para cada minuto dentro da mesma sessão para a tarefa de discriminação com diferentes níveis de similaridade, Teste t de uma amostra. *Comparações significativas considerando-se $p < 0,05$.; $N = 7$. \pm Erro Padrão da média.

Não foram encontradas diferenças significativas no tempo de exploração nos minutos [$F_{(2, 10)} = 0,23$; $p = 0,79$], tentativas [$F_{(3, 15)} = 0,16$; $p = 0,91$], nem interação entre eles [$F_{(6, 30)} = 0,43$; $p = 0,84$], veja figura 28.

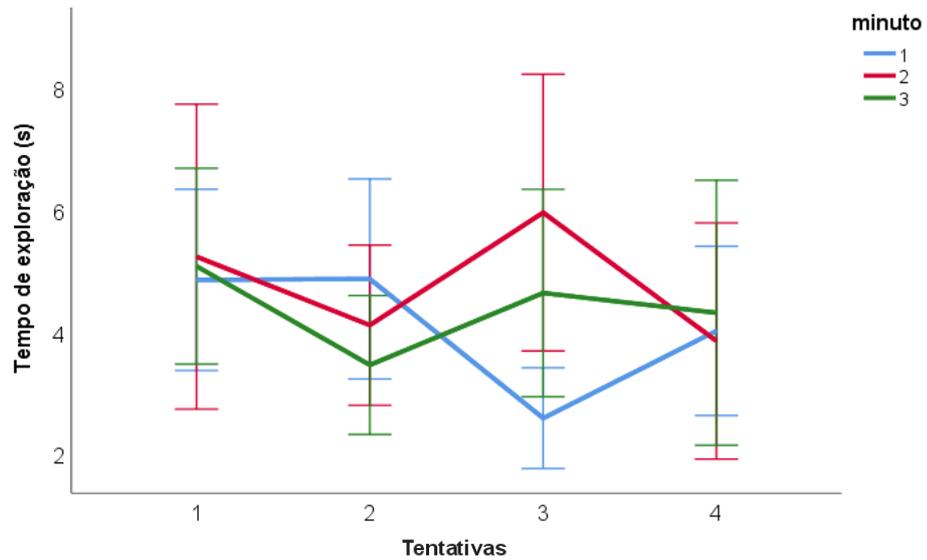


Figura 286. Tempo de exploração em segundos para cada minuto ao longo das tentativas para a condição de 75%. N=6; \pm Erro Padrão da média.

5.3 Imunofluorescência

5.3.1 A expressão de c-fos no CA3cR e HilosR é aumentada no hipocampo rostral para as condições de memória com maiores níveis de similaridade.

A imunofluorescência foi feita utilizando-se uma dupla marcação com marcadores específicos para o IEG c-Fos e a proteína PV, permitindo assim avaliar a ativação de neurônios excitatórios, veja figura 29.

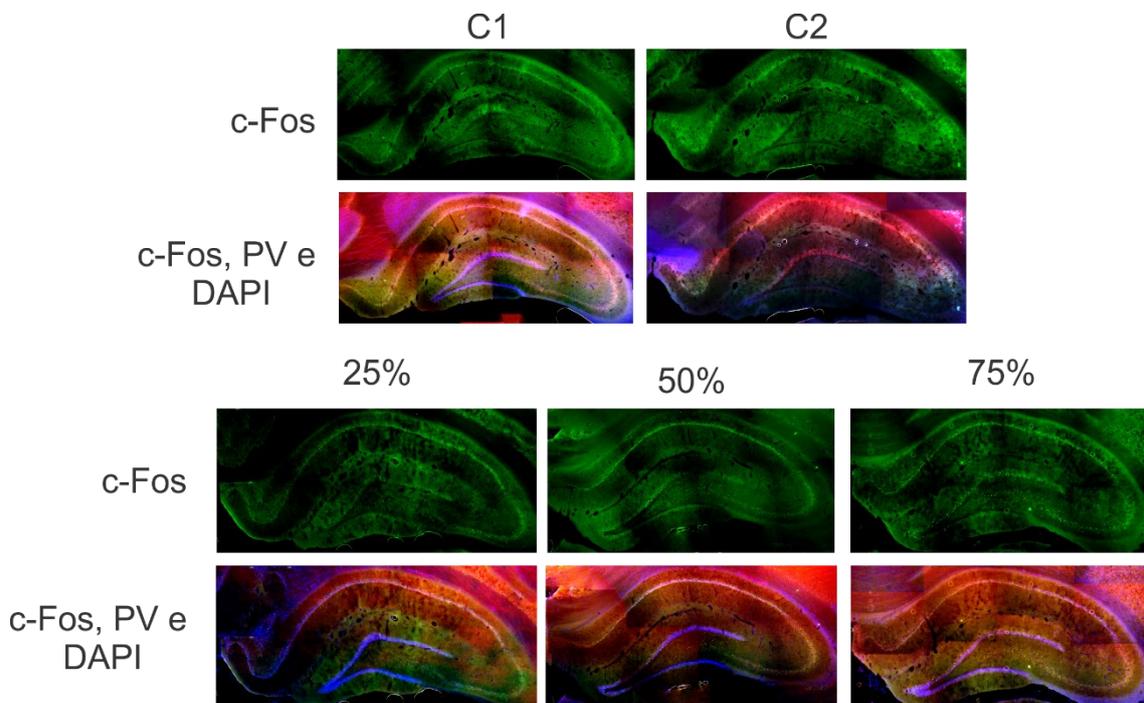


Figura 79. Fotos montadas da imunofluorescência com marcação de c-Fos e tripla marcação (c-Fos, PV e DAPI), para cada grupo controle e experimental.

A expressão de c-Fos apresentou dados normais apenas para a área do hilosR, e CA3cR, as demais áreas não foram tratadas como homogêneas. Um teste de contrastes foi gerado afim de realizar comparações diretas entre as condições experimentais e controles, dessa forma, 4 contrastes foram feitos com as seguintes comparações: 1- todas as condições experimentais versus todas as condições controle; 2- Condições 50% e 75% versus condição de 25%; 3- Condição experimental 50% versus 75% e 4- Condição NOR versus DIST. Os contrastes planejados identificaram uma diferença significativa na expressão de c-Fos tanto para a área de CA3cR [$F_{(4,28)}=4,67$; $p=0,005$] e camada do Hilos(GD) [$F_{(4,28)}=3,76$; $p=0,01$], veja tabela suplementar 6.

O teste de contrastes planejados apontou para uma diferença significativa na expressão de c-Fos no CA3cR [$t(28)= 2,84$, $p=0,008$] (bilateral) e Hilos [$t(28)= 2,87$, $p=0,001$ (bilateral)] entre os diferentes níveis de similaridade (25%, 50% e 75%). Entre as condições experimentais também houve uma diferença significativa entre a condição de menor similaridade (25%) comparada com a condição de média (50%) e alta similaridade 75%, tanto para CA3cR [$t(28)= 2,99$, $p=0,006$ (bilateral)] e Hilos [$t(28)= 2,75$, $p=0,01$ (bilateral)]. Não houve diferença entre as condições de 50% e 75%, além disso também não foi encontrada diferença entre os controles (NOR e DIST) veja figura 30, parte B, dados dos testes na tabela suplementar 7.

Também foi encontrada uma diferença significativa na expressão de c-Fos para a área de CA3b [$H(4)=12,49$, $p=0,01$, $\omega^2= 0,18$], O teste post hoc (teste de Dunn) revelou aumento significativo e com grande efeito na expressão de c-Fos no CA3bR entre as condições NOR e 50% ($p=0,04$, $g=-0,87$). E uma tendência no aumento da expressão de c-Fos também em CA3aR entre as condições DIST e 50% ($p=0,05$), veja figura 29 e tabela suplementar 6.

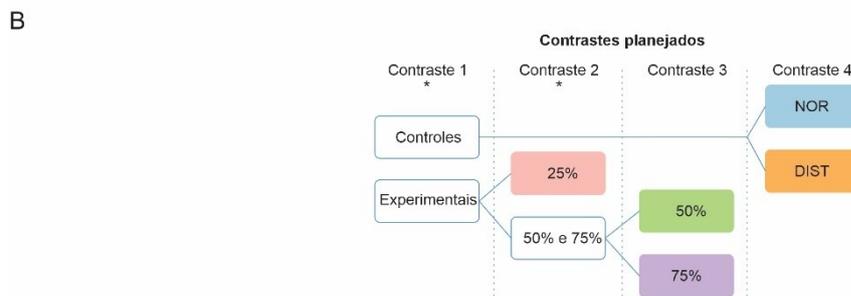
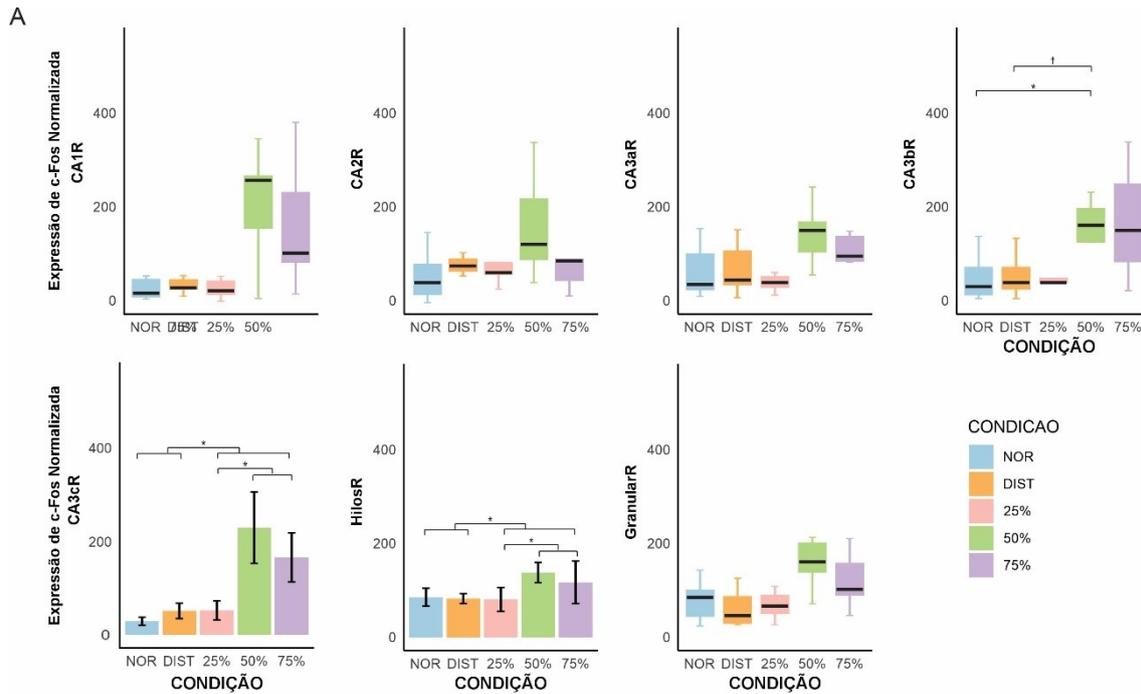


Figura 308. A. Expressão de c-fos normalizada em subáreas do hipocampo rostral para diferentes condições de reconhecimento e discriminação de objetos. B. Contrastes planejados para comparação da expressão de c-fos no hilos, entre as condições. Teste de Kruskal-Wallis e post hoc de Dunn e contrastes planejados ortogonais (bidirecionais). *Comparações significativas considerando-se $p < 0,05$. †Tendências próximas ao valor de significancia; $N = 6-7$. \pm Erro Padrão da média.

Correlações de Pearson ou Spearman (a depender da normalidade da variável) entre o comportamento e a expressão de c-Fos para cada condição apontou existir correlações significativas dentro da condição NOR, sendo essas correlações todas negativas entre: CA3bR e o D2 ($\rho = -0,79$), e Hilos D2 ($r = -0,80$). Nenhuma correlação significativa entre a expressão de c-Fos e D2 foi encontrada para as condições de DIST e 25% e 50%. Na condição de 75% encontrou-se correlações fortes e significativa entre o CA3cR ($r = 0,93$), CA2R ($\rho = 0,82$) e o D2 (veja tabela suplementar 8 a 12).

Tomados em conjunto esses achados apontam que a expressão de c-Fos no CA3cR e HilosR é dependente do nível de similaridade no hipocampo Rostral, sendo aumentada à medida que a tarefa exige maior desambiguação das características quando comparada com tarefas com menores níveis de similaridade. Além disso, a expressão de c-Fos em áreas do hipocampo rostral se correlaciona positivamente com o reconhecimento de objetos em condições com maiores níveis de similaridade. A expressão de c-Fos CA3bR parece estar envolvida com o processo de discriminação, porém somente quando se tem uma condição de média similaridade.

5.3.2 A expressão de c-Fos não muda no hipocampo medial entre condições de memória com diferentes níveis de similaridade.

Contrastes planejados direcionados para os dados paramétricos do hipocampo medial não encontraram diferenças significativas entre as condições para as subregiões do hipocampo: CA3aM ($F(4,28)=0,49$, $p=0,74$) e GranularM ($F(4,28)=1,19$, $p=0,33$). Os testes de KW também não encontraram diferenças significativas para as áreas do hipocampo medial, veja figura 31 (estatísticas na tabela suplementar 6 e 7). Quando realizadas correlações entre os níveis da expressão de c-Fos e o D2, considerando cada condição, encontramos uma correlação entre o CA3aM e o D2 para a condição de 25% ($r=0,78$). Também existiu uma correlação entre o CA3bM e o D2 ($\rho=0,88$) na condição de 75% de similaridade.

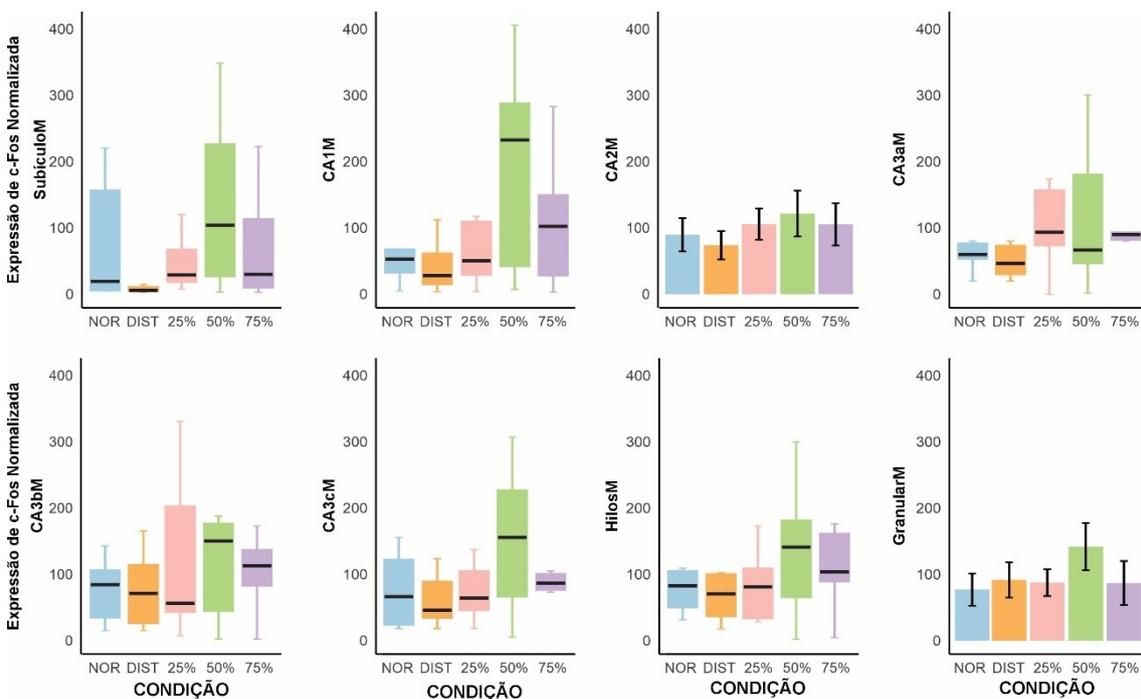


Figura 31. Expressão de c-Fos normalizada em subáreas do hipocampo medial para diferentes condições de reconhecimento e discriminação de objetos. Teste de Kruskal-Wallis, post hoc de Dunn e contrastes planejados ortogonais (bidirecionais). *Comparações significativas considerando-se $p < 0,05$. †Tendências próximas ao valor de significância; N=6-7. \pm Erro Padrão da média.

Esses dados nos sugerem que para o hipocampo medial a expressão de c-Fos não é influenciada pelos diferentes níveis de similaridade, porém de alguma forma nas condições que envolvem algum grau de similaridade, algumas subregiões do CA3 parece se relacionar com o comportamento.

5.3.3 A expressão de c-Fos não muda no hipocampo caudal entre condições de memória com diferentes níveis de similaridade.

Considerando a porção caudal do hipocampo, não foram encontraram diferenças significativas entre as condições, nos níveis de expressão de c-Fos nas subregiões de SubículoC, CA1C, CA3C, HilosC e GranularC, veja figura 32 (estatísticas na tabela suplementar 6 e 7). Porém no que se refere as correlações entre os níveis de c-Fos comportamento, encontramos uma correlação significativa para a condição de DIST, entre o subículoC e o D2 ($r=0,76$). As demais condições não apresentaram correlações significativas com o comportamento.

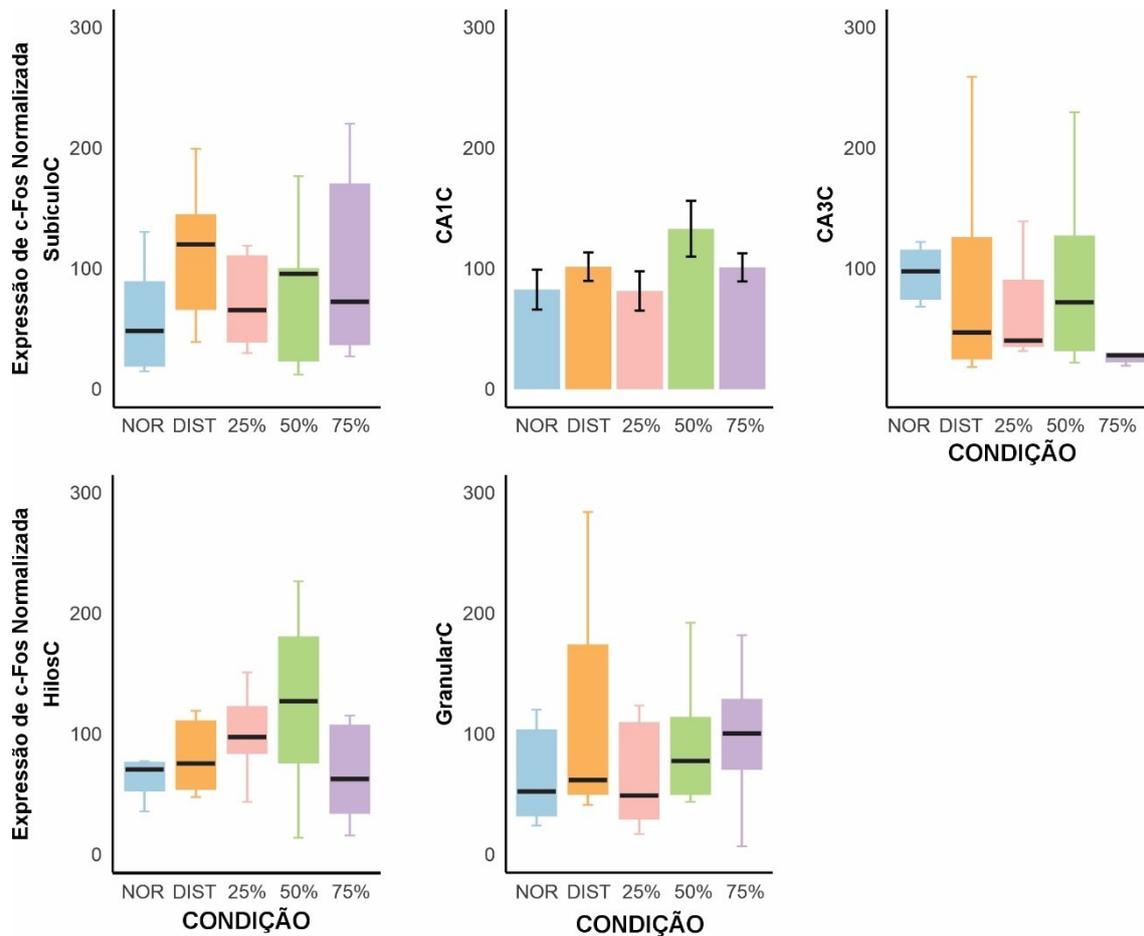


Figura 92. Expressão de c-Fos normalizada em subáreas do hipocampo caudal para diferentes condições de reconhecimento e discriminação de objetos. Teste de Kruskal-Wallis, post hoc de Dunn e contrastes planejados ortogonais (bidirecionais). *Comparações significativas considerando-se $p < 0,05$. †Tendências próximas ao valor de significância; $N=6-7$. \pm Erro Padrão da média.

Esses dados nos sugerem que para o hipocampo medial a expressão de c-Fos não é influenciada pelos diferentes níveis de similaridade, porém de alguma forma nas condições que envolvem algum grau de similaridade, o subículo C parece se relacionar com o comportamento em uma condição de diferentes níveis de similaridade.

5.3.4 A expressão de c-Fos não muda no hipocampo ventral entre condições de memória com diferentes níveis de similaridade.

Verificando a região ventral do hipocampo, não foram encontradas diferenças nos níveis de expressão de c-Fos, entre as condições, nas subregiões: SubículoV CA1V, CA3V, HilosV e GranularV, veja figura 33 (estatísticas na tabela suplementar 6 e 7). Não

foi observada correlação entre as condições (NOR, DIST, 25%, 50% e 75%) e o índice de discriminação.

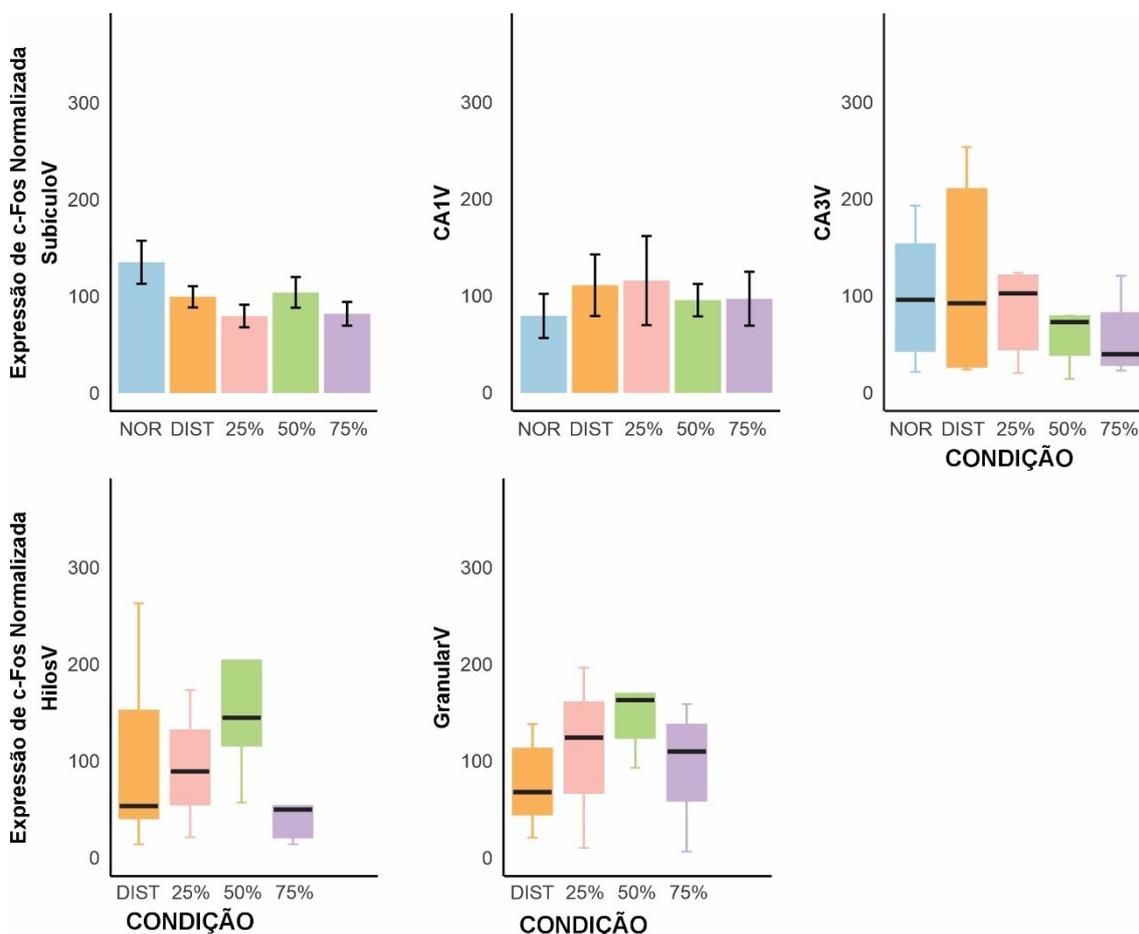


Figura 33. Expressão de c-Fos normalizada em subáreas do hipocampo ventral para diferentes condições de reconhecimento e discriminação de objetos. Teste de Kruskal-Wallis, post hoc de Dunn e contrastes planejados ortogonais (bidirecionais). Condição NOR excluída das comparações do HilosV e granularV por valores ausentes. *Comparações significativas considerando-se $p < 0,05$. †Tendências próximas ao valor de significância; $N=6-7$. \pm Erro Padrão da média.

5.3.5 A expressão de c-Fos é maior em camadas profundas do PHR 36 em uma condição de média similaridade.

Quando contrastes planejados foram orientados para os dados paramétricos, encontrou-se uma tendência para a região do PHR-36S [$F(4,24)=2,6$, $p=0,061$], no qual um contraste planejado entre condições controle (NOR e DIS) e experimental (25%, 50% e 75%) apresentou significância [$t(24)=2,23$, $p=0,035$]. Considerando os testes de KW foi identificada uma diferença significativa no PHR-36P [$H(4)=10,25$, $p=0,04$, $\omega^2=0,21$].

O teste post hoc de Dunn apontou diferenças significativas e com grande efeito entre as condições 25% e 50% ($p=0,03$, $g=-2,10$). Também foram encontradas tendências entre a condição de DIST e 50% ($p=0,06$), veja tabela suplementar 6 e figura 34.

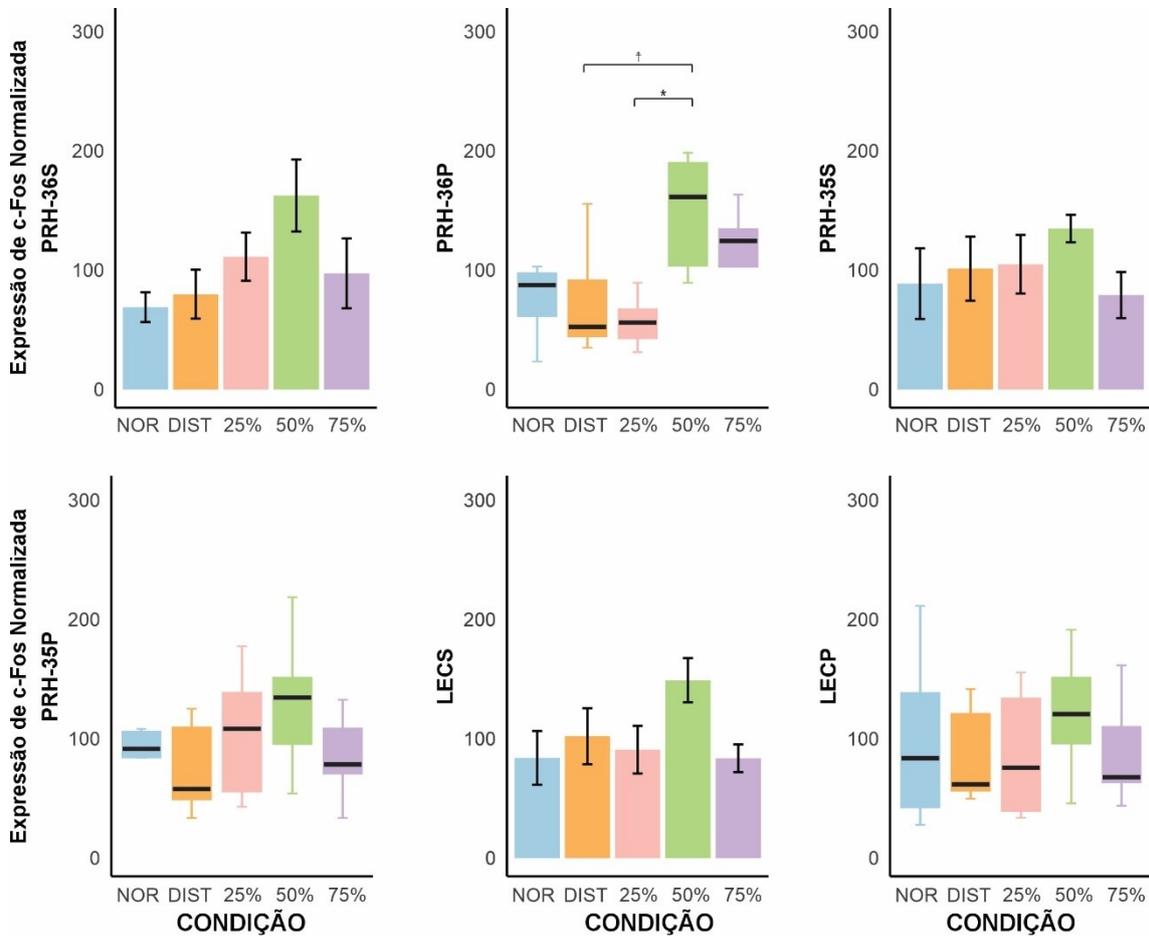


Figura 34. Expressão de c-Fos normalizada em subáreas e camadas do córtex parahipocampal para diferentes condições de reconhecimento e discriminação de objetos. Teste de Kruskal-Wallis, post hoc de Dunn e contrastes planejados ortogonais (bidirecionais). Condição NOR excluída das comparações do HilosV e granularV por valores ausentes. *Comparações significativas considerando-se $p<0,05$. †Tendências próximas ao valor de significância; $N=6-7$. \pm Erro Padrão da média.

Avaliando-se a correlação da expressão de c-Fos e o comportamento na região parahipocampal, identificou-se uma correlação significativa forte entre o Phr-36S e o D2 na condição de maior similaridade ($r=0,94$, $p=0,01$). As demais condições não apresentaram valores de correlação significativos.

75% ($p < 0,001$). As demais comparações não apresentaram valores significativos. A Média do Z escore para cada condição foi: NOR= 0,49; DIST= 0,51; 25%= 1,49; 50%= 0,76 e 75%= 0,87. Deve-se destacar que as condições DIST, 50% e 75% apresentaram correlações negativas.

Para medir a relevância de nós individuais dentro das redes e obter informações sobre como a informação flui dentro delas, foram calculados o grau de centralidade, a centralidade de intermediação e a força. Os nós foram classificados de acordo com cada métrica para revelar sua importância relativa na respectiva rede. Na condição NOR foi identificado que os nós CA2M(maior grau e força), CA3aM, CA3cM, Granular M, P35S(maior centralidade) e CA3 V se destacaram como hubs, é interessante notar que grande parte do hipocampo medial desempenhou papel central nesta condição, com a região P35S sendo uma ponte importante entre clusters, veja figura 36 e tabela suplementar 13 e 14.

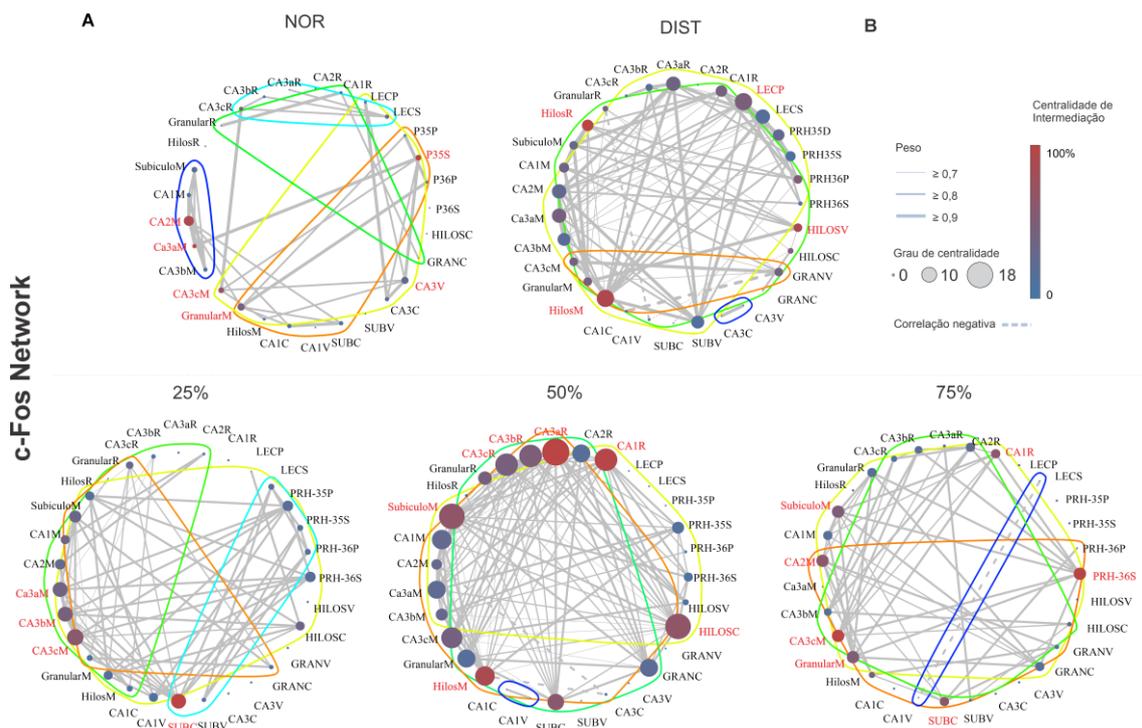


Figura 36. A- Grafos construídos para cada grupo controle e experimental. Cada círculo corresponde a um nó (região). As linhas representam a correlação entre as áreas. As linhas ao redor de um grafo representam a quantidade de cluster's no grafo. B-A espessura das linhas representa a força da correlação. Linhas trastejadas representam correlações negativas. As cores do nó representam o nível de centralidade de intermediação de cada nó. O tamanho do nó representa o grau de intermediação.

Para a condição DIST as regiões consideradas hubs foram o HilosR (maior centralidade), HilosM (maior grau), HilosV e LECP (maior grau e força). É interessante notar que o hilos em diferentes porções anteroposteriores do hipocampo esteve engajado nesta tarefa como hubs importantes do hipocampo rostral e pontes entre clusters do hipocampo rostral-medial e caudal. Em 25% de similaridade tem-se como hub todas as subregiões do CA3 medial: CA3aM, CA3bM, CA3cM (maior grau) e o SubículoC (maior centralidade e força). As subregiões do CAM3 conectam estruturas do hipocampo medial a estruturas do córtex parahipocampal e hipocampo caudal e ventral. O subículo por sua vez parece ser uma região de ponte central para conectar o cluster do córtex parahipocampal com hipocampo medial e rostral.

Quando se avalia condições de 50% de similaridade, verifica-se que algumas subestruturas do hipocampo rostral são consideradas hubs: CA1R, CA3aR (maior grau, centralidade e força), CA3bR e CA3cR. Também são considerados hub os nós SubículoM e HilosM, além do HilosC. É interessante notar que o HilosC e SubículoM parecem conectar um grande cluster que envolve principalmente o hipocampo medial e o córtex parahipocampal. As subáreas do CA3R em conjunto com o Hilos M por sua vez são centrais para conectar um outro cluster que envolve regiões rostrais, caudais e ventrais do hipocampo.

Na condição de maior similaridade (75%) destacam-se como hubs alguma subregiões do hipocampo medial: Subículo M, CA2M, CA3cM (maior centralidade), GranularM. Além dessas, também considerou-se como hub o SubículoC, o CA1R e o PRH-36S (maior força). Com exceção de CA1R e SubículoC, todos os hubs tiveram o mesmo grau (8). Nota-se que o CA3cM é um hub importante para conectar áreas do hipocampo rostral com o nós de outras porções do hipocampo. O PRH-36S por sua vez é a única área do córtex fortemente engajada na rede, sendo um hub de conexões fortes de diferentes porções do hipocampo para o córtex, trabalhando em conjunto com outros hubs destas regiões como CA1R e Granular M, veja figura 35.

Para verificar o funcionamento da rede como um todo, foi verificado que existia diferenças significativas na força dos nós entre todas as condições [$H(4)=595$, $p<0,001$, $\omega^2 =0,39$]. Tendo um efeito grande, a força dos nós foi diferente entre cada par de condições ($p<0,001$), a força em cada condição foi: NOR= 106; DIST= 5,04; 25%= 4,08; 50%= 6,99; 75%= 3,23. A análise de eficiência global mostrou que todas as condições são diferentes entre si [$H(4)=478$, $p<0,001$, $\omega^2 =0,96$]. Quando verificado o post hoc

identificou-se que havia diferença entre todos os pares de condições ($p < 0,001$). Sendo a condição de 50% a de maior eficiência, a eficiência global para cada condição foram: NOR= 0,22; DIST= 0,51; 25%=0,38, 50%= 0,45 e 75%= 0,26. Quando comparados os coeficientes de agrupamento global verificou-se que existia diferença entre todas as condições [$H(4)=477$, $p < 0,001$, $\omega^2 = 0,96$], sendo essa diferença também observada nas comparações (post hoc de Dunn) de cada condição ($p < 0,001$). Sendo o coeficiente de agrupamento global para cada condição: NOR=0,5; DIST= 0,6; 25%=0,52; 50%= 0,71 e 75%= 0,61, veja tabela suplementar 15 e 16.

Além disso, vale notar que a análise de cluster de Louvain encontrou que para a condição NOR 11 clusters foram encontrados (6 sendo áreas sem conexões). Nota-se que um cluster evidente do hipocampo medial é mostrado. Outros cluster trabalha integrando partes do hipocampo rostral com uma estrutura do hipocampo cauda(GranularC). Outro por sua vez integra as subregiões do CA3 rostral com a região do LECS do córtex. Outro cluster integra regiões profundas do perihinal com diferentes subáreas do hipocampo medial e caudal. Um último cluster tem conexões entre regiões do córtex e subregiões do hipocampo (tabela suplementar 17).

Para a condição de DIST apenas 5 clusters foram encontrados (1 cluster sendo uma área isolada). Nota-se que a um cluster envolvendo subregiões do hipocampo rostral e medial e quase todo o córtex parahipocampal. Outro cluster envolve em conjunto tanto áreas do hipocampo medial quanto do rostral, caudal e ventral, ligando-se a uma região do córtex parahipocampal (PHR36P). Dois outros pequenos cluster incluem conexões entre regiões em diferentes porções anteroposteriores do hipocampo.

A condição de 25% de similaridade foi composta por 10 clusters (6 sendo áreas isoladas). Dois grande clusters eram compostos por 8 nós cada. O primeiro deles envolve conexões entre diferentes porções anteroposteriores do hilos, além do CA3bM e CA1V com porções profundas e superficiais do córtex perirrinal e o LEC profundo. O outro cluster por sua vez era composto em sua grande maioria por estruturas do hipocampo rostral e medial, com exceção do CA1C. É interessante notar que as demais estruturas do córtex PRH36P, PRH35S e LECS formaram um cluster com duas porções do subículo (SubículoC e SubículoV). Por fim, um último cluster continha conexões entre duas porções da camada granular (granularM e GranularC) e o subícumo medial e CA3cR.

Em 50% de similaridade tem-se 10 clusters (6 sendo áreas isoladas). Porém, três grandes clusters são destacados, com 9, 7 e 7 nós cada. O primeiro deles envolve quase toda a subregião do hipocampo medial com algumas subáreas do CA3 rostral, além do CA3C e HilosV. Outro cluster envolvia em conjunto grande parte das subregiões do hipocampo rostral com a camada granularM, granular C e o subículoC. Por último, um outro grupo distinto de nós envolve regiões do córtex perihinal e distintas porções do hipocampo (CA1R, subículo M, CA3bM e Hilos C).

Na condição de 75% é observado 12 clusters (8 áreas isoladas). Pode-se observar que 3 clusters se evidenciam nessa condição, cada um deles com 8, 7 e 6 nós. O primeiro e maior deles envolve diferentes porções do CA3: CA3aR, CA3bR, CA3cR, CA3bM, CA3cM. Este também conecta regiões como o CA2R, HilosC e Subículo C. Outro cluster tem conexões do hipocampo medial (SubículoM e GranularM), rostral (CA1R e Granular R) com o córtex PRH-36S, neste cluster também existe conexão com outra porção da camada granular (GranularC). Por último, um outro cluster é visto envolvendo regiões do hipocampo medial (CA2M, CA3aM, HilosM), o córtex PRH-36P, subículoC e granularV. Desconsiderando as áreas sem conexões para contagem de clusters, cada condição apresentou exatamente 4 clusters, com exceção da condição NOR que apresentou 5 clusters (veja tabela suplementar).

Apesar de a quantidade de clusters ser bastante similar entre as redes, pode-se utilizar o valor de modularidade como uma métrica da homogeneidade dos clusters de cada rede. O valor de modularidade demonstrou-se distinto entre as redes [$H(4)=471$, $p=0,0001$, $\omega^2= 0,94$], com diferença entre todas as condições ($p<0,001$). O valor de modularidade sugere que a rede de 50% é mais homogênea, sem divisões claras em comunidades, o que pode indicar uma rede altamente distribuída sem subestruturas. Além disso, todas as condições apresentam uma modularidade maior que a condição sem similaridade (veja figura 37 e tabela suplementar 18).

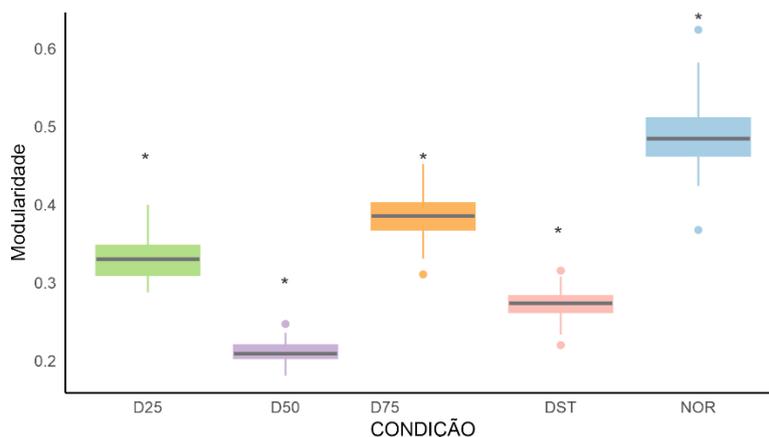


Figura 37. Modularidade dos clusters para cada condição. Quanto menor o valor de modularidade maior a integridade da rede. *Comparações significativas considerando-se $p < 0,05$. †Tendências próximas ao valor de significância; N=6-7. \pm Erro Padrão da média.

6. DISCUSSÃO

Utilizando-se a tendência natural dos roedores à exploração de novidade, diversos paradigmas foram desenvolvidos com o intuito de se avaliar a memória em animais, considerando-se primariamente sua preferência significativa por objetos novos quando comparado com objetos familiares (Ennaucer & Delacour, 1988; Cohen & Stackman, 2015; Blaser & Heyser 2015). Porém, além de simplesmente reconhecer, são necessárias representações únicas de eventos similares que podem ser associados a resultados diferentes, através de um processo chamado separação de padrões (Josey & Brigman, 2015; Gilbert & Kesner, 2006; Miranda et al., 2017). Portanto, aqui objetivou-se avaliar os mecanismos moleculares da tarefa de reconhecimento de objetos com diferentes graus de similaridade entre si, padronizando um protocolo que envolvia múltiplas tentativas.

Para o piloto comportamental pode-se perceber 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), deve-se notar que mesmo a tarefa de reconhecimento de objetos, em algum grau possui similaridade uma vez que os objetos são construídos por legos que compartilham características parecidas (Aggleton *et al.*, 2010, Gámiz & Gallo, 2012).

Os animais também apresentaram memória para o objeto familiar mesmo em condições com baixo e médio grau de similaridade. Porém, os animais não apresentaram essa memória para os objetos com maior similaridade. Esse resultado foi diferente do encontrado por Johnson et al. (2017), no qual os animais conseguem discriminar níveis

mais altos de similaridade. Possivelmente objetos com alto nível de similaridade (75%) sejam altamente difíceis de discriminar pela linhagem aqui utilizada, uma vez que esta apresenta uma redução na acuidade visual (Prusky West & Douglas, 2005). Existe uma diferença na medida comportamental aqui adotada (tempo de exploração), quando comparada ao estudo de Johnson et al., (2017) que apenas usou acerto e erros (associados a uma recompensa) como medidas. Além disso, a tarefa aqui proposta 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 tentativas, permitindo assim a análise da codificação e recordação da memória (Ameen-Ali *et al.*, 2012). Portanto, pode-se inferir que nossa tarefa é útil para comparar a memória de reconhecimento com níveis de similaridades baixos a moderados.

Deve-se considerar que a tarefa de múltiplas tentativas foram fundamentais para a obtenção de um grande volume de dados, por meio da qual D2 significativos foram encontrados, reduzindo assim a variância dos dados. Aqui, tentativas e minutos isolados obtiveram poucos resultados significativos. Os níveis de exploração significativamente diferentes entre os minutos sugerem que ao longo das voltas realizadas no mesmo teste o animal acaba perdendo o interesse na exploração dos objetos, uma vez que esses objetos se tornam cada vez mais familiares, esses resultados são semelhantes aos encontrados por Manns e Eichenbaum (2009). Apesar do número considerável de tentativas, o nível de exploração foi mantido, provavelmente pelo valor motivador da recompensa utilizada. Portanto, o protocolo pode ser considerado adequado para a avaliação da memória de reconhecimento com múltiplas tentativas.

O reconhecimento de objetos é uma tarefa amplamente utilizada que requer um número considerável de animais. Aqui padronizamos um paradigma de reconhecimento e discriminação de objetos que reduz o número de animais, com menor nível de estresse para os animais, consequente de um menor manuseio, o que pode facilitar a obtenção de uma quantidade de dados com menor ruído de estresse (Hurst e West, 2010).

Um objetivo deste trabalho foi verificar as bases neurais da memória de reconhecimento e discriminação de objetos. Para isso, foram utilizadas diferentes porções anteroposteriores do hipocampo (Rostral, Medial, Caudal e Ventral), além de camadas distintas de estruturas do córtex parahipocampal. Considerando-se somente os animais que discriminaram em todas as condições, no que se refere à porção do hipocampo rostral, percebeu-se que a expressão de c-Fos em subáreas do CA3R e HilosR é dependente do

nível de similaridade, sendo aumentada à medida que a tarefa exige maior desambiguação das características quando comparada com tarefas com menores níveis de similaridade. Esses resultados corroboram com hipóteses que colocam o Giro denteado e CA3 como centrais em uma rede refinada que trabalha em processos de desambiguação de características similares, especificamente para objetos (Burke et al., 2018; Senzai, 2018; Stark & Stark, 2017).

Além disso, a expressão de c-Fos nos HilosR é aumentada à medida que cada nível de similaridade é apresentado, em uma direção de maior sobreposição (maior expressão de c-Fos). É interessante notar que o HilosR parece ser sensível a mudanças em todos os níveis de similaridade, isso corrobora com outros achados que apontam a ideia de que essa camada do giro possui maior ativação dependente de mudanças ambientais, o que permite que essa região seja crucial para a separação de padrões (Senzai & Buzsáki, 2017, Goodsmith et al., 2022). Esses achados foram muito similares aos encontrados por Scharfman et al. (2019), onde diferenças foram encontradas no hilos e não na camada granular em diferentes condições de novidade. Esses dados implicam células musgosas nos circuitos que levam à discriminação de objetos novos e similares, sendo importante para a desambiguação de memórias sobrepostas.

Outro achado interessante é que na região de CA3R houve uma expressão de c-Fos diferencial a depender da região de CA3R analisada. Os mesmos dados encontrados para o HilosR foram encontrados para a região do CA3cR e de forma muito similar no CA3bR, demonstrando que estas regiões estão de forma similar e progressiva envolvidas em processos de separação de padrões. Aqui cabe destacar que diversos estudos têm demonstrado o envolvimento do CA3 na desambiguação de memórias similares, por meio do processo de complementação de padrões (Neves, Cooke e Bliss, 2012; Senzai, 2018; Kang & Toyozumi, 2024).

É interessante notar que, apesar de se tratar da mesma região, estudos têm demonstrado que diferentes porções do eixo transversal do CA3R podem desempenhar papéis distintos, sendo a porção CA3cR mais diretamente conectada com o hilos, por meio das fibras musgosas e, portanto, mais estreitamente relacionada à não sobreposição de memórias por meio da separação de padrões, operações necessárias para codificação e recuperação da memória (Senzai & Buzsaki, 2017; Senzai, 2018; Lee et al., 2022, Moer et al. 2017). O CA3aR por sua vez recebe projeções diretamente do LEC, em essência, enquanto a atividade do CA3c é consistente com os cálculos de separação de padrões, os

padrões de atividade do CA3ab podem ser gradativamente atribuídos à conclusão do padrão (Berdugo-Veja, Dhingra & Calegari, 2023)

Não é observada diferença na expressão de c-Fos entre os grupos de maior similaridade, isso sugere que mesmo que o nível de similaridade aumente, a expressão de c-Fos em CA3 encontrou-se num ponto estável, sugerindo que um nível de ativação equilibrado é útil para a discriminação, estudos apontam uma relação em forma de U invertido entre a atividade CA3 e a capacidade de discriminar entre estímulos que compartilham características (Cooper, et al., 2022). A precisão da discriminação diminuirá se a atividade do CA3 for muito baixa ou muito alta (Kent et al., 2016, Lee et al, 2021).

Duffy et al, (2013) demonstraram que existe uma relação de inibição entre o Hilos (mais ativado) e a camada granular (menor ativação). A ausência de diferença de expressão na camada granular pode ser justificada pelas suas características fisiológicas das células granulares, sendo está uma célula mais silenciosa e hiperpolarizada com uma densa rede de interneurônios inibindo-a (Duffy et al., 2013).

Também similar a outros estudos, incluindo estudos de múltiplas tentativas, o c-Fos em diferentes porções anteroposteriores do hipocampo esteve associado a medidas comportamentais de reconhecimento (Barbosa & Silva, 2018, Aggleton et al. 2012, Barbosa et al., 2013, Albasser, Poirier & Aggleton, 2010). Nesse estudo, essa relação foi percebida principalmente para as condições com nível de similaridade. O nível de maior diferença entre os objetos tem uma relação negativa na expressão de c-Fos e comportamento, apontando que para essa condição é necessária uma redução na atividade geral para resolução da tarefa. No nível de maior similaridade, fortes correlações positivas foram encontradas em áreas centrais na separação de padrões e hipocampo (CA3cR, CA3bM). Esta observação apoia a ideia de que mais atividade, inclusive no CA3, aumenta a capacidade de discriminar entre estímulos que partilham características (Cooper, et al., 2022).

Nenhuma diferença foi encontrada para a expressão de c-Fos nas sub-regiões do hipocampo medial, caudal e ventral. Esse achado é similar ao encontrado por Botterill et al. (2021). Além disso, diversos estudos têm enfatizado o papel distinto do hipocampo rostral, posterior e ventral em componentes diferentes da memória, sendo o hipocampo posterior e ventral mais ligado aspectos emocional como condicionamento contextual, estando assim mais envolvido em processo de detecção de novidade e generalização de estímulos, sendo portanto o processo de separação de padrões uma especialização mais

direcionada ao hipocampo rostral (Fredes et al., 2021; Fanselow & Dong, 2009). Essas diferenças funcionais e na expressão de c-Fos podem ser justificadas pela forma distinta que a rede inibitória atua ao longo do eixo hipocampal anteroposterior, sendo a região rostral do hilos e CA3 não apenas menos hiperativada, mas também mediada por mais inativação indireta (interneurônios), uma vez que as células musgosas ventrais têm um efeito excitador sobre as células granulares dorsais e são essenciais para a formação da memória contextual. Em contraste, as células musgosas dorsais exercem um efeito inibitório sobre as células granulares dorsais e não são indispensáveis para a aquisição da memória (Scharfman et al., 2016; Fredes et al., 2021; Hsu, Lee, Tai & Lien, 2016).

No que diz respeito ao córtex, é interessante destacar que uma diferença na expressão de c-Fos é percebida apenas na região PHR-36P. Deve-se destacar que essa região tem sido atribuída como central dentro do processo de separação de padrões, além de ser considerada como mais especializada em reconhecimento de objetos, recebendo diversas projeções associativas (Burke 2018, Lee et al, 2021b, Pereira, Agster & Burwell, 2016). O que nota-se aqui é que essa expressão maior de c-Fos ocorre apenas para a condição de 50%, sugerindo que esta região trabalha com um nível de ativação similar ao CA3c e Hilos. Diversos estudos têm apontado que hiperatividades em regiões parahipocampais podem estar vinculadas a déficits em processo de separação de padrões, portanto um nível de ativação ideal deve ser mantido, a fim de se desambiguar e resolver a tarefa (Maurer, Burke, Diba & Barner, 2017; Lee et al, 2021b; Frick, Besson, Salmon, Delhay, 2023). Além disso, estudos têm demonstrado que o reconhecimento de objetos recruta a expressão de genes imediatos na camada V nas áreas 35 e 36 (Burke et al., 2012). Portanto, de alguma forma, a região profunda da área 36 do perirrinal deve desempenhar um papel na decodificação de características de objetos.

A ausência de diferença entre a condição de menor similaridade e os controles pode se justificar devido às características dos objetos aqui utilizados (LEGOS) que podem ser considerados objetos complexos com maior ambiguidade, elevando o nível de dificuldade da tarefa, portanto talvez a condição de controle NOR seja muito similar à condição de baixa similaridade (Aggleton *et al.*, 2010, Gámiz & Gallo, 2012).

No que se refere à análise de rede, demonstrou-se que para as condições com níveis de similaridade existem mais correlações significativas, demonstrando uma maior coatividade de pares, portanto pode-se inferir que essas regiões estão funcionalmente acopladas (Wheeler et al., 2013). Além disso, quando se observam os hubs para diferentes condições, percebe-se que diferentes porções do CA3 ao longo do eixo

horizontal e anteroposterior se colocam como hubs distintos para cada condição de similaridade. Destaca-se que, para a condição de 50% e DIST, não apenas distintas porções do CA3 são hubs, mas também diferentes porções anteroposteriores do hilos se destacam como nós centrais. Esse achado se dá pela forma dinâmica que o hipocampo funciona não apenas dentro do eixo CA3 horizontal, mas ao longo de todo hipocampo anteroposterior, sendo funcionalmente heterogêneo (Hsu, Lee, Tai & Lien, 2016; Fredes et al., 2021; Lee et al., 2022). Além disso, esse dado corrobora a ideia de que as áreas de CA3 e Hilos são centrais na separação de padrões, atuando de forma distinta, a depender de sua posição no eixo anteroposterior (Morales et al., 2020; Fredes et al., 2021; Lee et al., 2023).

O conectoma c-Fos poderia refletir o estado da memória durante a recordação, com redes cerebrais específicas desenvolvidas para memórias. Aqui, a força da rede, eficiência local e global da rede foi aumentada à medida que o nível de similaridade aumentava, com exceção da condição de 75%. Esse achado sugere que condições com maior similaridade e, conseqüentemente, maior necessidade de desambiguação requerem uma maior eficiência no fluxo global de informação entre as áreas, isso ocorre tanto para a rede como um todo, como para os nós próximos. Conseqüentemente, a rede envolvida na informação de 25%, DIST e 50% pode ser progressivamente muito plástica e robusta, permitindo um equilíbrio muito integrado de processamento local e global, levando a uma transferência de informação altamente eficiente a baixos custos de energia (Durieux et al., 2021). Isso seria essencial para a separação de padrões e o armazenamento distinto de entradas sobrepostas, visto que registros eletrofisiológicos, estudos de IEG e fMRI de alta resolução humana têm demonstrado que a dinâmica de separação/conclusão no DG e CA3 é complexa e depende amplamente do grau de similaridade de entrada (Yassa, Stark, 2011).

Apenas a condição NOR teve 5 clusters, percebe-se que as condições de similaridade terem apenas 4 clusters, porém condições de similaridade possuem menor valor de modularidade, significando que podem-se ser mais homogêneas, especialmente a condição de 50% e DIST, este achado corrobora com a ideia da necessidade de uma rede mais integrada para resolução de maior grau de similaridade (Yassa, Stark, 2011). Além disso, a forma como os clusters se conectam recruta regiões do hipocampo que estão funcionalmente intimamente mais interconectadas por projeções diretas, além de serem bastante distintas entre as condições. A exemplo, para a condição de 75% todas as subáreas do CA3 rostral foram recrutadas em conjunto com outras subáreas do CA3

medial, o que reproduz projeções anatomicamente funcionais e conhecidas (Berdugo-Veja, Dhingra & Calegari, 2023).

O não aumento da eficiência da rede entre as condições de 50% e 75% pode ser justificado pela ausência de uma resposta qualitativa que nos diga a “qualidade” com que a informação de maior similaridade é lembrada pelos animais, podendo essa ser uma condição mais difícil, o que conseqüentemente pode interferir em como a informação é armazenada. Em estudos com humanos, temos a curva ROC como uma medida de confiabilidade da resposta (Clark & Squire, 1998). Para investigações futuras, deve-se considerar um maior número de regiões a ser investigadas. Também se sugere a realização da tarefa por outras linhagens de rato, como Long-Evans. É importante realizar tarefas de separação de padrões envolvendo fêmeas na amostra, o que é uma limitação desse trabalho. Além disso, outros estudos devem buscar investigar e incluir o que acontece diante de uma condição de não discriminação. Também é interessante testar este protocolo com diferentes níveis de similaridade, apenas com uma tentativa por dia.

7. Conclusão

Apesar das limitações apresentadas pelos experimentos aqui realizados, pode-se estabelecer alguns pontos de partida tomando como base os achados aqui destacados. Acredita-se que esse protocolo comportamental pode ser utilizado para avaliar a memória de reconhecimento e a separação de padrões para objetos por meio de múltiplas tentativas, o que pode ser útil quando se exige um grande quantitativo de dados (ex: estudos eletrofisiológicos). Considerando-se as ressalvas da condição de 75%, a qual em outros estudos pode ser tratada como condição de não discriminação. É possível utilizar esse protocolo para que futuros estudos avaliem como perturbações ou intervenções dentro de circuitos cerebrais podem influenciar (prejudicando ou contribuindo) o processo de separação de padrões para objetos, uma vez que o protocolo atual possui condições de maior ou menor similaridade, o que influencia na demanda e dificuldade da tarefa e em como processos de separação de padrões serão recrutados para cada nível.

O hilo e o eixo horizontal do CA3 rostral são ativados de forma distinta a depender do nível de similaridade, demonstrando que estão diretamente envolvidos na desambiguação de memórias de objetos parecidos, tendo portanto papel central na separação de padrões. Este trabalho demonstrou que o hipocampo e as regiões parahipocampais trabalham como uma rede mais densamente integrada à medida que a

demanda de sobreposição entre as memórias aumenta, sugerindo que a rede hipocampo e para-hipocampo trabalha em conjunto para um processamento rápido e robusto da informação, dependente da similaridade. Esses achados contribuem para elucidar os mecanismos em torno das bases neurobiológicas da memória de reconhecimento e separação de padrões, processos estes bastante suscetíveis a alterações morfológicas e funcionais advindas do envelhecimento e doenças neurodegenerativas. Além disso, pode-se buscar expandir esses achados, investigando-se por meio deste protocolo diferentes modelos animais que mimetizem o envelhecimento e diversas alterações patológicas como epilepsia e doenças neurovegetativas, buscando assim identificar perturbações na rede hipocampal e para-hipocampal.

8. REFERÊNCIAS

- Acsády, L., Kamondi, A., Sík, A., Freund, T., Buzsáki, G., (1998). GABAergic cells are the major postsynaptic targets of mossy fibers in the rat hippocampus. *J. Neurosci.* 18, 3386–3403
- 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
- Aggleton, J. P., Brown, M. W., & Albasser, M. M. (2012). Contrasting brain activity patterns for item recognition memory and associative recognition memory: Insights from immediate-early gene functional imaging. *Neuropsychologia*, 50(13), 3141–3155. <https://doi.org/10.1016/j.neuropsychologia.2012.05.018>
- 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>
- Albasser, M. M., Chapman, R. J., Amin, E., Iordanova, M. D., Vann, S. D., & Aggleton, J. P. (2010). New behavioral protocols to extend our knowledge of rodent object recognition memory. *Learning and Memory*, 17(8), 407–419. <https://doi.org/10.1101/lm.1879610>
- Albasser, M. M., Olarte-Sánchez, C. M., Amin, E., Brown, M. W., Kinnavane, L., & Aggleton, J. P. (2015). Perirhinal cortex lesions in rats: Novelty detection and sensitivity to interference. *Behavioral Neuroscience*, 129(3), 227–243. <https://doi.org/10.1037/bne0000049>
- Albasser, M. M., Olarte-Sánchez, C. M., Amin, E., Horne, M. R., Newton, M. J., Warburton, E. C., & Aggleton, J. P. (2013). The neural basis of nonvisual object recognition memory in the rat. *Behavioral Neuroscience*, 127(1), 70–85.

<https://doi.org/10.1037/a0031216>

- Albasser, M. M., Poirier, G. L., & Aggleton, J. P. (2010). Qualitatively different modes of perirhinal-hippocampal engagement when rats explore novel vs. familiar objects as revealed by c-Fos imaging. *European Journal of Neuroscience*, 31(1), 134–147. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2009.07042.x>
- Ameen-Ali KE, Easton A, Eacott MJ. (2015). Moving beyond standard procedures to assess spontaneous recognition memory. *Neurosci Biobehav Rev.* 2015 Jun;53:37-51. doi: 10.1016/j.neubiorev.2015.03.013. Epub 2015 Apr 2. PMID: 25842032.
- 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>
- Ameen-Ali, K. E., Sivakumaran, M. H., Eacott, M. J., O'Connor, A. R., Ainge, J. A., & Easton, A. (2021). Perirhinal cortex and the recognition of relative familiarity. *Neurobiology of Learning and Memory*, 182(April), 107439. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2021.107439>
- Aminoff E, Gronau N, Bar M. (2007). The parahippocampal cortex mediates spatial and nonspatial associations. *Cereb Cortex* 7, 1493– 1503.
- Araujo, A. P. de C., de Lucena, J. D., Drieskens, D. C., Neves, L. R., Pugliane, K. C., Belchior, H. A., Castelo-Branco, R., & Barbosa, F. F. (2021). Rats recognize spatial and temporal attributes in a new object recognition memory task with multiple trials. *Journal of Neuroscience Methods*, 348(August 2020). <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2020.108936>
- Araujo, A. P. C., Dias, V., Farias, L., Barbosa, F. F., & Barbosa, F. F. (2025). Development of a rodent task for discrimination of stimuli with similar features. *Psychology and Neuroscience*. Advance online publication. <https://dx.doi.org/10.1037/pne0000356>
- Bar M, Aminoff E, Schacter D. (2008). Scenes unseen: The parahippocampal cortex subserves contextual associations, not scenes or places per se. *J Neurosci* 34,8539–8544.
- Bar M, Aminoff E. (2003). Cortical analysis of visual context. *Neuron* 2:347–358.
- Barbosa, F. F., & Silva, R. H. (2018). Immediate-Early Gene Expression in Neural Circuits Related to Object Recognition Memory. In *Handbook of Behavioral Neuroscience* (Vol. 27). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812012-5.00018-5>
- Barbosa, Flávio Freitas, Santos, J. R., Meurer, Y. S. R., Macêdo, P. T., Ferreira, L. M. S., Pontes, I. M. O., Ribeiro, A. M., & Silva, R. H. (2013). Differential Cortical c-Fos and Zif-268 Expression after Object and Spatial Memory Processing in a Standard or Episodic-Like Object Recognition Task. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 7(AUG), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2013.00112>
- 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>

- Beer, Z., Chwiesko, C., Kitsukawa, T., & Sauvage, M. M. (2013). Spatial and stimulus-type tuning in the LEC, MEC, POR, PrC, CA1, and CA3 during spontaneous item recognition memory. *Hippocampus*, 23(12), 1425–1438. <https://doi.org/10.1002/hipo.22195>
- Berdugo-Vega G, Dhingra S, Calegari F. Sharpening the blades of the dentate gyrus: how adult-born neurons differentially modulate diverse aspects of hippocampal learning and memory. *EMBO J.* 2023 Nov 15;42(22):e113524. doi: 10.15252/embj.2023113524. Epub 2023 Sep 25. PMID: 37743770; PMCID: PMC11059975.
- Bekinschtein, P., Cammarota, M., & Medina, J. H. (2014). BDNF and memory processing. *Neuropharmacology*, 76 Pt C, 677–683. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.04.024>
- Binicewicz, F. Z., van Strien, N. M., Wadman, W. J., van den Heuvel, M. P., & Cappaert, N. L. (2016). Graph analysis of the anatomical network organization of the hippocampal formation and parahippocampal region in the rat. *Brain structure & function*, 221(3), 1607–1621. <https://doi.org/10.1007/s00429-015-0992-0>
- Bisler, S., Schleicher, A., Gass, P., Stehle, J., H, Zilles, K., Staiger, J.F., (2002). Expression of c-fos, ICER, Krox-24 and JunB in the whisker-to-barrel pathway of rats: time course of induction upon whisker stimulation by tactile exploration of an enriched environment. *J. Chem. Neuroanat.* 23, 187–198.
- Botterill J. J., Gerencer K.J., Vinod K. Y., Alcantara-Gonzalez D. & Scharfman H. E. (2021). Dorsal and ventral mossy cells differ in their axonal projections throughout the dentate gyrus of the mouse hippocampus. *Hippocampus*. (5):522-539. doi: 10.1002/hipo.23314
- Botterill JJ, Vinod KY, Gerencer KJ, Teixeira CM, LaFrancois JJ, Scharfman HE. (2021) Bidirectional Regulation of Cognitive and Anxiety-like Behaviors by Dentate Gyrus Mossy Cells in Male and Female Mice. *J Neurosci.* Mar 17;41(11):2475-2495. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1724-20.2021.
- 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>
- Brunel, N. (2016). Is cortical connectivity optimized for storing information? *Nat. Neurosci.* 19, 749-755.
- Burke, S. N., Gaynor, L. S., Barnes, C. A., Bauer, R. M., Bizon, J. L., Roberson, E. D., & Ryan, L. (2018). Shared Functions of Perirhinal and Parahippocampal Cortices: Implications for Cognitive Aging. *Trends in Neurosciences*, 41(6), 349–359. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2018.03.001>
- Burke, S. N., Maurer, A. P., Hartzell, A. L., Nematollahi, S., Uprety, A., Wallace, J. L., et al. (2012b). Representation of three-dimensional objects by the rat perirhinal cortex. *Hippocampus*, 22(10), 2032–2044. <https://doi.org/10.1002/hipo.22060>
- 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>

- Chao, O. Y., de Souza Silva, M. A., Yang, Y. M., & Huston, J. P. (2020). The medial prefrontal cortex - hippocampus circuit that integrates information of object, place and time to construct episodic memory in rodents: Behavioral, anatomical and neurochemical properties. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 113(October 2019), 373–407. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2020.04.007>
- Clark, R. E., & Squire, L. R. (1998). Classical conditioning and brain systems: The role of awareness. *Science*, 280*(5360), 77–81. <https://doi.org/10.1126/science.280.5360.77>
- 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>
- Cooper T. L, Thompson J. J., Turner S. M., Watson C., Lubke K.N., Logan C. N., Maurer A. P. & Burke S.N. (2022). Unilateral Perforant Path Transection Does Not Alter Lateral Entorhinal Cortical or Hippocampal CA3 *Arc* Expression. *Front Syst Neurosci*. 16:920713. doi: 10.3389/fnsys.2022.920713
- 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>
- Dere, E., Huston, J. P., & De Souza Silva, M. A. (2005a). Episodic-like memory in mice: Simultaneous assessment of object, place and temporal order memory. *Brain Research Protocols*, 16(1-3), 10–19. doi:10.1016/j.brainresprot.2005.08.001
- Dere, E., Huston, J. P., & De Souza Silva, M. A. (2005b). Integrated memory for objects, places, and temporal order: Evidence for episodic-like memory in mice. *Neurobiology of Learning and Memory*, 84(3), 214–221. doi:10.1016/j.nlm.2005.07.002
- Dere, E., Kartteke, E., Huston, J., & De Sousa Silva, M. (2006). The case for episodic memory in animals. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 30(8), 1206–1224. doi:10.1016/j.neubiorev.2006.09.005
- Deshmukh S, Knierim J. (2011). Representation of non-spatial and spatial information in the lateral entorhinal cortex. *Front Behav Neurosci* 2011,5–69
- 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.

- Duffy, A. M., Schaner, M. J., Chin, J., & Scharfman, H. E. (2013). Expression of c-fos in hilar mossy cells of the dentate gyrus in vivo. *Hippocampus*, 23(8), 649–655. <https://doi.org/10.1002/hipo.22138>
- Durieux L., Herbeaux K., Borcuk C., Hildenbrand C., Andry V., Goumon Y., Barbelivien A., Mathis C., Bataglia D., Majchrzak M. & Lecourtier L. (2022). Functional brain-wide network mapping during acute stress exposure in rats: Interaction between the lateral habenula and cortical, amygdalar, hypothalamic and monoaminergic regions. *Eur J Neurosci*. 56(8):5154-5176. doi: 10.1111/ejn.15803.
- 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>
- Fanselow MS, Dong HW. Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron*. 2010 Jan 14;65(1):7-19. doi: 10.1016/j.neuron.2009.11.031. PMID: 20152109; PMCID: PMC2822727.
- Fisher, R. A. (1925). *Statistical methods for research workers*. Oliver & Boyd.
- Fornito, A., Zalesky, A., & Bullmore, E. (2016). *Fundamentals of brain network analysis*. Academic Press.
- Fredes, F., Silva, M. A., Koppensteiner, P., Kobayashi, K., Joesch, M., & Shigemoto, R. (2021). Ventro-dorsal hippocampal pathway gates novelty-induced contextual memory formation. *Current Biology*, 31(1), 25–38.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.09.074>
- Frick A, Besson G, Salmon E, Delhaye E. Perirhinal cortex is associated with fine-grained discrimination of conceptually confusable objects in Alz
- Furtak S, Ahmed O, Burwell R. (2012). Single neuron activity and theta modulation in postrhinal cortex during visual object discrimination. *Neuron* 5,976–988.
- 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>
- 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>

- Gonzalez, W. G., Zhang, H., Harutyunyan, A., & Lois, C. (2020). Persistence of neuronal representations through time and damage in the hippocampus. *Cell Reports*, 32(1), 107955. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107955>
- GoodSmith, D., Kim, S. H., Puliyadi, V., Ming, G. L., Song, H., Knierim, J. J., & Christian, K. M. (2022). Flexible encoding of objects and space in single cells of the dentate gyrus. *Current biology : CB*, 32(5), 1088–1101.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2022.01.023>
- Guzman, S.J., Schlögl, A., Frotscher, M., Jonas, P., (2016). Synaptic mechanisms of pattern completion in the hippocampal CA3 network. *Science* 353, 1117–1123
- Guzowski J. F. (2002). Insights into immediate-early gene function in hippocampal memory consolidation using antisense oligonucleotide and fluorescent imaging approaches. *Hippocampus*, 12(1), 86–104. <https://doi.org/10.1002/hipo.10010>
- 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>
- Hannesson, D. K., Howland, J. G., Phillips, A. (2004). Interaction between Perirhinal and Medial Prefrontal Cortex Is Required for Temporal Order But Not Recognition Memory for Objects in Rats. *Journal of Neuroscience*, 24(19), 4596–4604. doi:10.1523/jneurosci.5517-03.2004
- Hedges, L. V., & Olkin, I. (1985). *Statistical Methods for Meta-Analysis*. Academic Press.
- Henze, D.A., Wittner, L., Buzsáki, G., (2002). Single granule cells reliably discharge targets in the hippocampal CA3 network in vivo. *Nat. Neurosci.* 5, 790–795
- Houser C.R., Peng Z., Wei X., Huang C. S., & Mody, I. (2021). Mossy Cells in the Dorsal and Ventral Dentate Gyrus Differ in Their Patterns of Axonal Projections. *J Neurosci.* 41(5):991-1004. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2455-20.2020.
- Hsu TT, Lee CT, Tai MH, Lien CC. Differential Recruitment of Dentate Gyrus Interneuron Types by Commissural Versus Perforant Pathways. *Cereb Cortex*. 2016 Jun;26(6):2715-27. doi: 10.1093/cercor/bhv127.
- 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., Lubke, K. N., Cooper, T. L., Fertal, K. E., Bizon, J. L., Maurer, A. P., & Burke, S. N. (2019). Experience-dependent effects of muscimol-induced hippocampal excitation on mnemonic discrimination. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 12(January), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2018.00072>

- Johnson, S. A., Turner, S. M., Santacroce, 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>
- Kang, L., & Toyozumi, T. (2024). Distinguishing examples while building concepts in hippocampal and artificial networks. *Nature communications*, 15(1), 647. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-44877-0>
- 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>
- 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>
- Kubik, S., Miyashita, T., & Guzowski, J. F. (2007). Using immediate-early genes to map hippocampal subregional functions. *Learning & Memory*, 14(11), 758–770. doi:10.1101/lm.698107
- Lavenex, P., Suzuki, W. A., & Amaral, D. G. (2004). Perirhinal and Parahippocampal Cortices of the Macaque Monkey: Intrinsic Projections and Interconnections. *Journal of Comparative Neurology*, 472(3), 371–394. <https://doi.org/10.1002/cne.20079>
- Lee H, Wang Z, Tillekeratne A, Lukish N, Puliyadi V, Zeger S, Gallagher M, Knierim JJ. Loss of functional heterogeneity along the CA3 transverse axis in aging. *Curr Biol*. 2022 Jun 20;32(12):2681-2693.e4. doi: 10.1016/j.cub.2022.04.077
- Lee SM, Jin SW, Park SB, Park EH, Lee CH, Lee HW, Lim HY, Yoo SW, Ahn JR, Shin J, Lee SA, Lee I. Goal-directed interaction of stimulus and task demand in the parahippocampal region. *Hippocampus*. 2021 Jul;31(7):717-736. doi: 10.1002/hipo.23295.
- 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>
- Malhotra, S., Cross, R. W. A., & van der Meer, M. A. A. (2012). Theta phase precession beyond the hippocampus. *Reviews in the Neurosciences*, 23(1), 39–50.

<https://doi.org/10.1515/revneuro-2011-0064>

- 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>
- 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>
- Mendez, M., Arias, N., Uceda, S., & Arias, J. L. (2015). C-Fos expression correlates with performance on novel object and novel place recognition tests. *Brain Research Bulletin*, 117, 16–23. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2015.07.004>
- Miranda, M., Kent, B. A., Morici, J. F., Gallo, F., Saksida, L. M., Bussey, T. J., Weisstaub, N., & Bekinschtein, P. (2018). NMDA receptors and BDNF are necessary for discrimination of overlapping spatial and non-spatial memories in perirhinal cortex and hippocampus. *Neurobiology of Learning and Memory*, 155(July), 337–343. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2018.08.019>
- 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>
- Miranda, M., Morici, J. F., Gallo, F., Piromalli Girado, D., Weisstaub, N. V., & Bekinschtein, P. (2021). Molecular mechanisms within the dentate gyrus and the perirhinal cortex interact during discrimination of similar nonspatial memories. *Hippocampus*, 31(2), 140–155. <https://doi.org/10.1002/hipo.23269>
- Miranda, M., Morici, J. F., Zanoni, M. B., & Bekinschtein, P. (2019). Brain-Derived Neurotrophic Factor: A Key Molecule for Memory in the Healthy and the Pathological Brain. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13(August), 1–25. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00363>
- Mishkin M, Ungerleider L, Macko K. (1983). Object vision and spatial vision: Two cortical pathways. *Trends Neurosci* 6,414–417.
- Mitchell, J. B., & Laiacona, J. (1998). The medial frontal cortex and temporal memory: Tests using spontaneous exploratory behaviour in the rat. *Behavioural Brain Research*, 97(1–2), 107–113. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(98\)00032-1](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(98)00032-1)
- Miyashita, T., Kikuchi, E., Horiuchi, J., & Saitoe, M. (2018). Long-Term Memory Engram Cells Are Established by c-Fos/CREB Transcriptional Cycling. *Cell reports*, 25(10), 2716–2728.e3. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.11.022>
- Morales C., Morici J. F., Miranda M., Gallo F. T., Bekinschtein P. & Weisstaub N. V. (2020) Neurophotonic Approaches for the Study of Pattern Separation. *Front Neural Circuits*. 14:26. doi: 10.3389/fncir.2020.00026.
- Nath, T., Mathis, A., Chen, A.C. et al. (2019). Using DeepLabCut for 3D markerless pose estimation across species and behaviors. *Nat Protoc* 14, 2152–2176.

<https://doi.org/10.1038/s41596-019-0176-0>

- Neves, G., Cooke, S. F., & Bliss, T. V. (2008). Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. *Nature reviews Neuroscience*, 9(1), 65–75. <https://doi.org/10.1038/nrn2303>
- Nilson et al., (2020) Simple Behavioral Analysis (SimBA) – an open source toolkit for computer classification of complex social behaviors in experimental animals. *Cold Spring Harbor Laboratory*. 04(19) 049452. Doi: 10.1101/2020.04.19.049452
- 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>
- Pause, B. M., Zlomuzica, A., Kinugawa, K., Mariani, J., Pietrowsky, R., & Dere, E. (2013). Perspectives on Episodic-Like and Episodic Memory. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 7(1), 33. <http://doi.org/10.3389/fnbeh.2013.00033>
- Prusky, G.T.; Douglas, R.M. (2005). The behavior of the laboratory rat: a handbook with tests. In: WHISHAW, I.Q.; KOLB, B. Oxford University Press, Inc. ISBN 0-19-516285-4.
- Reagh, Z. M., Ho, H. D., Leal, S. L., Noche, J. A., Chun, A., Murray, E. A., & Yassa, M. A. (2016). Greater loss of object than spatial mnemonic discrimination in aged adults. *Hippocampus*, 26(4), 417–422. <https://doi.org/10.1002/hipo.22562>
- Reagh, Z. M., Noche, J. A., Tustison, N. J., Delisle, D., Murray, E. A., & Yassa, M. A. (2018). Functional Imbalance of Anterolateral Entorhinal Cortex and Hippocampal Dentate/CA3 Underlies Age-Related Object Pattern Separation Deficits. *Neuron*, 97(5), 1187–1198.e4. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.01.039>
- Robbins, M.A., Ryan, C.L., Adams-Marriott, A.L. and Doucette, T.A. (2013) Temporal Memory Dysfunction and Alterations in Tyrosine Hydroxylase Immunoreactivity in Adult Rats Following Neonatal Exposure to Domoic Acid. *Neuroscience and Medicine*, 4 (1), 29-35
- Rolls, E. T., & Kesner, R. P. (2006). A computational theory of hippocampal function, and empirical tests of the theory. *Progress in Neurobiology*, 79(1), 1–48. doi:10.1016/j.pneurobio.2006.04.005
- Rolls, E.T., (2013). The mechanisms for pattern completion and pattern separation in the hippocampus. *Front. Syst. Neurosci.* 7, 74
- 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>

- Rubinov, M., & Sporns, O. (2010). Complex network measures of brain connectivity: Uses and interpretations. *NeuroImage*, 52(3), 1059-1069. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2009.10.003>
- Sauvage M, Fortin N, Owens C, Yonelinas A, Eichenbaum H. (2008). Recognition memory: Opposite effects of hippocampal damage on recollection and familiarity. *Nat Neurosci* 1, 16–18.
- Sauvage M. (2010). ROC in animals: Uncovering the neural substrates of recollection and familiarity in episodic recognition memory. *Conscious Cogn* 3, 816–828
- 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>
- Seel, S.V., Eacott, M.J., Langston, R.F., Easton, A., (2018). Cholinergic input to the hippocampus is not required for a model of episodic memory in the rat, even with multiple consecutive events. *Behav. Brain Res.* 354, 48–54. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.06.001>
- 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
- Senzai, Y. (2018). Function of local circuits in the hippocampal dentate gyrus-CA3 system. *Neuroscience Research*, 140, 43–52. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2018.11.003>
- Senzai, Y., & Buzsáki, G. (2017). Physiological Properties and Behavioral Correlates of Hippocampal Granule Cells and Mossy Cells. *Neuron*, 93(3), 691–704.e5. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.12.011>
- Seoane, A., Tinsley, C. J., & Brown, M. W. (2012). Interfering with Fos expression in rat perirhinal cortex impairs recognition memory. *Hippocampus*, 22(11), 2101–2113. <https://doi.org/10.1002/hipo.22028>
- Sethumadhavan N, Strauch C, Hoang TH, Manahan-Vaughan D. The Perirhinal Cortex Engages in Area and Layer-Specific Encoding of Item Dimensions. *Front Behav Neurosci.* 2022 Jan 4;15:744669. doi: 10.3389/fnbeh.2021.744669.
- 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>
- Strange, B. A., Witter, M. P., Lein, E. S., & Moser, E. I. (2014). Functional organization

- of the hippocampal longitudinal axis. *Nature Reviews Neuroscience*, 15(10), 655–669. <https://doi.org/10.1038/nrn3785>
- Sugar, J., Witter, M. P., van Strien, N. M., & Cappaert, N. L. M. (2011). The retrosplenial cortex: Intrinsic connectivity and connections with the (para)hippocampal region in the rat. An interactive connectome. **Frontiers in Neuroinformatics, 5**, Article 7. <https://doi.org/10.3389/fninf.2011.00007>
- 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>
- Pereira, T. I., Agster, K. L., Burwell, R. D. Subcortical connections of the perirhinal, postrhinal, and entorhinal cortices of the rat. I. afferents. *Hippocampus*. 2016 Sep;26(9):1189-212. doi: 10.1002/hipo.22603.
- 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>
- Touitou, Y. (2013) Adolescent sleep misalignment: a chronic jet lag and a matter of public health. *Journal of Physiology-Paris*, 107,(4), p. 323-326.
- Tulving, E. (2002). Episodic memory: From mind to brain. *Annual Review of Psychology*, 53(1), 1–25. 10.1146 / annurev.psych.53.100901.135114
- van Dijk, M. T., & Fenton, A. A. (2018). On How the Dentate Gyrus Contributes to Memory Discrimination. *Neuron*, 98(4), 832–845.e5. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.04.018>
- Van Strien, N. M., Cappaert, N. L. M., & Witter, M. P. (2009). The anatomy of memory: An interactive overview of the parahippocampal- hippocampal network. *Nature Reviews Neuroscience*, 10(4), 272–282. <https://doi.org/10.1038/nrn2614>
- Van Strien, N. M., Cappaert, N. L. M., & Witter, M. P. (2009). The anatomy of memory: An interactive overview of the parahippocampal–hippocampal network. **Nature Reviews Neuroscience, 10*(4), 272–282. <https://doi.org/10.1038/nrn2614>*
- Wang Q, Gao E, Burkhalter A. (2011). Gateways of ventral and dorsal streams in mouse visual cortex. *J Neurosci* 5,1905–1918
- Wheeler, A.L., Teixeira, C.M., Wang, A.H., Xiong, X., Kovacevic, N., Lerch, J.P., McIntosh, A.R., Parkinson, J., & Frankland, P.W., (2013). Identification of a functional connectome for long-term fear memory in mice. *PLoS Comput. Biol.* 9, e1002853. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002853>
- Yassa MA, Stark CE. Pattern separation in the hippocampus. *Trends Neurosci.* 2011 Oct;34(10):515-25. doi: 10.1016/j.tins.2011.06.006.
- Yonelinas A. (1997) Recognition memory ROCs for item and associate information: The contribution of recollection and familiarity. *Mem Cognit* 6, 747–763.
- Yushkevich, P. A., Pluta, J. B., Wang, H., Xie, L., Ding, S.-L., Gertje, E. C., Mancuso, L., Kliot, D., Das, S. R., & Wolk, D. A. (2016). Quantitative comparison of 21 protocols for labeling hippocampal subfields and parahippocampal subregions in vivo MRI: Towards a harmonized segmentation protocol. *Neuron*, 92(2), 439–466.

<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.10.027>

Zhuo, J., Fan, L., Liu, Y., Zhang, Y., Yu, C., & Jiang, T. (2016). Connectivity profiles reveal a transition subarea in the parahippocampal region that integrates the anterior temporal–posterior medial systems. *Journal of Neuroscience*, 36(9), 2782–2795. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1975-15.2016>

Anexos

MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela suplementar 1. Índices de discriminação (2) para a tarefa de reconhecimento e discriminação de objetos com diferentes níveis de similaridade, piloto comportamental.

Índice de discriminação (D2)					
Tarefa	Tentativa	t	p	Média	Erro padrão
NOR	1	4,500	0,004*	0,239	0,053
	2	2,306	0,061*	0,225	0,097
	3	3,184	0,019*	0,242	0,076
	4	3,693	0,010*	0,273	0,073
	5	3,745	0,010*	0,213	0,056
	6	5,417	0,002*	0,207	0,038
	7	4,985	0,002*	0,187	0,037
	8	5,086	0,002*	0,182	0,035
	9	7,067	0,000*	0,187	0,026
	10	8,567	0,000*	0,180	0,021
	11	8,102	0,000*	0,187	0,023
	12	10,963	0,000*	0,192	0,017
25%	1	-0,819	0,450	-0,082	0,101
	2	-0,012	0,991	-0,001	0,094
	3	1,774	0,136	0,108	0,061
	4	2,911	0,033*	0,175	0,060
50%	1	-0,819	0,450	-0,082	0,100

	2	7,029	0,001*	0,256	0,036
	3	4,189	0,009*	0,268	0,064
	4	3,195	0,024*	0,239	0,074
75%	1	-0,819	0,450	-0,082	0,100
	2	-0,270	0,798	-0,053	0,196
	3	-0,424	0,689	-0,082	0,194
	4	-0,222	0,833	-0,035	0,161

* valores significativos (<de 0,05)

Tabela suplementar 2. Índices de discriminação (D2) para cada minuto dentro de cada tentativa para a tarefa de reconhecimento, piloto comportamental.

Índice de discriminação (D2) tarefa NOR						
Tarefa	Tentativa	Minuto	t	p	Média	Erro padrão
NOR	1	1	3,376	0,015*	0,441	0,130
		2	3,287	0,017*	0,312	0,095
		3	4,500	0,004*	0,239	0,053
	2	1	2,231	0,067	0,347	0,155
		2	2,139	0,076	0,264	0,123
		3	1,578	0,166	0,230	0,145
	3	1	1,416	0,206	0,215	0,152
		2	2,280	0,063	0,333	0,146
		3	1,927	0,102	0,236	0,122
	4	1	1,160	0,290	0,286	0,246
		2	0,584	0,580	0,137	0,234
		3	1,792	0,123	0,256	0,142
	5	1	-2,006	0,092	-0,285	0,142
		2	-0,727	0,495	-0,131	0,181
		3	-0,742	0,486	-0,108	0,145
	6	1	0,012	0,991	0,002	0,233
		2	-0,145	0,889	-0,018	0,126
		3	0,774	0,468	0,094	0,122
	7	1	0,501	0,634	0,080	0,161
		2	-0,037	0,972	-0,005	0,134
		3	0,203	0,846	0,030	0,152
	8	1	0,545	0,605	0,068	0,126
		2	2,620	0,040*	0,201	0,076
		3	1,766	0,128	0,149	0,084
	9	1	0,093	0,929	0,017	0,188
		2	0,631	0,551	0,115	0,183
		3	1,688	0,142	0,189	0,112
	10	1	0,232	0,824	0,051	0,220
		2	-0,112	0,915	-0,020	0,178
		3	0,562	0,595	0,084	0,150
	11	1	0,350	0,741	0,093	0,268
		2	1,198	0,276	0,162	0,135
		3	0,866	0,420	0,134	0,155
	12	1	1,883	0,109	0,463	0,246
		2	1,088	0,319	0,269	0,247

	3	2,125	0,078	0,355	0,167
--	---	-------	-------	-------	-------

* valores significativos (<de 0,05)

Tabela suplementar 3. Índices de discriminação (D2) para cada minuto ao longo das tentativas para a tarefa de discriminação de objetos com diferentes níveis de similaridade, piloto comportamental.

Índice de discriminação (D2) tarefa discriminação em diferentes níveis de similaridade						
Condição	Minuto	Tentativa	t	P	Média	Erro padrão
25%	1	1	-0,752	0,481	-0,133	0,177
		2	-0,264	0,801	-0,027	0,104
		3	-0,717	0,500	-0,062	0,087
	2	1	0,992	0,360	0,120	0,121
		2	1,069	0,326	0,154	0,144
		3	0,805	0,451	0,106	0,132
	3	1	4,909	0,003*	0,418	0,085
		2	4,655	0,003*	0,423	0,090
		3	4,634	0,004*	0,404	0,087
	4	1	0,530	0,615	0,093	0,175
		2	1,884	0,109	0,283	0,150
		3	1,912	0,104	0,338	0,177
50%	1	1	2,355	0,057	0,295	0,125
		2	6,283	0,001*	0,283	0,045
		3	6,821	0,000*	0,274	0,040
	2	1	1,557	0,170	0,166	0,106
		2	3,786	0,009*	0,246	0,065
		3	3,011	0,024*	0,205	0,068
	3	1	1,050	0,334	0,265	0,252
		2	0,940	0,384	0,209	0,222
		3	1,348	0,226	0,264	0,195
	4	1	0,361	0,730	0,086	0,239
		2	0,466	0,657	0,095	0,204
		3	0,645	0,543	0,126	0,196
75%	1	1	0,495	0,638	0,103	0,209
		2	0,225	0,829	0,053	0,237
		3	0,108	0,917	0,024	0,221
	2	1	-1,788	0,134	-0,248	0,138
		2	-1,398	0,221	-0,220	0,157
		3	-0,909	0,405	-0,136	0,150
	3	1	-0,882	0,412	-0,125	0,142
		2	-1,274	0,250	-0,193	0,151
		3	-1,153	0,293	-0,197	0,170
	4	1	-1,246	0,259	-0,123	0,097
		2	0,471	0,654	0,039	0,084
		3	0,240	0,818	0,017	0,073

* valores significativos (<de 0,05)

Tabela suplementar 4. Índices de discriminação (2) para a tarefa de reconhecimento e discriminação de objetos com diferentes níveis de similaridade, imunofluorescência.

Índice de discriminação (D2)					
Condição	Tentativa	t	p	Média	Erro padrão
NOR	1	3,227	0,015*	0,338	0,104
	2	2,698	0,031*	0,312	0,115
	3	3,192	0,015*	0,300	0,094
	4	3,215	0,015*	0,238	0,074
DIST	1	0,545	0,602	0,038	0,071
	2	1,366	0,214	0,157	0,115
	3	2,802	0,026*	0,255	0,091
	4	2,633	0,034*	0,240	0,091
25%	1	1,067	0,335	0,072	0,068
	2	2,000	0,102	0,109	0,054
	3	1,155	0,300	0,074	0,064
	4	3,732	0,014*	0,104	0,028
50%	1	-0,199	0,848	-0,017	0,086
	2	1,789	0,124	0,150	0,083
	3	2,487	0,047*	0,165	0,066
	4	3,019	0,023*	0,151	0,050
75%	1	3,946	0,011*	0,308	0,078
	2	1,677	0,154	0,206	0,123
	3	2,712	0,042*	0,227	0,083
	4	2,806	0,038*	0,208	0,074

* valores significativos (<de 0,05)

Tabela suplementar 5. Índices de discriminação (D2) para cada minuto dentro de cada tentativa para a tarefa de reconhecimento, piloto comportamental.

Índice de discriminação (D2) tarefa NOR						
Condição	Tentativa	Minuto	t	p	Média	Erro padrão
NOR	1	1	1,875	0,103	0,336	0,179
		2	2,265	0,058	0,320	0,141
		3	3,227	0,015*	0,338	0,104
	2	1	1,334	0,224	0,207	0,155
		2	1,379	0,210	0,241	0,175
		3	1,789	0,117	0,266	0,148
	3	1	0,729	0,490	0,153	0,210
		2	1,968	0,090	0,262	0,133
		3	2,757	0,028*	0,347	0,126
	4	1	-1,427	0,197	-0,223	0,156
		2	-0,640	0,543	-0,101	0,158
		3	-0,294	0,778	-0,043	0,147
DIST	1	2	0,617	0,557	0,134	0,218
		3	-0,269	0,796	0,029	0,171

		3	3,216	0,018*	0,159	0,115
	2	1	1,043	0,332	0,210	0,201
		2	0,688	0,514	0,190	0,210
		3	1,567	0,168	0,176	0,166
	3	1	-0,065	0,950	-0,015	0,234
		2	0,536	0,609	0,230	0,175
		3	0,215	0,836	0,174	0,143
	4	1	0,471	0,654	-0,043	0,091
		2	1,117	0,307	-0,128	0,141
		3	0,751	0,486	-0,134	0,145
25%	1	2	-2,392	0,054	-0,276	0,115
		3	-1,438	0,200	-0,186	0,129
		3	1,411	0,208	0,082	0,058
	2	1	0,244	0,815	0,061	0,252
		2	1,528	0,177	0,251	0,164
		3	1,717	0,137	0,230	0,133
	3	1	0,139	0,894	0,037	0,266
		2	0,801	0,454	0,097	0,121
		3	0,819	0,444	0,103	0,126
	4	1	0,517	0,627	0,128	0,248
		2	1,049	0,342	0,193	0,184
		3	1,731	0,144	0,244	0,141
50%	1	2	-0,334	0,750	-0,080	0,239
		3	0,949	0,379	0,137	0,144
		3	1,456	0,196	0,064	0,044
	2	1	0,380	0,717	0,092	0,242
		2	0,579	0,584	0,103	0,177
		3	0,925	0,391	0,127	0,138
	3	1	1,052	0,333	0,224	0,213
		2	3,411	0,014*	0,322	0,094
		3	1,464	0,194	0,161	0,110
	4	1	0,611	0,563	0,128	0,210
		2	1,349	0,226	0,159	0,117
		3	0,862	0,422	0,073	0,085
75%	1	2	-0,581	0,586	-0,147	0,253
		3	0,417	0,694	0,094	0,226
		3	1,135	0,308	0,178	0,157
	2	1	0,750	0,487	0,177	0,237
		2	1,944	0,109	0,255	0,131
		3	0,773	0,474	0,150	0,194
	3	1	1,317	0,245	0,274	0,208
		2	0,294	0,780	0,053	0,182
		3	2,748	0,040*	0,284	0,103
	4	1	2,606	0,048*	0,342	0,131
		2	0,922	0,399	0,165	0,179
		3	1,898	0,116	0,279	0,147

* valores significativos (<de 0,05)

Tabela suplementar 6. Comparações estatísticas da expressão de c-Fos em cada área do hipocampo, entre todas as condições.

		Estatísticas dos testes ANOVA ou K-W	
Hipocampo Rostral	Área	F ou H	p
	CA1R	H=9,071	0,059
	CA2R	H=5,469	0,242
	CA3aR	H=9,067	0,059
	CA3bR	H=12,496	0,014*
	CA3cR	H=4,677	0,005*
	GranularR	H=4,094	0,393
	HilosR	F= 4,514	0,006*
Hipocampo Medial	SubículoM	H=6,003	0,199
	CA1M	H=3,592	0,464
	CA2M	H=4,150	0,386
	CA3aM	F=0,491	0,742
	CA3bM	H=2,093	0,0719
	CA3cM	H=4,690	0,321
	Granular	F=1,194	0,335
	Hilos	F= 2,920	0,571
Hipocampo Caudal	SubículoC	H=3,362	0,499
	CA1C	F=1,600	0,203
	CA3C	H=4,877	0,300
	HilosC	F=0,515	0,725
	GranularC	H=2,085	0,720
Hipocampo Ventral	SubículoV	F=0,215	0,928
	CA1V	F=2,071	0,113
	CA3V	H=0,802	0,938
	HilosV	F=1,397	0,280
	GranularV	H=3,656	0,301
Córtex	PRH-36S	F=2,605	0,061
	PRH-36P	H=10,260	0,036*
	PRH-35S	F=0,763	0,560
	PRH-35P	H=2,908	0,573
	LECP	H=1,599	0,809
	LECS	F=1,776	0,167

* valores significativos (<de 0,05)

Tabela suplementar 7. Contraste planejados para cada área entre condições

Area	Estatísticas dos testes		
CA3cR	Condições	t	p
	NORe DIST x 25%, 50% e 75%	2,844	0,008*

	25% x 50% e 75%	2,996	0,006*
	50% x 75%	-1,085	0,287
	NOR x DIST	0,405	0,688
HilosR			
	NOR e DIST x 25%, 50% e 75%	2,871	0,008*
	25% x 50% e 75%	2,753	0,010*
	50% x 75%	-1,706	0,099
	NOR x DIST	-0,545	0,590
CA3aM			
	NOR e DIST x 25%, 50% e 75%	1,286	0,209
	25% x 50% e 75%	0,278	0,783
	50% x 75%	-0,414	0,682
	NOR x DIST	-0,402	0,691
GranularM			
	NOR e DIST x 25%, 50% e 75%	0,929	0,361
	25% x 50% e 75%	1,040	0,307
	50% x 75%	-1,511	0,142
	NOR x DIST	0,374	0,711
CA1C			
	NOR e DIST x 25%, 50% e 75%	0,636	0,530
	25% x 50% e 75%	1,699	0,101
	50% x 75%	-1,355	0,187
	NOR x DIST	0,805	0,428
CA1V			
	NOR e DIST x 25%, 50% e 75%	-1,636	0,113
	25% x 50% e 75%	0,707	0,486
	50% x 75%	-1,043	0,306
	NOR x DIST	-1,688	0,103
SubículoV			
	NOR e DIST x 25%, 50% e 75%	0,082	0,935
	25% x 50% e 75%	-0,507	0,617
	50% x 75%	0,035	0,972
	NOR x DIST	0,741	0,465

* valores significativos (<de 0,05)

Tabela suplementar 8. Correlação entre a expressão de c-Fos e o comportamento para a condição NOR

Área	Correlação	p-valor
CA1R	-0,714	0,088
CA2R	-0,607	0,167
CA3aR	-0,607	0,167
CA3bR	-0,786	0,048*
GranularR	-0,667	0,102
CA3cR	-0,669	0,101
HilosR	-0,804	0,029*
CA3aM	-0,339	0,511
GranularM	-0,608	0,2
SubículoM	0,0	1,0
CA1M	-0,2	0,714
CA2M	-0,319	0,538
CA3bM	-0,2	0,714
CA3cM	-0,58	0,228
HilosM	-0,464	0,354
SubículoV	-0,157	0,767
CA1C	-0,071	0,894
CA1V	-0,278	0,594
HilosC	-0,321	0,535
HilosV	-	-
SubículoC	-0,2	0,714
CA3C	-0,314	0,564
CA3V	-0,371	0,497
GranularC	-0,314	0,564
GranularV	-	-
PRH-36S	-0,618	0,191
PRH-35S	-0,455	0,364
LECS	-0,534	0,275
PRH-36P	-0,812	0,05
PRH-35P	-0,886	0,01*
LECP	-0,029	1,0

* valores significativos (<de 0,05)

Tabela suplementar 9. Correlação entre a expressão de c-Fos e o comportamento para a condição DIST

Área	Correlação	p-valor
CA1R	0,396	0,379
CA2R	0,378	0,403
CA3aR	0,252	0,585
CA3bR	0,429	0,354
GranularR	0,162	0,728
CA3cR	0,456	0,304
HilosR	0,559	0,192
CA3aM	0,665	0,103
GranularM	0,436	0,328
SubículoM	0,45	0,31
CA1M	0,357	0,444
CA2M	0,143	0,783

CA3bM	0,45	0,31
CA3cM	0,214	0,662
HilosM	0,393	0,396
SubículoV	0,514	0,238
CA1C	-0,176	0,705
CA1V	0,301	0,512
HilosC	0,211	0,65
HilosV	0,633	0,127
SubículoC	0,786	0,04*
CA3C	-0,257	0,658
CA3V	-0,314	0,564
GranularC	-0,5	0,267
GranularV	0,286	0,556
PRH-36S	0,369	0,415
PRH-35S	0,513	0,239
LECS	0,574	0,178
PRH-36P	0,571	0,2
PRH-35P	0,286	0,556
LECP	0,321	0,498

* valores significativos (<de 0,05)

Tabela suplementar 10. Correlação entre a expressão de c-Fos e o comportamento para a condição 25%

Área	Correlação	p-valor
CA1R	0,714	0,088
CA2R	0,709	0,074
CA3aR	0,643	0,139
CA3bR	0,468	0,29
GranularR	0,25	0,595
CA3cR	0,696	0,083
HilosR	0,549	0,202
CA3aM	0,782	0,038*
GranularM	0,587	0,166
SubículoM	0,321	0,498
CA1M	0,536	0,236
CA2M	0,577	0,175
CA3bM	0,45	0,31
CA3cM	0,45	0,31
HilosM	-0,036	0,963
SubículoV	0,738	0,094
CA1C	0,786	0,064
CA1V	0,449	0,372
HilosC	0,126	0,812
HilosV	-0,012	0,992
SubículoC	0,029	1,0
CA3C	-0,564	0,322
CA3V	-0,7	0,233
GranularC	-0,143	0,803
GranularV	1,0	0,333

PRH-36S	0,62	0,265
PRH-35S	0,264	0,668
LECS	0,354	0,559
PRH-36P	0,1	0,95
PRH-35P	0,2	0,783
LECP	-0,1	0,95

* valores significativos (<de 0,05)

Tabela suplementar 11. Correlação entre a expressão de c-Fos e o comportamento para a condição 50%

Área	Correlação	p-valor
CA1R	0,943	0,017*
CA2R	0,657	0,175
CA3aR	0,754	0,084
CA3bR	0,754	0,084
GranularR	0,543	0,297
CA3cR	0,835	0,039*
HilosR	0,545	0,263
CA3aM	0,092	0,844
GranularM	-0,129	0,783
SubículoM	0,357	0,444
CA1M	0,107	0,84
CA2M	0,071	0,906
CA3bM	0,214	0,662
CA3cM	0,107	0,84
HilosM	0,214	0,662
SubículoV	0,442	0,38
CA1C	0,41	0,361
CA1V	0,643	0,119
HilosC	0,353	0,437
HilosV	0,866	0,058
SubículoC	-0,107	0,84
CA3C	0,029	1,0
CA3V	0,257	0,658
GranularC	0,214	0,662
GranularV	0,1	0,95
PRH-36S	0,233	0,657
PRH-35S	0,06	0,91
LECS	0,384	0,452
PRH-36P	0,58	0,228
PRH-35P	0,086	0,919
LECP	-0,143	0,803

* valores significativos (<de 0,05)

Tabela suplementar 12. Correlação entre a expressão de c-Fos e o comportamento para a condição 75%

Área	Correlação	p-valor
CA1R	0,657	0,175
CA2R	0,812	0,05
CA3aR	0,314	0,564
CA3bR	0,771	0,103
GranularR	0,486	0,356
CA3cR	0,856	0,03*
HilosR	0,719	0,107
CA3aM	0,149	0,779
GranularM	0,585	0,223
SubículoM	0,6	0,242
CA1M	0,371	0,497
CA2M	0,667	0,148
CA3bM	0,886	0,019*
CA3cM	0,667	0,148
HilosM	0,522	0,288
SubículoV	0,534	0,275
CA1C	0,747	0,088
CA1V	0,206	0,696
HilosC	0,771	0,073
HilosV	0,631	0,253
SubículoC	0,657	0,175
CA3C	0,2	0,783
CA3V	-0,1	0,95
GranularC	0,486	0,356
GranularV	0,5	0,45
PRH-36S	0,947	0,015*
PRH-35S	0,289	0,637
LECS	-0,182	0,77
PRH-36P	0,8	0,133
PRH-35P	0,5	0,45
LECP	-0,2	0,783

* valores significativos (<de 0,05)

Tabela suplementar 13. Medidas de Centralidade para cada região em grafos para cada condição, parte 1.

Áreas	NOR			DIST			25%		
	Grau	Centra lidade	Forç a	Grau	Centr alidad e	Forç a	Grau	Centr alidad e	Força
PRH36S	0*	0*	0*	3*	0*	2,571 *	7*	8,277*	7*
PRH36P	2*	0*	1,913	6*	35,65*	5,033	4	7*	3,974
PRH35S	4*	92,5*	3,612 *	7*	0,742*	5,871 *	4*	7*	3,898

PRH35P	2	0*	1,871	8*	12,93*	6,703 *	7*	8,277*	7*
LECS	3*	18*	2,493	10*	4,855*	8,783 *	4*	7*	3,974
LECP	2*	0*	1,828	12*	30,37*	10,23 *	1*	0*	1*
CA1R	2	1*	1,828	8*	27,51*	6,756 *	0*	0*	0*
CA2R	0*	0*	0*	0*	0*	0*	2*	0*	1,835*
CA3aR	1*	0*	0,840 *	10*	22,13	8,636 *	0*	0*	0*
CA3bR	2	0*	1,697	5	5,683*	4,355	3*	0*	2,423*
CA3cR	3*	48*	2,654 *	2*	0*	1,664 *	5*	20,63	4,084
Granular R	1*	0*	0,942 *	4*	19,87*	3,153 *	1*	0*	0,857*
HilosR	0*	0*	0*	8*	74,61*	6,873 *	6*	5,366*	5,624*
Subiculo M	4*	11*	3,390 *	6	14,76*	5,386	8*	24,75*	6,979*
CA1M	3*	0*	2,739 *	7*	22,80*	6,140 *	6*	28,36*	5,067
CA2M	7*	81*	6,346 *	10*	15,81*	8,712 *	7*	19,18*	5,825*
Ca3aM	3*	90*	2,711 *	10*	26,21*	8,540 *	10*	30,08*	9,049*
CA3bM	3	0*	2,739 *	9*	7,461*	7,493 *	10*	36,36	9,149*
CA3cM	4*	65,5*	3,549 *	6	25,32*	5,204	11*	50,78*	9,899*
Granular M	5*	34*	4,483 *	6	27,73*	5,247	4	2,5*	3,518
HilosM	2	0*	1,723	12*	65,20*	10,41 *	6*	5,366*	5,660*
CA1C	3*	0*	2,784 *	2*	0*	1,892 *	4*	0,458*	3,594*
CA1V	0*	0*	0*	2*	0*	1,596 *	6*	2,022*	5,670*
SUBC	3*	0*	2,784 *	1*	0*	0,785 *	10*	94,16*	9,194*

SUBV	0*	0*	0*	9*	2,819*	8,052*	3*	0*	2,974*
CA3C	3*	5,5*	2,771*	1*	0*	0,942*	0*	0*	0*
CA3V	5*	20,5*	4,510*	1*	0*	0,942*	0*	0*	0*
GRANC	1*	0*	0,885*	1*	0*	0,892*	3*	0,833*	2,726*
GRANV	0*	0*	0*	6	26,54*	5,142	0*	0*	0*
HILOSC				4*	32,24*	3,239*	6*	27,54	5,539*
HILOSV				6*	63,68*	5,032*	0*	0*	0*

* valores significativos (<de 0,05)

Tabela suplementar 14. Medidas de Centralidade para cada região em grafos para cada condição, parte 2.

Áreas	50%			75%		
	Grau	Centralidade	Força	Grau	Centralidade	Força
PRH36S	6*	0,2*	5,554	8*	56,57*	7,974*
PRH36P	2*	0*	1,652*	1*	0*	1*
PRH35S	8	1,001*	7,240*	0*	0*	0*
PRH35P	0*	0*	0*	0*	0*	0*
LECS	0*	0*	0*	1*	0*	1*
LECP	0*	0*	0*	0*	0*	0*
CA1R	15*	20,82*	13,04*	6*	32,59*	5,481*
CA2R	12*	1,666*	10,60*	6*	10,81*	5,695*
CA3aR	18*	21,77*	16,09*	2*	8*	1,783*
CA3bR	15*	9,216*	13,36*	5*	5,330*	4,799*

CA3cR	15*	8,549*	13,28*	4*	0*	3,567*
GranularR	9*	8,109*	7,382	6*	4,896*	5,612*
HilosR	2*	0*	1,678*	0*	0*	0*
SubiculoM	17*	13,20*	14,82*	8*	26,45*	7,555*
CA1M	13*	4,175*	11,39*	6*	4,162*	5,354*
CA2M	7*	4,880*	6,153*	8*	33,20*	7,144*
Ca3aM	12*	3,351*	10,74*	1*	0*	0,811*
CA3bM	8	4,963*	6,790*	5*	2,5*	4,654*
CA3cM	14*	7,685*	12,26*	8*	57,81*	7,090*
GranularM	12*	1,666*	10,60*	8*	26,45*	7,555*
HilosM	13*	18,47	11,47*	4	19*	3,553
CA1C	1*	0*	0,918*	0*	0*	0*
CA1V	1*	0*	0,918*	1*	0*	1*
SUBC	11*	12,14*	9,515*	6*	32,79*	5,481*
SUBV	0*	0*	0*	2*	0,5*	1,828*
CA3C	2*	0*	1,885*	0*	0*	0*
CA3V	0*	0*	0*	0*	0*	0*
GRANC	12*	2,920*	10,68*	6*	4,896*	5,612*
GRANV	0*	0*	0*	3*	0*	2,974
HILOSC	17*	13,20*	14,82*	3	10*	2,640*
HILOSV	4*	0*	3,974*	0*	0*	0*

Tabela suplementar 15. Medidas de eficiência da rede

Medidas	Eficiência global		Coeficiente de cluster		Força média da rede	
	Valor original	Média do Bootstrap	Valor original	Média do Bootstrap	Valor original	Média do Bootstrap
Condições						
NOR	0,225*	0,338	0,505*	0,088	2,106*	2,065
DIST	0,512*	0,651	0,606*	0,207*	5,041*	4,769
25%	0,388*	0,532	0,524*	0,166*	4,081*	3,755
50%	0,457*	0,712	0,719*	0,289*	6,996*	5,573
75%	0,262*	0,449	0,611*	0,137*	3,231*	2,203

Tabela suplementar 16. comparação das medidas de eficiência das redes

Medidas	Valores do teste		Mediana				
	K-W	p	NOR	DIST	25%	50%	75%
Eficiência global	478	0,0001	0,337	0,654	0,537	0,712	0,453
Coeficiente de cluster	370	0,0001	0,08	0,202	0,166	0,286	0,142
Força da rede	595	0,0001	1,828	5,068	3,811	7,023	2,885

* valores significativos (<de 0,05)

Tabela suplementar 17. Lovain cluster analysis values, modules and modularity

Condição	Grupos	Cluster Lovain
		Áreas dos Grupos
NOR	2	P36P, P35P, GranularM, CA1C, SubículoC
	3	P35S, LECP, CA3cM, HilosM, CA3C, CA3V
	4	LECS, CA3aR, CA3bR, CA3cR
	5	CA1R, GranularR, GranularC
	8	SubículoM, CA1M, CA2M, CA3aM, CA3bM
	Isolados	(1) P36S, (6) CA2R, (7) HilosR, (9) CA1V, (10) SubículoV, (11) HilosC
DIST	1	PRH36S, PRH35S, PRH35P, LECS, LECP, CA3aR, CA3bR, CA3cR, CA2M, CA3aM, CA3bM, HilosM, SubículoV

	2	PRH36P, CA1R, GranularR, HilosR, SubículoM, CA1M, GranularM, CA1V, SubículoC, GranularC, HilosC, HilosV
	4	CA3cM, CA1C, GranularV
	5	CA3C, CA3V
	Isolados	(3) CA2R
25%	1	PRH36S, PRH35P, LECP, HilosR, CA3bM, HilosM, CA1V, HilosC
	2	PRH36P, PRH35S, LECS, SubículoC, SubículoV
	4	CA2R, CA3bR, GranularR, CA1M, CA2M, CA3aM, CA3cM, CA1C
	6	CA3cR, SubículoM, GranularM, GranularC
	Isolados	(3) CA1R, (5) CA3aR, (7) CA3C, (8) CA3V, (9) GranularV, (10) HilosV
50%	1	PRH36S, PRH36P, PRH35S, CA1R, SubículoM CA3bM, HilosC
	5	CA2R, CA3cR, GranularR, HilosR, GranularM, SubículoC, GranularC
	6	CA3aR, CA3bR, CA1M, CA2M, CA3aM, CA3cM, HilosM, CA3C, HilosV
	7	CA1C, CA1V
	Isolados	(2) PRH35P, (3) LECS, (4) LECP, (8) SubículoV, (9) CA3V, (10) GranularV
75%	1	PRH36S, CA1R, GranularR, SubículoM, CA1M GranularM, GranularC
	2	PRH36P, CA2M, Ca3Am, HilosM, SubículoC, GranularV
	5	LECS, CA1V
	7	CA2R, CA3aR, CA3bR, CA3cR, CA3bM, CA3cM SubículoV, HilosC
	Isolados	(3) PRH35S, (4) PRH35P, (8) HilosR, (9) CA1C, (10) CA3C, (11) CA3V, (12) HilosV

Tabela suplementar 18. Tabela com comparação estatística de modularidade

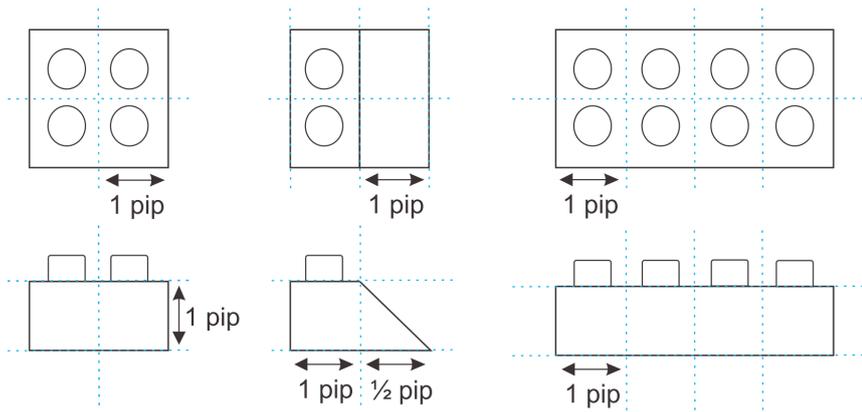
Medida	Valores do teste		Valor da modularidade (modularidade média)				
	K-W	p	NOR	DIST	25%	50%	75%

Modularidade de Lovain	478	<0,001	0,612 (0,485))*	0,034 (0,27 4)*	0,38 5 (0,33)*	0,03 7 (0,20 9)*	0,42 9 (0,38 5)*
------------------------	-----	--------	------------------------	-----------------------	--------------------------	---------------------------	---------------------------

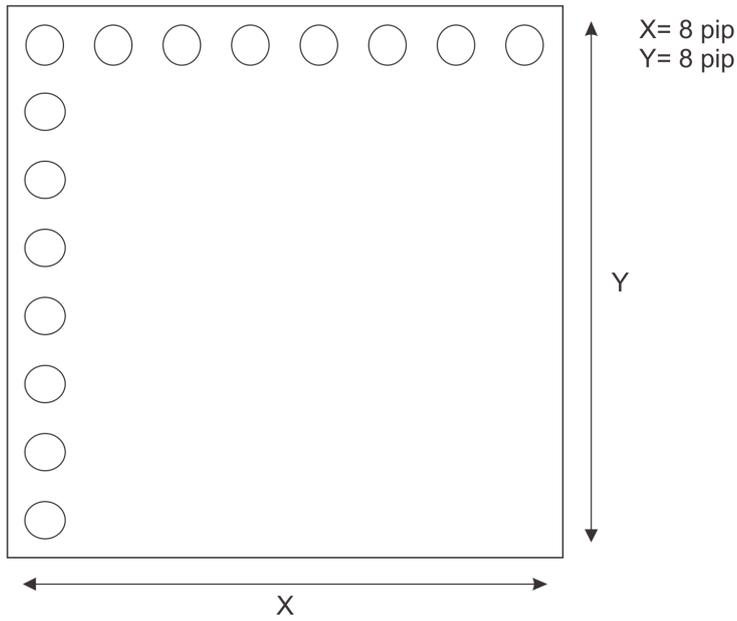
* valores significativos (<de 0,05)

ANEXO A

Modelo base para cálculo de sobreposição dos objetos a partir de legos.



Área de distribuição máxima para a construção dos objetos



Esquema ilustrativo da visão frontal para mensurar sobreposição



ANEXO B



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Bases moleculares e 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 5276130921 (ID 001522), 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 10/12/2021.

We certify that the proposal "Molecular bases and electrophysiological correlates of recognition memory "what?" in an object recognition task and discrimination of similar objects with multiple layers", utilizing 84 Heterogenics rats (84 males), protocol number CEUA 5276130921 (ID 001522), 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 12/10/2021.

Vigência da Proposta: de 12/2021 a 12/2024 Área: **Psicologia**

Origem: **Unidade de Produção Animal IPeFarm**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **2 a 3 meses**

N: **84**

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, 10 de dezembro de 2021

Prof. Dra. Adriana Maria Fernandes de Oliveira Golzio
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

Prof. Dr. Ivia Carmem Talieri
Vice-Cordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

ANEXO C

Artigos publicados e submetidos ao longo do Doutorado

- Artigo 1 (publicado):** Araujo, A. P. de C., de Lucena, J. D., Drieskens, D. C., Neves, L. R., Pugliane, K. C., Belchior, H. A., Castelo-Branco, R., & Barbosa, F. F. (2021). Rats recognize spatial and temporal attributes in a new object recognition memory task with multiple trials. *Journal of Neuroscience Methods*, 348(August 2020).
<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2020.108936>
- Artigo 2 (publicado):** Neves, L., Lobão-Soares, B., Araujo, A. P. C., Furtunato, A. M. B., Paiva, I., Souza, N., Morais, A. K., Nascimento, G., Gavioli, E., Tort, A. B. L., Barbosa, F. F., & Belchior, H. (2022). Theta and gamma oscillations in the rat hippocampus support the discrimination of object displacement in a recognition memory task. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 16.
<https://doi.org/10.3389/fnbeh.2022.970083>
- Artigo 3 (publicado):** Araujo, A. P. C., Dias, V., Farias, L., Barbosa, F. F., & Barbosa, F. F. (2025). Development of a rodent task for discrimination of stimuli with similar features. *Psychology and Neuroscience*. Advance online publication.
<https://dx.doi.org/10.1037/pne0000356>
- Artigo 4 (aceito):** Castelo-Branco, R., Araujo, A. P., Pugliane, K. C. Brandão, L. E., Belchior, H. Meuer, Y. S., Pereira-Costa, A. A., Barbosa, F. F. (2025). Brain networks differ according to levels of interference in spatiotemporal processing. *Hippocampus*.