



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

A área hipocampal CA1 é essencial para a memória similar à episódica

Davi Drieskens Carvalho de Castro Sá Barreto

João Pessoa
Março de 2016

Davi Drieskens Carvalho de Castro Sá Barreto

A área hipocampal CA1 é essencial para a memória similar à episódica

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

João Pessoa
Março de 2016

B273a Barreto, Davi Drieskens Carvalho de Castro Sá.
A área hipocampal CA1 é essencial para a memória similar
à episódica / Davi Drieskens Carvalho de Castro Sá Barreto.-
João Pessoa, 2016.
66f. : il.
Orientador: Flávio Freitas Barbosa
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCHL
1. Psicologia. 2. Neurociência cognitiva e comportamento.
3. Psicobiologia. 4. Memória similar à episódica. 5. Hipocampo.
6. CA1. Muscimol.

UFPB/BC

CDU: 159.9(043)

Título: A ÁREA HIPOCAMPAL CA1 É ESSENCIAL PARA A MEMÓRIA SIMILAR À EPISÓDICA.

Autor: Davi Drieskens Carvalho de Castro Sá Barreto

Data da defesa: 31 de março de 2016.

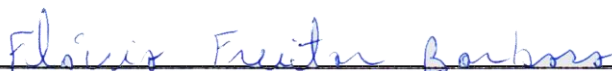
Banca Examinadora:



Prof.^a Dr.^a. Bernardino Fernández Calvo
Universidade Federal da Paraíba



Prof.^o Dr.^o. Hindiael Aeraf Belchior
Universidade Federal do Rio Grande do Norte



Prof.^o Dr.^o. Flávio Freitas Barbosa
Universidade Federal da Paraíba

JOÃO PESSOA-PB
2016

“For long you live and high you fly
And smiles you'll give and tears you'll cry
All you touch and all you see
Is all your **memories** will ever be”

- Adaptado de Waters, Gilmour & Wright (1973)

Este trabalho não seria possível sem a presença de pessoas muito importantes para o sucesso do meu mestrado e, talvez, para o sucesso do início da minha carreira científica. Dentre estas pessoas, duas foram essenciais. Dedico este trabalho ao professor Flávio Freitas Barbosa e a Lívia Rodrigues Neves, sem os quais eu não teria começado o meu percurso pelo mundo da memória, nem concluído este trabalho.

Agradecimentos

Há três anos eu tomei a decisão mais importante da minha vida. Foi após estudar para escrever um projeto de mestrado na área de comunicação e mídias digitais que eu me dei conta que eu não poderia estudar Pierre Lévy e Marshall McLuhan a não ser por hobby, então decidi estudar neurociência. Para me dar conta disto, os dois anos (de 2010 a 2012) no grupo de pesquisas bibliográficas sobre neuromarketing no Instituto de Educação Superior da Paraíba (IESP) foram fundamentais e, a primeira pessoa a quem agradeço é ao eterno professor **Augusto Vaz**. Seus ensinamentos me fizeram questionar as minhas bases e contribuíram imensamente para que eu me tornasse um curioso. É isto que sou: um curioso. Muito obrigado!

A minha trajetória de vida não seria possível sem o apoio da minha família. Aqui agradeço a todos, em especial aos meus irmãos **Geraldo** e **Mateus** e aos meus pais **Francisco** e **Patrícia**. Mãe, eu só não dediquei este trabalho a você porque à tua pessoa eu dedico minha vida. Tudo o que eu fizer e conseguir nesta vida será dedicado a ti de forma intrínseca. Eu te amo!

Agradeço com um carinho imenso à **Damara**. Você é minha melhor amiga, eu te amo! E deixei um parágrafo só para você. Obrigado pelas conversas, cervejas e devaneios. Obrigado por me tornar um ser humano melhor.

Obrigado a **André**, **Caio** e **Henrique** pela longa amizade. Desculpem a ausência neste último ano.

Foi na manhã do dia 19 de abril de 2013 (uma sexta feira) que um professor pioneiro (ou louco) encontrou um aluno louco (ou pioneiro), vindo da comunicação, que queria estudar neurociências. Não sei o que deu na tua cabeça para que você apostasse fichas em mim, talvez, como você mesmo fala, tenha sido aquela pitada de loucura que poderia existir nesta parceria, afinal, é pré-requisito para a entrada no laboratório, não é? Professor **Flávio**, eu te agradeço profundamente por ter depositado uma confiança inicial em mim, que foi crescendo a cada compromisso que passou.

Entrar para o embrião do Laboratório de Estudos da Memória e Cognição (LEMCOG – UFPB) foi uma das experiências mais fantásticas que vivi. Neste laboratório aprendi tudo o que um mestrando precisa aprender. Aos integrantes do laboratório deixo meu profundo agradecimento, em especial às professoras **Fabíola** e **Mirian**. Agradeço a **Crhistine**, **Izabela**, **Paulo**, **Jalles** e demais integrantes do laboratório pela convivência do dia a dia. Em especial a **Joenilton**, sem o qual a minha trajetória do mestrado não seria tão divertida, e a **Karen**, que esteve sempre disposta a ajudar quando necessário. Você vai longe menina! **Lívia**, você esteve comigo desde o primeiro experimento, sem exceção, em todas as etapas, do planejamento à análise estatística. Você terá um futuro brilhante. Para mim, foi uma honra poder trabalhar contigo, principalmente nos últimos dias de dezembro de 2015 e início de janeiro de 2016, sem feriados nem fins de semana, quando o coração desde trabalho foi desenvolvido. Sem você eu não teria terminado o mestrado. Não poderia deixar de agradecer a **Guigs (Ingrid)**, o seu apoio foi fundamental para completar a histologia. Obrigado pelos

ensinamentos e papos diversos e, pela estadia que me concedeu junto a **Priscila**, durante a histologia, muito obrigado.

Cursar o mestrado não teria sido a mesma coisa sem a companhia dos colegas de sala, dentre eles **Ismael**, um amigo especial. Muito obrigado pela parceria sem muitos encontros, mas com muita sintonia, pelos papos científicos e não científicos e, é claro, pelas bagunças em sala de aula.

Agradeço profundamente ao **Laboratório de Estudos Neuroquímicos (LENQ – UFRN)**, onde realizei a última etapa do mestrado e, a todos os integrantes do **Laboratório de Estudos da Memória (LEME – UFRN)**, logo mais estarei aí para marcarmos as idas ao Thomas.

Com um profundo apreço, agradeço aos membros da banca, **Bernardino** e **Hindiael**, pela atenção concedida a este quase mestre. Berna, ainda beberemos muitas cervejas juntos! Hindi, muito obrigado pela ajuda no começo do mestrado, enquanto o objetivo ainda estava sob o sonho de se realizar a eletro e, obrigado pelos conselhos e pela parceria com o doutorado, muito obrigado mesmo!

Por fim, agradeço à Universidade Federal da Paraíba, ao Programa de Pós-graduação em Neurociência Cognitiva e Comportamento e ao CNPQ.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 Memória	13
1.1.1 Etapas da Formação da Memória	14
1.1.2 Sistemas de Memória	15
1.2 Memória Episódica em Humanos e Outros Animais	16
1.2.1 Tarefa de Memória Similar à Episódica Para Roedores	18
1.3 Substratos Neurais da Memória Episódica	21
2. JUSTIFICATIVA	26
3. OBJETIVOS	27
3.1 Objetivo Geral	27
3.2 Objetivos Específicos	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1 Animais	28
4.2 Cirurgia	28
4.3 Aparato Experimental e Objetos	29
4.4 Procedimentos Experimentais	30
4.5 Análise Comportamental e Estatística	32
5. RESULTADOS	34
5.1 Parâmetros Histológicos	34
5.2 Parâmetros Comportamentais	34
5.2.1 Taxas de Exploração	35
5.2.2 Índices de discriminação	36
5.2.3 Tempo total de exploração	37
6. DISCUSSÃO	38
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	43
8. REFERÊNCIAS	44
Anexo A	54
Anexo B	55

Índice de figuras

FIGURA 1. GRÁFICO DA QUANTIDADE DE ARTIGOS PUBLICADOS COM O TERMO “MEMORY” NO TÍTULO E/OU RESUMO NOS ÚLTIMOS dez ANOS.....	9
FIGURA 2. ESQUEMA ILUSTRATIVO SIMPLIFICADO DA RELAÇÃO FUNCIONAL ENTRE DIFERENTES ÁREAS CEREBRAIS E OS TIPOS DE MEMÓRIA RELACIONADAS AO CONTEÚDO. EXTRAÍDO DE SOUZA (2015).	11
FIGURA 3. ESQUEMAS ILUSTRATIVOS DE TAREFAS DE RECONHECIMENTO NÃO-ASSOCIATIVAS ADAPTADOS DE INOSTROZA ET AL. (2013). A, TAREFA DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS (CARÁTER “O QUÊ”), B, TAREFA DE RECONHECIMENTO DE LUGAR (CARÁTER “ONDE”), C, TAREFA DE RECONHECIMENTO TEMPORAL (CARÁTER “QUANDO”). AS SETAS INDICAM A TENDÊNCIA DE EXPLORAÇÃO DOS ANIMAIS.	14
FIGURA 4. ESQUEMA ILUSTRATIVO DA TAREFA DE MEMÓRIA SIMILAR À EPISÓDICA ADAPTADO DE KART-TEKE ET AL. (2006).....	15
FIGURA 5. ESQUEMA ILUSTRATIVO DAS AFERÊNCIAS E EFERÊNCIAS ENTRE O SISTEMA HIPOCAMPAL E ÁREAS ADJACENTES ADAPTADO DE KEALY E COMMINS (2011). AS SETAS INDICAM A ORIGEM E DESTINO DAS PROJEÇÕES DE FEIXES AXÔNICOS E AS CORES AZUL E VERMELHO, REPRESENTAM FUNÇÕES ESSENCIAIS PARA MEMÓRIA DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS (AZUL) E MEMÓRIA DE RECONHECIMENTO ESPACIAL (VERMELHO).....	17
FIGURA 6. ESQUEMA ILUSTRATIVO DA FUNÇÃO HIERÁRQUICA DO HIPOCAMPO E DE ÁREAS ADJACENTES ADAPTADO DE EICHENBAUM ET AL., 2012. A PARTE ESQUERDA DA FIGURA ILUSTRA UMA VIA DE PROCESSAMENTO DE INFORMAÇÕES “O QUÊ” QUE VIRIA DE ÁREAS NEOCORTICAIS E PASSARIA PELOS CÓRTICES PERIRRINAL E LATERAL ENTORRINAL (CPER E CEL), ENQUANTO A PARTE DA DIREITA ILUSTRA UMA VIA DE PROCESSAMENTO DE INFORMAÇÕES “ONDE”, QUE VIRIA DE ÁREAS NEOCORTICAIS E PASSARIA PELOS CÓRTICES PÓSRRINAL E MEDIAL ENTORRINAL (CPOR E CEM). AMBAS DESEMBOLARIAM NO HIPOCAMPO, ONDE SERIA FEITA A JUNÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS NÃO ASSOCIATIVAS.....	18
FIGURA 7. ESQUEMA ILUSTRATIVO DO CAMPO ABERTO COM PISTAS PROXIMAIS E DAS PISTAS DISTAIS. (A) ARENA CIRCULAR UTILIZADA PARA A TAREFA DE MEMÓRIA SIMILAR À EPISÓDICA COM A DISPOSIÇÃO DAS PISTAS PROXIMAIS. (B) UMA DAS PISTAS DISTAIS DISPOSTAS NAS PAREDES DA SALA DE EXPERIMENTOS.	25
FIGURA 8. FOTOS DOS OBJETOS UTILIZADOS NOS EXPERIMENTOS.....	25
FIGURA 9. ESQUEMA ILUSTRATIVO DA TAREFA COMPORTAMENTAL DE MEMÓRIA SIMILAR À EPISÓDICA.....	27
FIGURA 10. ILUSTRAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS E DIAS DO PROTOCOLO EXPERIMENTAL DA TAREFA DE MEMÓRIA À EPISÓDICA UTILIZADA NO EXPERIMENTO 3.....	27
FIGURA 11. ILUSTRAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS E DIAS DO PROTOCOLO EXPERIMENTAL DA TAREFA DE MEMÓRIA À EPISÓDICA UTILIZADA NO EXPERIMENTO 3.....	29
FIGURA 12. ESQUEMAS ILUSTRATIVOS BASEADOS NO ATLAS DO CÉREBRO DO RATO (PAXINOS E WATSON, 2009) E FOTO DA HISTOLOGIA. (A) ESQUEMAS DA POSIÇÃO DAS CÂNULAS INDO DE -3,24MM ATÉ -3,60MM A PARTIR DE BREGMA. (B) REPRESENTAÇÃO FOTOGRÁFICA DO AZUL DE METILENO E DAS PONTAS DAS AGULHAS. CORTE CORADO COM CRESIL VIOLETA ATRAVÉS DA REAÇÃO	

DE NISSL. SOMENTE DADOS DOS ANIMAIS COM A POSIÇÃO CORRETA DA AGULHA FORAM UTILIZADOS PARA A ANÁLISE ESTATÍSTICA.....30

FIGURA 13. TAXA DE EXPLORAÇÃO DOS OBJETOS NA SESSÃO DE TESTE PARA OS GRUPOS SALINA E MUSCIMOL. OS GRÁFICOS REPRESENTAM A MÉDIA E O ERRO PADRÃO. * COMPARAÇÕES SIGNIFICATIVAS ENTRE OS PARES A1>B1. † COMPARAÇÕES SIGNIFICATIVAS ENTRE OS PARES B2>B1. # COMPARAÇÕES SIGNIFICATIVAS ENTRE OS PARES A1>B1.....32

FIGURA 14. ÍNDICE DE DISCRIMINAÇÃO DOS OBJETOS NA SESSÃO DE TESTE PARA OS GRUPOS SALINA E MUSCIMOL. OS GRÁFICOS REPRESENTAM A MÉDIA E O ERRO PADRÃO. * COMPARAÇÕES SIGNIFICATIVAS PARA OS ASPECTOS TEMPORAL, ESPACIAL E DE INTEGRAÇÃO, CONSIDERANDO-SE $P < 0,05$33

FIGURA 15. TEMPO TOTAL DE EXPLORAÇÃO PARA AS SESSÕES DE AMOSTRA 1, AMOSTRA 2 E TESTE COMPARADO ENTRE OS DOIS GRUPOS. OS GRÁFICOS REPRESENTAM A MÉDIA E O ERRO PADRÃO.....33

Índice de tabelas

TABELA 1. VALORES DE REFERÊNCIA PARA TAMANHOS DE EFEITO (T.E) EM RELAÇÃO A DIFERENTES TESTES ESTATÍSTICOS.....	29
---	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A1 – OBJETO ANTIGO NÃO DESLOCADO
A2 – OBJETO ANTIGO DESLOCADO
ANOVA – ANÁLISE DE VARIÂNCIA, DO INGLÊS “ANALYSIS OF VARIANCE”
B1 – OBJETO RECENTE NÃO DESLOCADO
B2 – OBJETO RECENTE DESLOCADO
CA1 – REGIÃO 1 DO CORNO DE AMON
CA2 – REGIÃO 2 DO CORNO DE AMON
CA3 – REGIÃO 3 DO CORNO DE AMON
CE – CÓRTEX ENTORRINAL
CEL – CÓRTEX ENTORRINAL LATERAL
CEM – CÓRTEX ENTORRINAL MEDIAL
CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
C-FOS – PROTO-ONCOGENE DA FAMÍLIA FOS
CPER – CÓRTEX PERIRRINAL
CPFM – CÓRTEX PRÉ-FRONTAL MEDIAL
CPOR – CÓRTEX PÓSRRINAL
GD – GIRO DENTEADO
H.M – HENRY MOLAISON
LTM – LOBO TEMPORAL MEDIAL
UFPB – UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
ZIF-268 – DO INGLÊS, “ZINC FINGER PROTEIN 225”

Resumo

A memória episódica é uma memória declarativa rica em contexto espacial e temporal. Este tipo de memória tem sido atribuído apenas a humanos, mas alguns animais têm demonstrado uma memória similar à episódica, baseada em critérios que podem ser mostrados através do comportamento e, tida como a memória para eventos (“o quê”) que ocorreram em um devido local (“onde”) e num determinado espaço de tempo (“quando”). Para ser considerada uma memória similar à episódica, estes aspectos comportamentais devem ser evocados de forma integrada e associativa, não havendo a possibilidade de se recordar cada aspecto separado. Há algum tempo tem sido demonstrado que o lobo temporal medial (LTM) é importante para processos que envolvem características da memória similar à episódica e, o hipocampo e áreas como os córtices perirrinal, pósrrinal, entorrinal e pré-frontal medial parecem estar envolvidas em um ou mais dos aspectos comportamentais deste tipo de memória. Neste trabalho nós procuramos avaliar o papel da área hipocampal CA1 em uma tarefa de memória similar à episódica integrativa dos três aspectos comportamentais através da inativação bilateral com o agonista GABA_A muscimol. Para tal, utilizamos 24 ratos wistar machos de 3 a 4 meses de idade, pesando entre 270-360g e mantidos em condições controladas. Esta tarefa é realizada em uma arena circular e é baseada no paradigma da novidade, que aponta que em estado saudável, ratos sempre vão preferir explorar algo novo. Foram realizadas três sessões na tarefa: a sessão de amostra 1, amostra 2 e teste. Cada sessão teve duração de cinco minutos e o intervalo entre sessões foi de uma hora. Na sessão de amostra 1 foi permitido que o animal explorasse quatro objetos novos (A) em disposições específicas. Na sessão de amostra 2 quatro novos objetos (B) foram expostos, sendo dois alocados em posições ocupadas pelos objetos “A” e dois em novas posições. Na sessão de teste os animais entraram em contato dois objetos da primeira sessão e, dois objetos da segunda sessão, onde um objeto de cada sessão era estacionário em relação à sua posição inicial (A1 e B1) e outro objeto era deslocado (A2 e B2). O padrão de exploração esperado para esta tarefa é de A1>B1 (padrão temporal), B2>B1 (padrão espacial) e A1>A2 (padrão integrativo). Os animais do grupo controle conseguiram evocar o episódio na sessão de teste da tarefa, enquanto que os animais do grupo experimental não conseguiram e, isto não foi influenciado por uma falta de motivação em explorar por parte do grupo experimental. Um exame histológico verificou a posição correta das cânulas e agulhas de infusão para a área CA1. Concluímos que CA1 é importante para a resolução da tarefa, mas não fica claro se o é por influenciar no reconhecimento de objetos, ou porque influenciou diretamente no processamento dos aspectos espacial e temporal.

Palavras chave: Memória similar à episódica; Hipocampo; CA1; Muscimol; Exploração de objetos

Abstract

Episodic memory is a declarative type of memory rich in temporal and spatial contexts. This type of memory has been attributed only to humans, but animals have been demonstrating an episodic-like memory, based on behavioural criteria and, considered as a memory for a particular event (“what”) that happened in a particular place (“where”) and in a particular time (“when”). To be considered as an episodic-like memory, these behavioural aspects must be evoked in an integrative and associative way, excluding any possibility of being evoked separately. For a long time it has been demonstrated that the medial temporal lobe (MTL) is important for processes involving episodic-like memory characteristics and, the hippocampus and other areas, such as the perirhinal, postrhinal, entorhinal and medial prefrontal cortices seem to be involved in one or more of episodic-like memory behavioural aspects. In this work we sought to investigate the role of the hippocampal subfield CA1 with bilateral infusions of the GABA_A agonist muscimol, in an integrative episodic-like memory task. 24 naïve male wistar rats, ranging from 3 to 4 months, weighing 270-360g and kept in controlled conditions, were used as subjects. This task is done in an open-field and it depends on the tendency of rats to explore novelty. There were three trials: sample 1, sample 2 and test. Each one had a duration of five minutes and the intertrial interval was of 1 hour. In sample 1, rats were allowed to explore four novel objects (A) in specific locations. In sample 2, four new objects (B) were disposed in the open-field, where two of them were placed in locations previously occupied by objects “A”, and two of them were placed in new positions. In the test trial, animals were exposed to four copies of previously seen objects, where two of them were stationary to its initial position (A1 and B1) and another two were displaced (A2 and B2). The pattern of exploration expected to this task is of A1>B1 (temporal pattern), B2>B1 (spatial pattern) and A1>A2 (integrative pattern). Animals of the control group did evoked an episodic-like memory in the test trial, while the animals in the experimental group didn't. This was not influenced by a lack of exploration in the muscimol group. Histology showed that the cannulae and niddle tips were placed in the right positions. Altogether, our data provides evidence that CA1 plays an essential role in the recollection of the episodic-like memory components, although it's not clear if it does by having a role in the recognition of objects alone, or on the association of temporal and spatial aspects of episodic-like memory.

Keywords: Episodic-like memory; Hippocampus; CA1; Muscimol; Objects exploration

1. INTRODUÇÃO

1.1 Memória

Dentre as funções que o sistema nervoso toma parte como agente, sem dúvida a memória é uma das mais complexas, intrigantes e fascinantes de se estudar. Por estas qualidades, a memória é um dos objetos de estudo mais pesquisados, que pode ser abordado de diversas maneiras, caracterizando-se como mais uma área interdisciplinar da neurociência. Uma breve pesquisa do termo “*memory*” presente nos títulos e resumos de trabalhos indexados na base de dados PUBMED para os últimos 10 anos retorna 104117 resultados (pesquisa realizada em 29/01/2016). O gráfico presente na figura abaixo mostra o quanto a produção de artigos envolvendo o estudo da memória tem aumentado:

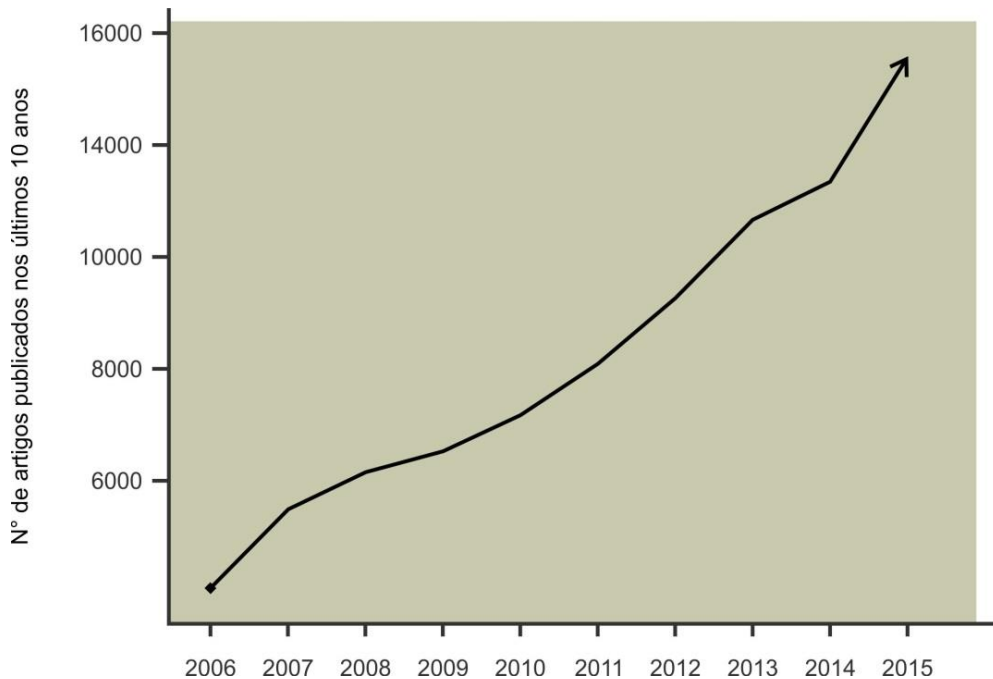


Figura 1. Gráfico da quantidade de artigos publicados com o termo “*memory*” no título e/ou resumo nos últimos dez anos.

O estudo da memória teve grande impacto após a descrição do caso do paciente Henry Molaison (H.M), em 1957, que contribuiu para um aumento da pesquisa dos seus substratos neurais. Henry sofria de epilepsia do Lobo Temporal Medial (LTM), com dezenas de crises diárias que o impossibilitavam de ter uma vida normal. Sabia-se à época que o hipocampo era o foco deste tipo de epilepsia, o que proporcionava apenas a retirada unilateral desta área para amenizar as crises (Squire & Wixted, 2011).

O caso de Henry Molaison era grave o suficiente para o Dr. Scoville, seu cirurgião, decidir realizar uma ablação bilateral do hipocampo e áreas adjacentes, fazendo com que Henry eliminasse grande parte da epilepsia, mas adquirisse uma amnésia anterógrada total (perda na capacidade de formar novas memórias episódicas) e uma amnésia retrógrada parcial (perda de memórias episódicas passadas) de cerca de três anos. Foi a partir dos estudos de Scoville e Milner (1957) que algumas divisões teóricas da memória tiveram seu início e continuaram evoluindo.

A década de 1970 trouxe grandes avanços para o estudo da memória, com os estudos de aprendizagem e memória de Kandel (Kandel, 2006), a descoberta da potenciação de longa duração (do inglês, *Long Term Potentiation*) (Bliss & Lomo, 1973), das *place cells*, células hipocâmpais que codificam um lugar específico (O'keefe & Dostrovsky, 1971) e a introdução do conceito de memória episódica e semântica como dois tipos de memória diferentes (Tulving, 1972). Tulving, além de elaborar inicialmente o conceito de memória episódica, continuou contribuindo de forma significativa para a evolução dos seus conceitos (Tulving, 1983, 1985a,b, 1986, 1999, 2001, 2002).

1.1.1 Etapas da Formação da Memória

A memória não é um sistema unitário, ou seja, pode ser dividida em diversos tipos com diferentes funções, mas, de forma geral, as memórias passam por um processo similar para serem armazenadas. Os três componentes básicos de um processo mnemônico são: aquisição, consolidação e evocação (Burgess et al., 2002).

Na aquisição, processo que depende da atenção de forma intrínseca, os sistemas de memória selecionam as informações mais relevantes para serem guardadas. Durante a consolidação a memória passa de um estado modulável e instável para um duradouro através de mudanças metabólicas que envolvem a síntese de proteínas e plasticidade sináptica em diversas estruturas encefálicas e, após consolidadas, as memórias podem ser evocadas através de um processo consciente ou inconsciente (McGaugh, 2000).

Estudos em roedores mostram dois picos de síntese de proteínas e expressão gênica no hipocampo, um logo em seguida à aquisição e, outro de 03 a 04 horas após o episódio. Este intervalo sugere que é necessário pelo menos três horas para que o processo de consolidação ocorra (Bourtchuladze et al., 1998; Quevedo et al., 1999).

Há controvérsias em relação à condição estável de um traço de memória após sua consolidação. Estudos mostraram que um traço de memória já adquirido pode ser reestruturado através de bloqueadores de síntese de proteínas, situação que só poderia ocorrer em um estado de consolidação, o que levou a novos insights e o surgimento do termo

reconsolidação, um fenômeno que pode ocorrer cada vez que uma memória é evocada, tornando-a lábil novamente e, portanto, possibilitando a alteração do traço através de uma nova experiência ou bloqueio da síntese de proteínas (Nader, Schafe & LeDoux, 2000; Cammarota, Bevilaqua, Medina & Izquierdo, 2004; Lee, Everitt & Thomas, 2004).

1.1.2 Sistemas de Memória

Dentro da taxonomia clássica, a memória pode ser dividida quanto ao seu tempo de retenção (curto e longo prazo) e quanto ao seu conteúdo (explícito e implícito) (Izquierdo, 2011). A memória de curto prazo é breve e pode ser recordada por poucos minutos, enquanto que a memória de longo prazo pode chegar a ser lembrada por toda a vida. (Squire & Zola, 1996, Eichenbaum, 2000, Tulving, 2002). Quanto ao tempo de retenção, a memória ainda pode ser subdividida. As memórias de curto prazo possuem uma capacidade de quantidade de informação reduzida, enquanto memórias de longo prazo possuem uma extensão indefinida (Squire & Zola, 1996).

A memória explícita refere-se à memória que é evocada conscientemente pelo sujeito, já a memória implícita não necessita de um processo consciente para acontecer como, por exemplo, a memória utilizada para andarmos de bicicleta (Squire & Zola, 1996). Estes tipos de memória demandam áreas encefálicas diferentes (O'Reilly & Norman, 2002; Simons & Spiers, 2003; Eichenbaum, 2004). A figura 2 ilustra o envolvimento de áreas distintas nos diferentes tipos de memória relacionadas ao conteúdo.

Baseado no conceito de memória explícita é que Tulving (2002) definiu memória episódica e semântica. A primeira seria a memória para eventos específicos, rica em conteúdo espacial e temporal, como lembrar o seu último aniversário, enquanto a segunda reuniria fatos sem a necessidade deste conteúdo temporal e espacial, como saber que João Pessoa é a capital da Paraíba.

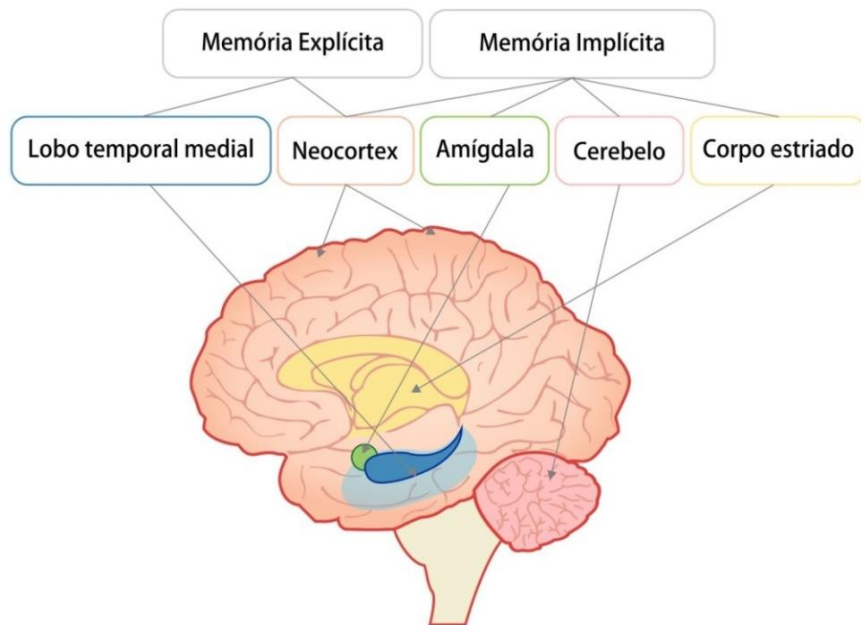


Figura 2. Esquema ilustrativo simplificado da relação funcional entre diferentes áreas cerebrais e os tipos de memória relacionadas ao conteúdo. Extraído de Souza (2015)

1.2 Memória Episódica em Humanos e Outros Animais

Muito se tem estudado sobre os mecanismos neurais da memória episódica em humanos e modelos animais. De acordo com Tulving (2002) a memória episódica é um tipo de memória explícita rica em contextos temporais e espaciais, que representa onde e quando um determinado evento aconteceu. Para o autor, a memória episódica só existe se o indivíduo realizar uma viagem mental no tempo e, para que esta viagem ocorra, há três condições que devem ser cumpridas, que são: a capacidade de cognição relativa ao tempo subjetivo, a autoconsciência e a consciência autooética. Estas condições são caracterizadas como os critérios fenomenológicos da memória episódica.

O tempo subjetivo refere-se à condição de um organismo ser capaz de diferenciar e conceituar passado, presente e futuro. A autoconsciência (*self*) é relativa à capacidade do indivíduo de se reconhecer como um ser único, diferente do restante do mundo. A consciência autooética traduz a capacidade de um indivíduo em se reconhecer como o mesmo, seja no passado ou no presente e, além disso, ser capaz de planejar o que vai fazer em um futuro próximo ou distante.

Utilizando essas três condições como referência para a realização da memória episódica, Tulving (2002) implicou que o ser humano seria o único capaz de, ao utilizar-se destes três critérios fenomenológicos, realizar uma viagem temporal através da mente.

Existe uma grande discussão na literatura a respeito da capacidade, ou não, dos animais realizarem essa viagem temporal (Tulving, 2002; Clayton, Bussey & Dickinson, 2003; Dere et al., 2006; Babb & Crystal, 2006; Clayton & Russel, 2009; Crystal, 2009; Crystal, 2010; Easton & Eacott, 2010). Contudo, este debate pode ser parcialmente resolvido ao se considerar uma memória similar à episódica, inicialmente proposta por Clayton e Dickinson (1998). Esta memória utiliza-se de critérios comportamentais e, traduz-se como a memória para localizações espaciais, estímulos encontrados nestes espaços e a ocasião, contextual ou temporal, em que um dado evento aconteceu.

Tulving (2002) concorda com a noção de memória similar à episódica, referindo-se ao trabalho de Clayton e Dickinson (1998), reforçando a ideia de que este tipo de memória preenche a lacuna evolutiva entre a memória dependente do espaço e do tempo e outros tipos de memória. O autor ressalta que neste tipo de memória os animais podem ter experiências vivenciadas no passado influenciando o presente ou o futuro, mas sem consciência autoconsciente, tornando este tipo de memória similar à episódica menos complexa.

De qualquer modo, para ter validade de constructo, um protocolo experimental que se proponha a avaliar memória similar à episódica precisa analisar os três componentes comportamentais (“o quê”, “onde” e “quando/em qual”) ao mesmo tempo, de forma integrada, pois esta é a principal característica da memória episódica (Clayton et al., 2003; Dere, Huston & De Souza Silva, 2005a,b; Kart-Teke, Dere, Brandão, Huston & De Souza Silva, 2006,2007; Wilson, Watanabe, Milner & Ainge, 2013; Wilson, Langston et al., 2013).

Inicialmente a memória similar à episódica foi identificada em “Scrub Jays”, uma espécie de corvídeo (Clayton & Dickinson, 1998) e, posteriormente foram desenvolvidas tarefas para se identificar este tipo de memória em camundongos (Dere et al., 2005a,b) e ratos (Eacott & Norman, 2004; Eacott, Easton & Zinkivskay 2005; Kart-Teke et al., 2006), o que facilitou os estudos, já que roedores são mais próximos dos seres humanos na escala filogenética. Além disso, existe um conhecimento neuroanatômico denso sobre estes animais, o que abre espaço para estudos mais precisos, como estudos farmacológicos e eletrofisiológicos.

Há uma discussão em relação ao componente “quando” e “em qual” (do inglês, *which*) no que se refere à validade de se avaliar memória episódica. Embora a definição de memória similar à episódica tenha derivado da definição de Tulving (2002) e tenha carregado consigo o componente temporal, alguns trabalhos demonstram a importância de áreas do lobo temporal medial para esta alternativa focada no componente de ocasião contextual (Eacott & Norman, 2004; Eacott et al., 2005). Neste trabalho focamos apenas nos componentes “o quê”, “onde” e “quando”.

No estudo da memória episódica, diversos modelos animais já foram utilizados ao longo dos últimos anos, dentre eles os roedores, principalmente ratos e camundongos, por serem dóceis, de fácil manutenção, reprodução e manuseio. Ratos e camundongos possuem um comportamento natural de forrageio por alimento, o que faz com que eles prefiram, em estado saudável, sempre explorar alguma novidade no ambiente em que os cerca (Ennaceur & Delacour, 1988; Dere et al., 2005a; Kart-Teke et al., 2006). Este comportamento é fundamental para as tarefas de reconhecimento de objetos.

1.2.1 Tarefa de Memória Similar à Episódica Para Roedores

Baseados no paradigma de exploração natural da novidade, diversos estudos lançaram tarefas comportamentais que se propuseram a estudar os aspectos da memória episódica tanto de forma associativa quanto não associativa (Eacott & Norman, 2004; Eacott et al., 2005; ; Kart-Teke et al., 2006,2007; Wilson, Watanabe et al., 2013; Wilson, Langston et al., 2013; Inostroza et al., 2013). As tarefas não associativas são aquelas que focam em apenas um componente comportamental, analisando só “o quê”, só “onde” ou só “quando” e, tarefas associativas, por sua vez, focam em mais de um componente de forma integrada, conseqüentemente, exigindo uma maior demanda cognitiva do animal.

Tarefas de reconhecimento de objetos geralmente utilizam um campo aberto de forma circular ou quadrada. Os animais são postos no aparato com objetos em disposições específicas e permanecem por um determinado tempo para que os explorem naturalmente e, a esta sessão dá-se o nome de amostra. Após um intervalo os animais voltam ao aparato para serem testados ou para uma nova sessão de amostra de acordo com o protocolo (Eacott & Norman, 2004; Eacott et al., 2005; Kart-Teke et al., 2006,2007; Wilson, Watanabe et al., 2013; Wilson, Langston et al., 2013; Inostroza et al., 2013). A figura a seguir traz um esquema ilustrativo de três tarefas não associativas:

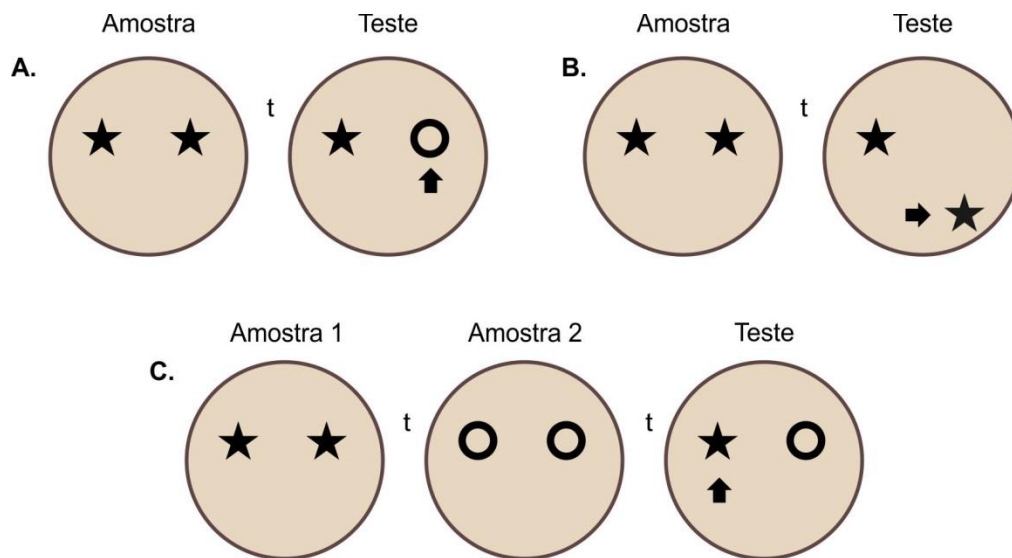


Figura 3. Esquemas ilustrativos de tarefas de reconhecimento não-associativas adaptados de Inostroza et al. (2013). A, tarefa de reconhecimento de objetos (caráter “o quê”), B, tarefa de reconhecimento de lugar (caráter “onde”), C, tarefa de reconhecimento temporal (caráter “quando”). As setas indicam a tendência de exploração dos animais.

Para as tarefas não associativas “o quê” e “onde”, criadas respectivamente por Ennaceur e Delacour (1988) e Ennaceur, Neave e Aggleton (1997), a dedução da exploração do animal é intuitiva, pois ele explora o objeto novo, para o parâmetro “o quê” (figura 3A) e, o objeto deslocado, para o parâmetro “onde” (figura 3B).

Na tarefa não associativa temporal, criada por Mitchell e Laiacona (1998), o animal apresenta um padrão de explorar o objeto mais antigo, o que indica reconhecimento temporal (figura 3C) justificado por primazia, fenômeno que ocorre em humanos e outros animais, que reflete uma facilidade para recordar elementos que vieram primeiro numa sequência. Para não haver a possibilidade de o animal explorar o objeto mais antigo por esquecimento, o que estaria sendo explorado como um objeto novo, um trabalho recente solucionou o problema com a exposição de um objeto novo junto ao objeto mais antigo. Os animais passaram a explorar mais o objeto novo, demonstrando através desta preferência que o objeto antigo ainda era lembrado (Inostroza et al., 2013).

Para mimetizar a memória episódica em roedores faz-se necessária a integração dos três componentes comportamentais na mesma tarefa, o que foi concretizado por Kart-Teke et al. (2006) em ratos. Para isto, os autores utilizaram as três tarefas não-associativas para “o quê”, “onde” e “quando” e construíram uma única tarefa de duas sessões de amostra e uma de teste.

Na primeira sessão, chamada de “amostra 1”, o animal entra em contato com 04 objetos dispostos em locais específicos. Na segunda sessão (amostra 2) o animal entra em contato com 04 novos objetos, dos quais, 02 estão em uma mesma posição em relação à

sessão de “amostra 1” e dois em novas posições. Na sessão de teste o animal entra em contato com duas cópias de objetos da primeira sessão e duas da segunda sessão e, dentre estas, uma foi deslocada (objetos representados pelo número 2) e outra permaneceu no mesmo local (objetos representados pelo número 1) em relação à sessão de amostra (Kart-Teke et al., 2006). A figura 4 ilustra como a tarefa foi construída:

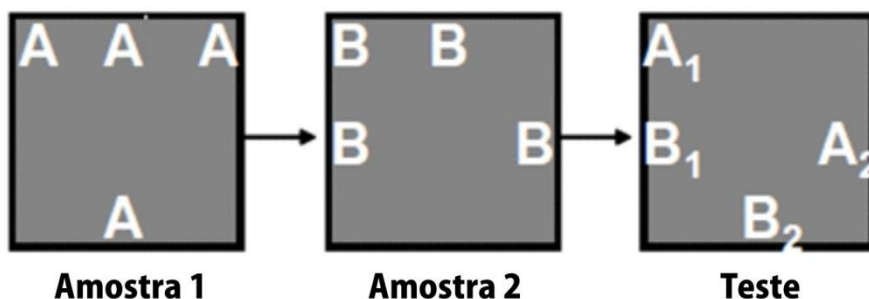


Figura 4. Esquema ilustrativo da tarefa de memória similar à episódica adaptado de Kart-Teke et al. (2006).

O padrão de exploração apresentado pelos animais é de explorar mais o objeto “A1” do que o “B1” e, mais o objeto “B2” do que o “B1” (Kart-Teke et al., 2006; Inostroza et al., 2013), demonstrando padrões das tarefas não associativas para “quando” e “onde” respectivamente. Pode-se demonstrar uma memória similar à episódica somando estes dois padrões ao padrão de “A1>A2”, onde ocorre integração da memória para “o quê”, “onde” (“B2>B1”) e “quando” (“A1>B1”).

Esta integração de “A1>A2” não é intuitiva, mas é necessário que analisemos de uma forma não linear. O tempo estaria intrinsecamente ligado ao espaço, de forma que para um tempo recente, o padrão esperado seria de o animal explorar mais o objeto deslocado. Já para tempos mais distantes, o padrão seria invertido, excluindo a possibilidade de que os animais tivessem identificado espaço e tempo de uma forma separada, demonstrando assim uma integração dos componentes da memória similar à episódica.

No estudo de Kart-Teke et al. (2006) os autores propõem esta integração comparando com um estudo anterior do mesmo grupo, que utilizou uma versão da mesma tarefa, deslocando um dos objetos antigos, mas deixando os objetos recentes na mesma localidade (Dere et al., 2005a). O padrão dos animais foi de explorar o objeto antigo deslocado (“A2”), demonstrando uma memória não associativa apenas para “onde”. Quando, na nova tarefa, um dos objetos recentes também sofreu um deslocamento, o padrão dos animais foi de explorar tanto o aspecto “onde” (“B2>B1”), quanto o “quando” (“A1>B1”), mas desta vez demonstrando um padrão invertido para os objetos antigos, fazendo com que fosse vista uma integração de “o quê” aconteceu junto ao tempo e espaço.

O desenvolvimento de tarefas comportamentais de memória similar à episódica que de fato possam avaliar os aspectos “o quê”, “onde” e “quando” integrados é fundamental. Como demonstrado aqui, é através do comportamento que podemos saber se um animal evoca ou não uma memória e, a avaliação comportamental abre espaço para análises dos substratos neurais envolvidos na resolução destas tarefas.

1.3 Substratos Neurais da Memória Episódica

Ao longo dos anos, os estudos têm demonstrado que o lobo temporal medial e os córtices associativos são estruturas importantes para a memória explícita em humanos e outros animais (Scoville & Milner, 1957; Squire & Zola, 1996). Não há um local específico no cérebro que contenha todas as nossas memórias episódicas, estudos demonstram que algumas estruturas, como o hipocampo e áreas adjacentes, são essenciais para a aquisição e formação de novas memórias, mas não são o seu loco final (Squire & Zola, 1996; Tulving, 2001, 2002).

Quando se trata do sistema nervoso, até mesmo uma pequena área pode estar envolvida em muitos processos e ser subdividida em áreas menores ainda. Dentre as estruturas essenciais à memória episódica estão o hipocampo, o córtex entorrinal (CE), o córtex perirrinal e o córtex pósrrinal (Parahipocampal em primatas). O hipocampo pode ser subdividido em CA1, CA2, CA3 e Giro Denteado (GD) e o córtex entorrinal em lateral e medial. Estas divisões são feitas de acordo com a citoarquitetura e com funções diferentes que cada área subdividida exerce (Kealy & Commins, 2011; Morrissey & Takehara-Nishiuchi, 2014). A figura a seguir traz um esquema das aferências e eferências destas respectivas áreas:

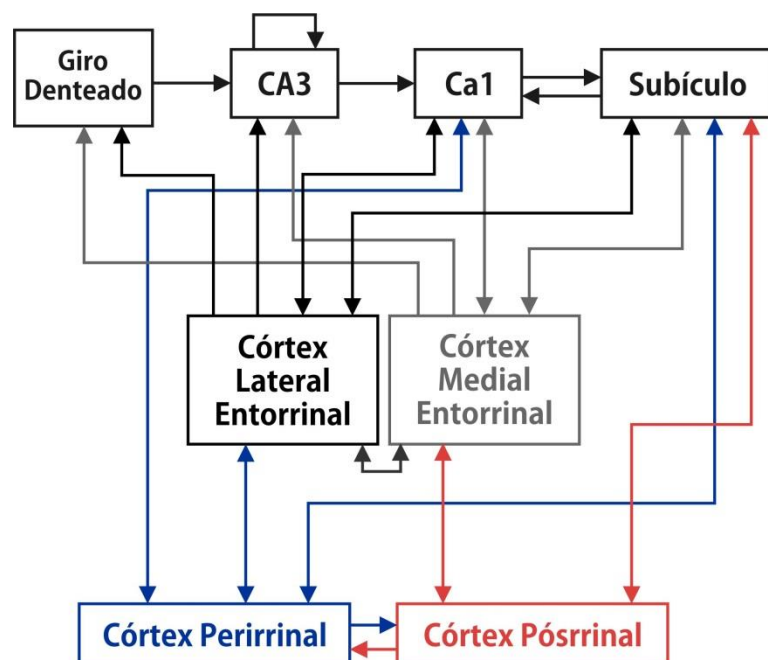


Figura 5. Esquema ilustrativo das aferências e eferências entre o sistema hipocampal e áreas adjacentes adaptado de Kealy e Commins (2011). As setas indicam a origem e destino das projeções de feixes axônicos e as cores azul e vermelho, representam funções essenciais para memória de reconhecimento de objetos (azul) e memória de reconhecimento espacial (vermelho).

Há uma discussão sobre uma posição hierárquica de nível de processamento entre essas áreas, onde o hipocampo estaria no topo, integrando informações mais complexas advindas das outras áreas e, enviando estas informações para o neocórtex (Eichenbaum & Lipton, 2008; Eichenbaum, Sauvage, Fortin, Komorowski & Lipton, 2012). O córtex entorrinal estaria abaixo, projetando aferências para o hipocampo com informações menos complexas e, os córtices perirrinal e pósrrinal viriam abaixo, com informações menos complexas ainda. (Agster & Burwel, 2009, 2013; Kealy & Commins, 2011).

Estudos experimentais têm demonstrado que o córtex pós-rinal e perirrinal são essenciais para memórias não associativas que envolvam um caráter “onde” e “o quê” respectivamente (Squire, 1992; Bussey, Muir & Aggleton, 1999; Witter et al., 2000; Bussey, Duck, Muir & Aggleton, 2000; Ramos, 2002; Winters, Forwood, Cowell, Saksida & Bussey, 2004; Norman & Eacott, 2005; Jo & Lee, 2010), enquanto que o córtex entorrinal estaria envolvido em tarefas associativas mais complexas (Wilson, Watanabe et al., 2013; Wilson, Langston et al., 2013; Hunsaker, Chen, Tran & Kesner, 2013) e, o hipocampo estaria envolvido com tarefas ainda mais complexas (Eichenbaum & Lipton, 2008; Eichenbaum et al., 2012).

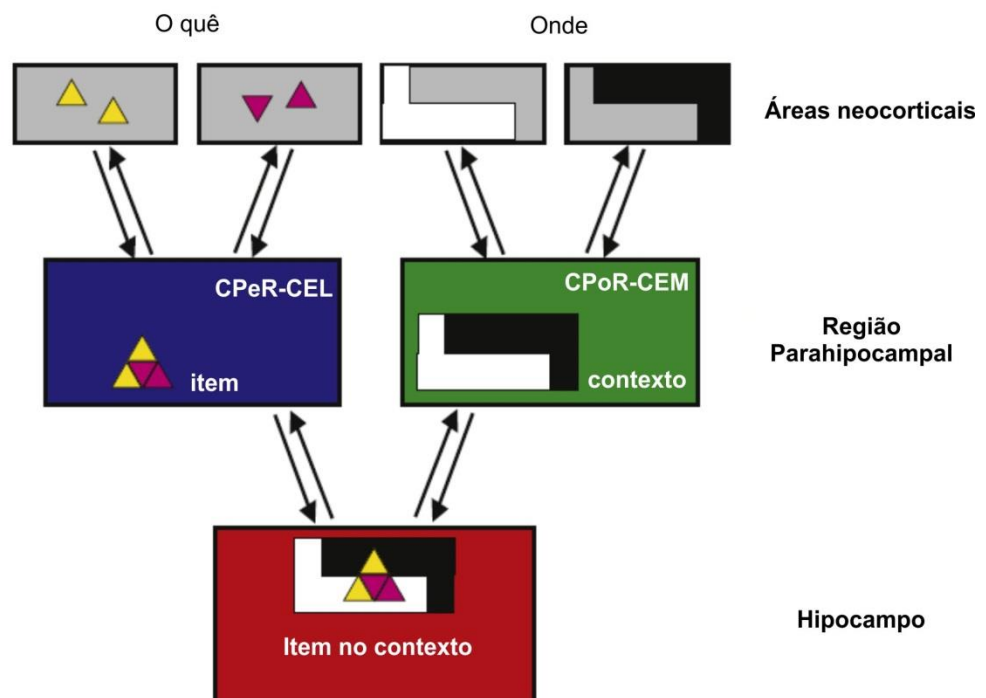


Figura 6. Esquema ilustrativo da função hierárquica do hipocampo e de áreas adjacentes adaptado de Eichenbaum et al., 2012. A parte esquerda da figura ilustra uma via de processamento de informações “o quê” que viria de áreas neocorticais e passaria pelos córtices Perirrinal e Lateral Entorrinal (CPer e CEL), enquanto a parte da direita ilustra uma via de processamento de informações “onde”, que viria de áreas neocorticais e passaria pelos córtices Pósrrinal e Medial Entorrinal (CPoR e CEM). Ambas desembocariam no Hipocampo, onde seria feita a junção das características não associativas.

Alguns estudos demonstram que tarefas não associativas não são prejudicadas quando o hipocampo é lesionado (Bussey et al., 2000; Mumby, Gaskin, Glenn, Schramek & Lehmann, 2002; Winters et al., 2004; Forwood, Winters & Bussey, 2005; Good, Barnes, Stual, McGregor & Honey, 2007; Langston & Wood, 2010). Estes estudos corroboram com a proposta de uma hierarquia de funções entre as áreas envolvidas em processos de memória.

O hipocampo demonstra seu papel fundamental na codificação do espaço com as células de lugar (do inglês, *place cells*). Este tipo de célula vem sendo estudada há quase cinquenta anos, mas ainda assim há poucos estudos com tarefas comportamentais que demandem um processamento cognitivo maior (O’keefe & Dostrovsky, 1971; O’keefe & Recce, 1993; Ferbinteanu, Kennedy & Shapiro, 2006; Moser, Kropff & Moser, 2008).

Subregiões hipocampais como o Giro Denteado e CA3 aparentam estar envolvidas na “separação de padrões” (do inglês, *pattern separation*) Leutgeb, Leutgeb, Moser & Moser (2007), ou seja, na codificação de eventos similares em representações diferentes (O’Reilly & Rudy 2001; Eichenbaum, 2004), permitindo ao hipocampo evitar que memórias sofram interferência de outras, mesmo que sejam parecidas.

A região CA3 também atua no “completamento de padrões” (do inglês, *pattern completion*), que se traduz como a evocação de uma memória na presença de um estímulo (dica) que facilite a lembrança do evento já vivenciado, mesmo que não seja idêntico a ele (Leutgeb & Leutgeb, 2007; Leutgeb et al., 2007; Rolls, 2013).

A sub-região CA2 tem sido apontada como importante para a memória social, que seria a capacidade de reconhecer um animal da mesma espécie. Um estudo conseguiu analisar as conexões sinápticas de CA2 em camundongos transgênicos e, a inativação desta área através da manipulação genética fez com que os animais preservassem inteiramente outras funções relativas à memória espacial e contextual, mas prejudicassem o processamento da memória sócio cognitiva (Hitti & Siegelbaum, 2014). Outros estudos também demonstraram a importância de CA2 para a memória social (Stevenson & Caldwell, 2014; Smith et al., 2016; Piskorowski et al., 2016)

A área CA2 também é apontada em um trabalho recente como importante para codificar informações espaciais quando o animal está parado, de forma diferente das células de lugar, que codificam o espaço enquanto o animal está se locomovendo (Kay et al., 2016).

Como peça chave na memória episódica, a separação temporal também está presente no hipocampo e, estudos demonstram que CA1 parece exercer esse papel (Hoge & Kesner, 2007; Kesner & Hunsaker, 2010; Barbosa, Pontes, Ribeiro, Ribeiro & Silva, 2012), embora também pareça exercer um papel no componente espacial em uma tarefa associativa de memória similar à episódica (Barbosa et al., 2012). A sub-área CA1 dorsal é considerada a maior via de saída do hipocampo para o neocórtex e possui vias que a ligam a CA3 e ao Córtex Entorrinal (Agster & Burwell, 2009, 2013).

Estudos demonstram diferentes papéis do hipocampo em tarefas de reconhecimento de objetos padrão (aspecto não associativo “o quê”). Como dito anteriormente, animais com lesões permanentes no hipocampo parecem conseguir resolver este tipo de tarefa da mesma forma que animais controle (Mumby et al., 2002; Ainge et al., 2006; Barker & Warburton, 2011), no entanto, um estudo demonstrou que a inativação temporária de CA1 através do agonista GABA_A muscimol danificou o padrão de exploração na tarefa para a aquisição, consolidação e evocação (Cohen et al., 2013; Cohen & Stackman Jr., 2015).

A tarefa de memória similar à episódica para roedores com componente temporal foi criada há mais de 10 anos (Dere et al., 2005b; Kart-Teke et al., 2006; Binder, Dere & Slomuzica, 2015). Desde então, vários estudos foram realizados com ambas as tarefas, tanto com a feita para camundongos (tarefa não integrativa dos três componentes) (Dere et al., 2005b) quanto com a feita para ratos (tarefa integrativa dos três componentes) (Kart-Teke et al., 2006).

DeVito e Eichenbaum (2010) demonstraram que uma lesão envolvendo o hipocampo dorsal e ventral, abrangendo as subáreas CA1, CA2, CA3, GD e subículo, prejudica a evocação dos três componentes (“o quê”, “onde” e “quando”) da tarefa para camundongos. O mesmo estudo apontou que uma lesão no córtex pré-frontal medial (CPFm) prejudica apenas o componente espacial. Os autores indicaram que embora alguns estudos demonstrem que lesões no CPFm não prejudicam a memória não associativa “onde”, quando há uma integração entre os componentes “o quê” e “onde”, tanto o CPFm quanto a conexão entre ele e o hipocampo são necessárias (Barker et al., 2007; DeVito & Eichenbaum, 2010).

Mais recentemente, de Souza Silva e colaboradores demonstraram que lesões contralaterais no CPFm e em CA3 dorsal prejudicaram todos os aspectos da tarefa de memória similar à episódica integrativa, enquanto que lesões ipsilaterais os mantiveram intactos (De Souza Silva et al., 2015). Além disso, tanto lesões ipsilaterais quanto

contralaterais não prejudicaram os padrões de tarefas não associativas (tarefas com apenas um componente avaliado).

Li e Chao (2008) demonstraram que uma lesão em CA3 dorsal impossibilitou que os animais demonstrassem o padrão de integração da tarefa de memória similar à episódica integrativa, mas mantivessem a memória não associativa para “o quê”, “onde” e “quando” intactas. Somados, este estudo e o de De Souza Silva et al. (2015), corroboram com a ideia de uma organização hierárquica entre o hipocampo e áreas necessárias à resolução destas respectivas tarefas não associativas (Eichenbaum et al., 2012).

Em um estudo recente, Barbosa e colaboradores demonstraram que a infusão de muscimol na porção dorsal de CA3/GD antes da amostra 1, danificou o padrão espacial da tarefa de memória similar à episódica não integrativa quando testados 24h depois da sessão amostra 2, mantendo o padrão temporal intacto, enquanto que a inativação de CA1 dorsal danificou tanto o aspecto temporal quanto o espacial (Barbosa et al., 2012).

Juntos, os estudos de Li e Chao (2008) e de Barbosa et al. (2012) sugerem que CA3 e o GD são necessários para a aquisição/consolidação do componente espacial da memória similar à episódica, mas não para a memória não associativa “onde”. Além disso, CA1 parece processar informações temporais, como evidenciado em estudos anteriores (Hoge & Kesner, 2007; Kesner & Hunsaker, 2010), mas também informações espaciais, o que pode acontecer devido a CA1 também ser necessária à resolução de tarefas espaciais, como evidenciado por Lee, Hunsaker, & Kesner (2005) e/ou por ser a principal via de saída do hipocampo, recebendo projeções diretas de CA3 (Kealy & Commins, 2011; Binder et al., 2015)

A tarefa de memória similar à episódica integrativa é bastante susceptível ao estresse, seja ele causado ao animal de forma crônica ou aguda (Kart-Teke et al., 2006). Isto dificulta a realização de estudos farmacológicos, que, por utilizarem com frequência a administração de drogas através da via intraperitoneal (i.p), estressam o animal com a inserção da agulha. Devido a este fator limitante, estudos têm focado no papel de áreas anatômicas e na função destas através de técnicas de lesão e inativação intracerebral para a execução da tarefa (Li & Chao, 2008; Barbosa et al., 2012; De Souza Silva et al., 2015)

Nos últimos dez anos, vários estudos foram realizados com as tarefas de memória similar à episódica integrativa e não integrativa (Binder et al., 2015), contudo, apenas o estudo de Barbosa et al. (2012), com a tarefa não integrativa, buscou verificar o papel da área CA1 dorsal na tarefa. Nenhum estudo inativou ou lesionou a área CA1 dorsal para identificar seu papel na resolução da tarefa integrativa. Isso abre espaço para que novos estudos sejam feitos.

2. JUSTIFICATIVA

A memória é uma das áreas mais estudadas na neurociência. Os estudos são impulsionados pela possibilidade de entender melhor seus processos e, com isso, colaborar com a cura de doenças que a prejudicam. Tem sido mostrado que as áreas hipocampais e parahipocampais são as primeiras a serem acometidas na doença de Alzheimer (Aggleton, 2014; Kesner & Rolls, 2015) e, como demonstrado aqui, estas áreas são essenciais para a memória episódica.

Estudos que foquem na compreensão básica dos processos da memória episódica podem contribuir de forma incomensurável para o arcabouço teórico necessário à busca da cura de doenças que acometem a memória e, a utilização de animais nestas pesquisas tem favorecido o entendimento destes processos (Eacott & Norman, 2004; Eacott et al., 2005; ; Kart-Teke et al., 2006,2007; Wilson, Watanabe et al., 2013; Wilson, Langston et al., 2013; Inostroza et al., 2013).

Até hoje, não há registro de nenhum trabalho que tenha utilizado uma tarefa de memória similar à episódica com componente integrativo para uma análise do papel da área hipocampal CA1 na sua resolução. Com este trabalho buscamos preencher esta lacuna e contribuir com a literatura de estudos neuroanatômicos e funcionais da memória similar à episódica.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Investigar o papel da área hipocampal CA1 dorsal na memória similar à episódica

3.2 Objetivos Específicos

- Analisar o papel da área hipocampal CA1 dorsal na memória similar à episódica através da infusão intracraniana do agonista GABA_A muscimol.
- Verificar se os resultados provenientes da infusão do muscimol foram influenciados por um efeito hipolocomotor dos animais

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos ($N=24$, 12 por grupo) de 03 a 04 meses de idade, pesando entre 270-360g mantidos em uma sala com temperatura controlada ($24 \pm 1^\circ\text{C}$), Os animais foram alocados em gaiolas de polietileno (30cm de comprimento x 37cm de largura x 16 cm de altura) em grupos de 03 ou 04 por gaiola e, submetidos a um ciclo claro-escuro de 12:12 h, com luzes acesas às 06:30 h. Cinco animais foram retirados da análise estatística por não estarem com a cânula na posição correta.

Os procedimentos foram realizados na fase clara do ciclo, entre 12:00 h e 16:30 h, água e comida foram fornecidas *ad libitum* e o ambiente de experimentos teve iluminação controlada de 10-15lux (Inostroza et al., 2013).

Os ratos foram fornecidos pelo Biotério Prof. Thomas George da Universidade Federal da Paraíba e foram tratados de acordo com as diretrizes da legislação brasileira para a utilização de animais em pesquisa (Lei Arouca, nº 11.794/08). Todos os procedimentos foram submetidos ao Comitê de Ética da Universidade Federal da Paraíba e aprovados sob a CEUA nº 050/2015. Foi feito todo o esforço possível para minimizar o estresse, a dor e o desconforto dos animais.

4.2 Cirurgia

Os animais foram anestesiados com uma dose associada de Cetamina (100mg/kg, i.p.) e Xilazina (50mg/kg, i.p.) para então serem posicionados em um aparelho estereotáxico (*Insight*, Brasil). Cânulas guia inoxidáveis (calibre 22G, 12mm) foram implantadas bilateralmente na sub-área hipocampal CA1 dorsal. As coordenadas para o implante foram AP = -3.4 mm, ML = ± 2.0 mm e DV = -2.0 mm (Paxinos e Watson, 2009). As cânulas foram fixadas ao crânio com parafusos de aço e cimento acrílico polimerizável. Ao fim da cirurgia, cada cânula foi selada com um fio de aço inoxidável a fim de protegê-las de possíveis obstruções. Após a cirurgia os animais foram tratados com medicamento anti-inflamatório (diclofenaco sódico 75mg/ml, i.m.) e antibiótico (penicilina 60.000 UI/ml, i.m.). Após os procedimentos operatórios os animais foram mantidos em observação por 02 dias para se recuperarem antes do início da manipulação. Ao fim da manipulação os animais estavam com 07 dias de cirurgia e puderam realizar os procedimentos de habituação e teste.

4.3 Aparato Experimental e Objetos

O aparato utilizado para o experimento consistiu de um campo aberto de material acrílico de 60 cm de diâmetro e 40 cm de altura, com parede transparente e piso preto. A arena circular está representada na figura abaixo (Figura 7A):

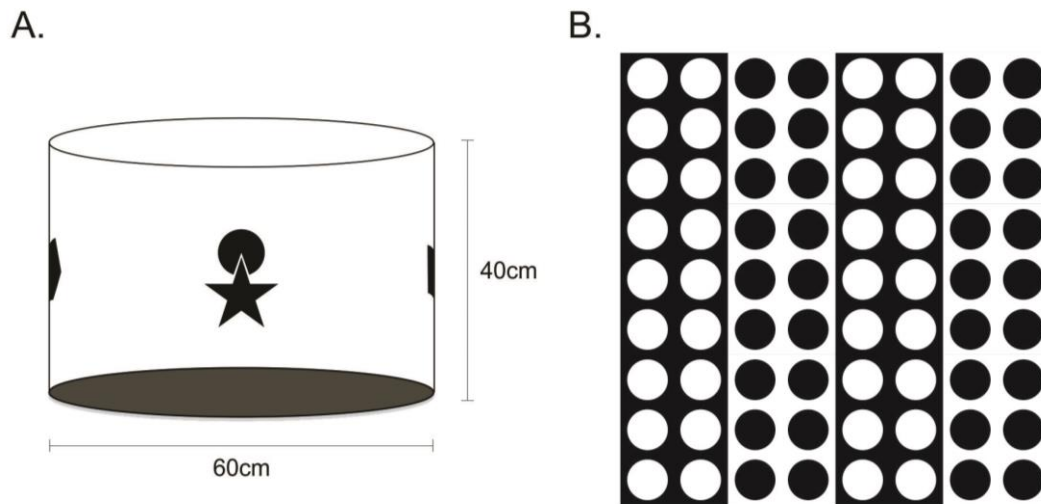


Figura 7. Esquema ilustrativo do campo aberto com pistas proximais e das pistas distais. (A) arena circular utilizada para a tarefa de memória similar à episódica com a disposição das pistas proximais. (B) uma das pistas distais dispostas nas paredes da sala de experimentos.

Foram utilizados 05 objetos com 04 cópias idênticas cada, de material plástico que diferiram em altura (5 a 15 cm), largura (5a 10 cm), cor (azul, vermelho, preto, amarelo, laranja e rosa), textura (rugosa, lisa e áspera) e forma.



Figura 8. Fotos dos objetos utilizados nos experimentos.

O modelo linear geral de medidas repetidas revelou uma interação entre grupos e objetos para as taxas de exploração, com tamanho de efeito alto para este tipo de teste ($f = 0,53$) e, não mostrou efeito principal para grupos ou objetos. Este resultado é interessante, já que, para a medida de taxa de exploração, um efeito principal de grupos poderia implicar numa quantidade maior de exploração por parte do grupo controle e, um efeito de objeto poderia ter sido originado através de um viés de exploração de um objeto específico. A interação demonstra que o grupo controle formou a memória para “o quê”, “quando” e “onde” e o grupo experimental não.

Para os índices de discriminação, o MLG de medidas repetidas revelou um efeito principal de grupo, sem efeito principal por parte dos índices nem de interação entre “índices e objetos”. Isto era esperado, já que os animais controle desempenharam o padrão de exploração esperado para a memória similar à episódica ($A1 > B1$, $B2 > B1$ e $A1 > A2$). Um efeito principal de índice poderia, assim como para as taxas de exploração, demonstrar uma preferência de algum objeto específico.

Também verificamos o tempo total de exploração para ambos os grupos, a fim de descartar a possibilidade de que os animais do grupo experimental demonstrassem um padrão de exploração danificado através de uma diminuição da motivação de explorar. Um MLG de medidas repetidas para grupos e tempo total por sessão não revelou interação entre “grupo x sessão” nem efeito principal para cada uma das medidas. Este resultado é essencial, já que, caso os grupos tivessem demonstrado uma diferença na motivação de explorar, o muscimol poderia ser o causador dessa diferença locomotora, o que prejudicaria as conclusões extraídas do comportamento exploratório, já que este depende intrinsecamente de uma locomoção intacta.

Neste estudo, optamos pela inativação farmacológica devido à possibilidade de uma maior validade para se analisar o papel da área estudada. Modelos de lesão representam uma condição patológica e podem refletir como outras áreas desempenham uma função específica sem a área lesionada ao invés de o papel da área alvo em si. Este ponto é interessante de ser discutido, já que os estudos parecem utilizar mais lesões do que inativações farmacológicas (Cohen et al., 2013; Cohen & Stackman Jr, 2015).

Dentre as vantagens de uma lesão, ressaltamos a possibilidade de verificar a extensão da área atingida com bastante precisão, algo que não acontece com as inativações farmacológicas, mesmo quando utilizados fármacos fluorescentes, que podem facilitar a checagem da extensão da ação do fármaco (Cohen & Stackman Jr, 2015; Leão et al., 2016). Há uma incongruência profunda na literatura em relação aos resultados de estudos com lesão em comparação a estudos de inativação para a tarefa de reconhecimento de objetos (aspecto

O experimento dispôs de pistas proximais e distais (Figura 7B) para ajudar na localização allocêntrica e egocêntrica dos animais, as pistas distais estavam localizadas a 1,2 metros do centro do aparato e eram compostas de diferentes padrões geométricos de 80 x 90 cm (figura 7B), já as proximais eram compostas por quatro figuras geométricas distintas (15 cm de largura/diâmetro), localizadas na parede da arena circular e dispostas em cruz (figura 7A).

4.4 Procedimentos Experimentais

O experimento com os animais já cirurgiados durou 09 dias. Os animais foram manipulados durante 20 minutos por dia, durante 05 dias, a fim de haver a adaptação ao experimentador. Após a manipulação os animais foram habituados ao campo aberto por 03 dias em sessões individuais de 10 minutos e, após este período os animais foram testados. Tanto as sessões de habituação quanto as sessões do teste foram gravadas por uma webcam (*FaceCam 1020, Genius®*) e posteriormente analisadas através de um software de análise comportamental (*Ethowatcher*).

Ao fim de cada sessão de habituação o campo aberto foi limpo com solução de álcool etílico a 5%, para minimizar odores provenientes dos outros animais. E, após a retirada dos animais da sala, o campo aberto e todos os objetos foram limpos com álcool etílico a 70%, deixando o aparato pronto para o próximo dia.

Neste experimento utilizamos a tarefa de memória similar à episódica criada por Kart-Teke e colaboradores em 2006 (Kart-Teke et al., 2006; Binder et al., 2015). Inicialmente, esta tarefa foi desenvolvida por Dere et al. (2005a) para camundongos, integrando três tarefas de reconhecimento não associativo para “o quê”, “onde” e “quando” (Ennaceur & Delacour, 1988; Ennaceur, Neave & Aggleton, 1997; Mitchell & Laiacóna, 1998) em uma só tarefa associativa de memória similar à episódica.

A tarefa consiste de três sessões, sendo duas de amostra e uma de teste, similar à tarefa de reconhecimento temporal (Mitchell & Laiacóna, 1998; Inostroza et al., 2013). Na primeira sessão de amostra o animal entra em contato com quatro objetos idênticos, representados na figura 9 pela letra “A”, dispostos no campo aberto e permanece no aparato por 5 minutos. Após o período de 1 hora o animal volta ao aparato para a segunda sessão de amostra por mais 05 minutos e entra em contato com quatro novos objetos, representados pela letra “B”, sendo dois objetos posicionados em um mesmo local dos objetos “A” e dois objetos em um novo local. Novamente após 1 hora o animal retorna ao aparato para a sessão de teste e, desta

vez entra em contato com dois objetos “A” e dois objetos “B”, sendo um objeto “A” e “B” estacionários (chamados de “A1” e “B1”) e, um objeto “A” e “B” deslocados (chamados de “A2” e “B2”) em relação às sessões de amostra.

Para um melhor entendimento a figura 9 traz um exemplo de disposição dos objetos:

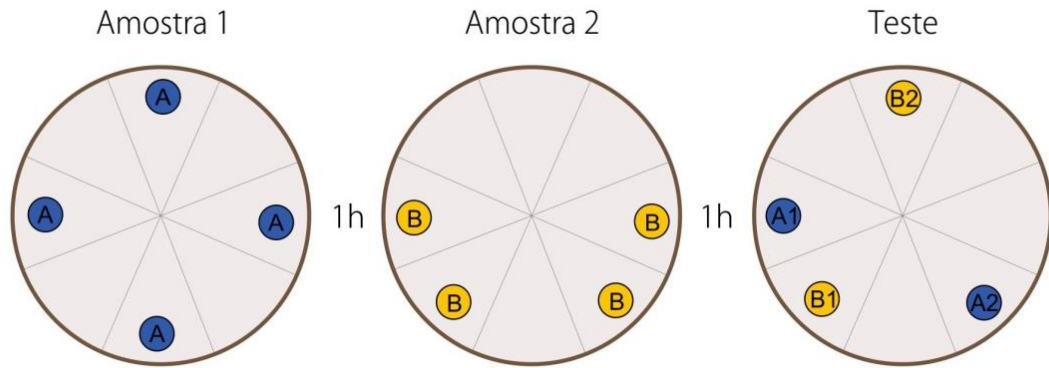


Figura 9. Esquema ilustrativo da tarefa comportamental de memória similar à episódica.

Para identificar o papel da área hipocampal CA1 durante a execução da tarefa de memória similar à episódica utilizamos o agonista GABA_A muscimol (Sigma, EUA) para inativar a região. Este fármaco foi utilizado por ter um efeito inibitório local e temporário, sem deixar danos nas fibras neurais (Edeline, Hars, Hennevin & Cotillon, 2002; Cohen et al., 2013; Leão et al., 2016).

Foram feitas infusões bilaterais de muscimol (0,2µg em 0,2µl por hemisfério) (Edeline et al., 2002; McHugh, Niewoehner, Rawlins & Bannerman, 2008) ou solução salina (0,2µl) durante um período de 60 segundos com uma bomba de microinfusão (*Insight*, Brasil) com seringas Hamilton de 10µg conectadas a um tubo de polietileno. As agulhas de injeção eram deixadas na cânula por mais 30 segundos a fim de permitir que a droga se difundisse da ponta da agulha. Os testes comportamentais seguiram o protocolo de Kart-Teke et al. (2006). A amostra 1 foi realizada 20 minutos após a infusão bilateral do muscimol (Cohen et al., 2013).

A figura a seguir ilustra respectivamente como o delineamento experimental foi dividido em dias:



Figura 10. Ilustração dos procedimentos e dias do protocolo experimental da tarefa de memória à episódica utilizada no experimento 3.

Após os experimentos os animais foram anestesiados com 1ml de tiopenal sódico (50mg/ml) e perfundidos transcardiacamente com tampão fosfato 0,2N seguido de uma solução de 10% de fixador paraformaldeído. Antes da craniotomia foi injetado azul de metileno (0,2µl) nas cânulas. Os cérebros foram removidos e imersos em uma solução de paraformaldeído de 10% e sacarose a 30% por 24h. Após isto, os cérebros foram imersos em sacarose a 30% por 48h, para então poderem ser cortados.

Os cérebros foram cortados a uma espessura de 50 µm em um criostato (*Leica*). As secções foram coradas com solução cresil violeta (reação de Niessl), visualizadas e fotografadas em um microscópio óptico para verificar o posicionamento da cânula.

4.5 Análise Comportamental e Estatística

Como dito antes, a exploração dos objetos foi avaliada manualmente através um *software* de rastreamento etológico (*Ethowatcher*) que utilizou os vídeos gravados durante as sessões de amostra e testes. Este programa requer que o experimentador, através de comandos de teclas, faça o registro de quando o animal aproximou-se de um objeto e o explorou. Considerou-se “exploração” quando o focinho do animal aproximou-se em direção plena do objeto em, no mínimo 02 cm e, o animal engajou-se em explorar o objeto. Não se considerou “exploração” a aproximação do objeto enquanto o animal fazia *grooming* ou se apoiava no objeto para explorar o ambiente. As análises foram feitas com o experimentador “cego” para a condição dos objetos e dos grupos. Após a análise histológica, apenas o comportamento de 19 animais dos 24 iniciais foi utilizado.

Foram calculadas uma taxa de exploração para cada objeto e um índice de discriminação de objetos baseado nos padrões de exploração esperados de acordo com a literatura (DeVito & Eichenbaum, 2010; Inostroza et al., 2013).

A taxa de exploração é uma medida que mostra a exploração de um objeto em relação à exploração de todos os objetos somados, enquanto a discriminação é uma medida que demonstra quanto um objeto foi explorado em relação ao outro. A primeira gera um valor entre 0 e 1 e a segunda um valor entre -1 e 1, onde um valor negativo significa que a variável escolhida para a comparação foi menos explorada do que a variável subtraída. A figura a seguir ilustra como as duas medidas são construídas:

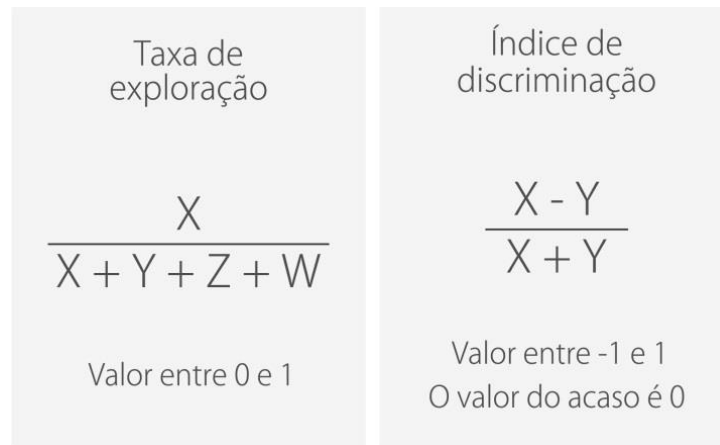


Figura 11. Ilustração da construção das medidas de taxa de exploração e índice de discriminação.

A normalidade foi verificada através do teste de *Shapiro-Wilk* (SPSS 21.0). Como todos os dados apresentaram-se normais, foram realizados modelos lineares gerais (MLG) de medidas repetidas [3x2] para o tempo total de exploração dos objetos nas sessões de amostra 1, amostra 2 e teste, [4x2] para as taxas de exploração dos quatro objetos em cada grupo e, [3x2] para os índices de discriminação. Também foram realizados testes *t* pareados para as taxas de exploração dos objetos A1xB1 (padrão temporal), B2xB1 (padrão espacial) e A1xA2 (padrão de integração) e testes *t* de uma amostra para os índices de discriminação, com valor de acaso em 0. O *post-test* utilizado foi o de Sidak-Bonferroni e o nível de significância em todas as análises foi de $p < 0,05$.

Também foi calculado o tamanho do efeito (T.E) para cada teste estatístico realizado através do software G*Power 3 (Faul, Erdfelder, Buchner, & Lang, 2009). O tamanho do efeito pode ser classificado em baixo, médio e alto (Cohen, 1988; Lakens, 2013). A tabela 1 mostra os valores de referência para cada classificação e o respectivo teste estatístico utilizado:

Tabela 1. Valores de referência para tamanhos de efeito (T.E) em relação a diferentes testes estatísticos.

	T.E baixo	T.E médio	T.E alto
Teste t pareado (d)	0.2	0.5	0.8
Teste t one-sample (dz)	0.2	0.5	0.8
ANOVA (f)	0.1	0.25	0.4

5. RESULTADOS

5.1 Parâmetros Histológicos

Foi feita uma análise dos cortes histológicos para verificar a posição das cânulas implantadas cirurgicamente. Os cortes foram corados com a coloração cresil violeta através da reação de Nissl. Os esquemas e a foto abaixo representam a posição da ponta da agulha e a área em que o azul de metileno foi injetado. 19 dos 24 animais iniciais foram selecionados para a análise estatística. Os cinco animais foram excluídos por não estarem com a cânula no local correto.

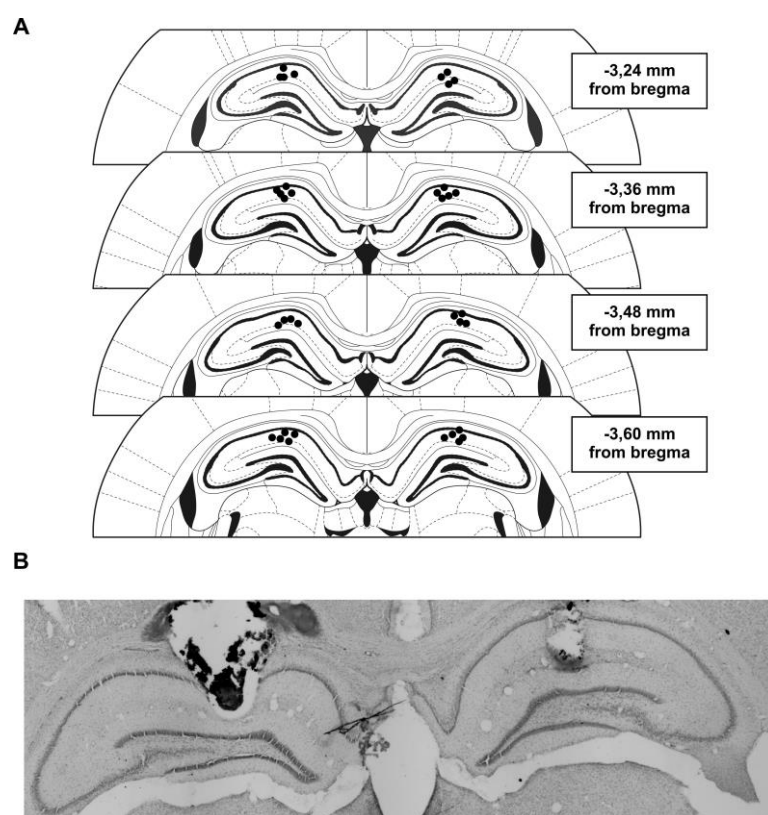


Figura 12. Esquemas ilustrativos baseados no atlas do cérebro do rato (Paxinos e Watson, 2009) e foto da histologia. (A) Esquemas da posição das cânulas indo de -3,24mm até -3,60mm a partir de bregma. (B) Representação fotográfica do azul de metileno e das pontas das agulhas. Corte corado com cresil violeta através da reação de Nissl. Somente dados dos animais com a posição correta da agulha foram utilizados para a análise estatística.

5.2 Parâmetros Comportamentais

Foram feitas análises das taxas de exploração e dos índices de discriminação, medidas comumente utilizadas em experimentos que envolvem o reconhecimento de objetos. Como

- Clayton, N. S., & Dickinson, A. (1998). Episodic-like memory during cache recovery by scrub jays. *Nature*, *395*(6699), 272–274. <http://doi.org/10.1038/26216>
- Clayton, N. S., & Russell, J. (2009). Looking for episodic memory in animals and young children: prospects for a new minimalism. *Neuropsychologia*, *47*(11), 2330–2340. <http://doi.org/10.1016/j.neuropsychologia.2008.10.011>
- Clayton, N. S., Bussey, T. J., & Dickinson, A. (2003). Can animals recall the past and plan for the future? *Nature Reviews. Neuroscience*, *4*(8), 685–691. <http://doi.org/10.1038/nrn1180>
- Cohen, J. (1988). *Statistical power analysis for the behavioral sciences*. Hillsdale, NY: Lawrence Erlbaum Associates.
- Cohen, S. J., & Stackman, R. W. (2015). Assessing rodent hippocampal involvement in the novel object recognition task. A review. *Behavioural Brain Research*, *285*, 105–117. <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.08.002>
- Cohen, S. J., Munchow, A. H., Rios, L. M., Zhang, G., Asgeirsdóttir, H. N., & Stackman, R. W. (2013). The rodent hippocampus is essential for nonspatial object memory. *Current Biology: CB*, *23*(17), 1685–1690. <http://doi.org/10.1016/j.cub.2013.07.002>
- Crystal, J. D. (2009). Elements of episodic-like memory in animal models. *Behavioural Processes*, *80*(3), 269–277. <http://doi.org/10.1016/j.beproc.2008.09.009>
- Crystal, J. D. (2010). Episodic-like memory in animals. *Behavioural Brain Research*, *215*(2), 235–243. <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.03.005>
- De Lima, M. N., Luft, T., Roesler, R., & Schröder, N. (2006). Temporary inactivation reveals an essential role of the dorsal hippocampus in consolidation of object recognition memory. *Neuroscience Letters*, *405*(1–2), 142–146. <http://doi.org/10.1016/j.neulet.2006.06.044>
- De Souza Silva, M. A., Huston, J. P., Wang, A.-L., Petri, D., & Chao, O. Y.-H. (2015). Evidence for a Specific Integrative Mechanism for Episodic Memory Mediated by AMPA/kainate Receptors in a Circuit Involving Medial Prefrontal Cortex and Hippocampal CA3 Region. *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)*. <http://doi.org/10.1093/cercor/bhv112>
- Dere, E., Huston, J. P., & De Souza Silva, M. A. (2005a). Episodic-like memory in mice: simultaneous assessment of object, place and temporal order memory. *Brain Research. Brain Research Protocols*, *16*(1-3), 10–19. <http://doi.org/10.1016/j.brainresprot.2005.08.001>

exposto na sessão de materiais e métodos, a taxa de exploração é uma medida da exploração de um objeto em relação a todos os outros, já o índice de discriminação mede o quanto um animal discriminou um objeto em relação a outro específico e o resultado pode ser comparado ao acaso.

Baseado nos resultados da tarefa de memória similar à episódica presentes na literatura (Kart-Teke et al., 2006; Li & Chao, 2008; Inostroza et al., 2013; Chao et al., 2014; Binder et al., 2015), existem três padrões a serem comparados: o temporal, o espacial e a integração. Estes padrões são deduzidos da exploração dos objetos dispostos na sessão de teste. O padrão temporal acontece quando o objeto antigo não deslocado (A1) é mais explorado do que o objeto recente não deslocado (B1), o padrão espacial quando o objeto recente deslocado (B2) é mais explorado do que o objeto recente não deslocado (B1) e o padrão de integração quando o objeto antigo não deslocado (A1) é mais explorado do que o objeto antigo deslocado (A2).

5.2.1 Taxas de Exploração

O grupo salina apresentou diferenças estatisticamente significativas para os três padrões analisados através de um teste *t* pareado: A1xB1 [$t(10) = 3,725$, $p=0,004$; $d = 1,13$]; B2xB1 [$t(10) = 3,726$, $p = 0,004$; $d = 1,13$] e A1xA2 [$t(10) = 2,551$, $p = 0,029$; $d = 0,78$]. Isto demonstra que os animais conseguiram evocar o episódio avaliado através do padrão para os três aspectos da memória similar à episódica.

No grupo experimental a evocação dos três padrões necessários à avaliação da memória similar à episódica foi danificada e, como pode ser observado, os dados não apresentaram diferenças estatisticamente significativas: A1xB1 [$t(7) = -1,433$, $p= 0,195$; $d = 0,50$]; B2xB1 [$t(7) = -1,401$, $p = 0,204$; $d = 0,49$] e A1xA2 [$t(7) = -1,170$, $p = 0,280$; $d = 0,41$]. A figura 13 ilustra os dados aqui apresentados.

Foi feita uma ANOVA [4x2] de medidas repetidas para comparar os resultados entre as taxas de exploração dos objetos e os grupos, a fim de verificar a possibilidade de uma interação entre “grupo x objeto”. Não foi encontrado efeito principal para os grupos [$F(1,17) = 1,428$, $p = 0,249$; $f = 0,27$] e para os objetos [$F(3,51) = 0,549$, $p = 0,651$, $f = 0,17$], mas foi encontrada uma interação entre ambos [$F(3,51) = 4,943$, $p = 0,004$, $f = 0,53$].

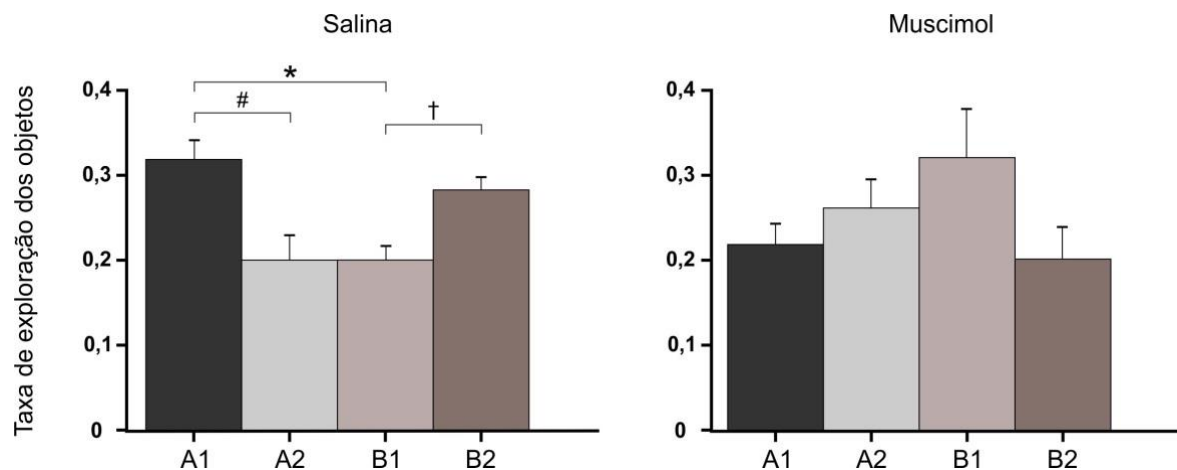


Figura 13. Taxa de exploração dos objetos na sessão de teste para os grupos salina e muscimol. Os gráficos representam a média e o erro padrão. * Comparações significativas entre os pares A1>B1. † Comparações significativas entre os pares B2>B1. # Comparações significativas entre os pares A1>A2.

5.2.2 Índices de discriminação

Para os índices de discriminação comparamos os resultados em relação ao acaso com um teste t de uma amostra. O grupo salina apresentou resultados estatisticamente significativos para os três aspectos: temporal [$t(10) = 3,798$, $p = 0,003$; $dz = 1,17$]; espacial [$t(10) = 3,583$, $p = 0,005$; $dz = 1,08$] e integração [$t(10) = 2,551$, $p = 0,029$; $dz = 0,76$].

Já o grupo experimental não apresentou resultados estatisticamente significativos para os três aspectos: temporal [$t(7) = -1,144$, $p = 0,290$; $dz = 0,40$]; espacial [$t(7) = -1,340$, $p = 0,222$; $dz = 0,47$] e integração [$t(7) = -0,862$, $p = 0,417$; $dz = 0,29$]. O resumo dos dados pode ser visto na figura 14.

Também foram comparados os resultados dos índices e os grupos através de uma ANOVA [3x2] de medidas repetidas. Foi encontrado efeito principal para os grupos [$F(1,17) = 13,047$, $p = 0,002$; $f = 0,86$], mas não para os índices [$F(2,34) = 0,735$, $p = 0,439$, $f = 0,20$], nem para uma interação entre ambos [$F(2,34) = 0,052$, $p = 0,887$, $f = 0,05$].

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Baseados nos resultados apresentados neste trabalho, podemos considerar que ratos wistar machos são capazes de acessar uma memória similar à episódica com caráter temporal. A área hipocampal CA1 dorsal de ratos parece ser importante para a resolução de uma tarefa de memória similar à episódica integrativa, mas isto não pode ser justificado apenas pela função desta área em relação aos aspectos espaciais e temporais da tarefa, já que há relatos na literatura que apontam para um papel desta área no reconhecimento de objetos padrão (“o quê”) dependendo do método utilizado (inativação ou lesão).

Ressaltamos que mais estudos são necessários para verificar a relação entre áreas hipocampais e extrahipocampais em tarefas associativas e não associativas a fim de se entender como se dá o processamento e construção de informações relevantes à memória episódica. Técnicas complementares aos estudos de lesão e inativação, como a imunohistoquímica, eletrofisiologia e optogenética, podem acessar aspectos diferentes do problema e, podem colaborar para o arcabouço teórico acerca do tema.

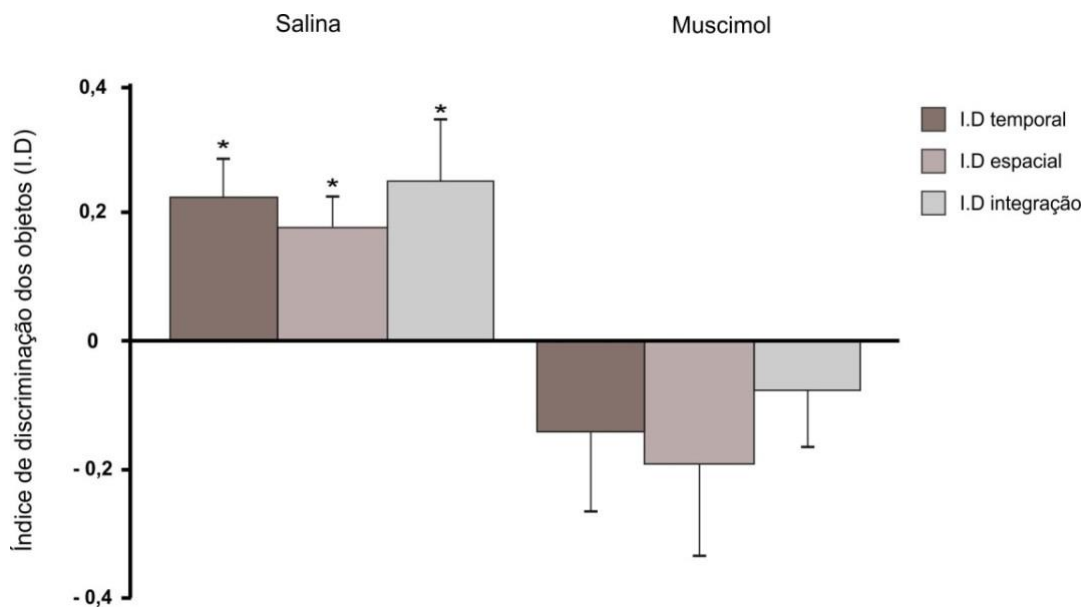


Figura 14. Índice de discriminação dos objetos na sessão de teste para os grupos salina e muscimol. Os gráficos representam a média e o erro padrão. * Comparações significativas para os aspectos temporal, espacial e de integração, considerando-se $p < 0,05$.

5.2.3 Tempo total de exploração

Para ambos os grupos foram analisados os tempos totais de exploração a fim de identificarmos se o resultado do padrão de exploração representado pelas taxas de exploração e índices de discriminação poderia ter sido influenciado pelo tempo total de exploração das sessões de amostra 1, amostra 2 e teste entre os grupos.

Foi feita uma ANOVA [3x2] de medidas repetidas comparando sessões e grupos e não foi identificado efeito principal entre as sessões [$F(2,34) = 0,399$, $p = 0,602$, $f = 0,15$], entre grupos [$F(1,17) = 2,569$, $p = 0,127$, $f = 0,38$] e de interação entre “sessões x grupo” [$F(2,34) = 0,281$, $p = 0,678$, $f = 0,12$]. Os resultados podem ser conferidos na figura 15:

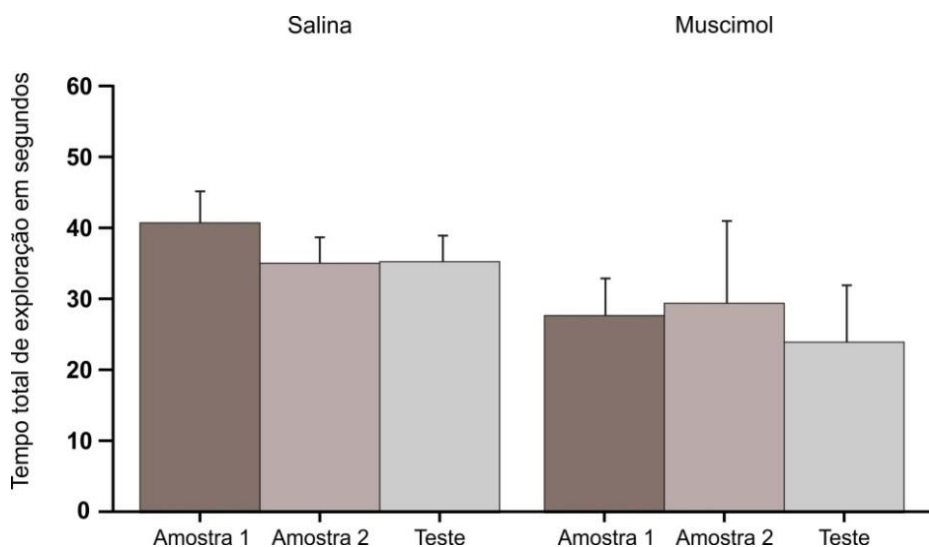


Figura 15. Tempo total de exploração para as sessões de amostra 1, amostra 2 e teste comparado entre os dois grupos. Os gráficos representam a média e o erro padrão.

6. DISCUSSÃO

O presente trabalho procurou identificar o papel da área CA1, através da inativação farmacológica pelo agonista GABA_A muscimol, em uma tarefa de memória similar à episódica integrativa criada por Kart-teke e colaboradores há 10 anos (Kart-teke et al., 2006; Binder et al., 2015). Esta tarefa depende intrinsecamente da exploração de objetos e do reconhecimento da novidade, comportamento inerente a roedores (Ennaceur & Delacour, 1988). Ela foi baseada em três tarefas não associativas focadas nos componentes comportamentais da memória similar à episódica (“o quê”, “onde” e “quando”) (Ennaceur & Delacour, 1988; Ennaceur, Neave & Aggleton, 1997; Mitchell & Laiacina, 1998) e, possibilita a análise de três padrões de exploração: o padrão espacial (associação de “o quê” e “onde”), o temporal (associação de “o quê” e “quando”) e o integrativo (associação de todos os aspectos).

Para a análise comportamental, avaliamos o desempenho dos animais em relação a duas medidas comumente utilizadas na literatura: a taxa de exploração e o índice de discriminação. A primeira torna a comparação dos resultados mais fácil, já que normatiza o tempo de exploração de cada objeto em relação ao tempo total de todos os objetos de uma respectiva sessão (amostra 1, amostra 2 ou teste). A segunda realiza em sua própria fórmula uma comparação entre um objeto e outro e, pode ser utilizada devido à expectativa de um padrão de exploração específico atribuído aos objetos, onde o objeto antigo não deslocado deve ser mais explorado que o recente não deslocado (padrão temporal, $A1 > B1$), o objeto recente deslocado deve ser mais explorado que o recente não deslocado (padrão espacial, $B2 > B1$) e o objeto antigo não deslocado deve ser mais explorado que o objeto antigo deslocado (padrão integrativo, $A1 > A2$).

Os animais do grupo controle conseguiram obter desempenho significativo tanto para a taxa de exploração quanto para o índice de discriminação, analisados respectivamente por um teste *t* pareado (Figura 13) e um teste *t* de uma amostra (Figura 14). Quando comparados ao grupo experimental, em ambas as medidas, através de um MLG de medidas repetidas para “objetos e grupos” (em relação às taxas de exploração) e “índices e grupos” (em relação aos índices de discriminação), os animais do grupo controle também mostraram desempenho estatisticamente significativo e tamanho de efeito relevante. Os animais do grupo experimental, administrados com muscimol vinte minutos antes da amostra 1, não conseguiram realizar nenhum dos padrões esperados para a tarefa e, a análise do tamanho de efeito mostrou um efeito baixo.

“o quê”). Esta situação é discutida em uma revisão recente (Cohen & Stackman Jr, 2015) e se demonstra muito relevante para estudos futuros, já que resultados diferentes podem ser atribuídos a uma mesma característica a ser avaliada, podendo gerar conclusões precipitadas.

Outro ponto importante que a discussão entre lesão e inativação suscita é a função hierárquica entre as áreas hipocampais e extrahipocampais responsáveis por processos de memória (Eichenbaum et al., 2012; Aggleton, 2014). Este modelo hierárquico levanta que o hipocampo processa informações mais complexas, enquanto que os córtices entorrinal, perirrinal e pósrrinal, assim como o córtex pré-frontal medial, processariam informações menos complexas relativas aos aspectos espaciais, temporais e de reconhecimento de objetos (Bussey et al., 1999; Bussey, Muir & Aggleton, 2000; DeVito & Eichenbaum., 2010; Binder et al., 2015 De Souza Silva et al., 2015, Chao et al., 2016).

Estudos com lesão que demonstram que o hipocampo não é necessário para a tarefa não associativa “o quê” corroboram com a possibilidade desta hierarquia, no entanto, estudos de inativação farmacológica também demonstram a importância do hipocampo para a mesma tarefa (De Lima, Luft, Roesler, & Schröder, 2006; Cohen et al., 2013). Esta divergência incita a discussão sobre o tema, o que colabora para de fato procurarmos entender o processamento de informações “o quê”, “onde” e “quando” nas estruturas hipocampais e extrahipocampais. Novas técnicas, como a optogenética, parecem ser promissoras para avaliar estas questões (Cohen & Stackman Jr., 2015)

Estudos têm demonstrado que o hipocampo é essencial para a resolução de tarefas associativas (que dependem da associação entre pelo menos dois aspectos comportamentais da memória similar à episódica) (Barker et al., 2007; DeVito & Eichenbaum, 2010). A área CA3 tem sido apontada como fundamental para processos associativos espaciais (Li & Chao, 2008; DeVito & Eichenbaum, 2010), mas não para processos não associativos relativos aos três aspectos comportamentais (Li & Chao, 2008). CA1 recebe aferências diretas de CA3 e de outras áreas hipocampais e extrahipocampais (Kealy & Commins, 2011; Binder et al., 2015) e, tem sido apontada como fundamental para processos temporais (Hoge & Kesner, 2007; Kesner & Hunsaker, 2010) e espaciais (Lee, Hunsaker & Kesner, 2005; Barbosa et al., 2012).

O córtex pré-frontal medial tem sido demonstrado como importante para o processamento de informações associativas entre “o quê e onde” e “o quê, onde e quando”, mas não para as memórias não associativas (DeVito & Eichenbaum., 2010; Chao et al., 2015) e, junto a CA3 e ao córtex entorrinal lateral, tem sido apontado como essencial para o processamento de informações que associem um objeto a um local (De Souza Silva et al., 2015; Chao et al., 2015)

O córtex perirrinal é apontado como fundamental para o processamento de informações “o quê” (Kealy & Commins., 2011). Recentemente, Chao e colaboradores procuraram avaliar qual a predominância da exploração de um aspecto (“o quê” ou “onde”) sobre o outro, utilizando uma tarefa que acessou simultaneamente a memória para objetos e para localidade. Os autores mostraram que, para intervalos de 05 e 80 minutos após amostra, no teste, os animais exploraram tanto o aspecto “o quê” quanto o “onde”, já para um intervalo de 24h, os ratos preferiram explorar o objeto novo ao invés do objeto deslocado, demonstrando uma memória mais robusta para objetos (Chao, Huston, Nikolaus, & De Souza Silva, 2016).

No mesmo estudo, uma lesão do córtex perirrinal prejudicou apenas a exploração de objetos novos e, uma lesão no hipocampo prejudicou a exploração de objetos deslocados, mas não de novos objetos. Estes resultados corroboram com dados na literatura que mostram que, quando lesionado, o hipocampo não interfere no processamento da memória para reconhecimento de objetos (Ainge et al., 2006; Barker & Warburton, 2011; Chao et al., 2016)

Estudos que foquem na mensuração da presença de genes imediatos podem ajudar a entender o papel de uma área específica em algum processo de memória. Um estudo recente buscou quantificar a expressão dos genes imediatos proto-oncogene da família fos (c-Fos) e *zinc finger protein 225* (Zif-268) em ratos após a realização de uma tarefa de reconhecimento de objetos padrão (“o quê”) e a tarefa de memória similar à episódica integrativa (Barbosa et al., 2013).

Os autores realizaram a contagem da expressão em várias áreas anatômicas e correlacionaram com a exploração dos animais nas respectivas tarefas. Foi vista uma correlação positiva significativa entre a exploração e Zif-268 no córtex perirrinal para a tarefa de reconhecimento de objetos (“o quê”) e de c-Fos no perirrinal para a tarefa de memória similar à episódica. Junto a isto, houve uma correlação positiva significativa entre o giro denteado e o córtex perirrinal na realização da tarefa de memória similar à episódica. Estes resultados apontam para uma relação funcional entre essas áreas, demonstrando que o córtex perirrinal tem expressão nas duas tarefas, e o giro denteado apenas na tarefa de memória similar à episódica, corroborando com o modelo hierárquico hipocampal (Barbosa et al., 2013).

Esta discussão aponta para funções específicas de áreas hipocampais e extrahipocampais em tarefas que envolvam os aspectos “o quê”, “onde” e “quando” de forma associativa ou não associativa. Sob a influência do modelo hierárquico, parece que algumas áreas são responsáveis por processos comportamentais separados (analisando só “o quê”, só “onde” ou só “quando”), enquanto outras por processos comportamentais mais complexos,

que analisam os aspectos da memória similar à episódica de forma integrativa. (Bussey et al., 1999; Bussey, Muir & Aggleton, 2000; DeVito & Eichenbaum., 2010; Binder et al., 2015 De Souza Silva et al., 2015, Chao et al., 2016)

Baseado nisto era de se esperar que a inativação de CA1 prejudicasse os três aspectos da tarefa, já que como dito, ela tem sido apontada como fundamental para processos espaciais e temporais (Lee, Hunsaker & Kesner, 2005; Hoge & Kesner, 2007; Kesner & Hunsaker, 2010; Barbosa et al., 2012) e, também se demonstra fundamental para o reconhecimento de objetos quando inativada através do muscimol (Cohen et al., 2013).

É necessário, contudo, levantar que não há a possibilidade de saber se de fato a inativação de CA1 prejudicou os três aspectos pela relação com a subárea e tarefas de aspectos temporais e espaciais, ou porque os animais não reconheceram os objetos desde o começo das sessões, o que ocasionaria, possivelmente, no mesmo resultado. Mais estudos precisam ser feitos acerca destas diferenças metodológicas, já que, mesmo diferentes, de forma tentadora utilizamos dos seus resultados para comparação.

A tarefa de memória similar à episódica integrativa desenvolvida por Kart-Teke e colaboradores tem limitações claras. A susceptibilidade ao estresse que os animais possuem nesse protocolo desfavorece o planejamento de experimentos que poderiam acessar diferentes aspectos e processos da memória (Binder et al., 2015). Até então, nenhum trabalho que se utilizou da tarefa obteve sucesso com um intervalo entre sessões maior do que uma hora, o que dificulta estudos que foquem no entendimento de processos de aquisição, consolidação e evocação de forma separada, como no caso deste trabalho.

Estudar eletrofisiologia com esta tarefa também não parece ser promissor. O único estudo eletrofisiológico com a tarefa teve uma perda enorme da quantidade de animais que iniciaram o experimento em relação à análise dos dados eletrofisiológicos, extraindo dados de apenas dois animais. (Inostroza et al., 2013). A aquisição de dados eletrofisiológicos é fugaz e, por vezes utiliza tarefas menos complexas, que possam ser repetidas várias vezes, a fim de aumentar a possibilidade de adquirir os dados necessários à análise (Buzsáki, 2006) e, este pode ter sido o motivo da perda de animais do estudo de Inostroza e colaboradores.

Levando em conta estas limitações, a tarefa ainda se mostra como a mais promissora para o estudo da memória similar à episódica com caráter temporal que integre os três aspectos comportamentais “o quê”, “onde” e “quando” e, os resultados aqui presentes podem colaborar com uma crescente literatura que vem sendo construída com a utilização desta tarefa, junto a outras tarefas associativas e não associativas.

8. REFERÊNCIAS

- Aggleton, J. P. (2014). Looking beyond the hippocampus: old and new neurological targets for understanding memory disorders. *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society*, *281*(1786). <http://doi.org/10.1098/rspb.2014.0565>
- Agster, K. L., & Burwell, R. D. (2009). Cortical efferents of the perirhinal, postrhinal, and entorhinal cortices of the rat. *Hippocampus*, *19*(12), 1159–1186. <http://doi.org/10.1002/hipo.20578>
- Agster, K. L., & Burwell, R. D. (2013). Hippocampal and subicular efferents and afferents of the perirhinal, postrhinal, and entorhinal cortices of the rat. *Behavioural Brain Research*, *254*, 50–64. <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.07.005>
- Ainge, J. A., Heron-Maxwell, C., Theofilas, P., Wright, P., de Hoz, L., & Wood, E. R. (2006). The role of the hippocampus in object recognition in rats: examination of the influence of task parameters and lesion size. *Behavioural Brain Research*, *167*(1), 183–195. <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2005.09.005>
- Babb, S. J., & Crystal, J. D. (2006). Episodic-like memory in the rat. *Current Biology: CB*, *16*(13), 1317–1321. <http://doi.org/10.1016/j.cub.2006.05.025>
- Barbosa, F. F., Pontes, I. M. de O., Ribeiro, S., Ribeiro, A. M., & Silva, R. H. (2012). Differential roles of the dorsal hippocampal regions in the acquisition of spatial and temporal aspects of episodic-like memory. *Behavioural Brain Research*, *232*(1), 269–277. <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.04.022>
- Barbosa, F. F., Santos, J. R., Meurer, Y. S. R., Macêdo, P. T., Ferreira, L. M. S., Pontes, I. M. O., ... Silva, R. H. (2013). Differential Cortical c-Fos and Zif-268 Expression after Object and Spatial Memory Processing in a Standard or Episodic-Like Object Recognition Task. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *7*. <http://doi.org/10.3389/fnbeh.2013.00112>
- Barker, G. R. I., & Warburton, E. C. (2011). When is the hippocampus involved in recognition memory? *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *31*(29), 10721–10731. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6413-10.2011>
- Binder, S., Dere, E., & Zlomuzica, A. (2015). A critical appraisal of the what-where-when episodic-like memory test in rodents: Achievements, caveats and future directions. *Progress in Neurobiology*, *130*, 71–85. <http://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2015.04.002>

- Bliss, T. V., & Lomo, T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *The Journal of Physiology*, *232*(2), 331–356.
- Bourtchouladze, R., Abel, T., Berman, N., Gordon, R., Lapidus, K., & Kandel, E. R. (1998). Different training procedures recruit either one or two critical periods for contextual memory consolidation, each of which requires protein synthesis and PKA. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, *5*(4-5), 365–374.
- Bourtchouladze, R., Abel, T., Berman, N., Gordon, R., Lapidus, K., & Kandel, E. R. (1998).
- Burgess, N., Maguire, E. A., & O'Keefe, J. (2002). The human hippocampus and spatial and episodic memory. *Neuron*, *35*(4), 625–641.
- Bussey, T. J., Duck, J., Muir, J. L., & Aggleton, J. P. (2000). Distinct patterns of behavioural impairments resulting from fornix transection or neurotoxic lesions of the perirhinal and postrhinal cortices in the rat. *Behavioural Brain Research*, *111*(1-2), 187–202.
- Bussey, T. J., Muir, J. L., & Aggleton, J. P. (1999). Functionally dissociating aspects of event memory: the effects of combined perirhinal and postrhinal cortex lesions on object and place memory in the rat. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *19*(1), 495–502.
- Buzsáki, G. (2006) *Rhythms of The Brain*. Oxford University Press, New York.
- Cammarota, M., Bevilaqua, L. R. M., Medina, J. H., & Izquierdo, I. (2004). Retrieval does not induce reconsolidation of inhibitory avoidance memory. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, *11*(5), 572–578. <http://doi.org/10.1101/lm.76804>
- Chao, O. Y., Nikolaus, S., Huston, J. P., & de Souza Silva, M. A. (2014). The neurokinin-3 receptor agonist senktide facilitates the integration of memories for object, place and temporal order into episodic memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, *114*, 178–185. <http://doi.org/10.1016/j.nlm.2014.06.009>
- Chao, O. Y., Huston, J. P., Li, J.-S., Wang, A.-L., & de Souza Silva, M. A. (2015). The medial prefrontal cortex-lateral entorhinal cortex circuit is essential for episodic-like memory and associative object-recognition. *Hippocampus*. <http://doi.org/10.1002/hipo.22547>
- 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. <http://doi.org/10.1016/j.nlm.2016.02.007>

- Dere, E., Huston, J. P., & De Souza Silva, M. A. (2005b). Integrated memory for objects, places, and temporal order: evidence for episodic-like memory in mice. *Neurobiology of Learning and Memory*, *84*(3), 214–221. <http://doi.org/10.1016/j.nlm.2005.07.002>
- Dere, E., Kart-Teke, E., Huston, J. P., & De Souza Silva, M. A. (2006). The case for episodic memory in animals. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *30*(8), 1206–1224. <http://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2006.09.005>
- DeVito, L. M., & Eichenbaum, H. (2010). Distinct contributions of the hippocampus and medial prefrontal cortex to the “what-where-when” components of episodic-like memory in mice. *Behavioural Brain Research*, *215*(2), 318–325. <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.09.014>
- Eacott, M. J., & Norman, G. (2004). Integrated memory for object, place, and context in rats: a possible model of episodic-like memory? *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *24*(8), 1948–1953. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2975-03.2004>
- Eacott, M. J., Easton, A., & Zinkivskay, A. (2005). Recollection in an episodic-like memory task in the rat. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, *12*(3), 221–223. <http://doi.org/10.1101/lm.92505>
- Easton, A., & Eacott, M. J. (2010). Recollection of episodic memory within the medial temporal lobe: behavioural dissociations from other types of memory. *Behavioural Brain Research*, *215*(2), 310–317. <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.10.019>
- Edeline, J.-M., Hars, B., Hennevin, E., & Cotillon, N. (2002). Muscimol diffusion after intracerebral microinjections: a reevaluation based on electrophysiological and autoradiographic quantifications. *Neurobiology of Learning and Memory*, *78*(1), 100–124. <http://doi.org/10.1006/nlme.2001.4035>
- Eichenbaum, H. (2000). A cortical-hippocampal system for declarative memory. *Nature Reviews. Neuroscience*, *1*(1), 41–50. <http://doi.org/10.1038/35036213>
- Eichenbaum, H. (2004). Hippocampus: cognitive processes and neural representations that underlie declarative memory. *Neuron*, *44*(1), 109–120. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.08.028>
- Eichenbaum, H., & Lipton, P. A. (2008). Towards a functional organization of the medial temporal lobe memory system: role of the parahippocampal and medial entorhinal cortical areas. *Hippocampus*, *18*(12), 1314–1324. <http://doi.org/10.1002/hipo.20500>
- Eichenbaum, H., Sauvage, M., Fortin, N., Komorowski, R., & Lipton, P. (2012). Towards a functional organization of episodic memory in the medial temporal lobe.

- Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 36(7), 1597–1608.
<http://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2011.07.006>
- Ennaceur, A., & Delacour, J. (1988). A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behavioural Brain Research*, 31(1), 47–59.
- 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. *Experimental Brain Research*, 113(3), 509–519.
- Faul, F., Erdfelder, E., Buchner, A., & Lang, A.-G. (2009). Statistical power analyses using G*Power 3.1: tests for correlation and regression analyses. *Behavior Research Methods*, 41(4), 1149–1160. <http://doi.org/10.3758/BRM.41.4.1149>
- Ferbinteanu, J., Kennedy, P. J., & Shapiro, M. L. (2006). Episodic memory--from brain to mind. *Hippocampus*, 16(9), 691–703. <http://doi.org/10.1002/hipo.20204>
- Forwood, S. E., Winters, B. D., & Bussey, T. J. (2005). Hippocampal lesions that abolish spatial maze performance spare object recognition memory at delays of up to 48 hours. *Hippocampus*, 15(3), 347–355. <http://doi.org/10.1002/hipo.20059>
- Good, M. A., Barnes, P., Staal, V., McGregor, A., & Honey, R. C. (2007). Context- but not familiarity-dependent forms of object recognition are impaired following excitotoxic hippocampal lesions in rats. *Behavioral Neuroscience*, 121(1), 218–223. <http://doi.org/10.1037/0735-7044.121.1.218>
- Hitti, F. L., & Siegelbaum, S. A. (2014). The hippocampal CA2 region is essential for social memory. *Nature*, 508(7494), 88–92. <http://doi.org/10.1038/nature13028>
- Hoge, J., & Kesner, R. P. (2007). Role of CA3 and CA1 subregions of the dorsal hippocampus on temporal processing of objects. *Neurobiology of Learning and Memory*, 88(2), 225–231. <http://doi.org/10.1016/j.nlm.2007.04.013>
- Hunsaker, M. R., Chen, V., Tran, G. T., & Kesner, R. P. (2013). The medial and lateral entorhinal cortex both contribute to contextual and item recognition memory: a test of the binding of items and context model. *Hippocampus*, 23(5), 380–391. <http://doi.org/10.1002/hipo.22097>
- Inostroza, M., Brotons-Mas, J. R., Laurent, F., Cid, E., & de la Prida, L. M. (2013). Specific impairment of “what-where-when” episodic-like memory in experimental models of temporal lobe epilepsy. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 33(45), 17749–17762. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0957-13.2013>
- Izquierdo, I. (2011). *Memória*. Porto Alegre, Brasil: Artmed.

- Jo, Y. S., & Lee, I. (2010). Disconnection of the hippocampal-perirhinal cortical circuits severely disrupts object-place paired associative memory. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *30*(29), 9850–9858. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1580-10.2010>
- Kandel, E. R. (2006) In search of memory: the emergence of a new science of mind. W.W. Norton Company, New York.
- Kart-Teke, E., De Souza Silva, M. A., Huston, J. P., & Dere, E. (2006). Wistar rats show episodic-like memory for unique experiences. *Neurobiology of Learning and Memory*, *85*(2), 173–182. <http://doi.org/10.1016/j.nlm.2005.10.002>
- Kart-Teke, E., Dere, E., Brandão, M. L., Huston, J. P., & De Souza Silva, M. A. (2007). Reinstatement of episodic-like memory in rats by neurokinin-1 receptor antagonism. *Neurobiology of Learning and Memory*, *87*(3), 324–331. <http://doi.org/10.1016/j.nlm.2006.09.007>
- Kay, K., Sosa, M., Chung, J. E., Karlsson, M. P., Larkin, M. C., & Frank, L. M. (2016). A hippocampal network for spatial coding during immobility and sleep. *Nature*, *531*(7593), 185–190. <http://doi.org/10.1038/nature17144>
- Kealy, J., & Commins, S. (2011). The rat perirhinal cortex: A review of anatomy, physiology, plasticity, and function. *Progress in Neurobiology*, *93*(4), 522–548. <http://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2011.03.002>
- Kesner, R. P., & Hunsaker, M. R. (2010). The temporal attributes of episodic memory. *Behavioural Brain Research*, *215*(2), 299–309. <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.12.029>
- Kesner, R. P., & Rolls, E. T. (2015). A computational theory of hippocampal function, and tests of the theory: new developments. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *48*, 92–147. <http://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.11.009>
- Lakens, D. (2013). Calculating and reporting effect sizes to facilitate cumulative science: a practical primer for t-tests and ANOVAs. *Frontiers in Psychology*, *4*, 863. <http://doi.org/10.3389/fpsyg.2013.00863>
- Langston, R. F., & Wood, E. R. (2010). Associative recognition and the hippocampus: differential effects of hippocampal lesions on object-place, object-context and object-place-context memory. *Hippocampus*, *20*(10), 1139–1153. <http://doi.org/10.1002/hipo.20714>
- Leão, A. H. F. F., Medeiros, A. M., Apolinário, G. K. S., Cabral, A., Ribeiro, A. M., Barbosa, F. F., & Silva, R. H. (2016). Hippocampal-dependent memory in the plus-maze

- discriminative avoidance task: The role of spatial cues and CA1 activity. *Behavioural Brain Research*, 304, 24–33. <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.02.012>
- Lee, I., Hunsaker, M. R., & Kesner, R. P. (2005). The role of hippocampal subregions in detecting spatial novelty. *Behavioral Neuroscience*, 119(1), 145–153. <http://doi.org/10.1037/0735-7044.119.1.145>
- Lee, J. L. C., Everitt, B. J., & Thomas, K. L. (2004). Independent cellular processes for hippocampal memory consolidation and reconsolidation. *Science (New York, N.Y.)*, 304(5672), 839–843. <http://doi.org/10.1126/science.1095760>
- Leutgeb, J. K., Leutgeb, S., Moser, M.-B., & Moser, E. I. (2007). Pattern separation in the dentate gyrus and CA3 of the hippocampus. *Science (New York, N.Y.)*, 315(5814), 961–966. <http://doi.org/10.1126/science.1135801>
- Leutgeb, S., & Leutgeb, J. K. (2007). Pattern separation, pattern completion, and new neuronal codes within a continuous CA3 map. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 14(11), 745–757. <http://doi.org/10.1101/lm.703907>
- Li, J.-S., & Chao, Y.-S. (2008). Electrolytic lesions of dorsal CA3 impair episodic-like memory in rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, 89(2), 192–198. <http://doi.org/10.1016/j.nlm.2007.06.006>
- McGaugh, J. L. (2000). Memory--a century of consolidation. *Science (New York, N.Y.)*, 287(5451), 248–251.
- McHugh, S. B., Niewoehner, B., Rawlins, J. N. P., & Bannerman, D. M. (2008). Dorsal hippocampal N-methyl-D-aspartate receptors underlie spatial working memory performance during non-matching to place testing on the T-maze. *Behavioural Brain Research*, 186(1), 41–47. <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2007.07.021>
- Mitchell, J. B., & Laiacona, J. (1998). The medial frontal cortex and temporal memory: tests using spontaneous exploratory behaviour in the rat. *Behavioural Brain Research*, 97(1-2), 107–113.
- Morrissey, M. D., & Takehara-Nishiuchi, K. (2014). Diversity of mnemonic function within the entorhinal cortex: a meta-analysis of rodent behavioral studies. *Neurobiology of Learning and Memory*, 115, 95–107. <http://doi.org/10.1016/j.nlm.2014.08.006>
- Moser, E. I., Kropff, E., & Moser, M.-B. (2008). Place cells, grid cells, and the brain's spatial representation system. *Annual Review of Neuroscience*, 31, 69–89. <http://doi.org/10.1146/annurev.neuro.31.061307.090723>
- Mumby D. G., Gaskin S., Glenn M. J., Schramek T. E., Lehmann H. (2002). *Hippocampal damage and exploratory preferences in rats: Memory for objects, places and contexts*. *Learn Mem* 9, 49 –57.

- Nader, K., Schafe, G. E., & Le Doux, J. E. (2000). Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature*, *406*(6797), 722–726. <http://doi.org/10.1038/35021052>
- Norman, G., & Eacott, M. J. (2004). Impaired object recognition with increasing levels of feature ambiguity in rats with perirhinal cortex lesions. *Behavioural Brain Research*, *148*(1-2), 79–91.
- O’Keefe, J., & Dostrovsky, J. (1971). The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Research*, *34*(1), 171–175.
- O’Keefe, J., & Recce, M. L. (1993). Phase relationship between hippocampal place units and the EEG theta rhythm. *Hippocampus*, *3*(3), 317–330. <http://doi.org/10.1002/hipo.450030307>
- O’Reilly, R. C., & Norman, K. A. (2002). Hippocampal and neocortical contributions to memory: advances in the complementary learning systems framework. *Trends in Cognitive Sciences*, *6*(12), 505–510.
- O’Reilly, R. C., & Rudy, J. W. (2001). Conjunctive representations in learning and memory: principles of cortical and hippocampal function. *Psychological Review*, *108*(2), 311–345.
- Paxinos G., Watson C. (2009) The rat brain in stereotaxic coordinates. 6th ed. Elsevier.
- Piskorowski, R. A., Nasrallah, K., Diamantopoulou, A., Mukai, J., Hassan, S. I., Siegelbaum, S. A., ... Chevaleyre, V. (2016). Age-Dependent Specific Changes in Area CA2 of the Hippocampus and Social Memory Deficit in a Mouse Model of the 22q11.2 Deletion Syndrome. *Neuron*, *89*(1), 163–176. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.11.036>
- Quevedo, J., Vianna, M. R., Roesler, R., de-Paris, F., Izquierdo, I., & Rose, S. P. (1999). Two time windows of anisomycin-induced amnesia for inhibitory avoidance training in rats: protection from amnesia by pretraining but not pre-exposure to the task apparatus. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, *6*(6), 600–607.
- Ramos, J. M. J. (2002). The perirhinal cortex and long-term spatial memory in rats. *Brain Research*, *947*(2), 294–298.
- Rolls, E. T. (2013). The mechanisms for pattern completion and pattern separation in the hippocampus. *Frontiers in Systems Neuroscience*, *7*, 74. <http://doi.org/10.3389/fnsys.2013.00074>
- Smith, A. S., Williams Avram, S. K., Cymerblit-Sabba, A., Song, J., & Young, W. S. (2016). Targeted activation of the hippocampal CA2 area strongly enhances social memory. *Molecular Psychiatry*. <http://doi.org/10.1038/mp.2015.189>

- Souza, I. B. M. B. (2015). Prejuízo de memória do tipo episódica induzido pela Cetamina: diferenças funcionais na expressão de c-Fos em sub-regiões do hipocampo. Dissertação de mestrado, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brasil.
- Squire, L. R. (1992). Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychological Review*, 99(2), 195–231.
- Squire, L. R., & Zola-Morgan, J. T. (1991). The cognitive neuroscience of human memory since H.M. *Annual Review of Neuroscience*, 34, 259–288. <http://doi.org/10.1146/annurev-neuro-061010-113720>
- Squire, L. R., & Zola, S. M. (1996). Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(24), 13515–13522.
- Stevenson, E. L., & Caldwell, H. K. (2014). Lesions to the CA2 region of the hippocampus impair social memory in mice. *The European Journal of Neuroscience*, 40(9), 3294–3301. <http://doi.org/10.1111/ejn.12689>
- Tulving, E. (1972). Episodic and semantic memory. Em: Tulving, E.; Donaldson, W.; editors. *Organization of memory*. New York: Academic Press.
- Tulving, E. (1983). *Elements of episodic memory*. Oxford, Clarendon press.
- Tulving, E. (1985a). How many memory systems are there? *Am. Psychologist*, 40 (4), 385–398.
- Tulving, E. (1985b). Memory and consciousness. *Can. Psychol.*, 26 (1), 1-12.
- Tulving, E. (1986). What kind of a hypothesis is the distinction between episodic and semantic memory? *J. Exp. Psychol.*, 12 (2), 307-311.
- Tulving, E. (1999). Study of memory: processes and systems. Em: Foster, J.K. e Jelic, M. (Eds.). *Memory: systems, process, or function?* (pp. 11-30). Cambridge, MA/London: Oxford University Press.
- Tulving, E. (2001). Episodic memory and common sense: how far apart? *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 356(1413), 1505–1515. <http://doi.org/10.1098/rstb.2001.0937>
- Tulving, E. (2002). Episodic memory: from mind to brain. *Annual Review of Psychology*, 53, 1–25. <http://doi.org/10.1146/annurev.psych.53.100901.135114>
- Wilson, D. I. G., Langston, R. F., Schlesiger, M. I., Wagner, M., Watanabe, S., & Ainge, J. A. (2013). Lateral entorhinal cortex is critical for novel object-context recognition. *Hippocampus*, 23(5), 352–366. <http://doi.org/10.1002/hipo.22095>

- Wilson, D. I. G., Watanabe, S., Milner, H., & Ainge, J. A. (2013). Lateral entorhinal cortex is necessary for associative but not nonassociative recognition memory. *Hippocampus*, 23(12), 1280–1290. <http://doi.org/10.1002/hipo.22165>
- Winters, B. D., Forwood, S. E., Cowell, R. A., Saksida, L. M., & Bussey, T. J. (2004). Double dissociation between the effects of peri-postrhinal cortex and hippocampal lesions on tests of object recognition and spatial memory: heterogeneity of function within the temporal lobe. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 24(26), 5901–5908. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1346-04.2004>
- Witter, M. P., Naber, P. A., van Haften, T., Machielsen, W. C., Rombouts, S. A., Barkhof, F., ... Lopes da Silva, F. H. (2000). Cortico-hippocampal communication by way of parallel parahippocampal-subicular pathways. *Hippocampus*, 10(4), 398–410. [http://doi.org/10.1002/1098-1063\(2000\)10:4<398::AID-HIPO6>3.0.CO;2-K](http://doi.org/10.1002/1098-1063(2000)10:4<398::AID-HIPO6>3.0.CO;2-K)

Anexo A



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)



CERTIDÃO

João Pessoa, 06 de agosto de 2015.
CEUA nº 050/2015.

Ilmo(a): **Prof. Dr. Flávio Freitas Barbosa**
Departamento de Psicologia – CCHLA – UFPB

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba em sua reunião ordinária de **03/08/2015** analisou e **APROVOU** a execução do projeto **ANÁLISE DO PAPEL DA ÁREA HIPOCAMPAL CA1 NA MEMÓRIA SIMILAR À EPISÓDICA.**

Com previsão de empregar **30 ratos Wistar;**
Animais do **Biotério Prof. Thomas George;**
Para serem utilizados no período de **06/08/2015 a 06/08/2016.**

Atenciosamente,

Islania Giselia Albuquerque Gonçalves

Profa. Dra. Islania Giselia Albuquerque Gonçalves
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais da UFPB

Profª. Drª. Islania G. A. Gonçalves
Coordenadora CEUA/UFPB
SIAPE 3366301

Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA
Universidade Federal da Paraíba
www.ufpb.br/ceua/ - ceua@ufpb.br

Anexo B

Artigo a ser submetido na forma de *short communication* à revista *Behavioural Brain Research*.

Qualis: A1

Fator de Impacto: 3.028

Title: Episodic-like memory impairment after CA1 inactivation

Authors: Davi Drieskens Carvalho de Castro Sá Barreto, Lívia Rodrigues Neves, Ingrid Brasilino Montenegro Bento de Souza, Mirian Graciela da Silva Stiebbe Salvadori, Alessandra Mussi Ribeiro, Regina Helena da Silva, Flávio Freitas Barbosa

Abstract

Episodic memory in its definition is intrinsic to humans, but studies have shown that rats recollect an episodic-like memory based on three behavioural aspects (*e.g.*, what, where and when). Here we addressed the role of the dorsal hippocampal subfield CA1 in an integrative what-where-when task by bilaterally inactivating the area by using the GABA_A agonist muscimol. The saline group showed normal recollection for the three aspects of episodic-like memory, while treated animals presented a profound memory impairment. Also, the time of exploration did not differ among groups, which indicates that treated animals were still fully motivated to explore the objects. This result suggests that the changes in exploration ratios cannot account for impaired memory performance. Altogether, our data provides evidence that CA1 plays an essential role in all episodic-like memory components.

Short Communication

Human episodic memory refers to the recollection of a particular event regarding spatial and temporal contents (Tulving, 2002). In rats, it has been referred as an integrated memory for objects (what), places (where) and temporal order (when) (Kart-Teke et al., 2006; Binder et al., 2015). It has been shown that the hippocampus and other areas, such as the entorhinal, perirhinal, postrhinal and medial prefrontal cortices, are essential for episodic memory processing (Aggleton, 2014; Kesner & Rolls, 2015).

Studies have shown that the hippocampal subfield CA1 processes temporal and spatial aspects of different memory tasks (Lee, Hunsaker & Kesner, 2005; Hoge & Kesner, 2007; Binder et al., 2015). As said, rats do have an integrated episodic-like memory (considering a what-where-when task) (Kart-teke et al., 2006). Through the last 10 years, some studies has shown the involvement of the medial prefrontal cortex (mPFC), perirhinal cortex (PRH) and

CA3 in the task (Li & Chao, 2008; DeVito & Eichenbaum, 2010; Barbosa et al., 2013; De Souza Silva et al., 2015), but no study focused on the role of CA1 and, here we address this gap.

Twenty four naïve male *Wistar* rats (Thomas George, Brazil), aged from 3 to 4 months and weighting between 270-360g were used as subjects in the experiment. They were housed in groups of 4 or 5 per cage in a room with controlled temperature ($24 \pm 1^\circ\text{C}$) and kept on a 12-h light-dark cycle (lights on at 6:30 am, off at 6:30 pm) with testing carried out during the light phase. Water and food was available *ad libitum* throughout the study. Animals were handled according to the Brazilian law for the use of animals in scientific research (Law Number 11.794) and all procedures were approved by the local ethics committee (protocol number 050/2015). All efforts were made to minimize animal pain, suffering, or discomfort as well as the number of rats used in all experiments.

Animals were anaesthetised with intraperitoneal ketamine (100mg/kg) and xylazine (50mg/kg). Next, they were positioned in a stereotaxic apparatus (Insight, Brazil) and the skull was exposed. Stainless guide cannulae (22 gauge, 12mm) were implanted bilaterally in the dorsal hippocampus subregion CA1. The stereotaxic coordinates from bregma for guide cannula placement in the dorsal CA1 were anterior-posterior (AP) = -3.4mm, medial-lateral (ML) = $\pm 2.0\text{mm}$ and dorsal-ventral (DV) = -2.0mm. The guide cannula tips were placed 1mm above the injection site to minimize damage to the area of interest. The guide cannulae were anchored to the skull with a stainless steel wire to protect it from obstruction. After surgery, animals received anti-inflammatory (diclofenac sodium 75 mg/ml, i.m.) and antibiotic (penicillin 60.000 UI/ml, i.m) treatments. Animals were given 2 days of recovery before the handling procedures, totalizing 07 days of recovery at the end of the handling.

Behavioural tests were carried in a sound-attenuated room with controlled light intensity (10 lux) at the center of the apparatus. A transparent circular acrylic open field (60 x 45 cm) was used to access object exploration. Distant cues were placed in the room and proximal cues were placed in the open-field to facilitate self-location in the apparatus. The episodic-like memory paradigm accesses an integrated memory for places, objects and temporal order, though is dependent on spontaneous object exploration. Five sets of objects in quadruplicate were used randomly through experiments. Objects were made of plastic and differed in height (5-10cm), width (5-10cm), colour, texture and shape. All objects were filled with plaster to ensure that the animals would not displace them. The apparatus and objects were cleaned with a 5% alcohol solution after each session and all sessions were recorded by a digital camera placed 2m above the apparatus.

The experimental procedures were similar as described earlier (Barbosa et al., 2013) and were completed in 9 days. All animals were handled for 20 minutes/day for 5 days. After handling animals passed by 3 days of habituation to the open-field without any objects. A day after the habituation procedures animals did the task. The episodic-like memory task consisted of two sample trials and one test trial of five minutes each. The delay between each trial was 60 minutes. The circular open field was virtually divided into eight equal areas and objects were placed in these locations (figure 1). In the first sample trial animals were allowed to explore four identical objects randomly located in four different places out of eight. In the second sample trial, four novel identical objects were placed in the arena. Whereas two of them were placed in two of four possible locations that were previously occupied, the other two were placed in two of four locations that were not occupied before. In the test trial there were two copies of objects from the first trial (old familiar objects, represented by A) and two copies from the second trial (recent familiar objects, represented by B), where one of each set of objects were stationary (objects represented by A1 and B1) and another displaced (objects represented by A2 and B2), relative to the initial position. An example of object placement in this task is provided in Figure 1.

In this task, rats tend to explore the object A1 more than B1, object B2 more than B1 and object A1 more than A2, respectively reflecting memory for temporal order, place and an integration of episodic-like memory components (Kart-teke et al., 2006; Inostroza et al., 2013; Chao et al., 2014). This inversed exploration pattern of the old familiar objects indicates an interaction between the location (“where” component) and the temporal order (“when” component) that they were presented, providing evidence that rats show an integrated memory for “what-where-when” components of episodic-like memory (Kart-teke et al., 2006, Barbosa et al., 2013; Chao et al., 2014).

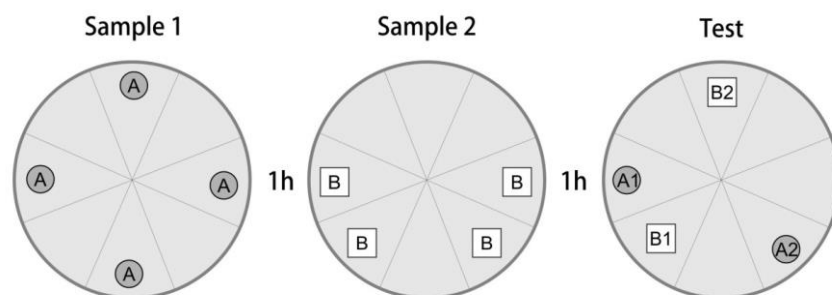


Fig. 1. Scheme of the open-field and object placement (one example). Rats spent 5 minutes in each trial and the time interval between trials was of 1 hour. In the test trial, two objects from sample 1 and two objects from sample two were placed in the arena, either being stationary or displaced relative to its initial position. A1: old familiar stationary; A2: old familiar displaced; B1: recent familiar stationary; B2: recent familiar displaced. The pattern of

exploration expected is of A1>B1 (temporal pattern); B2>B1 (spatial pattern) and A1>A2 (integrative pattern)

To identify the role of CA1 during the execution of the episodic-like memory task we inactivated it using the selective GABA_A agonist muscimol (Sigma, USA). Muscimol was used because it doesn't cause a permanent damage to neural tissue, as lesion methods, as it only has a local inhibitory effect (Edeline, Hars, Hennevin & Cotillon, 2002; Leão et al., 2016).

Muscimol (Sigma, USA) was administered intra-hippocampal bilaterally (0.2 µl per side) at the dose of 0.2 µg. The same volume of saline solution (0.9% NaCl) was given to the control group. The infusion was performed via a microsyringe pump (Insight, Brazil) using 10µg Hamilton syringes connected to a polyethylene tube. Following the infusions, injection needles were left for 30 seconds in the guide cannulae, allowing a complete diffusion of the drug from the needle tip. After the injection, rats went back to their home cages for 20 minutes before the first sample trial of the task. The dose and volume were chosen based on previous studies investigating the central effect of muscimol infusions (Edeline, Hars, Hennevin & Cotillon, 2002; Leão et al., 2016).

After the experiment rats were deeply anaesthetized with 1 ml of sodium thiopental (25 mg/ml) and perfused intracardially with 0.2N phosphate buffered solution followed by a 10% paraformaldehyde solution. The brains were infused with methylene blue at 0.2 µg, removed and stored in 10% paraformaldehyde associated with 30% sucrose at 4°C for 72 h before being frozen and sectioned into 50 µm slices using a cryostat (Leica, Germany). The sections were mounted onto glass slides and Nissl stained with cresyl violet. The slides were examined under the microscope to verify of the exact placement of the cannulae and the infusion needle tip. Only data from animals with correct cannulae placement were computed for statistical analysis. A scheme and a picture of the cannulae placement is shown in figure 2.

All sessions were filmed and analysed manually by a researcher after the experiments with a tracking software (Ethowatcher, Brazil). Object exploration was considered as animals made physical contact with an object with snout, vibrissae or forepaws. Other behaviours, such as contacting the object, while visually exploring the environment, and standing close to the object without exploring it, were not considered.

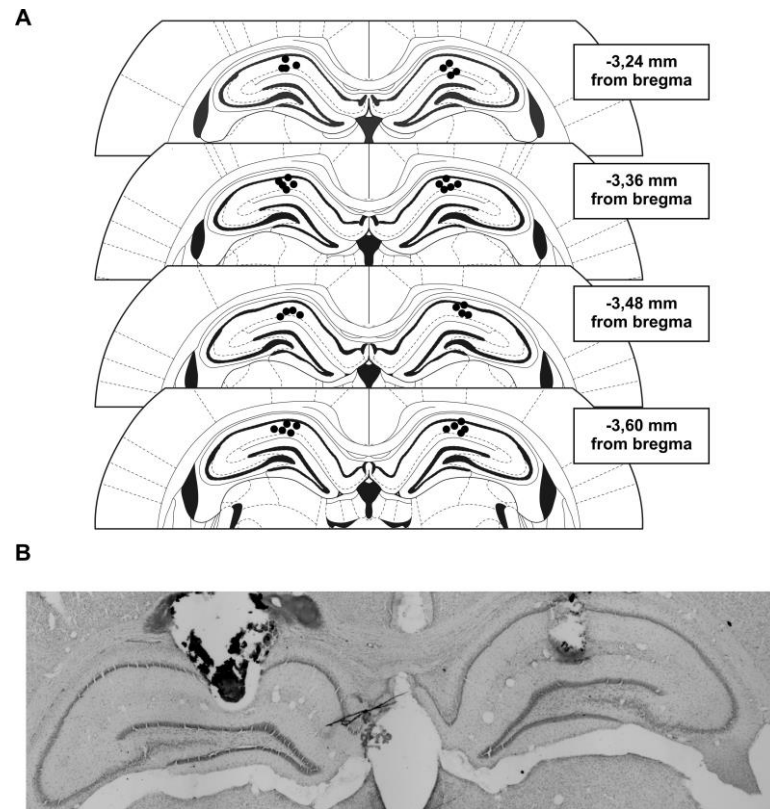


Fig.2. Schemes and a picture of the cannulae placement and niddle tips. (A) schematic of the cannulae placement ranging from -3.24 to -3.60 from bregma. Injection sites might not correspond to correct number of animal described due to overlapping points. (B) Cresyl violet stained representation of the methylene blue infusion.

We calculated an exploration ratio for each object and a discrimination index for each expected pattern of exploration (DeVito & Eichenbaum, 2010; Inostroza et al., 2013). The exploration ratio is a measure of how much an object was explored regarding the exploration of all objects, and the output shows a value between 0 and 1, while the discrimination index is given by how much an object is discriminated relative to another object, and the output ranges from -1 to 1. Since in this task we have an expectation of exploration of objects $A1 > B1$ (old stationary > recent stationary), $B2 > B1$ (recent displaced > recent stationary) and $A1 > A2$ (old stationary > old displaced), we calculated three indexes:

$$\text{Temporal Index} = (\text{time exploring } A1 - \text{time exploring } B1) / (\text{time exploring } A1 + \text{time exploring } B1);$$

$$\text{Spatial Index} = (\text{time exploring } B2 - \text{time exploring } B1) / (\text{time exploring } B2 + \text{time exploring } B1);$$

$$\text{Integration Index} = (\text{time exploring } A1 - \text{time exploring } A2) / (\text{time exploring } A1 + \text{time exploring } A2).$$

All data were tested for normality using Shapiro-Wilk's test, and for homogeneity using Levene's test. Parametric tests were used as data showed a normal distribution, and

correspondent *F* and *t* values were adopted according to the homogeneity of variance. A general linear model (GLM) with repeated measures was applied to assess total time of exploration, exploration ratios and discrimination indexes in each group. Also, paired sample *t*-tests and one sample *t*-tests were done respectively for exploration ratios and discrimination indexes. Two-tailed statistical comparisons were applied and the significant level was set as $p < 0.05$. We also calculated the size effect for each *t*-test and the GLM using G*Power 3 (Faul, Erdfelder, Buchner, & Lang, 2009).

Analyzing exploration ratios, paired *t*-tests revealed significant effects for the saline group in all analyzed patterns in the test trial: A1xB1 [$t(10) = 3,725, p=0,004; d = 1,13$]; B2xB1 [$t(10) = 3,726, p = 0,004; d = 1,13$] and A1xA2 [$t(10) = 2,551, p = 0,029; d = 0,78$]. This provides evidence that animals showed a memory for “what,” “where,” and “when”, i.e., episodic-like memory (ELM). In the experimental group, animals didn't showed an episodic-like memory: A1xB1 [$t(7) = -1,433, p = 0,195; d = 0,50$]; B2xB1 [$t(7) = -1,401, p = 0,204; d = 0,49$] and A1xA2 [$t(7) = -1,170, p = 0,280; d = 0,41$] (Figure 3A).

The repeated measures GLM with the within factor “objects” and the between factor “groups” showed a significant effect for the interaction “groups x objects” [$F(3,51) = 4,943, p = 0,004, f = 0,53$], but not for “groups” [$F(1,17) = 1,428, p = 0,249; f = 0,27$] or “objects” [$F(3,51) = 0,549, p = 0,651, f = 0,17$].

Regarding discrimination indexes, one-sample *t*-tests showed significant effects for the saline group in all indexes available in the test trial: temporal index [$t(10) = 3,798, p = 0,003; dz = 1,17$]; spatial index [$t(10) = 3,583, p = 0,005; dz = 1,08$] and integration index [$t(10) = 2,551, p = 0,029; dz = 0,76$], showing again, that animals evoked an episodic-like memory. This didn't happened to the muscimol group: temporal index [$t(7) = -1,144, p = 0,290; dz = 0,40$]; spatial index [$t(7) = -1,340, p = 0,222; dz = 0,47$] and integration index [$t(7) = -0,862, p = 0,417; dz = 0,29$] (Figure 3B)

Another repeated measures GLM with the within factor “indexes” and the between factor “groups” was done. We found an effect for “groups” [$F(1,17) = 13,047, p = 0,002; f = 0,86$], but not for “indexes” [$F(2,34) = 0,735, p = 0,439, f = 0,20$] or the interaction “groups x indexes” [$F(2,34) = 0,052, p = 0,887, f = 0,05$].

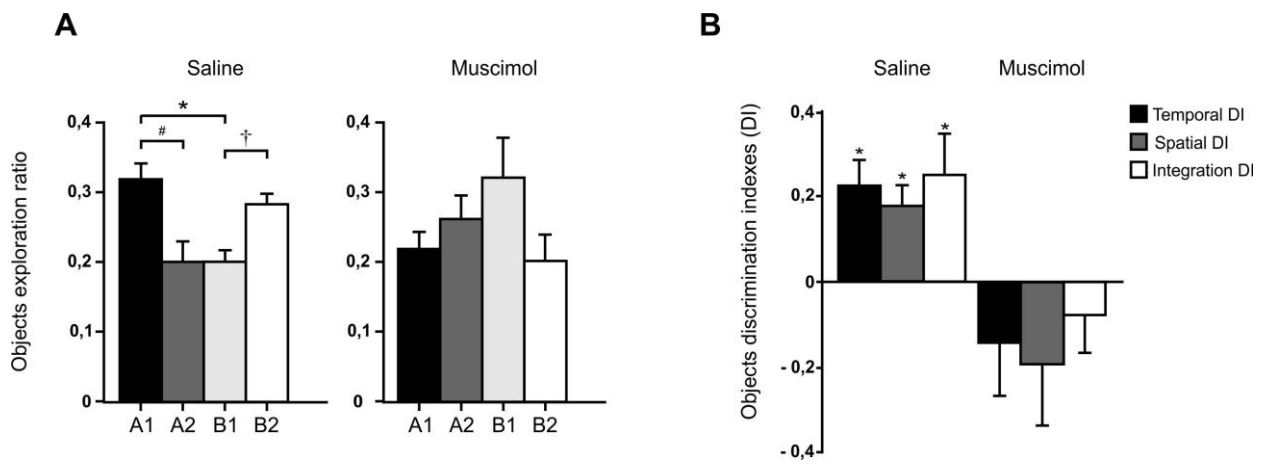


Fig.3. The effects of muscimol administration before sample 1 on the test. (A) Exploration ratios. * Significant comparisons between pairs A1 and B1; † significant comparisons between pairs B2 and B1; # significant comparisons between pairs A1 and A2. (B) Discrimination indexes. * Significant comparisons of temporal, spatial and integration indexes. All Graphics represent mean and standard error and all comparisons were significant considering $p < 0.05$.

To see if the patterns of exploration were influenced by a lack of exploration in one of the groups we carried a repeated measures GLM with the within factor “trials” and the between factor “groups”, using the total time of exploration of each trial. There was no effect for “trials” [$F(2,34) = 0,399$, $p = 0,602$, $f = 0,15$], “groups” [$F(1,17) = 2,569$, $p = 0,127$, $f = 0,38$] and for the interaction “trials x groups” [$F(2,34) = 0,281$, $p = 0,678$, $f = 0,12$] (Figure 3).

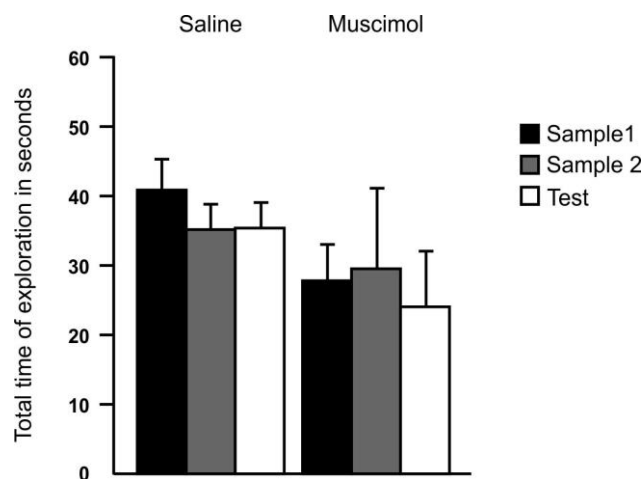


Fig. 3 Total time of exploration of sample 1, sample 2 and test trials, compared by a repeated measures GLM. The graphics represent the mean and the standard error.

Here we addressed the role of the hippocampal subregion CA1 in a task that access integrated spatial and temporal aspects of episodic-like memory. Bilateral infusions of the GABA_A agonist muscimol impaired episodic-like memory in male wistar rats, compared to the control group. We used exploration ratios and discrimination indexes, two commonly used

measures in object recognition tasks, to address the pattern of exploration of the animals, and total time of exploration to see if the pattern of exploration was influenced by a lack of exploring motivation.

The saline group showed significant results compared to the experimental group in both behavioural measures with high and medium size effects, and no significant differences in total time of exploration. Regarding the exploration ratio, a repeated measures GLM with the within factor “objects” and the between factor “groups” showed no effect of objects of groups alone, but showed an interaction between “groups x objects”. This interestingly shows that animals in the saline group had an integrated episodic-like memory, while the experimental group doesn’t, excluding the possibility of a specific exploration pattern by both groups, or preference for a particular object. This is supported by prior literature (Li & Chao, 2008; DeVito & Eichenbaum, 2010; Barbosa et al., 2013; De Souza Silva et al., 2015)

Regarding discrimination indexes, the repeated measures GLM with the within factor “indexes” and the between factor “groups” show no effect of “indexes” or an interaction of both, but showed an effect of “groups”. This was expected, since an effect of “indexes” would reflect a particular pattern of exploration in both groups, and an interaction of “indexes x groups” would implicate an inversion of the patterns expected by one of the groups, showing then, not only an impairment of the episodic-like memory, but a new completely inversed pattern that would not corroborate with the results of previous studies (Li & Chao, 2008; DeVito & Eichenbaum, 2010; Barbosa et al., 2013; De Souza Silva et al., 2015).

To see if the pattern of exploration was influenced by a lack of exploration in the experimental group, we carried a repeated measures GLM with the within factor “sessions” and the between factor “groups”. There were no “effects” of sessions and “groups”, and no interaction between them, reflecting that muscimol didn’t influenced the motivation of exploration of the animals.

A great number of studies has been carried addressing the role of hippocampal and extrahippocampal areas in non-associative what, where and when tasks (Bussey et al., 1999; DeVito & Eichenbaum., 2010; Wilson, Langston, et al., 2013; Wilson, Watanabe, Milner, & Ainge, 2013; Binder et al., 2015 De Souza Silva et al., 2015, Chao et al., 2016). The majority of these studies use different methods of permanent lesions to these areas, while the minority uses temporal inactivation methods.

It is proposed that the hippocampus processes more complex information than other extrahippocampal areas (Eichenbaum, Sauvage, Fortin, Komorowski, & Lipton, 2012). Regarding that, there is a common sense that the hippocampus is not involved in the novel object recognition task (NOR) (Mumby, Gaskin, Glenn, Schramek & Lehmann, 2002;

Langston & Wood, 2010; Wilson, Langston, et al., 2013; Wilson, Watanabe, Milner, & Ainge, 2013; Chao et al., 2016).

However, a few studies has shown a role of the hippocampus in the NOR (De Lima, Luft, Roesler, & Schröder, 2006; Cohen et al., 2013), the main difference of the results in these studies regards on the method used to see the role of the hippocampus in the NOR task. While the studies that indicate that the hippocampus is not involved in the NOR task use permanent lesions, the studies that indicate a role use temporal inactivations. This discussion is addressed in a recent review (Cohen & Stackman, 2015).

Altogether, our data provides clear evidence that the hippocampal subfield CA1 has a role in this episodic-like memory task, but it remains unclear if this is relative to a role of the area in recognizing objects, or if it's relative to a role in processing temporal and spatial aspects.

References

- Aggleton, J. P. (2014). Looking beyond the hippocampus: old and new neurological targets for understanding memory disorders. *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society*, *281*(1786). <http://doi.org/10.1098/rspb.2014.0565>
- Barbosa, F. F., Santos, J. R., Meurer, Y. S. R., Macêdo, P. T., Ferreira, L. M. S., Pontes, I. M. O., ... Silva, R. H. (2013). Differential Cortical c-Fos and Zif-268 Expression after Object and Spatial Memory Processing in a Standard or Episodic-Like Object Recognition Task. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *7*. <http://doi.org/10.3389/fnbeh.2013.00112>
- Binder, S., Dere, E., & Zlomuzica, A. (2015). A critical appraisal of the what-where-when episodic-like memory test in rodents: Achievements, caveats and future directions. *Progress in Neurobiology*, *130*, 71–85. <http://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2015.04.002>
- Bussey, T. J., Muir, J. L., & Aggleton, J. P. (1999). Functionally dissociating aspects of event memory: the effects of combined perirhinal and postrhinal cortex lesions on object and place memory in the rat. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *19*(1), 495–502.
- Chao, O. Y., Nikolaus, S., Huston, J. P., & de Souza Silva, M. A. (2014). The neurokinin-3 receptor agonist senktide facilitates the integration of memories for object, place and temporal order into episodic memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, *114*, 178–185. <http://doi.org/10.1016/j.nlm.2014.06.009>
- 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. <http://doi.org/10.1016/j.nlm.2016.02.007>
- Cohen, S. J., & Stackman, R. W. (2015). Assessing rodent hippocampal involvement in the novel object recognition task. A review. *Behavioural Brain Research*, *285*, 105–117. <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.08.002>
- De Lima, M. N., Luft, T., Roesler, R., & Schröder, N. (2006). Temporary inactivation reveals an essential role of the dorsal hippocampus in consolidation of object recognition memory. *Neuroscience Letters*, *405*(1–2), 142–146. <http://doi.org/10.1016/j.neulet.2006.06.044>
- De Souza Silva, M. A., Huston, J. P., Wang, A.-L., Petri, D., & Chao, O. Y.-H. (2015). Evidence for a Specific Integrative Mechanism for Episodic Memory Mediated by

- AMPA/kainate Receptors in a Circuit Involving Medial Prefrontal Cortex and Hippocampal CA3 Region. *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)*. <http://doi.org/10.1093/cercor/bhv112>
- DeVito, L. M., & Eichenbaum, H. (2010). Distinct contributions of the hippocampus and medial prefrontal cortex to the “what-where-when” components of episodic-like memory in mice. *Behavioural Brain Research*, 215(2), 318–325. <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.09.014>
- Edeline, J.-M., Hars, B., Hennevin, E., & Cotillon, N. (2002). Muscimol diffusion after intracerebral microinjections: a reevaluation based on electrophysiological and autoradiographic quantifications. *Neurobiology of Learning and Memory*, 78(1), 100–124. <http://doi.org/10.1006/nlme.2001.4035>
- Faul, F., Erdfelder, E., Buchner, A., & Lang, A.-G. (2009). Statistical power analyses using G*Power 3.1: tests for correlation and regression analyses. *Behavior Research Methods*, 41(4), 1149–1160. <http://doi.org/10.3758/BRM.41.4.1149>
- Hoge, J., & Kesner, R. P. (2007). Role of CA3 and CA1 subregions of the dorsal hippocampus on temporal processing of objects. *Neurobiology of Learning and Memory*, 88(2), 225–231. <http://doi.org/10.1016/j.nlm.2007.04.013>
- Inostroza, M., Brotons-Mas, J. R., Laurent, F., Cid, E., & de la Prida, L. M. (2013). Specific impairment of “what-where-when” episodic-like memory in experimental models of temporal lobe epilepsy. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 33(45), 17749–17762. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0957-13.2013>
- Kart-Teke, E., De Souza Silva, M. A., Huston, J. P., & Dere, E. (2006). Wistar rats show episodic-like memory for unique experiences. *Neurobiology of Learning and Memory*, 85(2), 173–182. <http://doi.org/10.1016/j.nlm.2005.10.002>
- Kesner, R. P., & Rolls, E. T. (2015). A computational theory of hippocampal function, and tests of the theory: new developments. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 48, 92–147. <http://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.11.009>
- Langston, R. F., & Wood, E. R. (2010). Associative recognition and the hippocampus: differential effects of hippocampal lesions on object-place, object-context and object-place-context memory. *Hippocampus*, 20(10), 1139–1153. <http://doi.org/10.1002/hipo.20714>
- Leão, A. H. F. F., Medeiros, A. M., Apolinário, G. K. S., Cabral, A., Ribeiro, A. M., Barbosa, F. F., & Silva, R. H. (2016). Hippocampal-dependent memory in the plus-maze

- discriminative avoidance task: The role of spatial cues and CA1 activity. *Behavioural Brain Research*, 304, 24–33. <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.02.012>
- Lee, I., Hunsaker, M. R., & Kesner, R. P. (2005). The role of hippocampal subregions in detecting spatial novelty. *Behavioral Neuroscience*, 119(1), 145–153. <http://doi.org/10.1037/0735-7044.119.1.145>
- Li, J.-S., & Chao, Y.-S. (2008). Electrolytic lesions of dorsal CA3 impair episodic-like memory in rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, 89(2), 192–198. <http://doi.org/10.1016/j.nlm.2007.06.006>
- Mumby D. G., Gaskin S., Glenn M. J., Schramek T. E., Lehmann H. (2002). *Hippocampal damage and exploratory preferences in rats: Memory for objects, places and contexts*. *Learn Mem* 9, 49 –57.
- Tulving, E. (2002). Episodic memory: from mind to brain. *Annual Review of Psychology*, 53, 1–25. <http://doi.org/10.1146/annurev.psych.53.100901.135114>
- Wilson, D. I. G., Langston, R. F., Schlesiger, M. I., Wagner, M., Watanabe, S., & Ainge, J. A. (2013). Lateral entorhinal cortex is critical for novel object-context recognition. *Hippocampus*, 23(5), 352–366. <http://doi.org/10.1002/hipo.22095>
- Wilson, D. I. G., Watanabe, S., Milner, H., & Ainge, J. A. (2013). Lateral entorhinal cortex is necessary for associative but not nonassociative recognition memory. *Hippocampus*, 23(12), 1280–1290. <http://doi.org/10.1002/hipo.22165>