



Universidade de Brasília  
Faculdade de Ciências da Saúde  
Departamento de Farmácia

**André Wagner Carvalho de Oliveira**

**EFEITO DA ESCOPOLAMINA NA MEMÓRIA DE RECONHECIMENTO DE  
OBJETOS DE MICOS-ESTRELA (*CALLITHRIX PENICILLATA*).**

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marília Barros

BRASÍLIA  
novembro / 2017



Universidade de Brasília  
Faculdade de Ciências da Saúde  
Departamento de Farmácia

**André Wagner Carvalho de Oliveira**

**EFEITO DA ESCOPOLAMINA NA MEMÓRIA DE RECONHECIMENTO DE  
OBJETOS DE MICOS-ESTRELA (*CALLITHRIX PENICILLATA*).**

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marília Barros

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC)  
apresentado ao curso de graduação em  
Farmácia da Faculdade de Ciências da  
Saúde da Universidade de Brasília como  
requisito parcial para obtenção do título de  
bacharel em Farmácia.

BRASÍLIA  
novembro / 2017



Universidade de Brasília  
Faculdade de Ciências da Saúde  
Departamento de Farmácia

**André Wagner Carvalho de Oliveira**

**EFEITO DA ESCOPOLAMINA NA MEMÓRIA DE RECONHECIMENTO DE  
OBJETOS DE MICOS-ESTRELA (*CALLITHRIX PENICILLATA*).**

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado ao curso de graduação em Farmácia da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Farmácia.

BANCA EXAMINADORA:

---

Prof. Dra. Marília Barros (Presidente)

---

Prof. Dr. Rafael Souto Maior

BRASÍLIA  
novembro / 2017

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente à minha orientadora Prof. Dra. Marília Barros por todo o suporte dado durante a realização dessa pesquisa. São poucos professores que tiram tempo do seu dia para explicar atenciosamente noções básicas de estatística ou discutir cada detalhe dos resultados. Obrigado por ser um exemplo de profissional, por me inspirar a ser melhor sempre e me incentivar a seguir nessa área. Que seja só o começo de uma parceria de sucesso.

Ao grupo de pesquisa que me ajudou durante o experimento: Carolina Lisboa, Clara Costa, Clarissa Vannuchi, Fernando Magela, Jéssica Lohana, Jéssica do Vale, Lucas Cardoso e Renata Duarte.

À equipe do Centro de primatologia: ao veterinário Antonizete Reis, aos tratadores Geinaldo da Silva e Almir de Araújo e à Marili Pascoal.

À minha família, especialmente aos meus pais, Pio Wagner e Amélia, que sempre me apoiaram e acreditaram na minha formação e nesse sonho até mais do que eu. Agradeço também aos meus irmãos Priscila, Rebeca e Jonatas, ao meu cunhado Laérgele e ao meu sobrinho João por me ajudarem em tudo que precisei durante esse tempo de curso. Especialmente à Priscila, muito obrigado por me acolher e ser mais do que uma irmã pra mim.

Aos meus amigos de curso que sempre me ajudaram e incentivaram.

Aos meus amigos queridos da vida que me acompanharam durante toda a graduação.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Taxonomia da memória com as áreas neurais envolvidas em cada uma delas .....	3
<b>Figura 2.</b> Representação da uma sinapse da via colinérgica com síntese, armazenamento, transporte e degradação da acetilcolina (ACh) .....	9
<b>Figura 3.</b> Representação da estrutura de um receptor nicotínico com suas subunidades ...	10
<b>Figura 4.</b> Receptores muscarínicos metabotrópicos e sua via de sinalização .....	11
<b>Figura 5.</b> Indivíduo adulto da espécie <i>Callithrix penicillata</i> (mico-estrela) em vida livre na natureza.....	19
<b>Figura 6.</b> Aparato experimental do Campo Aberto empregado no procedimento .....	23
<b>Figura 7.</b> Representação esquemática do Teste de Reconhecimento Espontâneo de Objeto (REO) .....	26
<b>Figura 8.</b> Objetos utilizados no Teste de Reconhecimento Espontâneo de Objeto (REO)...	27
<b>Figura 9.</b> Imagem das câmeras para análise dos comportamentos no software AnyMaze®	28
<b>Figura 10.</b> Média ( $\pm$ e.p.m.) do tempo de exploração (em segundos; à esquerda) dos objetos familiar e novo na sessão teste, e do Índice de Discriminação (à direita), dos micos que receberam salina (SAL) ou 0,05 mg/kg de escopolamina (ESC) de forma aguda e que depois de 20 min foram submetidos ao teste de memória de reconhecimento espontâneo de objetos .....	30
<b>Figura 11.</b> Média ( $\pm$ e.p.m.) da exploração total dos objetos (em segundos; à esquerda) e da locomoção (em segundos; à direita) observados nas sessões treino e teste dos micos que receberam salina (SAL) ou 0,05 mg/kg de escopolamina (ESC) de forma aguda e que depois de 20 min foram submetidos ao teste de memória de reconhecimento espontâneo de objetos .....	31

## LISTA DE ABREVIATURAS

acetil-CoA: acetil-coenzima A

ACh: acetilcolina

AChE: acetilcolinesterase

AMPA-R: receptor de ácido propriônico  $\alpha$ -amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazol

AMPC: adenosina 3',5'-monofosfato cíclico

CA: Campo Aberto

Ca<sup>2+</sup>: cálcio

CBF: prosencéfalo colinérgico basal

CEUA: Comissão de Ética no Uso Animal

ChAT: colina acetiltransferase

CHT: transportador de colina de alta afinidade dependente de sódio

C<sub>máx</sub>: concentração plasmática máxima

CONCEA: Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

CPUnB: Centro de Primatologia da Universidade de Brasília

CT: tomografia computadorizada

CYP450: citocromo P450

DA: Doença de Alzheimer

DAG: diacilglicerol

DMS: teste de escolha de acordo com o modelo

DNMS: teste de escolha diferente do modelo

EEG: eletroencefalograma

ESC: escopolamina

FAL/UnB: Fazenda Água Limpa da Universidade de Brasília

GABA: ácido gama-aminobutírico

iAChE: inibidores de acetilcolinesterase

IBAMA: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

IM: intramuscular

IP3: inositol 1,4,5-trifosfato

IV: intravenosa

K+: potássio

LTM: lobo temporal medial

MRI: ressonância magnética

Na+: sódio

NAc: núcleo accumbens

nbM: núcleo basal de Meynert

NGF: fator de crescimento neural

NMDA-R: receptor de glutamato N-metil-D-aspartato

PET: tomografia cerebral de emissão de pósitrons

PKC: proteína quinase C

PLC: fosfolipase C

PNH: primatas não-humanos

REO: Reconhecimento Espontâneo de Objetos

SAL: solução salina

SC: subcutânea

SNC: sistema nervoso central

SNP: sistema nervoso periférico

VAcHT: transportador vesicular de acetilcolina

VO: via oral

TGI: trato gastrointestinal

## RESUMO

A memória é definida como a capacidade de adquirir, guardar e usar uma determinada informação sobre o mundo. A memória declarativa, em particular, está relacionada à coleta consciente de informações sobre fatos e eventos e à capacidade de descrevê-los, sendo subdividida em semântica e episódica. Em animais, o teste de reconhecimento espontâneo de objetos (REO) avalia aspectos da memória de reconhecimento, que está relacionada à memória declarativa do tipo episódica. Esse método baseia-se na preferência natural dos animais em explorar um estímulo novo. Além disso, sabe-se que baixos níveis do neurotransmissor acetilcolina (ACh) prejudicam a aquisição de novas memórias de reconhecimento, dentre outros aspectos. A administração de escopolamina (ESC), um antagonista de receptores muscarínicos para ACh, pode mimetizar esses efeitos de forma temporária e reversível, tanto em estudos com animais, como em ensaios clínicos. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi verificar o desempenho de micos-estrela (*Callithrix penicillata*) no teste de REO, na presença e ausência da ESC. Os sujeitos foram divididos em dois grupos, um recebendo solução salina (SAL) e o outro 0,05 mg/kg de ESC, ambos 20 min antes do procedimento experimental. Os animais foram submetidos a uma sessão de habituação de 10 min e 24 h depois eles foram submetidos ao teste de REO em um Campo Aberto (CA). A tarefa de REO consistiu em uma sessão treino de 10 min em que foram apresentados dois objetos idênticos. Na sessão teste, que ocorreu 6 h depois, um dos objetos foi substituído por um novo (na mesma posição do objeto familiar) e os sujeitos puderam explorá-los por 10 min. Foi observado que, na sessão teste, os animais do grupo SAL exploraram significativamente mais o objeto novo em relação ao familiar, enquanto que os do grupo ESC exploraram os dois objetos equitativamente. Em ambos os grupos, não houve alteração na locomoção ou na exploração dos objetos entre as sessões treino e teste. Portanto, como em modelos animais, micos-estrela apresentam uma memória de reconhecimento para objetos neutros no seu ambiente após um intervalo de retenção de pelo menos 6 h. A ESC, por outro lado, induz um efeito amnésico semelhante ao já visto em roedores nesse mesmo teste e em primatas não-humanos (PNH) em tarefas de discriminação visual. O teste de REO é, portanto, um teste rápido, simples e de baixo custo que também pode ser empregado em PNH.

**Palavras-chave:** memória de reconhecimento; exploração espontânea; objeto neutro; escopolamina; amnésia; primata não-humano.



## SUMÁRIO

1. Introdução.....	1
1.1. Aspectos gerais da memória.....	1
1.2. Memória de reconhecimento.....	4
1.3. A via colinérgica e a sua relação com a memória.....	8
1.4. Modulação farmacológica da via colinérgica.....	13
1.4.2. Escopolamina.....	13
1.5. PNH como modelos animais para estudos de memória.....	16
1.5.1. Aspectos gerais.....	16
1.5.2. Micos como modelos animais.....	18
2. Objetivos.....	21
3. Materiais e Métodos.....	22
4. Resultados.....	30
5. Discussão.....	32
6. Conclusão.....	37
7. Referências Bibliográficas.....	38
8. Anexo 1: Declaração da CEUA.....	51

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Aspectos gerais da memória

A memória é definida como a capacidade em adquirir, guardar e usar uma determinada informação sobre o mundo (AMADIO e cols., 2004). Ela surgiu cedo na evolução do sistema nervoso e desde então auxilia seres vivos na adaptação ao ambiente. Portanto, esse processo cognitivo é essencial para a sobrevivência de diversas espécies, que devem lembrar qual lugar é mais seguro, qual é o seu possível predador, onde podem achar alimento e, ainda, repetir padrões de vocalização (PONTES e SOUSA, 2016). Assim, esse processo define a vida do indivíduo como um todo, visto que algumas ações irão se basear na lembrança de fatos e acontecimentos (SQUIRE, 2004).

A memória não é um processo único e pode então ser dividida em aquisição, consolidação e evocação. A aquisição é o período em que o indivíduo é primeiramente exposto à experiência ou estímulo (ABEL e LATTAL, 2001). A consolidação se trata do período em que o traço mnemônico deixa de ser lábil e passa a ser estável, sendo armazenado posteriormente (IZQUIERDO e cols., 2006). A evocação é definida como o processo de avaliação da memória e o uso da informação consolidada. Em humanos, ela pode ser vista na mudança de um comportamento, adequação a um determinado padrão ou no reconhecimento de pessoas, lugares e palavras, etc. (ABEL e LATTAL, 2001).

Outra forma de se classificar a memória é pela duração, sendo assim dividida em dois tipos: de curto e de longo-prazo (Figura 1). A memória de curto-prazo é aquela que faz referência a experiências recém-vividas e conhecimentos adquiridos há pouco tempo, com o seu armazenamento por um período limitado de tempo. Um exemplo seria a recordação de uma sequência pequena de letras ou números (VESELIS, 2015). Há lembranças que tem relação com conhecimentos adquiridos há muito tempo e elas são relacionadas com a memória de longo-prazo. Portanto, esse tipo de memória trata-se do armazenamento de grande quantidade de informações, por um período de tempo indefinido (SQUIRE e KANDEL, 2003). Há ainda a memória operacional, que participa de habilidades motoras necessárias

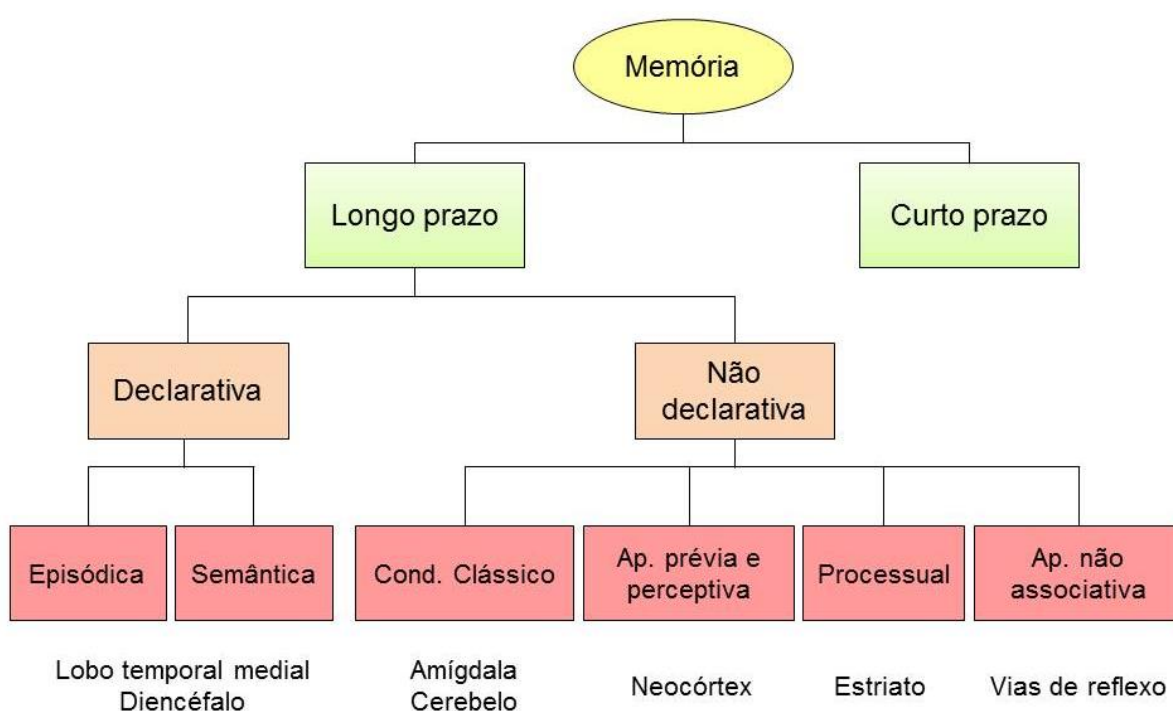
para o cumprimento de uma determinada tarefa. Ela guia atividades em um nível inconsciente e não depende da quantidade de informação, nem do tempo. Quando necessário, ela é evocada para ser usada em procedimentos que necessitem de competências motoras e intelectuais. Esse tipo de memória se desenvolve quando há um aprendizado operacional pela repetição de uma tarefa (CAMINA e GÜELL, 2017).

A memória de longo-prazo é dividida em declarativa e não-declarativa (Figura 1; AMEEN-ALI e cols., 2015; SQUIRE, 2004; TULVING, 1985; XAVIER, 1993). A memória declarativa está relacionada com a capacidade de coleta consciente de informações sobre fatos e eventos e a capacidade de descrevê-los. Portanto, a memória do tipo declarativa é representacional, provendo um modelo do mundo externo, que pode ser verdadeiro ou fictício. As estruturas cerebrais envolvidas nesse tipo de memória incluem áreas do lobo temporal medial (LTM) e do diencéfalo (Figura 1), sendo que suas funções estão comprometidas em indivíduos com amnésia e demências (SQUIRE, 2004).

A memória do tipo declarativa pode ser dividida em semântica e episódica (Figura 1). A do tipo semântica está relacionada a fatos concretos sobre o mundo a partir de conhecimentos simbolicamente representáveis, como, por exemplo, o fato do céu de fim de tarde ser alaranjado. Já a memória episódica é definida como a capacidade de reviver um evento no contexto original em que ocorreu e está diretamente relacionada com a lembrança pessoal de um indivíduo. Portanto, é a lembrança do que aconteceu, assim como onde e quando. Um exemplo seria a cor desse mesmo céu exemplificado anteriormente desencadear lembranças sobre episódios vividos nessas condições (AMEEN-ALI e cols., 2015; SQUIRE, 2004; TULVING, 1985). Comparada com a memória semântica, essa última requer a participação de mais sistemas cerebrais, como o lobo frontal (Figura 1; SQUIRE, 2004).

A memória não-declarativa, por sua vez, é expressa via alterações no padrão comportamental do indivíduo. Ela é composta de modificações em áreas cerebrais responsáveis pelo desempenho em uma determinada tarefa (GASBARRI e cols., 2014). Dessa forma, as memórias adquiridas ocorrem pela reativação de áreas em que o

aprendizado já foi consolidado. Isso é possível pela aquisição, consolidação e evocação de habilidades motoras e cognitivas. Um exemplo seria o ato de dirigir. Mesmo que ele possa ter surgido de fatos inerentes ao indivíduo, depois de um tempo a ação torna-se quase automática (SQUIRE, 2004; TULVING, 1985). Há diversas áreas neurais envolvidas na memória não-declarativa, sendo o corpo estriado envolvido nos hábitos e habilidades, o neocórtex no aprendizado perceptivo, e a amígdala e o cerebelo nas respostas emocionais e esqueléticas, respectivamente (Figura 1).



**Figura 1.** Taxonomia da memória com as áreas neurais envolvidas em cada uma delas. Ap.: aprendizagem; Cond.: Condicionamento. Adaptado de ROPPER e colaboradores (2014) e SQUIRE (2004).

Quando se trata de processamento de informação e operação, os dois tipos básicos de memória de longo prazo diferem ainda mais. A memória declarativa tem o princípio de detecção das características de um evento que ocorre em um determinado local e hora. No caso da não-declarativa, o princípio mais importante é a junção de elementos comuns de uma série de eventos separados (SQUIRE, 2004). Sabe-se então que os sistemas de memória operam de forma independente e também paralela, subsidiando assim o comportamento gerado (SQUIRE e ZOLA, 1996; TULVING, 1985).

Os tipos de memória estão ainda relacionados a diferentes níveis de consciência. A memória não-declarativa é caracterizada pela consciência anoética, que significa sem conhecimento. A memória semântica, por sua vez, se relaciona com a consciência noética. Essa consciência permite que o organismo esteja atento e associe objetos e eventos no seu ambiente, mesmo na falta deles, podendo agir em um conhecimento simbólico do mundo. Por último, há a consciência auto-noética (autoconhecimento), que se correlaciona especificamente com a memória episódica. Quando o indivíduo se lembra de eventos pessoalmente vividos, levando em conta que eles fazem parte do seu passado, ele está usando esse tipo de memória. Com base nisso, a demonstração desse tipo de memória em animais é limitada, visto que eles não podem relatá-la (TULVING, 1985). Diz-se então que eles possuem uma memória do tipo episódica. Além disso, ela é seletivamente perdida quando há algum dano cerebral, aparece tardiamente durante o desenvolvimento, tem variação interindividual e pode ser medida via testes de memória (AMEEN-ALI e cols., 2015).

## **1.2. Memória de reconhecimento**

A memória de reconhecimento pode ser definida como o processo de identificação de um objeto ou pessoa previamente visto. Ela se correlaciona à memória episódica, porém não envolve necessariamente uma lembrança de uma experiência passada. Esse tipo de memória faz parte de um dos aspectos da memória declarativa, que se trata de uma função cognitiva multimodal e complexa (AMEEN-ALI e cols., 2015; WINTERS e cols., 2010).

A habilidade de indivíduos reconhecerem um estímulo visto anteriormente pode ser classificada em memória de reconhecimento e de familiaridade. Se essa informação gerada inclui detalhes do contexto episódico anterior (informação espacial e temporal ou pensamentos gerados durante exposição prévia), ela faz parte do reconhecimento. Se não, ela é característica da familiaridade. Isso pode ser visto em situações em que o indivíduo sabe que se lembra de um fato, mas somente se alguma informação for apresentada conjuntamente. Por exemplo, a pessoa pode sentir um determinado cheiro e saber que já o

sentiu, mas não lembrar especificamente a que se refere (EICHENBAUM e cols., 2007; HENSON e GAGNEPAIN, 2010).

O córtex perirrinal é uma estrutura extremamente importante para o reconhecimento de objetos vistos anteriormente (WARBURTON e BROWN, 2015; DERE e cols., 2007). Quando danificado, o reconhecimento de objetos novos fica prejudicado, confirmando assim seu papel nesse processo (NORMAN e EACOTT, 2004). Além disso, estudos eletrofisiológicos mostraram a presença de neurônios nessa área que são responsáveis pela codificação da memória de reconhecimento visual em primatas não-humanos (PNH; BROWN e cols., 2010) e roedores (ZHU e BROWN, 1995). Estudos feitos por WINTERS e BUSSEY (2005) utilizaram a lidocaína, um bloqueador de canais de sódio, para a inativação dessa área. Os animais passaram a não reconhecer mais os objetos, revelando a importância dessa área na aquisição, consolidação e evocação da memória.

Outra estrutura envolvida nesses processos é o hipocampo, não havendo, contudo, um consenso quando se trata de sua importância na memória de reconhecimento de objetos (WINTERS e cols., 2010). Uma lesão nessa área em roedores induziu uma resposta semelhante ao grupo controle quando esses objetos foram colocados em novas posições ou contextos (O'BRIEN e cols., 2006). Portanto, pode-se inferir que o hipocampo é importante para o reconhecimento de objetos, mas somente quando são apresentadas informações espaciais e contextuais (SUZUKI e NAYA, 2014; WARBURTON e BROWN, 2015; WINTERS e cols., 2010).

Alguns estudos apontaram o córtex pré-frontal medial como uma área envolvida em processos de memória de reconhecimento em PNH (MILLER e cols., 1996; XIANG E BROWN, 2004). Em roedores, lesões nessa área comprometeram as memórias de objeto-lugar (BARKER e cols., 2007) e de ordem temporal (CROSS e cols., 2013; DEVITO e EICHENBAUM, 2011).

Estudos de memória em humanos vêm sendo realizados com diversos tipos de metodologias. Uma delas é a investigação de pacientes que possuem lesões cerebrais que

interferem em diferentes processos cognitivos, associados a tarefas de reconhecimento de padrões de imagens ou palavras (SQUIRE e WIXTED, 2011). Estudos de lesão apresentam algumas vantagens, como a evidência de que se trata de um processo dissociativo ou não. Porém existem algumas desvantagens, como o fato da seleção do paciente não ser randômica, a amostra ser pequena e muitas vezes consistir em apenas um paciente, e a dificuldade de seleção de indivíduos com lesões exatamente na mesma área cerebral (STERNBERG, 1999). Também há a possibilidade de medição da atividade cerebral por técnicas como o eletroencefalograma (EEG). Esse exame pode ser associado com a falha na memória, mas não pode ser usado para compor o diagnóstico em todos os pacientes (BELL e CUEVAS, 2012). Além disso, há questões éticas envolvidas, que impedem o estudo de vários tipos de comprometimento cognitivo. Para que haja uma relação minuciosa entre as estruturas cerebrais e déficits de memória com um número maior de indivíduos, modelos animais podem ser usados (SQUIRE e WIXTED, 2011).

Na década de 70, GAFFAN (1974) desenvolveu um teste em PNH chamado teste de escolha de acordo com o modelo (do inglês, *delay matching to sample*, DMS). Nesse teste, a memória de reconhecimento é testada de forma visual. Na fase de treinamento, um objeto contendo um reforço alimentar é apresentado, podendo ser obtido quando o objeto é tocado ou deslocado pelo animal. Na fase teste, apresenta-se um objeto adicional e o animal tem que identificar qual foi o objeto da fase de treinamento, demonstrando que se recorda dele. O intervalo entre as duas fases é o parâmetro usado para atestar a memória de reconhecimento no PHN e pode variar de minutos a horas, dependendo do que está sendo testado (AMEEN-ALI e cols., 2015; EICHENBAUM e cols., 2007; WINTERS e cols., 2008; WINTERS e cols., 2010).

Esse procedimento foi modificado por MISHKIN (1978), sendo que os animais agora teriam que tocar/deslocar o objeto novo na fase teste, culminando em um treinamento mais rápido porque se baseia no princípio de que os animais explorariam mais o estímulo novo no ambiente. Esse teste é chamado de escolha diferente do modelo (do inglês, *delay*

*nonmatching to sample*, DNMS) e tem sido amplamente usado em PNH para o entendimento das bases neurais da memória. Esses dois tipos de teste esclarecem muitos aspectos sobre a memória. Porém, ao usar um reforço, adiciona-se o viés de outros processos neurais, como a motivação (AMEEN-ALI e cols., 2015; EICHENBAUM e cols., 2007; WINTERS e cols., 2008; WINTERS e cols., 2010).

Em roedores, um dos testes mais empregados é o de Reconhecimento Espontâneo de Objetos (REO; do inglês, *spontaneous object recognition*). Nesse teste são colocados dois objetos idênticos em locais distintos e depois de um intervalo de retenção pré-determinado, troca-se um dos objetos por um estímulo novo. O animal teria então uma preferência natural em explorar o objeto novo (AMEEN-ALI e cols., 2015; DERE e cols., 2007). Esse teste de reconhecimento de objetos permite avaliar o efeito de diversos fármacos nas diferentes fases da memória, a depender do momento em que são administrados, ou seja, antes/depois da sessão treino ou teste (DERE e cols., 2007).

Estratégias farmacológicas, como o bloqueio do receptor de glutamato N-metil-D-aspartato (NMDA-R) em roedores, têm sido usadas para a verificação do papel do hipocampo no reconhecimento de objetos (DERE e cols., 2007). Isso se deve ao fato desse receptor estar envolvido em alguns tipos de mecanismos de plasticidade sináptica e consolidação da memória (MARTIN E MORRIS, 2002). Além do NMDA-R, há outros receptores envolvidos na plasticidade sináptica e formação da memória, como o AMPA-R (receptor de ácido propiônico  $\alpha$ -amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazol; DERE e cols., 2007). A administração de um antagonista desse receptor diminuiu o reconhecimento de objetos após diferentes intervalos de retenção, atestando também o seu envolvimento na codificação de informações (WINTERS e BUSSEY, 2005).

Mecanismos colinérgicos também parecem estar envolvidos na plasticidade sináptica no córtex perirrinal (DERE e cols., 2007). Baixos níveis desse neurotransmissor no hipocampo têm efeito amnésico, observado na Doença de Alzheimer (DA; BARTUS, 2000), assim como uma elevação na sua transmissão tem efeito pró-mnésico (SARTER e BRUNO, 2000). Dessa



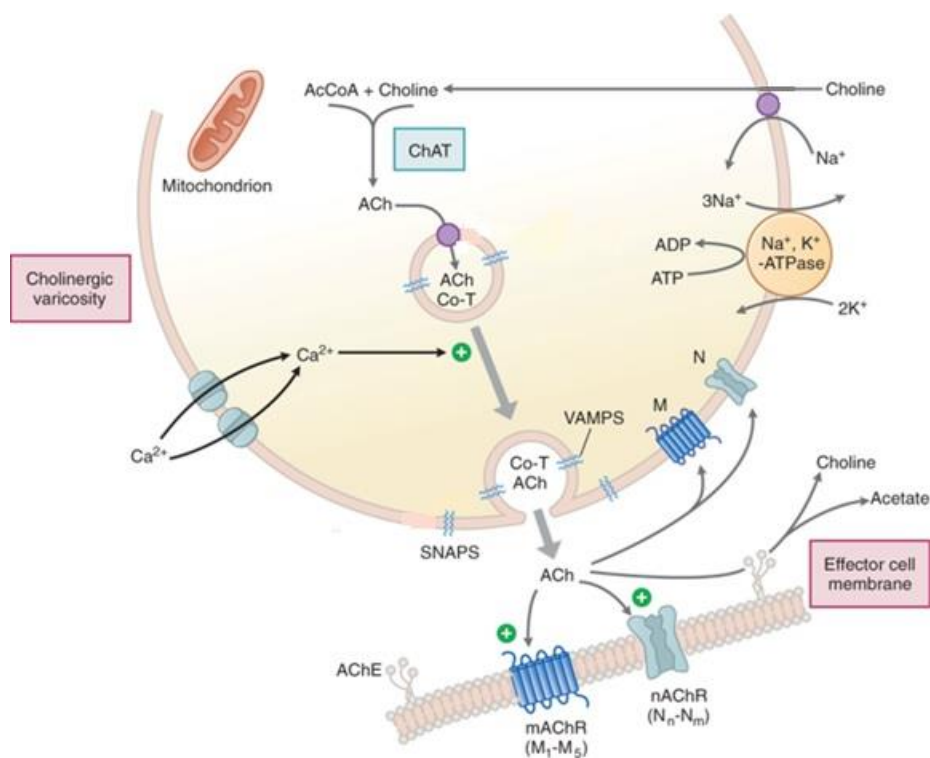
forma, a modulação por agonistas dos receptores de acetilcolina (ACh) tem impacto na aquisição e possivelmente na consolidação de características do objeto em testes de memória de reconhecimento realizados em roedores (DERE e cols., 2007).

### **1.3. A via colinérgica e sua relação com a memória**

A transmissão colinérgica (Figura 2) é baseada em proteínas que estão envolvidas na síntese, estocagem, transporte e degradação do neurotransmissor ACh (FERREIRA-VIEIRA e cols., 2016). A síntese desse neurotransmissor se dá no citoplasma de neurônios colinérgicos a partir de acetil-coenzima A (acetil-CoA) e colina. A enzima responsável por essa reação é a colina acetiltransferase (ChAT). Depois de sua biossíntese, a ACh é armazenada em vesículas pré-sinápticas e levada à fenda sináptica por transportadores vesiculares de acetilcolina (VACHT), presentes na membrana da vesícula sináptica (DEIANA e cols., 2011; POTTER, 1970). A ChAT é ativada quando há despolarização, influxo de cálcio e fosforilação por diversas proteínas quinases (DOBRANSKY e cols., 2000; SCHIMDT e RYLLET, 1993). Apesar de sua importante função na síntese de ACh, essa enzima não é um fator limitante (COLLIER e KATZ, 1974).

À medida que o neurônio colinérgico é despolarizado, a ACh é liberada na fenda sináptica por exocitose e assim ativa seus receptores. Esse neurotransmissor é rapidamente inativado pela acetilcolinesterase (AChE), enzima que está geralmente presente na membrana plasmática de neurônios da fenda sináptica (DEIANA e cols., 2011). Os mecanismos de inativação dessa enzima são bem particulares, visto que cada AChE pode hidrolisar cerca de 5.000 moléculas de ACh por segundo. Isso faz com que ela seja uma das enzimas mais cineticamente eficientes (POTTER e cols., 1984). A AChE é transcrita principalmente nos músculos e no cérebro, mas pode também ser expressa em células sanguíneas e epidermais (SEIDMAN e cols., 1995). Assim que a ACh é hidrolisada, cerca de 50% da colina derivada da hidrólise é recuperada pelo transportador de colina de alta afinidade (CHT) dependente de sódio ( $\text{Na}^+$ ). Dessa forma, ela pode ser usada novamente na

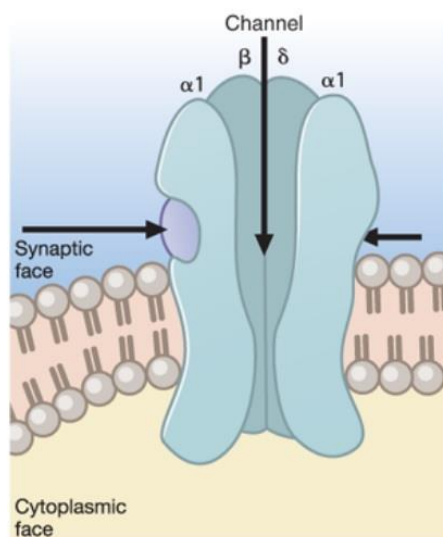
síntese desse neurotransmissor. Portanto, a recaptação está diretamente relacionada à taxa de síntese de ACh (ABREU-VILLAÇA e cols., 2011).



**Figura 2.** Representação de uma sinapse da via colinérgica com síntese, armazenamento, transporte e degradação da acetilcolina (ACh). Retirado de BRUNTON e colaboradores (2011).

Os receptores de ACh são divididos, de acordo com a afinidade de agonistas e sua farmacologia, em receptores nicotínicos e muscarínicos (FERREIRA-VIEIRA e cols., 2016). Os receptores nicotínicos fazem parte de uma família de canais iônicos pentaméricos que são seletivos para os cátions potássio ( $K^+$ ),  $Na^+$  e cálcio ( $Ca^{2+}$ ; Figura 3; DEIANA e cols., 2011). A combinação de subunidades determina os tipos de receptores nicotínicos, que podem estar localizados em diferentes áreas neurais (COOPER e cols., 1991). Depois que esses receptores são ativados, há um aumento da permeabilidade celular ao  $Na^+$  e  $Ca^{2+}$  com consequente despolarização e excitação celular (ABREU-VILLAÇA e cols., 2011; DEIANA e cols., 2011). Essa resposta intracelular resulta em transmissão sináptica no sistema nervoso periférico (SNP) e atividade modulatória no sistema nervoso central (SNC). Portanto, esses receptores podem ser expressos em diferentes regiões do SNC, assim como nos gânglios e

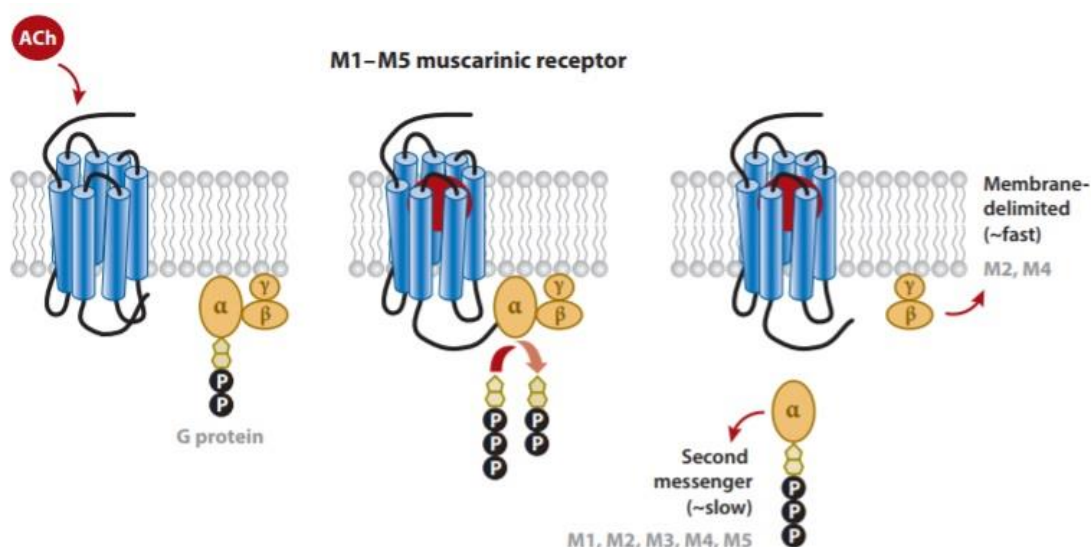
músculos (COOPER e cols., 1991; WONNACOTT, 1997). Centralmente, a estimulação desses receptores facilita a liberação de diversos neurotransmissores, como o glutamato (RADCIFFE e DANI, 1998), ácido gama-aminobutírico (GABA) e dopamina, além da ACh (WONNACOTT, 1997). Por sua vez, a regulação da neurotransmissão glutamatérgica pela ACh está envolvida nos processos de memória e aprendizado (RADCIFFE e DANI, 1998).



**Figura 3.** Representação da estrutura de um receptor nicotínico com suas subunidades. Retirado de BRUNTON e colaboradores (2011).

Receptores muscarínicos são receptores acoplados a proteína G com 7 domínios transmembranares, e assim modulam diversos canais iônicos (Figura 4). Até o momento, já foram descobertas cinco isoformas (M1-M5) e elas diferem entre si no tipo de proteína G a qual se ligam e, conseqüentemente, ao tipo de resposta intracelular que desencadeiam (CAULFIELD e BIRDSALL, 1998). Os tipos M1, M3 e M5 são acoplados à proteína G<sub>αq</sub> e o seu segundo mensageiro é a fosfolipase C (PLC), que produz uma resposta celular excitatória. A ativação da PLC gera o inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG). Enquanto o IP3 mobiliza reservas intracelulares de Ca<sup>2+</sup>, o DAG ativa a proteína quinase C (PKC; Figura 4; ABREU-VILLAÇA e cols., 2011). Em contrapartida, os tipos M2 e M4 são acoplados à proteína G<sub>αi</sub>, promovendo assim uma diminuição da excitabilidade celular. Isso acontece devido à inibição da enzima adenilato ciclase, que reduz os níveis de adenosina 3',5'-monofosfato

cíclico (AMPC; Figura 4; ABREU-VILLAÇA e cols., 2011; DEIANA e cols., 2011; FELDER, 1995). Os receptores do tipo M1/M3/M5 estão predominantemente localizados pós-sinápticamente, já os do tipo M2/M4 são encontrados em nível pré-sináptico, atuando como autorreceptores ou regulando negativamente a liberação de ACh. A ativação de receptores muscarínicos no SNC gera principalmente uma resposta excitatória, especialmente no córtex (PORTER e cols., 2002). Os receptores do tipo M1 são mais predominantes no córtex e hipocampo, enquanto que os do tipo M3 e M5 são mais encontrados no SNP. Já os receptores muscarínicos do tipo M2 são altamente concentrados no cerebelo e medula espinal e os do tipo M4 no estriado, como nos núcleos caudado e putâmen (THIELE, 2013; WARREN e cols., 2005).



**Figura 4.** Receptores muscarínicos metabotrópicos e sua via de sinalização. O tipo de proteína G a que se ligam e o segundo mensageiro muda de acordo com o subtipo do receptor. Retirado de THIELE (2013).

Neurônios colinérgicos estão espalhados por várias regiões no SNC e SNP. Alguns deles fazem parte de circuitos locais e são chamados de interneurônios. Esses estão presentes no estriado, no núcleo accumbens (NAc) e no tubérculo olfatório (EVERITT e ROBBINS, 1997; JONES, 2004). Outros ligam diversas partes do cérebro, os ditos neurônios de projeção, que podem conectar duas regiões tanto no SNC, quanto no SNP. O grupo de neurônios mais conhecidos que eles inervam são os do prosencéfalo basal. Nessa área,

existem neurônios que vão do nbM até o córtex e a amígdala. Os neurônios colinérgicos presentes no septo e na banda diagonal da área de Broca projetam para o hipotálamo e hipocampo (MESULAM, 2004). Essas projeções neurais que vêm do prosencéfalo basal têm importância fundamental em diversas funções corticais (EVERITT e ROBBINS, 1997; JONES, 2004; WEINBERGER, 2003).

O papel da ACh nos processos de memória e aprendizado está sendo esclarecido. Sugere-se que esse neurotransmissor tem um papel importante no hipocampo, onde colabora com a aquisição e a evocação das informações. Nesse modelo, chamado de hipótese colinérgica, a alta concentração de ACh facilitaria a aquisição de novas memórias, enquanto sua baixa concentração seria responsável pela evocação de memórias anteriores. Neurônios colinérgicos do prosencéfalo basal são afetados na DA e isso impulsionou os estudos nessa área em relação às funções cognitivas (KLINKENBERG e BLOKLAND, 2010). Estudos experimentais usaram primeiramente excitotoxinas, porém, por não se tratar de um método seletivo, muitas áreas não-colinérgicas poderiam ser afetadas. Começou-se então a serem usadas algumas toxinas seletivas, como a imunotoxina IgG-saporina 192, que se liga à receptores do fator de crescimento neural (NGF), expressos majoritariamente nessa população celular. Ela afeta apenas os neurônios colinérgicos dessa área e serve como um modelo animal de lesão (BAXTER e BUCCI, 2013).

Apesar de se saber o envolvimento do prosencéfalo basal no aprendizado e na memória, alguns experimentos concluíram que uma lesão nessa área também levaria ao déficit de funções de atenção, além do dano à plasticidade de neurônios sensoriais (BUCCI e cols., 1998). Estudos mais recentes começaram a identificar outros mecanismos em que esses neurônios estariam envolvidos com processos de memória. Quando ratos foram testados em um teste de aprendizado espacial condicional, lesões nessa área induziram um desempenho inferior dos animais nessa tarefa (JANISIEWICZ, 2004). Em PNH, a remoção desse circuito colinérgico para o córtex temporal exacerbou os efeitos de uma lesão anatômica na memória episódica (CROXSON e cols., 2012). Portanto, conclui-se que neurônios não-

colinérgicos nessa área também contribuem para processos de memória e aprendizado (BAXTER e BUCCI, 2013; KLINKENBERG e BLOKLAND, 2010).

#### **1.4. Modulação farmacológica da via colinérgica**

##### **1.4.1. Escopolamina**

A escopolamina (ESC) é uma amina terciária da classe dos alcalóides da beladona. Esse fármaco é um antagonista competitivo não-seletivo de receptores muscarínicos. Portanto, ela não se liga mais fortemente a nenhum dos subtipos desses receptores metabotrópicos, tendo ação central e periférica (ANTOR e cols., 2014). Quando administrada em altas concentrações, também pode antagonizar receptores nicotínicos. Receptores muscarínicos estão distribuídos em todo o organismo e, como explicitado anteriormente, pressupõe-se que os subtipos M1 e M5 estão mais presentes no cérebro. Portanto, os efeitos centrais desse fármaco são mediados por esses dois subtipos (KLINKENBERG e BLOKLAND, 2010).

A ESC se apresenta nas formas farmacêuticas sólidas como comprimido, em solução injetável e, para algumas indicações, em adesivos transdérmicos e soluções nasais (ANTOR e cols., 2014; PERGOLIZZI JR e cols., 2012). Portanto, esse fármaco pode ser administrado oralmente, assim como pelas vias subcutânea (SC), intramuscular (IM), intravenosa (IV), ocular e transdérmica (tópica; RENNER e cols., 2005). Se administrado por via oral (VO) ou SC, sua absorção é rápida, pois é bem absorvido no trato gastrointestinal (TGI) e pela derme. De acordo com o estudo realizado por EBERT e colaboradores (2000), atinge sua concentração plasmática máxima ( $C_{máx}$ ) em cerca de 30 min quando administrada oralmente. Na via SC, atinge a  $C_{máx}$  em cerca de 15 min, a depender da dose (EBERT e cols., 1998). Já na via IM, o tempo para se chegar na  $C_{máx}$  está em torno de 20 min (EBERT e cols., 2001). Com a administração IV de ESC, foi observado um efeito amnésico em 10 min, o qual persistiu por pelo menos 120 min. Sua distribuição é ampla e aparentemente se liga irreversivelmente a proteínas plasmáticas (AHFS, 2011). Em roedores, a ligação a proteínas plasmáticas foi de

30 ± 10% (NAKASHIMA e cols., 1993). Ela atravessa a barreira hematoencefálica, assim como a placenta, e é distribuída ao leite materno também. Sua meia-vida de eliminação é de aproximadamente 9,5 horas, sendo metabolizada no fígado (por conjugação) e excretada na urina, em sua maioria na forma conjugada (AHFS, 2011). Essa conjugação é possivelmente com o ácido glicurônico ou sulfato (RENNER e cols., 2005). Mesmo que a ESC seja amplamente metabolizada, sua ação terapêutica é feita em grande parte pelo fármaco inalterado (AHFS, 2011). Apenas cerca de 2,6% do fármaco é excretado na urina em sua forma farmacologicamente ativa (KANTO e cols., 1989).

Clinicamente, a ESC é usada principalmente para a profilaxia da náusea e êmese induzidos pela anestesia (PERGOLIZZI e cols., 2012). No pré-operatório, o seu uso é justificado para prevenir efeitos colinérgicos, como arritmias cardíacas, hipotensão e bradicardia, além dos seus efeitos sedativos, anti-secretórios (principalmente no trato respiratório), antieméticos e amnésicos (RANG e cols., 2012). Ela é um dos fármacos mais usados para o enjoo em pacientes que foram submetidos a períodos curtos de movimentos intensos ou que são mais susceptíveis a esse tipo de situação. Outro uso seria em condições em que é necessária a inibição da motilidade do TGI (síndrome do intestino irritável, diverticulite, desinteria leve, etc.). Ela também pode ser usada como antiespasmódico, no tratamento sintomático da síndrome parkinsoniana e em outras condições em que se deseja os seus efeitos anticolinérgicos depressores do SNC (AHFS, 2011).

Seus efeitos adversos estão diretamente relacionados com a sua farmacodinâmica. Assim sendo, quando a ESC age em receptores do tipo M1, pode produzir tontura, amnésia, vertigem e fadiga. Entretanto, também podem ocorrer alucinações, euforia, comportamento paranóico, delírio, desorientação e irritabilidade (AHFS, 2011; RANG e cols., 2012). Os seus efeitos cardíacos estão relacionados ao receptor do tipo M2, com bradicardia em baixas doses e taquicardia em doses elevadas. Já os seus efeitos glandulares são produzidos quando os receptores do tipo M3 são antagonizados. Isso é demonstrado com a inibição da salivação (xerostomia) e da secreção de muco nas vias respiratórias e a diminuição da atividade de

glândulas sudoríparas (RENNER e cols., 2005). Podem ocorrer ainda outros efeitos periféricos, como midríase, visão turva e motilidade e secreção do TGI diminuída (RANG e cols., 2012; RENNER e cols., 2005).

Em animais, a ESC é amplamente usada como modelo farmacológico experimental de dano cognitivo (MORE e cols., 2016). Quando administrada sistemicamente, ela interferiu na aquisição da memória em modelos murinos (LIEBEN e cols., 2005). Além disso, a ESC prejudica tarefas relacionadas a procedimentos com intervalos de retenção, o que sugere que esse fármaco acomete a memória operacional espacial (KLINKERBERG e BLOKLAND, 2010; MORE e cols., 2016). Quando infundida no córtex perirrinal, a ESC afetou o reconhecimento de objetos em ratos (ABE e cols., 2004). Em estudos que utilizaram o DNMS em camundongos, ela induziu um aumento no número de omissões e na latência de resposta e uma diminuição no número de tarefas realizadas (ESTAPÉ e STECKLER, 2002). Pesquisas que utilizaram o DMS em PNHs também relataram uma diminuição no número de respostas corretas pós-ESC (BUCCAFUSCO, 2009). A partir da dose de 0,03 mg/kg, há prejuízo na memória de reconhecimento de objetos, dependendo dos parâmetros utilizados, e seu efeito é dose-dependente (BUSHNELL e cols., 1997; JONES e HIGGINS, 1995).

Em humanos, a ESC não é o fármaco mais indicado devido aos seus efeitos adversos periféricos (KLINKENBERG e BLOKLAND, 2010). No entanto, já foi comprovado danos cognitivos reversíveis que foram dose e tempo-dependente (EBERT e cols., 1998). Além disso, a concentração plasmática do fármaco parece estar relacionada a alterações no EEG de pacientes saudáveis (EBERT e cols., 2001).

## **1.5. Primatas não-humanos como modelos animais para estudos de memória**

### **1.5.1. Aspectos gerais**

Estudos clínicos estão envolvidos no desenvolvimento de qualquer medicamento novo. Além dos fatores éticos, morais, técnicos e sociais, alguns parâmetros fisiológicos, como o tecido cerebral, não podem ser analisados em humanos vivos. Portanto, não é seguro



fazê-los sem a realização de estudos pré-clínicos e isso é alcançado via modelos animais. Apesar de suas limitações, como baixa validação e predição do efeito de substâncias no organismo humano, eles são muito importantes em diversas etapas de estudo. Não é possível testar um novo fármaco sem um ensaio prévio de seus efeitos farmacodinâmicos e farmacocinéticos em animais (NESTLER e HYMAN, 2010).

Nesse contexto, modelos murinos têm sido extensivamente usados na fase pré-clínica e possuem inúmeras vantagens. Além de serem de porte menor e manipulação mais fácil, esses animais possuem uma rápida reprodução e ciclo de vida acelerado. Isso muitas vezes corresponde a uma diminuição do custo e tempo requerido. Logo, primeiramente preconiza-se o uso de espécies de roedores, porém há algumas situações em que isso não é viável (COLMAN, 2017; NESTLER e HYMAN, 2010; 't HART e cols., 2012).

Algumas doenças, comportamentos e sintomas clínicos são de difícil mimetização em roedores. Muitas vezes há uma variação filogenética grande entre eles e humanos, com a presença ou ausência de algum gene e diferentes polimorfismos genéticos. Assim, nem sempre um agente farmacológico atingirá o sítio de ação desejado (CAPITANIO e EMBORG, 2008). Além disso, algumas estruturas anatômicas não são equivalentes entre roedores e humanos. Por exemplo, o neocórtex do humano corresponde a 80% da massa cerebral, comparado com 72% do macaco rhesus e apenas 20% dos roedores. Também há áreas cerebrais funcionais em PNH que não existem em roedores, como algumas subdivisões do córtex pré-frontal (PHILLIPS e cols., 2014).

Via estudos com PNH é possível verificar, de forma mais fidedigna, os mecanismos fisiopatológicos que interferem no curso de uma doença. Assim, pode-se investigar também a segurança e a eficácia de novos fármacos (NESTLER e HYMAN, 2010). A similaridade de PNH com humanos vai desde a fisiologia, neuroanatomia (parecidos em desenvolvimento e organização cortical) e capacidade cognitiva, até a complexidade social, diferenças interindividuais, biologia reprodutiva e habilidades perceptuais e sensoriais (CAPITANIO e EMBORG, 2008; NESTLER e HYMAN, 2010; 't HART e cols., 2012; YAMAZAKI e

WATANABE, 2009). Eles são considerados o modelo animal mais preditivo em relação a parâmetros farmacocinéticos, como a depuração renal (WARD e SMITH, 2004) e metabolismo por enzimas do citocromo P450 (CYP450), devido a sua homologia com humanos (UNO e cols., 2016). Ainda, existe a questão social e ambiental, como o estresse gerado pela hierarquia que acontece mesmo em cativeiro, que pode alterar o efeito de um fármaco no organismo (BURKART e FINKENWIRTH, 2015). Outro fator que deve ser levado em consideração é a possibilidade de se realizar estudos mais fidedignos relacionados ao envelhecimento. A sua capacidade de desenvolver doenças ligadas à demência sem manipulação genética e o seu longo tempo de vida torna esse modelo o melhor para esse tipo de investigação (COLMAN, 2017; NESTLER e HYMAN, 2010). Essa longa expectativa de vida permite estudos comportamentais de longo prazo e há ainda a vantagem desses animais serem capazes de aprender tarefas mais complexas (WEERTS e cols., 2007). Diferentemente dos humanos, também é possível controlar todos os aspectos inerentes à pesquisa, como as condições de habitação, dieta e interações sociais (COLMAN, 2017).

Um dos aspectos que podem ser analisados na fase pré-clínica de um estudo é a memória de reconhecimento. Via esse tipo de metodologia, é possível avaliar efeitos de substâncias pró-mnésicas e amnésicas, e isso tem sido útil no desenvolvimento de novos fármacos para patologias como a DA (WINTERS e cols., 2010). Existem diversos procedimentos que podem ser realizados em modelos murinos e em PNHs. Dessa forma, há dois modelos de teste para avaliação desse tipo de memória: DMS/DNMS ou teste de reconhecimento de objetos. Esse primeiro procedimento foi validado primeiramente para PNH, apesar de que já foi adaptado para roedores (AMEEN-ALI e cols., 2015). Contudo, necessita-se de diversas sessões de treinamento, o que pode inviabilizar alguns projetos. Ele também utiliza reforço alimentar, que pode modificar os resultados do experimento, podendo haver alteração na motivação do animal (KINNAVANE e cols., 2014). Dito isso, recentemente, começaram a ser exploradas estratégias alternativas, como o teste de reconhecimento de objetos. Ele é baseado na tendência natural do animal em explorar mais objetos novos versus

aqueles já familiares, sem que haja um treinamento anterior ou uso de reforço. Portanto, é um teste rápido e prático e com ele é possível analisar diversos aspectos da memória declarativa, como espaço e lugar de um objeto. Contudo, ele é quase sempre realizado em modelos murinos (AMEEN-ALI e cols., 2015; WINTERS e cols., 2007).

### **1.6.2. Micos como modelos animais**

Os macacos da família Callitrichidae e do gênero *Callithrix*, representados em estudos por *C. jacchus* (mico-comum) e *C. penicillata* (mico-estrela) vivem naturalmente em grupos de 10 a 15 indivíduos em áreas de florestas tropicais, mas adaptam-se a áreas urbanas também (SOLOMON e ROSA, 2014). Eles possuem inúmeras vantagens em relação ao seu tamanho pequeno e baixo peso (varia de 250 a 450 g quando adulto; Figura 5). Isso possibilita uma manipulação mais fácil, sem a necessidade de sedação, uma menor concentração do princípio ativo utilizado e menores custos com alimentação e manejo (YAMAZAKI e WATANABE, 2009). Esse gênero vive de 10 a 12 anos em cativeiro e é capaz de se adequar a diversas condições ambientais. Além disso, eles se reproduzem facilmente nessas condições e tem alta taxa reprodutiva (BURKART e FINKENWIRTH, 2015).

Eles tornam-se sexualmente maduros aos 18 meses de idade, o que promove uma alta taxa de crescimento do grupo. Geralmente têm partos gemelares a cada 5 meses, o que não é comum para PNH (BURKART e FINKENWIRTH, 2015). Os gêmeos gerados são quimeras hematopoiéticas, permitindo que não haja uma variabilidade tão grande entre os grupos usados em um estudo. Esses animais são considerados idosos aos 8 anos de idade, podendo ser usados em estudos de envelhecimento (COLMAN, 2017). Portanto, eles unem a conveniência dos roedores com a semelhança filogenética dos modelos de PNH (MANSFIELD, 2003; 't HART e cols., 2012). Eles compartilham cerca de 93% da sequência com o genoma humano e podem desenvolver distúrbios como diabetes, doenças cardiovasculares e câncer (COLMAN, 2017).

Além disso, os micos possuem morfologia cerebral muito parecida com a de outros PNH e humanos (BURKART e FINKENWIRTH, 2015; MANSFIELD, 2003; 't HART e cols., 2012; YAMAZAKI e WATANABE, 2009), mesmo com a diferença no tamanho do cérebro e estilo de vida. Sua vantagem em estudos neuropsicofarmacológicos é a presença de mecanismos neurais semelhantes aos que ocorrem em humanos (YUN e cols., 2015). Esse tipo de estudo demonstra que algumas substâncias, como a nicotina e ESC, podem ser usadas, respectivamente, como modelo de melhora e déficit cognitivo em testes de memória operacional e atenção em animais desse gênero (SPINELLI e cols., 2006).



**Figura 5.** Indivíduo adulto da espécie *Callithrix penicillata* (mico-estrela) em vida livre na natureza. Foto: Aline Caron Borges.

Experimentos envolvendo o córtex órbito-frontal revelaram que muitas funções são similares, principalmente em tarefas de aprendizado. O número e densidade de neurônios corticais e uma grande taxa de mielinização também são parâmetros comparáveis a modelos humanos (PHILLIPS e cols., 2014; YAMAZAKI e WATANABE, 2009). Estudos realizados por BAKER (2004) revelam que uma lesão do tálamo e córtex causam danos à memória operacional espacial. Outras tarefas de aprendizado, como o teste de discriminação visual, já foram avaliadas em micos idosos (MUNGER e cols., 2017). Também já foram feitos testes de

memória como o DMS para confirmar se ela é afetada por diferentes intervalos de retenção (YAMAZAKI e cols., 2016). Experimentos que investigam memória de reconhecimento de objetos espontânea de micos-estrela são bem recentes e devem ser validados de forma mais abrangente (MELAMED e cols., 2017a,b).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

O trabalho teve como objetivo demonstrar a capacidade de memória de reconhecimento de micos-estrela (*Callithrix penicillata*) via teste de reconhecimento espontâneo de objetos (REO) e analisar o efeito da administração da ESC no desempenho dos animais nesse teste.

### **2.2. Objetivos específicos**

O estudo visou, de maneira específica:

- a) A validação do teste de REO, nunca antes utilizado em PNH, em um intervalo de retenção de 6h;
- b) A demonstração da capacidade de memória de reconhecimento dos animais do grupo SAL nesse mesmo intervalo;
- c) A constatação de desempenho inferior quando é administrada a ESC, um antagonista não-seletivo de receptores muscarínicos que possui conhecida ação amnésica em diversos modelos animais.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Aspectos éticos**

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília (processo SEI no. 23106.045614/2017-94; protocolo no. 37/2017). Uma cópia da declaração emitida pela CEUA encontra-se no Anexo 1. Os experimentos foram realizados de acordo com os preceitos éticos estipulados pelo CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal) e pela Lei Arouca (nº11.794/2008), que regulamenta a experimentação animal no Brasil. Além disso, o estudo foi realizado com animais mantidos no Centro de Primatologia da Universidade de Brasília (CPUnB), o qual é credenciado pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) como criadouro de primatas para fins científicos (Registro IBAMA no. 1/53/1999/000006-2).

#### **3.2. Sujeitos e condições gerais de alojamento**

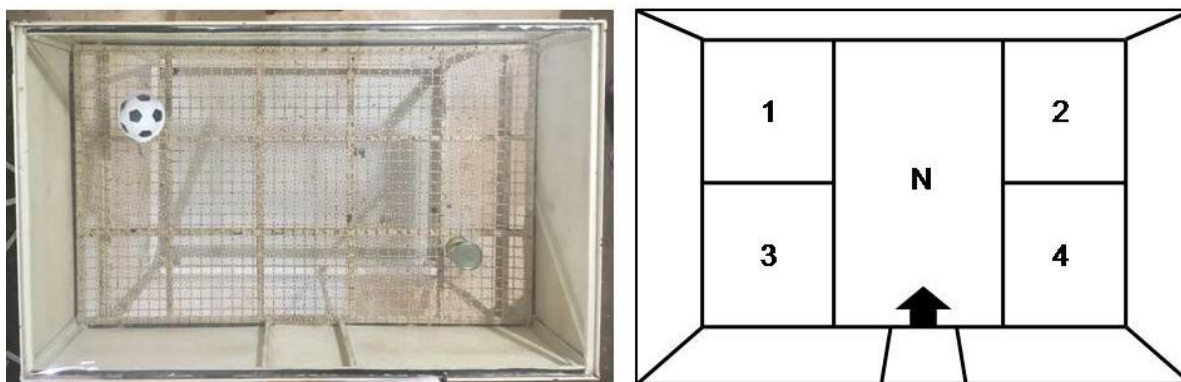
O presente trabalho utilizou como sujeitos de pesquisa indivíduos adultos (>18 meses), de ambos os sexos, da espécie *Callithrix penicillata* (mico-estrela; n=10; Figura 5). Os animais foram mantidos no CPUnB, que está localizado na Fazenda Água Limpa da Universidade de Brasília (FAL/UnB). Nesse centro, os viveiros estão circundados por mata de galeria que permite a manutenção dos animais sob condições naturais de temperatura, luminosidade e umidade. Os sujeitos que participaram do estudo já faziam parte do plantel, tendo sido repassados pelo IBAMA ou nascidos no próprio CPUnB. Como parte da rotina de manejo dos animais, os mesmos foram previamente implantados com um microchip subcutâneo, permitindo que fossem rápida e precisamente identificados.

Os animais foram alojados aos pares, em viveiros padrões para calitriquídeos do CPUnB (1 m de largura x 2 m de profundidade x 2 m de altura). Os viveiros estão dispostos de forma a permitir o contato acústico e olfativo entre os animais, porém impede o contato visual entre eles. A alimentação consistiu em frutas, legumes, sementes e fonte de proteína (peito de frango, ovos e/ou larvas de tenébre), sendo fornecida uma vez ao dia. Além disso,

água e ração para primatas foram disponibilizados livremente aos indivíduos. As condições descritas para alojamento e manutenção dos animais foram de acordo com as normas e regulamentos do IBAMA.

### 3.3. Aparato experimental

Os animais foram testados no aparato do Campo Aberto (CA; Figura 6), o qual 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. A arena do CA tinha três paredes de chapa de alumínio, enquanto que a quarta parede e o teto eram de vidro transparente de 4 mm. O chão foi confeccionado de tela metálica. Uma porta tipo-guilhotina, localizada na parede oposta à de vidro, foi o ponto de acesso ao aparato. Para facilitar o rastreamento dos sujeitos dentro da arena, essa foi pintada de branco, excluindo-se a parede e o teto de vidro.



**Figura 6.** Aparato experimental do Campo Aberto empregado no procedimento. À esquerda, fotografia da vista superior do aparato contendo com os objetos utilizados. À direita, representação esquemática do aparato com indicação da divisão espacial dos quadrantes utilizados; 1 - 4: quatro quadrante externos onde os objetos poderiam ser posicionados; N: quadrante neutro; seta: porta do tipo-guilhotina que dava acesso ao aparato. No caso da fotografia à esquerda, os objetos foram colocados nos quadrantes 1 e 4.

Além disso, a arena foi dividida (imaginariamente) em cinco quadrantes (Figura 6): quatro zonas externas com as mesmas dimensões (32,5 cm de largura x 37,5 cm de profundidade) e uma zona central maior (65 cm de largura x 75 cm de profundidade). Os quadrantes externos corresponderam aos quatro cantos da arena retangular, sendo os mesmos utilizados como possíveis locais para apresentação dos objetos teste (vide



*Procedimento experimental* abaixo). O quadrante central foi considerado como zona neutra, não havendo a colocação de objetos nesse local.

O aparato foi montado em uma sala de experimento situada a 50 m dos viveiros de moradia dos animais. Visto isso, os sujeitos foram transportados dos seus viveiros até a sala de experimento, e depois de volta aos seus viveiros, em uma caixa-transporte (35 cm largura x 20 cm de profundidade x 23 cm de altura). Essa caixa não permitiu que o animal visualizasse o ambiente externo durante o seu transporte e tinha uma porta do tipo-guilhotina que se acoplava diretamente à porta de acesso do aparato. Pistas visuais para orientação espacial dos sujeitos foram fornecidas pela localização de diferentes objetos dentro da sala de experimento (porta, quadro de aviso, prateleiras, etc.).

A observação e o registro das sessões foram realizados via um circuito interno de filmagem. Esse sistema consistiu em duas câmeras digitais (modelo C920, Logitech, Brasil), sendo uma fixada a aproximadamente 1,5 m 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 conectadas diretamente a um computador portátil (laptop) localizado em uma sala adjacente à sala de experimento, de onde todas as sessões foram observadas e registradas.

### **3.4. Fármacos empregados**

A depender do grupo experimental (*vide Procedimento experimental* abaixo), os sujeitos foram tratados com:

- a) 0,05 mg/kg de hidrobrometo de escopolamina (ESC; Sigma-Aldrich, Brasil),
- b) solução salina 0,9% (SAL).

A ESC foi dissolvida em solução salina, a qual também foi empregada como veículo controle. As administrações foram realizadas por via subcutânea, no volume de 0,5 mL/kg, 20 min antes do início do procedimento comportamental descrito abaixo. A dose da substância colinérgica empregada foi baseada em estudos prévios sobre seus efeitos na memória de

nicos (HARDER e cols., 1998; MELAMED e cols., 2017b; RIDLEY e cols., 1984a, 1984b, 1986; SPINELLI e cols., 2006).

### **3.5. Procedimento experimental**

Todos os sujeitos foram inicialmente submetidos a uma sessão individual de 10 min de habituação ao aparato experimental. Nessa sessão não foi feita nenhuma administração e o aparato permaneceu vazio.

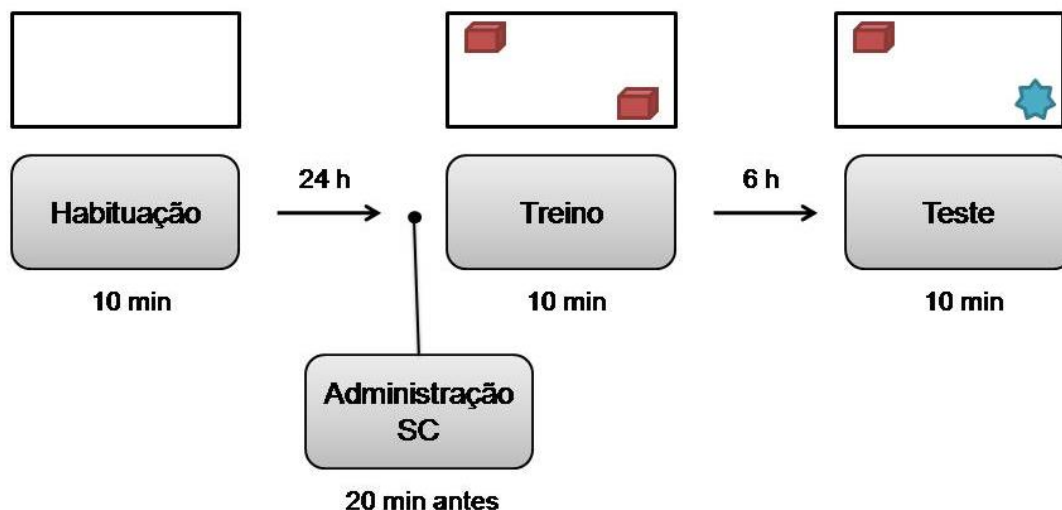
Os sujeitos foram então divididos aleatoriamente em dois grupos experimentais, de acordo com o tratamento farmacológico que seria administrado:

- a) SAL: n=5;
- b) ESC: n=5.

Após um intervalo de 24 h da sessão de habituação, todos os sujeitos foram submetidos individualmente ao teste de REO. Esse teste consistiu em duas sessões, de 10 min cada, com um intervalo de 6 h entre elas: uma sessão treino e uma sessão teste (Figura 7). Na sessão treino, duas cópias idênticas de um mesmo objeto foram colocadas no chão do aparato – cada exemplar em um quadrante externo distinto. A escolha dos quadrantes onde foram colocados os objetos foi estabelecida de forma aleatória, e, assim, a localização dos mesmos variou entre os sujeitos. Durante os 10 min da sessão treino, cada sujeito pôde explorar livremente os dois objetos. Após um intervalo de 6 h, os sujeitos foram recolocados na arena do CA para realização da sessão teste. Para essa sessão também foram usados dois objetos: um idêntico ao item visto anteriormente na sessão treino (objeto familiar) e um item diferente (objeto novo). Esses objetos foram posicionados nos mesmos dois quadrantes onde foram colocados os objetos na sessão treino. Cada sujeito pôde novamente explorar livremente os dois objetos durante os 10 min da sessão teste.

Em cada sessão (habituação, treino e teste), o animal foi capturado em seu viveiro de moradia, colocado dentro da caixa-transporte, levado até a sala de experimento e então liberado na arena do CA. Durante a sessão, o sujeito teve livre acesso a todo o ambiente.

Após o intervalo de 10 min da sessão, o animal foi levado de volta ao seu viveiro de moradia via caixa-transporte.



**Figura 7.** Representação esquemática do Teste de Reconhecimento Espontâneo de Objeto (REO). Os retângulos superiores representam o aparato experimental com a colocação dos objetos. Na sessão de habituação, não foram utilizados objetos. No treino, dois objetos idênticos foram colocados em quadrantes aleatórios. No teste, um dos objetos foi substituído. Cada sessão durou 10 min, com os intervalos entre elas explicitados na imagem (24 ou 6 h). A administração dos fármacos ocorreu 20 min antes da sessão treino. SC: subcutânea.

Cada sujeito recebeu seu tratamento pré-estabelecido antes do início da sessão treino. O tratamento foi ministrado nesse momento com base em estudos anteriores que demonstraram que a ESC exerce seu efeito amnésico principalmente por interferir no processo de aquisição/consolidação da informação (AIGNER e cols., 1991; WINTERS e cols., 2007). Além disso, efeitos significativos sobre a atividade neuronal só foram detectados cerca de 30 min após a administração sistêmica de ESC (EBERT e cols., 2001).

Os objetos usados como estímulo consistiram em duas cópias idênticas de dois itens distintos em termos de sua forma, cor e textura (Figura 8). Desta forma pretendeu-se facilitar que os micos pudessem diferenciar entre o objeto familiar e o objeto novo. O objeto A foi uma lata de milho (7 cm de diâmetro x 8 cm de altura) e o objeto B foi uma bola de futebol de plástico (13 cm de diâmetro x 10 cm de altura; Figura 8). Os dois objetos consistiram em estímulos desconhecidos para os animais e neutros em termos de relevância biológica. Além disso, tinham peso suficiente para não poderem ser deslocados pelos animais. Metade dos

sujeitos foram testados com o item A sendo o objeto familiar e o item B o objeto novo. Para a outra metade, o item B foi designado como sendo o objeto familiar e o item A foi o objeto novo.



**Figura 8.** Objetos utilizados no Teste de Reconhecimento Espontâneo de Objeto (REO). A: bola de futebol de plástico. B: lata de milho.

O aparato e os objetos foram higienizados com uma solução de álcool 70% após cada sessão. As sessões foram realizadas no período da manhã, das 8:00 às 12:00 h para as sessões de habituação e treino, ou da tarde, das 14:00 – 17:00 h para a sessão teste.

### 3.6. Análise dos dados

Todas as sessões foram registradas e analisadas no software AnyMaze® (Stoelting Co., EUA; Figura 9) por um observador previamente treinado. Foram registrados os seguintes comportamentos: (1) *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); (2) *locomoção* – tempo em que o sujeito estiver em movimento por um período superior a 2 s. Vale ressaltar que micos possuem uma

orientação predominantemente visual em sua resposta a estímulos em seu ambiente (FORSTER, 1995).

Considerou-se haver uma memória de reconhecimento se, na sessão teste, o sujeito passasse significativamente mais tempo explorando o objeto novo que o familiar (DERE e cols., 2007), 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 de Discriminação* para a sessão teste, de acordo com ENNACEUR e cols. (1997): [tempo de exploração do objeto novo – tempo de exploração do objeto familiar] / [tempo de exploração dos dois objetos]. Um índice de  $\approx 0,0$  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 novo do que o familiar.

Para ser incluso na análise, o animal precisava ter explorado cada objeto por pelo menos 5 s na sessão treino. Os resultados foram expressos como a média dos valores e o erro padrão da média ( $\pm \text{epm}$ ).



**Figura 9.** Imagem das câmeras para análise dos comportamentos no software AnyMaze®. As imagens foram obtidas durante uma sessão treino, havendo no aparato dois objetos idênticos. A: vista superior. B: vista frontal.

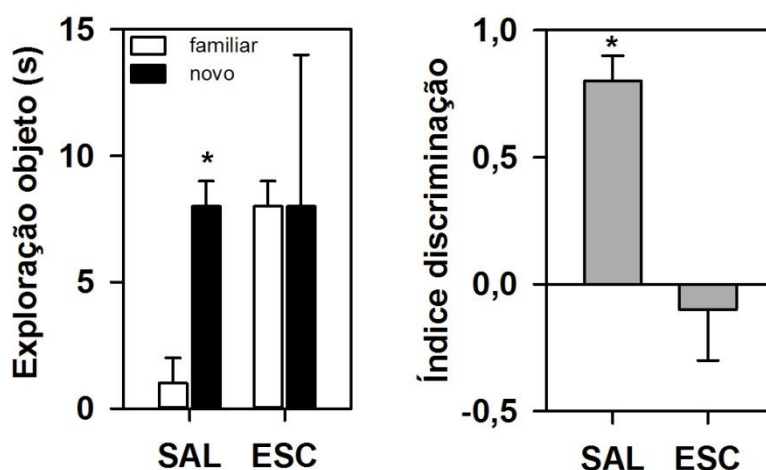
### 3.7. Análise estatística

Os dados foram analisados para se estabelecer possíveis diferenças entre os grupos em termos: (1) do tempo de exploração dos objetos familiar x novo na sessão teste, (2) do

tempo de exploração 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 (SAL x ESC) e 'objeto' (novo x familiar) ou 'sessão' (treino x teste) a variável dependente. Quando resultados significativos foram obtidos, o teste *post hoc* de Tukey foi utilizado. Além disso, para o Índice de Discriminação, os dados foram analisados usando o teste t para uma amostra (*one-sample t test*), para comparação com o valor de zero (nível do acaso). O nível de significância adotado em todos os testes foi de  $p \leq 0,05$ .

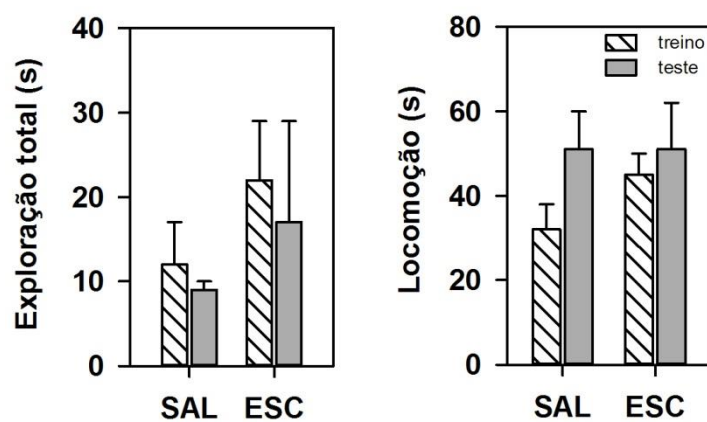
#### 4. RESULTADOS

Em termos da exploração dos objetos na sessão teste da tarefa de REO, foi observado que os animais exploraram por significativamente mais tempo o objeto novo do que o item familiar. Contudo, tal efeito só foi detectado no grupo de micos que foram previamente tratados com SAL, sendo que o grupo ESC explorou os dois objetos de forma equitativa (*fator tratamento*:  $F_{1,8}=0,43$ ,  $p=0,53$ ; *fator objeto*:  $F_{1,8}=12,90$ ,  $p=0,007$ ; *interação*:  $F_{1,8}=16,97$ ,  $p=0,003$ ; Figura 10). Esse resultado foi corroborado pelo resultado do Índice de Discriminação calculado para a sessão teste (Figura 10). O resultado obtido para o grupo SAL foi significativamente acima de zero ( $t_4=5,76$ ,  $p=0,005$ ), enquanto que o do grupo ESC não diferiu do valor de zero ( $t_4= -0,33$ ,  $p=0,76$ ).



**Figura 10.** Média ( $\pm$  e.p.m.) do tempo de exploração (em segundos; à esquerda) dos objetos familiar e novo na sessão teste, e do Índice de Discriminação (à direita), dos micos que receberam salina (SAL) ou 0,05 mg/kg de escopolamina (ESC) de forma aguda e que depois de 20 min foram submetidos ao teste de memória de reconhecimento espontâneo de objetos.  $n=5$  por grupo. \* $p<0,05$  vs. objeto familiar do grupo SAL.

Em relação à exploração total dos objetos, não foi detectada uma diferença significativa entre os grupos SAL e ESC, ou entre as sessões treino e teste (*fator tratamento*:  $F_{1,8}=0,82$ ,  $p=0,39$ ; *fator sessão*:  $F_{1,8}=0,96$ ,  $p=0,36$ ; *interação*:  $F_{1,8}= 0,04$ ,  $p=0,84$ ; Figura 11). Para o comportamento de locomoção, um perfil similar foi detectado (Figura 11). Nesse sentido, não houve uma diferença significativa no tempo de locomoção visto nos animais do grupo SAL e ESC, assim como entre as sessões treino e teste (*fator tratamento*:  $F_{1,8}=0,43$ ,  $p=0,53$ ; *fator sessão*:  $F_{1,8}=2,98$ ,  $p=0,12$ ; *interação*:  $F_{1,8}=0,70$ ,  $p=0,43$ ).



**Figura 11.** Média ( $\pm$  e.p.m.) da exploração total dos objetos (em segundos; à esquerda) e da locomoção (em segundos; à direita) observados nas sessões treino e teste dos micos que receberam salina (SAL) ou 0,05 mg/kg de escopolamina (ESC) de forma aguda e que depois de 20 min foram submetidos ao teste de memória de reconhecimento espontâneo de objetos. n=5 por grupo.



## 5. DISCUSSÃO

De acordo com os resultados obtidos, os micos-estrela apresentam uma memória de reconhecimento para objetos neutros encontrados em seu ambiente, uma vez que, na sessão teste da tarefa de memória de REO, os animais do grupo SAL exploraram significativamente mais o objeto novo em relação ao familiar.

Nos micos, essa memória de reconhecimento parece durar pelo menos 6 h, correspondendo a intervalos de retenção já empregados anteriormente em outros animais usando essa mesma tarefa. Por exemplo, camundongos demonstram uma preferência pelo objeto novo, em comparação ao familiar, após intervalos que variam de minutos até poucas horas (2 *min*: PHENSY e cols., 2017; 5 *min*: BRIZ e cols., 2017; NAZIR e cols., 2017; 2 *h*: LIN e cols., 2017). Contudo, parece haver um declínio dessa memória depois de 24 h (LIN e cols., 2017; porém ver VAN CAN e cols., 2017; NAZIR e cols., 2017). Em ratos, houve uma maior exploração do objeto novo versus o familiar após um intervalo de retenção de 1, 5, 4 e 24 h (MAZUMDER e cols., 2017; TAMIJANI e cols., 2017). Novamente esse efeito não foi visto após intervalos mais longos (48 *h*: CALLAHAN e cols., 2013; 7 *dias*: FERNANDEZ e SAVAGE, 2017). Quando esse teste foi feito com hamsters, os animais também exibiram Índice de Discriminação diferente do acaso com o intervalo de retenção de 24 h (PALCHYKOVA e cols., 2006).

O teste de REO também já foi realizado em espécies não-roedoras, como em coelhos, os quais foram capazes de reconhecer o objeto novo após 5 min. Entretanto, com intervalos maiores (20 min, 3 h, 6 h), o Índice de Discriminação não diferiu de zero (HOFFMAN e BASURTO, 2013; porém ver THOMPSON e cols., 2005). Suínos, após um intervalo de retenção de 1 h, exploraram mais o objeto novo do que o familiar (MOUSTGAARD e cols., 2002), porém outros autores só constataram um desempenho significativo no teste REO quando intervalos de 10 (KORNUM e cols., 2007; SØNDERGAARD e cols., 2012) e 40 min foram utilizados (SØNDERGAARD e cols., 2012). A memória de reconhecimento também já foi testada em peixes, não havendo exploração significativa após 2, 6 e 24 h entre as sessões

treino e teste (LUCON-XICCATO e DADDA, 2014), apenas depois de intervalos mais curtos (1 a 30 min; MAY e cols., 2016; MILETTO PETRAZZINI e cols., 2012).

O teste de REO, até onde se sabe, é inédito em PNH. Em experimentos realizados recentemente em micos-estrela, aplicou-se o teste de reconhecimento objeto-lugar (ROL) – uma variação do teste de REO. Nessa versão, dois objetos idênticos são apresentados no treino e um deles é deslocado na fase teste. Os animais do grupo SAL foram capazes de reconhecer o objeto deslocado após um intervalo de retenção de 10 min (MELAMED e cols., 2017b). Porém, vale ressaltar que outros testes são usados para avaliar a memória de reconhecimento em PNH, principalmente os de discriminação visual. Nesse tipo de procedimento feito em macacos *rhesus*, geralmente se usa intervalos de retenção que variam entre poucos segundos até alguns minutos (BACHEVALIER e cols., 2015; TANG e cols., 1997). Ainda, ZOLA e colaboradores (2000) demonstraram que, quanto maior o intervalo entre estímulo e a resposta, menor foi a porcentagem de acerto de macacos cinomolgos.

No presente estudo, a administração de ESC antes da sessão treino induziu um efeito amnésico, uma vez que houve uma exploração equitativa dos objetos familiar e novo na sessão teste por parte dos animais que foram tratados com esse fármaco. Portanto, os animais desse grupo não exibiram uma memória de reconhecimento. Um resultado semelhante no mesmo teste foi obtido em camundongos após um intervalo de retenção de 15 min (DE BRUIN e POUZET, 2006; NAZIR e cols., 2017) e 24 h (MUGWAGWA e cols., 2015; NAZIR e cols., 2017), assim como em ratos usando intervalos de 15 min a 3 h (JACKLIN e cols., 2015; SCHÄBLE e cols., 2012; TERRY e cols., 2011).

Quando há um acometimento da sinalização colinérgica, por lesão de áreas com grande quantidade de neurônios colinérgicos ou por uso de fármacos antagonistas dessa via, como a ESC, há um prejuízo em processos mnemônicos (JACKLIN e cols., 2015). Desta forma, o efeito amnésico da ESC era esperado, visto que ela tem sido usada como um modelo farmacológico de indução de amnésia em diversos trabalhos (DE BRUIN e POUZET, 2006; SCHÄBLE e cols., 2012; WINTERS e cols., 2006).

Acredita-se que a ESC age nos processos de aquisição e consolidação da informação, uma vez que não há déficits de memória de reconhecimento quando ela é administrada antes da sessão teste (JACKLIN e cols., 2015; WALLENSTEIN e VAGO, 2001). No caso do presente estudo, não se pode afirmar exatamente em qual desses dois processos o fármaco interferiu. Com base no momento da administração (20 min pré-treino) e nas características farmacocinéticas da ESC, acredita-se que a mesma possa ter influenciado mais o processo de consolidação. Em humanos, sua concentração máxima é atingida 30 min depois da administração (LIEM-MOOLENAAR, 2011). Além disso, apenas depois de 30 a 90 min de uma administração IM é que se observa uma alteração no perfil eletroencefalográfico de indivíduos sadios (EBERT e cols., 2001).

A ACh é um neurotransmissor que participa dos processos de aprendizado e memória. Quando a ESC (WINTERS e cols., 2006) ou uma imunotoxina colinérgica específica (WINTERS e BUSSEY, 2005) são infundidas bilateralmente no córtex perirrinal de ratos, antes da sessão treino, há um déficit na memória de reconhecimento. Um efeito similar já foi observado em macacos *rhesus* após a administração sistêmica ou central de ESC nessa mesma área (TANG e cols., 1997; YAMAMOTO e cols., 2011). O mesmo efeito foi constatado após a administração de antagonistas de receptores colinérgicos do tipo M1, mas não com um antagonista de receptores M2, o que sugere que esse efeito amnésico acontece via inativação de receptores M1 (WU e cols., 2012). Isso também foi relatado em humanos em um teste de aprendizado viso-espacial após a administração de ESC (HAREL e cols., 2013). Portanto, acredita-se que receptores muscarínicos M1 do córtex perirrinal são importantes para a aquisição de informações novas (WINTERS e cols., 2005; 2006).

Dados sobre os efeitos da ESC na memória de reconhecimento de micos ainda são limitados. A ESC, também na dose usada de 0,06 mg/kg, teve efeito amnésico em um teste de discriminação visual de objetos empregando um intervalo de 24 h (HARDER e cols., 1998; RIDLEY e cols., 1984a; 1984b). Quando a dose de 0,03 mg/kg foi administrada em animais com lesão no prosencéfalo basal, foi visto um déficit de discriminação visual de objetos

(RIDLEY e cols., 1985; RIDLEY e cols., 1986; porém ver ROBERTS e cols., 1990), o que não foi observado em animais sem lesão (RIDLEY e cols., 1984a). A ESC também parece prejudicar aspectos da memória operacional de micos (SPINELLI e cols., 2006).

Portanto, acredita-se que o modelo de amnésia induzido pela ESC é adequado para auxiliar nos estudos dos mecanismos fisiológicos envolvidos no aprendizado e memória (LIEM-MOOLENAAR, 2011). O prejuízo na aquisição de novas memórias declarativas é um dos sintomas iniciais mais proeminentes da DA (WINTERS e cols., 2006), sendo que mais estudos se fazem necessários para aumentar o nosso conhecimento na área e desenvolver novas e/ou melhorar estratégias terapêuticas. Para isso, o uso de PNH é justificado, entre outras considerações, pela organização citoquímica de neurônios colinérgicos do prosencéfalo basal (uma das áreas afetadas na DA), que se assemelha muito mais a humanos que os dos modelos murinos (GEULA e cols., 1993).

Vale ressaltar que o déficit de memória causado pela ESC não parece ter sido influenciado por alterações na locomoção ou na motivação dos animais em explorar os objetos. Em ratos, há relatos de que a ESC pode induzir tanto um aumento (DAY e cols., 1991) como uma diminuição da locomoção (BESHEER e cols., 2001). No presente estudo, não houve alteração significativa nos níveis de locomoção entre as sessões treino e teste, similar a estudos anteriores nessa espécie empregando a ESC em um protocolo semelhante (MELAMED e cols., 2017b). Além disso, a exploração total dos objetos também se manteve constante entre as duas sessões.

O teste de reconhecimento de objetos tem sido um procedimento amplamente usado em estudos comportamentais de neurociência. Apresenta vantagens por não envolver privação alimentar, motivação ou estímulo aversivo, e a duração do teste é relativamente curta, sem a necessidade de treinamento prévio. Além disso, é um teste simples que estuda processos cognitivos que explicam a memória de reconhecimento e que dependem dos mesmos mecanismos neurais (BLASER e HEYSER, 2015; KINNAVANE e cols., 2015). Portanto, nesse teste é possível fazer uma pesquisa comparativa entre mamíferos e não-

mamíferos, visto que é uma tarefa de relevância biológica para várias espécies (BLASER e HEYSER, 2015). Por se basear essencialmente na curiosidade natural dos animais, os dados obtidos nesse teste podem ser extrapolados para humanos, refletindo assim uma memória do tipo episódica (PITSIKAS, 2015). Adicionalmente, com ele, pode se avaliar separadamente as diferentes fases de formação da memória (aquisição, consolidação e evocação). Dessa forma, ele é usado em estudos psicofarmacológicos, inclusive nos que investigam a ação de novos fármacos (CHUHAN e TAUKULIS, 2006; LYON e cols., 2012; PITSIKAS, 2015).

Demências, de forma geral, podem interferir em processos de aprendizado e memória, além de habilidades de percepção visual (ARMSTRONG, 2012). Visto isso, o teste de REO pode ser utilizado como uma ferramenta para estudos dos mecanismos envolvidos nesses tipos de doença. O seu uso já foi relatado para DA (MEUNIER e cols., 2013; SØNDERGAARD e cols., 2012; WOLF e cols., 2016), Doença de Huntington (ABADA e cols., 2013) e Demência com Corpos de Lewis (ARMSTRONG, 2012).

## **6. CONCLUSÃO**

Os micos foram capazes de realizar a tarefa de REO usando-se um intervalo de retenção de 6 h e, por isso, manifestaram memória de reconhecimento. A administração de ESC induziu um déficit no desempenho dos micos, quando injetada 20 min antes da sessão treino. Esse dado corrobora o de outros estudos e demonstra que esse fármaco atua na aquisição e/ou consolidação de novas informações.

Esse teste já foi realizado com diversas espécies, e apresenta vantagens metodológicas por ser simples, rápido e de relativo baixo custo. Além disso, não há a necessidade de reforço alimentar e sessões de treinamento prévio. Com o mesmo teste, é possível avaliar a memória de reconhecimento em diversas espécies e fazer estudos comparativos. Ele também é útil no desenvolvimento de novos fármacos e compõe um dos testes pré-clínicos de avaliação de cognição e memória. Com esse método, é possível examinar mecanismos de doenças neurodegenerativas que acometem milhões de pessoas mundialmente, sendo a mais comum a DA. Dessa forma, o teste de REO é uma ferramenta que tende a ser cada vez mais utilizada em PNH devido aos seus muitos benefícios.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

't Hart BA, Abbott DH, Nakamura K, Fuchs E. The marmoset monkey: a multi-purpose preclinical and translational model of human biology and disease. *Drug Discov Today* 17: 1160-1165, 2012.

Abada YS, Nguyen HP, Schreiber R, Ellenbroek B. Assessment of motor function, sensory motor gating and recognition memory in a novel BACHD transgenic rat model for huntington disease. *PLoS One* 8: e68584, 2013.

Abe H., Ishida Y., Iwasaki T. Perirhinal N-methyl-D-aspartate and muscarinic systems participate in object recognition in rats. *Neurosci Lett* 356: 191–194, 2004.

Abel T, Lattal KM. Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. *Curr Opin Neurobiol* 11:180-187, 2001.

Abreu-Villaça Y, Figueiras CC, Manhães AC. Developmental aspects of the cholinergic system. *Behav Brain Res* 221: 367-378, 2011.

Aigner T, Walker DL, Mishkin M. Comparison of the effects of scopolamine administered before and after acquisition in a test of visual recognition memory in monkeys. *Behav Neural Biol* 55: 61–67, 1991.

Amadio M, Govoni S, Alkon DL, Pascale A. Emerging targets for the pharmacology of learning and memory. *Pharmacol Res* 50: 111-122, 2004.

Ameen-Ali KE, Easton A, Eacott MJ. Moving beyond standard procedures to assess spontaneous recognition memory. *Neurosci Biobehav Rev* 53: 37-51, 2015.

American Society of Health-System Pharmacists. AHFS Drug Information. 2011. 4000 p.

Antor MA, Uribe AA, Erminy-Falcon N, Werner JG, Candiotti KA, Pergolizzi JV, Bergese SD. The effect of transdermal scopolamine for the prevention of postoperative nausea and vomiting. *Front Pharmacol* 5: 55, 2014.

Armstrong RA. Visual signs and symptoms of dementia with Lewy bodies. *Clin Exp Optom* 95: 621-630, 2012.

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

Baker KC. Benefits of positive human interaction for socially-housed chimpanzees. *Anim Welfare* 13: 239–245, 2004.

Barker GR, Bird F, Alexander V, Warburton EC. Recognition memory for objects, place, and temporal order: a disconnection analysis of the role of the medial prefrontal cortex and perirhinal cortex. *J Neurosci* 27: 2948-2957, 2007.

Bartus RT. On neurodegenerative diseases, models, and treatment strategies: lessons learned and lessons forgotten a generation following the cholinergic hypothesis. *Exp Neurol* 163: 495-529, 2000.

Baxter MG, Bucci DJ. Selective immunotoxic lesions of basal forebrain cholinergic neurons: twenty years of research and new directions. *Behav Neurosci* 127: 611-618, 2013.

Bell MA, Cuevas K. Using EEG to study cognitive development: issues and practices. *J Cogn Dev* 13: 281–294, 2012.

Besheer J, Short KR, Bevinsa RA. Dopaminergic and cholinergic antagonism in a novel-object detection task with rats. *Behav Brain Res* 126: 211-217, 2001.

Blaser R, Heyser C. Spontaneous object recognition: a promising approach to the comparative study of memory. *Front Behav Neurosci* 9: 183, 2015.

Briz V, Restivo L, Pasciuto E, Juczewski K, Mercaldo V, Lo AC, Baatsen P, Gounko NV, Borreca A, Girardi T, Luca R, Nys J, Poorthuis RB, Mansvelder HD, Fisone G, Ammassari-Teule M, Arckens L, Krieger P, Meredith R, Bagni C. The non-coding RNA BC1 regulates experience-dependent structural plasticity and learning. *Nat Commun* 8: 293, 2017.

Brown MW, Warburton EC, Aggleton JP. Recognition memory: material, processes, and substrates. *Hippocampus* 20: 1228-1244, 2010.

Brunton LL, Chabner BA, Knollmann BC. Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics. Mc Graw Hill Education, 12<sup>a</sup> edição; 2011. 2112p.

Buccafusco JJ. The revival of scopolamine reversal for the assessment of cognition-enhancing drugs. *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience*. CRC Press/Taylor & Francis. 2<sup>a</sup> edição, 2009. 360 p.

Bucci DJ, Holland PC, Gallagher M. Removal of cholinergic input to rat posterior parietal cortex disrupts incremental processing of conditioned stimuli. *J Neurosci* 18: 8038–8046, 1998.



Burkart JM, Finkenwirth C. Marmosets as model species in neuroscience and evolutionary anthropology. *Neurosci Res* 93: 8-19, 2015.

Bushnell PJ, Oshiro WM, Padnos BK. Detection of visual signals by rats: effects of chlordiazepoxide and cholinergic and adrenergic drugs on sustained attention. *Psychopharmacology* 134: 230–241, 1997.

Camina E, Güell F. The neuroanatomical, neurophysiological and psychological basis of memory: current models and their origins. *Front Pharmacol* 8: 438, 2017.

Callahan PM, Hutchings EJ, Kille NJ, Chapman JM, Terry AV Jr. 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, 2013.

Capitano JP, Emborg ME. Contributions of non-human primates to neuroscience research. *Lancet* 371: 1126-1135, 2008.

Caulfield MP, Birdsall NJ. International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol Rev* 50: 279-290, 1998.

Chuhan YS, Taukulis HK. Impairment of single-trial memory formation by oral methylphenidate in the rat. *Neur Learn Mem* 85: 125-131, 2006.

Collier B, Katz HS. Acetylcholine synthesis from recaptured choline by a sympathetic ganglion. *J Physiol* 238: 639–655, 1974.

Colman RJ. Non-human primates as a model for aging. *Biochim Biophys Acta* 17: 30232-6, 2017.

Cooper E, Couturier S, Ballivet M. Pentameric structure and subunit stoichiometry of a neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Nature* 350: 235-238, 1991.

Croxson PL, Browning PGF, Gaffan D, Baxter MG. Acetylcholine facilitates recovery of episodic memory after brain damage. *J Neurosci* 32: 13787–13795, 2012.

Day J, Damsma G, Fibiger HC. Cholinergic activity in the rat hippocampus, cortex and striatum correlates with locomotor activity: an in vivo microdialysis study. *Pharmacol Biochem Behav* 38: 723-729, 1991.

de Bruin N, Pouzet B. 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, 2006.

Deiana S, Platt B, Riedel G. The cholinergic system and spatial learning. *Behav Brain Res* 221: 389-411, 2011.

Dere E, Huston JP, Silva MADS. The pharmacology, neuroanatomy and neurogenetics of one-trial object recognition in rodents. *Neur Bio Rev* 31: 673–704, 2007.

DeVito LM, Eichenbaum H. Memory for the order of events in specific sequences: contributions of the hippocampus and medial prefrontal cortex. *J Neurosci* 31: 3169–3175, 2011.

Dobransky T, Davis WL, Xiao G, Ryllet RJ. Expression, purification and characterization of recombinant human choline acetyltransferase: phosphorylation of the enzyme regulates catalytic activity. *Biochem. J* 349: 141–151, 2000.

Ebert U, Grossmann M, Oertel R, Gramatté T, Kirch W. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of the electroencephalogram effects of scopolamine in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol* 41: 51-60, 2001.

Ebert U, Oertel R, Kirch W. Influence of grapefruit juice on scopolamine pharmacokinetics and pharmacodynamics in healthy male and female subjects. *Int J Clin Pharmacol Ther* 38: 523-531, 2000.

Ebert U, Siepmann M, Oertel R, Wesnes KA, Kirch W. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of scopolamine after subcutaneous administration. *J Clin Pharmacol* 38: 720-726, 1998.

Eichenbaum H, Yonelinas AP, Ranganath C. The medial temporal lobe and recognition memory. *Annu Rev Neurosci* 30: 123-152, 2007.

Ennaceur A, Neave N, Aggleton JP. 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, 1997.

Everitt BJ, Robbins TW. Central cholinergic systems and cognition. *Annu Rev Psychol* 48: 649-684, 1997.

Estepé N, Steckler T. Cholinergic blockade impairs performance in operant DNMTTP in two inbred strains of mice. *Pharmacol Biochem Behav* 72: 319-334, 2002.

Felder CC. Muscarinic acetylcholine receptors: signal transduction through multiple effectors. *FASEB J* 9: 619-625, 1995.

Ferreira-Vieira TH, Guimaraes IM, Silva FR, Ribeiro FM. Alzheimer's disease: targeting the cholinergic system. *Curr Neuropharmacol* 14: 101-115, 2016.

Fernandez GM, Savage LM. Adolescent binge ethanol exposure alters specific forebrain cholinergic cell populations and leads to selective functional deficits in the prefrontal cortex. *Neuroscience* 361: 129-143, 2017.

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

Gaffan D. Recognition impaired and association intact in the memory of monkeys after transection of the fornix. *J Comp Physiol Psychol* 86:1100-1109, 1974.

Gasbarri A, Pompili A, Packard MG, Tomaz C. Habit learning and memory in mammals: behavioral and neural characteristics. *Neurobiol Learn Mem* 114: 198-208, 2014.

Geula C, Schatz CR, Mesulam MM. Differential localization of NADPH-diaphorase and calbindin-D28k within the cholinergic neurons of the basal forebrain, striatum and brainstem in the rat, monkey, baboon and human. *Neuroscience* 54: 461-476, 1993.

Harder JA, Aboobaker AA, Hodgetts TC, Ridley RM. Learning impairments induced by glutamate blockade using dizocilpine (MK-801) in monkeys. *Brit J Pharmacol* 125: 1013–1018, 1998.

Harel BT, Pietrzak RH, Snyder PJ, Maruff P. Effect of cholinergic neurotransmission modulation on visual spatial paired associate learning in healthy human adults. *Psychopharmacology (Berl)* 228: 673-683, 2013.

Henson RN, Gagnepain P. Predictive, interactive multiple memory systems. *Hippocampus* 20:1315-1326, 2010.

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

Izquierdo I, Bevilaqua LR, Rossato JI, Bonini JS, Medina JH, Cammarota M. Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. *Trends Neurosci* 9: 496-505, 2006.

Jacklin DL, Kelly P, Bianchi C, MacDonald T, Traquair H, Winters BD. Evidence for a specific role for muscarinic receptors in crossmodal object recognition in rats. *Neurobiol Learn Mem* 118: 125-32, 2015.

Janisiewicz A, Jackson O, Firoz E, Baxter M. Environment spatial conditional learning in rats with selective lesions of medial septal cholinergic neurons. *Hippocampus* 14: 265–273, 2004.

Jones BE. Activity, modulation and role of basal forebrain cholinergic neurons innervating the cerebral cortex. *Prog Brain Res* 145: 157-169, 2004.

Jones DNC, Higgins GA. Effect of scopolamine on visual attention in rats. *Psychopharmacol* 120: 142–149, 1995.

Kanto J, Kentala E, Kaila T, Pihlajamäki K. Pharmacokinetics of scopolamine during caesarean section: relationship between serum concentration and effect. *Acta Anaesthesiol Scand* 33: 482-486, 1989.

Kinnavane L, Albasser MM, Aggleton JP. Advances in the behavioural testing and network imaging of rodent recognition memory. *Behav Brain Res* 285: 67-78, 2015.

Kinnavane L, Amin E, Horne M, Aggleton JP. Mapping parahippocampal systems for recognition and recency memory in the absence of the rat hippocampus. *Eur J Neurosci* 40: 3720–3734, 2014.

Klinkenberg I, Blokland A. The validity of scopolamine as a pharmacological model for cognitive impairment: a review of animal behavioral studies. *Neurosci Biobehav Rev* 34: 1307-1350, 2010.

Kornum BR, Thygesen KS, Nielsen TR, Knudsen GM, Lind NM. The effect of the inter-phase delay interval in the spontaneous object recognition test for pigs. *Behav Brain Res* 181: 210-217, 2007.

Lieben CK, Blokland A, Sik A, Sung E, van Nieuwenhuizen P, Schreiber R. The selective 5-HT<sub>6</sub> receptor antagonist Ro4368554 restores memory performance in cholinergic and serotonergic models of memory deficiency in the rat. *Neuropsychopharmacol* 30: 2169-2179, 2005.

Liem-Moolenaar M, de Boer P, Timmers M, Schoemaker RC, van Hasselt JG, Schmidt S, van Gerven JM. Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships of central nervous system effects of scopolamine in healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol* 71: 886-898, 2011.

Lin WS, Lo JH, Yang JH, Wang HW, Fan SZ, Yen JH, Wang PY. *Ludwigia octovalvis* extract improves glycemic control and memory performance in diabetic mice. *J Ethnopharmacol* 207: 211-219, 2017.

Lucon-Xiccato T, Dadda M. Assessing memory in zebrafish using the one-trial test. *Behav Processes* 106: 1-4, 2014.

Lyon L, Saksida LM, Bussey TJ. Spontaneous object recognition and its relevance to schizophrenia: a review of findings from pharmacological, genetic, lesion and developmental rodent models. *Psychopharmacology (Berl)* 220: 647-672, 2012.

Mansfield K. Marmoset models commonly used in biomedical research. *Comp Med* 53: 383–392, 2003.

Martin SJ, Morris RG. New life in an old idea: the synaptic plasticity and memory hypothesis revisited. *Hippocampus* 12: 609-636, 2002.

May Z, Morrill A, Holcombe A, Johnston T, Gallup J, Fouad K, Schalomon M, Hamilton TJ. Object recognition memory in zebrafish. *Behav Brain Res* 296: 199-210, 2016.

Mazumder AG, Sharma P, Patial V, Singh D. Ginkgo biloba L. attenuates spontaneous recurrent seizures and associated neurological conditions in lithium-pilocarpine rat model of temporal lobe epilepsy through inhibition of mammalian target of rapamycin pathway hyperactivation. *J Ethnopharmacol* 204: 8-17, 2017.

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

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

Mesulam MM. The cholinergic innervation of the human cerebral cortex. *Prog Brain Res* 145: 67-78, 2004.

Meunier J, Villard V, Givalois L, Maurice T. The  $\gamma$ -secretase inhibitor 2-[(1R)-1-[(4-chlorophenyl)sulfonyl](2,5-difluorophenyl) amino]ethyl-5-fluorobenzenebutanoic acid (BMS-299897) alleviates A $\beta$ 1-42 seeding and short-term memory deficits in the A $\beta$ 25-35 mouse model of Alzheimer's disease. *Eur J Pharmacol* 698: 193-199, 2013.

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

Miller EK, Erickson CA, Desimone R. Neural mechanisms of visual working memory in prefrontal cortex of the macaque. *J Neurosci* 16: 5154-5167, 1996.

Mishkin M. Memory in monkeys severely impaired by combined but not by separate removal of amygdala and hippocampus. *Nature* 273: 297-298, 1978.

More SV, Kumar H, Cho DY, Yun YS, Choi DK. Toxin-induced experimental models of learning and memory impairment. *Int J Mol Sci* 17: 1447, 2016.

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

Mugwagwa AT, Gadaga LL, Pote W, Tagwireyi D. Antiamnesic effects of a hydroethanolic extract of *Crinum macowanii* on scopolamine-induced memory impairment in mice. *J Neurodegener Dis* 2015: 242505, 2015.

Munger EL, Takemoto A, Raghanti MA, Nakamura K. Visual discrimination and reversal learning in aged common marmosets (*Callithrix jacchus*). *Neurosci Res*, 2017.

Nakashima E, Ishizaki J, Takeda M, Matsushita R, Yokogawa K, Ichimura F. Pharmacokinetics of anticholinergic drugs and brain muscarinic receptor alterations in streptozotocin diabetic rats. *Biopharm Drug Dispos* 14: 673-684, 1993.

Nazir N, Karim N, Abdel-Halim H, Khan I, Wadood SF, Nisar M. Phytochemical analysis, molecular docking and antiamnesic effects of methanolic extract of *Silybum marianum* (L.) Gaertn seeds in scopolamine induced memory impairment in mice. *J Ethnopharmacol* 210: 198-208, 2017.

Norman G, Eacott MJ. Impaired object recognition with increasing levels of feature ambiguity in rats with perirhinal cortex lesions. *Behav Brain Res* 148: 79-91, 2004.

Nestler EJ, Hyman SE. Animal models of neuropsychiatric disorders. *Nat Neurosci* 13: 1161-1169, 2010.

O'Brien N, Lehmann H, Lecluse V, Mumby DG. Enhanced context-dependency of object recognition in rats with hippocampal lesions. *Behav Brain Res* 170:156-162, 2006.

Palchykova S, Crestani F, Meerlo P, Tobler I. Sleep deprivation and daily torpor impair object recognition in Djungarian hamsters. *Physiol Behav* 87: 144-153, 2006.

Pergolizzi JV Jr, Philip BK, Leslie JB, Taylor R Jr, Raffa RB. Perspectives on transdermal scopolamine for the treatment of postoperative nausea and vomiting. *J Clin Anesth* 24: 334-345, 2012.

Phensy A, Duzdabanian HE, Brewer S, Panjabi A, Driskill C, Berz A, Peng G, Kroener S. 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: 106, 2017.

Phillips KA, Bales KL, Capitanio JC, Conley A, Czoty P, 't Hart BA, Hopkins WD, Hu SL, Miller LA, Nader MA, Nathanielsz PW, Rogers J, Shively CA, Voytko ML. Why primate models matter. *Am J Primatol* 76: 801–827, 2014.

Pitsikas N. The role of nitric oxide in the object recognition memory. *Behav Brain Res* 285: 200-207, 2015.

Pontes AH, de Sousa MV. Mass spectrometry-based approaches to understand the molecular basis of memory. *Front Chem* 4: 1-12, 2016.

Porter AC, Bymaster FP, DeLapp NW, Yamada M, Wess J, Hamilton SE, Nathanson NM, Felder CC. M1 muscarinic receptor signaling in mouse hippocampus and cortex. *Brain Res* 944: 82-89, 2002.

Potter LT. Synthesis, storage and release of [<sup>14</sup>C] acetylcholine in isolated rat diaphragm muscles. *J. Physiol.* 206: 145-166, 1970.

Potter PE, Hadjiconstantinou M, Meek JL, Neff NH. Measurement of acetylcholine turnover rate in brain: an adjunct to a simple HPLC method for choline and acetylcholine. *J Neurochem* 43: 288-290, 1984.

Radcliffe, K.A.; Dani, J.A. Nicotinic stimulation produces multiple forms of increased glutamatergic synaptic transmission. *J Neurosci* 18: 7075-7083, 1998.

Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ, Henderson G. *Rang & Dale Farmacologia*. 7ª edição. Elsevier, 2012. 808 p.

Renner UD, Oertel R, Kirch W. Pharmacokinetics and pharmacodynamics in clinical use of scopolamine. *Ther Drug Monit* 27: 655-665, 2005.

Ridley RM, Barratt NG, Baker HF. Cholinergic learning deficits in the marmoset produced by scopolamine and ICV hemicholinium. *Psychopharmacol* 83: 340-345, 1984a.

Ridley, R.M., Baker, H.F., Drewett, B. and Johnson, J.A., Effects of ibotenic acid lesions of the basal forebrain on serial reversal learning in marmosets, *Psychopharmacology* 86: 438-443, 1985.

Ridley RM, Bowes PM, Baker HF, Crow TJ. An involvement of acetylcholine in object discrimination learning and memory in the marmoset. *Neuropsychologia* 22, 253–263, 1984b.

Ridley RM, Murray TK, Johnson JA, Baker HF. Learning impairment following lesion of the basal nucleus of Meynert in the marmoset modification by cholinergic drugs. *Br Res* 376: 108-116, 1986.

Roberts AC, Robbins TW, Everitt BJ, Jones GH, Sirkia TE, Wilkinson J, Page K. The effects of excitotoxic lesions of the basal forebrain on the acquisition, retention and serial reversal of visual discriminations in marmosets. *Neuroscience* 34: 311-329, 1990.

Ropper AH, Samuels MA, Klein JP. Adams and Victor's Principles of Neurology, Mc Graw Hill Education, 10ª edição; 2014. Versão online.

Søndergaard LV, Ladewig J, Dagnæs-Hansen F, Herskin MS, Holm IE. Object recognition as a measure of memory in 1-2 years old transgenic minipigs carrying the APPsw mutation for Alzheimer's disease. *Transgenic Res* 21:1341-1348, 2012.

Sarter M, Bruno JP. Cortical cholinergic inputs mediating arousal, attentional processing and dreaming: differential afferent regulation of the basal forebrain by telencephalic and brainstem afferents. *Neuroscience* 95: 933-952, 2000.

Schäble S, Huston JP, Barros M, Tomaz C, de Souza Silva MA. The NK3 receptor agonist senktide ameliorates scopolamine-induced deficits in memory for object, place and temporal order. *Neurobiol. Learn. Mem* 97: 235–240, 2012.

Schmidt B.M., Rylett R.J. Phosphorylation of rat brain choline acetyltransferase and its relationship to enzyme activity. *J Neurochem* 61: 1774-1781, 1993.

Seidman S, Sternfeld M, Ben Aziz-Aloya R, Timberg R, Kaufer-Nachum D, Soreq H. Synaptic and epidermal accumulations of human acetylcholinesterase are encoded by alternative 3'-terminal exons. *Mol Cell Biol* 15: 2993-3002, 1995.

Solomon SG, Rosa MG. A simpler primate brain: the visual system of the marmoset monkey. *Front Neural Circuits* 8: 96, 2014.

Spinelli S, Ballard T, Feldon J, Higgins GA, Pryce CR. Enhancing effects of nicotine and impairing effects of scopolamine on distinct aspects of performance in computerized attention and working memory tasks in marmoset monkeys. *Neuropharmacol* 51: 238-250, 2006.

Squire LR. Memory systems of the brain: a brief history and current perspective. *Neurobiol Learn Mem* 82: 171-177, 2004.

Squire LR, Kandel ER. *Memória: da mente às moléculas*. Porto Alegre: Artmed, 2003. 215 p.

Squire LR, Zola-Morgan JT. The cognitive neuroscience of human memory since H.M. *Annu Rev Neurosci* 34: 259-288, 2011.



Squire LR, Zola SM. Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 13515-22, 1996.

Sternberg RJ. *The nature of cognition*. MIT Press, 1999. 736 p.

Suzuki WA, Naya Y. The perirhinal cortex. *Annu Rev Neurosci* 37: 39-53, 2014.

Tamijani SMS, Beirami E, Ahmadiani A, Dargahi L. Effect of three different regimens of repeated methamphetamine on rats' cognitive performance. *Cogn Process*. 2017.

Tang Y, Mishkin M, Aigner TG. Effects of muscarinic blockade in perirhinal cortex during visual recognition. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 12667-9, 1997.

Terry AV Jr, Buccafusco JJ, Herman EJ, Callahan PM, Beck WD, Warner S, Vandenhuerk L, Bouchard K, Schwarz GM, Gao J, Chapman JM. The prototypical ranitidine analog JWS-USC-75-IX improves information processing and cognitive function in animal models. *J Pharmacol Exp Ther* 336: 751-766, 2011.

Thiele A. Muscarinic signaling in the brain. *Annu Rev Neurosci* 36: 271–294, 2013.

Thompson BL, Levitt P, Stanwood GD. Prenatal cocaine exposure specifically alters spontaneous alternation behavior. *Behav Brain Res* 164: 107-116, 2005.

Tulving E. How many memory systems are there? *Am Psychol* 40: 385-398, 1985.

Uno Y, Uehara S, Yamazaki H. 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, 2016.

Van Can M, Tran AH, Pham DM, Dinh BQ, Van Le Q, Van Nguyen B, Thi Nguyen MT, Nguyen HX, Nguyen NT, Nishijo H. *Willughbeia cochinchinensis* prevents scopolamine-induced deficits in memory, spatial learning, and object recognition in rodents. *J Ethnopharmacol*. 2017.

Veselis RA. Memory formation during anaesthesia: plausibility of a neurophysiological basis. *BJA* 115: i13–i19, 2015.

Wallenstein GV, Vago DR. Intrahippocampal scopolamine impairs both acquisition and consolidation of contextual fear conditioning. *Neurobiol Learn Mem* 75: 245-252, 2001.

Warburton EC, Brown MW. Neural circuitry for rat recognition memory. *Behav Brain Res* 285: 131-139, 2015.

Ward KW, Smith BR. A comprehensive quantitative and qualitative evaluation of extrapolation of intravenous pharmacokinetic parameters from rat, dog, and monkey to humans. I. Clearance. *Drug Metab Dispos* 32: 603-611, 2004.

Warren NM, Piggott MA, Perry EK, Burn DJ. Cholinergic systems in progressive supranuclear palsy. *Brain* 128: 239-249, 2005.

Weerts EM, Fantegrossi WE, Goodwin AK. The value of nonhuman primates in drug abuse research. *Exp Clin Psychopharmacol* 15: 309-327, 2007.

Weinberger NM. The nucleus basalis and memory codes: auditory cortical plasticity and the induction of specific, associative behavioral memory. *Neurobiol Learn Mem* 80: 268-284, 2003.

Winters BD, Bartko SJ, Saksida LM, Bussey TJ. Scopolamine infused into perirhinal cortex improves object recognition memory by blocking the acquisition of interfering object information. *Learn Mem* 14: 590-596, 2007.

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

Winters BD, Saksida LM, Bussey TJ. Paradoxical facilitation of object recognition memory after infusion of scopolamine into perirhinal cortex: Implications for cholinergic system function. *J Neurosci* 26: 9520-9529, 2006.

Winters BD, Saksida LM, Bussey TJ. Object recognition memory: neurobiological mechanisms of encoding, consolidation and retrieval. *Neurosci Biobehav Rev* 32: 1055-1070, 2008.

Winters BD, Saksida LM, Bussey TJ. Implications of animal object memory research for human amnesia. *Neuropsychologia* 48: 2251-2261, 2010.

Wolf A, Bauer B, Abner EL, Ashkenazy-Frolinger T, Hartz AM. A comprehensive behavioral test battery to assess learning and memory in 129S6/Tg2576 mice. *PLoS One* 11: e0147733, 2016.

Wonnacott, S. Presynaptic nicotinic ACh receptors. *Trends Neurosci* 20: 92-98, 1997.

Wu W, Saunders RC, Mishkin M, Turchi J. Differential effects of m1 and m2 receptor antagonists in perirhinal cortex on visual recognition memory in monkeys. *Neurobiol Learn Mem* 98: 41-46, 2012.

Xavier GF. A modularidade da memória e o sistema nervoso. *Psicologia USP* 4: 61-115, 1993.

Xiang JZ, Brown MW. Neuronal responses related to long-term recognition memory processes in prefrontal cortex. *Neuron* 42: 817-829, 2004.

Yamamoto S, Nishiyama S, Kawamata M, Ohba H, Wakuda T, Takei N, Tsukada H, Domino EF. Muscarinic receptor occupancy and cognitive impairment: a PET study with [<sup>11</sup>C](+)-3-MPB and scopolamine in conscious monkeys. *Neuropsychopharmacology* 36: 1455–1465, 2011.

Yamazaki Y, Saiki M, Inada M, Watanabe S, Iriki A. Sustained performance by common marmosets in a delayed matching to position task with variable stimulus presentations. *Behav Brain Res* 297: 277-284, 2016.

Yamazaki Y, Watanabe S. Marmosets as a next-generation model of comparative cognition. *Jpn Psychol Res* 51: 182–196, 2009.

Yun J, Ahn J, Kang B. Modeling Parkinson's disease in the common marmoset (*Callithrix jacchus*): overview of models, methods, and animal care. *Lab Anim Res* 31: 155–165, 2015.

Zhu XO, Brown MW. Changes in neuronal activity related to the repetition and relative familiarity of visual stimuli in rhinal and adjacent cortex of the anaesthetised rat. *Brain Res* 689: 101-110, 1995.

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

## ANEXO 1



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

Brasília, 20 de junho de 2017.

### **DECLARAÇÃO**

Declaramos que o projeto intitulado "MEMÓRIA DE RECONHECIMENTO EM PRIMATAS NÃO-HUMANOS (CALLITHRIX PENICILLATA) E SUA MODULAÇÃO POR COMPOSTOS AMNÉSICOS E PRO-MNÉSICOS", Protocolo n.º 37/2017, 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 (24). A presente aprovação é válida pelo período de: 1º/07/2017 a 01/07/2019.



*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.