



Universidade de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde
Departamento de Farmácia

Matheus Alecrim Moreira

Efeito do tempo de familiarização no desempenho de primatas não-humanos (*Sapajus spp.*) adultos em um teste de memória de reconhecimento para objetos

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Marília Barros

Brasília - DF
outubro / 2021



Universidade de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde
Departamento de Farmácia

Matheus Alecrim Moreira

Efeito do tempo de familiarização no desempenho de primatas não-humanos (*Sapajus spp.*) adultos em um teste de memória de reconhecimento para objetos

Orientadora: Prof^a Dr^a 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 - DF
outubro / 2021

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer imensamente à minha orientadora, a professora Dra. Marília Barros, por ter me dado uma chance de vivenciar o fabuloso mundo da pesquisa científica através da Iniciação Científica, mesmo estando nos anos finais da graduação e sem nenhuma experiência com pesquisa. Serei sempre grato por essa oportunidade!

Gostaria também, de deixar aqui registrado, minha gratidão a Jéssica Lohana Aquino, por todas as conversas, conselhos e experiências compartilhados durante as várias vezes em que estivemos na FAL e durante nossas reuniões virtuais. Você foi uma peça fundamental nessa minha “jornada científica” até aqui e tenho certeza que você ainda tem muito a contribuir para a pesquisa científica.

Agradeço também à toda a equipe do Centro de Primatologia e incluo aqui os macacos-prego, objeto de estudo deste trabalho.

À UnB, por proporcionar aos estudantes um mundo de experiências durante sua jornada acadêmica.

À minha mãe, Ana Alecrim, por todo apoio durante esses 6 anos de graduação.

À FAP-DF e ao CNPq, que me concederam bolsa-auxílio durante os dois anos em que estive na Iniciação Científica e que contribuíram para o meu desenvolvimento acadêmico.

E, por fim, a todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para conclusão dessa etapa e fechamento de mais um ciclo.

*“not in knowledge is happiness, but in the acquisition of knowledge”
- Edgar Allan Poe*

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Classificação dos sistemas de memória de longo prazo..... 2
- Figura 2.** Ativação simultânea de receptores glutamatérgicos AMPA e NMDA na potenciação de longo-prazo..... 4
- Figura 3.** Representação ilustrativa do procedimento empregado no teste de Escolha Diferente do Modelo com Atraso (em inglês - *Delayed Nonmatching to Sample*). Para receber uma recompensa, o sujeito deve deslocar o objeto na fase inicial de treino. Após um intervalo de retenção pré-determinado, o animal precisa agora deslocar o objeto novo para receber a recompensa..... 8
- Figura 4.** Representação esquemática de cinco variações do teste de Reconhecimento Espontâneo de Objetos (REO). Os asteriscos indicam o objeto novo ou sua nova configuração e as setas indicam os intervalos entre as sessões. (A) teste de REO, (B) teste de reconhecimento objeto-lugar (ROL), (C) teste de reconhecimento objeto-no-lugar, (D) teste de reconhecimento do contexto do objeto, (E) teste de reconhecimento da ordem temporal..... 10
- Figura 5.** Indivíduo adulto do gênero *Sapajus* (macaco-prego) do CPUnB..... 16
- Figura 6.** Representação esquemática do aparato experimental utilizado no estudo. O aparato consistiu em três compartimentos (viveiros para macacos-prego do CPUnB modificados): viveiro-moradia (em branco), viveiro-transição (em cinza claro) e viveiro teste (em cinza escuro). O sujeito pôde transitar entre os viveiros (setas) por meio de uma abertura temporária formada ao abrir parcialmente a divisória entre os viveiros (linhas delgadas), controlada manualmente pelo pesquisador pelo lado de fora do aparato. No viveiro-teste, o sujeito pôde explorar dois objetos (quadrados pretos) fixados na tela frontal do viveiro (linhas pontilhadas). O comportamento de transitar entre os viveiros do aparato, sob o comando do pesquisador, foi reforçado por uma uva-passa disposta nos locais indicados por um ponto preto em frente aos viveiros transição e teste. As linhas espessas representam as paredes fixas. As dimensões estão indicadas em metros, tendo os viveiros 2 m de altura..... 17

Figura 7. Representação esquemática do *Teste de Reconhecimento Espontâneo de Objetos* (REO). O quadrado cinza representa o viveiro-teste com os objetos teste (em preto) fixados na tela frontal do viveiro. Na sessão treino, dois objetos idênticos foram apresentados. Na sessão teste, um dos objetos da sessão treino foi substituído por um novo. A sessão treino teve duração de 10 ou 20 min (dependendo do tempo de familiarização empregado), a sessão teste teve duração de 10 min e o intervalo entre as sessões foi de 30 min..... 19

Figura 8. Fotografias de quatro objetos utilizados no teste de Reconhecimento Espontâneo de Objetos (REO) realizado ao longo do presente estudo. (Fotografias: Jéssica Lohana Aquino Cunha)..... 20

Figura 9. Índice de discriminação (média \pm epm em segundos) calculados para as sessões teste realizadas 30 min desde a sessão inicial de familiarização de 10 ou 20 min com os objetos. *À esquerda:* índice calculado considerando todo o grupo amostral (n=8). *À direita:* índice calculado em separado para machos e fêmeas (n=4/sexo). * $p \leq 0,05$ vs. valor de zero (nível do acaso)..... 23

Figura 10. Tempo de exploração total dos objetos (média \pm epm em segundos) durante as sessões treino e teste do teste de REO. *À esquerda:* tempo de exploração total considerando todo o grupo amostral (n=8). *À direita:* tempo de exploração total para machos e fêmeas separadamente (n=4/sexo)..... 25

Figura 11. Tempo em movimento (média \pm epm em segundos) nas sessões treino e teste do teste de REO. *À esquerda:* atividade locomotora considerando todo o grupo amostral (n=8). *À direita:* atividade locomotora para machos e fêmeas separadamente (n=4/sexo)..... 27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tempo total de exploração dos objetos e de locomoção nas sessões treino, expresso com a média \pm epm em segundos..... 24

Tabela 2. Tempo total de exploração dos objetos nas sessões treino (apenas os primeiros 10 min) e teste, de acordo com a ordem com que o teste de REO foi realizado e expresso como a média \pm epm em segundos..... 25

Tabela 3. Atividade locomotora nas quatro sessões de habituação ao procedimento experimental, expressa como a média \pm epm em segundos..... 26

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPA: amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato

ANOVA: Análise de Variância

CA: Corno de Ammon

CEUA: Comissão de Ética no Uso Animal

CONCEA: Conselho Nacional de Experimentação Animal

CPUnB: Centro de Primatologia da Universidade de Brasília

DNMS: *Delayed Nonmatching to Sample*

EUA: Estados Unidos da América

epm: erro padrão da média

H.M.: Henry Molaison

IBAMA: Instituto de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

ID: Índice de Discriminação

IR: intervalo de retenção

LTD: *long term-depression*

LTM: lobo temporal medial

LTP: *long term-potentiation*

MCP: memória de curto-prazo

MLP: memória de longo-prazo

NMDA: N-metil-D-aspartato

PEPS: potencial excitatório pós-sináptico

PNH: primata não-humano

PVC: policloreto de vinila

rAMPA: receptores ionotrópicos do tipo AMPA

REO: Reconhecimento Espontâneo de Objetos

ROL: Reconhecimento Objeto-Lugar

rNMDA: receptores ionotrópicos do tipo NMDA

SNC: sistema nervoso central

UnB: Universidade de Brasília

VPC: *Visual paired-comparison*

RESUMO

A memória de reconhecimento permite a discriminação entre estímulos familiares e novos, podendo ser avaliada no teste de Reconhecimento Espontâneo de Objetos (REO). Este teste é baseado na preferência inata de animais por estímulos novos detectados no ambiente via atividade exploratória espontânea. Acredita-se que o tempo inicial de familiarização aos objetos pode influenciar a memória de reconhecimento. Dessa forma, este estudo comparou o desempenho de macacos-prego (*Sapajus* spp.) adultos após intervalos de familiarização de 10 e 20 min no teste de REO. O desempenho também foi correlacionado ao tempo de exploração dos objetos na sessão treino fornecendo, assim, informações sobre a motivação dos sujeitos. Para tanto, cada sujeito foi inicialmente habituado a um viveiro-teste durante 10 min, por quatro dias consecutivos. Depois de 24 h, foram submetidos duas vezes ao teste de REO, em um intervalo de quatro dias. Em ambos os testes de REO, foi realizada uma sessão treino (familiarização) na qual o animal pôde explorar, livremente, dois objetos neutros idênticos por 10 ou 20 min. Após um intervalo de retenção de 30 min, o sujeito foi submetido a uma sessão teste de 10 min, onde pôde explorar, novamente, dois objetos: um idêntico ao visto na sessão treino (familiar) e outro desconhecido (novo). Para cada teste de REO, um Índice de Discriminação (ID) foi calculado: tempo explorando o objeto novo subtraído pelo tempo explorando o objeto familiar dividido pelo tempo total de exploração dos objetos. Os animais demonstraram uma memória de reconhecimento, independente do tempo inicial de familiarização aos objetos, uma vez que na sessão teste exploraram significativamente mais o objeto novo em relação ao familiar. Para ambos os testes de REO, o ID estava significativamente acima do nível do acaso, mas não diferiu entre si. Contudo, os machos demonstraram um reconhecimento significativo após 10 e 20 min de familiarização, enquanto as fêmeas apenas depois de 10 min. Nem a exploração total, nem a locomoção diferiram entre as sessões treino e teste, ou entre os dois testes de REO. O padrão de exploração também foi similar independente do primeiro tempo de familiarização ter sido de 10 ou 20 min. Por fim, o desempenho dos sujeitos no teste não estava relacionado ao tempo de exploração dos objetos na sessão treino ou de atividade locomotora na sessão teste. Portanto, um aumento no tempo de familiarização de 10 para 20 min não parece influenciar a memória de reconhecimento de macacos-prego submetidos ao teste de REO, apesar de possivelmente haver uma diferença entre machos e fêmeas. Alterações na motivação, devido a testes repetidos ou a um maior tempo de contato inicial com os objetos, não influenciou esse resultado. O teste de REO tem se mostrado ser um procedimento robusto e versátil para avaliar memória de reconhecimento em diferentes espécies, incluindo agora, primatas não-humanos.

Palavras-chave: exploração, familiarização, macaco-prego, memória, motivação, reconhecimento de objeto

SUMÁRIO

1. Introdução	1
1.1 Aspectos gerais da memória.....	1
1.2 Neurofisiologia da memória.....	2
1.3 Memória de reconhecimento.....	4
1.3.1 Neurobiologia da memória de reconhecimento.....	5
1.3.2 Estudo da memória de reconhecimento em animais.....	7
1.3.3 Uso de PNH para o estudo da memória de reconhecimento.....	12
2. Relevância do trabalho	13
3. Objetivos	14
4. Metodologia	15
4.1 Aspectos éticos.....	15
4.2 Sujeitos e condições gerais de alojamento.....	15
4.3 Aparato experimental.....	16
4.4 Procedimento experimental.....	17
4.5 Registro e análise do comportamento.....	20
4.6 Análise estatística dos dados.....	21
5. Resultados	22
6. Discussão	27
7. Conclusão	31
8. Referências bibliográficas	32
Anexo I	38

1. Introdução

1.1 Aspectos gerais da memória

Dentre as funções cognitivas, como a percepção e a atenção, a memória é uma das mais importantes e complexas. Esta pode ser definida, de acordo com IZQUIERDO (2014), como a habilidade de adquirir, reter e evocar informações. Sendo assim, consiste em um processo fundamental e determinante para o planejamento de comportamentos prospectivos (TOMAZ, 1993).

Didaticamente, a memória pode ser dividida em três fases: *aquisição* é quando a informação, proveniente dos sistemas sensoriais, é processada à nível do Sistema Nervoso Central (SNC); *consolidação* é quando essa informação é armazenada, via síntese proteica, nas redes neurais; e *evocação* é quando a informação, adquirida e armazenada, é recuperada (conscientemente ou não), resultando em uma resposta comportamental e/ou fisiológica. Além disso, após a recuperação, as memórias podem retornar a um estado transiente de instabilidade, sendo necessário nova síntese protéica para que sejam (re)armazenadas. Essa *reconsolidação* permite que as informações previamente adquiridas sejam 'atualizadas' em resposta a novos estímulos (NADER e EINARSSON, 2010).

Os processos mnemônicos podem ser classificados quanto a duração - memória de curto (MCP) ou longo prazo (MLP), bem como quanto ao seu conteúdo - declarativas ou não-declarativas (IZQUIERDO, 2014). As MCP são aquelas disponíveis de segundos a minutos para que se alcance um determinado objetivo; já as MLP são aquelas que podem durar de dias a anos (PURVES e cols., 2018). As memórias não-declarativas, também chamadas de memórias implícitas, são informações evocadas de forma inconsciente e podem ser divididas em *priming* (recordação induzida por pistas/dicas), procedurais (hábitos e habilidades), aprendizado não-associativo (mudança comportamental frente a um estímulo) e condicionamento (associação estímulo-resposta)

(BEAR e cols., 2017; PURVES e cols., 2018). Já as memórias declarativas, ou explícitas, são aquelas recordadas de maneira consciente e passíveis de verbalização. As memórias explícitas podem ser divididas em semânticas, ou seja, relacionadas a fatos e conhecimentos gerais, e episódicas, que correspondem a eventos autobiográficos que estão associados a um contexto espacial e temporal (Figura 1; SQUIRE, 2004). Assim, as memórias episódicas contêm informações sobre o que foi visto, onde foi visto e quando foi visto (DERE e cols., 2005).



Figura 1. Classificação dos sistemas de memória de longo prazo. Adaptado de Squire (2004).

1.2 Neurofisiologia da memória

Em 1953, Henry Molaison, ou “H.M.” como ficou mundialmente conhecido, foi submetido a uma neurocirurgia na qual boa parte de seu lobo temporal medial (LTM) foi removido em uma tentativa de aliviar as várias crises epiléticas que sofria (SCOVILLE, 1954; SCOVILLE e MILNER, 1957). A cirurgia de fato aliviou as crises, mas o paciente H.M. teve danos severos e irreversíveis em termos de sua memória, apesar de ainda conseguir aprender alguns tipos de tarefas novas. Seu caso contribuiu muito para o estudo do envolvimento do LTM na memória, em especial o hipocampo, já que pouco se sabia acerca da função desta e outras estruturas adjacentes.

A memória está relacionada com alterações em nível celular, cujo resultado é a modificação da força da conexão sináptica (SÁ e MEDALHA, 2001), que pode tanto ser fortalecida, quanto enfraquecida. Essa modificação envolve alterações pré e pós-sinápticas que podem durar até semanas. Quando há um aumento da eficácia da sinapse, o processo é denominado de Potenciação de Longo-Prazo (LTP, do inglês *long-term potentiation*).

Resumidamente, quando despolarizados, neurônios glutamatérgicos pré-sinápticos liberam glutamato na fenda sináptica. Esse neurotransmissor excitatório pode, por sua vez, interagir com receptores ionotrópicos do tipo AMPA (rAMPA) e NMDA (rNMDA). A interação do glutamato com o rAMPA causa influxo de íons de Na^+ levando a um potencial excitatório pós-sináptico (PEPS). No potencial de repouso da membrana neuronal, os rNMDA pós-sinápticos estão bloqueados por um íon Mg^{2+} . Entretanto, o PEPS induzido pelo influxo de Na^+ , via a ativação do rAMPA, pode ocorrer concomitantemente com a interação do glutamato com o rNMDA, levando assim ao deslocamento desse íon Mg^{2+} do receptor, a abertura do canal e ao influxo de Ca^{2+} (Figura 2). Dentro do neurônio, esses íons de Ca^{2+} ativam proteínas quinases que podem tanto aumentar a condutância dos rAMPA, via sua fosforilação, quanto estimular a inserção de novos receptores AMPA na membrana pós-sináptica. Esse aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} nos neurônios pós-sinápticos parece estar intimamente ligado à indução da LTP (BEAR e cols., 2017).

Contudo, as sinapses também podem ser enfraquecidas, um fenômeno chamado de Depressão de Longa-Duração (LTD, do inglês *long-term depression*). Esse enfraquecimento sináptico ocorre quando o neurônio pós-sináptico não está fortemente despolarizado. Nesse caso, há um bloqueio parcial dos rNMDA pelo Mg^{2+} , impedindo que haja um grande influxo de Ca^{2+} , como visto na LTP. Diante disso, a baixa quantidade intracelular de Ca^{2+} acaba ativando enzimas fosfatases, que desfosforilam (inativam)

várias proteínas. Logo, para que a LTD ocorra, é necessário que a sinapse esteja ativa (liberação de neurotransmissor) ao mesmo tempo de uma fraca despolarização pós-sináptica, ao passo que para a LTP, vista anteriormente, a transmissão sináptica tem que ocorrer juntamente com uma forte despolarização pós-sináptica.

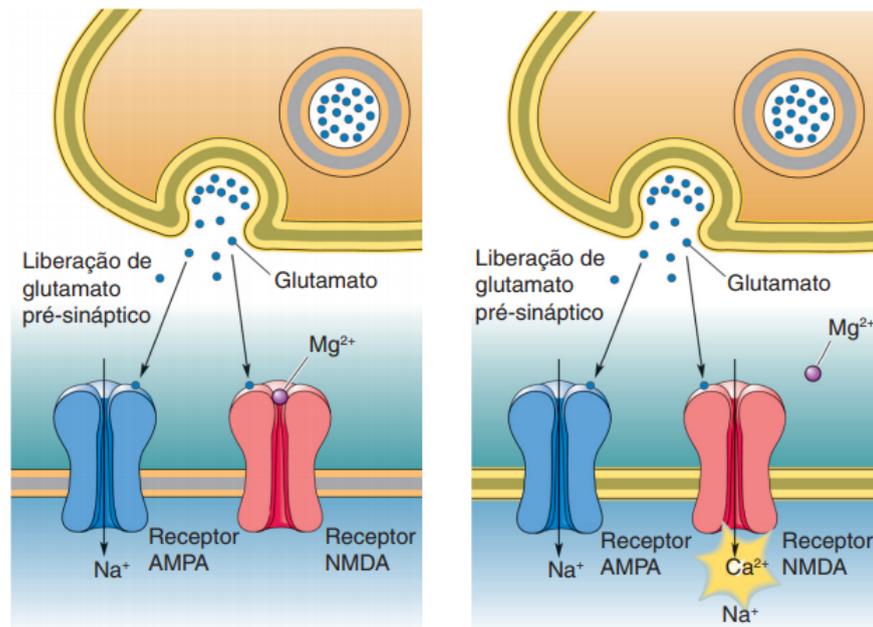


Figura 2. Ativação simultânea de receptores glutamatérgicos AMPA e NMDA na potenciação de longo-prazo. Adaptado de BEAR e cols. (2017).

1.3 Memória de reconhecimento

A memória de reconhecimento consiste na capacidade de diferenciar estímulos (e.g., objetos e pessoas) previamente vistos, de estímulos novos no ambiente (ENNACEUR e DELACOUR, 1988; KINNAVANE e cols., 2015). Ainda não há um consenso na literatura científica se a memória de reconhecimento seria uma memória episódica ou uma forma diferente de memória declarativa (AGGLETON e BROWN, 2006); o fato é que déficits neste tipo de memória podem ser vistos em diferentes neuropatologias, como na esquizofrenia (LYON e cols., 2011), na doença de Alzheimer (LEE e LYKETSOS, 2003), após lesões cerebrais (AGGLETON e SHAW, 1996) e em

estágios avançados da doença de Parkinson (WHITTINGTON e cols., 2000). Logo, é de grande relevância a compreensão de seus mecanismos neuropsicofisiológicos, bem como a investigação de outros fatores que podem prejudicá-la.

A memória de reconhecimento, assim como a memória episódica, pode estar associada ao contexto e ao local onde o estímulo foi visto. Sendo assim, a memória de reconhecimento pode estar associada a capacidade de (AMEEN-ALI e cols., 2015; WARBURTON e BROWN, 2015):

- (a) diferenciar estímulos novos e familiares (reconhecimento de objeto);
- (b) detectar a nova localização de um estímulo (reconhecimento de estímulo-lugar);
- (c) identificar a associação entre estímulos e onde esses foram vistos (reconhecimento estímulo-no-lugar);
- (d) discriminar entre estímulos familiares vistos em momentos diferentes (reconhecimento temporal); e
- (e) reconhecer a presença de um estímulo familiar em um novo contexto (reconhecimento estímulo-contexto).

1.3.1 Neurobiologia da memória de reconhecimento

Duas estruturas cerebrais no LTM demonstram ser fundamentais para a memória de reconhecimento: o córtex perirrinal e o hipocampo. Apesar de agirem como um sistema integrado (BROWN e AGGLETON, 2001), o córtex perirrinal parece estar mais relacionado ao reconhecimento de objetos por curtos intervalos de tempo, enquanto o hipocampo estaria envolvido no reconhecimento de objetos após intervalos mais longos (REGER e cols., 2009).

A inativação do córtex perirrinal parece prejudicar a memória de reconhecimento em seus três estágios: aquisição, consolidação e evocação (WINTERS e BUSSEY; 2005). De fato, HANNESSON e cols. (2004) relataram que lesões no córtex perirrinal de

ratos prejudicaram a capacidade de discriminar entre um estímulo novo e o que já era familiar. Já BALDERAS e cols. (2013) observaram que a administração de um antagonista dopaminérgico D1 diretamente no córtex perirrinal, mas não no hipocampo, gerou um déficit na memória de reconhecimento dos animais.

O córtex perirrinal também parece ser importante para a memória de reconhecimento objeto-no-lugar, o qual necessita de uma integração entre as informações pertinentes ao estímulo e a sua localização espacial. Lesões perirrinais prejudicaram o desempenho de macacos em uma tarefa que avaliou esse tipo de reconhecimento (BACHEVALIER e NEMANIC, 2008). Entretanto, é possível que o córtex perirrinal esteja mais relacionado ao processamento de informações relacionadas às características do estímulo em si, enquanto o hipocampo mais responsável por informações relacionadas a localização desse estímulo (WAN e cols., 1999).

De fato, quando um estímulo familiar está em um novo local, o córtex perirrinal não configura como uma estrutura fundamental (revisado em WARBURTON e BROWN, 2010). Lesões no hipocampo, por sua vez, prejudicaram o reconhecimento de aspectos espaciais do estímulo, mas não quando a tarefa envolvia apenas identificar se um estímulo era familiar ou não (BARKER e WARBURTON, 2011).

A integração entre o córtex perirrinal e o hipocampo também ocorre no reconhecimento da ordem temporal (WARBURTON e BROWN, 2010). Ratos com lesão bilateral no córtex perirrinal não foram capazes de discriminar a sequência temporal com que estímulos foram apresentados no ambiente (BARKER e cols., 2007; HANNESSON e cols., 2004). Em relação ao hipocampo, ao inativar a região hipocampal CA1 de ratos, BARBOSA e cols. (2012) observaram que esses tiveram seu desempenho prejudicado, indicando que o hipocampo também é importante para esse tipo de reconhecimento temporal.

Vale destacar que a exposição a um estímulo familiar e a um estímulo novo simultaneamente, não parece necessariamente indicar o aprendizado de uma nova informação (estímulo novo), mas sim, o enfraquecimento de uma informação já armazenada (estímulo familiar), visto que a repetição a um estímulo pode levar a uma diminuição na resposta de neurônios no LTM, incluindo neurônios do córtex perirrinal (BROWN e BASHIR, 2002). De fato, estudos eletrofisiológicos (LEMON e MANAHAN-VAUGHAN, 2006; MANAHAN-VAUGHAN e BRAUNEWELL, 1999) e que utilizaram substâncias que interferem na plasticidade sináptica (GRIFFITHS e cols., 2008; LEMON e MANAHAN-VAUGHAN, 2006) mostraram que o armazenamento de informações sobre objetos novos estava relacionado a uma diminuição na responsividade neuronal, ou seja, a LTD.

1.3.2 Estudo da memória de reconhecimento em animais

Um dos primeiros testes pré-clínicos desenvolvidos para o estudo da memória de reconhecimento em animais foi o *Delayed Nonmatching to Sample* (DNMS; MISHKIN, 1978). Esse teste avalia a capacidade do sujeito discriminar entre estímulos novos e familiares. Resumidamente, o animal é primeiro exposto a um objeto novo, devendo deslocá-lo para obter uma recompensa. Após um intervalo (de retenção - IR), o animal é reapresentado a esse mesmo objeto – agora familiar – juntamente com um segundo objeto nunca visto antes (objeto novo). Agora o animal receberá uma recompensa apenas se deslocar o objeto novo (Figura 3).

Apesar de ter sido amplamente utilizado em primatas não-humanos (PNH) (EACOTT e cols., 1994; MISHKIN, 1978; MISHKIN e DELACOUR, 1975), em humanos (AGGLETON e cols., 1988; SQUIRE e cols., 1988) e em roedores (AGGLETON, 1985; MUMBY e cols., 1990) para o estudo da memória de reconhecimento, o teste de DNMS apresenta algumas desvantagens. Esse teste necessita, por exemplo, de várias sessões

de treino previamente à realização do teste, uma vez que os sujeitos precisam aprender a regra da tarefa (e.g., escolher o objeto diferente daquele visto antes). Uma outra desvantagem é o uso de uma recompensa (p. ex., alimento) para estimular a participação do animal. Tendo isso em vista, possíveis déficits no desempenho podem ser atribuídos a problemas de aprendizado e memória ou a mudanças na motivação para realizar o teste (DERE e cols., 2007; KINNAVANE e cols., 2015). Considerando tais aspectos, novos procedimentos para o estudo da memória de reconhecimento vêm sendo desenvolvidos.

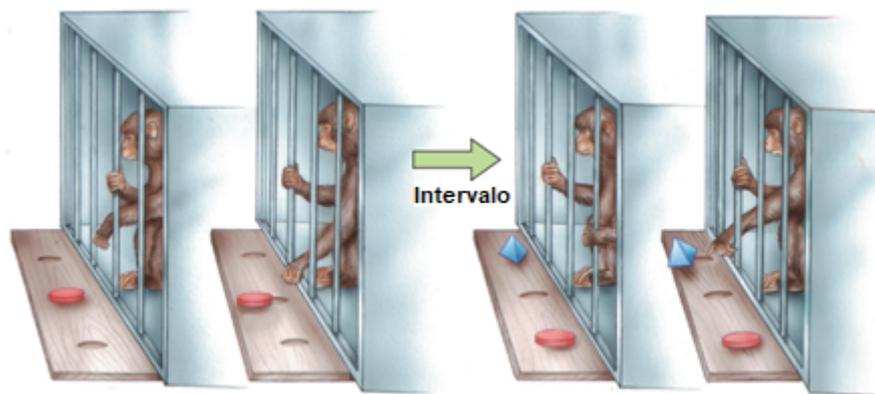


Figura 3. Representação ilustrativa do procedimento empregado no teste de Escolha Diferente do Modelo com Atraso (em inglês - *Delayed Nonmatching to Sample*). Para receber uma recompensa, o sujeito deve deslocar o objeto na fase inicial de treino. Após um intervalo de retenção pré-determinado, o animal precisa agora deslocar o objeto novo para receber a recompensa. Adaptado de BEAR e cols. (2017).

Nesse contexto, ENNACEUR e DELACOUR (1988) desenvolveram o teste de Reconhecimento Espontâneo de Objetos (REO). Esse teste, assim como o DNMS, também está baseado na preferência inata dos animais por estímulos novos. Contudo, aqui, essa preferência é determinada em termos do comportamento exploratório espontâneo do animal. Este é um teste simples, de baixo de custo, rápido e versátil (DERE e cols., 2007; KINNAVANE e cols., 2015), uma vez que ele pode ser modificado para avaliar diferentes aspectos da memória de reconhecimento, como o componente espacial, a ordem temporal e o contexto em que os estímulos foram apresentados (AMEEN-ALI e cols., 2015; BARKER e cols., 2007; WARBURTON e BROWN, 2015).

Em geral, o teste de REO e várias de suas vertentes possuem uma sessão inicial de familiarização, um intervalo de retenção (que pode variar de segundos a horas e até dias) e por fim uma sessão teste. Já as tarefas que envolvem diferentes contextos ou a ordem temporal são realizadas usando duas sessões de familiarização (Figura 4).

No teste de REO (Figura 4A), o sujeito é exposto a duas cópias idênticas de um mesmo objeto, podendo explorá-las livremente. Após um IR, um desses objetos é substituído por um objeto novo. Considera-se que o animal possui uma memória de reconhecimento nesse teste caso ele venha a explorar mais o objeto novo em relação ao familiar durante a sessão teste. Já na tarefa de reconhecimento objeto-lugar (ROL; Figura 4B), espera-se que na sessão teste o animal explore mais o objeto que foi deslocado do local de onde estava inicialmente, comparado ao objeto que permaneceu no mesmo lugar. No teste de objeto-no-lugar o animal é inicialmente exposto a quatro objetos distintos; no teste, os objetos são reapresentados, mas dois deles têm a posição alternada. Nesse caso, espera-se que o animal explore mais os objetos que estão em uma nova configuração espacial (Figura 4C). Na tarefa de contexto (Figura 4D), dois diferentes pares de objetos idênticos são apresentados em contextos diferentes. No teste, espera-se que o animal explore mais o objeto que está em um contexto diferente do qual foi inicialmente apresentado. Por fim, no teste de ordem temporal (Figura 4E), o animal é exposto a dois objetos idênticos e, depois, é reapresentado a outros dois objetos. Quando apresentado a ambos os objetos durante a sessão teste, espera-se que o animal explore mais o primeiro objeto apresentado, considerado o menos familiar (ou 'novo').

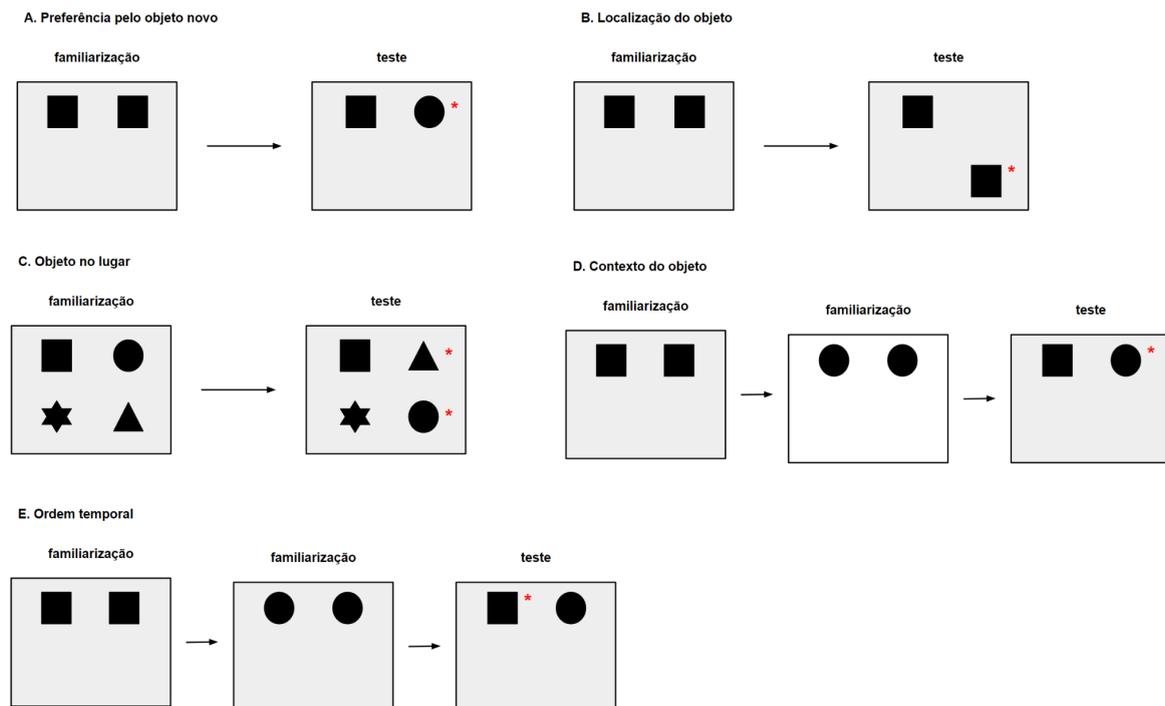


Figura 4. Representação esquemática de cinco variações do teste de Reconhecimento Espontâneo de Objetos (REO). Os asteriscos indicam o objeto novo ou sua nova configuração e as setas indicam os intervalos entre as sessões. (A) teste de REO, (B) teste de reconhecimento objeto-lugar (ROL), (C) teste de reconhecimento objeto-no-lugar, (D) teste de reconhecimento do contexto do objeto, (E) teste de reconhecimento da ordem temporal. Adaptado de AMEEN-ALI e cols. (2015) e WARBURTON e BROWN (2015).

Um outro teste, também desenvolvido recentemente e que está baseado na exploração espontânea do sujeito, é o *Visual Paired-Comparison* (VPC), já empregado em humanos (MANNNS e cols., 2000; RICHMOND e cols., 2004) e em primatas não-humanos (GOTHARD e cols., 2004). Apesar de serem muito semelhantes, o teste de VPC possibilita a análise apenas da exploração visual (CLARK e SQUIRE, 2010), enquanto no teste de REO o sujeito pode explorar o objeto usando qualquer modalidade sensorial.

Apesar das vantagens que o teste de REO tem em relação ao DNMS, como não requerer um treinamento prévio ou o uso de recompensa, alguns fatores podem influenciar o desempenho dos sujeitos nesses procedimentos que envolvem exploração espontânea. Por exemplo, de acordo com CLARK e SQUIRE (2010), quanto maior for o

intervalo entre as fases de treino e teste, maior será a demanda cognitiva dos sujeitos para realizar o teste de REO. De fato, quando um IR maior que 4 h foi usado, os ratos avaliados neste teste não foram capazes de discriminar entre os estímulos novo e familiar (SUTCLIFFE e cols., 2007). Outro aspecto importante a se considerar são os objetos utilizados na tarefa. HEYSER e CHEMERO (2012) observaram que a capacidade de camundongos discriminarem entre o objeto novo e o familiar foi maior quando o objeto podia ser escalado pelo animal, do que quando podia apenas ser tocado.

Além disso, no presente trabalho, foi avaliado a possível influência do tempo que os sujeitos são expostos aos objetos durante a fase de familiarização (i.e., duração da sessão treino). É durante essa fase que o sujeito detecta e armazena as diferentes características do objeto: tamanho, cor, textura, forma, cheiro, dentre outros. Por isso, acredita-se que quanto maior for a familiarização do sujeito com o objeto, maior será a preferência pelo objeto novo durante a sessão teste, indicando um traço mnemônico mais forte para o objeto familiar (AMEEN-ALI e cols., 2015; OZAWA e cols., 2011). Em suínos, o objeto novo foi explorado preferencialmente após uma fase de treino de 45 h, mas não depois de apenas 10 min (GIFFORD e cols., 2007). Em humanos, a preferência pelo estímulo novo aumentou em função do tempo de familiarização no teste de VPC (RICHMOND e cols., 2004). Já no teste de ROL, OZAWA e cols. (2011) observaram que ratos exploraram mais o objeto deslocado do que o estacionário quando a familiarização ocorreu após sessões treino mais longas.

No entanto, alguns estudos têm demonstrado que um maior tempo de familiarização pode vir a diminuir a motivação do animal em realizar a tarefa e, conseqüentemente, levar a uma menor exploração total dos objetos durante a sessão teste. Vale ressaltar que os objetos usados no teste de REO e suas variantes são itens neutros – sem valência emocional (DERE e cols., 2007), logo alterações na motivação podem influenciar o resultado obtido. BROADBENT e cols. (2009) observaram em

roedores que a preferência pelo objeto novo estava relacionada a um menor tempo de familiarização. Nesse sentido, quanto maior for a familiaridade com um objeto neutro, menor poderá ser o interesse do animal por esse objeto (revisado em ANTUNES e BIALA, 2012). Em roedores, os primeiros minutos da sessão teste já foram relatados como sendo os mais sensíveis para demonstrar a capacidade discriminativa entre um objeto novo e familiar no teste de REO (DIX e AGGLETON, 1999; OZAWA e cols., 2011).

1.3.3 Uso de PNH para o estudo da memória de reconhecimento

Apesar de roedores serem muito utilizados em diversas pesquisas, a mimetização de algumas patologias e aspectos comportamentais podem ser limitados nessas espécies. Dessa forma, PNH configuram como um modelo mais translacional para o estudo de déficits de memória em humanos.

O DNMS é um dos testes mais utilizados para estudos de memória de reconhecimento em PNH (p. ex., BACHEVALIER e cols., 1999; HEUER e BACHEVALIER, 2011; MURRAY e MISHKIN, 1998; RESENDE e cols., 2003; WEISS e BACHEVALIER, 2016), mas como dito anteriormente, é uma tarefa que requer o uso de recompensa e extensos treinamentos antes do teste, o que pode vir a gerar vieses motivacionais.

O teste de REO tem sido bastante utilizado para o estudo da memória de reconhecimento, especialmente em roedores (*ratos*: AINGE e cols., 2006; BERTAINA-ANGLADE e cols., 2006; GÁMIZ e GALLO, 2012; GASKIN e cols., 2010; MUMBY e cols., 2005; REGER e cols., 2009; *camundongos*: BERTAINA-ANGLADE e cols., 2006; CLARKE e cols., 2010; DERE e cols., 2005; *toupeira*: HEGAB e cols., 2018). No entanto, também já foi empregado em outras espécies, a saber: suínos (GIFFORD e cols., 2007; KORNUM e cols., 2007), peixes (MAY e cols., 2016; LUCON-XICCATO e DADDA, 2016), cachorros (CALLAHAN e cols., 2000) e *musaranhos* (KHANI e RAINER,

2012). Todavia, recentemente foi transposto para PNH (KALINICHENKO e cols., 2021a,b), empregando macacos da espécie *Callithrix penicillata*. Essa mesma espécie também já foi avaliada no teste de Reconhecimento Objeto-Lugar (ROL; MELAMED e cols., 2017a,b; VANNUCHI e cols., 2020). Contudo, a análise e validação do teste de REO, bem como de suas variantes em outras espécies, possibilitará aumentar a robustez deste tipo de protocolo, assim como permitirá realizar comparações interespecíficas.

Macacos-prego (*Sapajus* spp.) são um gênero de PNH que possuem uma elevada capacidade cognitiva, sobretudo quando comparado a outras espécies do Novo Mundo (KLUVER, 1933). Vários dos seus comportamentos se assemelham aos de espécies do Velho Mundo, conhecidos por terem uma cognição bem desenvolvida (ANTINUCCI, 1990). Os macacos-prego possuem uma ampla distribuição geográfica ao longo das Américas Central e do Sul (FRAGASZY e cols., 2004), sendo isso um indicativo de sua plasticidade comportamental e capacidade adaptativa. Além disso, possuem uma grande habilidade manipulativa, exemplificada pelo uso de ferramentas para abertura de frutos (FRAGASZY e cols., 2013; VISALBERGHI, 1993; WAGA e cols., 2006). Macacos-prego também aprendem por imitação, o que indica um certo grau de aprendizagem social (CUSTANCE e cols., 1999) e usam informações espaciais (memória espacial) para forragear (GARBER e PACIULLI, 1997; GOMES e BICCA-MARQUES, 2011; JANSON, 1998). Diante todo o exposto, estes animais tornam-se de grande interesse científico, em especial, para realização de testes cognitivos e de memória.

Até o presente momento, não há relatos na literatura de estudos que avaliaram a memória de reconhecimento em macacos-prego utilizando o teste de REO.

2. Relevância do trabalho

A memória de reconhecimento é a habilidade de reconhecer se um estímulo já foi visto anteriormente (AMEEN-ALI e cols., 2015), podendo estar prejudicada em diversas

doenças neuropsiquiátricas, como a esquizofrenia (LYON e cols., 2011) e a Doença de Alzheimer (LEE e LYKETSOS, 2003).

Sendo assim, a compreensão desta função neural em seus diversos aspectos (neuroanatômicos, neurofisiológicos e comportamentais) é de grande relevância no desenvolvimento de estratégias (farmaco)terapêuticas para minimizar os impactos clínico, social e econômico ocasionados por déficits de memória, sendo o teste de REO uma ferramenta com grande potencial de contribuição. Entretanto, devido às limitações éticas e/ou metodológicas para estudos acerca desta função cognitiva em humanos, é necessário recorrer a modelos animais (SQUIRE e WIXTED, 2011), já que esse tipo de memória parece ser ubíquo entre as espécies.

Apesar do teste de REO ser bastante utilizado em roedores, o uso de outras espécies, principalmente PNH, possibilita a obtenção de resultados mais translacionais, devido à proximidade filogenética entre esses animais e o homem. Além disso, este teste só foi avaliado em uma única espécie de PNH (KALINICHENKO e cols., 2021a,b) e sua validação em outras espécies, além de permitir comparações interespecíficas, aumenta a validade e robustez do protocolo.

3. Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o desempenho de macacos-prego (*Sapajus* spp.) adultos no teste de Reconhecimento Espontâneo de Objetos (REO) após intervalos de familiarização de 10 e 20 min. Os dados de exploração total dos objetos foram utilizados como índice de motivação dos animais para realização da tarefa e foram correlacionados ao desempenho (Índice de Discriminação - ID) dos sujeitos no teste.

4. Metodologia

4.1 Aspectos éticos

Os experimentos foram realizados de acordo com as normas estabelecidas pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA) e pela Lei Arouca nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, que estabelece os procedimentos para o uso de animais na pesquisa científica. O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília (UnB; protocolo no. 6/2019; Anexo I). Os animais utilizados fazem parte do plantel permanente do Centro de Primatologia da UnB (CPUUnB), o qual é credenciado pelo Instituto do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) como criadouro de primatas para fins científicos (registro nº 1/53/1999/000006-2).

4.2 Sujeitos e condições gerais de alojamento

Para o presente estudo, foram utilizados como sujeitos experimentais oito macacos-prego (*Sapajus* spp.; Figura 5) adultos (> 6 anos de idade) e de ambos os sexos (n=4/sexo), pesando de 2,0 a 4,5 kg. Ainda que o ciclo estral não tenha sido controlado, nenhuma fêmea estava prenha ou teve filhotes recentemente. Todos os sujeitos foram mantidos no CPUUnB, localizado na Fazenda Água Limpa da UnB.

Os animais foram alojados em pares heterossexuais, sob condições naturais de temperatura, umidade e luminosidade. Cada díade ocupou dois viveiros padrão para cebídeos do CPUUnB (1,5 m x 1,5 m x 2,0 m; L x P x A), sendo esses viveiros adjacentes e intercomunicáveis. A disposição dos viveiros não permitiu o contato visual entre os diferentes grupos. O viveiro moradia foi provido com uma caixa-ninho, fixada na tela superior, um recipiente para alimento fresco e outro para ração seca, um bebedouro de acionamento automático pelo animal e poleiros fixados em diferentes alturas. Ração e

água estavam disponíveis *ad libitum* e alimento fresco, como frutas, legumes e ovos cozidos, foi fornecido diariamente das 07h30 às 17h30.



Figura 5. Indivíduo adulto do gênero *Sapajus* (macaco-prego) do CPUUnB. Fonte: <https://neurocienciasunb.wixsite.com/neurocienciaunb/centro-de-primatologia>.

4.3 Aparato experimental

Os experimentos foram realizados em um aparato que consistiu em três viveiros padrão para cebídeos do CPUUnB, dispostos em uma sequência linear: viveiro-moradia, viveiro-transição e viveiro-teste (Figura 6). A parte frontal e superior era de tela metálica, enquanto o chão era de terra. Algumas paredes que separavam os viveiros foram feitas de alvenaria, enquanto outras eram móveis e feitas de chapa metálica. Essas divisórias móveis deslizavam horizontalmente para fora do viveiro. Quando abertas, elas permitiam a comunicação entre os viveiros adjacentes. Quando fechadas, os animais dentro de um viveiro não puderam visualizar o que estava acontecendo nos outros viveiros do aparato. As divisórias eram controladas manualmente apenas pelo pesquisador e pelo lado de fora do viveiro.

Vale ressaltar que, quando os sujeitos não estavam sendo testados, a parede deslizante entre os viveiros-moradia e de transição esteve sempre aberta e assim os animais tiveram mais espaço de vivência para uso diário (vide descrição acima sobre as condições gerais de alojamento). Já o acesso ao viveiro-teste ocorreu apenas durante a realização do teste de REO.

4.4 Procedimento experimental

Todos os sujeitos foram inicialmente treinados a transitar voluntariamente entre os três diferentes viveiros do aparato, além de também serem habituados ao viveiro-teste. Para isto, foi realizada uma sessão diária de habituação, de 10 min cada, durante quatro dias consecutivos.

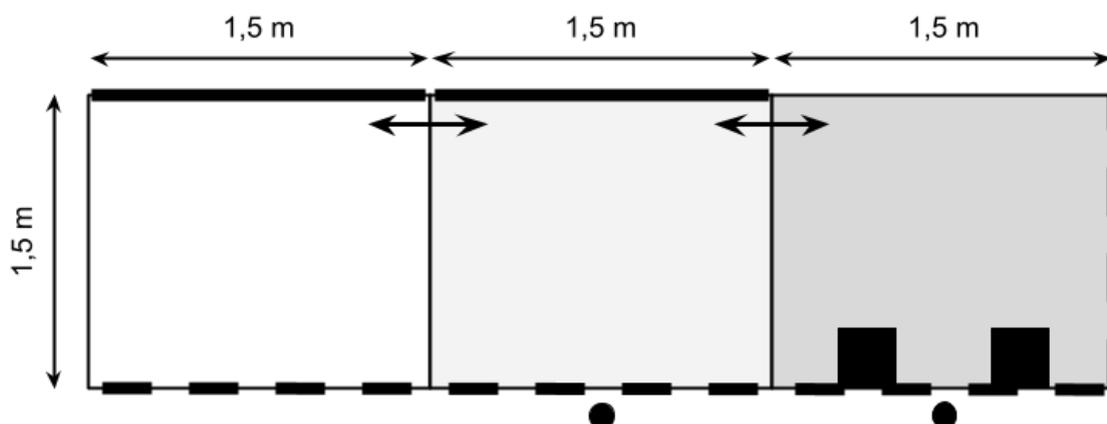


Figura 6. Representação esquemática do aparato experimental utilizado no estudo. O aparato consistiu em três compartimentos (viveiros modificados para macacos-prego do CPUnB): viveiro-moradia (à esquerda em branco), viveiro-transição (no meio em cinza claro) e viveiro-teste (à direita em cinza escuro). O sujeito pôde transitar entre os viveiros (setas) por meio de uma abertura temporária formada ao abrir parcialmente a divisória entre os viveiros (linhas delgadas), controlada manualmente pelo pesquisador pelo lado de fora do aparato. No viveiro-teste, o sujeito pôde explorar dois objetos (representados aqui como quadrados pretos) fixados na tela frontal do viveiro (linhas pontilhadas). O comportamento de transitar entre os viveiros do aparato, sob o comando do pesquisador, foi reforçado por uma uva-passa disponibilizada nos locais indicados por um ponto preto em frente aos viveiros transição e teste. As linhas espessas representam as paredes fixas. As dimensões estão indicadas em metros, tendo os viveiros 2 m de altura.

Nessas sessões, a divisória entre o viveiro-moradia e o de transição foi fechada para separar a díade. O sujeito a ser testado ficou no viveiro-transição e o outro animal

permaneceu no viveiro-moradia. Em seguida, a divisória entre o viveiro-transição e o viveiro-teste foi aberta parcialmente, permitindo que o sujeito passasse voluntariamente para esse local onde o teste foi realizado. Uma vez que o sujeito estava dentro do viveiro-teste, essa parede deslizante foi fechada e o animal pôde explorar livremente o viveiro-teste vazio por 10 min. Ao final desse intervalo, as divisórias foram abertas sequencialmente e o sujeito pôde voltar voluntariamente para o seu viveiro-moradia. A mudança do sujeito de um viveiro para outro foi recompensada por uma uva-passa, disponibilizada em frente à tela frontal dos viveiros-transição e de teste. Cabe salientar que a uva-passa foi apenas um estímulo para o sujeito transitar entre os diferentes viveiros, não sendo uma recompensa para a realização do teste REO.

Após um intervalo de 24 h desde a última sessão de habituação, cada sujeito foi submetido duas vezes ao teste de REO, sendo um teste para cada tempo de familiarização avaliado no presente estudo (10 ou 20 min) e com um intervalo de quatro dias entre eles.

Para cada teste de REO, foram realizadas uma sessão treino e uma sessão teste (Figura 7). Na sessão treino, duas cópias idênticas de um mesmo objeto foram fixadas em locais distintos na tela frontal do viveiro-teste. O sujeito pôde explorar esses objetos livremente por 10 ou 20 min (dependendo do tempo de familiarização empregado), retornando ao viveiro-transição ao final da sessão. Após um intervalo de retenção de 30 min dentro do viveiro-transição, o animal voltou ao viveiro-teste para a realização da sessão teste. Nessa sessão, dois objetos também foram fixados na tela frontal do viveiro-teste: um idêntico ao que foi visto anteriormente na sessão treino (objeto familiar) e um objeto nunca visto antes (objeto novo). O sujeito, novamente, pôde explorar ambos os objetos livremente durante 10 min, retornando ao seu viveiro-moradia após o fim da sessão.

Foi utilizado um conjunto distinto de objetos para cada teste de REO. Cada conjunto de objetos consistiu em duas cópias idênticas de dois objetos distintos (A e B) que diferiram em termos de sua forma. Os objetos foram fixados na tela frontal do viveiro-teste de modo que não puderam ser deslocados pelo sujeito e consistiram em itens etologicamente irrelevantes para os animais. Os objetos A e B foram aleatoriamente designados como sendo o objeto familiar ou novo. Para metade dos sujeitos, o objeto A foi usado como o item novo, enquanto para a outra metade, o objeto B foi o objeto novo. Ao término de cada sessão, os objetos foram higienizados com solução de etanol 70%, a fim de evitar pistas olfatórias. Todas as sessões experimentais foram realizadas das 08h00 às 12h00.

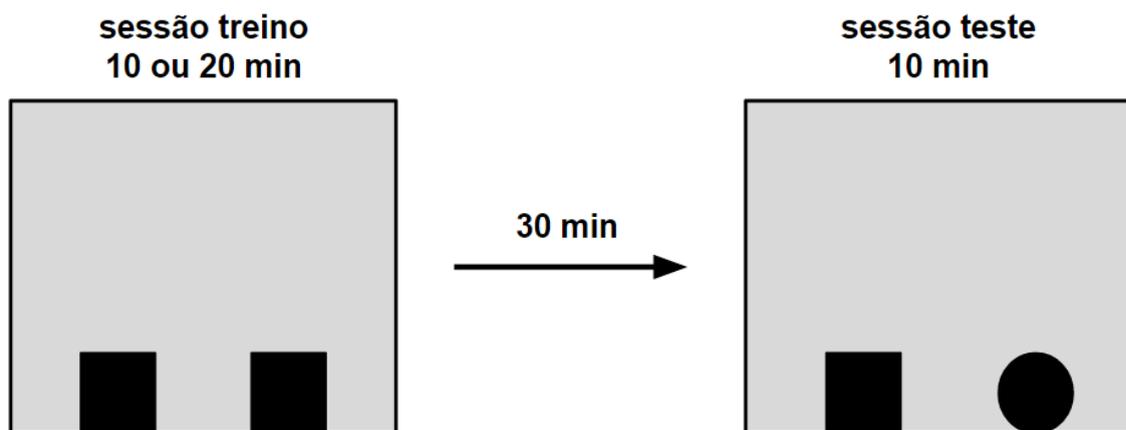


Figura 7. Representação esquemática do *Teste de Reconhecimento Espontâneo de Objetos* (REO). O quadrado cinza representa o viveiro-teste com os objetos teste (em preto) fixados na tela frontal do viveiro. Na sessão treino, dois objetos idênticos foram apresentados. Na sessão teste, um dos objetos da sessão treino foi substituído por um novo. A sessão treino teve duração de 10 ou 20 min (dependendo do tempo de familiarização empregado), a sessão teste teve duração de 10 min e o intervalo entre as sessões foi de 30 min.

Os objetos usados foram todos confeccionados usando pedaços de canos lisos de plástico PVC branco com 7,5 a 15 cm de diâmetro, comumente utilizados para tubulação hidráulica. Os canos foram encaixados de modo a formar diferentes formas geométricas e, portanto, tiveram diferentes tamanhos. No entanto, nenhum objeto foi menor que 10 cm

de largura, 10 cm de profundidade e 20 cm de altura, ou maior que 40 cm de largura, profundidade e altura.



Figura 8. Fotografias de quatro objetos utilizados no teste de Reconhecimento Espontâneo de Objetos (REO) realizado ao longo do presente estudo. (Fotografias: Jéssica Lohana Aquino Cunha)

4.5 Registro e análise do comportamento

Todas as sessões experimentais foram observadas remotamente, com o uso de uma câmera digital (Logitech C920, Brasil) posicionada em frente ao viveiro-teste e conectada a um computador localizado em uma sala adjacente ao pavilhão onde estavam os viveiros. O registro e a análise das sessões foram feitos por um pesquisador previamente treinado, utilizando o software AnyMaze® (Stoelting Co., EUA). Os seguintes comportamentos foram registrados: (1) *exploração do objeto*: duração de qualquer contato físico do sujeito com cada objeto; (2) *locomoção*: tempo em que o sujeito esteve em movimento no viveiro-teste.

Foi calculado um Índice de Discriminação (ID; ENNACEUR e cols., 1997) para cada sessão teste, a fim de minimizar a influência de variações interindividuais dos níveis basais de exploração. O ID foi calculado da seguinte forma: [tempo de exploração do objeto novo - tempo de exploração do objeto familiar] / [tempo de exploração dos dois objetos]. Um ID=0,0 indica que o sujeito explorou ambos os objetos equitativamente, enquanto um ID >0,0 indica que o sujeito explorou mais o objeto novo em relação ao objeto familiar. Uma maior exploração do objeto novo versus o objeto familiar na sessão

teste foi estabelecido como parâmetro indicativo de uma memória de reconhecimento nesse teste (DERE e cols. (2007).

4.6 Análise estatística dos dados

O ID, para as análises considerando todo o grupo amostral (n=8) e por sexo (n=4/sexo), foi comparado ao valor de zero (nível do acaso) utilizando o teste-t para uma amostra (*one sample t-test*). Um teste-t pareado (*paired sample t-test*) foi empregado para detectar se houve diferença entre os valores de ID. Este mesmo teste também foi utilizado para comparar o tempo de exploração total dos objetos e da atividade locomotora registrados entre os primeiros (0-10 min) e últimos (10-20 min) dez minutos da sessão treino de 20 min, bem como para comparar a exploração total entre as sessões treino, considerando o tempo total (10 min e 20 min) das sessões.

Uma análise de variância (ANOVA) de duas vias para amostras repetidas (*two-way repeated measure ANOVA*) foi utilizada para comparar a exploração total e a locomoção entre os dois tempos de familiarização (10 x 20 min) e as duas sessões (treino x teste) do teste de REO. Uma ANOVA de duas vias para amostras repetidas também foi empregada para verificar uma provável diferença na exploração total dos objetos, considerando a sequência temporal em que os testes de REO foram realizados, independente do tempo de familiarização usado (variáveis: *sequência* - 1° x 2° teste de REO; *sessão* - treino x teste). Na comparação entre machos e fêmeas, esses mesmos parâmetros foram analisados em separado para cada sexo, utilizando este mesmo teste.

Para comparar o tempo de locomoção entre as quatro sessões de habituação, foi realizada uma ANOVA de uma via (*one-way repeated measure ANOVA*). Já para averiguar se houve diferença entre os sexos em relação ao ID e as sessões de habituação, foi realizada uma ANOVA de duas vias de desenho misto (*two-way mixed design ANOVA*). Por fim, os valores do ID de ambos os testes de REO foram

correlacionados aos seus respectivos níveis de exploração total durante a sessão treino e a atividade locomotora registrada na sessão teste, empregando o teste de correlação de Pearson. O programa SPSS (v.25, IBM, EUA) foi utilizado para realizar as análises estatísticas e o nível de significância adotado para todos os testes foi de $p \leq 0,05$

5. Resultados

Independente do tempo de familiarização empregado (10 ou 20 min), os animais exploraram por mais tempo o objeto novo em relação ao familiar durante a sessão teste, uma vez que o ID diferiu significativamente do nível do acaso (*TF10 min*: $t_7=7,07$, $p<0,001$; *TF20 min*: $t_7=3,14$, $p=0,02$; Figura 9). Ao comparar os valores de ID entre si, não foi observada uma diferença significativa entre os dois tempos de familiarização avaliados neste estudo ($t_7=0,88$, $p=0,41$). No entanto, uma análise por sexo revelou que o ID dos machos diferiu significativamente de zero após ambos os intervalos de familiarização (*TF10 min*: $t_3=3,83$, $p=0,03$; *TF20 min*: $t_3=6,44$, $p=0,01$), ao passo que as fêmeas só tiveram esse desempenho após 10 min de familiarização inicial com os objetos (*TF10 min*: $t_3=11,06$, $p=0,002$; *TF20 min*: $t_3=0,99$, $p=0,39$; Figura 9), havendo uma interação significativa entre tempo de familiarização e sexo (*fator sexo*: $F_{1,6}=0,24$, $p=0,64$; *fator tempo de familiarização*: $F_{1,6}=1,41$, $p=0,27$; *interação*: $F_{1,6}=7,36$, $p=0,03$).

Em relação à exploração total dos objetos durante a sessão treino de 20 min, foi visto que os animais tiveram um padrão exploratório constante ao longo de toda a sessão, não diferindo entre os primeiros (0-10 min) e últimos (10-20 min) dez minutos ($t_7=1,20$, $p=0,27$; Tabela 1). Esse mesmo padrão de resposta também foi observado para a atividade locomotora, ou seja, não foi observada diferença na locomoção dos sujeitos entre os primeiros e últimos dez minutos da sessão treino de 20 min ($t_7=0,82$, $p=0,44$; Tabela 1). Diante desses resultados, as análises subsequentes, tanto para a atividade locomotora, quanto para a exploração total, foram realizadas utilizando o valor médio

desses parâmetros, observados nos primeiros e últimos dez minutos da sessão treino. Isso foi feito devido a outra sessão treino ter duração de 10 min.

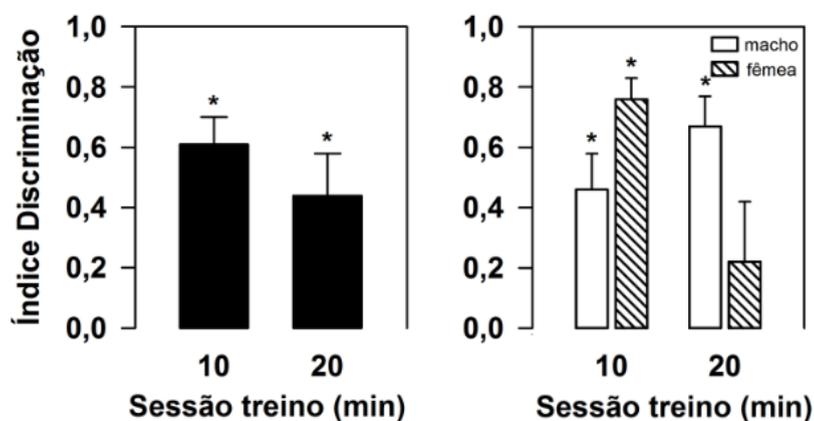


Figura 9. Índice de discriminação (média ± epm em segundos) calculados para as sessões teste realizadas 30 min desde a sessão inicial de familiarização de 10 ou 20 min com os objetos. *À esquerda:* índice calculado considerando todo o grupo amostral (n=8). *À direita:* índice calculado em separado para machos e fêmeas (n=4/sexo). *p<0,05 vs. valor de zero (nível do acaso).

Quando esses mesmos parâmetros comportamentais foram avaliados considerando uma análise por sexo, tanto os machos ($t_3=0,99$, $p=0,39$) quanto as fêmeas ($t_3=3,00$, $p=0,06$) mantiveram a exploração total dos objetos ao longo de toda a sessão de 20 min (Tabela 1). Todavia, para a locomoção, foi observado que os machos tiveram uma menor atividade locomotora na segunda parte da sessão treino de 20 min (i.e., 10-20 min; $t_3=3,63$, $p=0,04$), resultado não observado para as fêmeas ($t_3=-1,10$, $p=0,35$; Tabela 1).

Além disso, quando todos os animais foram analisados em conjunto (n=8), o tempo total de exploração dos objetos não diferiu significativamente entre as sessões treino e teste, ou entre os diferentes intervalos de familiarização (*fator sessão:* $F_{1,7}=0,10$, $p=0,77$; *fator tempo de familiarização:* $F_{1,7}=0,002$, $p=0,97$; *interação:* $F_{1,7}=1,27$, $p=0,30$; Figura 10). Também não foram observadas diferenças significativas entre sessão (treino x teste) e intervalos de familiarização (TF10 min x TF20 min) para os machos (*fator sessão:* $F_{1,3}=0,01$, $p=0,93$; *fator tempo de familiarização:* $F_{1,3}=0,51$, $p=0,53$; *interação:* $F_{1,3}=1,17$, $p=0,36$) ou para as fêmeas (*fator sessão:* $F_{1,3}=8,59$, $p=0,06$; *fator tempo de familiarização:*

$F_{1,3}=6,62$, $p=0,08$; *interação*: $F_{1,3}=0,13$, $p=0,74$; Figura 10). Quando os dados de exploração total das sessões treino de 10 min e 20 min (considerando toda a sessão de 20 min) foram comparadas (i.e., 10 min x 20 min), não foram detectadas diferenças significativas (*todos*: $t_7=-1,07$, $p=0,32$; *machos*: $t_3=-1,46$, $p=0,24$; *fêmeas*: $t_3=1,28$, $p=0,29$; Tabela 1).

Tabela 1. Tempo total de exploração dos objetos e de locomoção nas sessões treino, expresso como a média \pm epm em segundos.

Sujeito	Sessão treino			
	10 min	20 min		
	total	0-10 min	10-20 min	total
<i>Exploração total</i>				
machos e fêmeas	13 \pm 3	14 \pm 7	7 \pm 3	21 \pm 9
machos	19 \pm 4	25 \pm 12	12 \pm 4	37 \pm 13
fêmeas	8 \pm 2	3 \pm 1	2 \pm 1	5 \pm 1
<i>Locomoção</i>				
machos e fêmeas	192 \pm 46	149 \pm 38	140 \pm 47	289 \pm 84
machos	158 \pm 70	115 \pm 37	80 \pm 37*	195 \pm 73
fêmeas	227 \pm 65	185 \pm 67	199 \pm 80	384 \pm 148

* $p < 0,05$ vs. sessão treino 20 min (0-10 min)

Ao analisar os dados de exploração total, mas agora considerando apenas a ordem temporal na qual os dois testes de REO foram realizados, isto é, independente se o animal foi inicialmente familiarizado aos objetos por 10 ou 20 min, também não houve diferenças significativas entre os dois testes ou entre as duas sessões (*fator sequência*: $F_{1,7}=0,05$, $p=0,82$; *fator sessão*: $F_{1,7}=0,02$, $p=0,89$; *interação*: $F_{1,7}=2,28$, $p=0,17$; Tabela 2), mesmo quando a análise foi feita separadamente para os machos e as fêmeas (machos - *fator sequência*: $F_{1,3}=0,01$, $p=0,93$; *fator sessão*: $F_{1,3}=0,05$, $p=0,84$; *interação*: $F_{1,3}=3,42$,

$p=0,16$; fêmeas - *fator seqüência*: $F_{1,3}=0,73$, $p=0,45$; *fator sessão*: $F_{1,3}=2,88$, $p=0,19$, *interação*: $F_{1,3}=0,16$, $p=0,72$; Tabela 2). Para esta análise, considerou-se apenas a exploração total registrada nos primeiros 10 min da sessão treino de 20 min.

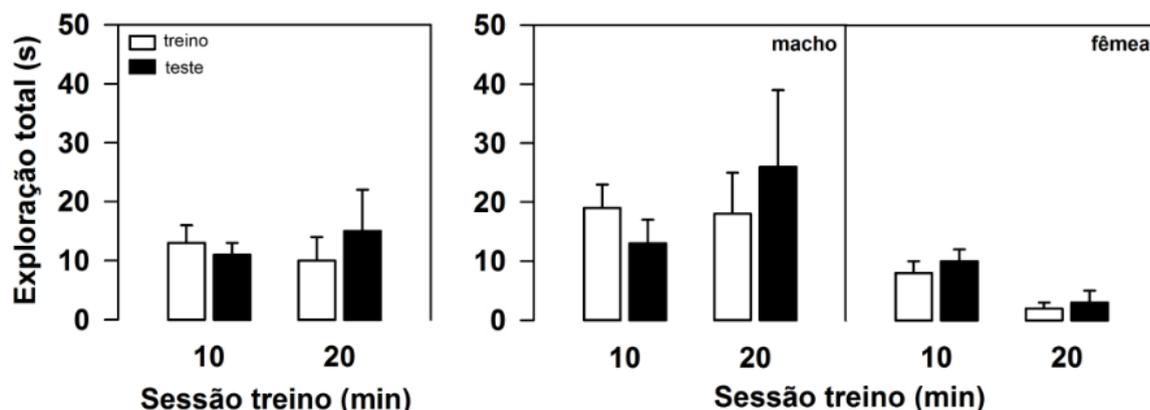


Figura 10. Tempo de exploração total dos objetos (média \pm epm em segundos) durante as sessões treino e teste do teste de REO. À esquerda: tempo de exploração total considerando todo o grupo amostral ($n=8$). À direita: tempo de exploração total para machos e fêmeas separadamente ($n=4$ /sexo). Os dados para a sessão treino de 20 min estão representados como a média dos intervalos 0-10 e 10-20 min desta sessão.

Tabela 2. Tempo total de exploração dos objetos nas sessões treino (apenas os primeiros 10 min) e teste, de acordo com a ordem com que o teste de REO foi realizado e expresso como a média \pm epm em segundos.

Sujeito	1º teste de REO		2º teste de REO	
	treino	teste	treino	teste
machos e fêmeas	17 \pm 7	11 \pm 3	10 \pm 3	15 \pm 7
machos	27 \pm 11	13 \pm 4	16 \pm 6	25 \pm 13
fêmeas	7 \pm 3	8 \pm 3	4 \pm 0	5 \pm 1

Já para a locomoção, não foi visto diferença significativa ao longo das quatro sessões de habituação ($F_{3,21}=2,25$, $p=0,16$; Tabela 3). Na análise que dividiu os sujeitos por sexo, a atividade locomotora também não diferiu significativamente entre os machos

e as fêmeas, ou entre as sessões de habituação (*fator sessão*: $F_{3,18}=2,01$, $p=0,19$; *fator sexo*: $F_{1,6}=0,35$, $p=0,57$; *interação*: $F_{3,18}=0,26$, $p=0,70$; Tabela 3).

Tabela 3. Atividade locomotora nas quatro sessões de habituação ao procedimento experimental, expressa como a média \pm epm em segundos.

Sujeito	Sessões de habituação			
	1	2	3	4
machos e fêmeas	113 \pm 17	114 \pm 27	120 \pm 25	170 \pm 52
machos	90 \pm 23	106 \pm 48	108 \pm 41	141 \pm 86
fêmeas	135 \pm 20	121 \pm 33	133 \pm 34	200 \pm 68

Além disso, nenhuma diferença significativa na atividade locomotora foi observada entre os diferentes tempos de familiarização, ou entre as sessões treino e teste do teste de REO (*fator tempo de familiarização*: $F_{1,7}=2,80$, $p=0,14$; *fator sessão*: $F_{1,7}=2,10$, $p=0,19$; *interação*: $F_{1,7}=0,57$, $p=0,47$; Figura 11). Nessa mesma avaliação, mas considerando os dados de machos e fêmeas separadamente, também não se revelou nenhuma diferença significativa (machos - *fator tempo de familiarização*: $F_{1,3}=1,63$, $p=0,29$; *fator sessão*: $F_{1,3}=0,07$, $p=0,94$; *interação*: $F_{1,3}=0,25$, $p=0,65$; fêmeas - *fator tempo de familiarização*: $F_{1,3}=0,86$, $p=0,42$; *fator sessão*: $F_{1,3}=5,00$, $p=0,11$; *interação*: $F_{1,3}=0,24$, $p=0,66$; Figura 11).

Por fim, as análises de correlação demonstraram que o desempenho dos animais no teste de REO não estava relacionado à sua atividade exploratória total na sessão treino (*TF10 min*: $r_8=-0,12$, $p=0,78$; *TF20 min*: $r_8=0,31$, $p=0,45$), nem à sua atividade locomotora durante a sessão teste (*TF10 min*: $r_8=0,16$, $p=0,70$; *TF20 min*: $r_8=-0,43$, $p=0,29$).

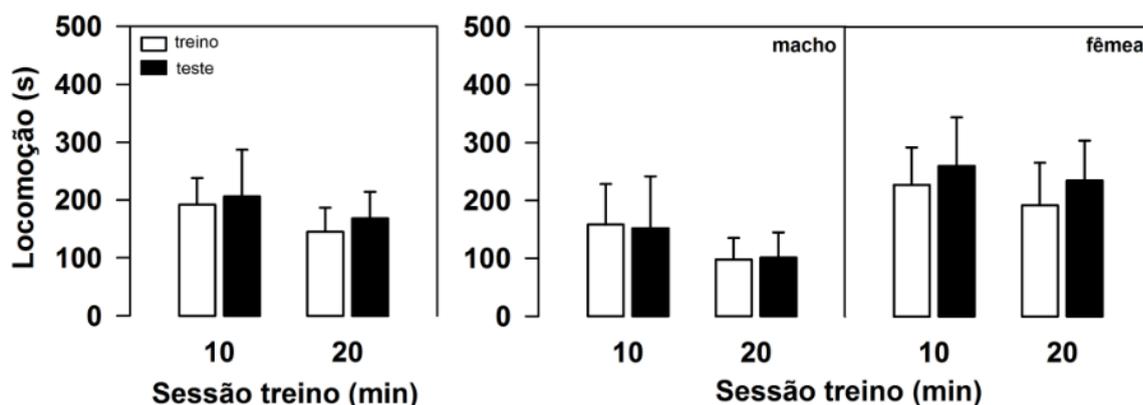


Figura 11. Tempo em movimento (média \pm epm em segundos) nas sessões treino e teste do teste de REO. À esquerda: atividade locomotora considerando todo o grupo amostral (n=8). À direita: atividade locomotora para machos e fêmeas separadamente (n=4/sexo). Os dados para a sessão treino de 20 min estão representados como a média dos intervalos 0-10 e 10-20 min desta sessão.

6. Discussão

No presente estudo foi visto que os macacos-prego adultos foram capazes de discriminar entre objetos novos e familiares. De fato, os dois ID calculados estavam significativamente acima do nível do acaso, indicando que o objeto novo foi explorado por mais tempo que o familiar. Desta forma, os animais apresentaram uma memória de reconhecimento no teste de REO. Um resultado semelhante já havia sido observado em outra espécie de PNH neotropical – o mico-estrela (KALINICHENKO e cols., 2021a,b).

Contudo, vale ressaltar que os ID dos dois testes realizados não diferiram entre si, ou seja, o reconhecimento dos objetos ocorreu independentemente de o tempo de familiarização com esses itens ter sido de 10 ou 20 min (i.e., a sessão treino). Assim, um aumento no tempo de familiarização não aumentou a memória de reconhecimento dos macacos-prego para objetos neutros. Um resultado semelhante a esse foi observado anteriormente em roedores (GASKIN e cols., 2010).

Porém, a influência do tempo de familiarização na memória de reconhecimento ainda não está totalmente esclarecida, já que outros estudos também já demonstraram haver uma possível relação entre esses dois aspectos. De fato, vários pesquisadores

acreditam que um aumento no tempo de familiarização resultaria em uma memória de reconhecimento mais pronunciada, manifestada por uma exploração consideravelmente maior do objeto novo (AMEEN-ALI e cols., 2015). Ao aumentar a duração da fase de familiarização de 4 para 8 min, ALBASSER e cols. (2009) observaram uma melhora na capacidade de ratos reconhecerem objetos, mesmo após 24 h de IR. Um resultado similar foi visto no teste de ROL com ratos, onde a preferência pelo objeto deslocado aumentou conforme a duração da sessão treino (OZAWA e cols., 2011). Em suínos, só foi observada uma memória de reconhecimento após IR de 3 e 5 h, quando os animais haviam sido expostos aos objetos familiares por 45 h (GIFFORD e cols., 2007).

Ao comparar esses estudos com o presente trabalho, é possível verificar diferenças metodológicas que limitam comparações diretas. Tais diferenças incluem, por exemplo, o tipo de teste adotado (REO vs. ROL), o tempo do IR empregado e a espécie do sujeito experimental (roedores, suínos e PNH).

Mesmo que uma diferença significativa entre os ID não tenha sido observada aqui, houve uma pequena redução no desempenho dos animais após a familiarização de 20 min, comparada a sessão treino de apenas 10 min. Essa tendência de diminuição no desempenho após a sessão treino mais longa de 20 min poderia corresponder, na verdade, a um menor interesse dos sujeitos em explorar os objetos, como revisado em ANTUNES e BIALA (2012). Os itens usados como estímulo no teste de REO são neutros e assim, após uma exploração inicial, poderia haver uma perda de interesse por parte do indivíduo em continuar explorando tais objetos, mesmo com um tempo de exposição mais longo a esses mesmos objetos. Mas, no presente estudo, os níveis de exploração permaneceram constantes ao longo de toda a sessão treino de 20 min (i.e., 0-10 min e 10-20 min) e entre as sessões treino e teste do teste de TF20min.

Vale lembrar ainda que os animais foram submetidos a dois testes de REO, em um intervalo de 4 dias. Em ratos, após várias sessões de familiarização, foi observada

uma redução nos níveis de exploração dos objetos (IWAMURA e cols., 2016; KHANI e RAINER, 2012), demonstrando uma possível redução na motivação desses animais (KHANI e RAINER, 2012). Contudo, o interesse dos macacos-prego em explorar os objetos também não diminuiu após duas exposições ao teste de REO, mesmo utilizando objetos cuja única diferença entre si era sua forma, já que os níveis de exploração total não diferiram em relação à ordem cronológica de realização dos testes de REO.

Ao analisar machos e fêmeas separadamente, apenas os machos exploraram mais o objeto novo após ambos os tempos de familiarização. Machos têm mais dificuldade em lembrar características específicas de um estímulo ao qual foram expostos (HALPERN, 1992), demandando assim, mais tempo para codificar tais informações. Isso poderia explicar, pelo menos em parte, o bom desempenho dos machos após a familiarização de 20 min.

Em contrapartida, as fêmeas não demonstraram um desempenho satisfatório após a sessão treino mais longa de 20 min. Apesar de tal resultado poder indicar uma falta de memória de reconhecimento nesse teste, os baixos níveis de exploração total observados nas respectivas sessões treino e teste podem ter influenciado esse desempenho fraco das fêmeas. AINGE e cols. (2006) argumentam que o tempo de exploração é um fator importante na memória de reconhecimento e, portanto, déficits no reconhecimento poderiam na verdade ser alterações na atividade exploratória, ao invés de um déficit de memória em si. De fato, no teste de REO que avaliou o tempo de familiarização de 10 min nos macacos-prego, a atividade exploratória das fêmeas nas sessões treino e teste foi maior e uma memória de reconhecimento foi demonstrada. ALBASSER e cols. (2009) observaram um resultado semelhante em ratos. Contudo, outros estudos com ratos não observaram uma correlação entre o tempo de exploração dos objetos na sessão treino e o desempenho no teste de REO (GASKIN e cols., 2010) e de ROL (OZAWA e cols., 2011). No entanto, estes últimos trabalhos utilizaram apenas

machos como sujeito experimental, o que limita comparações mais diretas com os resultados do presente estudo.

Além disso, o ciclo estral não foi controlado e assim não é possível determinar se a fase do ciclo teve alguma influência no desempenho das fêmeas. Em ratos, variações nos níveis hormonais detectados ao longo do ciclo das fêmeas já foram demonstrados como sendo um fator capaz de influenciar o desempenho no teste de REO (van GOETHEM e cols., 2012). Tendo isso em conjunto, novos estudos se fazem necessários para melhor avaliar a influência da exposição inicial aos objetos no desempenho de PNH fêmeas no teste de REO.

Também não foi observada uma relação entre o desempenho dos animais no teste de REO e o tempo de exploração dos objetos na sessão treino, algo que também já foi visto em roedores (AKKERMAN e cols., 2012a; GASKIN e cols., 2010; OZAWA e cols., 2011). Porém, ALBASSER e cols. (2009) encontraram uma relação entre o grau de discriminação dos objetos na sessão teste e a exploração dos objetos na sessão treino. Essa discrepância pode ser parcialmente atribuída aos indicadores de memória utilizados. Enquanto ALBASSER e cols. (2009) utilizaram a diferença entre o tempo de exploração do objeto novo e familiar – um indicador que não leva em consideração diferenças nos níveis gerais de exploração e, conseqüentemente, os resultados podem ser influenciados por animais mais ativos (AMEEN-ALI e cols., 2015), o presente estudo utilizou o ID – um indicador que dimensiona a exploração de modo a considerar tais efeitos na exploração total e que reduz a variabilidade interindividual dos níveis de exploração (AMEEN-ALI e cols., 2015). O uso do ID já demonstrou ser mais sensível a diferenças sutis, quando grupos com diferentes níveis de exploração são comparados (AKKERMAN e cols., 2012b).

A atividade locomotora também não influenciou os resultados observados aqui, visto que este parâmetro não diferiu entre as sessões treino e teste, ou entre as duas

versões do teste de REO que foram realizadas, tampouco estava relacionada ao desempenho dos sujeitos no teste de memória empregado.

7. Conclusão

Os resultados do presente trabalho indicam que, aumentar o tempo de familiarização de 10 para 20 min não necessariamente resulta em uma melhora na memória de reconhecimento de macacos-prego adultos no teste de REO. No entanto, os machos parecem se beneficiar com este aumento. Além do mais, alterações na motivação, devido a testes repetidos ou a um maior tempo de contato inicial com os objetos, não influenciou os resultados observados. Este trabalho também corrobora para o uso de macacos-prego como um modelo translacional para o estudo da memória de reconhecimento. De fato, o teste de REO se mostrou ser, mais uma vez, um procedimento robusto e versátil para avaliar a memória de reconhecimento em diferentes espécies, incluindo agora, PNH.

8. Referências bibliográficas

Aggleton JP. One-trial object recognition by rats. *The Quarterly Journal of Experimental Psychology* 37B: 279-294, 1985.

Aggleton JP, Brown MW. Interleaving brain systems for episodic and recognition memory. *Trends in Cognitive Sciences* 10: 455-463, 2006.

Aggleton JP, Nicol RM, Huston AE, Fairbairn AF. The performance of amnesic subjects on tests of experimental amnesia in animals: delayed matching-to-sample and concurrent learning. *Neuropsychologia* 26: 265-272, 1988.

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

Ainge JA, Heron-Maxwell C, Theofilas P, Wright P, de Hoz L, Woor ER. The role of the hippocampus in object recognition in rats: examination of the influence of task parameters and lesion size. *Behavioural Brain Research* 167: 183-195, 2006.

Akkerman S, Blokland A, Reneerkens O, van Goethem NP, Bollen E, Gijssels HJM, Lieben CKJ, Steinbusch HWM, Prickaerts J. Object recognition testing: methodological considerations on exploration and discrimination measures. *Behavioural Brain Research* 232: 335-347, 2012a.

Akkerman S, Prickaerts J, Steinbusch HWM, Blokland A. Object recognition testing: statistical considerations. *Behavioural Brain Research* 232: 317-322, 2012b.

Albasser MM, Davies M, Futter JE, Aggleton JP. Magnitude of the object recognition deficit associated with perirhinal cortex damage in rats: effects of varying the lesion extent and the duration of the sample period. *Behavioral Neuroscience* 123: 115-124, 2009.

Ameen-Ali KE, Easton A, Eacott MJ. Moving beyond standard procedures to assess spontaneous recognition memory. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 53: 37-51, 2015.

Antinucci F. The comparative study of cognitive ontogeny in four primate species. "Language" and intelligence in monkeys and apes. Cambridge: Cambridge University Press 157-171, 1990.

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

Bachevalier J, Beauregard M, Alvarado MC. Long-term effects of neonatal damage to the hippocampal formation and amygdaloid complex on object discrimination and object recognition in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Behavioral Neuroscience* 113: 1127-1151, 1999.

Bachevalier J, Nemanic S. Memory for spatial location and object-place associations are differently processed by the hippocampal formation, parahippocampal areas TH/TF and perirhinal cortex. *Hippocampus* 18: 64-80, 2008.

Balderas I, Moreno-Castilla P, Bermudez-Rattoni F. Dopamine D1 receptor activity modulates object recognition memory consolidation in the perirhinal cortex but not in the hippocampus. *Hippocampus* 23: 873-878, 2013.

Barbosa FF, de Oliveira Pontes IM, Ribeiro S, Ribeiro AM, Silva RH. Differential roles of the dorsal hippocampal regions in the acquisition of spatial and temporal aspects of episodic-like memory. *Behavioural Brain Research* 232: 269-277, 2012.

Barker GRI, 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. *The Journal of Neuroscience* 27: 2948-2957, 2007.

Barker GRI, Warburton EC. When is the hippocampus involved in recognition memory? *The Journal of Neuroscience* 31: 10721-10731, 2011.

Bear MF, Connors BW, Paradiso MA. *Neurociências: desvendando o sistema nervoso* (4. Ed.). Porto Alegre, RS: Artmed, 2017.

Bertaina-Anglade V, Enjuanes E, Morillon D, Drieu la Rochelle C. The object recognition task in rats and mice: a simple and rapid model in safety pharmacology to detect amnesic properties of a new chemical entity. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 54: 99-105, 2006.

Broadbent NJ, Gaskin S, Squire LR, Clark RE. Object recognition memory and the rodent hippocampus. *Learning & Memory* 17: 5-11, 2009.

Brown MW, Aggleton JP. Recognition memory: what are the roles of the perirhinal cortex and hippocampus? *Nature Reviews in Neuroscience* 2: 51-61, 2001.

Brown MW, Bashir ZI. Evidence concerning how neurons of the perirhinal cortex may effect familiarity discrimination. *Philosophical Transactions of The Royal Society of London, Series B Biological Sciences* 357: 1083-1095, 2002.

Callahan H, Ikeda-Douglas C, Head E, Cotman CW, Milgram NW. Development of a protocol for studying object recognition memory in the dog. *Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry* 24: 693-707, 2000.

Clark RE, Squire LR. An animal model of recognition memory and medial temporal lobe amnesia: history and current issues. *Neuropsychologia* 48: 2234-2244, 2010.

Clarke JR, Cammarota M, Gruart A, Izquierdo I, Delgado-García JM. Plastic modifications induced by object recognition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 2652-2657, 2010.

Custance D, Whiten A, Fredman T. Social learning of an artificial fruit task in capuchin monkeys (*Cebus apella*). *Journal of Comparative Psychology* 113: 13-23, 1999.

Dere E, Huston JP, De Souza Silva MA. Integrated memory for objects, places, and temporal order: evidence for episodic-like memory in mice. *Neurobiology of Learning and Memory* 84: 214-221, 2005.

Dere E, Huston JP, Silva MADS. The pharmacology, neuroanatomy and neurogenetics of one-trial object recognition in rodents. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 31: 673-704, 2007.

Dix SL, Aggleton JP. Extending the spontaneous preference test of recognition: evidence of object-location and object-context recognition. *Behavioural Brain Research* 99: 191-200, 1999.

Eacott MJ, Gaffan D, Murray EA. Preserved recognition memory for small sets, and impaired stimulus identification for large sets, following rhinal cortex 231 ablations in monkeys. *The European Journal of Neuroscience* 6: 1466-1478, 1994.

Ennaceur A, Delacour J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: behavioral data. *Behavioural Brain Research* 31: 47-59, 1988.

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. *Experimental Brain Research* 113: 509-519, 1997.

- Fragaszy DM, Liu Q, Wright BW, Allen A, Brown CW, Visalberghi E. Wild bearded capuchin monkeys (*Sapajus libidinosus*) strategically place nuts in a stable position during nut-cracking. PLoS One 8: e56182, 2013.
- Fragaszy DM, Visalberghi E, Fedigan LM. The complete capuchin: the biology of the genus *Cebus*. Cambridge, Cambridge University Press, 2004.
- Gámiz F, Gallo M. Spontaneous object recognition memory in aged rats: complexity versus similarity. Learning & Memory 19: 444-448, 2012.
- Garber PA, Paciulli LM. Experimental field study of spatial memory and learning in wild capuchin monkeys (*Cebus capucinus*). Folia Primatologica 68: 236-253, 1997.
- Gaskin S, Tardif M, Cole E, Piterkin P, Kayello L, Mumby DG. Object familiarization and novel-object preference in rats. Behavioural Processes 83: 61-71, 2010.
- Gifford AK, Cloutier S, Newberry RC. Objects as enrichment: effects of object exposure time and delay interval on object recognition memory of the domestic pig. Applied Animal Behaviour Science 107: 206-217, 2007.
- Gomes DF, Bicca-Marques JC. Capuchin monkeys (*Cebus nigritus*) use spatial and visual information during within-patch foraging. American Journal of Primatology 74: 58-67, 2011.
- Gothard KM, Erickson CA, Amaral DG. How do rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) scan faces in a visual paired comparison task? Animal Cognition 7: 25-36, 2004.
- Griffiths S, Scott H, Glover C, Bienemann A, Ghorbel MT, Uney J, Brown MW, Warburton EC, Bashir ZI. Expression of long-term depression underlies visual recognition memory. Neuron 58: 186-194, 2008.
- Halpern DF. Sex differences in cognitive abilities, Third Edition. Hillsdale NJ: Erlbaum, 1992.
- Hannesson DK, Howland JG, Phillips AG. Interaction between perirhinal and medial prefrontal cortex is required for temporal order but not recognition memory for objects in rats. The Journal of Neuroscience 24: 4596-4604, 2004.
- Hegab IM, Tan Y, Wang C, Yao B, Wang H, Ji W, Su J. Examining object recognition and object-in-place memory in plateau zokors, *Eospalax baileyi*. Behavioural Processes 146: 34-41, 2018.
- Heuer E, Bachevalier J. Effects of selective neonatal hippocampal lesions on tests of object and spatial recognition memory in monkeys. Behavioral Neuroscience 125: 137-149, 2011.
- Heyser CJ, Chemero A. Novel object exploration in mice: not all objects are created equal. Behavioural Processes 89: 232-238, 2012.
- Iwamura E, Yamada K, Ichitani Y. Involvement of hippocampal NMDA receptors in retrieval of spontaneous object recognition memory in rats. Behavioural Brain Research 307: 92-99, 2016.
- Izquierdo I. Memória (2. ed.). Porto Alegre, RS: Artmed, 2014.
- Janson CH. Experimental evidence for spatial memory in foraging wild capuchin monkeys, *Cebus apella*. Animal Behaviour 55: 1229-1243, 1998.
- Kalinichenko LS, Abdel-Hafiz L, Wang AL, Mühle C, Rösler N, Schumacher F, Kleuser B, Smaga I, Frankowska M, Filip M, Schaller G, Richter-Schmidinger T, Lenz B, Gulbins E, Kornhuber J, Oliveira AWC, Barros M, Huston JP, Müller CP. Neutral sphingomyelinase is an affective valence-dependent regulator of learning and memory. Cerebral Cortex 31: 1316-1333, 2021a.

Kalinichenko LS, Wang AL, Mühle C, Abdel-Hafiz L, Gulbins E, Kornhuber J, Oliveira AWC, Barros M, Huston JP, Müller CP. Neutral ceramidase is a marker for cognitive performance in rats and monkeys. *Pharmacological Reports* 73: 73-84, 2021b.

Khani A, Rainer G. Recognition memory in tree shrew (*Tupaia belangeri*) after repeated familiarization sessions. *Behavioural Processes* 90: 364-371, 2012.

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

Kluver H. Behavior mechanisms in monkeys. Chicago: University of Chicago Press, 1933.

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. *Behavioural Brain Research* 181: 210-217, 2007.

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

Lemon N, Manahan-Vaughan D. Dopamine D1/D5 receptors gate the acquisition of novel information through hippocampal long-term potentiation and long-term depression. *The Journal of Neuroscience* 26: 7723-7729, 2006.

Lucon-Xiccato T, Dadda M. Guppies show behavioural but not cognitive sex differences in a novel object recognition test. *PLoS One* 11: e0156589, 2016.

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* 220: 647-672, 2011.

Manahan-Vaughan D, Braunewell KH. Novelty acquisition is associated with induction of hippocampal long-term depression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 8739-8744, 1999.

Manns JR, Stark CE, Squire LR. The visual paired-comparison task as a measure of declarative memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 12375-12379, 2000.

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

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. *Progress in Brain Research* 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. *Frontiers in Pharmacology* 8: 395, 2017b.

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

Mishkin M, Delacour J. An analysis of short-term visual memory in the monkey. *Journal of Experimental Psychology. Animal Behavior Processes* 1: 326-334, 1975.

Mumby DG, Pinel JP, Wood ER. Nonrecurring-items delayed nonmatching-to-sample in rats: a new paradigm for testing nonspatial working memory. *Psychobiology* 18: 321-326, 1990.

- Mumby DG, Tremblay A, Lecluse V, Lehmann H. Hippocampal damage and anterograde object-recognition in rats after long retention intervals. *Hippocampus* 15: 1050-1056, 2005.
- Murray EA, Mishkin M. Object recognition and location memory in monkeys with excitotoxic lesions of the amygdala and hippocampus. *The Journal of Neuroscience* 18: 6568-6582, 1998.
- Nader K, Einarsson EO. Memory reconsolidation: an update. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1191: 27-41, 2010.
- Ozawa T, Yamada K, Ichitani Y. Long-term object location memory in rats: effects of sample phase and delay length in spontaneous place recognition test. *Neuroscience Letters* 497: 37-41, 2011.
- Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Hall WC, LaMantia AS, Mooney RD, Platt ML, White LE. *Neuroscience* (6. Ed.). Sunderland, Massachusetts: Oxford University Press, 2018.
- Reger ML, Hovda DA, Giza CC. Ontogeny of rat recognition memory measured by the novel object recognition task. *Developmental Psychobiology* 51: 672-678, 2009.
- Resende MC, Tavares MC, Tomaz C. Ontogenetic dissociation between habit learning and recognition memory in capuchin monkeys (*Cebus apella*). *Neurobiology of Learning and Memory* 79: 19-24, 2003.
- Richmond J, Sowerby P, Colombo M, Hayne H. The effect of familiarization time, retention interval, and context change on adults' performance in the visual paired-comparison task. *Developmental Psychobiology* 44: 146-155, 2004.
- Sá CSC, Medalha CC. Aprendizagem e memória - contexto motor. *Revista Neurociências* 9: 103-110, 2001.
- Scoville WB. The limbic lobe in man. *Journal of Neurosurgery* 11: 64-66, 1954.
- Scoville WB, Milner B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* 20: 11-21, 1957.
- Squire LR. Memory systems of the brain: a brief history and current perspective. *Neurobiology of Learning and Memory* 82: 171-177, 2004.
- Squire LR, Wixted JT. The cognitive neuroscience of human memory since H.M. *Annual Review Neuroscience* 34: 259-288, 2011.
- Squire LR, Zola-Morgan S, Chen KS. Human amnesia and animal models of amnesia: performance of amnesic patients on tests designed for the monkey. *Behavioral Neuroscience* 102: 210-221, 1988.
- Sutcliffe J, Marshall K, Neill J. Influence of gender on working and spatial memory in the novel object recognition task in the rat. *Behavioural Brain Research* 177: 117-125, 2007.
- Tomaz C. *Psicobiologia da memória*. Psicologia USP, S. Paulo. 49-59, 1993.
- van Goethem NP, Rutten K, van der Staay FJ, Jans LAW, Akkerman S, Steinbusch HWM, Blokland A, van't Klooster J, Prickaerts J. Object recognition testing: rodent species, strains, housing conditions, and estrous cycle. *Behavioural Brain Research* 232: 323-334, 2012.
- Vannuchi CRS, Costa CS, de Jesus FM, Maior RS, Barros M. Sex, diurnal variation and retention interval differently affect performance of marmoset monkeys in a recognition memory task for object location. *Behavioural Brain Research* 379: 112334, 2020.

Visalberghi E. Capuchin monkeys: a window into tool use in apes and humans. Cambridge: Cambridge University Press: 138-150, 1993.

Waga IC, Dacier AK, Pinha PS, Tavares MCH. Spontaneous tool use by wild capuchin monkeys (*Cebus libidinosus*) in the Cerrado. *Folia Primatologica* 77: 337-344, 2006.

Wan H, Aggleton JP, Brown MW. Different contributions of the hippocampus and perirhinal cortex to recognition memory. *The Journal of Neuroscience* 19: 1142-1148, 1999.

Warburton EC, Brown MW. Findings from animals concerning when interactions between perirhinal cortex, hippocampus and medial prefrontal cortex are necessary for recognition memory. *Neuropsychologia* 48: 2262-2272, 2010.

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

Weiss AR, Bachevalier J. Object and spatial memory after neonatal perirhinal lesions in monkeys. *Behavioural Brain Research* 298: 210-217, 2016.

Whittington CJ, Podd J, Kan MM. Recognition memory impairment in Parkinson's disease: power and meta-analyses. *Neuropsychology* 14: 233-246, 2000.

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

ANEXO I



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

Brasília, 26 de fevereiro de 2019.

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado “MEMÓRIA DE RECONHECIMENTO EM PRIMATAS NÃO-HUMANOS: UM ESTUDO COMPORTAMENTAL EM MACACOS-PREGO (*SAPAJUS SPP.*)” Protocolo n.º 6/2019, 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: *Sapajus spp* (12). A presente aprovação é válida pelo período de: 01/03/2019 a 01/03/2022.



Prof. Dr. Cássio José da Silva
Coordenador 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.