

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA – UFPB
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS, LETRAS E ARTES – CCHLA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIA COGNITIVA E
COMPORTAMENTO – PPGNeC
LABORATÓRIO DE ESTUDOS EM MEMÓRIA E COGNIÇÃO – LEMCOG

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Caracterização comportamental da memória similar à episódica em roedores ao longo
da ontogênese**

João Pedro dos Santos Cipriano

João Pessoa
2025

João Pedro dos Santos Cipriano

Caracterização comportamental da memória similar à episódica em roedores ao longo da ontogênese

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Neurociência Cognitiva e Comportamento – PPGNeC, da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), como requisito para título do Mestrado.

Linha de pesquisa: Psicobiologia: Processos Psicológicos Básicos e Neuropsicologia

Orientador: Prof. Dr. Flávio Freitas Barbosa.

Coorientador: Dra. Rochele Castelo-Branco.

João Pessoa
2025

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

C577c Cipriano, João Pedro dos Santos.

Caracterização comportamental da memória similar à episódica em roedores ao longo da ontogênese / João Pedro dos Santos Cipriano. - João Pessoa, 2025.
61 f. : il.

Orientação: Flávio Freitas Barbosa.
Coorientação: Rochele Castelo-Branco.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCHLA.

1. Memória episódica. 2. Discriminação de objetos.
3. Ratos. I. Barbosa, Flávio Freitas. II.
Castelo-Branco, Rochele. III. Título.

UFPB/BC

CDU 159.953.2(043)

Folha de aprovação da dissertação



Universidade Federal da Paraíba
Programa de Pós-graduação em Neurociência Cognitiva e Comportamento
Centro de Ciências Humanas, Letras e Artes
Campus I, Cidade Universitária
CEP 58.051-900 João Pessoa/PB – BRASIL

ATA DE DEFESA (DISSERTAÇÃO)

Aos trinta dias do mês de abril de dois mil e vinte e cinco, às 14 horas, na sala 505 do Centro de Ciências Humanas, Letras e Artes, reuniram-se em solenidade pública os membros da comissão designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Neurociência Cognitiva e Comportamento para a defesa de dissertação de mestrado do discente **JOAO PEDRO DOS SANTOS CIPRIANO**, matrícula 20231012926. Foram componentes da banca examinadora os Professores Doutores: Flávio Freitas Barbosa (Presidente/orientador), Danilo Andrade de Meneses (Membro Interno) e Adriana Maria Fernandes de Oliveira Golzio (Membro Externo ao Programa). Dando início aos trabalhos, o presidente da banca, Prof. Dr. Flávio Freitas Barbosa, após declarar o objetivo da reunião, apresentou o examinando Joao Pedro dos Santos Cipriano e, em seguida, concedeu-lhe a palavra para que defendesse sua pesquisa, intitulada “**Caracterização comportamental da memória similar à episódica em roedores ao longo da ontogênese**”. Passando então ao aludido tema, o examinando foi a seguir arguido pelos examinadores na forma regimentar. Ato contínuo passou a comissão, em secreto, a proceder à avaliação e julgamento do trabalho, concluindo por atribuir-lhe o conceito “ Aprovado ”, o qual foi proclamado pela presidência logo que esta foi franqueada ao recinto da solenidade pública. A versão final da dissertação deverá ser depositada em até 90 dias, contendo as modificações sugeridas pela banca examinadora. O discente não terá o título se não cumprir as exigências acima. Nada mais havendo a tratar, eu, **FLÁVIO FREITAS BARBOSA**, presidente da comissão examinadora, lavrei a presente ata, que depois de lida e aprovada por todos, assino juntamente aos demais membros da banca. João Pessoa, 30 de abril de 2025.

Documento assinado digitalmente
gov.br JOAO PEDRO DOS SANTOS CIPRIANO
Data: 02/05/2025 13:11:29-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Joao Pedro dos Santos Cipriano (Mestrando/PPGNeC)

Documento assinado digitalmente
gov.br FLAVIO FREITAS BARBOSA
Data: 30/04/2025 16:57:18-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. Flávio Freitas Barbosa (Presidente/Orientador)

Documento assinado digitalmente
gov.br DANILO ANDRADE DE MENESES
Data: 30/04/2025 19:12:29-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. Danilo Andrade de Meneses (Membro Interno)

Documento assinado digitalmente
gov.br ADRIANA MARIA FERNANDES DE OLIVEIRA GOLZ
Data: 02/05/2025 08:41:49-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Adriana Maria Fernandes de Oliveira Golzio

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	4
RESUMO	6
ABSTRACT	7
CAPÍTULO I	7
Introdução	7
Memória de Reconhecimento	8
O acesso a memória similar à episódica através das tarefas de reconhecimento de objeto	9
Substratos Neurais da Memória Episódica	13
Justificativa	16
Objetivos	17
Objetivo Geral	17
Objetivos específicos	17
CAPÍTULO II	18
Animais e aspectos éticos	18
Desenho experimental	18
Análise Comportamental e Estatística	24
CAPÍTULO III	26
Padrão de Locomoção dos animais nas sessões de Habituação	26
Caracterização da exploração da periferia e do centro do campo entre as habituações	28
Latência de exploração do primeiro objeto na primeira sessão de amostra	36
Experimento 1 - Ratos possuem algum viés de preferência entre os objetos?	37
Experimento 2 - Será se os ratos realmente discriminam ou somente esqueceram os objetos?	37
Experimento 3 - WWWhen/ELM	39
CAPÍTULO IV	43
CAPÍTULO V	48
REFERÊNCIAS	49
ANEXOS	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. (A) Campo aberto circular com pistas proximais. (B) Pistas distais dispostas nas paredes da sala de experimentos.....	20
Figura 2. Diagrama esquemático do experimento. Serão utilizados animais com 18, 24, 35, 60, 80 e 90 dias de idade pós-nascimento.....	20
Figura 3. Cópias dos quatros objetos utilizados nas sessões de amostras e teste, que foram feitos em impressora 3D.....	21
Figura 4. Tarefa de Reconhecimento de Objetos novos. Na primeira parte da figura está representada a fase amostral e na segunda fase o teste propriamente dito.....	22
Figura 5. Fórmulas dos Índices de Discriminação.....	24
Figura 6. Distância percorrida (em cm) por roedores durante as sessões de habituação em diferentes idades.....	27
Figura 7. Representação de cada zona do campo.....	29
Figura 8. Distância percorrida (em cm) nas zonas de periferia (Z1), transição (Z2) e centro (Z3) do campo aberto durante três sessões de habituação (Hab1, Hab2 e Hab3) em P18.....	29
Figura 9. Distância percorrida (em cm) nas zonas de periferia (Z1), transição (Z2) e centro (Z3) do campo aberto durante três sessões de habituação (Hab1, Hab2 e Hab3) em P24.....	31
Figura 10. Distância percorrida (em cm) nas zonas de periferia (Z1), transição (Z2) e centro (Z3) do campo aberto durante três sessões de habituação (Hab1, Hab2 e Hab3) em P35.....	32
Figura 11. Distância percorrida (em cm) nas zonas de periferia (Z1), transição (Z2) e centro (Z3) do campo aberto durante três sessões de habituação (Hab1, Hab2 e Hab3) em P60.....	33
Figura 12. Distância percorrida (em cm) nas zonas de periferia (Z1), transição (Z2) e centro (Z3) do campo aberto durante três sessões de habituação (Hab1, Hab2 e Hab3) em P80.....	34

Figura 13. Distância percorrida (em cm) nas zonas de periferia (Z1), transição (Z2) e centro (Z3) do campo aberto durante três sessões de habituação (Hab1, Hab2 e Hab3) em P90.....	35
Figura 14. Efeito da idade na latência para a primeira exploração no campo aberto.....	36
Figura 15. Tempo total bruto de exploração por tipo de objeto.....	37
Figura 16. Tempo médio de exploração (em segundos) durante a tarefa de exploração em diferentes idades (P18, P24, P35 e P60) na fase de teste de ratos.....	39
Figura 17. Índices de discriminação do cumulativo (minuto a minuto) nos testes de memória episódica "what-where-when" (WWWhen) ao longo do desenvolvimento (idades em dias pós-natal).....	40

RESUMO

A memória episódica consiste na capacidade de recordar, de forma integrada, informações contextuais dos eventos. Estudos com modelos animais têm utilizado critérios comportamentais para avaliação desse tipo de memória, utilizando elementos como o que (evento) ocorreu, em determinado lugar (onde), em um dado momento do tempo (quando), sendo sua ocorrência tratada de forma associativa entre esses aspectos. . Salienta-se que ainda não é bem compreendido a sua trajetória ontogenética. O presente estudo buscou descrever o comportamento de ratos Wistar submetidos a uma tarefa de memória similar à episódica durante o neurodesenvolvimento. Nessa direção, foram utilizados 140 ratos da linhagem Wistar, sendo 30 reprodutores e 110 filhotes com 18, 24, 35, 60, 80 e 90 dias de nascimento, mantidos em condições controladas. O presente trabalho realizou uma padronização do aparato e objetos para diferentes idades, logo foi feita uma avaliação de um conjunto de objetos 3D. A tarefa de memória similar à episódica consistiu em 3 sessões, sendo 2 amostras e 1 teste. Cada uma das sessões teve duração de cinco minutos, com intervalo de uma hora entre elas. Também foram submetidos a uma tarefa de reconhecimento de objetos novos para servir como controle de avaliação de discriminação dos ratos e existência de falsos positivos. Os resultados do índice de discriminação demonstraram que os ratos em diferentes idades expressaram predominantemente a memória temporal não-integrativa no teste WWWhen/ELM, sobretudo a partir de P35, além de uma tendência para a memória temporal em P60 [$t(14) = 1,954$, $p=0,071$]. Para a NOR, apenas ratos em P33 foram capazes de discriminar os objetos no primeiro e segundo minuto. Os resultados demonstraram que um deles foi explorado diferencialmente. Análises referentes à locomoção, comportamento do tipo ansioso e neofobia indicam que ratos em diferentes idades apresentam padrão similar. Essa é a primeira tarefa de memória episódica que avalia simultaneamente os aspectos temporais e espaciais da memória do tipo episódica em várias idades da ontogenia com intervalo de tempo de uma hora, com objetos e campo padronizado para cada idade. Conclui-se que não foram identificadas variáveis relacionadas à neofobia, sendo o principal resultado do estudo, a emergência da memória de ordem temporal em P35.

Palavras-Chave: Memória similar à episódica. Exploração. Discriminação de objetos. Ratos.

ABSTRACT

Episodic memory consists of the ability to remember, in an integrated way, contextual information about events. Studies with animal models have used behavioral criteria to assess this type of memory, using elements such as what (event) occurred, in a certain place (where), at a given moment in time (when), and its occurrence is treated in an associative way between the aspects mentioned above. Its ontogenetic trajectory is not yet well understood. The present study sought to describe the behavior of Wistar rats submitted to a memory task similar to episodic memory during neurodevelopment. To this end, 140 Wistar rats were used, 30 of which were breeders and 110 pups at 18, 24, 35, 60, 80 and 90 days of birth, kept under controlled conditions. This study standardized the apparatus and objects for different ages, so a set of 3D objects was evaluated. The episodic-like memory task consisted of 3 sessions, 2 samples and 1 test. Each session lasted five minutes, with an interval of one hour between them. They were also subjected to a novel object recognition task to serve as a control for evaluating the rats' discrimination and the existence of false positives. The results of the discrimination index showed that rats at different ages predominantly expressed non-integrative temporal memory in the WWWhen/ELM test, especially from P35 onwards, in addition to a tendency towards temporal memory at P60 [$t(14) = 1.954$, $p=0.071$]. For NOR, only rats on P33 were able to discriminate objects in the first and second minute. The results showed that one of them was differentially explored. Analyses relating to locomotion, anxiety-like behavior and neophobia indicate that rats at different ages show a similar pattern. This is the first episodic memory task that simultaneously evaluates the temporal and spatial aspects of episodic memory at various ages of ontogeny with a time interval of one hour, with objects and a standardized field for each age. It was concluded that no variables related to neophobia were identified, with the main result of the study being the emergence of temporal order memory in P35.

Keywords: Episodic-like memory. Exploration. Object discrimination. Rats.

CAPÍTULO I

Introdução

A memória é a capacidade de armazenar, reter e recuperar informações ao longo do tempo, resultante da interação com estímulos do ambiente. Ela é composta por diferentes estágios: codificação (processo de transformar informações em um formato que possa ser armazenado), consolidação (estabilização das informações armazenadas), evocação (recuperação das informações quando necessário) e esquecimento (perda de informações ao longo do tempo) (Tulving, 2002). Para entender como a memória funciona, é importante analisar como esses estágios operam de forma independente e como se inter-relacionam, influenciando a forma como lembramos e esquecemos informações (Guskjolem & Cembromvski, 2023).

O processo de codificação se dá por meio de uma mudança física no sistema nervoso em resposta a uma experiência de aprendizagem. Tal etapa depende de outros sistemas e processos, como é o caso da atenção, no qual os sistemas de memória irão seletivamente armazenar as informações mais relevantes para o sujeito. Assim, as memórias recentemente codificadas podem se manter temporariamente através do aumento da atividade neural induzida pela aprendizagem (McGaugh, 2000). No caso de memórias de longo prazo, a transformação de memórias de curto prazo para uma condição duradoura necessita da expressão de genes e proteínas, que perfazem o aumento de conexões sinápticas entre os neurônios ativos no momento da aprendizagem, compreendendo o processo de consolidação (Bisaz, Travaglia & Alberini, 2014). Já a evocação das memórias se relaciona à reativação do conjunto neuronal que estava presente durante a sua codificação, ou seja, após a consolidação, estas podem ser recuperadas por meio de uma ação consciente ou inconsciente do indivíduo (Cohen & Stackman, 2015).

Para além dessa concepção, a memória pode ser classificada não só quanto à duração, mas também referente ao seu conteúdo. A primeira classificação, como citado anteriormente, é baseada no aspecto temporal da memória (curto/longo prazo), sendo a de curto prazo evocada por curtos períodos no tempo, enquanto a de longo prazo requer a necessidade de síntese proteica para consolidação, podendo ter sua evocação após longos intervalos de tempo (horas a anos) (Squire & Zola, 1996; Izquierdo, 2018). A segunda classificação diz respeito

ao seu conteúdo (explícito/implícito), onde as memórias explícitas têm duração variável, desde alguns minutos, até mesmo meses ou décadas e possuem disponibilidade de acesso consciente para fatos ou eventos. Em relação às memórias implícitas, estas podem durar por toda a vida e são expressas por meio da aprendizagem associativa ou não associativa de hábitos, possuindo uma rede dependente de vários sistemas cerebrais (Squire, Stark, & Clark, 2004).

A memória explícita pode ser sub-classificada em semântica e episódica. O primeiro tipo pode ser caracterizado pela capacidade de acumular informações e conhecimentos gerais, auxiliando na formação de conceitos sobre o mundo, elementos presentes ou fatos. A memória episódica pode ser descrita como a habilidade para recuperar eventos que tem uma especificidade quanto à sua localização temporal e espacial (Tulving, 2002). Por muito tempo afirmou-se que tal habilidade era unicamente humana, porém, nas últimas décadas, tem-se demonstrado que animais não verbais conseguem formar uma memória similar à episódica (Griffiths, Dickinson & Clayton, 1999). Partindo-se, então, da dificuldade de avaliação da consciência destes animais, os pesquisadores têm estabelecidos critérios comportamentais para sua investigação, o que, dentro de um olhar evolucionista nos permite compreender que os seres humanos compartilhem não somente estruturas anatômicas, mas também aspectos cognitivos com outros animais (Barbosa & Castelo-Branco, 2022).

Memória de Reconhecimento

Atualmente, compreende-se que, tanto a memória episódica quanto a semântica podem ser resgatadas através de pistas contextuais do ambiente, ou por meio de dicas internas ao sujeito, sendo estes definidos como recordação e reconhecimento (Skinner & Fernandes, 2007; Yonelinas & Park, 2007). Assim, Aggleton e colaboradores (2012) têm discutido a associação entre a capacidade reconhecimento e a memória episódica. Alguns estudiosos afirmam que tais elementos são parte do mesmo continuum, porém, outras evidências indicam que se tratam de dois processos qualitativamente diferentes (Aggleton et al., 2012; Cohen, & Stackamn, 2015; Yonelinas & Park, 2007; Aggleton & Brown, 2006). Avanços obtidos nas técnicas de imagem associados ao desenvolvimento de testes comportamentais auxiliaram na resolução de tais questões, aproximando-as de um consenso, sendo o processo de reconhecimento o indicador de que um acontecimento já foi vivenciado (Aggleton & Brown, 2006).

O processo de memorização por reconhecimento pode ser compreendido como um subtipo de memória explícita, que está atrelado à capacidade de discriminação entre um objeto novo e outro familiar, sendo esta uma habilidade que está presente em várias espécies. Neste tipo de memória podem ser descritos dois processos distintos: a familiaridade, que compreende o como saber, e não se envolve a lembranças de experiências anteriores, e a recordação, que se associa a capacidade de atenção plena aos estímulos presentes que acabam por promover a evocação consciente de detalhes contextuais (Cohen & Stackman, 2015; Eichenbaum, Yonelinas & Ranganath, 2007).

Esses processos anteriormente mencionados têm funções que auxiliam no fornecimento do reconhecimento global da experiência. Estudos têm evidenciado que o processo de familiaridade aparece relacionado ao córtex entorrinal e perirrinal, como também, o parahipocampal em primatas, enquanto o recordar está intrinsecamente associado ao hipocampo e, a partir disto, pode-se observar que tais processos operam de forma dissociada em suas funções, mas que, integram conjuntamente áreas do lobo temporal medial (LTM) (Eichenbaum et al., 2007).

Neste sentido, é relevante mencionar que tal habilidade é crucial para o reconhecimento e previsão de situações que possam vir a ser ameaçadoras, além de situações potencialmente vantajosas, possibilitando a modulação das respostas comportamentais. Assim, as tarefas de reconhecimento de objeto se tornam um paradigma essencial na investigação dos mecanismos neurais envolvidos nos diversos tipos de memória (“o que”, “onde” e “quando”), bem como relacionados aos diferentes estágios, como a codificação, armazenamento e evocação.

O acesso a memória similar à episódica através das tarefas de reconhecimento de objeto

Por meio da execução de uma tarefa de reconhecimento de novos objetos (NOR), foi possível observar que roedores gastam mais tempo explorando a novidade presente em um objeto ainda desconhecido quando comparado ao mais familiar (Ennauer & Delacour, 1988). Tais tarefas consistem numa fase de amostra, compreendida como a sessão de aprendizagem, e uma fase de teste. Na fase amostral, os animais são postos em uma arena, que pode ser circular ou quadrada, onde são expostos a novos objetos. Após um intervalo de tempo, os animais são novamente expostos a esta arena, onde são apresentados a um objeto novo e um familiar. A finalidade de tal tarefa é verificar se os animais passam maior tempo explorando o objeto novo (Ennauer & Delacour, 1988).

Uma primeira adaptação da NOR deu-se a partir do interesse na investigação do aspecto espacial da memória, denominada de tarefa de reconhecimento de localização dos objetos (NOLT). Nesta, os animais são postos em uma arena e apresentados, em fase de amostra, a dois objetos idênticos. Após um dado intervalo de tempo, os ratos são novamente realocados na arena e expostos aos objetos, com um deles sendo apresentado em nova localização. Assim, seguindo a lógica da exploração de novidades nestes animais, espera-se que, durante o teste, estes gastem mais tempo na exploração do objeto deslocado, quando comparado ao estacionário (Ennaucer, 2010).

Uma versão de tarefa associativa da NOLT foi posteriormente criada, sendo conhecida como “object-in-place”. Nela, comumente são utilizados 4 objetos diferentes em uma fase amostral e, após um intervalo de tempo, os animais são reexpostos à arena com os mesmos objetos, contudo dois deles tendo suas posições trocadas, sendo esperado que o animal passe mais tempo explorando os objetos que tiveram mudança em seu posicionamento. Neste caso, o experimento possibilita avaliar se o animal consegue formar uma associação entre os objetos e seus locais específicos (Dix & Aggleton, 1999).

Para além disso, tem-se compreendido a capacidade de reconhecer temporalmente a apresentação de objetos por parte dos ratos. A tarefa de memória de ordem temporal compreende a utilização de duas fases de amostra e um teste. Na primeira fase amostral, os animais são colocados na arena onde, livremente, exploram dois objetos “A” idênticos. Após o período de intervalo, os roedores são novamente introduzidos no campo aberto e acessam dois objetos “B” nas mesmas posições da primeira fase de amostra. Por fim, durante o teste, os animais são expostos a uma cópia de cada um dos objetos apresentados anteriormente. Como resultado é esperado que os animais explorem mais o objeto mais antigo, neste caso, o “A”, quando comparado ao que foi mostrado mais recentemente (Mitchell & Laiacina, 1998).

Diante do exposto, pode ser percebido que as tarefas apresentadas avaliam diferentes elementos da memória similar à episódica, porém tais protocolos não verificam a capacidade dos animais na integração de tais elementos dentro de uma situação específica. Nesta perspectiva, Kart-teke e colaboradores (2006) desenvolveram uma tarefa de reconhecimento que consegue avaliar simultaneamente os aspectos de “o que-onde”, “o que-quando” e “o que-onde-quando” da memória (WWWhen/ELM task). Essa metodologia consiste em duas amostras e um teste com tempo de exploração de 5 minutos. Na primeira amostra os animais podem explorar livremente, na arena, quatro objetos “A” idênticos. Após o intervalo de uma hora, os ratos são novamente expostos ao campo aberto para exploração livre de quatro

objetos “B”, sendo dois deles colocados na mesma localização do ensaio anterior. Por fim, após o intervalo de uma hora é realizado o teste, que consiste na apresentação de dois objetos “A” e dois “B” no campo aberto, onde um dos objetos “B” é posto na mesma localização (Estacionário Recente - ER) do segundo ensaio e o outro em novo local (Recente Deslocado - RD). De maneira semelhante, um objeto “A” é disposto em nova localização (objeto deslocado - OD) e outro no local antigo (Objeto estacionário - OE) ao seu ensaio.

Para avaliar os aspectos de ordem temporal, espera-se que os ratos explorem mais OS quando comparado ao RS, devido a recência temporal que RS possui, sendo o OS, por ser mais antigo em ordem de apresentação, possuidor de um caráter maior de novidade. No que concerne à discriminação espacial dos objetos, a expectativa de exploração é direcionada mais fortemente para RD, quando comparado ao RS. Destarte, os animais podem apresentar um padrão não linear para aprender os conteúdos/aspectos da memória, sendo capazes de integrar desde informações espaciais até temporais, tendo sua habilidade de discriminação relacionada às fases da tarefa. Para tal, a indicação dos aspectos comportamentais de expressão da memória similar à episódica se encontra na maior exploração do OS quando comparado ao OD (Kart-teke et al., 2006). Assim, pode-se perceber que as tarefas integrativas abarcam um maior recrutamento de áreas, como também, maior esforço cognitivo (Aggleton & Nelson, 2020; Chao et al., 2020).

Recentemente tem sido demonstrado também que, seja em animais não-humanos ou em humanos, a produção de memórias dependentes do hipocampo é expressa ao longo da maturação, não estando disponível logo ao nascer (Ramsaran, 2018). Em ratos, a infância é compreendida desde seu nascimento até a etapa do desmame, sendo esta a fase na qual o animal permanece aos cuidados maternos; a partir de seu desenvolvimento sexual e início da exploração, dá-se o início da adolescência (P21 até P60). Assim, a partir de seus 60 dias, com a capacidade reprodutiva e repertório comportamental completo, define-se a fase adulta (Kolhaas, 2010; Wishaw & Kolb, 2005).

Evidências têm demonstrado que ratos com idade entre 15 e 17 dias já conseguem executar a tarefa NOR e recrutar o córtex perirrinal (Westbrook, Brennan, & Stanton, 2014; Kruger et al., 2012; Kruger, & Hanganu-opatz, 2013). Em relação às tarefas que são dependentes do hipocampo (a exemplo da NOLT, *object-in-place* e WWhen/ELM), a literatura mostra que apenas entre 21 e 26 dias, tal tipo de memória é expressa, como é apresentado por Westbrook e colaboradores (2014) que, em seu estudo, trouxeram evidências apontando para expressão de memória no hipocampo em ratos P21. Contrapondo-se a este resultado, Jablonski e colaboradores (2013) fizeram o mesmo experimento, contudo, apenas

ratos P26 conseguiram apresentar desempenho acima do acaso. Isto posto, observa-se que a execução de tarefas hipocampo-dependentes terá suas performances mais tardiamente. Em contrapartida, aquelas tarefas que não dependem diretamente do hipocampo irão ser executadas mais cedo no desenvolvimento.

Para além disso, quando é abordado o contexto de memória associativa, sabe-se que ratos adolescentes já executam este tipo de protocolo, como demonstrado por Ainge e Langston (2012), onde ratos P30 expressaram memória em tarefas OiC (objeto no contexto). Nesta mesma direção, buscando a associação entre o contexto e objeto através do uso de protocolos, Ramsaran e colaboradores (2016) afirmam que, para o contexto, ratos P21 obtiveram um desempenho significativo e, para a integração *object-place-context*, apenas ratos P31 realizaram bem a tarefa.

A performance dos ratos em tarefas dependentes do hipocampo tende a surgir mais tarde, em comparação a tarefas que não dependem desta área. Como se sabe, a tarefa NOR, que não depende diretamente do hipocampo, recrutando o córtex perirrinal, emerge entre P14 e P15, com intervalos curtos de retenção de até 30 minutos. Para intervalos de retenção de 1 hora, foi observada discriminação da novidade apenas a partir de P21 (Reger et al., 2009). Contudo, tarefas dependentes do hipocampo só tem boa execução após a infância. Isto posto, Westbrook e colaboradores (2014) evidenciou que, com intervalos de 5 minutos, os ratos com P21 conseguiram ter boa performance e expressar memória para localização dos objetos, embora Jablonski e colaboradores (2013), com mesmo intervalo de retenção, demonstraram que somente em P26 os ratos foram capazes de discriminar acima do acaso. Para intervalos mais longos de até 2 horas, Travaglia e colaboradores demonstraram que apenas animais a partir de P24 conseguiam expressar a NOLT. Para a tarefa de ordem temporal, com intervalos curtos de 5 e 10 minutos por sessão, para ratos, a memória foi expressa entre P17 e P21. Já para intervalos de 1 hora, a tarefa foi realizada apenas em camundongos, tendo desempenho significativo a partir de P28 (Cruz-Sanchez et al., 2021).

Para tarefas associativas, Ainge e Langston (2012) observaram que ratos em P30 conseguiam bom desempenho na tarefa OiC (objeto no contexto), já Ramsaran e colaboradores (2016) indicaram que ratos em P21 já apresentavam performance significativa para tal tarefa. Para a tarefa de objeto, lugar e contexto, Ramsaran e colaboradores (2016) evidenciaram que os animais já apresentavam capacidade para realizá-la acima do acaso a partir de P31, com intervalo de 5 minutos entre as sessões. Asiminas (2022), demonstrou que o reconhecimento surge aproximadamente entre 3 e 4 semanas (P25 e P28), com intervalo de 2 minutos entre as sessões. No que concerne à associação entre objeto e contexto, a memória

parece emergir ao longo da quinta semana (Asiminas et al., 2022). Para a tarefa de objeto-lugar, Asiminas e colaboradores (2022) ressaltam que a mesma emerge somente a partir da sétima semana (P50). Seguindo a mesma projeção, a tarefa de associação entre objeto, lugar e contexto, emergiu a partir da sétima semana (P50). Porém, mesmo com o número crescente de pesquisas envolvendo os elementos independentes da memória do tipo episódica, ainda não se encontram estudos que busquem avaliar, dentro de uma perspectiva ontogenética, os aspectos de “o quê”, “quando” e “onde” como a tarefa WWWhen/ELM (Kart- teke et al., 2006).

Substratos Neurais da Memória Episódica

A literatura vem demonstrando que, em relação às estruturas cerebrais responsáveis pela memória episódica, encontra-se uma ampla zona de regiões corticais, a exemplo do córtex pré-frontal, que auxilia no processo de formação da memória (Chao et al., 2020). Além disso, outras regiões como o córtex parahipocampal, as quais se integram ao lobo temporal medial, cuja organização exerce um papel crítico na aquisição, consolidação e evocação do sistema episódico, bem como, da facilitação do reconhecimento, identificação e integração das informações dos estímulos advindos do ambiente (Allen & Fortin, 2013). À vista disso, o hipocampo vem a desempenhar um papel crucial na formação e consolidação de memórias contextuais, episódicas, espaciais e sociais a longo prazo, como também na aprendizagem de novas habilidades e associações complexas (Sugar & Moser, 2019; Eichenbaum et al., 2012).

A importância do hipocampo na formação e consolidação de memórias também se reflete em sua plasticidade sináptica, um fenômeno que é crucial para a aprendizagem. A plasticidade sináptica, especialmente a potencialização de longa duração (LTP), permite que as conexões neuronais se fortaleçam em resposta à atividade, facilitando a codificação de informações e a formação de memórias duradouras (Mitchell-Heggs, & Tse, 2024). Estudos têm demonstrado que essa plasticidade é influenciada por diversos fatores, incluindo a experiência e o ambiente, o que sugere que o contexto em que a aprendizagem ocorre pode ter um impacto significativo na eficácia do hipocampo em formar novas memórias (Moser et al., 2008)

A circuitaria do hipocampo apresenta uma singularidade em seu funcionamento, de modo que, células granulares que estão no giro denteado (GD) recebem projeções de sinais excitatórios via córtex entorrinal (CE), que projeta axônios para as regiões de CA2 e CA3

(Steward, 1976). Em uma outra via de comunicação, as células granulares, por meio de fibras musgosas, conectam-se com CA3, que possui células piramidais que tanto recebem informações do GD, quanto reverberações em sua estrutura. Isso ocorre através dos colaterais de Schaffer que se projetam para CA1, a qual representa a rede de saída de informações para o CE (Schultz & Engelhardt, 2014).

O processamento da memória durante a codificação e evocação tem sido evidenciado anatomicamente através de regiões adjacentes ao hipocampo. As representações de características de itens ou objetos diferentes (via “o que”), dá-se por meio da recepção e codificação de informações sensoriais dadas nas porções do córtex perirrinal e córtex entorrinal lateral (Yonelinas et al., 2024; Eichenbaum et al., 2007). Destarte, a codificação de informações visuoespaciais e de representações contextuais combinadas as informações sensoriais dos itens/objetos são formadas na região medial do córtex entorrinal e pósrrinal (via “onde”), sendo o hipocampo responsável pelo processamento e associação da localização do item ao seu contexto (Knierim, Neunuebel & Deshmukh, 2018; Eichenbaum et al., 2012). Para além disso, a codificação temporal associada ao próprio desenvolvimento e maturação do animal está associada a especificidade da memória, como também em predição acuradas para julgamento e discriminação de eventos específicos, são formadas por meio da ativação de CA1 (Eichenbaum, 2014).

Nessa direção, entende-se que o hipocampo funciona como elemento para formar representações de itens relacionados. Para memória espacial, esta região vem a ser crítica em seu processo de consolidação, tanto humanos, como em ratos e animais não humanos, e evidências têm sugerido que neurônios hipocampais codificam localizações específicas no ambiente (place cells) (Tan et al., 2017; Ainge & Langson, 2012). Estes tipos de neurônios hipocampais respondem seletivamente a lugares específicos no campo, apresentando desenvolvimento inicial a partir do P14 e com atividade similar à idade adulta a partir dos 40 dias (Tan et al., 2017; Ainge & Langson, 2012).

Para além disso, existem células que disparam um padrão em grade e desempenham uma importante função de segregar informações espaciais. Assim, a compreensão dos diferentes papéis exercidos pelo hipocampo pelo córtex entorrinal medial (MEC), através das células em grade na formação da memória episódica, contribui de forma significativa para o apoio das representações entre o contexto espaço-temporal e a distinção de rotas episódicas, fornecendo, assim, um mapeamento ambiental (Eichenbaum et al., 2012).

Kesner, Hunsaker e Ziegler (2010) evidenciaram um disparo padrão de atividade neuronal na região de CA1 e que esta desempenha um papel importante na codificação e

representação temporal de momentos específicos. Assim, a percepção da função que as “times cells” na região de CA1 exercem para codificação escalar de tempo da memória, mesmo que não exista alteração na localização ou comportamental, possibilita para além disso, uma nova forma de sustentação das rotas integrativas para especificidade dos episódios (Eichenbaum, 2017).

O sistema de memória episódica sempre está ativado e gerando a captura e conexões entre os eventos de nossas experiências diárias, tal propriedade depende da ação do hipocampo, pois é por meio dele que estas codificações das informações ambientais ocorrem (Manns & Eichenbaum, 2009). Outras evidências importantes têm demonstrado a importância do hipocampo relacionado à separação de padrões, principalmente relacionado ao aprendizado contextual de medo (Laing & Dunsmoor, 2023; Ngo et al., 2021; Barkker et al., 2008).

A avaliação da circuitaria neural envolvida nas diversas fases de formação da memória pode ser realizada por meio da investigação de mecanismos subjacentes ao desenvolvimento de processos mnemônicos. Os correlatos de ativação neuronal observados na literatura durante a codificação, armazenamento e evocação de informações têm sido analisados por meio da expressão de genes imediatos (IEGs). O IEGs mais descrito nos estudos foi o c-Fos, que oferece uma cobertura espacial das regiões integradas nos processos cognitivos específicos (Barbosa & Silva, 2018).

Outros IEGs também são descritos, como o Arc e o Zif, contudo, o padrão de ativação neuronal entre o c-Fos, Arc e Zif diferem nas vias as quais são ativadas. O c-Fos e o Zif são responsáveis pela transcrição de genes que possuem relação com plasticidade sináptica, já o Arc tem associação direta a este processo de plasticidade, atuando diretamente em alterações nos espinhos dendríticos (Lanahan & Worley, 1998; Okuno et al., 2018). Deste modo, o papel metabólico, assim como a expressão diferente de cada IEGs na ativação neural durante o processamento de memória, oferece diversos caminhos a respeito dos mecanismos envolvidos na formação de traços de memória.

Sabe-se que, o período de desenvolvimento de estruturas do lobo temporal medial, como é o caso do hipocampo, estende-se no período pós-natal, sendo o processo maturacional de áreas diversas dessa região dado de forma não coincidente (Sugar & Moser, 2019; Eichenbaum et al., 2012; Reger, Hovda & Giza, 2009).

Neste sentido, observa-se que os níveis de expressão dessas moléculas diferem de acordo com a etapa do desenvolvimento, em animais infantes, após a execução de tarefas hipocampo-dependentes, houve uma expressão gradual e duradoura tanto para Arc, quanto

para Zif, na fase de codificação. Já em animais adultos submetidos a tarefas de esQUIVA inibitória, pela apresentação basal de níveis protéicos e de RNAm baixos, após a estimulação, ocorreu um aumento rápido destes durante a aprendizagem e memória (Bessieres et al., 2019). Por fim, os mecanismos de formação do engrama mudam no curso ontogenético, a partir da quarta semana, com o desenvolvimento da circuitaria inibitória, tornam-se mais precisos, esparsos e complexos de acordo com o processo de maturação dos ratos (Ramsaran et al., 2023).

Justificativa

A memória episódica é a capacidade de armazenar e recuperar experiências pessoais específicas, que estão contextualizadas em um determinado tempo e espaço. Ela envolve o processo de codificação, onde as informações são transformadas em uma forma que pode ser armazenada, a consolidação, que estabiliza essas memórias, e a evocação, que permite a recuperação das experiências vividas.

Esta modalidade de memória compõe um sistema amplo, e tem sido bastante estudada em diversas áreas, como as neurociências e a psicologia. Alterações em seu sistema podem ser percebidas ao longo do desenvolvimento, sendo o hipocampo uma região de particular interesse.

Dentro da perspectiva neurobiológica, o hipocampo é compreendido como estrutura relevante aos processos de codificação, armazenamento e evocação da memória episódica, principalmente por sua interação com áreas subjacentes que possibilitam a integração de conteúdos contextuais, espaciais e temporais. Na literatura, ainda há poucos estudos relativos a modelos animais que permitem avaliar funcionalmente a ativação do hipocampo e os mecanismos neurais envolvidos na associação e expressão da memória do tipo episódica sob uma perspectiva ontogenética.

Conforme exposto por Donato e colaboradores (2020), os métodos baseados em recursos de imagens não foram ainda capazes de prover uma avaliação acurada dos correlatos neurais envolvidos em processos mnemônicos ao longo do ciclo vital em humanos, principalmente no início da vida. Modelos animais, conseqüentemente, tem se tornado uma alternativa para testar hipóteses relativas ao neurodesenvolvimento da memória em humanos, seja no das psicopatologias, como na Ciência Básica. Assim sendo, faz-se necessário compreender os processos e mecanismos subjacentes ao desenvolvimento da memória episódica.

Objetivos

Objetivo Geral

Avaliar a expressão da memória similar à episódica e descrever o comportamento de ratos Wistar submetidos à uma tarefa de memória similar à episódica (WWWhen/ELM), durante o neurodesenvolvimento.

Objetivos específicos

- 1) Avaliar ratos infantes (P18), pré-púberes (P24), adolescentes (P35) e adultos (P60, P80 e P90) na tarefa de memória similar à episódica (WWWhen/ELM);
- 2) Mensurar o comportamento do tipo ansioso durante a realização da tarefa por ratos das diferentes idades;
- 3) Caracterizar neofobia para exploração dos objetos nas diferentes idades;
- 4) Investigar a viabilidade de um conjunto de objetos 3D produzido para a tarefa WWWhen/ELM para ratos de diferentes idades.

CAPÍTULO II

MÉTODO

Animais e aspectos éticos

Foram utilizados 140 ratos e ratas da linhagem Wistar, provenientes da Unidade de Produção Animal – UPA, da Universidade Federal da Paraíba, de acordo com o protocolo nº 9599290422 do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPB. Os animais foram alojados em gaiolas plásticas (32cm X 39cm X 16.5cm), com comida e água à vontade, em uma sala com temperatura mantida em 23°C e ciclo de claro-escuro de 12/12h, com luzes acesas a partir das 06h30min da manhã. Todos os experimentos seguiram os manuais e normas disponibilizados pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA).

Desenho experimental

Tamanho amostral

Para delimitação do tamanho amostral, foi utilizado como base um experimento piloto prévio realizado em nosso laboratório em 2021, que consistiu na obtenção de animais em idades específicas a partir de seus progenitores (Protocolo CEUA Nº 2502280121). Através do experimento, o estudo possui uma média de 9,5 filhotes por fêmea pareada em harém, com proporção de ½ por prole de machos e fêmeas. Nesta direção, considerando a previsibilidade de 10 animais para cada grupo nas idades experimentais, como também o tamanho amostral das unidades experimentais de N=10, conforme estudos sobre esta modalidade de memória.

Infraestrutura

Todos os experimentos foram realizados na sala de comportamento do Laboratório de Estudos em Memória e Cognição (LEMCOG), em uma sala com temperatura média de 23°C, livre de ruídos e iluminação de 150 lux, sendo a execução dos testes realizada entre as 09h00 e 17h00.

Procedimento de Acasalamento e Acompanhamento da ninhada

Para obtenção de prole em idade experimental pós-nascimento, foram realizados acasalamentos mediante formação de harém, sendo a proporção de duas fêmeas para um macho por gaiola. Foi realizado acompanhamento diário das fêmeas para identificação de

gravidez que, ao ser constatada, ocorria a separação do macho das fêmeas, com remanejamento destas em gaiolas individuais, para aguardar o nascimento da prole. O dia de nascimento de cada animal foi registrado e acompanhado individualmente para garantir que os ratos fossem testados na fase correta do neurodesenvolvimento (i.e.: idades-teste específicas).

O tamanho de ninhada foi mantido em 8 filhotes, para padronizar o investimento materno na prole. Caso houvesse uma quantidade de machos da prole inferior a 8, fêmeas eram mantidas na gaiola até o desmame em P21, para garantir manter o mesmo padrão.

Manipulação e Habituação

Os animais eram manipulados em dupla ou individualmente, no primeiro dia de manipulação o processo ocorria de forma individual, nos outros dois dias eram realizadas em dupla, com objetivo de redução da responsividade dos animais aos experimentadores. A manipulação dos animais pelos experimentadores possuiu duração de 10 minutos diários. As habituações consistiram em sessão de exposição ao campo aberto, sem objetos, com a duração de 10 minutos durante 3 dias anteriores às idades de teste.

Tarefa de memória similar à episódica (Tarefa WWWhen/ELM) e testes complementares

A tarefa de memória similar à episódica seguiu o protocolo elaborado por Drieskens e colaboradores (2017). A tarefa foi realizada no campo aberto, que consiste em uma arena circular, com base preta e pistas proximais (figura 1A). A seguir é demonstrada a adaptação do tamanho do aparato por idade:

Idade de teste	Tamanho do Campo (Diâmetro X Altura)
P18	30cm X 30cm
P24	52cm X 52cm
P35	52cm X 52cm
P60, P80, P90	60cm X 40cm

A tarefa é constituída de 3 etapas, a saber: habituação, amostra e teste. A habituação consistiu em sessões diárias de 10 minutos, por 3 dias, onde os ratos eram expostos ao campo

com pistas proximais, localizadas em quatro pontos das paredes da arena, e com pistas distais nas paredes da sala (Figura 1B), as quais permaneceram durante todo o experimento.

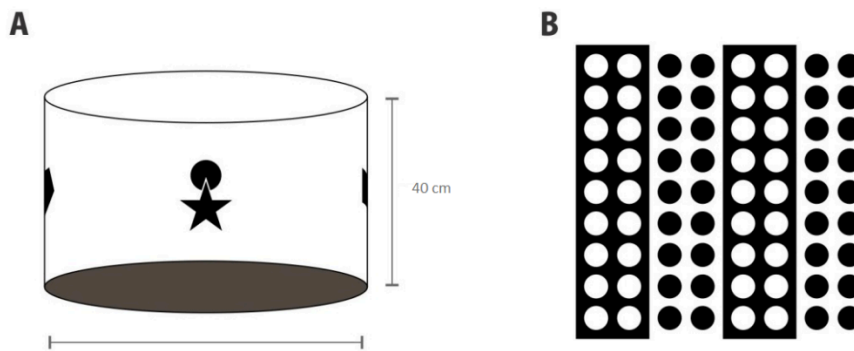


Figura 1. (A) Campo aberto circular com pistas proximais. (B) Pistas distais dispostas nas paredes da sala de experimentos.

Na segunda etapa, os animais passaram por duas sessões de amostra, com duração de 5 minutos, e intervalos de uma hora. Após uma hora de intervalo posterior à última sessão de amostra, foi realizada a sessão de teste por 5 minutos.

Na primeira sessão de amostra foram dispostos 4 objetos iguais (A), dando-se intervalo de uma hora, então, na segunda sessão foram apresentados quatro novos objetos (B), sendo dois deles alocados em locais ocupados anteriormente pelos objetos A e outros dois em locais diferentes. Uma hora após a última amostra, foi realizado o teste, no qual o animal é colocado dentro do campo aberto e apresentado a quatro objetos já conhecidos, sendo dois recentes na sua apresentação (B) e dois mais antigos (A). Desse conjunto de quatro objetos, dois estarão deslocados (A2 e B2) e dois permanecerão em posições estacionárias (A1 e B1), conforme disposto na figura 2.

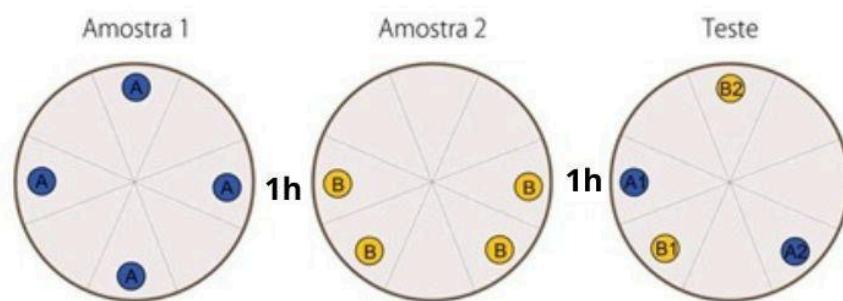


Figura 2. Diagrama esquemático do experimento. Serão utilizados animais com 18, 24, 35, 60, 80 e 90 dias de idade pós-nascimento.

Na execução da tarefa de memória similar à episódica, foram utilizados quatro modelos de objetos (Figura 3) impressos em 3D, sendo todos do mesmo material (Filamento de Poliacido Láctico - PLA), na cor azul, tendo sido produzidas 4 cópias de cada um (Pirâmide, Cone, Vaso e Twizzler), adaptadas no tamanho de acordo com as idades dos animais (ou seja P18, P24, P35, P60, P80, P90), com base no estudo realizado por Inayat et al. (2021). Ao final de cada sessão, os objetos foram higienizados com álcool diluído a 5%.

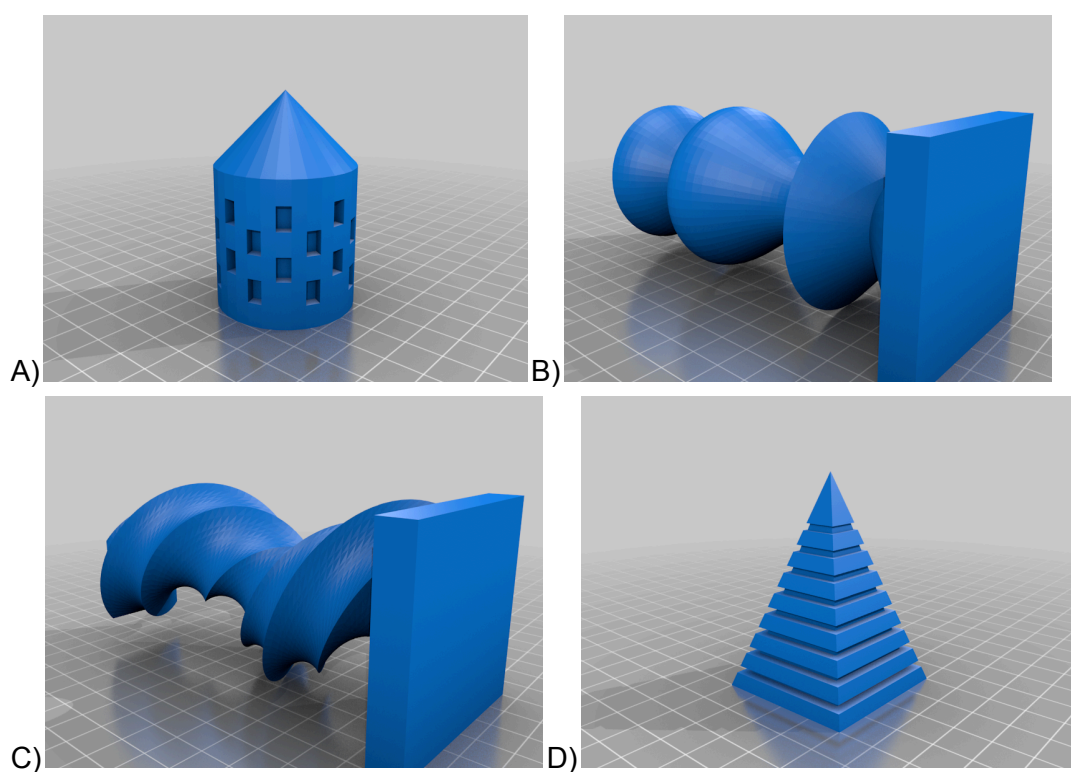


Figura 3. Cópias dos quatros objetos utilizados nas sessões de amostras e teste, que foram feitos em impressora 3D. Objeto (A): Cone; Objeto (B): Vaso; Objeto (C): Twizzler; Objeto (D): Pirâmide.

Teste de preferência por objetos (Experimento 1)

Para verificar a existência de possíveis vieses na exploração dos objetos a serem utilizados na tarefa de memória, foi realizado um teste prévio para verificar preferências pelos itens impressos em 3D. O Teste de preferência para exploração dos objetos foi realizado com machos em P25. A habituação consistiu no mesmo protocolo aplicado nos ratos para a tarefa WWWhen/ELM. Após as 3 sessões, no quarto dia, os animais eram

expostos a 4 objetos diferentes posicionados no campo para exploração livre, em sessão única de 5 minutos.

Teste de discriminação de objetos novos (Experimento 2)

Para investigar se os animais estavam conseguindo discriminar os itens impressos em 3D, foi realizada uma tarefa de discriminação de objetos novos.

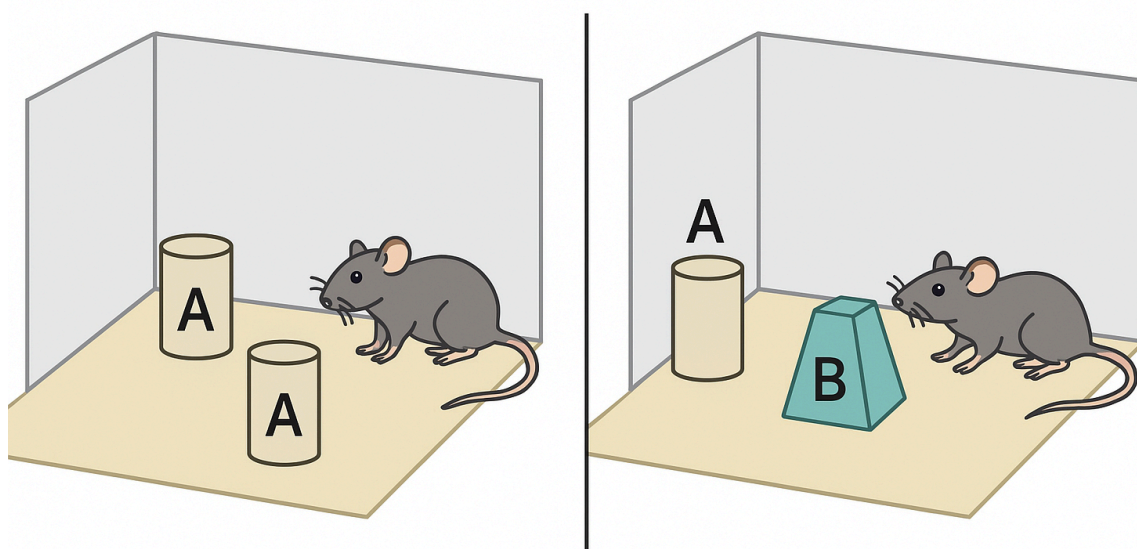


Figura 4. Tarefa de Reconhecimento de Objetos novos. Na primeira parte da figura está representada a fase amostral e na segunda fase o teste propriamente dito.

O primeiro momento de aplicação desta tarefa foi com ratos em P25, nas mesmas condições experimentais da tarefa WWWhen/ELM, na presença de pistas proximais e distais. Os ratos passaram por 3 dias de habituações ao campo, no quarto dia passaram por uma sessão de amostra, na qual eram expostos a dois objetos idênticos, e após intervalo de retenção de 1 hora, foram re-expostos ao campo, contendo um objeto familiar (já exposto na sessão de amostra) e um objeto novo.

O segundo momento de aplicação desta tarefa foi realizado com ratos em P33, desta vez na ausência de pistas proximais e distais, pois o campo foi coberto com papel adesivo preto. Antes da aplicação do teste, os animais passavam por 3 dias de habituações ao campo por 10 minutos. No quarto dia os ratos eram postos no campo com dois objetos idênticos, permitindo sua exploração livre por 5 minutos, e após o intervalo de 1 hora, os ratos eram expostos a um objeto anteriormente explorado e um objeto novo.

Caracterização comportamental da memória episódica ao longo do desenvolvimento:

Tarefa da Memória Similar à Episódica (WWWhen/ELM) - Experimento 3

O experimento tem como objetivo investigar a memória do tipo episódica no seu decurso ontogenético. Neste sentido, ratos na infância (P18), ratos no início da adolescência (P24) e ratos no final da adolescência (P35) foram submetidos e testados na tarefa de memória do tipo episódica. Como grupo controle para esta tarefa, utilizamos roedores adultos (P60, P80 e P90).

Análise Comportamental e Estatística

Todas as sessões foram gravadas com webcam, localizada acima do campo, com auxílio do software Debut. A análise dos vídeos ocorreu de forma automatizada, através de treinamento de redes utilizando o software de código aberto DeepLabCut (DLC) (Nilson et al., 2020/ Mathis et al., 2018). Após o treinamento e análise no DLC, por meio do Simple Behavioral Analysis (SimBa) (Nilson et al., 2020), foram demarcadas as regiões de interesse (ROI) a partir da posição dos objetos no campo. A exploração foi definida como o momento em que o focinho do animal estava dentro da região de interesse (ROI/objetos) – esta área corresponde a cerca de 1cm ao redor do objeto. Para exclusão de comportamentos não-exploratórios, como apoiar-se no objeto para explorar/mapear o ambiente, escalar o objeto ou permanecer próximo ao objeto sem atividade exploratória.

Desta forma, as variáveis extraídas a partir destas análises foram a distância percorrida durante as sessões, tempo total de exploração, além do início e final da exploração de cada objeto (Nilson et al., 2020; Mathis et al., 2018).

Para avaliar a expressão da memória, foi utilizado como parâmetro o tempo total de exploração dos objetos, constituindo os índices de discriminação. Os índices são descritos como medidas que abarcam a comparação de exploração de um objeto em relação a outro, variando de -1 a +1.

Para mensurar o comportamento ansioso foi realizada análise, por meio dos vídeos, em relação ao padrão locomoção, assim como a preferência entre percorrer áreas mais externas ou o centro. Também, como análise desse tipo de comportamento foi avaliada a latência, ou seja, o tempo em que o animal levava para iniciar a exploração em relação ao primeiro objeto.

Índice de Discriminação Memória Temporal	Índice de Discriminação Memória Espacial	Índice de Discriminação Memória Integrativa
$\frac{A1-B1}{A1+B1}$	$\frac{B2-B1}{B2+B1}$	$\frac{A1-A2}{A1+A2}$
Valor entre -1 e 1	Valor entre -1 e 1	Valor entre -1 e 1
Legenda: A1 = Obj. antigo estacionário B1 = Obj. recente estacionário	Legenda: B2 = Obj. recente deslocado B1 = Obj. recente estacionário	Legenda: A1 = Obj. antigo estacionário B1 = Obj. antigo deslocado

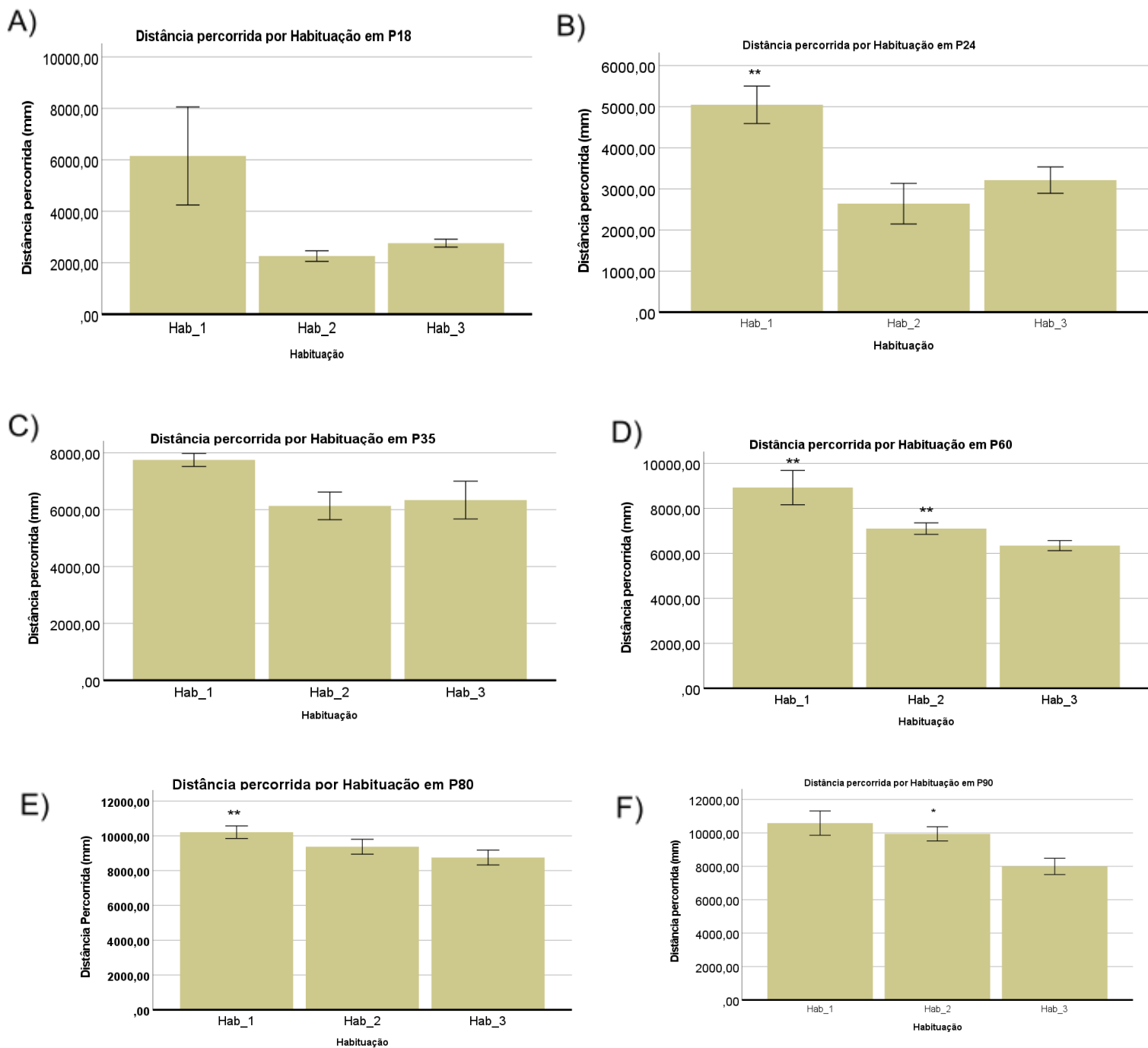
Figura 5. Fórmulas dos Índices de Discriminação.

Os procedimentos estatísticos foram conduzidos com o programa SPSS (25.0) e diferenças foram consideradas estatisticamente significantes com um valor de p menor que 0,05. A normalidade foi verificada através do teste de Shapiro-Wilk. Em caso de normalidade os índices de discriminação foram comparados em relação ao acaso com valor em zero mediante utilização do Teste t de uma amostra. Para avaliar o efeito de interação entre as zonas do campo aberto por habituação e distância total percorrida entre sessões, foi utilizada a ANOVA de medidas repetidas, para distribuição normal e seguidas de post-hoc Bonferroni. Para avaliar o perfil de latência de exploração dos objetos na primeira sessão de amostra, caso em que ocorreu desvio da distribuição, foi utilizada a ANOVA de Friedman. Para comparações do tempo total de exploração e teste de preferência foi utilizado ANOVA de medidas repetidas com objetos como fatores em caso de distribuição normal, seguida do teste post-hoc de Bonferroni. Também foi aplicada a correção de Greenhouse-geisser nos casos em que foi verificada violação da esfericidade.

CAPÍTULO III

RESULTADOS

Padrão de Locomoção dos animais nas sessões de Habituação



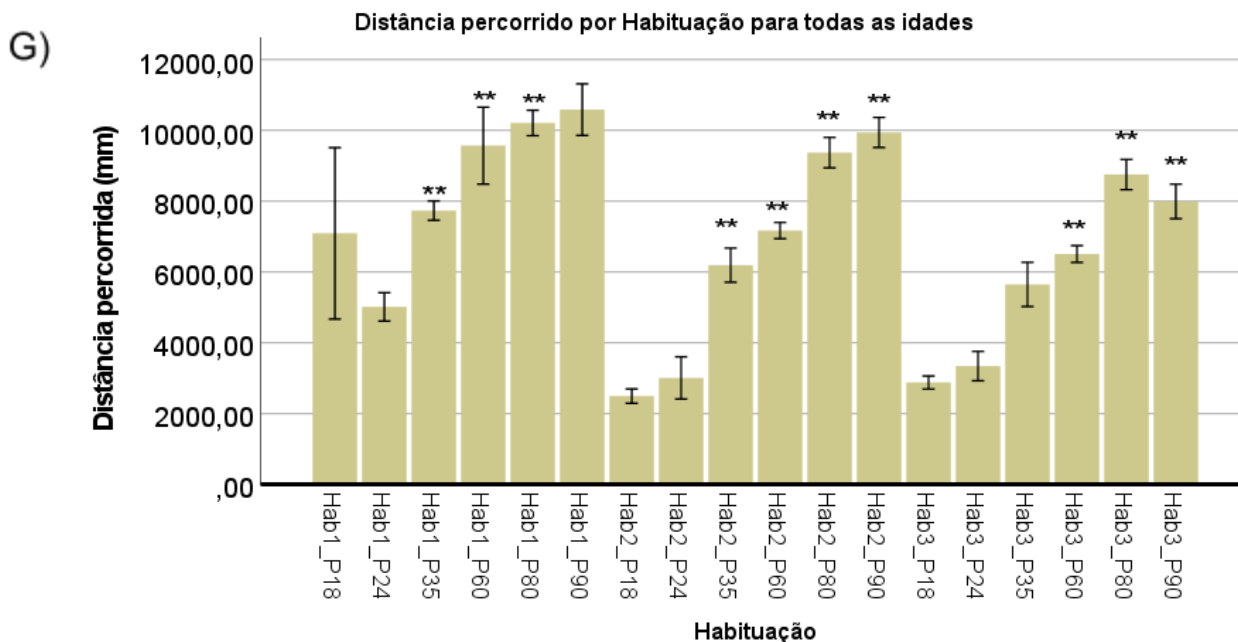


Figura 6. Distância percorrida (em mm) por roedores durante as sessões de habituação em diferentes idades. (A) P18, (B) P24, (C) P35, (D) P60, (E) P80, (F) P90, (G) Comparativo das sessões de habituação por idade. As colunas representam a média da distância percorrida em cada sessão de habituação (Hab_1, Hab_2 e Hab_3), com barras de erro indicando o erro padrão da média (± 1 SEM). Os asteriscos indicam significância estatística (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$) em comparação entre as habituações.

A Figura 6 apresenta o padrão de locomoção dos animais no campo aberto nas sessões de habituação. Para os ratos em P18, a ANOVA de medidas repetidas não revelou efeito para as sessões de habituação [$F(1,12) = 3,533$; $p = 0,08$; $\eta^2 = 0.227$, considerando a estimativa de Greenhouse-Geisser].

De forma semelhante, para P24 a ANOVA de medidas repetidas revelou efeito para as sessões de habituação [$F(2,24) = 8,313$; $p = 0,002$; $\eta^2 = 0.409$, considerando a estimativa de Greenhouse-Geisser]. No *post-hoc*, foi evidenciado que a habituação 1 teve maior distância percorrida que a habituação 2 ($p = 0,01$) e que a habituação 3 ($p = 0,02$).

Por sua vez, para P35 a ANOVA de medidas repetidas não revelou efeito para as sessões de habituação [$F(1,13) = 3,317$; $p = 0,08$; $\eta^2 = 0.217$, considerando a esfericidade].

Para os animais em P60, a ANOVA de medidas repetidas revelou efeito para as sessões de habituação [$F(1,15) = 11,546$; $p = 0,003$; $\eta^2 = 0.452$, considerando a esfericidade]. Por meio do *post-hoc*, foi observado que a habituação 1 teve maior distância

percorrida que a habituação 2 ($p = 0,04$) e que a habituação 3 ($p = 0,005$), assim como, a habituação 2 foi mais percorrida que a habituação 3 ($p < 0,001$).

Em relação à locomoção dos animais no campo aberto para P80, a ANOVA de medidas repetidas revelou efeito para as sessões de habituação [$F(2,18) = 5,393$; $p = 0,03$; $\eta^2 = 0.375$, considerando a esfericidade]. Ao se realizar o *post-hoc*, foi evidenciado que a habituação 1 teve maior distância percorrida que a habituação 2 ($p = 0,01$) e que a habituação 3 ($p = 0,05$).

Seguindo a mesma perspectiva, para P90, a ANOVA de medidas repetidas revelou efeito para as sessões de habituação [$F(2,18) = 5,471$; $p = 0,03$; $\eta^2 = 0.378$, considerando a esfericidade]. O *post-hoc* demonstrou que a habituação 2 teve maior distância percorrida que a habituação 3 ($p = 0,03$).

No entanto, para o comparativo entre todas as idades por sessão de habituação, a ANOVA revelou efeito para as sessões de habituação [$F(2,19) = 13,099$; $p < 0,001$; $\eta^2 = 0.593$, considerando a esfericidade]. Na habituação 1, no *post-hoc*, os animais em P35 tiveram maior distância percorrida do que P24 ($p < 0,001$), assim como animais em P80 percorreram maior distância do que P35 ($p < 0,001$) e que P24 ($p < 0,001$). Na habituação 2, no *post-hoc* foram encontradas diferenças, P35 teve maior distância que P18 ($p < 0,001$), P60 teve maior distância percorrida que P18 ($p < 0,001$) e que P24 ($p = 0,006$), P80 foi maior em distância percorrida do que P18 ($p < 0,001$), P24 ($p = 0,005$) e P35 ($p = 0,03$), e P90 teve distância percorrida maior apenas que P18 ($p < 0,001$) e P24 ($p = 0,002$). Para a habituação 3, no *post-hoc*, P60 teve maior distância percorrida que P18 ($p < 0,001$) e P24 ($p = 0,008$), P80 teve maior distância percorrida que P18 ($p < 0,001$), P24 ($p = 0,003$) e P35 ($p = 0,05$) e, por fim, P90 teve sua distância percorrida maior que P18 ($p = 0,001$) e P24 ($p = 0,002$).

Caracterização da exploração da periferia e do centro do campo entre as habituações

Para verificar a expressão do comportamento do tipo ansioso, foi avaliada a locomoção dos ratos no campo aberto durante as sessões de habituação. Assim sendo, no aparato foram demarcadas zonas que o dividiram entre periferia (Zona 1), área de transição ou intermediária (Zona 2) e centro (Zona 3). A Figura 7 demonstra tal disposição.

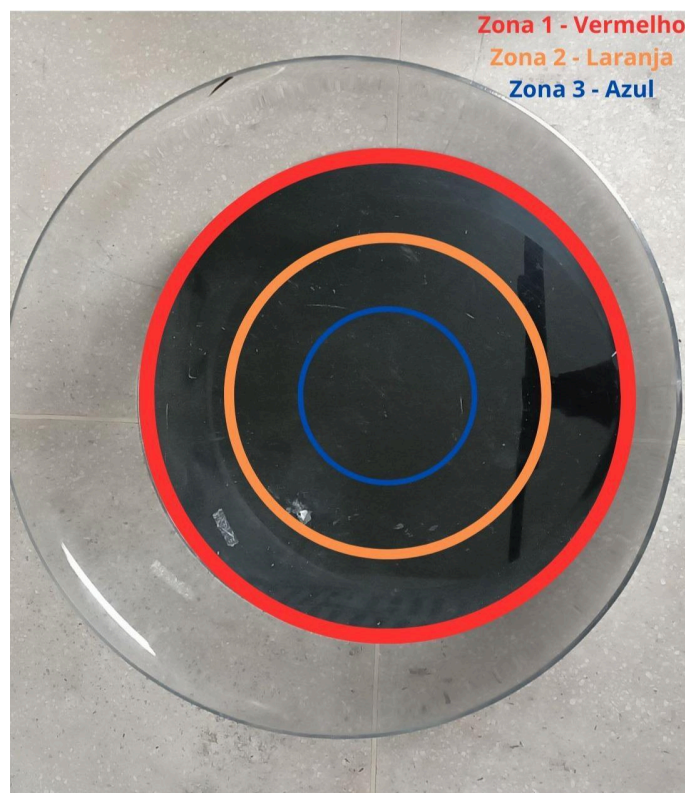


Figura 7. Representação de cada zona do campo. Zona 1 em vermelho (Z1), zona da periferia do campo; Zona 2 em laranja (Z2), zona intermediária ou de transição; Zona 3 em azul (Z3), centro do campo.

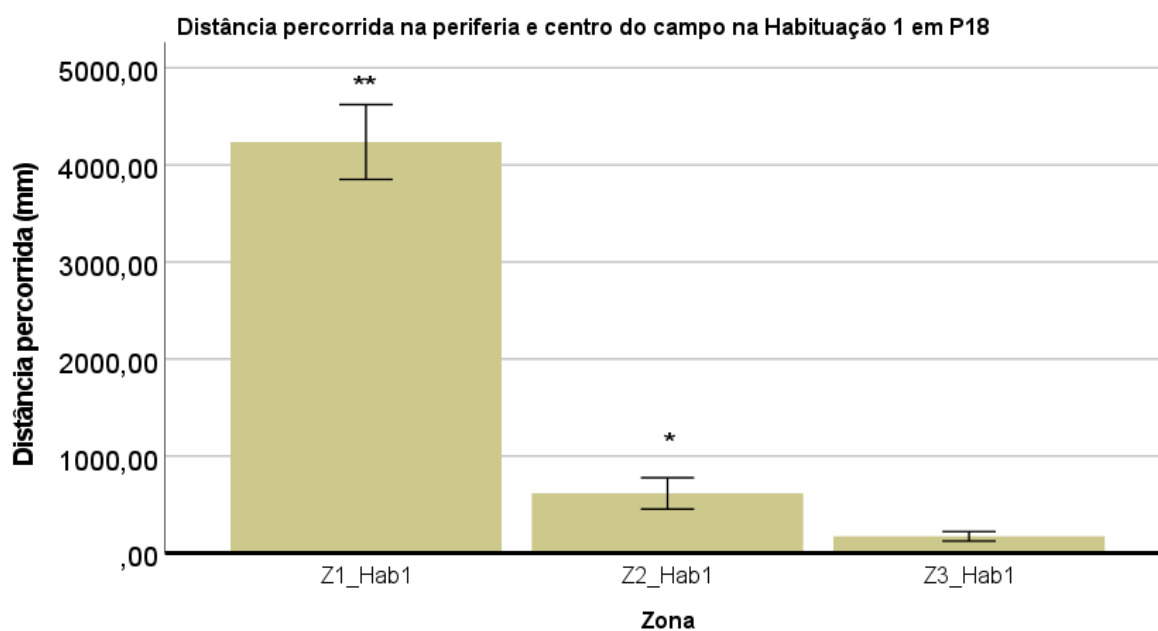


Figura 8. Distância percorrida (em mm) nas zonas de periferia (Z1), transição (Z2) e centro (Z3) do campo aberto durante a primeira sessão de habituação em P18. Os asteriscos indicam significância estatística (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$) em comparação entre zonas.

Assim sendo, esta seção apresenta a ocorrência de locomoção em áreas próximas às bordas do aparato ou mais internamente. Para os ratos em P18, o teste de Mauchly indicou que a esfericidade foi violada, $X^2(2) = 11.867$, $p < 0.001$, considerando a estimativa de Greenhouse-Geisser. Na realização da ANOVA de medidas repetidas, foram observadas diferenças entre as zonas para a habituação 1 [$F(1,13) = 84.404$, $p < 0.001$, $\eta^2 = 0.885$]. Após, foi feito *post-hoc*, para ver quais zonas estavam diferentes, foi demonstrado que a zona 1 foi maior explorada que a zona 2 ($p < 0.001$), que a zona 1 teve maior exploração que a zona 3 ($p < 0.001$) e a zona 2 teve maior preferência de exploração que a zona 3 ($p = 0.03$).

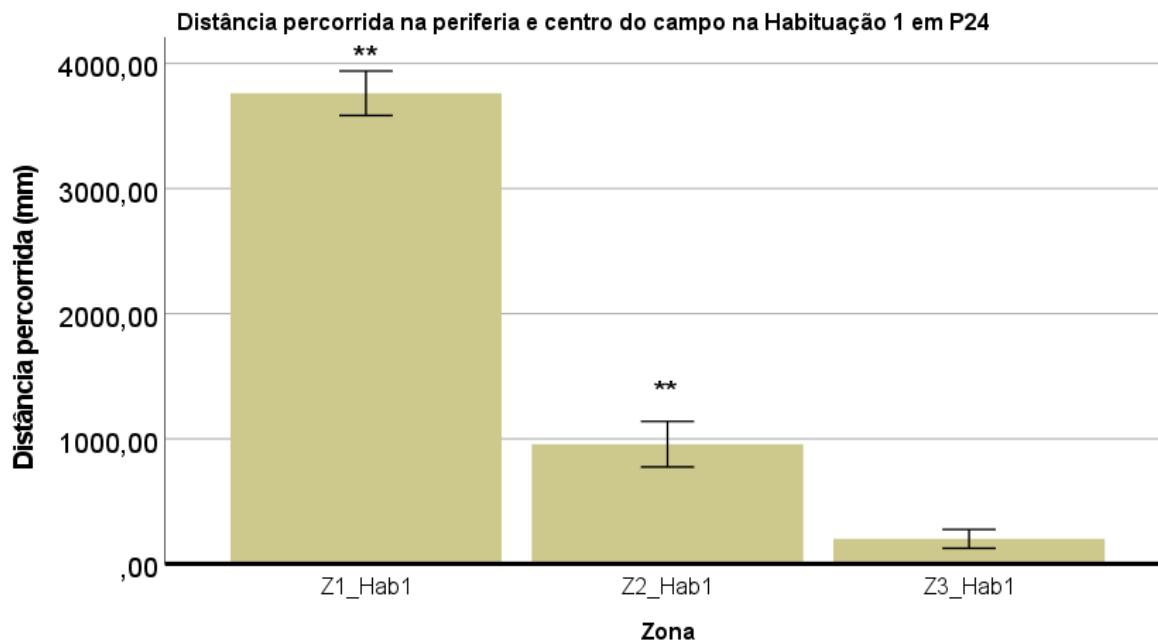


Figura 9. Distância percorrida (em mm) nas zonas de periferia (Z1), transição (Z2) e centro (Z3) do campo aberto durante a primeira sessão de habituação em P24. Os asteriscos indicam significância estatística (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$) em comparação entre zonas.

Para os animais em P24, o teste de Mauchly indica que a hipótese de esfericidade foi violada, $X^2(2) = 19.155$, $p < 0.001$, considerando a estimativa de Greenhouse-Geisser. Para a habituação 1 houve efeito na interação entre as três zonas [$F(1,13) = 107.89$; $p < 0.001$; $\eta^2 = 0.900$]. No *post-hoc*, a zona 1 teve maior distância percorrida que a zona 2 ($p < 0.001$) e zona 3 ($p < 0.001$), e a zona 2 teve maior exploração em comparação com a zona 3 ($p < 0.001$).

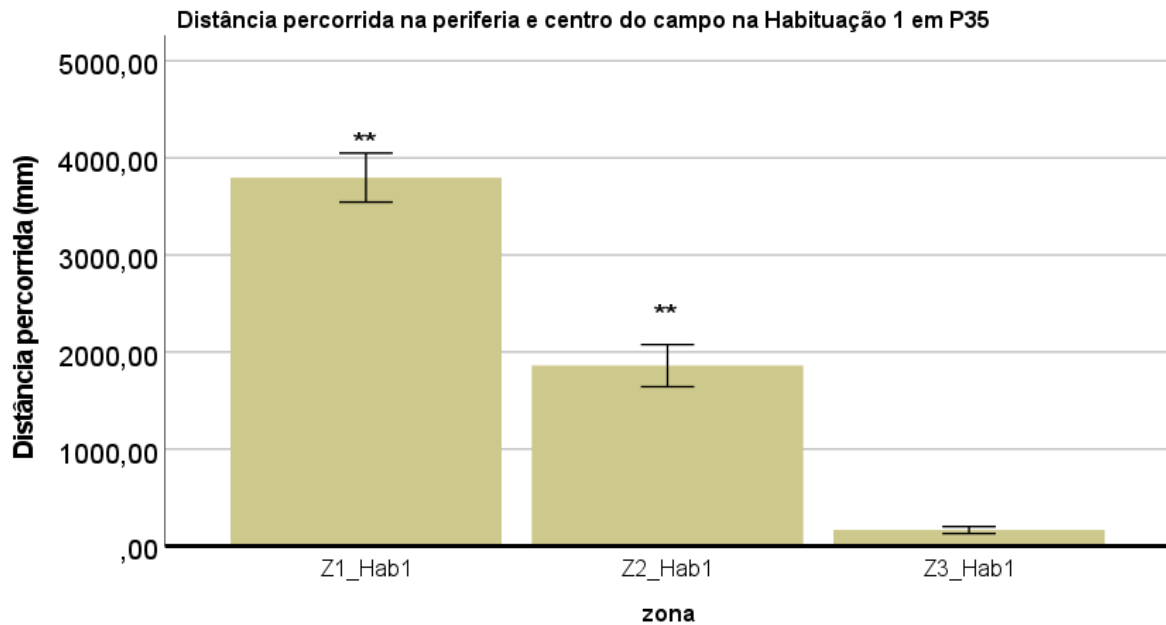


Figura 10. Distância percorrida (em mm) nas zonas de periferia (Z1), transição (Z2) e centro (Z3) do campo aberto durante a primeira sessão de habituação em P35. Os asteriscos indicam significância estatística (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$) em comparação entre zonas.

No que se refere a ratos em P35, no teste de Mauchly pode ser observado que a esfericidade foi violada, $X^2(2) = 45.510$, $p < 0.001$, considerando a estimativa de Greenhouse-Geisser. Então, realizou-se ANOVA de medidas repetidas, na habituação 1 foi observada diferença significativa entre as zonas [$F(1,12)=62.05$; $p < 0.001$; $\eta^2=0.838$]. Por fim, no *post-hoc* foi observado que a zona 1 teve maior distância percorrida que a zona 2 ($p < 0.001$) e que a zona 3 ($p < 0.001$), e que a zona 2 teve maior distância percorrida que 3 ($p < 0.001$).

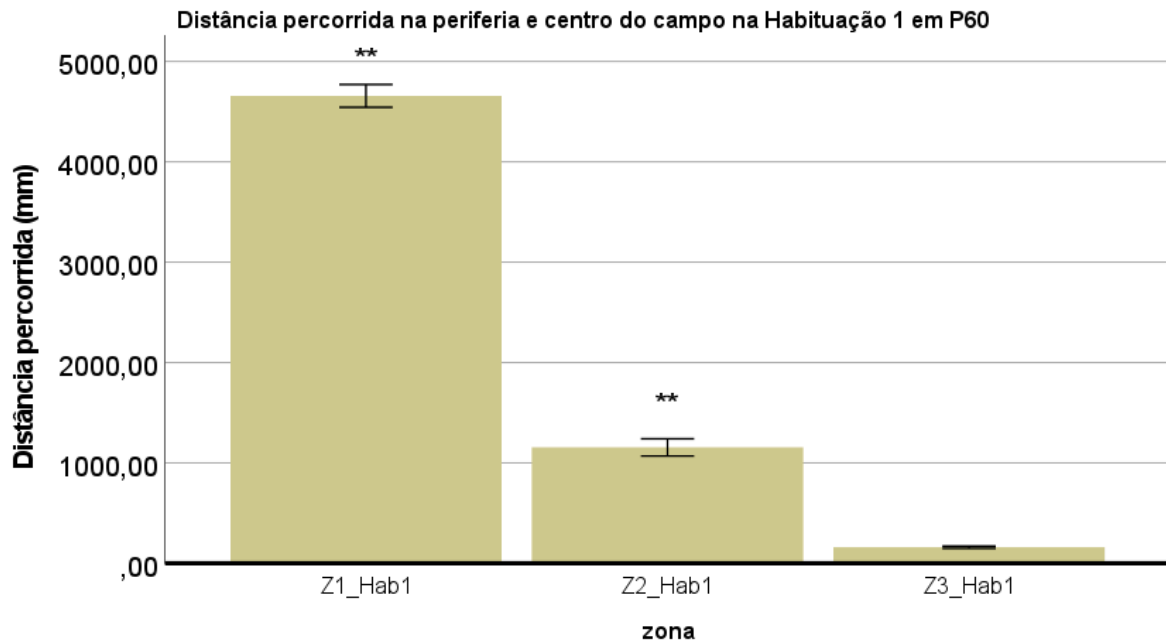


Figura 11. Distância percorrida (em mm) nas zonas de periferia (Z1), transição (Z2) e centro (Z3) do campo aberto durante a primeira sessão de habituação em P60. Os asteriscos indicam significância estatística (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$) em comparação entre zonas.

Em P60, no teste de Mauchly constatou-se que a esfericidade foi violada $X^2(2) = 16.100$, $p < 0.001$, considerando a estimativa de Greenhouse-Geisser. Na habituação 1 foram observadas diferenças entre as zonas, por meio da ANOVA de medidas repetidas, $[F(1,16)=1.706$; $p < 0.001$; $\eta^2=0.981]$. Por fim, no *post-hoc* foi observado que a zona 1 teve maior distância percorrida que a zona 2 ($p < 0.001$) e que a zona 3 ($p < 0.001$), e que a zona 2 teve maior distância percorrida que 3 ($p < 0.001$).

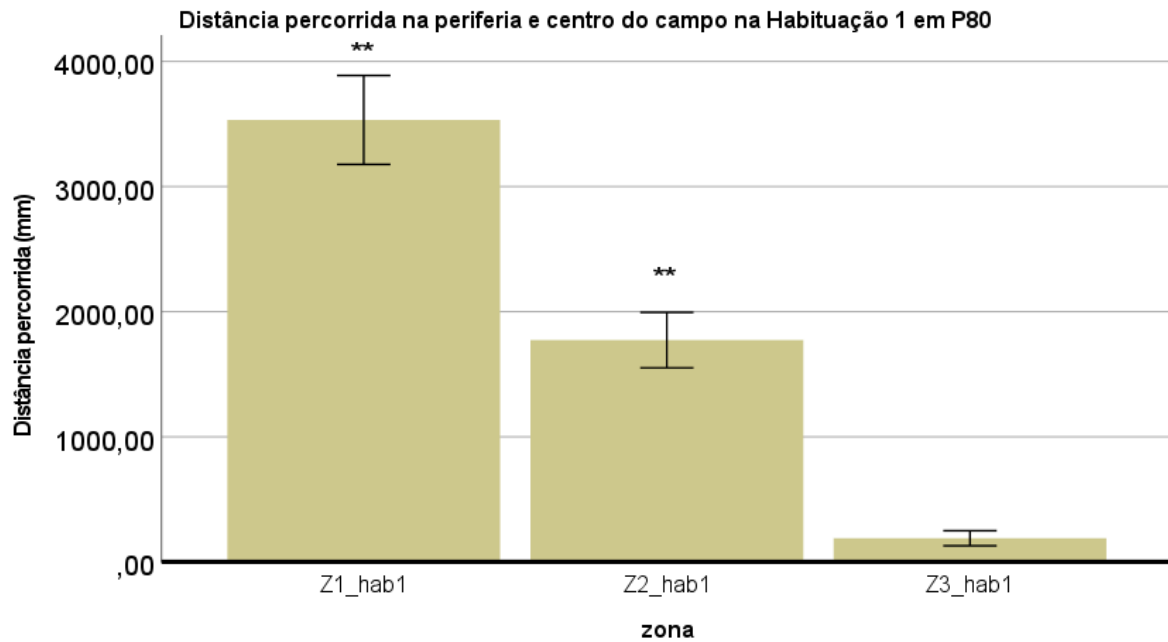


Figura 12. Distância percorrida (em mm) nas zonas de periferia (Z1), transição (Z2) e centro (Z3) do campo aberto durante a primeira sessão de habituação em P80. Os asteriscos indicam significância estatística (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$) em comparação entre zonas.

Para ratos em P80, no teste de Mauchly, foi constatada a violação da esfericidade, $X^2(2) = 14.841$, $p < 0.001$, considerando a estimativa de Greenhouse-Geisser. Na Habituação 1, por meio da ANOVA de medidas repetidas, foram encontradas diferenças para as três zonas [$F(1, 9) = 36.959$; $p < 0.001$; $\eta^2 = 0.804$]. No *post-hoc* foi observado que a zona 1 teve maior distância percorrida que a zona 2 ($p = 0.02$) e que a zona 3 ($p < 0.001$), e que a zona 2 teve maior distância percorrida que a zona 3 ($p < 0.001$).

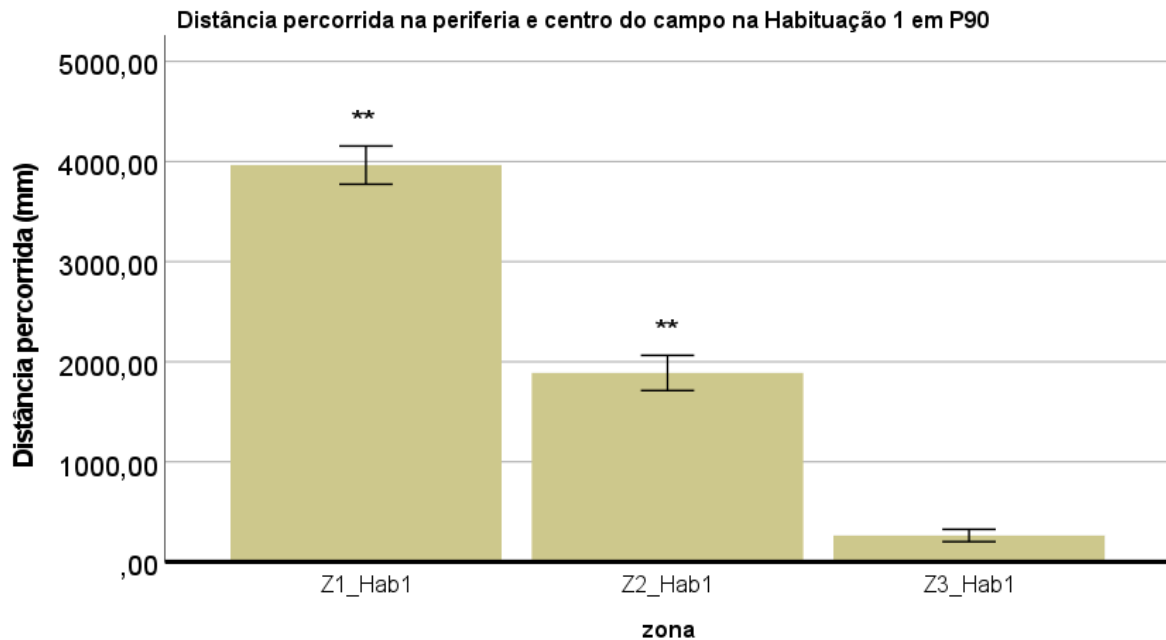


Figura 13. Distância percorrida (em mm) nas zonas de periferia (Z1), transição (Z2) e centro (Z3) do campo aberto durante a primeira sessão de habituação em P90. Os asteriscos indicam significância estatística (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$) em comparação entre zonas.

Para ratos em P90 na primeira habituação, foi constatada violação da esfericidade através do teste de Mauchly, $X^2(2) = 11.951$, $p=0.003$, considerando a estimativa de Greenhouse-Geisser. Na realização da ANOVA de medidas repetidas foram encontradas diferenças entre as zonas, $[F(1, 10)=98.293$; $p<0.001$; $n=0,916]$. Por fim, no *post-hoc* foi observado que a zona 1 teve maior distância percorrida que a zona 2 ($p<0.001$) e que a zona 3 ($p<0.001$), e que a zona 2 teve maior distância percorrida que zona 3 ($p<0.001$).

Latência de exploração do primeiro objeto na primeira sessão de amostra

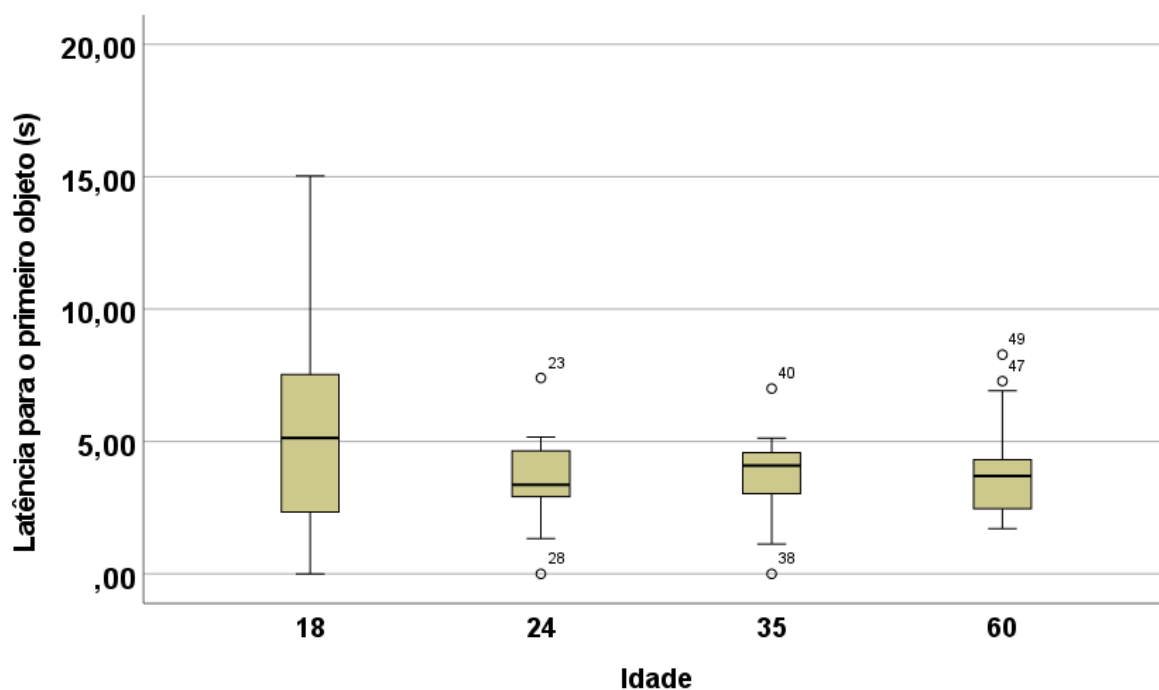


Figura 14. Efeito da idade na latência para a primeira exploração no campo aberto. Média do tempo (em segundos) para a primeira entrada na região de interesse durante a tarefa, nas diferentes idades avaliadas: P18, P24, P35 e P60. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média (SEM).

Para avaliar a possível interferência da neofobia na exploração, buscamos mensurar a latência para visitar o primeiro objeto explorado pelos animais no ensaio experimental (ou seja: o primeiro evento de exploração, que se dá na primeira sessão de Amostra). Esta variável foi investigada dentre as idades testadas. Os dados não seguiram uma distribuição normal, assim foi realizado o teste de Kruskal Wallis, o qual não revelou efeito na latência para visitar o primeiro objeto explorado por ratos P18, P24, P35 e P60 , $\chi^2(3) = 2,656$, $p < 0,448$.

Experimento 1 - Ratos possuem algum viés de preferência entre os objetos?

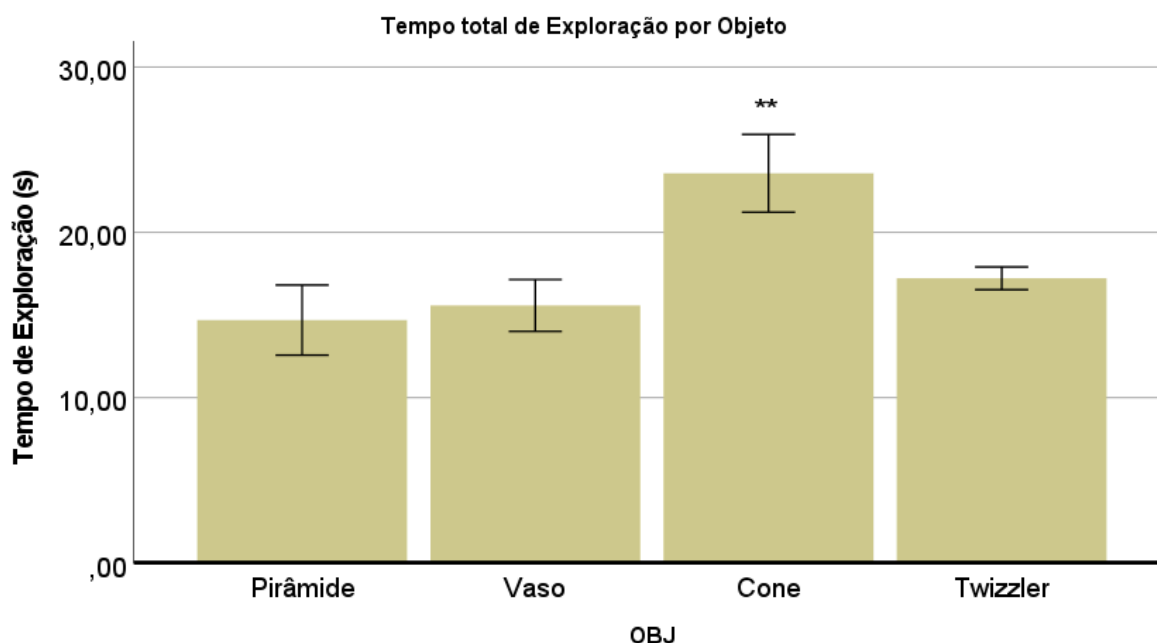


Figura 15. Tempo total bruto de exploração por tipo de objeto. Média do tempo total de exploração (em segundos) dedicado a cada objeto durante a tarefa: Pirâmide, Vaso, Cone e Twizzler. O objeto do tipo Cone foi o mais explorado, seguido pelo Vaso, Twizzler e Pirâmide. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média (SE).

Paralelamente às tarefas de reconhecimento de objetos, foram realizados testes de preferência entre os objetos, com animais em P25, a fim de avaliar se há enviesamento na exploração de objetos. Foi realizada ANOVA de Medidas Repetidas com o objeto sendo um fator [$F(3,30) = 5,924$; $p = 0,003$; $\eta^2 = 0,350$]. Após, foram realizados teste *post-hoc*, para avaliar o comparativo dos objetos, sendo observada preferência do cone quando comparado à pirâmide ($p=0.01$), assim como, maior exploração do cone em relação ao twizzler ($p=0.03$). Dado o resultado apresentado, o cone não foi utilizado nos experimentos seguintes.

Experimento 2 - Será se os ratos realmente discriminam ou somente esqueceram os objetos?

Para averiguar se os ratos conseguem lembrar ou não de objetos apresentados no período de retenção utilizado na tarefa de memória similar à episódica, foi aplicada a tarefa de reconhecimento (NOR) em duas idades. Inicialmente, a tarefa foi aplicada na idade de 25 dias, estado o ambiente com pistas proximais e distais. Posteriormente, foram retiradas todas

as pistas, e o campo foi coberto com um adesivo parafilme preto, tendo sido testados ratos em 33 dias. Ressalta-se que a tarefa realizada seguiu o intervalo de 1 hora entre amostra e teste, seguindo os parâmetros de intervalo da tarefa WWWhen/ELM.

Em relação ao índice geral de discriminação, ratos com P25 não foram capazes de discriminar os objetos. Quando buscamos avaliar o cumulativo por minuto do índice, ainda assim, em nenhum minuto foi observada discriminação por parte dos roedores [$p=0,423$; $d=0,266$].

Em relação ao índice geral de discriminação para ratos P33, não foi encontrado diferenças estatísticas significativas. Contudo, ao se avaliar o cumulativo por minuto, percebe-se que, no primeiro [$p=0,068$; IC= $-0,0233 - 0,5231$; $d=0,654$] e no segundo [$p=0,09$; IC= $-0,0307 - 0,3521$; $d=0,601$] minuto, os ratos demonstraram uma tendência para a discriminação dos objetos.

Experimento 3 - WWWhen/ELM

Exploração dos objetos por idades na sessão de teste

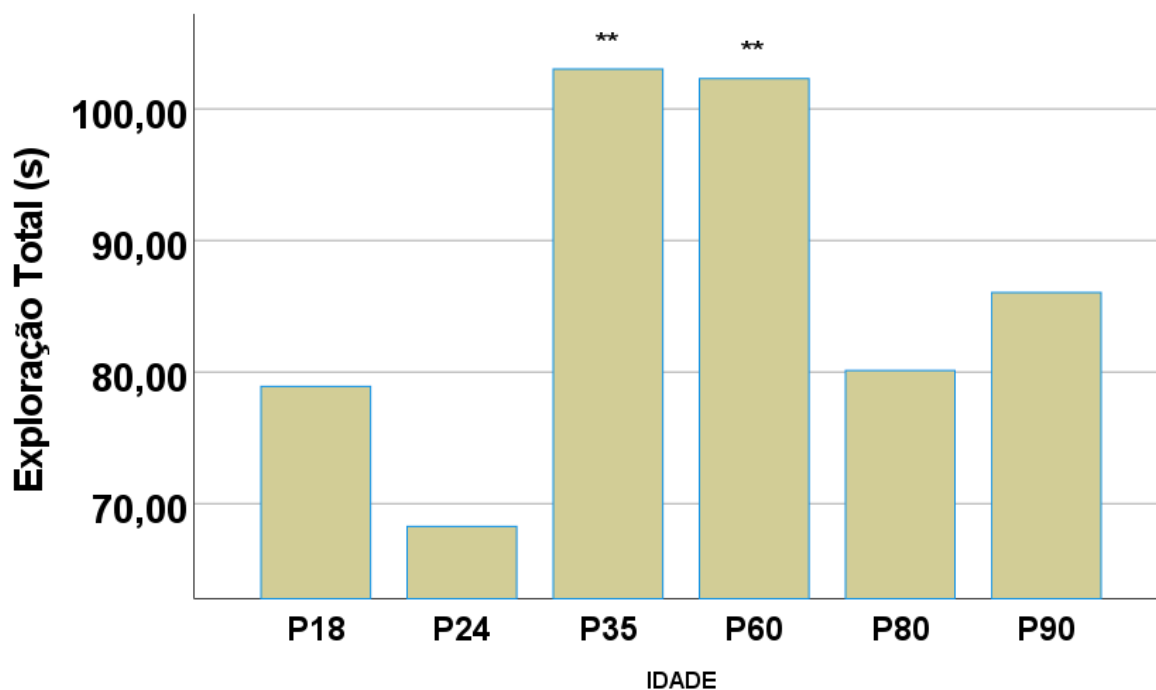


Figura 16. Tempo médio de exploração (em segundos) durante a tarefa de exploração em diferentes idades (P18, P24, P35, P60, P80 e P90), na fase de teste de ratos. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média (SEM).

Para a exploração total dos objetos na fase de Teste (Figura A.), foi realizada ANOVA de um fator, tendo sido observado efeito na exploração dos objetos entre os grupos experimentais [$F(5, 72)=5,484$; $p < 0,001$; $\eta^2 = 0,276$]. Foi então realizado *post-hoc* Bonferroni, e se verificou que o grupo de P35 teve maior tempo de exploração quando comparado a P24 ($p = 0,001$), assim como P60 quando comparado a P24 ($p = 0,001$).

Índices de Discriminação por idade na fase de teste da tarefa WWWhen/ELM

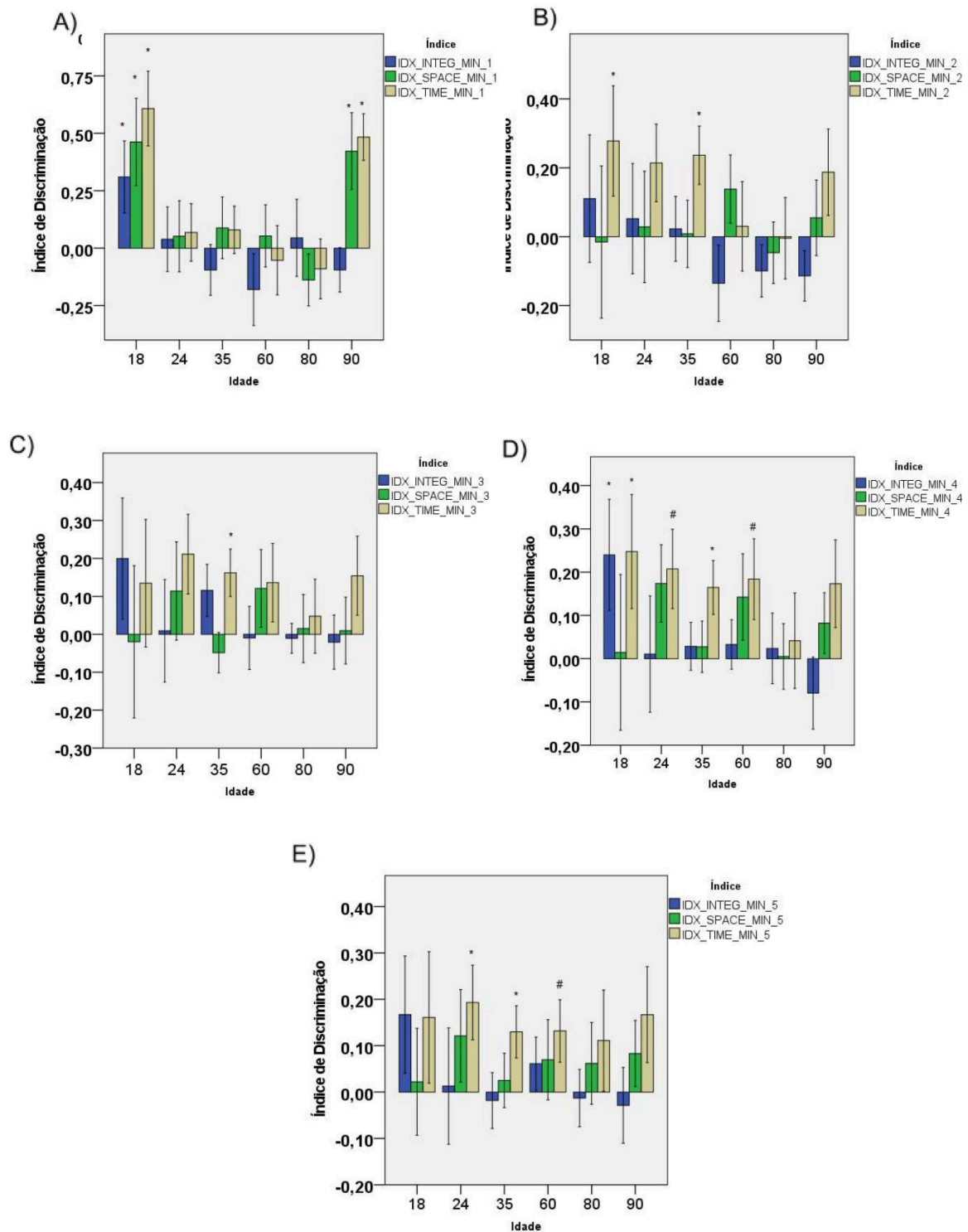


Figura 17. Índices de discriminação do cumulativo (minuto a minuto) nos testes de memória episódica "what-where-when" (WWWhen) ao longo do desenvolvimento (idades em dias pós-natal). Os painéis de A a E representam a análise cumulativa por minuto de exploração durante o teste, sendo A) primeiro minuto, B) segundo minuto, C) terceiro minuto, D) quarto minuto e E) quinto minuto. Em cada painel, são apresentados três índices de discriminação: IDX_Integração (azul), IDX_Espaço (verde) e IDX_Tempo (bege), com médias \pm erro padrão (SE). A presença de asteriscos (*) indica desempenho significativamente acima do nível do acaso ($p < 0,05$), e símbolos de cerquilha (#) indicam tendências estatísticas ($p \geq 0,06$).

O presente trabalho objetivou descrever o comportamento de ratos Wistar submetidos a uma tarefa de memória similar à episódica durante o neurodesenvolvimento, para tanto foram investigados ratos em P18, P24, P35, P60, P80 e P90.

Não foram encontradas diferenças estatísticas nos índices de tempo, espaço e integração nos ratos em P18, ao se considerar o tempo total do teste. Ao se avaliar os índices em relação ao cumulativo de minutos durante a sessão, observou-se que, no primeiro [$p = 0,002$; IC= 0,2683 - 0,9240; $d = 1,099$], segundo [$p = 0,059$; IC= -0,0148 - 0,6500; $d = 0,577$] e quarto [$p = 0,048$; IC= 0,0023 - 0,5413; $d = 0,610$] minuto, houve discriminação para ordem temporal. A memória espacial foi expressa no primeiro [$p = 0,031$; IC= 0,0492 - 0,8222; $d = 0,716$] minuto. O índice de integração dos elementos foi percebido no primeiro [$p = 0,048$; IC= 0,0040 - 0,6330; $d = 0,612$] e no quarto [$p = 0,050$; IC= 0,0000 - 0,5241; $d = 0,604$] minuto.

Ratos em P24 não obtiveram estatísticas significativas nos índices espaço e integração quando se observa toda a duração do teste, observa-se discriminação em relação à memória de ordem temporal [$p = 0,05$; IC= -0,0036 - 0,3578; $d = 0,543$]. Quanto às medidas cumulativas, foi observado no minuto quatro uma tendência para a ordem temporal [$p = 0,07$; IC= -0,0194 - 0,3871; $d = 0,501$].

Para os ratos em P35, foi expressa memória de ordem temporal [$p = 0,037$; IC= 0,0091 - 0,2505; $d = 0,596$] considerando-se o tempo total do teste. Com referência ao acumulado durante a sessão, foram constatadas estatísticas significantes para o segundo [$p = 0,014$; IC= 0,0547 - 0,4181; $d = 0,721$], terceiro [$p = 0,021$; IC= 0,0285 - 0,2959; $d = 0,672$], quarto [$p = 0,019$; IC= 0,0309 - 0,2982; $d = 0,682$] e quinto [$p = 0,037$; IC= 0,0091 - 0,2505; $d = 0,596$] minuto na memória de ordem temporal.

Em P60, os ratos expressaram apenas uma tendência para memória de ordem temporal ao se considerar todo o tempo de teste [$p = 0,071$; IC= -0,0129 - 0,2766; $d = 0,504$]. No que tange ao cumulativo durante a, na memória de ordem temporal foram observadas

diferenças estatisticamente significativas no quarto [$p= 0,070$; $IC = -0,0169 - 0,3844$; $d= 0,507$] e quinto [$p= 0,071$; $IC = -0,0129 - 0,2766$; $d= 0,504$] minuto.

Ratos em P81 não expressam memória episódica e nenhum dos índices de discriminação espacial e de ordem temporal. Quando se avalia a minutagem, os animais ainda permanecem sem discriminar os objetos ao longo da tarefa.

Ratos em P90 expressaram uma tendência para memória de ordem temporal [$p=0,08$; $IC= -0,033 - 0,402$; $d= 0,605$]. No que se refere a minutagem acumulada, os ratos expressaram tanto memória de ordem temporal [$p= 0,01$; $IC= 0,2542 - 0,7136$; $d= 1,507$] quanto espacial [$p= 0,03$; $IC= 0,0447 - 0,8007$; $d= 0,800$] no primeiro minuto.

CAPÍTULO IV

DISCUSSÃO

O trabalho buscou caracterizar comportamentalmente a emergência da memória similar à episódica em diferentes idades do desenvolvimento. Os resultados demonstraram que somente os ratos em P18, no cumulativo da sessão (1min), integraram os aspectos da memória similar à episódica. Contudo, parece haver um perfil de expressão consistente no que se refere à memória temporal, que aparece a partir de P24. Observa-se também que no teste de reconhecimento de objetos novos, foi observado que apenas ratos em P33 são capazes de discriminar objetos, considerando-se os dois primeiros minutos. Na compreensão destes resultados, é importante ressaltar que, objetivando padronizar os itens e o aparato que constituem a tarefa, foi utilizado um conjunto de objetos 3D com dimensões adaptados à cada idade. É importante lembrar também que a tarefa foi aplicada conforme o protocolo de Kart-teke e colaboradores (2006), mantendo-se inalterados os intervalos de retenção.

No que se refere à emergência da memória para o tempo, os resultados estão na direção de estudos anteriores quanto ao início de expressão mais tardio. Em intervalos de 10 minutos, este tipo de memória aparece entre P17 e P20, contudo não se tem evidências em intervalos tão longos quanto 1 hora, como o utilizado em nosso estudo – somente em pesquisas realizadas com camundongos, tendo sua expressão a partir de P28 (Cruz-Sanchez et al., 2020; Assiminas et al., 2022).

Nessa mesma direção, nossos resultados parecem estar em contraponto a Assiminas e colaboradores (2022) e Ramsaram (2016), quando direciona-se à discussão para tarefas que associam mais de um aspecto da memória, exigindo maior carga cognitiva e capacidade de integração, a exemplo da tarefa objeto-lugar (OL ou Object - Place Recognition, OPR), objeto no contexto (Object in Context, OiC) e Objeto - Lugar - Contexto (OLC ou, object-place-contexto, OPC), em que a memória somente emerge nas idades de P26 e P31 em camundongos, sendo estas realizadas com intervalos de retenção de 5 minutos. Em estudo desenvolvido por Assiminas e colaboradores (2022), o qual avaliou a emergência da memória integrativa em diferentes idades em ratos, tanto para OPR, quanto para OLC, esta teve sua expressão iniciada a partir da 7ª semana, entre 49 e 50 dias, com um curto intervalo de retenção entre as sessões. Porém, em comparação ao estudo aqui realizado, ressalta-se

diferenças metodológicas na natureza de informação contextual, além do intervalo de retenção da tarefa, pois os autores utilizam apenas 2 minutos entre as fases das tarefas e foi aplicado 1 hora.

Embora pareça que o perfil de emergência da memória de ordem temporal surja a partir de P24, com a realização da tarefa de reconhecimento de objetos, sugere-se que, nesta idade, os animais apenas esqueceram do objeto mais antigo, apresentando um falso positivo para a discriminação temporal. Logo, parece que apenas a partir de P35 os animais realmente têm capacidade discriminativa para o tempo, com exceção dos ratos em P80, de modo que a nossa hipótese é de que existem diferentes mecanismos comportamentais e neurobiológicos, ligados à ontogênese, que possibilitam tal competência.

Por que então os animais expressaram a memória de ordem temporal, e não a espacial? Uma hipótese que pode ser discutida é a de que os traços de memória em cada um desses elementos são diferentes e exigem estratégias diferentes para sua codificação, consolidação e evocação, a depender da fase ontogenética. Em idades mais iniciais, é possível que os animais não consigam visualizar e integrar os vários elementos postos em campo, enquanto em ratos adultos outros fatores podem surgir, como a neofobia e/ou a motivação para a exploração durante a execução da tarefa referência.

A isto, Araújo e colaboradores (2021) traz que diferentes estratégias são utilizadas pelos ratos em pista de múltiplas tarefas, e que, a memória temporal não depende de elementos e mapeamento do espaço para ser expressa, ao contrário da memória espacial, na qual o rato utiliza tanto de estratégias aloentrícas e egocêntricas para mapear o contexto em que está inserido e para se situar dentro do espaço, o que pode trazer elementos diferentes à formação dos traços de memória. Embora se já existam dados sobre a ontogenia dos correlatos neurais e comportamentais da memória espacial (Travaglia et al., 2018; Westbrook et al., 2014; Contreras et al., 2019; Tan et al., 2017; Ainge & Langson, 2012) há de se considerar a natureza integrativa da tarefa aplicada no presente trabalho. Em outras palavras: não é adequado pensar nos elementos constituintes do protocolo de forma separada e independente, pois é possível que presença de um elemento auxilie ou dificulte a expressão do outro.

Dentro desta reflexão, e considerando-se os resultados positivos para a memória temporal em diferentes idades, cabe hipotetizar quanto à saliência diferencial dos elementos da experiência. Neste contexto, Chao e colaboradores (2016) construíram uma tarefa para acessar de forma simultânea a memória para item e para local. Na sessão de amostra dessa tarefa, são apresentadas duas cópias idênticas de um objeto e na sessão de teste, é apresentada

uma cópia do objeto familiar em um novo local e um objeto novo em local conhecido. Os autores, então, aplicaram diferentes intervalos de retenção e verificaram que, em longos intervalos (i.e.: 24h), existe evocação da memória para o objeto, mas não para o local, indicando uma possível hierarquia entre os aspectos mnemônicos. Considerando-se os resultados da nossa pesquisa, é possível que as condições da tarefa (isto é: os objetos empregados e contexto experimental) tenham favorecido uma dimensão da memória em detrimento de outra.

Quanto ao engajamento dos ratos na tarefa de memória similar à episódica, no que se refere ao tempo de exploração total dos objetos na sessão de teste, o perfil evidenciado em nossos resultados indica que os animais não se diferenciam muito quanto à exploração, pois, como foi demonstrado, apenas P35 e P60 apresentaram maior tempo de exploração quando comparados a ratos mais jovens. Interessante perceber que isso pode estar evidenciando uma transição comportamental entre a infância e a adolescência, sendo a última uma fase caracterizada por alta exploração (Lin & Wilbrecht, 2022). Esta concepção também se aplica ao se comparar P24 e P35 na locomoção no campo durante a primeira sessão de habituação. De fato, embora a literatura considere que a adolescência inicia no desmame (ou seja: P21), elementos importantes que caracterizam a adolescência só estão presentes mais tarde (a exemplo das funções reprodutivas) (Premachandran, Wilkin, & Arruda-Carvalho, 2024; Hernández-Rodríguez et al., 2021).

Cruz-Sanchez e colaboradores (2020), em relação à memória de reconhecimento de objetos novos, com intervalo de retenção de uma hora, argumentam que esta começa a emergir a partir de P21. Nossos resultados não corroboram este achado, visto que apenas em P33, para o mesmo intervalo de retenção, os animais foram capazes de discriminar os objetos novos, não seguindo, nesta direção, o padrão demonstrado na revisão. A hipótese ou que se tem é que mesmo com as formas sendo diferentes, o padrão de similaridade que objetos 3d apresentam traz uma maior dificuldade no processo de codificação e discriminação dos objetos.

Um outro ponto a se destacar é que, na tarefa NOR, houve como limitação as diferentes condições para ratos em P25 e P33, visto que na idade mais jovem os animais estavam com pistas distais e proximais presentes, diferentemente da idade mais velha, o que pode ter vindo dificultar a expressão da discriminação dos objetos. Para além disto, cabe ressaltar que, foram os mesmos animais testados em idades diferentes, isto possivelmente traz à baila que, os animais em P33, já possuíam memória para os objetos da tarefa e, mesmo que esta tenha sido realizada 8 dias depois, possivelmente pode ter funcionado como variável de

menor estresse para a tarefa, além de ser uma dica contextual para evocação a nível mais longitudinal de expressão de memória para reconhecimento já formada.

Para identificar vieses de preferência nos objetos 3D, empregamos o teste de preferência nos machos com P25. Os resultados demonstraram que houve maior preferência na exploração do cone quando com os outros objetos. Este achado vai contra ao estudo original que validou, por meio de teste de preferência, a utilização de objetos 3D e do qual foram extraídos os objetos do presente estudo (Inayat et al., 2021). Embora, tenha sido evidenciado tal viés de preferência, ratifica-se que o objeto em questão não foi utilizado na execução dos protocolos de memória similar à episódica e de reconhecimento de objetos novos. Isto posto, pode ser elencada a não emergência da memória episódica em seus aspectos integrativos, principalmente em P90, devido a variáveis relacionadas à padronização dos objetos 3d, ao tempo de uma hora do intervalo de retenção, devido à complexidade do teste, assim como variabilidade individual e comportamento ansioso.

Considerando-se os dados existentes na literatura, há a necessidade de se investigar possíveis mudanças no uso do espaço ou nos níveis de atividade por animais na infância, adolescência e vida adulta, as quais podem se correlacionar à performance diferencial na tarefa.

Adotando-se esta perspectiva, em uma revisão realizada por Cruz-Sanchez e colaboradores (2021), foi sugerida a existência de níveis de ansiedade dependentes da idade, em decorrência de um dado que demonstra maior nível de self-grooming em ratos mais jovens (Heyser & Ferrer, 2012). As autoras apontam, então, que essa proposição nunca foi testada em um contexto de tarefas de reconhecimento de objetos. No presente trabalho, utilizamos as variáveis comportamentais: (1) locomoção geral no aparato, (2) padrão de uso da borda e centro do campo aberto na primeira exposição ao aparato e (3) latência para o primeiro episódio de exploração para avaliar diferenças ontogenéticas quanto à atividade, comportamento do tipo ansioso e neofobia, e encontramos que as idades apresentam o mesmo perfil comportamental.

Quando consideramos a avaliação da latência da primeira exploração, nossos dados não parecem sugerir fator de neofobia quando comparamos as idades. Da mesma maneira, o perfil geral dos animais quanto ao comportamento do tipo ansioso não se diferenciou entre as idades. Estes dados ressaltam que os animais na infância exploram, de fato, objetos e é possível utilizá-los em tarefas desta natureza, ao contrário do que havia sido sugerido no passado (Contreras et al., 2019; Shan et. al., 2021). Animais mais novos parecem permanecer com o mesmo perfil de permanência na zona mais periférica do campo em todas as

habituações, enquanto animais adultos, por mais que a permanência na zona da periferia seja sempre mais alta, a distância percorrida no centro possui uma tendência de aumento no decorrer das sessões de habituação, o que permite sugerir que os animais adultos fazem mais aproximações e se aventuram mais no centro do campo à medida que este ambiente se torna mais familiar.

O presente estudo possui ainda como limitação a não utilização de fêmeas na tarefa, tanto para discriminação de objetos quanto para a tarefa de memória similar à episódica, não possibilitando ver as diferenças sexuais que podem existir ao longo da ontogenia, que podem vir a afetar a performance e exploração para os roedores.

CAPÍTULO V

CONCLUSÃO

De forma geral, os animais possuem boa capacidade exploratória sendo crucial a atenção a possíveis eventos estressores que venham a interferir na qualidade de aplicação e execução da tarefa. Como pode ser visto, não foram identificadas variáveis relacionadas à neofobia dos ratos considerando-se as medidas utilizadas. Por fim, ressalta-se que, o objetivo de caracterização comportamental durante o desenvolvimento e na tarefa de memória similar à episódica foi alcançado, tendo como principal resultado, a emergência da memória temporal a partir de P35.

Apesar das limitações relacionadas aos itens e aparato utilizados para testar a memória similar à episódica em diferentes idades referentes ao, o presente estudo traz elucidações a respeito do desenvolvimento desta habilidade mnemônica. Compreende-se que o protocolo utilizado é sensível para avaliar a emergência da memória similar à episódica com toda sua complexidade integrativa, e destaca-se a importância de se reavaliar o intervalo de retenção empregado. Considera-se importante também utilizar este protocolo em estudos futuros verificando as diferenças sexuais ao longo da ontogênese.

REFERÊNCIAS

- Aggleton J. P. (2012). Multiple anatomical systems embedded within the primate medial temporal lobe: implications for hippocampal function. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 36(7), 1579–1596. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2011.09.005>
- Aggleton, J. P., & Brown, M. W. (2006). Interleaving brain systems for episodic and recognition memory. *Trends in cognitive sciences*, 10(10), 455-463.
- Aggleton, J. P., Nelson, A. J. D. (2020). Distributed interactive brain circuits for object-in-place memory: A place for time? *Brain and Neuroscience Advances*, 4, 1–11.
- Ainge J. A., Langston R. F. (2012) Ontogeny of neural circuits underlying spatial memory in the rat. *Front. Neural Circuits* 6, 8. doi: 10.3389/fncir.2012.00008
- Allen, T. A., & Fortin, N. J. (2013). The evolution of episodic memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110 Suppl 2(Suppl 2), 10379–10386. <https://doi.org/10.1073/pnas.1301199110>
- Araujo, A. P. 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, 108936. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2020.108936>
- Asiminas, A., Lyon, S. A., Langston, R. F., & Wood, E. R. (2022). Developmental trajectory of episodic-like memory in rats. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 16, 969871. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2022.969871>
- Bakker, A., Kirwan, C. B., Miller, M., & Stark, C. E. (2008). Pattern separation in the human hippocampal CA3 and dentate gyrus. *Science (New York, N.Y.)*, 319(5870), 1640–1642. <https://doi.org/10.1126/science.1152882>

- Barbosa F. F., 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. *Front. Behav. Neurosci.* 7, 112. doi: 10.3389/fnbeh.2013.00112
- Barbosa F. F., Silva R. H. (2018). Immediate-early gene expression in neural circuits related to object recognition memory. In: A Ennaceur and MA De Souza Silva (eds). *Handbook of Object Novelty Recognition*. London: Academic Press, 261–271.
- Barbosa, F. F., & Castelo-Branco, R. (2022). Assessing episodic memory in rodents using spontaneous object recognition tasks. *Emerging Topics in Life Sciences*, 6(5), 541-554.
- Bessièrès B., Jia M., Travaglia A., Alberini C. M. (2019). Developmental changes in plasticity, synaptic, glia and connectivity protein levels in rat basolateral amygdala. *Learn.Mem.* 26, 436–448.
- Bessièrès B., Jia M., Travaglia A., Alberini C. M. (2019). Developmental changes in plasticity, synaptic, glia and connectivity protein levels in rat basolateral amygdala. *Learn.Mem.* 26, 436–448.
- Bessièrès, B., Alessio Travaglia, Todd M. Mowery, et al. 2020. Early life experiences selectively mature learning and memory abilities. *Nat Comm*, 11:628.
- Bisaz, R., Travaglia, A., & Alberini, C. M. (2014). The neurobiological bases of memory formation: from physiological conditions to psychopathology. *Psychopathology*, 47(6), 347–356. <https://doi.org/10.1159/000363702>
- 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, 373–407.
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2020.04.007>
- Chao, O. Y., Huston, J. P., Nikolaus, S., & de Souza Silva, M. A. (2016). Concurrent assessment of memory for object and place: Evidence for different preferential importance of perirhinal cortex and hippocampus and for promnestic effect of a neurokinin-3 R agonist. *Neurobiology of learning and memory*, 130, 149–158.
<https://doi.org/10.1016/j.nlm.2016.02.007>
- 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.
- Contreras, M. P., Born, J., & Inostroza, M. (2019). The expression of allocentric object-place recognition memory during development. *Behavioural brain research*, 372, 112013.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112013>
- Cruz-Sanchez, A., Wilkin, J., & Arruda-Carvalho, M. (2021). Ontogeny of spontaneous recognition memory in rodents. *Neurobiology of learning and memory*, 177, 107361.
<https://doi.org/10.1016/j.nlm.2020.107361>
- Dix S. L., Aggleton J. P. (1999). Extending the spontaneous preference test of recognition: evidence of object-location and object-context recognition. *Behav Brain Res* 99, 191–200.
- Donato, F., Alberini, C. M., Amso, D., Dragoi, G., Dranovsky, A., & Newcombe, N. S. (2021). The Ontogeny of Hippocampus-Dependent Memories. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 41(5), 920–926.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1651-20.2020>

- Drieskens, D. C., Neves, L. R., Pugliane, K. C., de Souza, I. B. M. B., da Costa Lima, Á., Salvadori, M. G. D. S. S., ... & Barbosa, F. F. (2017). CA1 inactivation impairs episodic-like memory in rats. *Neurobiology of learning and memory*, 145, 28-33.
- Eacott, M. J., & Norman, G. (2004). Integrated memory for object, place, and context in rats: a possible model of episodic-like memory?. *Journal of Neuroscience*, 24(8), 1948-1953.
- Eichenbaum, H. (2014). Time cells in the hippocampus: a new dimension for mapping memories. *Nature Reviews Neuroscience*, 15(11), 732-744.
- Eichenbaum, H. (2017). On the integration of space, time, and memory. *Neuron*, 95(5), 1007-1018.
- Eichenbaum, H., Sauvage, M., Fortin, N., Komorowski, R., Lipton, P., (2012). Towards a functional organization of episodic memory in the medial temporal lobe. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 36 (7), 1597–1608.
- Eichenbaum, H., Yonelinas, A. P., & Ranganath, C. (2007). The Medial Temporal Lobe and Recognition Memory. *Annual Review of Neuroscience*, 30(1), 123–152. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.30.051606.094328>
- Ennaceur A. (2010). One-trial object recognition in rats and mice: methodological and theoretical issues. *Behavioural brain research*, 215(2), 244–254. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.12.036>
- Ennaceur, A., Neave, N., & Aggleton, J. P. (1997). Spontaneous object recognition and object location memory in rats: the effects of lesions in the cingulate cortices, the medial prefrontal cortex, the cingulum bundle and the fornix. *Exp Brain Res*, 113(3), 509-519.

- Ennaceur A, Delacour J. (1988) A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. I. Behavioral data. *Behav Brain Res.* 31:47–59.
- Griffiths, D., Dickinson, A., & Clayton, N. (1999). Episodic memory: what can animals remember about their past?. *Trends in cognitive sciences*, 3(2), 74–80. [https://doi.org/10.1016/s1364-6613\(98\)01272-8](https://doi.org/10.1016/s1364-6613(98)01272-8)
- Guskjolen, A., & Cembrowski, M. S. (2023). Engram neurons: Encoding, consolidation, retrieval, and forgetting of memory. *Molecular Psychiatry*, 1-13.
- Hernández-Rodríguez, J., López, A. L., Montes, S., Bonilla-Jaime, H., Morales, I., Limón-Morales, O., Ríos, C., Hernández-González, M., Viguera-Villaseñor, R. M., & Arteaga-Silva, M. (2021). Delay in puberty indices of Wistar rats caused by Cadmium. Focus on the redox system in reproductive organs. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 99, 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2020.11.010>
- Inayat, M., Cruz-Sanchez, A., Thorpe, H. H., Frie, J. A., Richards, B. A., Khokhar, J. Y., & Arruda-Carvalho, M. (2021). Promoting and optimizing the use of 3D-printed objects in spontaneous recognition memory tasks in rodents: a method for improving rigor and reproducibility. *Eneuro*, 8(5). doi: 10.1523/ENEURO.0319-21.2021.
- Izquierdo, I. (2018). Memória. Porto Alegre, Brasil: Artmed.
- Jablonski, S. A., Schreiber, W. B., Westbrook, S. R., Brennan, L. E., and Stanton, M. E. (2013). Determinants of novel object and location recognition during development. *Behav. Brain Res.* 256, 140–150.
- Kart-Teke, E., De Souza Silva, M.A., Huston, J.P., Dere, E., (2006). Wistar rats show episodic-like memory for unique experiences. *Neurobiol. Learn. Mem.* 85 (2), 173–182.

- Kesner, R. P., Hunsaker, M. R., & Ziegler, W. (2010). The role of the dorsal CA1 and ventral CA1 in memory for the temporal order of a sequence of odors. *Neurobiology of Learning and Memory*, 93(1), 111–116.
- Knierim, J. J., Neunuebel, J. P., & Deshmukh, S. S. (2013). Correlatos funcionais do córtex entorrinal lateral e medial: objetos, integração de caminhos e referenciais locais globais. *Transações Filosóficas da Sociedade Real B: Ciências Biológicas*, 369(1635), 20130369–20130369. doi: 10.1098 / rstb.2013.0369.
- Koolhaas JM, Baumans V, Blom HJM, von Holst D, Timmermans PJA, Wiepkema PR. Behaviour, stress and well-being. In: Van Zutphen LFM, Baumans V, Beynen AC, eds. *Principles of Laboratory Animal Science: A Contribution to the Humane Use and Care of Animals and to the Quality of Experimental Results*. 2nd edn. Amsterdam: Elsevier Science BV, 2001: 77– 102
- Krüger, H. S., & Hanganu-Opatz, I. L. (2013). Neonatal cholinergic lesion alters the acoustic structure of infant rat vocalization but not the early cognitive development. *Developmental psychobiology*, 55(3), 294–308. <https://doi.org/10.1002/dev.21029>
- Krüger, H. S., Brockmann, M. D., Salamon, J., Ittrich, H., & Hanganu-Opatz, I. L. (2012). Neonatal hippocampal lesion alters the functional maturation of the prefrontal cortex and the early cognitive development in pre-juvenile rats. *Neurobiology of learning and memory*, 97(4), 470–481. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2012.04.001>
- Laing, P. A., & Dunsmoor, J. E. (2023). Pattern separation of fear extinction memory. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, NY)*, 30(5-6), 110-115.
- Lanahan, A. & Worley, P. (1998) Immediate-early genes and synaptic function. *Neurobiol. Learn. Mem.* 70, 37–43.

- Lin, W. C., & Wilbrecht, L. (2022). Making sense of strengths and weaknesses observed in adolescent laboratory rodents. *Current opinion in psychology*, 45, 101297. <https://doi.org/10.1016/j.copsyc.2021.12.009>
- Manns, J.R., Eichenbaum, H., 2009. A cognitive map for object memory in the hippocampus. *Learn. Mem.* 16 (10), 616–624.
- Mathis, A., Mamidanna, P., Cury, K. M., Abe, T., Murthy, V. N., Mathis, M. W., & Bethge, M. (2018). DeepLabCut: markerless pose estimation of user-defined body parts with deep learning. *Nature Neuroscience*, 21(9), 1281–1289
- McGaugh, J. L. (2000). Memory--a century of consolidation. *Science*, 287(5451), 248-251.
- Mitchell-Heggs, R., & Tse, D. (2024). Reflecting on 50 years of long-term potentiation: Insights from the Royal Society's LTP50 conference. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 379(1906), 20241288004. <https://doi.org/10.1177/23982128241288004>
- Mitchell, J. B., & Laiacina, J. (1998). The medial frontal cortex and temporal memory: tests using spontaneous exploratory behaviour in the rat. *Behav Brain Res*, 97(1), 107-113.
- 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>.
- Ngo, C. T., Michelmann, S., Olson, I. R., & Newcombe, N. S. (2021). Pattern separation and pattern completion: Behaviorally separable processes?. *Memory & cognition*, 49(1), 193–205. <https://doi.org/10.3758/s13421-020-01072-y>

- 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
- Okuno H, Minatohara K, Bito H. 2018. Inverse synaptic tagging: an inactive synapse-specific mechanism to capture activity-induced Arc/arg3.1 and to locally regulate spatial distribution of synaptic weights. *Semin Cell Dev Biol* 77: 43–50.
- Paxinos, G., and Watson, C. (2013). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 6th Edn. Oxford: Elsevier.
- Premachandran, H., Wilkin, J., & Arruda-Carvalho, M. (2024). Minimizing Variability in Developmental Fear Studies in Mice: Toward Improved Replicability in the Field. *Current protocols*, 4(5), e1040. <https://doi.org/10.1002/cpz1.1040>
- Ramsaran AI, Sanders HR, & Stanton ME (2016). Determinants of object-in-context and object-place-context recognition in the developing rat. *Developmental Psychobiology*, 58(7), 883–895.
- Ramsaran AI, Schlichting ML, & Frankland PW. (2018). The ontogeny of memory persistence and specificity. *Developmental Cognitive Neuroscience*, 36, 100591.
- Ramsaran, A. I., Wang, Y., Golbabaie, A., Aleshin, S., de Snoo, M. L., Yeung, B. A., Rashid, A. J., Awasthi, A., Lau, J., Tran, L. M., Ko, S. Y., Abegg, A., Duan, L. C., McKenzie, C., Gallucci, J., Ahmed, M., Kaushik, R., Dityatev, A., Josselyn, S. A., & Frankland, P. W. (2023). A shift in the mechanisms controlling hippocampal engram formation during brain maturation. *Science (New York, N.Y.)*, 380(6644), 543–551. <https://doi.org/10.1126/science.ade6530>
- Reger M.L. Hovda D.A. Giza C.C. (2009) Ontogeny of Rat Recognition Memory measured by the novel object recognition task. *Dev. Psychobiol.*;51, 672–678.

- Schultz, C., & Engelhardt, M. (2014). Anatomy of the Hippocampal Formation. In *The Hippocampus in Clinical Neuroscience*, 34, 6–17).
- Skinner, E. I., & Fernandes, M. A. (2007). Neural correlates of recollection and familiarity: A review of neuroimaging and patient data. *Neuropsychologia*, 45(10), 2163-2179.
- Squire, L. R., & Zola-Morgan, J. (1991). The Cognitive Neuroscience of Human Memory Since H.M.
- Squire, L. R., & Zola, S. M. (1996). Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(24), 13515–13522.
- Squire, L. R., Stark, C. E. L., & Clark, R. E. (2004). The Medial Temporal Lobe*. *Annual Review of Neuroscience*, 27(1), 279–306.
- Steward O. (1976). Topographic organization of the projections from the entorhinal area to the hippocampal formation of the rat. *The Journal of comparative neurology*, 167(3), 285–314. <https://doi.org/10.1002/cne.901670303>
- Sugar, J., Moser, M.-B., 2019. Episodic memory: neuronal codes for what, where, and when. *Hippocampus* 29 (12), 1190–1205.
- Tan H. M., Wills T. J., Cacucci F. (2017) The development of spatial and memory circuits in the rat. *WIREs Cogn Sci*, 8, e1424. doi: 10.1002/wcs.1424
- Tulving, E. (2002). Episodic memory: from mind to brain. *Annu. Rev. Psychol.* 53, 1–25.

- Westbrook S. R., Brennan L. E., Stanton M. E. (2014) Ontogeny of object versus location recognition in the rat: Acquisition and retention effects. *Dev. Psychobiol* 56, 1492–1506.
- Whishaw IQ (1999) *The Behavior of the Laboratory Rat: A Handbook with Tests*, eds Whishaw IQ, Kolb B (Oxford University Press, Oxford), pp 478–486
- Yonelinas, A. P., & Parks, C. M. (2007). Receiver operating characteristics (ROCs) in recognition memory: a review. *Psychological bulletin*, 133(5), 800.
- Yonelinas, A., Hawkins, C., Abovian, A., & Aly, M. (2024). The Role of Recollection, Familiarity, and the Hippocampus in Episodic and Working Memory. *Neuropsychologia*, 193(108777).

ANEXOS



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Psicobiologia da memória episódica ao longo do desenvolvimento em ratos", protocolada sob o CEUA nº 9599290422 (ID 002071), sob a responsabilidade de **Flávio Freitas Barbosa e equipe; Rochele Vasconcelos Castelo Branco Mourão** - 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 16/12/2023.

We certify that the proposal "Psychobiology of episodic memory throughout development in rats", utilizing 110 Heterogenics rats (males and females), protocol number CEUA 9599290422 (ID 002071), under the responsibility of **Flávio Freitas Barbosa and team; Rochele Vasconcelos Castelo Branco Mourão** - 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 12/16/2023.

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

Vigência da Proposta: de **11/2023** a **11/2026** Área: **Psicologia**

Origem: **Centro de Bioterismo da Universidade Estadual da Paraíba**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **2 a 3 meses**

Quantidade: **110**

Linhagem: **Rattus Norvegicus - Wistar**

Peso: **250 a 400 kg**

João Pessoa, 02 de fevereiro de 2024

Prof. Dr. Luiz Henrique César Vasconcelos
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

Profa. Dra. Gláucia Veríssimo Faheina Martins
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba





ATA DE DEFESA (DISSERTAÇÃO)

Aos trinta dias do mês de abril de dois mil e vinte e cinco, às 14 horas, na sala 505 do Centro de Ciências Humanas, Letras e Artes, reuniram-se em solenidade pública os membros da comissão designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Neurociência Cognitiva e Comportamento para a defesa de dissertação de mestrado do discente **JOAO PEDRO DOS SANTOS CIPRIANO**, matrícula 20231012926. Foram componentes da banca examinadora os Professores Doutores: Flávio Freitas Barbosa (Presidente/orientador), Danilo Andrade de Meneses (Membro Interno) e Adriana Maria Fernandes de Oliveira Golzio (Membro Externo ao Programa). Dando início aos trabalhos, o presidente da banca, Prof. Dr. Flávio Freitas Barbosa, após declarar o objetivo da reunião, apresentou o examinando Joao Pedro dos Santos Cipriano e, em seguida, concedeu-lhe a palavra para que defendesse sua pesquisa, intitulada **“Caracterização comportamental da memória similar à episódica em roedores ao longo da ontogênese”**. Passando então ao aludido tema, o examinando foi a seguir arguido pelos examinadores na forma regimentar. Ato contínuo passou a comissão, em secreto, a proceder à avaliação e julgamento do trabalho, concluindo por atribuir-lhe o conceito **“Aprovado”**, o qual foi proclamado pela presidência logo que esta foi franqueada ao recinto da solenidade pública. A versão final da dissertação deverá ser depositada em até 90 dias, contendo as modificações sugeridas pela banca examinadora. O discente não terá o título se não cumprir as exigências acima. Nada mais havendo a tratar, eu, **FLÁVIO FREITAS BARBOSA**, presidente da comissão examinadora, lavrei a presente ata, que depois de lida e aprovada por todos, assino juntamente aos demais membros da banca. João Pessoa, 30 de abril de 2025.

Documento assinado digitalmente
gov.br JOAO PEDRO DOS SANTOS CIPRIANO
Data: 02/05/2025 13:11:29-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Joao Pedro dos Santos Cipriano (Mestrando/PPGNeC)

Documento assinado digitalmente
gov.br FLAVIO FREITAS BARBOSA
Data: 30/04/2025 16:57:18-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. Flávio Freitas Barbosa (Presidente/Orientador)

Documento assinado digitalmente
gov.br DANILO ANDRADE DE MENESES
Data: 30/04/2025 19:12:29-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. Danilo Andrade de Meneses (Membro Interno)

Documento assinado digitalmente
gov.br ADRIANA MARIA FERNANDES DE OLIVEIRA GOLZIO
Data: 02/05/2025 08:41:49-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Adriana Maria Fernandes de Oliveira Golzio