



**Universidade de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde**

CLARISSA ROCHA DA SILVA VANNUCHI

**INFLUÊNCIA DO GÊNERO, CICLO CIRCADIANO E INTERVALO DE
RETENÇÃO NA MEMÓRIA DE RECONHECIMENTO OBJETO-LUGAR
DE PRIMATAS NÃO-HUMANOS (*CALLITHRIX PENICILLATA*).**

Brasília

2018

CLARISSA ROCHA DA SILVA VANNUCHI

**INFLUÊNCIA DO GÊNERO, CICLO CIRCADIANO E INTERVALO DE
RETENÇÃO NA MEMÓRIA DE RECONHECIMENTO OBJETO-LUGAR
DE PRIMATAS NÃO-HUMANOS (*CALLITHRIX PENICILLATA*).**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília como requisito parcial obrigatório para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde na área de Neurociências e Comportamento.

Orientadora: Prof^a Dr^a Marília Barros

Brasília

2018

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeira a Deus, pelo dom da vida.

Agradeço especialmente a minha orientadora, Prof Dra Marília Barros, por toda a paciência, os ensinamentos, a dedicação e o auxílio constante durante a realização deste trabalho.

Agradeço aos meus pais, pelo apoio constante e a toda minha família por sempre acreditarem em mim.

A todos os estagiários e parceiros que me ajudaram: André Carvalho, Carolina Lisboa, Clara Costa, Fernando Magela, Jéssica Aquino, Jéssica Pacheco, Lucas Cardoso e Renata Duarte.

À equipe do Centro de primatologia: aos veterinários, Cecília Dias e Antonizete Reis, aos tratadores Geinaldo da Silva e Almir de Araújo e à Marili Pascoal. Por todo o suporte durante os experimentos.

Aos meus amigos distantes que sempre me apoiaram.

À Universidade de Brasília.

À CAPES pelo apoio financeiro.

LISTA DE ABREVIATURAS

CA	Campo Aberto
CEUA	Comissão de Ética no Uso Animal
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal do Brasil
CPP	<i>Conditioned Place Preference</i> (preferência condicionada por lugar)
CPUnB	Centro de Primatologia da Universidade de Brasília
DNMS	<i>Delayed Non-Matching to Sample</i>
DNSM	<i>Delayed Recognition Span Test</i>
GAMA	Ácido Gama-Aminobutírico
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IR24	Intervalo de Retenção 24 h
IR48	Intervalo de Retenção 48 h
MAT	Matutino
MCP	Memória de Curto Prazo
MLP	Memória de Longo Prazo
NSQ	Núcleo Supraquiasmático
PNH	Primata Não-Humano
REO	Reconhecimento Espontâneo de Objeto
ROC	<i>Receiver Operating Characteristics</i>
ROL	Reconhecimento Objeto-Lugar
VES	Vespertino

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação esquemática da classificação da memória em diferentes classes, sistemas e tipos.....10
- Figura 2.** Fotografia de um casal heterossexual adulto da espécie mico-estrela (*Callithrix penicillata*), macho à esquerda e fêmea à direita, mantido em cativeiro no Centro de Primatologia da Universidade de Brasília.....28
- Figura 3.** Fotografias do pavilhão para alojamento de calitriquídeos do Centro de Primatologia da Universidade de Brasília.....28
- Figura 4.** Fotografias do aparato experimental do Campo Aberto utilizado nos experimentos.....30
- Figura 5.** Representação esquemática do aparato do Campo Aberto, com indicação da divisão dos quatro quadrantes externos.....31
- Figura 6.** Fotografias dos três objetos utilizados como estímulo no teste de Reconhecimento Objeto-Lugar realizado ao longo do procedimento experimental do presente estudo.....32
- Figura 7.** Representação esquemática do procedimento geral empregado nos três experimentos realizados no presente estudo.....34
- Figura 8.** Gráficos do Experimento 1: Influência do Gênero.....38
- Figura 9.** Gráficos do Experimento 2: Influência do Horário do Dia40
- Figura 10.** Gráficos do Experimento 3: Influência do Intervalo de Retenção.....41

RESUMO

Memórias são informações adquiridas, armazenadas e evocadas quando necessárias, podendo assim modular o comportamento do indivíduo. A memória de reconhecimento se refere, especificamente, a capacidade de julgar a ocorrência prévia de um estímulo no ambiente, podendo ser influenciada por muitos fatores. Apesar de vários estudos já terem sido realizados em roedores, pouco se sabe a respeito desse tipo de memória em primatas não-humanos (PNH). Portanto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a influência do gênero, horário do dia e intervalo de retenção no desempenho de micos-estrela (*Callithrix penicillata*) adultos em uma tarefa de memória de reconhecimento recentemente desenvolvida para PNH – o teste de reconhecimento objeto-lugar (ROL). Nesse teste, cada sujeito foi inicialmente exposto a dois objetos idênticos durante os 10 min da sessão treino. Após um intervalo de retenção, foi avaliado o tempo de exploração do objeto que foi deslocado versus o que ficou estacionário, durante os 10 min da sessão teste. No primeiro experimento, que avaliou a influência do gênero, tanto os machos como as fêmeas foram capazes de discriminar o objeto deslocado do objeto estacionário após um intervalo de 24 h. No segundo experimento, realizado apenas com machos, os animais treinados e testados no período matutino ou vespertino tiveram um desempenho semelhante no teste de ROL usando um intervalo de retenção de 24 h. No último experimento, também realizado apenas com machos, foi observado que os micos submetidos a um intervalo de retenção de 24 h no teste de ROL foram capazes de discriminar o objeto deslocado, enquanto que o grupo testado após um intervalo de 48 h exploraram os dois objetos equitativamente. Dessa forma, os resultados do presente estudo indicam que micos-estrela adultos machos e fêmeas demonstram ter uma memória de reconhecimento espacial no teste de ROL por um intervalo de até 24 h, mas que o horário do dia (matutino vs. vespertino) não influencia significativamente o seu desempenho.

Palavras-chave: mico-estrela, memória de reconhecimento, gênero, horário do dia, intervalo de retenção

ABSTRACT

Memories are information that are acquired, stored and later retrieved, which can subsequently alter an individual's behavior. Recognition memory, more specifically, is the ability to identify that a specific stimulus has been seen previously, being influenced by several aspects. Although many studies have been conducted with rodents, little is still known about the recognition memory of nonhuman primates (NHP). Therefore, the present study aimed at analyzing the influence of gender, time-of-day and retention interval on the performance of adult marmoset monkeys (*Callithrix penicillata*) in a recognition memory task recently developed for NHP – the spontaneous object-location (SOL) test. In this task, each subject was initially exposed to two identical objects during the 10 min training session. After a retention interval, the time spent exploring the displaced versus the stationary object was assessed on the 10 min test trial. On the first experiment, which assessed the influence of gender, both males and females were able to discriminate between the displaced and stationary object after a 24 h retention interval. On the second experiment, held only with males, the subjects that were trained and tested either in the morning or the afternoon performed similarly in the SOL task with a 24 h retention interval. On the last experiment, also held only with males, the subjects that were submitted to the 24 h retention interval were able to distinguish between the displaced and stationary objects. However, the marmosets that were assessed after a 48 h interval explored both objects equally. Thus, results of the present study indicate that adult male and female marmosets are capable of a recognition memory in the SOL task after intervals of up to 24 h. On the other hand, the time of day (morning vs. afternoon) had no significant effect on their performance in this task.

Keywords: marmoset, recognition memory, gender, time-of-day, retention interval

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
1.1. Aspectos gerais da memória	9
1.2. Classificação da memória	10
1.3. Memória de Reconhecimento	12
1.4. Fatores que podem influenciar a memória de reconhecimento	18
1.4.1. Gênero	18
1.4.2. Ciclo Circadiano	21
1.4.3. Intervalo de Retenção	23
1.5. Calitriquídeos como modelo animal	25
2. OBJETIVOS	27
2.1. Objetivo Geral	27
2.2. Objetivos Específicos	27
3. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA DO ESTUDO	28
4. METODOLOGIA	29
4.1. Aspectos Éticos	29
4.2. Sujeitos e Condições Gerais de Alojamento e Manejo	29
4.3. Aparato Experimental	31
4.4. Objetos	33
4.5. Procedimento Experimental	35
4.5.1. Experimento 1: Influência do Gênero	35
4.5.2. Experimento 2: Influência do Horário do Dia	36
4.5.3. Experimento 3: Influência do Intervalo de Retenção	37
4.6. Análises dos Dados	38
4.7. Análise Estatística	39
5.0. RESULTADOS	40
5.1. Experimento 1: Influência do Gênero	40
5.2. Experimento 2: Influência do Horário do Dia	41
5.3. Experimento 3: Influência do Intervalo de Retenção	42
6. DISCUSSÃO	45
6.1. Influência do Gênero	45
6.2. Influência do Horário do Dia	47
6.3. Influência do Intervalo de Retenção	49
7. CONCLUSÕES	53
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
ANEXO: Declaração da CEUA/UnB	64

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos gerais da memória

A memória é a capacidade do indivíduo de se situar no presente, levando em consideração o passado e o futuro. A memória fornece as bases para todos os nossos conhecimentos, habilidades, sonhos, planos e anseios. Memória é, por conseguinte, um fator determinante do nosso comportamento (TOMAZ, 1993a).

A memória já foi comparada a um computador e definida por um modelo de processamento de informações sendo que essa passa por três etapas (MAY e EINSTEIN, 2013): aquisição, consolidação e evocação (TOMAZ e cols., 2003). A aquisição diz respeito ao momento em que a informação chega até o nosso sistema nervoso e se dá por meio das estruturas sensoriais, as quais transportam a informação recebida até o cérebro para processamento (KANDEL, 2006). Após esse processo ocorre a consolidação, que diz respeito ao armazenamento das informações. Essa etapa – que representa a memória propriamente dita – pode se dar de duas maneiras: (1) por meio de alterações eletrofisiológicas ou (2) de fenômenos bioquímicos. Nos fenômenos eletrofisiológicos, determinados conjuntos de neurônio continuam disparando durante alguns segundos após uma situação/estímulo novo, retendo temporariamente a informação somente durante o tempo em que a mesma é necessária, extinguindo-a logo em seguida. Esse tipo de fenômeno tem duração efêmera e não forma traços bioquímicos (SQUIRE e cols., 2003; MOURÃO e FARIA, 2015).

Por outro lado, os fenômenos bioquímicos (também chamados de traços de memória) incluem dois tipos de alterações: as estruturais (morfológicas) e as funcionais, ambas ocorrendo em níveis de circuitos neurais. As alterações estruturais compreendem a formação de novas espinhas dendríticas (as quais permitem que um determinado neurônio receba mais aferências de outros neurônios) ou então a formação de novos prolongamentos axonais (os quais permitem que um dado neurônio transmita

mais sinais para os neurônios com os quais ele se conecta). Podem ocorrer ainda alterações morfológicas que criam novas conexões/circuitos que anteriormente não existiam. Já as alterações funcionais, onde serão formados novos canais iônicos ou novas proteínas sinalizadoras, otimizam a transmissão sináptica (PURVES e cols., 2010; MOURÃO e FARIA, 2015).

A última etapa, a de recuperação da memória que foi consolidada, é denominada de evocação (TOMAZ, 1993b). Tem-se também, o processo de reconsolidação da memória, que permite a atualização de informações previamente adquiridas em resposta a novos estímulos (WANG e MORRIS, 2010).

A memória pode ser influenciada por alterações em determinados sistemas cerebrais, assim como por alterações entre interações celulares em áreas cerebrais específicas (TOMAZ, 1993a). A alteração do comportamento de um organismo em decorrência de experiências prévias evidencia que esse organismo é capaz de aprender, pois adquire informações, e de memorizar, pois retém essas informações (PAVÃO, 2008).

Os traços de memória podem se reorganizar no cérebro de uma maneira dependente do tempo. A incapacidade de se lembrar dos eventos de nossa vida pode se desenvolver de uma pequena irritação, a uma condição que prejudica a existência normal, e até mesmo aspectos da identidade pessoal. Dado seu papel central na cognição, um grande desafio para a área das Neurociências é entender os mecanismos subjacentes a nossa capacidade de codificar, armazenar e recuperar informações (WANG e MORRIS, 2010).

1.2. Classificação da memória

A memória pode ser classificada em diferentes classes, sistemas e tipos (Fig. 1). Em termos das classes, há a memória *filogenética* e a *ontogenética*. A primeira se refere as informações acumuladas geneticamente por ancestrais ao longo da evolução da espécie, envolvendo a arquitetura básica e conexões do cérebro (FORSTER, 1995).

A memória ontogenética se desenvolve no decorrer da vida do indivíduo, por meio de informações e experiências adquiridas pelo mesmo e não são transmitidas geneticamente para futuras gerações (TOMAZ e COSTA, 2001).

A memória ontogenética pode ainda ser dividida em diferentes sistemas, a saber: *memória de curto prazo* (MCP), *memória de longo prazo* (MLP) e *memória operacional*. MCP é um fenômeno que envolve plasticidade sináptica e se relaciona com a consolidação de MLP (IZQUIERDO, 2011). Para BADDELEY (2007), essas memórias são fenômenos de natureza elétrica que se resumem ao armazenamento de pequenas quantidades de informação por um breve período de tempo (MOURÃO e FARIA, 2015). A MLP, por sua vez, possui a capacidade ilimitada de retenção da informação e por um período indefinido de tempo, podendo manter o registro autobiográfico e dos conhecimentos adquiridos pelo indivíduo (BADDELEY, 1992; FORSTER, 1995).

A MLP, mais especificamente, pode ser subdividida em dois tipos de memória: as *declarativas* (ou explícita) e as *não-declarativas* (ou implícitas). A memória declarativa é aquela adquirida de forma consciente ou intencionalmente, via obtenção de fatos, conhecimentos ou algum esforço (IZQUIERDO e cols., 2013). Portanto, refere a habilidade de detectar e codificar o que é específico de um evento, associando os componentes temporais e espaciais. Pode ser subdividida em duas categorias: (a) *memória episódica*, que diz respeito às experiências passadas, episódios de nossas vidas, estando relacionada a um determinado momento no tempo e espaço (p.ex., uma festa de aniversário); (b) *memória semântica*, que diz respeito a fatos e conhecimentos gerais (p. ex., regras gramaticais, idiomas, etc.; HILL, 2010).

Para a consolidação de memórias declarativas, essa lembrança consciente depende principalmente de estruturas do lobo temporal medial (p.ex., hipocampo e córtices entorrinal, perirrinal e parahipocampal), mas há também a participação de regiões do diencefalo (p.ex., tálamo, corpos mamilares) e prosencéfalo basal (p.ex., septo medial) (ZOLA-MORGAN e SQUIRE, 1993).

A memória não-declarativa corresponde àquelas que estão em nível subconsciente e que não podem ser evocadas por palavras e sim por ações. É composta por uma coleção de habilidades expressas por meio de desempenhos que não exigem uma memória consciente, por exemplo hábitos e habilidades e os condicionamentos clássicos, dentre outros (SQUIRE e ZOLA, 1996).

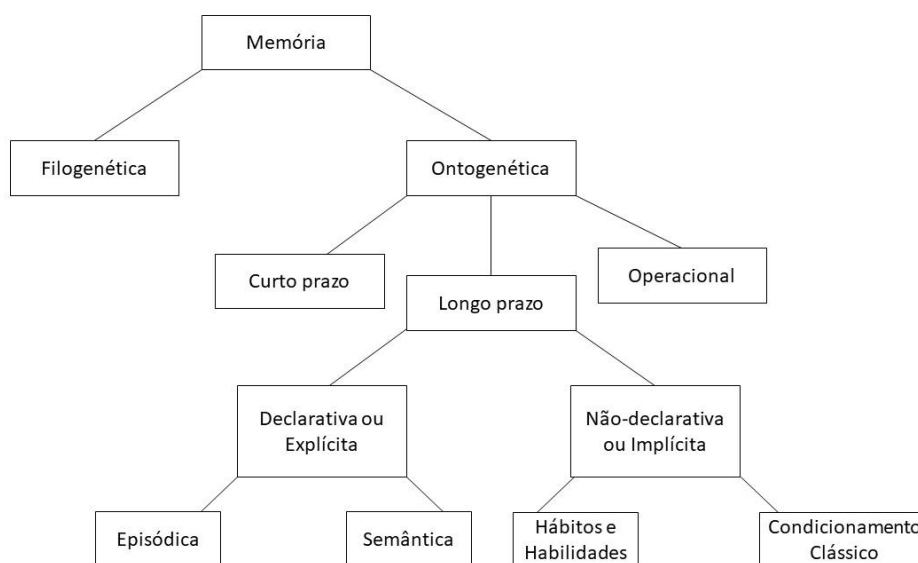


Figura 1: Representação esquemática da classificação da memória em diferentes classes, sistemas e tipos. Adaptado de SQUIRE (2004).

1.3. Memória de Reconhecimento

De acordo com WARBURTON e BROWN (2015), a memória de reconhecimento se refere a capacidade de julgar a ocorrência prévia de estímulos presentes no nosso ambiente. É vista como uma memória declarativa (JAEGER, 2016) e, assim, fundamental não somente para a nossa capacidade de registrar eventos, mas também para orientar o comportamento prospectivo. Podem ser feitos julgamentos sobre se um item específico é novo ou familiar, se estava anteriormente associado a um local ou contexto específico e/ou se foi visto recentemente ou há algum tempo.

Em 1890, William James sugeriu que a memória de reconhecimento estaria baseada nos aspectos de recordação e/ou de familiaridade. A familiaridade é um

processo rápido e automático, definido por um sentimento geral de ter encontrado um evento, alguém ou algum objeto anteriormente, sem se ter necessariamente uma recordação de detalhes adicionais. A recordação, por outro lado, é um processo mais lento referente à recuperação de detalhes contextuais adicionais sobre o evento, alguém ou objeto e como, quando e onde ocorreu (LI e cols., 2017).

A memória de reconhecimento depende do córtex perirrinal no lobo temporal medial (ENNACEUR e cols., 1996; BUSSEY e cols., 2000; WARBURTON e BROWN, 2015). Por outro lado, julgamentos relativos à localização espacial de um item anteriormente encontrado requerem também de atividade do hipocampo (BUSSEY e cols., 2000; BARKER e cols., 2011; WARBURTON e BROWN, 2015). Em relação a memória de reconhecimento que exige que um sujeito se lembre de um item associado a um lugar particular (previamente visto), ou os julgamentos de memória de recência dependem de uma rede de regiões cerebrais que incluem o córtex perirrinal, o córtex pré-frontal medial, o hipocampo e o tálamo dorsal medial (WARBURTON e BROWN, 2015).

A memória de reconhecimento demonstrou ser mediada pelas vias dopaminérgica (BELCHER e cols., 2008; BESHEER e cols., 1999; MOSES e cols., 2005; MUMBY, 2001, 2002; SCHRÖDER e cols., 2003; WAIS e cols., 2006; DE LIMA e cols., 2011). Diferentes tipos de receptores de dopamina parecem ser capazes de modular esse tipo de memória (BRASZKO, 2006, 2009; BRASZKO e cols., 2008; HOTTE e cols., 2005; MAROUN e cols., 2009; NAGAI e cols., 2007, 2009; DE LIMA e cols., 2011). Contudo, há relatos também da participação de outras vias neurotransmissoras, como a glutamatérgica. Por exemplo, o antagonismo de receptores do tipo AMPA bloqueou a codificação e a recuperação da memória de reconhecimento em roedores (BARKER e cols., 2008, 2013; WINTERS e BUSSEY, 2005).

Como discutido acima, a memória de reconhecimento é crucial para a aquisição de novas informações e um planejamento adequado de comportamentos futuros (WARBURTON e BROWN, 2015), sendo observado déficits significativos em pacientes

acometidos por doenças neurodegenerativas (demência de Alzheimer; LEE e LYKETSOS, 2003) ou com lesões cerebrais (AGGLETON e SHAW, 1996). Na doença de Alzheimer, por exemplo, ocorre um depósito excessivo de proteínas anômalas formando corpúsculos e emaranhados que impedem o trânsito de substâncias químicas nos neurônios e sinapses. Outras doenças também podem evoluir com um quadro demencial, a exemplo da doença de Parkinson em fase mais avançada e a Síndrome de Down, além de também ocorrer em pacientes com idade mais avançada (BEAR e cols., 2008; MOURÃO e FARIA, 2015).

Alguns déficits observados referem-se à formação, manutenção e correspondência da representação da memória de algum estímulo visual, especialmente quando evocados após intervalos mais prolongados. De acordo com dados obtidos a memória de reconhecimento é amplamente afetada pela doença de Alzheimer (VIGGIANO e cols., 2008).

Para o estudo da memória em humanos pode ser realizado diferentes testes visuais, como os de reconhecimento e recordação, testes verbais, podendo avaliar a recuperação da memória (BADDELEY e cols., 1995) e a tarefa de comparação de pares visuais (ENNACEUR, 2010; ANTUNES e BIALA., 2012). A análise de ROC (*Receiver Operating Characteristics*) tem sido utilizada para distinguir processos de familiaridade em tarefas de memória de reconhecimento em pacientes e voluntários saudáveis, utilizando também o paradigma lembrança/reconhecimento (YONELINAS e cols., 1998; AMEEN-ALI e EACOTT, 2015).

Contudo, estudos clínicos empregando diferentes abordagens experimentais – como neuroimagem e lesões – ainda tem gerado controvérsia em termos do substrato neural e dos circuitos neuroquímicos responsáveis pela memória de reconhecimento (AMEEN-ALI e EACOTT, 2015; SQUIRE e cols., 2007), e os mecanismos subjacentes aos déficits encontrados após lesões e em certas doenças neurais citadas acima. Apesar da possibilidade de se realizar testes em humanos, ainda existem muitas dificuldades e limitações metodológicas. Essas barreiras podem ser muitas, como por

exemplo a influência religiosa, a comunicação entre o pesquisador e o participante, idioma (ESCOBEDO e cols., 2011; LOKESH e cols., 2013), financiamento, problemas psicológicos dos participantes (GONZALEZ e cols., 2011; LOKESH e cols., 2013), idade, sexo e cultura. Algumas técnicas de experimentação neurológica mais invasivas, inclusive, não são muito viáveis em humanos.

Tendo em vista que a memória de reconhecimento ocorre de forma ubíqua na maioria das espécies, estudos pré-clínicos também tem se mostrado de grande valia para elucidar mecanismos de tratamento para déficits cognitivos e doenças neurodegenerativas (KINNAVANE e cols., 2015). Nas ciências biomédicas e pesquisas neuropsicofarmacológicas, animais de laboratório servem como intermediários na aplicação dos resultados da pesquisa básica à prática clínica (SASAKI, 2015). A maioria dos animais de laboratório são usados como modelos animais, através de manipulação genética, intervenção cirúrgica ou injeção de substâncias ou fármacos. As experiências com animais têm desempenhado um papel crucial no desenvolvimento de tratamentos médicos modernos e de doenças atuais (ROWAN, 1997), como as doenças neurodegenerativas.

Nesse sentido, o uso de tarefas comportamentais continua sendo uma ferramenta importante em pesquisas básicas sobre a base neural da memória, e os estudos em animais são um importante contribuinte para elucidar os estudos de memória de reconhecimento com humanos (AMEEN-ALI e EACOTT., 2015).

Existem vários testes que são utilizados atualmente para avaliar a memória de reconhecimento em animais. Como, por exemplo, o *Delayed Non-Matching to Sample* (DNMS). Originalmente desenvolvido por MISHKIN (1978) como uma variação de um outro teste similar, o DNMS exige que o indivíduo compare um objeto com um outro item apresentado recentemente e, assim, selecione/identifique qual dos dois objetos é o estímulo novo (nunca visto antes). No caso de uma resposta correta, é dada uma recompensa (alimentar) ao sujeito como forma de incentivo para sua participação na tarefa. O intervalo de tempo entre a apresentação inicial do objeto modelo e a sessão

de escolha entre os objetos familiar e novo pode variar entre poucos segundos até vários minutos, fazendo com que tenha, assim, uma demanda cognitiva maior (BACHEVALIER e BEAUREGARD, 1993). Porém, há controvérsias em termos desse teste por se utilizar uma recompensa para estimular o sujeito a escolher o objeto novo e a necessidade de treinar do sujeito previamente para que o mesmo adquira o comportamento de selecionar um objeto. O teste de DNMS tem sido utilizado de forma extensiva em primatas não-humanos (PNH) para identificar regiões cerebrais envolvidas no reconhecimento de estímulos previamente apresentados (ZOLA e cols., 2000; MURRAY e cols., 2000; RODRIGUEZ e PAULE, 2009). Apesar do DNMS ter sido adaptado para roedores, empregando-se tanto objetos (p.ex., AGGLETON e cols., 1985) como odores com estímulo (p.ex., WINTERS e cols., 2005), a necessidade de uma extensa fase de treinamento para que os animais adquiram a regra de “escolha diferente do modelo” gerou a necessidade de se desenvolver novos testes comportamentais para o estudo da memória de reconhecimento em outros animais.

Assim, ENNACEUR e DELACOUR (1988) desenvolveram um teste alternativo para ratos – *Reconhecimento Espontâneo de Objeto* (REO). Esse teste, similar ao DNMS, também está baseado na preferência do indivíduo por um objeto novo em detrimento de um objeto familiar. Porém, esse teste está fundamentado na exploração natural e espontânea dos objetos, não requerendo um treinamento prévio dos sujeitos, nem uso de uma recompensa. Assim, o teste de REO é uma tarefa comportamental simples para se avaliar a memória de reconhecimento, o qual depende essencialmente do comportamento exploratório inato do rato na ausência de aprendizagem de regras, treinamento prévio ou reforço alimentar. Com isso, o teste REO tornou-se um procedimento amplamente utilizado para a investigação de alterações da memória em várias espécies (CLARK e MARTIN, 2005).

Com a crescente utilização do teste de REO em pesquisas sobre memória de reconhecimento, várias vertentes foram desenvolvidas com base no procedimento original. De acordo com WARBURTON e BROWN (2015), é possível avaliar a memória

de reconhecimento por meio do uso de tarefas de reconhecimento de objetos com base na medição da preferência espontânea por novidade, sendo as principais variações os testes de:

- 1) *Reconhecimento objeto-lugar*: avalia a capacidade do sujeito lembrar da localização espacial de objetos vistos anteriormente em seu ambiente (objeto estacionário x deslocado);
- 2) *Reconhecimento de ordem temporal*: testa a capacidade de um indivíduo em diferenciar objetos apresentados anteriormente, mas em momentos diferentes (objeto recente x antigo).

Como mencionado acima, o teste de REO foi inicialmente utilizado em roedores e, apenas recentemente, é que o teste de *Reconhecimento Objeto-Lugar* (ROL) foi desenvolvido para uso em PNH (micos-estrela; MELAMED e cols., 2017a, 2017b). Por isso, faz-se necessária uma melhor validação desse novo teste em PNH estabelecendo, assim, diferentes variáveis que podem influenciar a memória de reconhecimento nesses animais. No presente trabalho, foram avaliados três fatores (gênero, ciclo circadiano e intervalo de retenção) no teste de ROL, os quais serão discutidos em mais detalhe a seguir.

1.4. Fatores que podem influenciar a memória de reconhecimento

1.4.1. Gênero

Homens e mulheres nem sempre apresentam um desempenho equivalente em termos de sua capacidade mnemônica. Esse tipo de dimorfismo sexual depende muito da tarefa sendo avaliada (SUTCLIFFE e cols., 2007) e parece ocorrer devido, pelo menos em parte, a uma influência dos diferentes hormônios esteróides circulantes. Esses, por sua vez, exercem um efeito modulatório já nas primeiras fases do desenvolvimento (CHRISTIANSEN, 1993; WILLIAMS e cols., 1991), mas persiste durante toda a vida (GOUCHIE e cols., 1991; KIMURA, 1996; SLABBEKOORN e cols., 1999; VAN GOOZEN e cols., 1994; HAUSMANN e cols., 2000).

De fato, sabe-se que os hormônios estradiol e progesterona são moduladores potentes do processo mnemônico que ocorre no hipocampo, além de outras áreas cerebrais, alterando os processos de aprendizagem e memória (WIZEMANN e PARDUE, 2001). Há uma maior densidade de espinhas dendríticas em células hipocampais durante o pico de liberação de estradiol, comparado à fase de menor liberação desse hormônio ao longo do ciclo (p. ex., mulheres: AMANTEA e cols., 2005; animais: WOOLLEY e McEWEN, 1992). Esse efeito pode ser mediado diretamente por receptores estrogênicos presentes no hipocampo (e outras estruturas cerebrais) (FRYE e cols., 1995) e/ou indiretamente pelo fato desses hormônios influenciarem os níveis de receptores e transportadores associados a diferentes neurotransmissores, como no caso do ácido gama-aminobutírico (GABA) e da acetilcolina (WILLIAMS e CHIENG, 1998).

Além disso, comparado ao homem, a mulher parece estar mais propensa à doença de Alzheimer, sendo a depleção pós-menopausa de estrogênios endógenos um aspecto que contribui para esse risco diferenciado entre os gêneros (ZANDI e cols., 2002). Apesar de ainda controverso, há relatos de um efeito benéfico da terapia de reposição hormonal em doenças que acometem funções cognitivas, como o Alzheimer (AMANTEA e cols., 2005) e a esquizofrenia (CUTTER e cols., 2003).

Nas mulheres, a influência hormonal pode ser detectada em diversas funções. Por exemplo, quando os níveis de estradiol e progesterona estão baixos no início da fase folicular, elas têm uma melhor coordenação motora, comparado ao que é visto quando os níveis desses hormônios estão elevados (no meio da fase lútea). Por outro lado, nessa última fase, as mulheres têm um bom desempenho em testes de fluência verbal (KIMURA e HAMPSON, 1994). Em tarefas espaciais, o desempenho das mulheres é sensível a flutuações hormonais ao longo do ciclo menstrual e diferentes aspectos de suas habilidades espaciais estão relacionadas a diferentes hormônios ou combinações hormonais (HAUSMANN e cols., 2000).

Em termos da memória espacial em animais, diferenças entre os gêneros também já foram demonstradas. Ratos machos costumam aprender mais rápido e apresentar um melhor desempenho que as fêmeas ao navegar labirintos, localizar recompensas alimentares e lembrar a localização de objetos (JONASSON, 2005; SUTCLIFFE e cols., 2007). Níveis elevados de estradiol e progesterona – durante flutuações naturais do ciclo ou mesmo após a administração sistêmica desses hormônios – melhoram o desempenho das fêmeas em tarefas de memória espacial usando labirintos (LUINE, 2008; KOROL e KOLO, 2002). Considerando que no presente estudo foi empregado um teste com um componente espacial (o teste de ROL já descrito anteriormente), uma diferença entre gêneros em termos da memória espacial poderia vir a influenciar a resposta dos sujeitos. Nesse contexto, machos teriam um desempenho superior ao das fêmeas.

Porém, os hormônios sexuais femininos também parecem exercer um efeito modulatório direto sobre a memória de reconhecimento. Em ratos, não houve diferença entre os gêneros após curtos intervalos de retenção (i.e., 30 min). Mas, depois de períodos mais longos (i.e., 90 min), apenas as fêmeas foram capazes de ainda reconhecer corretamente os objetos novo e familiar (SUTCLIFFE e cols., 2007). É importante salientar que no estudo de SUTCLIFFE e cols. (2007), o melhor desempenho das fêmeas após um intervalo de retenção de 3 h no teste de REO não teve correlação

com nenhuma fase específica do ciclo do estro (SUTCLIFFE e cols., 2007). Recentemente, nesse mesmo teste, foi demonstrado que ratos machos também foram capazes de distinguir entre os objetos novo e familiar por até 3 h (p.ex., GASKIN e cols., 2010). Diferenças metodológicas, como o tempo de treino, complexidade do estímulo e a espécie estudada, podem ter contribuído para a diferença observada entre esses estudos. Portanto, de uma forma geral, as fêmeas parecem melhor reter informações acerca de objetos neutros no ambiente e por um intervalo de retenção mais longo que os machos.

De fato, relatos na literatura indicam que os hormônios sexuais femininos melhoram o desempenho das ratas em tarefas de REO. Fêmeas ovariectomizadas tiveram um declínio nesse tipo de memória, assim como uma menor densidade de dendritos no hipocampo e no córtex pré-frontal (WALLACE e cols., 2006). A administração de estradiol antes ou logo após a fase de treino reverteu esse efeito, melhorando o desempenho das ratas ovariectomizadas no mesmo teste (INAGAKI e cols., 2010; JACOME e cols., 2010; WALF e cols., 2006; WALLACE e cols., 2006). Um efeito semelhante também foi relatado durante o pico de liberação de estradiol em fêmeas cujo ciclo de estro foi mantido intacto (WALF e cols., 2006). A reversão do déficit que é induzida pela administração de estradiol não foi observada quando dada para ratas *knockout* para o receptor de estrogênio (WALF e cols., 2009), o que corrobora o potencial efeito facilitador desse hormônio na memória de reconhecimento de objetos.

Já na versão espacial dessa tarefa – como o teste de ROL – ratos machos tiveram um melhor resultado em relação às fêmeas (COST e cols., 2012; SUTCLIFFE e cols., 2007). Os machos foram capazes de identificar a localização de objetos vistos anteriormente por um intervalo de, pelo menos, 1-3 h, enquanto que nas fêmeas esse período não ultrapassou 30 min a 1 h. Conforme já mencionado acima, machos tendem a ter um melhor desempenho que as fêmeas em tarefas que tenham algum tipo de demanda de memória espacial. Contudo, fêmeas ovariectomizadas, mas tratadas com estradiol e progesterona, tiveram um desempenho acima daquele visto nos machos e

por um período de retenção mais longo em uma tarefa de reconhecimento espacial (COST e cols., 2012).

Em PNH testados para memória de reconhecimento, fêmeas idosas de macacos *rhesus*, que foram ovariectomizadas, tiveram um desempenho abaixo dos animais controle quando avaliadas no protocolo de DNSM, mas um resultado melhor em testes avaliando reconhecimento espacial (*delayed recognition span test*) (LACREUSE e HERNDON, 2000). Contudo, em fêmeas adultas, a resposta a esses testes não foi modificada após uma ovariectomia, com ou sem o tratamento de reposição hormonal (VOYTKO e cols., 2009), questionando o efeito de estrogênio nesse tipo de memória em primatas. Portanto, novos estudos se fazem necessários para melhor se entender a influência do gênero na memória de reconhecimento em PNH.

1.4.2. Ciclo Circadiano

O sistema circadiano evoluiu para alinhar o comportamento e a fisiologia de um indivíduo com o tempo da Terra (ALBRECHT, 2011). Assim, os ritmos circadianos são uma propriedade inerente dos sistemas vivos e gerados por um relógio interno. Em mamíferos, este relógio interno está localizado no núcleo supraquiasmático (NSQ) do hipotálamo (REPPERT e WEAVER, 2002). Esse núcleo atua como um marca-passo central e está envolvido na regulação rítmica do ciclo sono-vigília, da atividade locomotora, do metabolismo e da temperatura corporal, dentre outros aspectos (MULLER e cols., 2014).

Portanto, o NSQ e os ritmos circadianos são importantes para muitos processos fisiológicos e comportamentais, incluindo as habilidades cognitivas. De fato, vários dos genes relacionados ao relógio biológico são expressos em áreas cerebrais envolvidas na aprendizagem e na memória, como a amígdala (LAMONT e cols., 2005; ALBRECHT, 2011) e o hipocampo (ALBRECHT e cols., 1997; WAKAMATSU e cols., 2001; CHAUDHURY e cols., 2005; JILG e cols., 2010; ALBRECHT, 2011).

A memória de reconhecimento, em particular, parece ser sensível a interrupções dos ritmos circadianos. Em hamsters, a perda da ritmicidade circadiana gerou um déficit de desempenho no teste de REO após um intervalo de retenção de apenas 20 e 60 min (MÜLLER e cols., 2015; RUBY e cols., 2008, 2013). Esse déficit não foi influenciado por alterações concomitantes no padrão de sono desses animais, mas foi revertido pela administração sistêmica de pentilenotetrazol – um antagonista de receptores para GABA (RUBY e cols., 2008, 2013). A administração desse recuperou a capacidade mnemônica dos animais no teste de REO sem que fosse re-estabelecida a ritmicidade circadiana dos sujeitos, sugerindo que projeções GABAérgicas para o hipocampo, provenientes do NSQ, exercem um importante papel na influência do ciclo circadiano sobre a memória (de reconhecimento) (RUBY e cols., 2008, 2013).

Além disso, há relatos de que a memória de reconhecimento varia ao longo do dia, apesar de ainda não haver uma indicação clara do horário de pico para formação desse tipo de memória. Hamsters testados na tarefa de REO foram capazes de distinguir entre os objetos novo e familiar após um intervalo de 60 min, mesmo ao serem avaliados em diferentes momentos do seu período de atividade, assim como uma hora antes do início de suas atividades, o que não foi visto em animais arrítmicos (MÜLLER e cols., 2015). Porém, em camundongos, houve uma clara melhora no desempenho dos animais no mesmo teste de REO quando os mesmos realizaram a tarefa no início da fase escura e empregando um intervalo de retenção de 24 h (SHIMIZU e cols., 2015).

COSTA e RIPPERGER (2015), também empregando a tarefa de REO em roedores, observaram que o sistema circadiano de 24 h modulou o comportamento e a memória dos animais. A coincidência do horário do dia na qual a informação foi adquirida e evocada gerou um melhor desempenho. Por outro lado, a evocação foi menos eficiente quando se deu em um horário diferente daquele em que ocorreu o processo inicial de aquisição. Por outro lado, SHIMIZU e cols. (2015) relataram que camundongos treinados na fase escura e testados 12 h depois na fase clara foram capazes de desempenhar a tarefa, enquanto que aqueles que foram treinados na fase

clara e testados 12 h depois na fase escura não distinguiram corretamente entre os dois objetos. Esse mesmo efeito não foi observado quando os animais foram avaliados após um intervalo curto de apenas 8 min, sendo o desempenho equivalente nesse caso. Por conseguinte, foi sugerido que o traço de memória (de longo prazo) é dependente do horário de treinamento e não o de evocação da informação armazenada, e desta forma o ciclo circadiano influenciaria mais o processo de consolidação da informação (ABEL e cols., 2001; SHIMIZU e cols., 2015).

Assim, o ciclo circadiano, ou mais especificamente o horário do dia, exerce uma importante influência sobre a memória de reconhecimento. Esse sistema possivelmente age de forma a limitar a formação de tais memórias, ou até mesmo a utilização de memórias previamente estabelecidas e associadas a horários do dia em que sua utilização seja mais favorável (GARREN e cols., 2013).

Ainda faltam ser realizados novos estudos sobre a influência do ciclo circadiano na memória de reconhecimento espacial (teste de ROL), assim como avaliar o potencial desse fator nesse tipo de memória em PNH. A regulação temporal associada a intervalos de tempo significativamente mais curtos, como no caso de segundos a minutos (CASTRO e cols., 2013; RICHELLE e cols., 1980; SHETTLEWORTH, 1998), será abordado no próximo tópico.

1.4.3. Intervalo de Retenção

O intervalo de retenção é um fator que pode ser variado em estudos voltados para elucidar a memória, incluindo a memória de reconhecimento. Nos procedimentos de REO ou ROL já discutidos acima (ou até mesmo em suas outras vertentes), esse intervalo corresponde especificamente ao tempo que decorre entre a apresentação inicial do objeto-estímulo e a fase de teste onde a informação armazenada deve ser evocada pelo indivíduo. Quanto maior for esse intervalo, maior será a demanda do processo mnemônico no desempenho do indivíduo e assim pode-se avaliar memórias mais duradouras (MLP).

Em PNH, a memória de reconhecimento tem sido tipicamente avaliada no teste de DNMS, conforme descrito acima. Porém, nesse procedimento, os intervalos de retenção que são utilizados geralmente variam entre poucos segundos (1-60 s; p.ex., BACHEVALIER e cols., 2015) a até no máximo alguns minutos (TANG e cols., 1997). Isso se deve ao fato de serem feitas várias tentativas em uma única sessão de 30-40 min. Mas, quanto maior for o intervalo entre a apresentação do estímulo e a resposta, menor foi a porcentagem de acertos dos macacos no teste de DNMS (ZOLA e cols., 2000). Isso também parece ocorrer no teste de ROL, recentemente desenvolvido em micos, uma vez que os sujeitos demonstraram um desempenho significativo após um intervalo de retenção de 10 min (MELAMED e cols., 2017a), mas não depois de 24 h (MELAMED e cols., 2017b). Para o intervalo mais longo foi sugerido que houve um processo natural de esquecimento, conforme já descrito para roedores submetidos a longos intervalos de retenção em testes de reconhecimento similares (MURAI e cols., 2007; NILSSON e CARLSSON, 2013).

De fato, há relatos de que ratos conseguem reconhecer uma mudança na localização espacial de um objeto neutro se a informação for evocada até no máximo 6 a 24 h depois da fase de aquisição/treino, a depender da duração da fase inicial de treino (NILSSON e CARLSSON, 2013; OZAWA e cols., 2011). Outros estudos já indicaram que esse intervalo é na verdade de no máximo uma (PITSIKAS, 2007) a duas horas (MURAI e cols., 2007). Quando os objetos foram apresentados aos ratos ao longo de vários dias, também houve uma discriminação significativa em termos de uma nova localização para um dos objetos vistos anteriormente (GASKIN e cols., 2009a, 2009b; HARDT e cols., 2010).

Já no teste de REO, uma discriminação entre o objeto novo e o familiar feita por camundongos foi observada após intervalos de retenção que variam de poucos minutos (p.ex., 2 min: PHENSY e cols., 2017) a algumas horas (p.ex., 2 h: LIN e cols., 2017), tendo um declínio significativo no desempenho após 24 h (LIN e cols., 2017; porém ver NADIR e cols., 2017). Em ratos e hamsters, os objetos foram corretamente distinguidos

após intervalos de até 24 h (DeBRUIN e POUZET, 2006; PALCHYKOVA e cols., 2006), mas já não depois de 48 h para ratos (CALLAHAN e cols., 2013). O desempenho de outros tipos de animais também foi analisado no teste de REO, sendo que o intervalo máximo de retenção já relatado foi de 5 min para coelhos (HOFFMAN e BASURTO, 2013; porém ver THOMPSON e cols., 2005), 1 h para suínos (MOUSTGAARD e cols., 2002) e de 1-30 min para peixes (MAY e EINSTEIN, 2013; MILETTO PETRAZZINI e cols., 2012).

Portanto, o tempo de retenção de informações acerca de objetos neutros que foram vistos anteriormente no ambiente não é somente espécie-específica, como também depende do tipo de teste sendo avaliado. Os estudos citados acima ressaltam a importância de se avaliar diferentes tempos de intervalo de retenção, pois assim se pode estudar de forma mais específica o tempo em que um indivíduo retém uma determinada informação a ser empregada para reconhecimento futuro do mesmo objeto/contexto/situação.

1.5. Calitriquídeos como modelo animal

O uso de PNH na pesquisa tem-se tornado cada vez mais controverso. Além disso, há uma exigência de uma dieta especial, de um espaço amplo, rigorosos critérios de higiene e a necessidade de interações sociais, sendo tais parâmetros um fator importante a ser levado em consideração, a fim de se evitar anormalidades comportamentais e fisiológicas ao adotar PNH como sujeitos em experimentos (STELLAR, 1960; KING e cols., 1988).

Pesquisas translacionais sobre memória empregando PNH ainda são muito válidas, sendo que esses e o homem são descendentes de um antepassado comum e, assim, divergiram há menos tempo quando comparado a outros tipos de modelos animais (MURRAY e WISE, 2010). Esse tipo de linha de pesquisa tem desfrutado de uma corrida longa e produtiva, levando a descobertas importantes sobre as funções do

hipocampo, amígdala, córtex entorrinal, córtex perirrinal e córtex parahipocampal, juntamente com as outras estruturas que compõem o lobo temporal medial.

Os calitriquídeos (micos), em particular, são uma família de PNH neotropicais. Seu uso na pesquisa tem crescido devido ao seu pequeno porte, facilidade de manejo, capacidade de reprodução em cativeiro e não apresentarem os mesmos riscos zoonóticos que outros PNH (TONUKO e cols., 2015). Eles são animais arborícolas, diurnos e, na natureza, vivem em grupos familiares. São animais altamente visuais e olfativos e se alimentam de pequenos insetos e frutas. Além disso, comparado a outros PNH (de maior porte), os micos são mais fáceis de criar em cativeiro e manter em pequenos grupos (HEARN, 1983; PRINS e cols., 2017) devido às características já citadas acima.

A estrutura cerebral dos micos, incluindo a organização cortical, compartilha muitas semelhanças com a dos humanos e de PNH maiores. Além disso, sua estrutura cortical é lisencefálica, o que pode simplificar a obtenção de gravações eletrofisiológicas de diferentes regiões (TOKUNO e cols., 2015; WALKER e cols., 2016; PRINS e cols., 2017). Ainda, o sequenciamento do genoma do *Callithrix jacchus* (*The Marmoset Genome Sequencing and Analysis Consortium*, 2014) e o desenvolvimento de animais geneticamente modificados (SASAKI, 2015) tornam o mico um modelo muito promissor.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O presente estudo teve como objetivo geral avaliar a influência do gênero, horário do dia e intervalo de retenção no desempenho de micos-estrela (*Callithrix penicillata*) adultos em uma tarefa de memória de reconhecimento recentemente desenvolvida para PNH – o teste de reconhecimento objeto-lugar (ROL).

2.2 Objetivos Específicos

Esse estudo pretendeu, de forma específica:

- a) comparar o desempenho de micos-estrela adultos machos versus fêmeas no teste de memória de ROL, empregando um intervalo de retenção de 24 h;
- b) avaliar a influência do horário do dia em que o teste de memória de reconhecimento é realizado (matutino vs. vespertino) no desempenho de micos-estrela machos, empregando um intervalo de retenção de 24 h;
- c) estabelecer o desempenho de indivíduos machos, no mesmo teste de memória de reconhecimento, após um intervalo de retenção de 24 versus 48 h.

3. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

Com base no referencial teórico descrito, pode-se destacar diferentes aspectos que evidenciam o mérito científico do presente estudo. Primeiramente, a memória é uma função central que permite adquirir, reter e usar informações do ambiente para melhor se adaptar ao mesmo, sendo que déficits acarretam prejuízos significativos aos indivíduos acometidos, envolvendo aspectos clínicos, familiares, sociais e econômicos, dentre outros. Pacientes com doenças neurodegenerativas e lesões cerebrais frequentemente apresentam um menor desempenho em tarefas de memória de reconhecimento. Contudo, vale destacar que os mecanismos neuroquímicos, as estruturas anatômicas e as respostas comportamentais relacionadas à memória de reconhecimento precisam ser melhor esclarecidos para, assim, facilitar o desenvolvimento de novas estratégias (fármaco) terapêuticas para déficits induzidos por doenças neurodegenerativas e para a neuro-reabilitação após a ocorrência de lesões cerebrais.

Nesse sentido, há limitações éticas e/ou metodológicas para estudos clínicos relacionados ao tema. Porém, a memória de reconhecimento parece ser ubíqua entre as espécies e, dessa forma, pode ser investigada também em modelos animais. Apesar de ser muito empregado em roedores, o teste de ROL só agora está sendo desenvolvido em PNH e, portanto, diferentes aspectos dessa nova ferramenta experimental precisam ser melhor estabelecidos, a exemplo do intervalo de retenção, horário do teste e diferenças/semelhanças entre gêneros.

Nesse contexto, o presente estudo contribuirá de forma significativa para o desenvolvimento de uma abordagem comportamental inédita para o estudo da memória de reconhecimento em PNH. De fato, avaliou-se a possível influência de diferentes e importantes variáveis metodológicas no desempenho dos sujeitos no teste de ROL. O desenvolvimento desse teste em PNH possibilitará a realização de estudos comparativos diretos entre primatas versus roedores.

4. METODOLOGIA

4.1. Aspectos Éticos

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília (no. 66725/2016; Anexo I). Todos os experimentos realizados seguiram a regulamentação brasileira para o uso científico de animais (Lei Arouca 11.794/2008), bem como as diretrizes para o cuidado e uso de animais de laboratório do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal do Brasil (CONCEA). Além disso, o estudo foi realizado com animais mantidos no Centro de Primatologia da UnB (CUnB), que é credenciado pelo Comissão de Ética no Uso Animal (IBAMA) como criadouro de primatas para fins científicos (registro no. 1/53/1999/000006-2). Todos os animais foram acompanhados por um médico veterinário durante e após a realização desse estudo.

4.2. Sujeitos e Condições Gerais de Alojamento e Manejo

Foram utilizados indivíduos adultos (≥ 18 meses), machos e fêmeas, da espécie mico-estrela (*Callithrix penicillata*; Fig. 2). No início do estudo, os animais pesavam em média 373 ± 38 g (média \pm erro padrão de média [epm]; variação: 295 – 545 g). O ciclo de estro das fêmeas não foi padronizado ou controlado, mas nenhuma das que foram utilizadas estava grávida no momento do estudo ou havia tido uma gestação recente.

Todos os sujeitos foram mantidos em ambiente de cativeiro no CUnB e já faziam parte do plantel, tendo sido repassados pelo IBAMA ou nascidos no próprio Centro. O CUnB está localizado na Fazenda Água Limpa da UnB, uma área de preservação ambiental, sendo que os viveiros que alojam os animais estão circundados por mata de galeria. Isso permitiu que os mesmos fossem alojados sob condições naturais de temperatura, luminosidade e umidade (Fig. 3).



Figura 2: Fotografia de um casal heterossexual adulto da espécie mico-estrela (*Callithrix penicillata*), macho à esquerda e fêmea à direita, mantido em cativeiro no Centro de Primatologia da Universidade de Brasília. (Fotografia: Marília Barros).



Figura 3: Fotografias do pavilhão para alojamento de calitriquídeos do Centro de Primatologia da Universidade de Brasília. *Esquerda:* vista interna da entrada do corredor central de segurança; *Centro:* vista externa de um dos corredores de viveiros; *Direita:* vista externa de dois viveiros. (Fotografias: Marília Barros).

Os animais foram alojados em casais heterossexuais ou grupos mistos de dois a três indivíduos no Pavilhão de Calitriquídeos do CPUUnB. Nem todos os animais de um mesmo viveiro foram empregados como sujeitos no presente estudo, devido a outros experimentos em andamento no CPUUnB. Esse pavilhão consistiu em dois corredores

paralelos com 12 viveiros cada (1 m de comprimento x 2 m de largura x 2 m de altura), separados por um corredor central de segurança, formando um sistema de alojamento semi-coberto (Fig. 3). Assim, um telhado cobriu dois terços de cada viveiro, sendo feito da telha em fibrocimento opaca e ondulada (do tipo Eternite), intercalada com telha de acrílico translúcida e ondulada. Cada viveiro tinha duas paredes laterais de alvenaria e tela metálica (malha 6 cm²) formando a parte da frente, de trás e de cima do viveiro. O chão foi feito de cimento queimado. Cada viveiro foi provido com: uma caixa-ninho de bambu (suspensa), poleiros de madeira fixados em diferentes alturas, um recipiente fixado na tela frontal para colocação de alimentos frescos, um tubo de PVC pendurado na tela do teto para colocação de ração e um bebedouro para água com sistema de acionamento manual efetuado pelos próprios ocupantes do viveiro.

A dieta consistiu em pedaços de frutas, legumes e verduras frescos, além de ovos cozidos, sementes/nozes, larvas de tenébrios e/ou peito de frango/carne moída. Esses alimentos frescos foram fornecidos uma vez ao dia, às 07:00 h, e a sobra retirada às 17:30 h. Água e ração para primatas estavam disponíveis *ad libitum*.

4.3. Aparato Experimental

O aparato empregado, o Campo Aberto (CA), consistiu em uma arena retangular de livre circulação (130 cm de largura x 75 cm de profundidade x 40 cm de altura), suspensa a 1 m do chão (Fig. 4). O CA consistiu em um chão de tela metálica (malha de 2,5 cm²), três paredes de chapa de alumínio, e uma quarta parede e o teto de vidro transparente de 4mm. Uma porta tipo-guilhotina, localizada na parede oposta à de vidro, dava acesso ao aparato. O mesmo foi pintado todo de branco para facilitar o rastreamento automático dos sujeitos pelo programa de análises comportamentais utilizado. Pistas visuais para orientação espacial dos sujeitos dentro do CA foram fornecidas por itens externos ao aparato que estavam presentes na sala de experimento.



Figura 4: Fotografias do aparato experimental do Campo Aberto utilizado nos experimentos. **Esquerda:** Vista de trás do aparato, mostrando na parte inferior da fotografia a caixa transporte acoplada ao aparato e do outro lado a parede de vidro. **Direita:** Vista de cima do aparato, podendo ver o piso na cor branca para contrastar com a cor do animal e o teto de vidro. (Fotografias: Clarissa R. da S. Vannuchi)

O aparato foi montado em uma sala de experimento situada a 50 m dos viveiros de moradia dos animais. Cada sujeito foi transportado do seu viveiro até a sala de experimento, e depois de volta ao seu viveiro, em uma caixa-transporte (35 cm largura x 20 cm de profundidade x 23 cm de altura). Essa caixa não permitiu a visualização do ambiente durante o transporte, tendo uma porta tipo-guilhotina que se acoplava diretamente à de entrada/saída do aparato do CA (Fig. 4).

A observação e o registro das sessões foram realizados via um circuito interno de filmagem. Esse sistema consistiu em duas câmeras digitais (Logitech C920, Brasil), sendo uma fixada a aproximadamente 1,5 m diretamente acima do aparato (vista superior) e a outra a 1,5 m à frente da parede de vidro do CA (vista frontal). As duas câmeras foram acopladas diretamente a um computador portátil (*laptop*) localizado em uma sala adjacente à sala de experimentos, de onde todas as sessões foram observadas e registradas usando o programa de análises comportamentais *AnyMaze* (Stoelting Co., EUA).

Empregando esse programa, o aparato foi dividido virtualmente em cinco quadrantes (Fig. 5). Os quatro quadrantes externos tinham as mesmas dimensões (32,5 cm de largura x 37,5 cm de profundidade), correspondendo aos cantos da arena retangular do CA. Esses quatro quadrantes foram utilizados como possíveis locais para

apresentação dos objetos utilizados nos testes (*vide* abaixo itens 4.4 e 4.5). O quadrante central (65 cm de largura x 37,5 cm de profundidade) foi considerado como uma zona neutra, não havendo a colocação de objetos teste nesse local. Os quadrantes não foram marcados no aparato, somente no programa *Anymaze*.

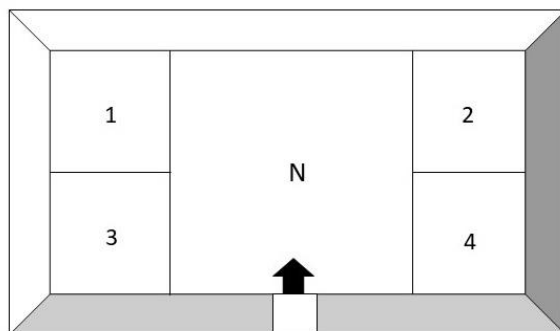


Figura 5: Representação esquemática do aparato do Campo Aberto, com indicação da divisão dos quatro quadrantes externos (1-4) que foram utilizados para posicionamento dos objetos teste durante os testes comportamentais, assim como o quadrante central neutro (N). A seta indica o ponto de acesso ao aparato via a porta do tipo-guilhotina.

4.4. Objetos

Nos testes de memória de reconhecimento descritos abaixo, duas cópias idênticas de três diferentes objetos foram utilizadas como estímulo (Fig. 6) – um objeto para cada experimento (*vide* abaixo item 4.5). Os objetos consistiram em estímulos neutros e etologicamente irrelevantes para os micos. Os sujeitos não tiveram contato com os objetos teste antes do início do presente estudo, sendo que os itens empregados tinham peso suficiente para não serem deslocados pelos micos.

Os três objetos empregados foram:

- 1) um recipiente circular de plástico (tipo *tupperware*) no formato de uma bola de futebol, nas cores branca e preta e com 11 cm de altura x 7,5 cm de diâmetro (*Experimento 1*);
- 2) uma lata de milho (de venda comercial) com 8 cm de altura x 7 cm de diâmetro (*Experimento 2*); e

- 3) um recipiente (tigela) circular de porcelana, nas cores branca, preta e cinza e com 6 cm de altura x 12 cm de diâmetro de base x 6,5 cm de diâmetro superior (*Experimento 3*).



Figura 6: Fotografias dos três objetos utilizados como estímulo no teste de Reconhecimento Objeto-Lugar realizado ao longo do procedimento experimental do presente estudo. Os objetos estão posicionados conforme foram usados nos seus respectivos experimentos. **Em cima:** recipiente de plástico no formato de bola de futebol empregado no Experimento 1; **No meio:** Lata de milho empregada no Experimento 2; e **Em baixo:** recipiente de porcelana empregado no Experimento 3. (Fotografias: Clarissa R. da S. Vannuchi)

4.5. Procedimento Experimental

O estudo foi dividido em três experimentos, conforme descrito a seguir. Os diferentes experimentos foram realizados em intervalos de, pelo menos, 20 dias. Em cada experimento, os sujeitos foram testados individualmente, sendo que alguns micos foram utilizados como sujeitos em mais de um experimento e colocados na mesma análise.

4.5.1. Experimento 1: *Influência do Gênero*

Neste primeiro experimento, comparou-se o desempenho entre indivíduos machos e fêmeas na tarefa de memória de ROL. Com isso, 10 micos-estrela adultos foram utilizados como sujeitos, sendo cinco machos e cinco fêmeas.

Todos os sujeitos foram inicialmente submetidos a uma habituação de 10 min no aparato do CA descrito acima (*vide* acima item 3.3), mas sem a presença de qualquer objeto. Os sujeitos puderam circular livremente pelo CA para se familiarizarem com esse ambiente. Cada sujeito foi, então, submetido ao teste ROL, baseado no procedimento empregado em roedores (ENNACEUR e cols., 1997), consistindo em duas sessões: uma de treino e uma de teste. Desta forma, após um intervalo de 24 h da sessão de habituação, cada sujeito foi submetido a uma sessão treino de 10 min. Nessa sessão, duas cópias exatas de um mesmo objeto foram colocadas em quadrantes externos distintos do aparato. Os dois quadrantes utilizados foram escolhidos de forma aleatória para cada sujeito. O objeto empregado como estímulo nesse experimento foi a bola de futebol (*vide* acima item 4.4; Fig. 6). Após um novo intervalo de 24 h, cada sujeito foi novamente liberado no CA, o qual continha os mesmos dois objetos vistos anteriormente na sessão treino. Um desses objetos foi colocado no mesmo local em que estava durante a sessão treino (objeto estacionário). Já o outro objeto foi posicionado em um quadrante externo novo (objeto deslocado), escolhido aleatoriamente entre os dois quadrantes do CA que na sessão treino tinham ficado vazios.

Para esse experimento, todas as sessões descritas acima foram realizadas das 08:00 às 12:00 h. Uma representação esquemática do procedimento geral encontra-se abaixo na Figura 7.

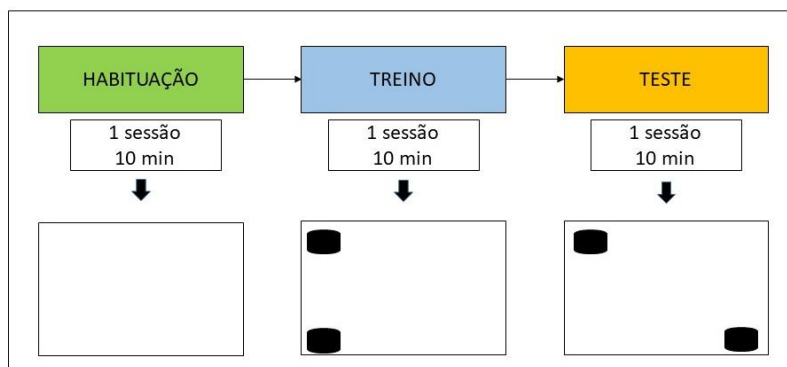


Figura 7: Representação esquemática do procedimento geral empregado nos três experimentos realizados no presente estudo, consistindo em uma sessão inicial de habituação, seguida após um intervalo de 24 h, pelo teste de *Reconhecimento Objeto-Lugar* (sessões treino + teste). O intervalo entre as sessões treino e teste variou de acordo com o experimento realizado. Os retângulos na porção inferior da figura representam a configuração de posicionamento dos objetos teste dentro do aparato Campo Aberto, sendo ilustrado aqui apenas um exemplo das possíveis disposições dos itens. O aparato permaneceu vazio na sessão de habituação.

4.5.2. Experimento 2: *Influência do Horário do Dia*

Nesse segundo experimento, comparou-se o desempenho de indivíduos machos na tarefa de memória de ROL realizada no período matutino versus no período vespertino. Para isso foram empregados como sujeitos 12 micos-estrela adultos machos. Esses foram divididos aleatoriamente em dois grupos experimentais ($n=6/\text{grupo}$). Um grupo foi submetido durante o período matutino (08:00 às 10:30 h; grupo MAT), ao mesmo teste de ROL descrito acima para o Experimento 1 (Fig. 7). Para o outro grupo, todas as sessões foram realizadas no período vespertino (14:00 às 16:30 h; grupo VES).

Resumidamente, todos os sujeitos foram inicialmente submetidos a uma sessão de habituação de 10 min no aparato do CA e sem a presença de objetos. Após um intervalo de 24 h, os sujeitos foram submetidos a uma sessão treino de 10 min no CA, sendo posicionadas duas cópias exatas de um mesmo objeto, cada um em quadrante diferente do aparato. O objeto empregado como estímulo nesse experimento foi a lata

de milho (*vide* acima item 4.4; Fig. 6). A sessão teste foi realizada 24 h depois. Sendo que, nessa sessão, um dos objetos vistos anteriormente foi deslocado para um novo quadrante no CA (objeto deslocado) e o outro objeto permaneceu no mesmo local (objeto estacionário).

4.5.3. Experimento 3: *Influência do Intervalo de Retenção*

Nesse último experimento, foi comparado o desempenho de indivíduos machos na tarefa de memória de ROL, empregando-se dois diferentes intervalos de retenção (24 x 48 h). Foi utilizado um intervalo de 24 h e 48 h, para que fosse possível avaliar intervalos mais longos e, assim, em estudos futuros utilizar fármacos que podem influenciar de forma positiva ou negativa a memória de reconhecimento no teste ROL. Para isso, foram empregados como sujeitos 10 micos-estrela adultos machos, os quais foram divididos aleatoriamente em dois grupos experimentais (n=5/grupo). Para um dos grupos o intervalo de retenção entre a sessão treino e a de teste do procedimento do ROL foi de 24 h (grupo IR24). No outro grupo, esse intervalo de retenção foi de 48 h (grupo IR48).

Todos os sujeitos foram submetidos ao mesmo procedimento já descrito acima para os Experimentos 1 e 2 (Fig. 7), contendo uma sessão de habituação ao CA, uma sessão treino e uma sessão teste. O objeto empregado neste experimento foi uma tigela circular de porcelana (*vide* item 4.4; Fig. 6) e ambos os grupos foram avaliados durante o intervalo das 08:00 às 12:00 h.

Para cada sessão descrita acima nos três Experimentos, foi adotado o mesmo procedimento. Inicialmente, o sujeito foi capturado em seu viveiro de moradia com o auxílio de luvas de couro e um puçá. Em seguida, o mesmo foi colocado na caixa-transporte e levado até a sala de experimento, onde foi liberado dentro do aparato do CA. Decorridos os 10 min da sessão, o mico foi levado de volta ao seu viveiro de moradia, novamente dentro da caixa-transporte. Após cada sessão, o aparato e os objetos (quando usados) foram limpos com uma solução de álcool 70%.

Nenhuma fêmea foi reutilizada, foram utilizados vinte e sete machos no total e seis foram utilizados em mais de um experimento.

4.6. Análise dos Dados

Todas as sessões foram registradas e analisadas via o software *AnyMaze*® (Stoelting Co., EUA) por um observador previamente treinado. Foram registrados os seguintes comportamentos:

- 1) *Locomoção* – tempo em que o sujeito esteve em movimento por um período superior a 2 s; e
- 2) *Exploração do Objeto* – tempo de contato físico do sujeito com o objeto utilizando as mãos, pés, nariz, boca ou língua, assim como os episódios de *headcock* (movimentos da cabeça de um lado ao outro olhando para o objeto), olhar direto (orientação rápida da cabeça e olhos direcionados ao objeto) e monitoramento visual (movimentos lentos de varredura da cabeça direcionados ao objeto). Vale ressaltar que micos possuem uma orientação predominantemente visual em sua resposta a estímulos em seu ambiente (FORSTER, 1995).

Para ser incluso na análise, foi estabelecido *a priori* que o sujeito deveria explorar os objetos por, pelo menos, 5 s na sessão treino. Além disso, de acordo com DERE e cols. (2007), foi determinado que memória de reconhecimento estaria evidenciada se, na sessão teste, o sujeito explorasse o objeto deslocado significativamente mais que o objeto estacionário, considerando que micos cativos exploram preferencialmente itens novos no seu ambiente (FORSTER, 1995).

Contudo, para minimizar a influência de variações inter-individuais nos níveis basais de exploração, foi calculado o seguinte índice para cada sessão teste, com base no tempo de exploração e de acordo com ENNACEUR e cols. (1997):

$$\text{Índice de Discriminação} = \frac{[(\text{exploração deslocado}) - (\text{exploração estacionário})]}{(\text{exploração total objetos})}$$

Um índice significativamente maior de zero indica que o sujeito explorou igualmente os dois objetos (ao acaso), enquanto que um índice $> 0,0$ demonstra que o sujeito explorou mais o objeto deslocado do que o estacionário, podendo ser também negativo, indicando que o indivíduo não atingiu o desempenho esperado.

4.7. Análise Estatística

Todos os sujeitos foram incluídos na análise, visto que atenderam ao critério pré-estabelecido de ter explorado os objetos por pelo menos 5 s na sessão treino. Para cada um dos experimentos realizados, os dados foram analisados para se estabelecer possíveis diferenças entre os grupos (macho x fêmea; MAT x VES; IR24 x IR48) em termos:

- 1) do tempo de exploração dos objetos estacionário x deslocado na sessão teste;
- 2) do tempo de exploração total dos objetos nas sessões treino x teste; e
- 3) da locomoção nas sessões treino x teste.

Para tanto, foi empregado o teste de Análise de Variância (ANOVA) de duas vias de desenho misto (*mixed design two-way ANOVA*), sendo 'grupo' o fator independente e o 'objeto' (estacionário x deslocado) ou 'sessão' (treino x teste) a variável dependente. Havendo diferenças significativas nas ANOVAs, os dados foram analisados posteriormente com o teste de Tukey. Além disso, para o *Índice de Discriminação*, os dados foram analisados usando o teste t para uma amostra (*one-sample t test*) em comparação ao valor de zero. O nível de significância de $p < 0,05$ foi adotado em todos os testes.

5.0. RESULTADOS

5.1. Experimento 1: *Influência do Gênero*

Nesse primeiro experimento, que comparou o desempenho de micos-estrela adultos machos vs. fêmeas no teste de memória de ROL, foi possível observar que ambos os grupos exploraram o objeto deslocado por significativamente mais tempo que o item estacionário (*fator objeto*: $F_{1,8}=7,61$; $p=0,03$; *fator gênero*: $F_{1,8}=0,37$; $p=0,55$; *interação*: $F_{1,8}=0,36$; $p=0,56$; Fig. 8A). Esse dado foi corroborado pelo Índice de Discriminação, uma vez que, novamente para ambos os grupos, o valor observado foi significativamente maior que zero (ao acaso) (*machos*: $t_4=4,34$; $p=0,01$; *fêmeas*: $t_4=10,04$; $p=0,001$; Fig. 8B), demonstrando assim que os sujeitos de fato exploraram mais o objeto deslocado do que o estacionário.

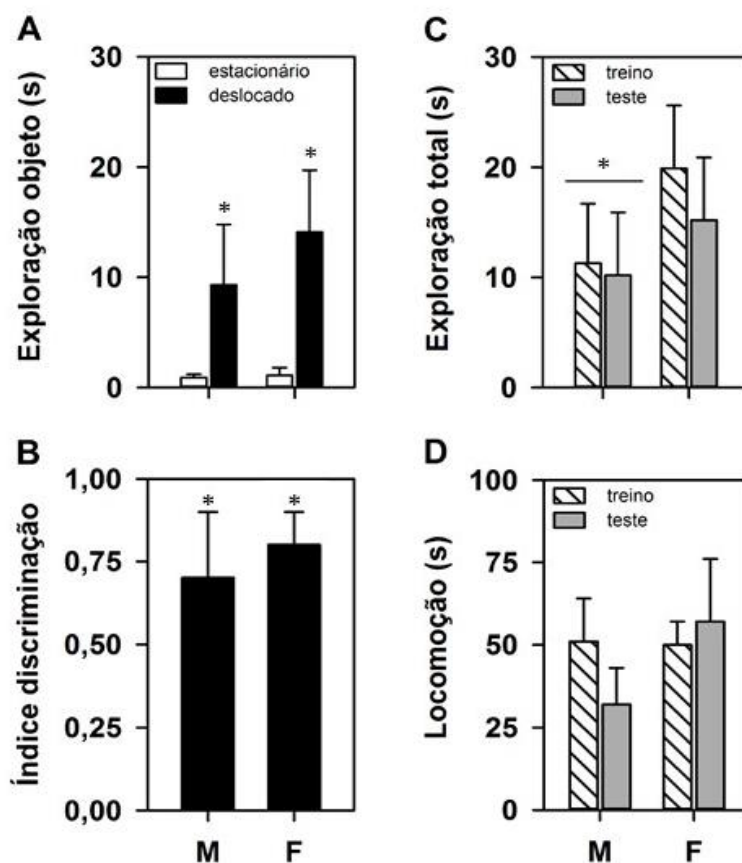


Figura 8: Desempenho dos micos-estrelas machos (M; n=5) e fêmeas (F; n=5) no teste de ROL do *Experimento 1* (influência do gênero). **(A)** Tempo (em segundos) de exploração dos objetos estacionário e deslocado na sessão teste; **(B)** Índice de Discriminação calculado para a sessão teste; **(C)** Tempo (em segundos) de exploração total dos objetos nas sessões treino e teste; e **(D)** Tempo (em segundos) despendido em locomoção durante as sessões treino e teste. Todos os dados estão expressos como média \pm epm; * $p<0,05$ vs. objeto estacionário do seu respectivo grupo (gráfico A) ou vs. valor de zero (gráfico C) ou vs. o grupo das fêmeas (gráfico B).

Em termos da exploração total dos objetos, foi observado um nível significativamente maior nas fêmeas do que nos machos, tanto na sessão treino quanto na sessão teste (treino x teste; *fator sessão*: $F_{1,8}=0,23$; $p=0,65$; *fator gênero*: $F_{1,8}=29,87$; $p=0,001$; *interação*: $F_{1,8}=0,09$; $p=0,77$; Fig. 8C). Já para a locomoção, não foram detectadas diferenças significativas entre os gêneros ou as sessões experimentais (*fator sessão*: $F_{1,8}=0,79$; $p=0,40$; *fator gênero*: $F_{1,8}=0,46$; $p=0,52$; *interação*: $F_{1,8}=3,59$; $p=0,10$; Fig. 8D).

5.2. Experimento 2: *Influência do Horário do Dia*

No segundo experimento, referente à influência do ciclo circadiano no desempenho dos micos adultos machos no teste de memória de ROL, observou-se que o objeto deslocado foi explorado significativamente por mais tempo que o item estacionário, independente do horário do dia em que o experimento foi realizado (i.e., matutino vs. vespertino; *fator objeto*: $F_{1,10}=9,13$; $p=0,01$; *fator grupo*: $F_{1,10}=0,002$; $p=0,97$; *interação*: $F_{1,10}=0,12$; $p=0,74$; Fig. 9A). Esse mesmo perfil de resposta também se refletiu no Índice de Discriminação, no qual os dois grupos obtiveram um valor significativamente acima de zero (ao acaso), o que indica que o objeto deslocado foi explorado mais do que o estacionário (*grupo MAT*: $t_5=3,82$; $p=0,01$; *grupo VES*: $t_5=3,17$; $p=0,03$; Fig. 9B).

Com relação à exploração total dos objetos registrada nas sessões treino e teste, foi observado que na sessão teste os itens empregados como estímulo foram explorados por um período de tempo significativamente menor que os níveis vistos na sessão treino. Contudo, esse efeito foi detectado apenas no grupo MAT (*fator sessão*: $F_{1,10}=16,07$; $p=0,002$; *fator grupo*: $F_{1,10}=2,31$; $p=0,16$; *interação*: $F_{1,10}=2,96$; $p=0,12$; Fig. 9C). Os níveis da atividade locomotora não diferiram significativamente entre os grupos ou as sessões experimentais (*fator sessão*: $F_{1,10}=2,15$; $p=0,17$; *fator grupo*: $F_{1,10}=1,11$; $p=0,32$; *interação*: $F_{1,10}=0,10$; $p=0,76$; Fig. 9D)

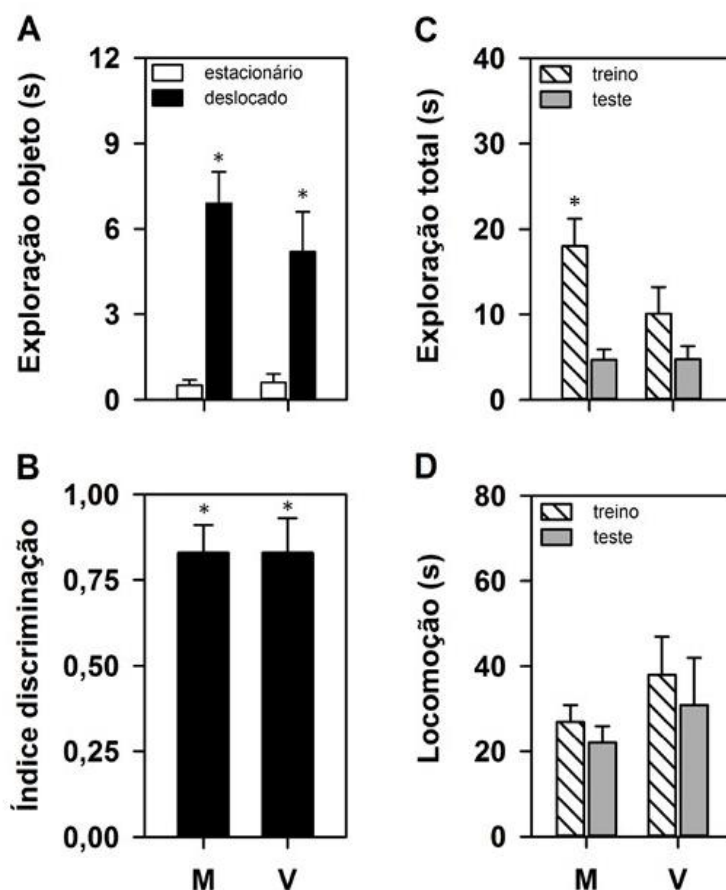


Figura 9: Desempenho dos micos-estrelas machos no teste de ROL do *Experimento 2* (influência do ciclo circadiano), quando submetidos ao procedimento no período matutino (M; n=6) ou vespertino (V; n=6). **(A)** Tempo (em segundos) de exploração dos objetos estacionário e deslocado na sessão teste; **(B)** Índice de Discriminação calculado para a sessão teste; **(C)** Tempo (em segundos) de exploração total dos objetos nas sessões treino e teste; e **(D)** Tempo (em segundos) despendido em locomoção durante as sessões treino e teste. Todos os dados estão expressos como média±epm; *p<0,05 vs. objeto estacionário do seu respectivo grupo (gráfico A) ou vs. valor de zero (gráfico B) ou vs. a sessão teste do grupo matutino (gráfico C).

5.3. Experimento 3: *Influência do Intervalo de Retenção*

No último experimento realizado, o qual comparou o desempenho dos micos adultos machos no teste de memória de ROL após um intervalo de retenção de 24 vs. 48 h, foi observado que, apenas para o grupo avaliado no intervalo de 24 h, o tempo de exploração do objeto deslocado foi significativamente maior que o do objeto estacionário (*fator objeto*: $F_{1,8}=12,72$; $p=0,007$; *fator grupo*: $F_{1,8}=2,91$; $p=0,13$; *interação*: $F_{1,8}=16,05$; $p=0,004$ Fig. 10A). Esse resultado foi novamente corroborado pelo Índice de Discriminação, que gerou um valor significativamente maior que zero apenas para o

grupo avaliado após um intervalo de retenção de 24 h (*grupo 24h*: $t_4=19,54$; $p=0,001$; *grupo 48h*: $t_4=0,69$; $p=0,53$; Fig. 10B).

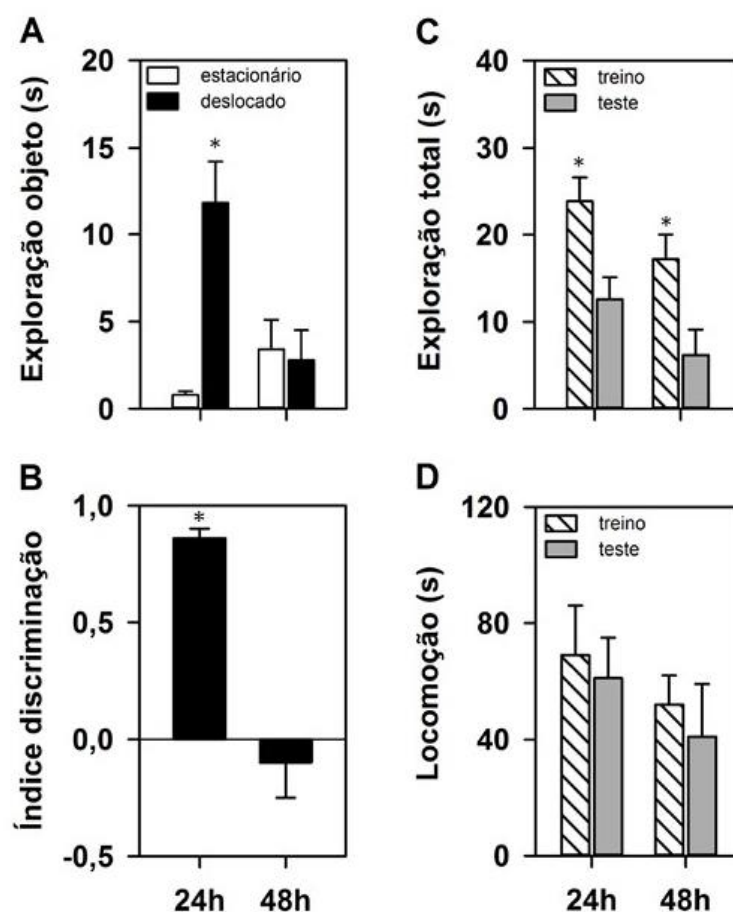


Figura 10: Desempenho dos micos-estrelas machos no teste de ROL do *Experimento 3* (influência do intervalo de retenção), quando submetidos a sessão teste do procedimento após um intervalo de 24 h ($n=5$) ou 48 h ($n=5$). **(A)** Tempo (em segundos) de exploração dos objetos estacionário e deslocado na sessão teste; **(B)** Índice de Discriminação calculado para a sessão teste; **(C)** Tempo (em segundos) de exploração total dos objetos nas sessões treino e teste; e **(D)** Tempo (em segundos) despendido em locomoção durante as sessões treino e teste. Todos os dados estão expressos como média \pm epm; * $p<0,05$ vs. objeto estacionário do seu respectivo grupo (gráfico A) ou vs. valor de zero (gráfico B) ou vs. a sessão teste do respectivo grupo (gráfico C).

A análise da exploração total dos objetos nas duas sessões experimentais do teste de ROL indicou que, independente do intervalo de retenção que foi empregado, os micos exploraram os estímulos por um período significativamente maior na sessão treino comparado aos níveis vistos na sessão teste (*fator sessão*: $F_{1,8}=15,01$; $p=0,005$; *fator grupo*: $F_{1,8}=6,15$; $p=0,04$; *interação*: $F_{1,8}=0,002$, $p=0,97$; Fig. 10C). Os níveis de

locomoção foram semelhantes entre os grupos e as sessões experimentais (*fator sessão*: $F_{1,8}=1,52$; $p=0,25$; *fator grupo*: $F_{1,8}=0,86$; $p=0,38$; *interação*: $F_{1,8}=0,04$; $p=0,85$; Fig. 10D).

6. DISCUSSÃO

6.1. Influência do Gênero

O desempenho dos micos machos e fêmeas no teste de memória de ROL demonstrou que ambos os gêneros foram capazes de reconhecer uma mudança na localização espacial de um objeto visto anteriormente em seu ambiente. Micos cativos tendem a explorar mais itens novos no seu ambiente do que aqueles que são mais familiares (FORSTER, 1995) e, na sessão teste do presente estudo houve uma exploração significativamente maior do objeto deslocado do que o objeto estacionário por ambos os gêneros.

Ao se analisar estudos realizados em roedores, observa-se que os machos possuem um melhor desempenho em relação às fêmeas ao lembrarem da localização de objetos após um período de retenção (SUTCLIFFE e cols., 2007). Outras tarefas em que os machos costumam exibir maiores vantagens são: aprender a navegar em labirintos e localizar recompensas no ambiente (JONASSON, 2005; SUTCLIFFE e cols., 2007; COST e cols., 2012). Em humanos, assim como nos animais, também há uma diferença de gênero. Tarefas que requerem contextos espaciais são geralmente melhor desempenhadas por homens do que por mulheres (HAMPSON, 1990; LUINE, 2014). Em um estudo realizado, não foi detectada uma diferença entre machos e fêmeas em um teste de preferência condicionada por lugar (*conditioned place preference*; CPP) realizado em micos-estrela (MONCLARO e cols., 2014). Em outros estudos já realizados que também investigaram aspectos da memória espacial de micos, a questão de uma possível diferença entre gêneros não foi avaliada (EASTON e cols., 2003; MACDONALD e cols., 1994; YAMAZAKI e cols., 2016).

A diferença entre os resultados observados no presente estudo e os de trabalhos anteriores descritos na literatura para o teste de ROL em roedores pode ser devido a vários fatores. No presente estudo, por exemplo, não houve um controle do ciclo estral das fêmeas de micos-estrela, por não ser um procedimento sempre realizado no Centro de Primatologia e não ser o objetivo do trabalho. Desta forma, não foi possível

determinar em que fase do ciclo e/ou os níveis hormonais circulantes que cada sujeito estava no momento que a tarefa de ROL foi realizada. Contudo, os hormônios gonadais podem influenciar vários tipos de memória (LUINE, 2014). Em ratas, o desempenho parece variar ao longo do ciclo estral e, por conseguinte nos níveis circulantes dos seus hormônios sexuais. Quando os níveis de estradiol e progesterona estão naturalmente elevados, ou após serem administrados sistemicamente, o desempenho desse gênero melhora em tarefas como o labirinto aquático de Morris e o labirinto radial (DOHANICH, 2002). Sabe-se também que, após a administração de estradiol em ratas ovariectomizadas, há uma reversão dos déficits observados pós-cirurgicamente em termos da capacidade de reconhecimento de objetos e na localização de objetos (FERNANDEZ e cols., 2004; FRYE e cols., 2007; LUINE e cols., 2010; JACOME e cols., 2010; LI e cols., 2004., VAUCHER e cols., 2002., WALF e cols., 2009; 2008; 2006; COST e cols., 2012).

Outro fator a ser considerado para as discrepâncias observadas entre os estudos seria uma possível diferença entre espécies. Conforme será discutido melhor adiante, uma memória de reconhecimento espacial no teste de ROL em roedores geralmente não é detectada após longos intervalos de retenção (até 6-24 h; NILSSON e CARLSSON, 2013; OZAWA e cols., 2011). Em termos do simples reconhecimento de objetos, ratos, camundongos e hamsters também parecem diferir quanto ao tempo limite de retenção da informação (CALLAHAN e cols., 2013; LIN e cols., 2017; PHENSY e cols., 2017). No presente estudo, os micos de ambos os gêneros foram capazes de realizar a tarefa de ROL em um intervalo de retenção de 24 h. Isso sugere que diferenças entre as espécies podem existir, com PNH retendo informações a respeito de objetos e a localização de objetos por períodos mais longos que roedores.

Nesse sentido, também é possível que o intervalo de retenção nos testes de REO e ROL seja um fator importante na detecção de diferenças entre os gêneros. No teste de REO, por exemplo, já foi relatado que a diferença de desempenho entre os ratos machos e fêmeas depende do intervalo de retenção. Somente os machos foram

capazes de discriminar corretamente o objeto novo do objeto familiar após intervalos mais longos (1-3 h vs. 0,5-1 h, em machos e fêmeas, respectivamente; COST e cols., 2012; SUTCLIFFE e cols., 2007). Ao se comparar o desempenho dos dois gêneros no presente estudo, foi avaliado apenas o intervalo de retenção de 24 h. Portanto, novos estudos empregando diferentes intervalos de retenção, maiores ou menores que 24 h, são necessários para se melhor avaliar a diferença entre gênero.

O desempenho dos sujeitos no experimento não foi influenciado pela atividade locomotora. Na verdade, os níveis de locomoção dos machos e das fêmeas não só foram equivalentes, como não diferiram entre as sessões treino e teste. Além disso, para ambos os gêneros, nota-se que o nível de exploração total dos objetos foi semelhante entre as sessões treino e teste. Isso sugere que a motivação dos sujeitos em explorar o objeto não mudou ao longo do teste de memória de ROL.

Porém, os machos exploraram os objetos por um período de tempo significativamente menor que as fêmeas, independente da sessão. As características específicas do objeto (material, formato, cor, textura, etc.) do presente experimento podem ter contribuído, em parte, para essa tendência natural das fêmeas em explorar mais o estímulo.

6.2. Influência do Horário do Dia

O horário do dia em que o procedimento foi realizado não influenciou o desempenho dos micos na tarefa de reconhecimento espacial. Os animais treinados e testados no período da manhã e da tarde tiveram uma resposta semelhante no teste de ROL, passando de novo significativamente mais tempo explorando o objeto deslocado do que o item estacionário durante a sessão teste.

Contudo, já foi relatado um efeito significativo do horário do dia na memória dos micos (MONCLARO e cols., 2014). Comparado aos animais treinados e testados no período da manhã ou em períodos contrários, apenas os micos avaliados no período da tarde adquiriram um comportamento de preferência-por-lugar condicionado à presença

de um reforço alimentar (*conditioned place preference*, CPP). Portanto, o horário do dia pode sim estar influenciando os processos de memória, mas este efeito depende da tarefa sendo realizada. Apesar dos testes de CPP e ROL dependerem de uma memória espacial, os dois procedimentos avaliam aspectos diferentes. O primeiro refere a uma memória do tipo não-declarativa de condicionamento, enquanto que, no segundo, é uma memória declarativa. Além disso usa-se, no CPP, um estímulo com alto conteúdo emocional positivo (alimento), enquanto que, no teste de ROL, o estímulo é um objeto neutro.

Ainda é necessário realizar estudos específicos sobre a influência do horário do dia na memória de reconhecimento de PNH. Porém, estudos com roedores tem gerado resultados controversos. COSTA e RIPPERGER (2015) observaram um traço de memória forte em ratos quando a aquisição e evocação da informação foram no mesmo horário do dia, sendo a resposta menor quando os processos se deram em horários diferentes. Por outro lado, SHIMIZU e cols. (2015) viram que camundongos treinados na fase escura e testados 12 h depois na fase clara tinham um desempenho satisfatório, mas que eles não conseguiam distinguir entre os dois objetos quando o treino foi na fase clara e o teste 12 h depois na fase escura. Já em hamsters, MÜLLER e cols. (2015) relataram que os animais reconheceram os objetos ao longo de vários momentos do seu período de atividade e, até mesmo, uma hora antes do início de atividade normal.

A ausência de um efeito significativo do horário do dia na memória de reconhecimento espacial dos micos pode estar relacionada a aspectos da sua ecologia comportamental. Calitriquídeos são uma família de pequenos PNH arborícolas, crípticos e diurnos (STEVENSON e RYLANDS, 1988). Na natureza eles vivem tipicamente em grupos familiares de 2-10 animais (FERRARI e DIGBY, 1996) e tem dois grandes horários de pico de atividade ao longo do dia – início da manhã e meio da tarde (ALONSO e LANGGUTH, 1989, DE CASTRO e cols., 2003). Por isso o teste foi realizado somente no período matutino e vespertino, devido aos horários de pico. Durante esses períodos, os membros do grupo geralmente se espalham na copa das

árvores para procurar frutos e insetos, além de retornarem a árvores já bem conhecidas em seu território para obter goma (STEVENSON e RYLANDS, 1988). Vale ressaltar também que os micos são altamente vulneráveis a ataques de predadores aéreos (aves) e terrestres (gatos selvagens e serpentes) (FERRARI e cols., 2009). Portanto, eles parecem ter desenvolvido uma boa memória espacial e de reconhecimento de objetos para poderem lembrar rapidamente da localização de alimentos (BICCA-MARQUES e GARBER, 2004) e de indícios da presença de predadores encontrados anteriormente em seu ambiente (FERRARI e FERRARI, 1990). Mas, considerando o padrão de atividade desses animais ao longo do dia, tais habilidades cognitivas não parecem estar necessariamente restritas e/ou favorecidas a um único período do dia.

O desempenho dos micos, nesse experimento, não foi influenciado por mudanças no padrão de locomoção dos sujeitos, uma vez que os níveis se mantiveram constantes entre as sessões treino e teste e em valores semelhantes nos dois grupos. Porém, no grupo MAT, o tempo de exploração total dos objetos na sessão teste foi significativamente menor que o da sessão treino. Esse resultado pode ser um indicativo de uma diminuição na motivação dos sujeitos em explorar os objetos ao longo do procedimento. Contudo, mesmo com uma menor exploração na sessão teste, os micos do grupo MAT passaram significativamente mais tempo explorando o objeto que havia sido deslocado. Foram utilizados alguns dos mesmos sujeitos do experimento anterior, porém não parece ter sido um fator muito importante, visto que esses sujeitos foram alocados em ambos os grupos (MAT e VES) e que não houve uma grande variação inter-individual em termos do tempo de exploração total dos objetos nas sessões treino e teste.

6.3. Influência do Intervalo de Retenção

Os micos-estrela demonstraram ter uma memória de reconhecimento espacial após um intervalo de retenção de até 24 h. Esse resultado foi visto nos dois experimentos anteriores, assim como no Experimento 3, que avaliou especificamente

esse fator. Na sessão teste do último experimento, o tempo de exploração do objeto deslocado foi significativamente maior do que o do objeto estacionário, mas apenas no grupo IR24. Para esses animais, a sessão teste ocorreu 24 h depois do contato inicial com os objetos na sessão treino. No grupo IR48, que foi testado somente 48 h depois da sessão treino, o tempo de exploração dos dois objetos foi igual.

A ausência de uma memória de reconhecimento após longos intervalos de retenção pode ser devido ao fato do indivíduo não estar suficientemente familiarizado com o objeto (AKKERMAN e cols., 2012; OZAWA e cols., 2011). Se a fase de treino for muito curta, o indivíduo não terá tempo hábil para explorar e se familiarizar com os objetos e sua localização. De fato, o teste de REO e suas diversas vertentes (como o ROL) estão baseados na premissa de que o indivíduo tem a tendência natural de explorar o que é novo no ambiente, e para poder fazer isso ele é então capaz de identificar o que lhe é mais familiar (ENNACEUR e DELACOUR, 1988). Por outro lado, um intervalo de familiarização muito longo pode levar a uma exploração excessiva do objeto e, assim, o indivíduo vem a futuramente perder interesse/motivação por esse item (AMEEN-ALI e EACOTT, 2015), considerando que o mesmo tem uma valência neutra.

Estudos recentes em roedores têm mostrado que a capacidade de reter a informação nos testes de REO (AKKERMAN e cols., 2012; ALBASSER e cols., 2009; GASKIN e cols., 2010) e de ROL (OZAWA e cols., 2011) será maior a medida que a fase de treino for mais longa, mas que esse efeito tende a atingir um platô. Contudo, o tempo de exploração na fase de treino não parece estar relacionado ao desempenho do indivíduo nesses testes de memória (AKKERMAN e cols., 2012; OZAWA e cols., 2011).

Em estudos anteriores usando o teste de ROL em micos, os sujeitos também tiveram um período inicial de 10 min para explorarem os objetos e, após um intervalo de retenção de 10 min, eles foram capazes de reconhecer a mudança de localização de um dos itens vistos anteriormente (MELAMED e cols., 2017a, 2017b). Portanto, 10 min de familiarização com o objeto e sua localização parecem ser suficientes para gerar uma

memória de reconhecimento nessa espécie. Assim, a falta de memória após 48 h, no presente estudo, não deve ser devido a uma pouca familiarização prévia com o objeto.

Com um intervalo de retenção muito longo – como no caso de 48 h do grupo IR48 – pode ter ocorrido um processo natural de declínio nesse tipo de memória. Conforme já mencionado anteriormente, o item usado como estímulo nos testes de REO e ROL é um objeto neutro e apenas estímulos (ou situações) com algum tipo de valência emocional (positiva ou negativa) são lembrados por períodos bem prolongados (p.ex., dias, semanas ou a vida toda). Em roedores, a memória de reconhecimento espacial de estímulos neutros parece ser retida por períodos de 6 a 24 h, dependendo da duração da fase inicial de aquisição/treino, conforme discutido acima (NILSSON e CARLSSON, 2013; OZAWA e cols., 2011). Mas alguns estudos até indicam que a retenção máxima de ratos no teste de ROL seria de uma (PITSIKAS, 2007) ou duas horas (MURAI e cols., 2007). Em outros animais o tempo de retenção pode variar de até 24 h para hamsters (DeBRUIN e POUZET, 2006; PALCHYKOVA e cols., 2006), 1 h para suínos (MOUSTGAARD e cols., 2002), 5 min para coelhos (HOFFMAN e BASURTO, 2013) e 1-30 min para peixes (MAY e cols., 2016; MILETTO PETRAZZINI e cols., 2012).

No estudo realizado por MELAMED e cols. (2017b), os micos não apresentaram uma memória de reconhecimento no teste de ROL após um intervalo de retenção de 24 h, contrariando os resultados do presente estudo. Apesar de ambos os estudos terem uma fase de treino de 10 min, no presente experimento foram utilizados apenas machos e uma tigela circular de porcelana nas cores branco, preto e cinza, enquanto que, no estudo anterior, machos e fêmeas foram testados usando um recipiente de plástico (*tupperware*) marrom no formato de um *cupcake*. Não houve uma comprovação de que os estímulos pudessem ter influenciado de forma significativa um grupo experimental ou outro, visto que todos os objetos eram neutros. Portanto, diferenças metodológicas podem ter contribuído para essa diferença entre esses estudos. Tal aspecto também é atribuído para explicar divergências entre estudos com roedores, uma vez que ainda

não há um consenso em termos das condições ideais para se gerar a maior preferência pela novidade e, assim, uma melhor memória de reconhecimento (AINGE e cols., 2006).

Quando há um objeto novo no ambiente, processos de detecção, atenção e motivação em explorar são demonstrados pelo sujeito. Os animais ficam alertas e precisam examiná-lo de perto ou distalmente, dependendo do risco. Por outro lado, se algo familiar estiver presente, exigirá atenção e reavaliação. Assim, o estímulo será explorado até perder sua novidade. A diminuição do interesse significa que o objeto se tornou familiar, e está diretamente relacionado com o intervalo de retenção. Em intervalos mais longos, a memória de objetos familiares se torna mais fraca, enquanto que, em intervalos mais curtos, fica quase intacta (ANTUNES e BIALA, 2012; ENNACEUR, 2010).

No presente estudo, tanto o grupo IR24 quanto IR48 exploraram os objetos por um período significativamente maior na sessão treino do que no teste, indicando uma possível alteração na motivação do sujeito em explorar os objetos ao longo do procedimento. Mesmo com um menor nível de exploração total na sessão teste, os animais do grupo IR24 exploraram quase que exclusivamente o objeto deslocado, o que não ocorreu no grupo IR48. Os níveis de locomoção, por sua vez, permaneceram constantes e, assim, não influenciaram o desempenho dos micos no teste.

7. CONCLUSÕES

No presente estudo foi possível estabelecer que, micos-estrela adultos machos como fêmeas apresentam um desempenho no teste de ROL utilizando um intervalo de 24 h, reconhecendo a mudança de localização espacial de um objeto visto anteriormente em seu ambiente. Além disso, o horário do dia (matutino vs. vespertino) não influenciou de forma significativa a memória de reconhecimento espacial dos micos, pelo menos nas condições experimentais do presente experimento (i.e., machos, teste de ROL, intervalo de retenção de 24 h). Por fim, os micos demonstraram reter informações sobre a localização de objetos no teste de ROL por um intervalo de retenção de até 24 h, havendo um declínio possivelmente natural nesse tipo de memória após intervalos mais longos, como 48 h.

No entanto, faz-se necessário novos estudos para que se possa avaliar melhor as diferentes variáveis que podem influenciar a memória de reconhecimento espacial dos micos. No futuro, pode-se levar em consideração o uso de intervalos mais longos, outros objetos como estímulo, o controle do ciclo hormonal das fêmeas e até a aplicação deste teste em outras espécies de PNH. Além disso, novos estudos poderão contribuir para um melhor entendimento da influência do ciclo circadiano na memória de ROL, como: horários mais específicos do dia, treinar e testar em horários diferentes, intervalos de retenção maiores/menores, coincidência ou não do momento treino-teste, objetos diferentes e avaliando de forma conjunta com diferenças de gênero, diferença entre as idades e até mesmo avaliar um único sujeito aplicando as três variáveis.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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. *Behav. Brain Res.* 167, 183-195.

Aggleton, J., Shaw, C. 1996. Amnesia and recognition memory: a re-analysis of psychometric data. *Neuropsychologia.* 34, 51-62.

Aggleton, J. 1985. One-trial object recognition by rats. *Q. J. Exp. Psychol.* 37, 279-294.

Akkerman, S., Blokland, A., Reneerkens, O., Goethem, N., Bollen, E., Gijssels, H., Lieben, C., Steinbusch, H., Prickaerts, J., 2012. Object recognition testing: Methodological considerations on exploration and discrimination measures. *Behav. Brain Res.* 232, 335-347.

Albrecht, U., 2011. The circadian clock, reward, and memory. *Front. Mol. Neurosci.* 4, 1-5.

Amantea, D., Russo, R., Bagetta, G., Corasaniti, M., 2005. From clinical evidence to molecular mechanisms underlying neuroprotection afforded by estrogens. *Pharmacol. Res.* 52, 119-32.

Ameen-Ali K., Eacott, A., 2015. Moving beyond standard procedures to assess spontaneous recognition memory. *Neurosc. Biohev. Rev.* 53, 37-51.

Antunes, M., Biala, G., 2012. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cogn. Process.* 13, 93-110.

Bachevalier, J., Beauregard, M., 1993. Maturation of medial temporal lobe memory functions in rodents, monkeys, and humans. *Hippocampus.* 3, 191-202.

Bachevalier, J., Nemanic, S., Alvarado, M., 2015. The influence of context on recognition memory in monkeys: effects of hippocampal, parahippocampal and perirhinal lesions. *Behav. Brain Res.* 285, 89-98.

Baddeley, A., 1995. Working memory. In: M.S. Gazzaniga. The cognitive neuroscience. 755-764.

Baddeley, A., 2007. Working memory, thought and action. New York: Oxford University Press.

Bicca-Marques, J., Garber, P., 2004. Use of spatial, visual, and olfactory information during foraging in wild nocturnal and diurnal anthropoids: A field experiment comparing *Aotus*, *Callicebus*, and *Saguinus*. *Am. J. Primatol.* 62, 171-187.

Callahan, P., Hutchings, E., Kille, N., Chapman, J., Terry, A., 2013. Positive allosteric modulator of $\alpha 7$ nicotinic-acetylcholine receptors, PNU-120596 augments the effects of donepezil on learning and memory in aged rodents and non-human primates. *Neuropharmacology* 67, 201-212.

Castro, A., Carvalho, M., Costa, A., Machado, A., 2013. A percepção do tempo: contributos do procedimento de bissecção. *Temas em Psicologia.* 21, 49-70.

Clark, R., Martin, S., 2005. Interrogating rodents regarding their object and spatial memory. *Curr. Opin. Neurobiol.* 15, 593-598.

Cost, K., Williams-Yee, Z., Fustok, J., Dohanich, G., 2012. Sex differences in object-in-place memory of adult rats. *Behav. Neurosci.* 126, 457-464.

Costa, S., Ripperger, J., 2015. Impact of the circadian clock on the aging process. *Front. Neurol.* 6, 43.

Cutter, J., Norbury, R., Murphy, D., 2003. Oestrogen, brain function, and neuropsychiatric disorders. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 74, 837-840.

De Bruin, N., Pouzet, B., 2006. Beneficial effects of galantamine on performance in the object recognition task in Swiss mice: deficits induced by scopolamine and by prolonging the retention interval. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 85, 253-260.

de Castro, C.S.S., de Menezes, A.L., Moreira, L.F.D., 2003. Locomotor activity rhythm in free-ranging common marmosets (*Callithrix jacchus*). *Biol. Rhythm Res.* 34, 23-30.

De Lima, M., Torres, J., Dornelles, A., Scalco, F., Roesler, R., Garcia, V., Schröder, N., 2011. Modulatory influence of dopamine receptors on consolidation of object recognition memory. *Neurobiol. Learn. Mem.* 95, 305-310.

Dohanich, G., 2002. Gonadal steroids, learning and memory. *Horm. Brain Behav. Academic.* 2, 265-327.

Ennaceur, A., Delacour, J. 1988. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. *Behav. Brain. Res.* 31, 47-59.

Ennaceur, A., Neave, N., Aggleton, J., 1997. Spontaneous object recognition and object location memory in rats, the effects of lesions in the cingulate cortices, the medial prefrontal cortex, the cingulum bundle and the fornix. *Exp. Brain Res.* 113, 509-519.

Ferrari, S., Ferrari, M. 1990. Predator avoidance behavior in the buffy-headed marmoset, *Callithrix flaviceps*. *Primates* 31, 323–338.

Ferrari, S., Digby, L. 1996. Wild *Callithrix* groups: stable extended families? *Am. J. Primatol.* 38, 19-27.

Ferrari, P., Bonini, L., Fogassi, L., 2009. From monkey mirror neurons to primate behaviours: possible 'direct' and 'indirect' pathways. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 364, 2311-2323.

Forster, F., 1995. Exploratory behavior and learning in laboratory marmosets (*Callithrix jacchus jacchus*): comparison between experimental-cage and home-cage activity. *Primates.* 36, 501-514.

Frye, C., 1995. Estrus-associated decrements in a water maze task are limited to acquisition. *Physiol Behav.* 57, 5-14.

Garren, M., Sexauer, S., Page, T., 2013. Effect of circadian phase on memory acquisition and recall: operant conditioning vs. classical conditioning. *PLoS One* 8, e58693.

Gaskin, S., Tardif, M., Cole, E., Piterkin, P., Kayello, L., Mumby, D., 2010. Object familiarization and novel-object preference in rats. *Behav. Process.* 83, 61–71.

Hardt, O., Einarsson, E., Nader, K. 2010 A bridge over troubled water: reconsolidation as a link between cognitive and neuroscientific memory research traditions. *Annu. Rev. Psychol.* 61, 141-167.

Hausmann, M., Goozen, S., Kettenis, P., 2000. Sex hormones affect spatial abilities during the menstrual cycle. *Behav. Neurosci.* 114, 1245-1250.

Hill, C., 2010. *Consciousness*. Cambridge, UK: Cambridge University Press.

Hoffman, K., Basurto, E., 2013. One-trial object recognition memory in the domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) is disrupted by NMDA receptor antagonists. *Behav. Brain Res.* 250, 62-73.

Inagaki, T., Gautreaux, C., Luine, V., 2010. Acute estrogen treatment facilitates recognition memory consolidation and alters monoamine levels in memory-related brain areas. *Horm. Behav.* 58, 415-426.

Izquierdo, I. 2011. *Memória* (2. ed.). Porto Alegre, RS: Artmed.

Izquierdo, I., Myskiw, J., Benetti, F., Furini, C., 2013. Memória: tipos e mecanismos – achados recentes. *Revista USP, São Paulo.* 98, 9-16.

Jaeger, A., 2016. *Memória de Reconhecimento: Modelos de Processamento Simples versus Duplo*. Psico-USF. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil. 21, 551-560.

Kandel, E., 2006. *In search of memory: The emergence of a new science of mind*. New York: W. W. Norton & Company.

Kimura, D., Hampson, E., 1994. Cognitive pattern in men and women is influenced by fluctuations in sex hormones. *Am. Psychol. Society.* 3, 57-61.

King, F., Yarbrough, C., Anderson, D., Gordon, T., Gould, K., 1988. *Primates*. *Science.* 240, 1475-1482.

Kinnavane, L., Albasser, M., Aggleton, J., 2015. Advances in the behavioural testing and network imaging of rodent recognition memory. *Behav. Brain Res.* 15, 67-78.

Lacreuse, A., Herndon, J., 2000. Cognitive function in aged ovariectomized female rhesus monkeys. *Behav. Neurosci.* 114, 506-513.

Lee, H., Lyketsos, C., 2003. Depression in Alzheimer's disease: heterogeneity and related issues. *Biol. Psychiatry.* 54, 353-362.

Li, B., Mao, X., Wang, Y., Guo, C., 2017. Electrophysiological correlates of familiarity and recollection in associative recognition: contributions of perceptual and conceptual processing to unitization. *Front. Hum. Neurosci.* 11, 1-12.

Lin, T., Dumigan, N., Good, M., Honey, R., 2017. Conditioning with spatio-temporal patterns: Constraining the contribution of the hippocampus to configural learning. *Neurobiol. Learn. Mem.* 142, 244-251.

Lokesh, N., Janodia, M., Muddukrishna, B., Bhat, K., Bairy, K., Udupa, N., Musmade, P., 2013. Informed consent: Issues and challenges. *J. Adv. Pharm. Technol. Res.* 4, 134-140.

Luine, V., 2008. Sex steroids and cognitive function. *J. Neuroendocrinol.* 20, 866-872.

Luine, V., 2014. Estradiol and cognitive function: past, present and future. *Horm. Behav.* 66, 602-618.

May, C.; Einstein, G., 2013. Memory. A five-day unit lesson plan for high school psychology teachers. TOPSS. American Psychological Association.

Melamed, J., de Jesus, F., Aquino, J., Vannuchi, C., Duarte, R., Maior, R., Tomaz, C., Barros, M., 2017a. Differential modulatory effects of cocaine on marmoset monkey recognition memory. *Prog. Brain Res.* 235, 155-176.

Melamed, J., de Jesus, F., Maior, R., Barros, M. 2017b. Scopolamine induces deficits in spontaneous object-location recognition and fear-learning in marmoset monkeys. *Front. Pharmacol.* 8, 395.

Monclaro, A., Sampaio, A., Ribeiro, N., Barros, M., 2014. Time-of-day effect on a food-induced conditioned place preference task in monkeys. *Behav. Brain Res.* 259, 336-341.

Mourão, C., Faria, N., 2015. Memória. *Psicologia: Reflexão e crítica*. 28, 780-788. Universidade Federal de Juiz de Fora, MG.

Moustgaard, A., Lind, N., Hemmingsen, R., Hansen, A., 2002. Spontaneous object recognition in the Göttingen minipig. *Neural Plast.* 9, 255-259.

Muller, L., Fritzsche., Weinert, D., 2014. Novel object recognition of Djungarian hamsters depends on circadian time and rhythmic phenotype. *Chronobiol. Int.* 32, 458-467.

Murai, T., Okuda, S., Tanaka, T., Ohta, H., 2007. Characteristics of object location memory in mice: behavioral and pharmacological studies. *Physiol. Behav.* 90, 116-124.

Murray, E., Wise, S., 2010. What, if anything, can monkeys tell us about human amnesia when they can't say anything at all? *Neuropsychologia*. 48, 2385-2405.

Nilsson, M., Carlsson, M., 2013. The monoaminergic stabilizer (-)-OSU6162 reverses delay-dependent natural forgetting and improves memory impairment induced by scopolamine in mice *Neuropharmacology*. 75, 399-406.

Ozawa, T., Yamada, K., Ichitani, Y., 2011. Long-term object location memory in rats: Effects of sample phase and delay length in spontaneous place recognition test. *Neurosci. Lett.* 497, 37-41.

Pavão, R., 2008. Memória e Aprendizagem. *Revista da Biologia. USP.* 1, 16-20.

Petrazzini, M., Agrillo, C., Piffer, L., Dadda, M., Bisazza, A., 2012. Development and application of a new method to investigate cognition in newborn guppies. *Behav. Brain Res.* 233, 443-449.

Phensy, A., Duzdabanian, HE., Brewer, S., Panjabi, A., Driskill, C., Berz, A., Peng, G., Kroener, S., 2017. Antioxidant treatment with N-acetyl cysteine prevents the development of cognitive and social behavioral deficits that result from perinatal ketamine treatment. *Front. Behav. Neurosci.* 11, 1-17.

Pitsikas, N., 2007. Effects of scopolamine and L-NAME on rats' performance in the object location test. *Behav. Brain Res.* 179, 294-298.

Prins, N., Pohlmeier, E., Debnath, S., Mylavarapu, R., Geng, S., Sanchez, J., Rothen, D., Prasad, A., 2017. Common marmoset (*Callithrix jacchus*) as a primate model for behavioral neuroscience studies. *J Neurosci. Methods.* 284, 35-46.

Reppert, S., Weaver, D., 2002. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature.* 418, 935-941.

Rodriguez JS, Paule MG., 2009. Working Memory Delayed Response Tasks in Monkeys. In: Buccafusco JJ, editor. *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience.* 2nd edition. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis, cap.12.

Rowan, A., 1997. The benefits and ethics of animal research. experiments on animals are a mainstay of modern medical and scientific research. But what are the costs and what are the returns? *Scientific Am.* 79-93.

Ruby, N., Fernandez, F., Garrett, A., Klima, J., Zhang, P., Sapolsky, R., Heller, HC., 2013. Spatial memory and long-term object recognition are impaired by circadian arrhythmia and restored by the GABAA antagonist pentylentetrazole. *PLoS One* 8, 1-10.

Sasaki, E., 2015. Prospects for genetically modified non-human primate models, including the common marmoset. *Neurosci. Res.* 93, 110-115.

Shimizu, K., Kobayashi, Y., Nakatsuji, E., Yamazaki, M., Shimba, S., Sakimura, K., Fukada, Y., 2015. SCOP/PHLPP1 β mediates circadian regulation of long-term recognition memory. *Nat. Commun.* 7, 1-12.

Squire, L., Zola, S., 1996. Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 13515-13522.

Stevenson, M., Rylands, A. 1988. The genus *Callithrix*. In: *Ecology and Behavior of Neotropical Primates.* In: R. A. Mittermeier, A. B. Rylands, A. F. Coimbra-Filho & G. A. B. Fonseca (eds.), *Ecology and behavior of Neotropical primates.* 2, 131-222.

Sutcliffe, J., Marshall, K., Neill, J., 2007. Influence of gender on working and spatial memory in the novel object recognition task in the rat. *Behav. Brain Res.* 177, 117-125.

Tang, Y., Mishkin, M., Aigner, T., 1997. Effects of muscarinic blockade in perirhinal cortex during visual recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94, 12667-12669.

Tomaz, C., 1993a. Memória: mecanismos celulares. *Ciência Hoje.* 16, 06-07.

Tomaz, C., 1993b. Psicobiologia da memória. *Psicologia USP, S. Paulo.* 49–59.

Tomaz, C., Costa, J., 2001. Neurociência e memória. *Humanidades.* 48, 146-160.

Tomaz, C., Resende, M., Tavares, M. 2003. Ontogenetic dissociation between habit learning and recognition memory in capuchin monkeys (*Cebus apella*). *Neurobiol. Learn. Mem.* 79, 19-24.

Tonuko, H., Watson, C., Roberts, A., Sasaki, E., Okano, H., 2015. Marmoset neuroscience. *Neurosci. Res.* 93, 1-178.

Uno, Y., Uehara, S., Yamazaki, H., 2016. Utility of non-human primates in drug development: Comparison of non-human primate and human drug-metabolizing cytochrome P450 enzymes. *Biochem. Pharmacol.* 121, 1-7.

Viggiano, M., Galli, G., Righi, S., Brancati, C., Gori, G., Cincotta, M., 2008. Visual recognition memory in Alzheimer's disease: repetition-lag effects. *Exp. Aging Res.* 34, 267-281.

Voytko, M., Murray, R., Higgs, C., 2009. Executive function and attention are preserved in older surgically-menopausal monkeys receiving estrogen or estrogen plus progesterone. *J. Neurosci.* 29, 10362-10370.

Walf, A., Koonce, C., Manley, K., Frye, C., 2009. Proestrous compared to diestrous wildtype, but not estrogen receptor beta knockout, mice have better performance in the spontaneous alternation and object. recognition tasks and reduced anxiety-like behavior in the elevated plus and mirror maze. *Behav. Brain Res.* 196, 254-260.

Walf, A., Rhodes, M., Frye, C., 2006. Ovarian steroids enhance object recognition in naturally cycling and ovariectomized, hormone-primed rats. *Neurobiol. Learn. Mem.* 86, 35-46.

Wallace, M., Luine, V., Arellanos, A., Frankfurt, M., 2006. Ovariectomized rats show decreased recognition memory and spine density in hippocampus and prefrontal cortex. *Brain Res.* 1126, 176-182.

Wang, S., Morris, G., 2010. Hippocampal-neocortical interactions in memory formation, consolidation, and reconsolidation. *Annu. Rev. Psychol.* 61, 49-79.

Warburton, E., Brown, M., 2015. Neural circuitry for rat recognition memory. *Behav. Brain Res.* 285, 131-139.

Williams, J., Chieng, B., 1998. Increased opioid inhibition of GABA release in nucleus accumbens during morphine withdrawal. *J. Neurosci.* 18, 7033-7039.

Winters, B., Bussey, T., 2005. Transient inactivation of perirhinal cortex disrupts encoding, retrieval, and consolidation of object recognition memory. *J. Neurosci.* 25, 52-61.

Wizemann, T., Pardue, M., 2001. Exploring the biological contributions to human health. Does sex matter? Institute of Medicine Committee on Understanding the Biology of Sex and Gender Differences. Washington, DC: National Academies Press.

Zandi, P., Carlson, M., Plassman, B., Welsh-Bohmer, K., Mayer, L., Steffens, D., Breitner, J., 2002. Hormone replacement therapy and incidence of Alzheimer disease in older women. *JAMA.* 288, 2123-2129.

Zola, S., Squire, L., 1993. Neuroanatomy of memory. *Annu. Rev. Neurosci.* 16, 547-563.

Zola, S., Squire, L., Teng, E., Stefanacci, L., Buffalo, E., Clark, R., 2000. Impaired recognition memory in monkeys after damage limited to the hippocampal region. *J. Neurosci.* 20, 451-463.

ANEXO



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso Animal

Brasília, 21 de novembro de 2016.

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado "MEMÓRIA DE RECONHECIMENTO OBJETO-LUGAR EM PRIMATAS NÃO-HUMANOS (CALLITHRIX PENICILLATA): UM ESTUDO COMPORTAMENTAL E DA ATIVIDADE NEURONAL VIA AFERIÇÃO DA TEMPERATURA TÍMPÂNICA.", UnBDoC n.º 66725/2016, sob responsabilidade da Professora Marília Barros foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de: *Callithrix penicillata* (12 machos e 6 fêmeas). A presente aprovação é válida pelo período de 1º/12/2016 a 31/12/2018.



Prof. Dra. Paula Diniz Galera

Prof. Dra. Paula Diniz Galera
Coordenadora da CEUA - UnB



*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.