

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

ÂNDREO VALENTIM RYSDYK DE SOUZA

**DÉFICITS COGNITIVOS E SOCIAIS EM RATOS SUBMETIDOS À HIPÓXIA-ISQUEMIA
NEONATAL: AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL E HISTOLÓGICA**

**PORTO ALEGRE
2016**

ÂNDREO VALENTIM RYSDYK DE SOUZA

**DÉFICITS COGNITIVOS E SOCIAIS EM RATOS SUBMETIDOS À HIPÓXIA-
ISQUEMIA NEONATAL: AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL E HISTOLÓGICA**

Trabalho de conclusão submetido ao Curso de Graduação em Biomedicina do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS, como requisito parcial para obtenção do título Bacharel em Biomedicina

Orientador: Me. Juliana Raquel Jaboinski, Doutoranda pelo programa de pós-graduação em Psicologia do Desenvolvimento e da Personalidade – UFRGS

Co-Orientador: Me. Mailton França de Vasconcelos, Doutorando pelo programa de pós-graduação em Psicologia do Desenvolvimento e da Personalidade– UFRGS

Porto Alegre

2016

ÂNDREO VALENTIM RYSDYK DE SOUZA

**DÉFICITS COGNITIVOS E SOCIAIS EM RATOS SUBMETIDOS À HIPÓXIA-
ISQUEMIA NEONATAL: AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL E HISTOLÓGICA**

Trabalho de conclusão submetido ao Curso de Graduação em Biomedicina do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS, como requisito parcial para obtenção do título Bacharel em Biomedicina

Aprovada em: Porto Alegre, ____ de _____ de 2016

BANCA EXAMINADORA

Dirson João Stein

Doutorando pelo Programa de Pós-Graduação em Psiquiatria e Ciências do Comportamento
UFRGS

Mellanie Fontes Dutra da Silva

Doutoranda pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Neurociências
UFRGS

AGRADECIMENTOS

Meus mais singelos agradecimentos se destinam a todos que de alguma forma me ajudaram nessa etapa de vida. Familiares, amigos, e qualquer um que tenha algum dia escutado minhas reclamações ou os meus momentos de estresse e, que mesmo assim, tenha continuado ao meu lado. Agradeço também aos meus professores, exceto raras exceções, que desde pequeno até hoje me enriqueceram com conhecimento.

Agradecimentos diretos, à minha amiga de longuíssima data, Stella Müller, que não só fez parte dos ouvintes já antes mencionados (provavelmente a que mais ouviu), como me ajudou diretamente na formatação desde trabalho; à Iohanna Deckmann, não só uma veterana do curso, mas que me ajudou de extrema boa vontade quando mais precisei; e aos meus orientadores, Juliana Jaboinski e Mailton Vasconcelos, que não só fizeram excelente papel me orientando, mas que me mostraram de forma extremamente compreensiva os passos para ser um melhor cientista.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Esquema demonstrando os eventos ocorridos neste estudo cronologicamente	10
Figura 2- Procedimento de hipóxia-isquemia encefálica de Levine-Rice	11
Figura 3- Ilustração do teste de reconhecimento social.....	12
Figura 4- Ilustração da tarefa de reconhecimento de objetos	13
Figura 5- Arranjo espacial da caixa de 5-CSRTT	15
Figura 6- Índice de Reconhecimento Social.....	21
Figura 7- Resultado do teste de reconhecimento de objetos	22
Figura 8- Percentual de Investigação	22
Figura 9- Número médio de sessões por estágio	23
Figura 10- Desempenho nas sessões de teste	25
Figura 11- Imagens da Histologia	26
Figura 12- Comparação da media dos volumes totais das áreas cortadas	26
Figura 13- Comparação do volume do córtex frontal	27
Figura 14- Comparação do volume do estriado	27
Figura 15- Comparação do volume do hipocampo	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Construtos avaliados pela 5-CSRTT e a forma como são aferidos.....	17
Tabela 2 – Manipulações dos Parâmetros	18

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	7
1.1 INTRODUÇÃO AOS MÉTODOS	7
2 OBJETIVOS	9
2.1 OBJETIVOS GERAIS	9
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
3 MÉTODOS	10
3.1 ANIMAIS	10
3.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL DE HIPÓXIA-ISQUEMIA ENCEFÁLICA	10
3.3 TAREFA DE INTERAÇÃO SOCIAL E RECONHECIMENTO SOCIAL	11
3.4 TAREFA DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS	12
3.5 TAREFA DE TEMPO DE REAÇÃO SERIAL DE CINCO ESCOLHAS (5-CSRTT) ..	14
3.5.1 Aparato	14
3.5.2 Habituação	15
3.5.3 Treinamento	16
3.5.4 Manipulações	17
3.6 ANÁLISES HISTOLÓGICAS E VOLUMÉTRICAS	19
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	20
4 RESULTADOS	20
4.1 RECONHECIMENTO SOCIAL	20
4.2 RECONHECIMENTO DE OBJETOS	21
4.3 RESULTADOS DA 5-CSRTT	23
4.3.1 aquisição da tarefa	23
4.3.2 acurácia	23
4.3.3 prematuras	24
4.3.4 latência de recompensa	24
4.4 HISTOLOGIA E VOLUMETRIA	25
5 DISCUSSÃO	29
6 CONCLUSÃO	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34

DÉFICITS COGNITIVOS E SOCIAIS EM RATOS SUBMETIDOS À HIPÓXIA-ISQUEMIA NEONATAL: AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL E HISTOLÓGICA

ÂNDREO VALENTIM RYSDYK DE SOUZA ¹

¹Aluno graduação em Biomedicina do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS

Resumo

A Encefalopatia Hipóxico-Isquêmica é uma condição obstétrica altamente debilitante, podendo levar ao óbito ou a sérios impactos motores e cognitivos em neonatos, atingindo 3 em cada 100 nascidos vivos a termo e com mortalidade entre 50% e 89%. O modelo animal de Levine-Rice é amplamente utilizado para mimetizar a hipóxia-isquemia (HI), na qual ratos são submetidos a uma oclusão da artéria carótida esquerda, seguida pela exposição a uma atmosfera com baixa concentração de oxigênio. Para avaliar os danos causados, foi utilizado um protocolo de reconhecimento social e de objetos e a 5-CSRTT (5 choice serial reaction time task), combinando análise social e cognitiva. Depois, uma análise histológica e volumétrica foi feita para avaliar danos encefálicos, com foco em estruturas correlacionadas ao aprendizado e processos atencionais, essas: córtex frontal, estriado e hipocampo. Um dano cognitivo e social foi verificado nos animais, incluindo déficits atencionais, de aprendizado, de impulsividade e no reconhecimento social, causados principalmente por dano cortical e estriatal. O modelo pode ser válido e de interesse para estudos futuros envolvendo doenças além da encefalopatia hipóxico-isquêmica, como o autismo, a esquizofrenia e o transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH).

Palavras-chaves: hipóxia-isquemia, comportamento social, atenção, impulsividade, 5-CSRTT.

1 INTRODUÇÃO

Encefalopatia Hipóxica-Isquêmica é uma condição obstétrica que pode levar ao óbito ou a sérios impactos motores e cognitivos em neonatos devido à falta de oxigenação cerebral, que pode ser causada por uma variedade de fatores, incluindo má nutrição materna, ruptura de placenta, prolapso do cordão umbilical e ruptura uterina (J. J. Kim et al., 2013). Numa escala global, atinge 3 em cada 1000 nascidos vivos em termo e leva a óbito entre 50% e 89% das crianças que sofrem Hipóxia-Isquemia Encefálica (HI)(Lai & Yang, 2010). Aquelas que sobrevivem, em sua maioria, são acometidas por transtornos neurais e/ou danos cerebrais, como por exemplo, paralisia cerebral, correspondendo a 10% a 20% dos casos (Doi et al., 2012; J. J. Kim et al., 2013).

O dano cerebral da hipóxia-isquemia é progressivo, iniciando-se durante a agressão ao sistema nervoso central e estende-se durante a recuperação após a lesão pela reperfusão (Busl & Greer, 2010). A fisiopatologia da HI está relacionada com a privação do aporte de glicose e oxigênio que implica na falha energética e inicia uma cascata de eventos bioquímicos, ocasionando disfunção celular e, ao final, a morte celular (Lai & Yang, 2010). Após a privação de ATP, há uma falha nas bombas iônicas dependentes de ATP dos neurônios, o que impede o neurônio de manter seu potencial elétrico de repouso, gerando acúmulo de íons como sódio, cálcio e água, seguidos de uma despolarização e a liberação de glutamato (excitotóxico quando em excesso), além do acúmulo de radicais livres e dano oxidativo consequente (Lai & Yang, 2010). Observa-se microscopicamente, principalmente no córtex e hipocampo, células tumefadas, degeneração celular, condensação e fragmentação do núcleo, vacuolização do citoplasma e desorganização do retículo (Yao et al., 2016). Estes e outros fatores induzem a célula para a ativação de caspases e outras proteínas que mediarão a morte celular (Northington, Chavez - Valdez, & Martin, 2011). Esse dano é primeiramente celular, mas acaba por danificar tecidos em grande extensão, sendo visível em preparados histológicos.

1.1 INTRODUÇÃO AOS MÉTODOS

O procedimento experimental de hipóxia-isquemia encefálica em ratos vem sendo amplamente estudado para avaliações comportamentais. Esse experimento foi desenvolvido com o objetivo de mimetizar a encefalopatia hipóxico-isquêmica artificialmente e, assim, fomentar a investigação da patologia e de possíveis métodos terapêuticos. Pode-se, então, com

esse protocolo estudar a relação entre a hipoperfusão em áreas do cérebro e os prejuízos cognitivos e comportamentais observados em diversas patologias. Esse procedimento é realizado no 7º dia de vida pós-natal quando o encéfalo de roedores corresponde, em relação ao desenvolvimento, ao encéfalo humano neonatal, quando as camadas neuronais do córtex estão completas (Vannucci & Vannucci, 2005).

A tarefa de tempo de reação serial de cinco escolhas (do inglês *Five Choice Serial Reaction Time Task – 5-CSRTT*) baseia-se na tarefa de performance contínua, desenvolvida por Beck, Bransome, Mirsky, Rosvold, and Sarason (1956), para a avaliação de distúrbios de atenção de indivíduos esquizofrênicos. Essa tarefa parte da apresentação em sequência de dois estímulos visuais – letras, por exemplo – ao sujeito, que deve pressionar um botão quando os estímulos apresentados forem iguais. O indivíduo pode responder corretamente, identificando a equivalência de estímulos, pode cometer um erro (apertar o botão quando os estímulos são diferentes) ou ainda omitir (não apertar nenhum botão após a apresentação do estímulo) (Bizarro et al. 2012). Através do número de omissões e a acurácia, ou seja, a porcentagem de respostas corretas emitidas pelo sujeito, tem-se uma medida de diversos processos cognitivos, como atenção e motivação. A adaptação da tarefa de performance contínua para roedores foi feita por Carli and Samanin (1992). A adaptação animal à tarefa consiste numa caixa operante com 5 aberturas na parede anterior equipadas com lâmpadas de *LED* e um alimentador na parede posterior. Ao detectar o estímulo luminoso aleatório em uma das aberturas e responder corretamente (inserindo o focinho na abertura em que a luz é emitida) o animal é então recompensado com um *pellet* de açúcar (Bizarro et al. 2012). Um amplo controle sobre as contingências comportamentais, coleta de dados acurada, automatizada e alto índice de confiabilidade legitimam a utilização desse paradigma e a qualidade dos dados coletados (Bari et al., 2008), além de fornecer informações robustas acerca do desempenho cognitivo do animal. Embora inúmeros argumentos apoiem a utilização da 5-CSRTT, publicações que tenham testado o modelo de HI neonatal nessa tarefa ainda são escassas.

Enquanto há dados sobre danos na memória espacial bem consistentes, mostrando que há prejuízos observáveis em animais submetidos ao protocolo de Levine-Rice, pouco se investigou se esses prejuízos se estendem à capacidade de reconhecimento de um objeto ou de outro roedor conspecífico. Thor and Holloway (1982) demonstraram que a quantidade de comportamentos sociais direcionados a animais desconhecidos pode ser utilizada para investigar a memória de reconhecimento social. Para isso, foram utilizados ratos maduros (residentes) que foram expostos a dois encontros de 5 minutos cada, com um mesmo rato

juvenil, com grupos alterando o intervalo entre as exposições. Quando o intervalo era menor de 40 minutos, os animais residentes diminuíram significativamente a emissão de comportamentos ao outro rato entre o primeiro e o segundo encontro. Num segundo experimento, investigou-se a interação entre animais familiares e não-familiares, com 2 exposições ao mesmo intruso ou a ratos diferentes. Os residentes apresentaram diminuição nos comportamentos sociais no segundo encontro, quando o intruso já era conhecido. A partir desse estudo (Thor & Holloway, 1982), outros autores passaram a utilizar esse paradigma intruso-residente para investigar a memória de reconhecimento social em roedores. Este tipo de metodologia utiliza apenas a tendência natural de investigar objetos ou indivíduos coespecíficos desconhecidos, o que é uma vantagem por independe de estímulos reforçadores ou punitivos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Diante disso, este trabalho pretendeu replicar os déficits da hipóxia-isquemia em ratos e traçar o perfil cognitivo e comportamental dos animais correlacionando-os ao dano estrutural a que foram submetidos, através da 5-CSRTT, tarefas de reconhecimento social e de objetos, e dos procedimentos de análise histológica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Através da 5-CSRTT, avaliar os danos promovidos pela HI na cognição dos animais, mais especificamente no que tange à aprendizagem, atenção e impulsividade.

2. Através das tarefa de Reconhecimento Social e da tarefa de Reconhecimento de Objetos, avaliar os danos promovidos pela HI na capacidade de discriminar animais coespecíficos e objetos.

3. Associar déficits cognitivos testados pela 5-CSRTT, do Reconhecimento Social e Reconhecimento de Objetos a danos estruturais no cérebro dos animais através de análise histológica, que irá priorizar áreas de interesse, ou seja, aquelas normalmente recrutadas para o bom desempenho na tarefa comportamental. Dessa forma, possibilitando a relação entre as áreas afetadas pelo procedimento experimental com o desempenho dos animais na tarefa.

3 MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados 22 ratos machos da linhagem Wistar alojados no Instituto de Ciências Básicas da Saúde, departamento de Ciências Morfológicas (ICBS- UFRGS) em ambiente ciclo claro/escuro, temperatura e umidade controladas. Esses animais foram mantidos em caixas de poliuretano com as seguintes medidas: 24 cm de largura, 38 cm de comprimento e 15 cm de altura, com cerca de quatro animais residindo por caixa. Ao sétimo dia pós-natal, os ratos foram submetidos a uma cirurgia hipóxico-isquêmica, (grupo HI, n = 11), ou cirurgia sham (grupo controle, n = 11) dependendo do grupo estabelecido aleatoriamente. Após o desmame, foram transportados para o Laboratório de Psicologia Experimental Neurociências e Comportamento LPNeC-UFRGS, e agrupados em caixas com 2 ratos, em estantes climatizadas, com ciclos claro/escuro de 12h, temperatura mantida entre 20-22°C e umidade relativa do ar entre 40-60%. O projeto foi submetido à análise do Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade (CEUA – UFRGS) e aprovado (Nº 24030). Um cronograma dos eventos pode ser observado na Figura 1.

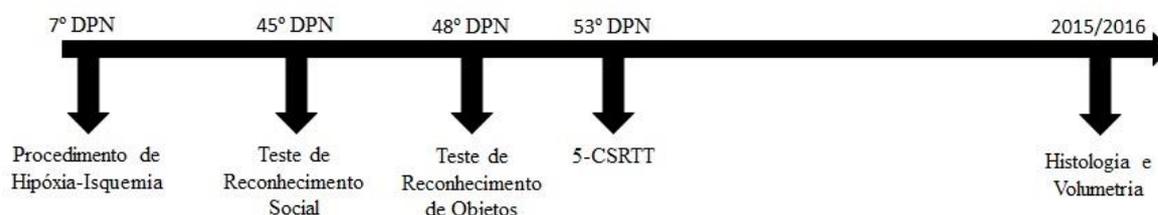


Figura 1 - Esquema demonstrando os eventos ocorridos neste estudo cronologicamente. Nota: DPN = Dias pós-natal

3.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL DE HIPÓXIA-ISQUEMIA ENCEFÁLICA

Este procedimento foi baseado no modelo de hipóxia-isquemia neonatal proposto por Levine (1960) e mais tarde modificado por Rice, Vannucci, and Brierley (1981). O modelo consiste na oclusão permanente da artéria carótida comum esquerda, seguida por uma exposição a ambiente hipóxico, produzindo uma lesão cerebral unilateral em ratos recém-nascidos. Ao 7º dia pós-natal, os animais designados como HI foram anestesiados com halotano (2-4%), e a artéria carótida comum direita foi ocluída com acesso através da superfície ventral do pescoço

do animal. Por volta de 2 a 3h após a cirurgia, os filhotes foram expostos a uma câmara com ambiente hipóxico (8% de oxigênio e 92% de nitrogênio, com fluxo de 5L/min), imersa em banho-maria para controle da temperatura a 37°C, por 90 min em grupo de 5 animais. Quanto aos animais do grupo *Sham*, estes receberam anestesia e incisão no pescoço. No entanto, a artéria comum não foi ocluída e não houve exposição a ambiente hipóxico. A Fig.2 ilustra esse processo. Acabados os procedimentos, os animais retornaram aos cuidados maternos, permanecendo em suas caixas moradias até o desmame, no 21º dia pós-natal.

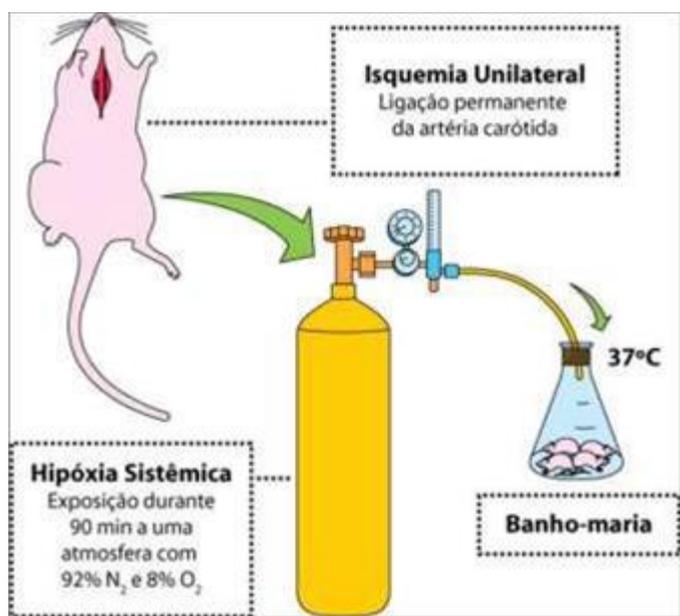


Figura 2: Procedimento de hipóxia-isquemia encefálica de Levine-Rice

Nota: Adaptado de Rice et al. (1981)

3.3 TAREFA DE INTERAÇÃO SOCIAL E RECONHECIMENTO SOCIAL

Ao 45º dia pós-natal, os animais iniciaram a tarefa de interação social, baseada no experimento de Engelmann, Wotjak, and Landgraf (1995) e modificado por Marin et al. (2008). Para esta tarefa, os animais foram postos em um campo aberto, onde se avaliou a interação social e a capacidade de reconhecimento social. A técnica toma como vantagem a capacidade olfatória discriminatória do roedor e o seu interesse em investigar animais de mesma espécie, ambos inatos ao animal. O experimento consiste na exposição do animal avaliado a dois animais desconhecidos, com idades e pesos semelhantes, durante 5 minutos. Em seguida, o animal experimental é mantido em isolamento em outra caixa, e após 30 minutos, retorna ao campo

aberto. Neste segundo momento no campo aberto, o animal se depara com dois animais, sendo um deles já presente no primeiro encontro (intruso familiar) e um animal novo (intruso não-familiar) por 10 minutos. Foram mensuradas, os seguintes comportamentos sociais: cheirar, cheirar áreas genitais, seguir, montar e colocar-se embaixo; e não-sociais: *self-grooming* e *rearing*, durante ambos os encontros. A comparação dos comportamentos direcionados aos intrusos familiar e não-familiar, no segundo encontro, permitiu avaliar a memória de reconhecimento dos animais. Ainda, a análise posterior de comportamentos conforme sua categoria, possibilitou verificar alterações na interação social entre os grupos pesquisados. Para a análise da tarefa de reconhecimento social também foi calculado um índice de reconhecimento expresso pela seguinte razão $SNF/(SNF+SF)$ [SNF = total de comportamentos sociais dirigidos ao animal não-familiar; SF = total de comportamentos sociais dirigidos ao animal familiar (Marin et al., 2008)]. Abaixo, pode-se observar um esquema da tarefa na figura 3.

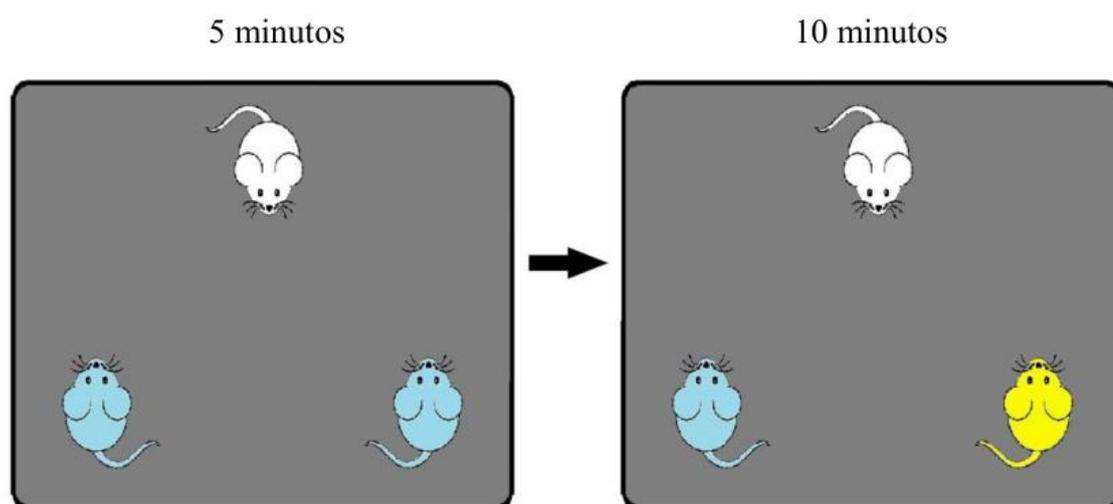


Figura 3. Ilustração do teste de reconhecimento social.

Nota: À esquerda, o primeiro encontro com dois animais desconhecidos por 5 minutos, passados 30 minutos de intervalo o segundo encontro com o intruso familiar e o intruso não familiar, por 10 minutos. Adaptado de Marin et al. (2008).

3.4 TAREFA DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS

Neste estudo, foi utilizado o protocolo de reconhecimento de objetos de Bevins and Besheer (2006). Neste protocolo os animais aos 48 dias pós-natal foram colocados no campo

aberto individualmente, onde puderam interagir com dois objetos iguais (A1 e A2) durante 5 minutos. Após um intervalo de uma hora, eles eram retornados ao campo aberto, contendo um dos objetos já conhecido previamente no primeiro encontro e um objeto novo (A1 e B1), com os quais eles puderam investigar os objetos por mais 5 minutos. O índice de reconhecimento foi obtido através da comparação do tempo que o animal passou interagindo com os objetos. A fim de averiguar o reconhecimento de objetos, calculou-se um índice de reconhecimento expresso através da razão $TN/(TF+TN)$ [TF= tempo de exploração do objeto familiar (A2) na primeira sessão; TN= tempo de exploração do objeto novo (B) na segunda sessão](Bevins & Besheer, 2006)Um esquema pode ser visualizado na Figura 4.

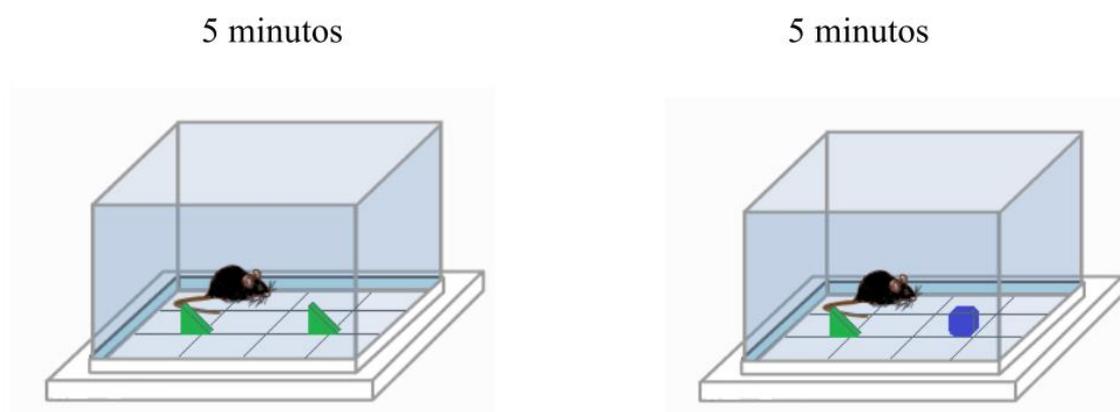


Figura 4. Ilustração da tarefa de reconhecimento de objetos

Nota: À esquerda a primeira sessão com dois objetos idênticos (A1 e A2); à direita a segunda sessão na qual o objeto A2 é trocado pelo objeto desconhecido B. Adaptado de Bevins and Besheer (2006)

Todos os objetos foram limpos entre as sessões com uma solução de etanol 70%. A partir das gravações, registrou-se o tempo gasto nas explorações dos objetos durante as sessões. Os vídeos foram distribuídos aleatoriamente entre dois observadores treinados, cegos em relação à condição experimental do animal. Em seguida, 5 vídeos aleatórios foram analisados por um juiz, também desconhecendo o grupo a qual o animal pertencia. O critério para a aceitação das análises dos vídeos foi de 75% de concordância entre os observadores.

3.5 TAREFA DE TEMPO DE REAÇÃO SERIAL DE CINCO ESCOLHAS (5-CSRTT)

Para uma melhor descrição, esta sessão subdivide-se em Aparato, Habituação, Treinamento e Manipulação.

3.5.1 Aparato

Para a execução desta tarefa, foram usadas oito caixas operantes de alumínio, com medidas 25cmX25cmX25cm (*Med Associates St. Albans, Vermont, USA*). O equipamento possui 5 entradas quadradas de 2,5cm para a resposta dos animais em uma parede lateral curvadas a 5cm do chão e com distância de 5cm entre cada entrada. Na parede oposta, há um alimentador de *pellets* de sacarose 45mg (*Biosery, USA*). O equipamento foi alojado em uma caixa ventilada a prova de som, a fim de evitar estressores. As entradas e o alimentador possuem lâmpada de iluminação e sensor infravermelho, utilizado para detecção de respostas. O software MED-PC (*Med Associates Inc., St. Albans, Vermont, USA*) foi utilizado para o controle e registro das respostas por computador.

O protocolo escolhido para esta etapa do estudo foi aquele utilizado por Carli et al (1992). Dentro da caixa operante, os animais deparam-se a dois painéis, um deles com apenas um orifício, conectado ao alimentador que libera *pellets* de açúcar de acordo com a resposta do animal ao teste, e o outro contendo as aberturas em que o animal responde posicionando o focinho dentro. No decorrer da tarefa, analisa-se o desempenho através dos seguintes quesitos: respostas corretas, respostas incorretas, respostas prematuras, respostas perseverativas e omissões, que podem indicar déficit na atenção ou presença de comportamento impulsivo dentre outros prejuízos (Robbins, 2002). Uma ilustração da caixa operante pode ser observada na Figura 5.

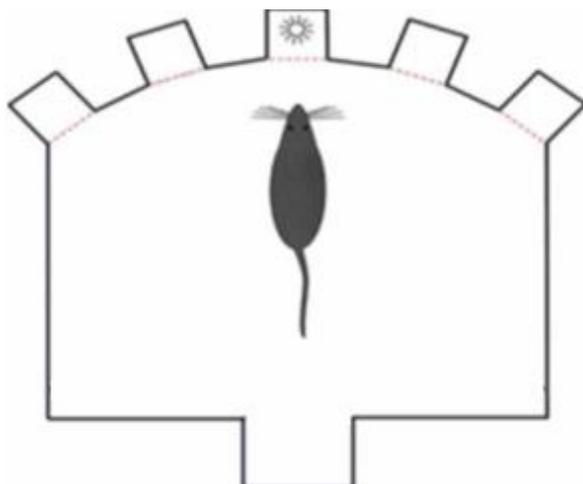


Figura 5. Arranjo espacial da caixa de 5-CSRTT.

Em frente ao animal estão localizadas as cinco aberturas e atrás o alimentador onde são dispensados os pellets de açúcar.

Nota: Adaptado de “The application of the 5-choice serial reaction time task for the assessment of visual attentional processes and impulse control in rats” (Bari, Dalley, & Robbins, 2008)

3.5.2 Habituação

Foi iniciada uma restrição alimentar 15 dias antes do início da habituação na tarefa. No primeiro dia de restrição, a oferta de alimento foi reduzida a 17g/ dia para cada animal até que eles atingissem 85% do peso esperado para a sua idade. O peso esperado foi calculado comparando o peso dos animais da tarefa a outros que não seguiam essa mesma restrição. Para tanto, foram mantidos animais controle com livre acesso à ração, com a mesma idade e mantidos nas mesmas condições de alojamento. Em uma semana, o peso dos animais experimentais encontrava-se no patamar desejado ($\approx 85\text{-}90\%$ do peso dos ratos controle).

Ao atingirem o peso esperado, foi iniciada a habituação dos animais ao aparato da 5-CSRTT. A habituação também seguiu o protocolo de Bari et al. (2008), com variações devidas a especificidade do projeto. Por exemplo, os animais já vinham sendo manuseados há algumas semanas, não necessitando essa habituação aos experimentadores descritas no protocolo.

A habituação ocorreu da seguinte forma: durante 4 dias consecutivos, os ratos foram alojados na caixa da 5-CSRTT. Foram colocados dois *pellets* de açúcar em cada uma das cinco aberturas e em torno de 10 *pellets* foram postos no alimentador. As luzes da caixa eram acesas, e o animal permanecia na caixa por 20 minutos para que coletasse os *pellets* de açúcar.

3.5.3 Treinamento

Cada sessão diária de treinamento durava 100 tentativas, com limite máximo de 30 minutos para o animal realizá-las, o que ocorresse primeiro. As sessões eram realizadas 5 vezes por semana. Desta vez, os *pellets* não eram disponibilizados nos orifícios do aparato. O animal, então deveria responder a um estímulo luminoso apresentado aleatoriamente em um dos cinco pequenos orifícios da caixa para consegui-los, posicionando seu focinho no orifício iluminado (*nose-poke*). A cada resposta correta, o animal era recompensado com um *pellet* no alimentador. Nesta fase de treinamento, os parâmetros utilizados foram os seguintes: duração do estímulo (SD) — tempo em que a luz do orifício mantinha-se acesa — de 30 segundos; *limited hold* (LH) — tempo disponível ao animal para responder após apresentação do estímulo — de 30 segundos; intervalo entre tentativas (ITI) — período de tempo que antecede o novo estímulo — de 5 segundos. Para o animal passar para o próximo estágio, ele deve apresentar um mínimo de 80% de acurácia ($\frac{\text{Respostas corretas}}{\text{Respostas corretas} + \text{incorretas}} \times 100$) e taxa de omissões inferiores a 20% em três sessões consecutivas. A cada novo estágio, a SD era reduzida gradualmente e o LH aumentado, o que representa a passagem a um novo estágio do treinamento da tarefa.

Se as respostas do animal fossem incorretas (aquelas em que o animal punha o focinho em um orifício não-iluminado), antecipatórias ou prematuras (quando o animal respondia antes da apresentação do estímulo) ou omissões (o animal não respondia ao estímulo), seguia-se um período de 5 segundos em que todas as luzes do aparato eram desligadas como forma punitiva. Respostas perseverativas (quando o animal insistia em um mesmo orifício) foram registradas, mas não puniam o animal. Na tabela 1 é possível observar os parâmetros avaliados pela 5-CSRTT, e os respectivos construtos.

Tabela 1. Construtos avaliados pela 5-CSRTT e a forma como são aferidos

Construtos avaliados	Variáveis correspondentes	Forma de coleta dos dados na 5-CSRTT
Desempenho Cognitivo	Aquisição da Tarefa	Nº de sessões necessárias para chegar ao último estágio e média de sessões em cada estágio
Atenção	Acurácia	Porcentagem de respostas corretas $\times 100 / (n^\circ \text{ de corretas} + \text{incorretas})$
Atenção/Motivação	Omissões	Porcentagem de respostas não realizadas
Impulsividade e Controle Inibitório	Prematuras	Respostas realizadas antes da aparição do estímulo, durante o ITI
Compulsividade	Perseverativas	Respostas persistentes em qualquer orifício após a apresentação da recompensa
Motivação/Velocidade de processamento	Latência	Tempo que o animal leva para responder ao estímulo luminoso e para coletar o pellet no alimentador
Medidas Auxiliares	Tempo e nº de <i>Trials</i>	Tempo necessário para completar os 100 trials e quantidade de trials realizados em cada sessão de treinamento

Tabela 1- Construtos avaliados pela 5-CSRTT e a forma como são aferidos. Nota: Adaptado de Bari, Dalley, & Robbins, (2008)

As sessões da 5-CSRTT foram realizadas de segunda a sexta, no turno da tarde (entre 13h e 17h) por 22 semanas. Ao adquirirem desempenho estável com os parâmetros (SD com duração de 1 segundo e ITI igual a 5 segundos), as dez últimas sessões foram usadas como linha de base e os ratos passaram a um novo estágio do processo, onde manipulava-se SD e ITI.

3.5.4 Manipulação

As manipulações tiveram como objetivo um aumento na demanda atencional, já que o animal respondia com parâmetros diferentes do habituado durante as semanas prévias.

A quantidade de respostas perseverativas pode proporcionar indícios de comportamento repetitivo e estereotipado, enquanto que o número de sessões que o animal leva para progredir para estágios mais avançados da tarefa durante o treino indica aprendizado do animal. A latência de resposta nos indica a velocidade de processamento, e a latência para coletar o *pellet*, a motivação do animal pela tarefa. Esses parâmetros foram analisados para comparar o desempenho entre animais que sofreram a hipóxia-isquemia neonatal e dos animais controles.

Essas manipulações ocorreram em quatro sessões de teste para cada animal, realizadas duas vezes por semana, às terças e quinta-feiras. Seguem os parâmetros delas (tabela 2):

Tabela 2 – Manipulações dos Parâmetros

Manipulação	Tempo de SD (em segundos)	Tempo de ITI (em segundos)
A	5	0,5
B	7	1
C	5	1
D	2	1

É importante mencionar que os animais passaram às sessões de teste (com manipulação) logo após atingirem desempenho estável no sétimo e último estágio. No entanto, nove animais do grupo experimental não foram capazes de atingir a linha de base, em outras palavras, não obtiveram mínimo de 80% de acurácia e omissões inferiores a 20%. Dessa forma, os requisitos foram flexibilidade para mínimo de 65% de acurácia e máximo de 20% de omissões. Ainda assim, quatro dentre esses nove animais não alcançaram desempenho estável com esses parâmetros, sendo então mantidos na última etapa de treinamento por, no mínimo, dez dias para que atingissem estabilidade na linha de base para enfim serem avaliados pelos testes manipulados.

3.6 ANÁLISES HISTOLÓGICA E VOLUMÉTRICA

Depois de finalizados os testes, os animais foram transportados para o Departamento de Ciências Morfológicas (ICBS- UFRGS) em suas caixas moradia, em veículo climatizado. Cortes dos encéfalos dos animais foram submetidos aos protocolos histológicos consolidados e realizados em estudos prévios (Derksen, Ward, Hartle, & Ivanco, 2007; Gharbawie, Gonzalez, & Whishaw, 2005; MacLellan et al., 2006). Para isso, os animais foram anestesiados com xilazina e quetamina (30% 10mL/Kg) por via intra-peritoneal, sendo realizado, posteriormente, a toracotomia com exposição do coração. A seguir, foram injetados 1000 UI de heparina sódica (Cristália) no ventrículo esquerdo e por meio de incisão neste mesmo ventrículo foi inserida uma cânula ligada a uma bomba de perfusão (*Control Company*). Após uma segunda incisão, desta vez no átrio direito, foi perfundida, primeiramente, solução salina (150mL), para lavagem da árvore vascular e posteriormente, solução fixadora (200mL) composta de paraformaldeído (PFA) 4% diluído em tampão fosfato (TF) 0,1 M pH 7,4. Após este procedimento, os encéfalos foram retirados por meio da abertura da calota craniana, sendo pós-fixados na mesma solução fixadora utilizada para a perfusão por mais 4h à temperatura ambiente. Posteriormente, os encéfalos foram crioprottegidos pela imersão em sacarose 30% diluídas em TF a 4°C, onde permaneceram até submersão. Depois de realizada a crioproteção, os encéfalos foram congelados em isopentano resfriado em nitrogênio líquido a -80° C até a realização das análises histológicas.

Para a análise dos danos cerebrais causados pela hipóxia-isquemia, foram elaboradas lâminas histológicas a partir dos cérebros dos animais. 17 cérebros (8 do grupo HI e 9 do grupo *Sham*) foram fatiados em criostato Microm HM505E (*Thermo Fisher*), que mantinha os cérebros congelados a $\approx -23^{\circ}$ C durante o processo. Cada corte possuía 50 μ m de espessura e com espaçamento de 300 μ m entre os cortes utilizados, compreendidos entre as coordenadas do bregma entre 5mm e -6mm ântero-posterior, onde são encontradas as estruturas de maior interesse, principalmente: córtex frontal (coordenadas do bregma entre 5 e -2 mm ântero-posterior), hipocampo (coordenadas do bregma entre -1e -6 mm ântero-posterior) e estriado (coordenadas do bregma entre 2 e -4 mm ântero-posterior) (Paxinos & Watson, 2007). As fatias foram capturadas em lâminas histológicas gelatinizadas, coloridas com Hematoxilina e Eosina-Y, fixadas em etanol, e mais tarde escaneadas a 1200 dpi (HP Photosmart 3160 All-in-one).

Para a análise do volume de cada estrutura e do volume total dos cortes, primeiramente foi utilizado o software ImageJ (Scion Corporation, Frederick, MD, USA), que calcula a área

através do número de pixels de uma certa delimitação na imagem. Depois foi utilizado o método Cavalieri (Porzionato et al., 2015), que parte do princípio de que, com a soma das áreas de todos os cortes multiplicada pelo intervalo entre os cortes (300 μ m), é possível estimar o volume.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Nos experimentos da 5-CSRTT, foi utilizada ANOVA (*General Linear Model*) para avaliar os efeitos principais de grupo, das manipulações e a interação entre grupo e manipulações para cada variável. O número de sessões necessárias para adquirir o estágio subsequente (aquisição da tarefa) também foi medido através de ANOVA. A correção de Greenhouse-Geisser foi utilizada quando o pressuposto de esfericidade foi violado.

Nas comparações histológicas e nas tarefas de reconhecimento, a comparação foi realizada através do teste *t* de Student. Para as correlações estatísticas, fez-se uso do Coeficiente de Correlação de Pearson.

Somente os testes de nível com significância de 0,05 ou inferior foram considerados para as hipóteses. Os dados são apresentados no formato : Média \pm Desvio Padrão. Em todas as tarefas, foram utilizados testes para verificar a normalidade dos dados. O *software* utilizado para os cálculos foi o IBM SPSS Statistics, versão 21.

4 RESULTADOS

4.1 RECONHECIMENTO SOCIAL

Enquanto não foi encontrada preferência de interação com o animal não-familiar pelos animais do grupo HI, essa preferência foi encontrada nos animais *Sham* (Fig 6).

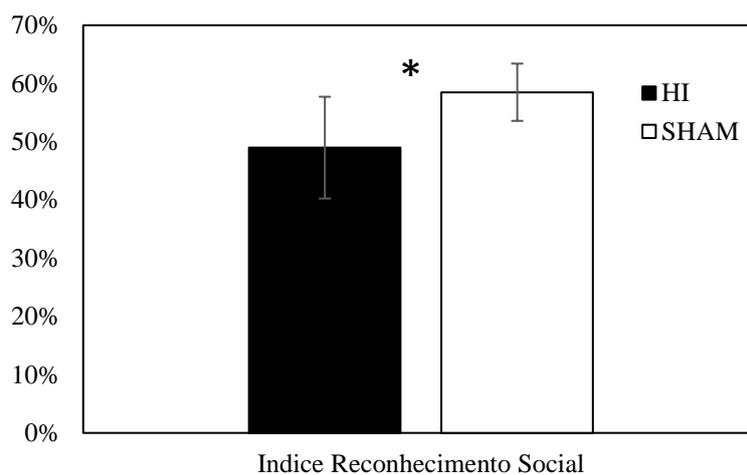


Figura 6. Índice de Reconhecimento Social.

*Diferença significativa, $t(1,20) = -3,148$, $p = 0,005$

4.2 RECONHECIMENTO DE OBJETOS

Na tarefa de reconhecimento de objetos, também houve um desempenho inferior dos animais HI, porém não houve diferença ($t(1,20) = -1,366$, $p = 0,187$). Em média, o índice de reconhecimento (tempo destinado ao objeto B em relação ao tempo total de investigação de ambos objetos) do grupo HI foi de 38,97% ± 15,36%. Em contrapartida o tempo médio do grupo *Sham* foi de 46,5% ± 9,89% (Figura 7).

Além disso, os animais do grupo HI obtiveram um percentual de investigação de objetos (tempo destinado à investigação) menor que os animais controle (HI – média 16,77% ± 5,82%; *Sham* – média 26,30% ± 9,15%). Essa diferença manteve-se significativa para os dois objetos analisados (Figura 8).

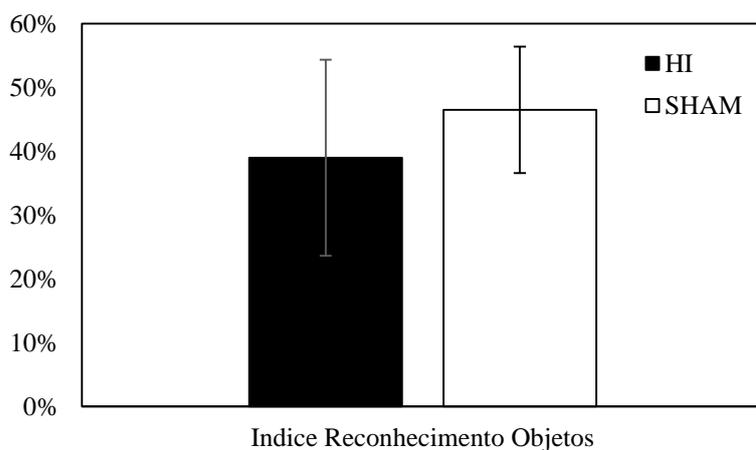
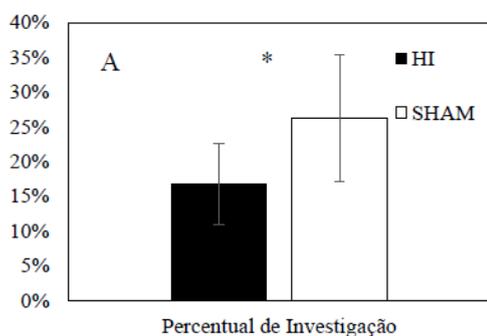


Figura 7. Resultado do teste de reconhecimento de objetos.

$t(1,20) = -1,366, p = 0,187$

A



B

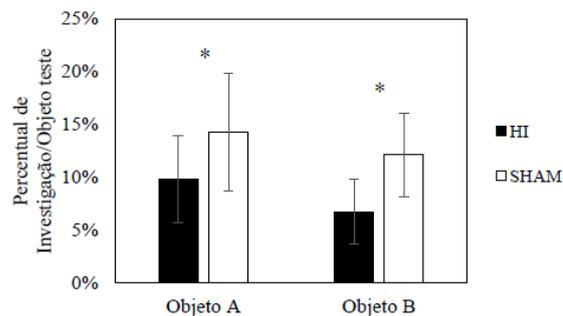


Figura 8. Percentual de Investigação

Nota: Gráfico A ilustra a diferença entre s grupos na investigação dos objetos. O gráfico B mostra que o índice de investigação dos animais do grupo HI foi menor para os dois objetos testados. Média HI: Objeto A $9,85\% \pm 4,13\%$, Objeto B $6,75\% \pm 3,10$; Média SHAM: Objeto A $14,33\% \pm 5,56$, Objeto B $12,14\% \pm 3,96\%$. * Diferenças foram significativas, $t(1,20) = -2,913, p = 0,009$ ** $t(1,20) = -2,150, p = 0,044$ *** $t(1,20) = -3,551, p = 0,002$

4.3 RESULTADOS DA 5-CSRTT

Os dados relatados a seguir tiveram efeito principal de grupo:

4.3.1 Aquisição da tarefa

No que diz respeito à aquisição da tarefa, observou-se um efeito principal de grupo, em outras palavras, os grupos diferiram quanto ao número de sessões necessárias para avançar de estágio $F(1,20) = 14,89, p = 0,001$. Esse efeito foi expressivo, especialmente, nos primeiros estágios: nesses, os animais HI precisaram de muito mais treinamento para conseguir atingir os critérios necessários para a progressão na tarefa (Fig. 9). Ainda, foi observado efeito do estágio da tarefa, ou seja, dependendo do estágio os animais tiveram mais dificuldade em avançar no treinamento $F(2,8; 57) = 6,14, p = 0,001$. Todavia a interação entre grupo e número de sessões por estágio não foi significativa $F(2,8; 57) = 1,88, p = 0,146$.

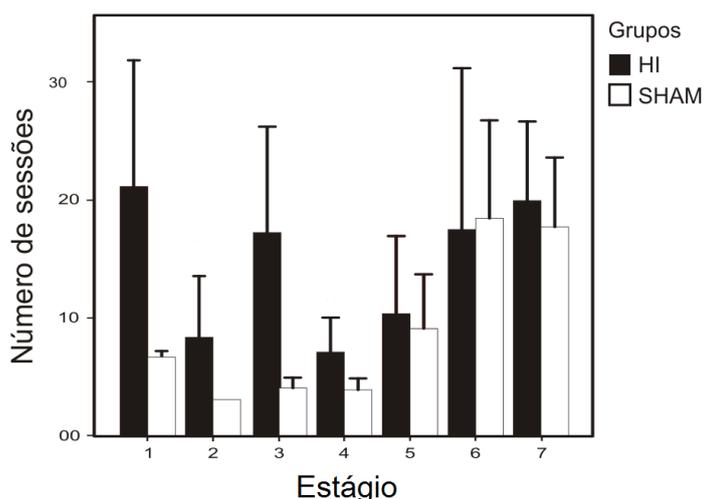


Figura 9: Número médio de sessões por estágio.

Nota: São demonstradas a média e erro padrão do número de sessões necessárias para atingir os critérios desejados em cada estágio da tarefa. Colunas brancas representam o grupo *SHAM* e barras pretas o grupo HI.

4.3.2 Acurácia

Quanto à acurácia, efeito principal de grupo indicou que a acurácia foi menor no grupo HI, se comparados ao grupo *Sham*, ($F(1,20) = 15,47, p = 0,001$) (Fig. 10A). O efeito principal da manipulação apontou que a alteração de parâmetros, como esperado, modificou a acurácia, sobretudo na manipulação A, que conta com redução da duração do estímulo de 1 segundo para 0.5 segundos. Tal efeito também foi encontrado na manipulação D, na qual o ITI foi diminuído,

de 5 para 2 segundos, ($F(4,80) = 39,27, p < 0,001$). Não houve interação entre os fatores manipulações e grupo para esta variável, ($F(4,80) = 1,62, p = 0,176$).

4.3.3 Prematuras

Quando comparado ao grupo *Sham*, o grupo HI teve uma maior média de respostas prematuras em todas as condições, como indicou o efeito principal de grupo ($F(1,20) = 5,35, p = 0,031$) (Fig 10B). O efeito principal da manipulação dos parâmetros mostrou que a alteração dos mesmos modifica o número de respostas antecipatórias. Um aumento do número desse tipo de resposta foi observado tanto na manipulação A, quando reduz-se SD, como na manipulação B, quando o ITI é acrescido em 2 segundos. Contudo, as prematuras diminuíram quando a duração do estímulo também diminuía, o que ocorre na manipulação D ($F(2,5; 51) = 8,73, p < 0,001$). Não foi observada interação entre as manipulações e o grupo ($F(2,5; 51) = 0,97, p = 0,39$).

4.3.4 Latência de recompensa

O efeito principal de grupo indicou diferença para a variável latência de recompensa. O grupo HI obteve uma latência maior para coletar a recompensa em todas as condições quando comparado ao grupo *Sham* ($F(1,20) = 12,48, p = 0,002$) (Fig. 10G). Em contrapartida, o efeito principal de manipulação não se mostrou significativo para esta variável ($F(1,4; 29) = 0,82, p = 0,413$), dessa forma, os grupos são diferentes não importando a manipulação a que foram expostos. Por fim, não houve interação significativa entre grupo e manipulação ($F(1,4; 29) = 1,30, p = 0,278$).

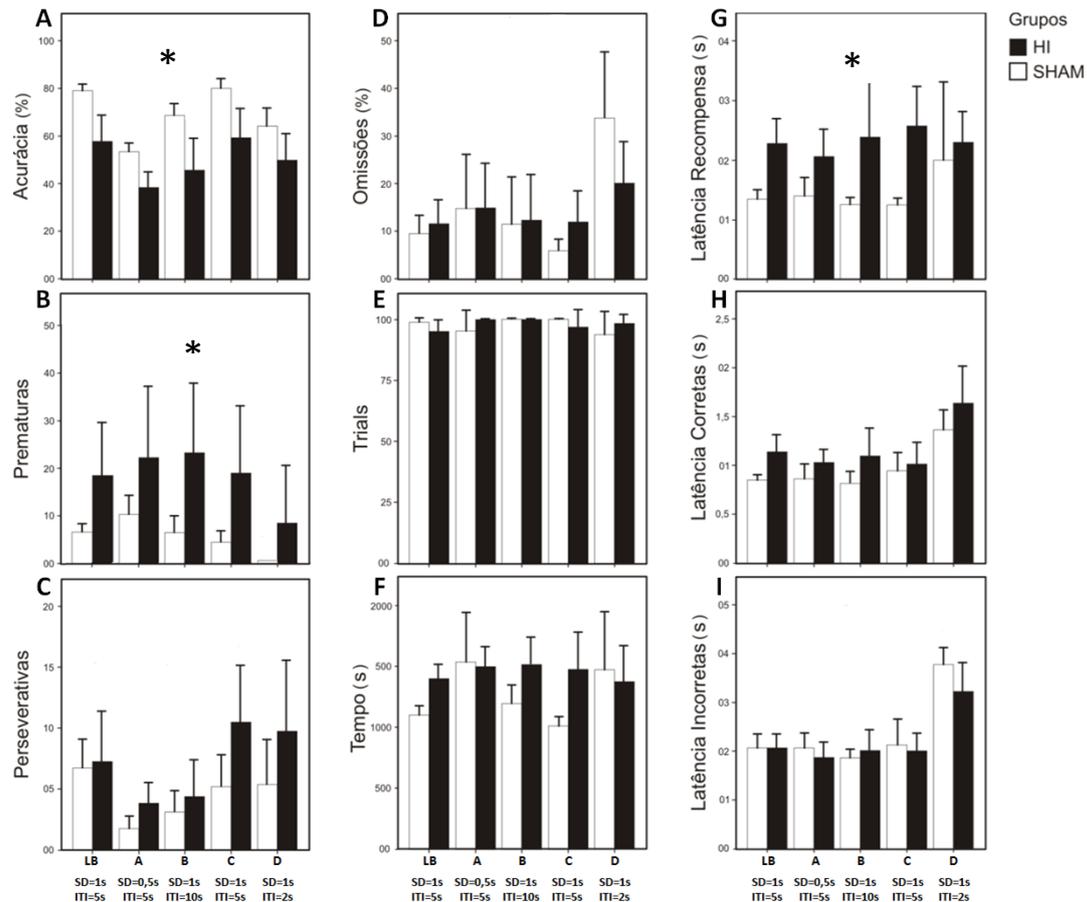


Figura 10 : Desempenho nas sessões de teste.

Nota: São demonstrados em média e erro padrão da média todos os parâmetros comportamentais avaliados para ambos os grupos, HI (colunas pretas) e SHAM (colunas brancas). Da esquerda para a direita: Linha de base, LB (média das dez últimas sessões), com os parâmetros SD = 1s e ITI = 5s. Manipulação A (diminuição da duração do estímulo), SD = 0,5s e ITI = 5s. Manipulação B (aumento do intervalo entre tentativas), SD = 1s e ITI = 7s. Manipulação C, (manipulação controle, mesmos parâmetros da linha de base). Manipulação D (diminuição do intervalo entre tentativas), SD = 1 e ITI = 2s. O efeito principal de grupo foi significativo nas variáveis: acurácia, prematuras, latência de respostas corretas e latência de recompensa. O efeito principal de manipulação foi encontrado em todas as variáveis analisadas exceto no tempo, trials e latência de recompensa. Interação entre grupo e manipulação foi observada somente na variável omissões.

4.4 HISTOLOGIA E VOLUMETRIA

De uma forma geral, a lesão pretendida com hipóxia-isquemia foi alcançada, como pode-se perceber na figura 11. Apesar do volume total do cérebro dos animais não ter sido significativo entre os grupos ($t(15)=1.88$ $p<0.88$), houve uma diferença significativa no volume do lado direito (lado lesado) de estruturas de interesse : córtex frontal direito ($t(15)=3.43$ $p<0.004$); estriado direito ($t(15)=2.79$ $p<0.016$) ; hipocampo direito ($t(15)=2.66$ $p<0.018$). Em

relação às estruturas contralaterais, não foi observada diferença estatística : Córtex frontal esquerdo ($t(15)=1.10$ $p<0.28$); estriado esquerdo ($t(15)=-1.18$ $p<0.264$); hipocampo esquerdo ($t(15)=0.34$ $p<0.44$). Ao considerar as estruturas de forma inteira, isto é, sem dividi-las em hemisférios, obteve-se diferença somente no córtex frontal ($t(15)=2.65$ $p<0.018$), devido à lesão acentuada no córtex frontal direito dos animais HI. Essas informações podem ser vistas nas Figuras 12 a 15.

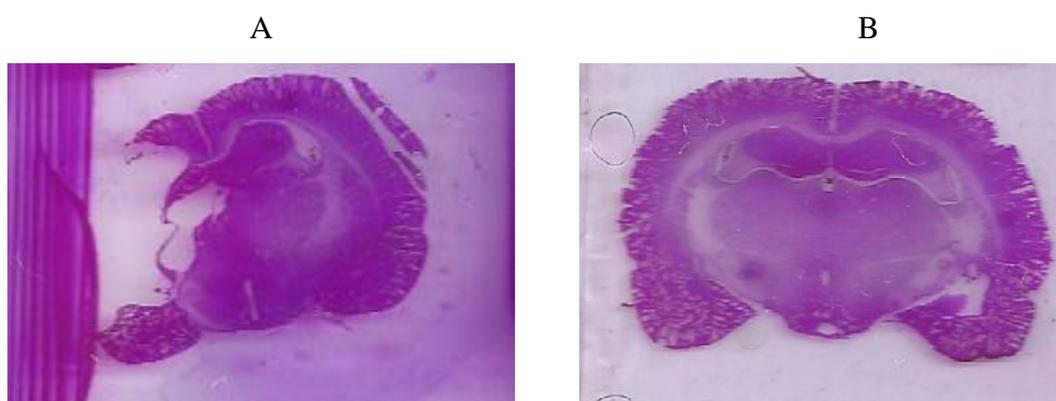


Figura 11. Imagens da histologia

Nota: À esquerda, na figura 11A, uma fatia do cérebro de um animal do grupo HI e à direita, figura 11B, uma fatia do cérebro de um animal do grupo *Sham*, ambos a 3,24 mm anteriores ao bregma.

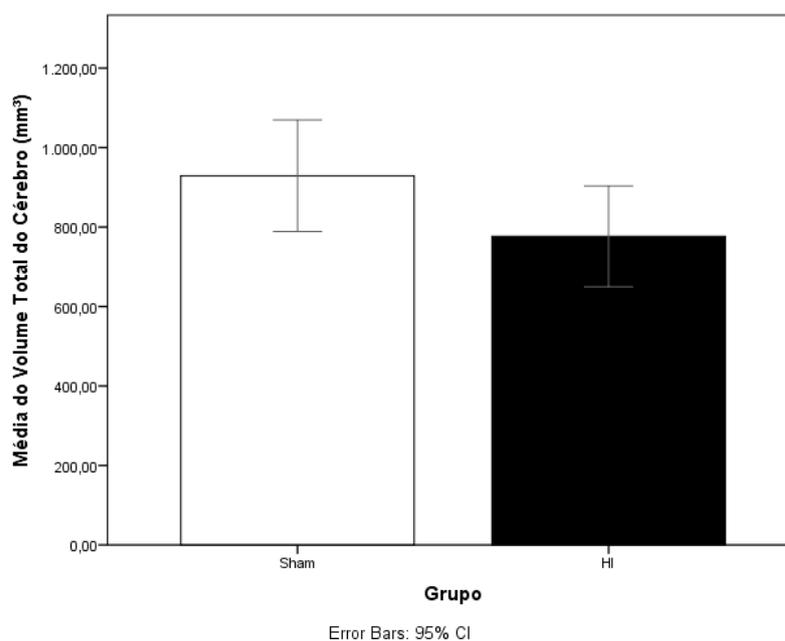


Figura 12. Comparação da média dos volumes totais das áreas cortadas dos cérebros entre os grupos HI e *Sham*, a qual sem diferença significativa $t(15)=1.88$ $p<0.88$

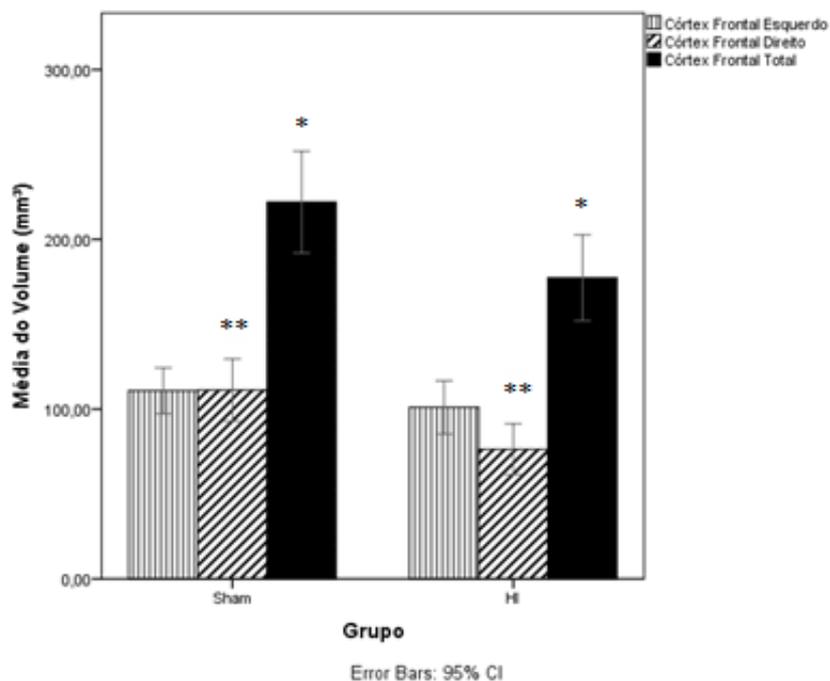


Figura 13. Comparação do volume do córtex frontal (total e dividido em hemisférios) entre os grupos estudados. Houve diferença estatística no córtex frontal direito entre os grupos $t(15)=3.43$ $p<0.004$ e no córtex de forma total. * - $p<0,05$ ** - $p<0,01$

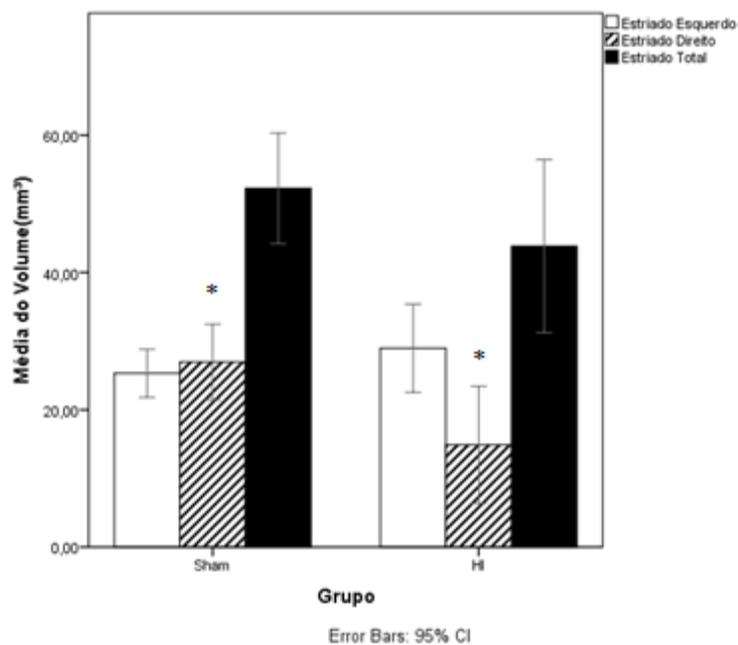


Figura 14. Comparação do volume do estriado (total e dividido em hemisférios) entre os grupos estudados.

Nota: Houve diferença estatística no estriado direito entre os grupos $t(15)=2.79 p<0.016$. * - $p<0,05$

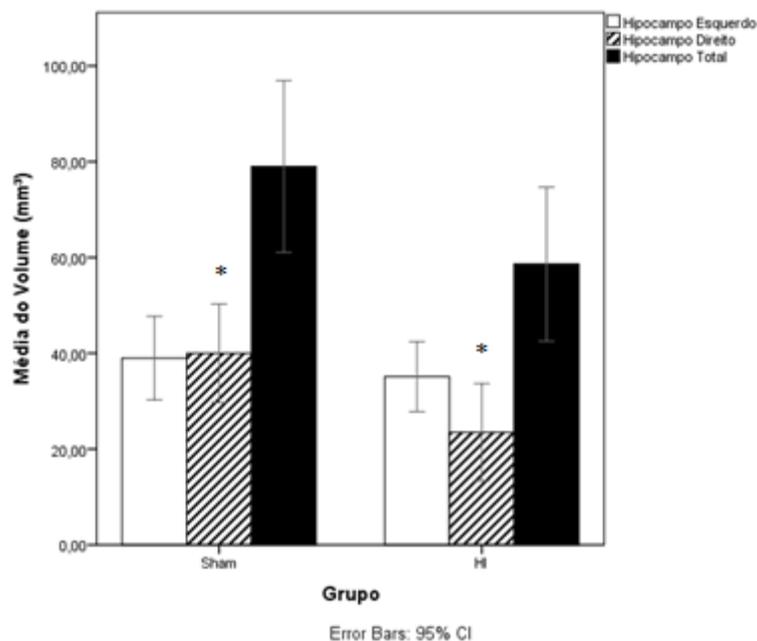


Figura 15. Comparação do volume do hipocampo (total e dividido em hemisférios) entre os grupos estudados. Houve diferença estatística no hipocampo direito entre os grupos $t(15)=2.66 p<0.018$. * - $p<0,05$

Ao parearmos os volumes das estruturas cerebrais lesadas ao Índice de Reconhecimento Social, houve uma correlação significativa entre volume do córtex frontal direito ($r=0,511$ $n=17$ $p=0,036$), estrutura com já diferença entre os grupos. Quanto ao reconhecimento de objetos, não houve interação significativa entre as estruturas e o desempenho dos animais a esta tarefa. Ademais, não foi observada correlação entre o número de cruzamentos e o volume de qualquer estrutura de interesse.

Em relação aos dados oriundos da 5-CSRTT, houve diversas correlações estatísticas. As respostas prematuras correlacionaram-se negativamente ao volume do cérebro total dos animais ($r=-0,684$ $n=17$ $p=0,002$), do córtex frontal direito ($r=-0,551$ $n=17$ $p=0,022$), do córtex frontal total ($r=-0,542$ $n=17$ $p=0,025$), do hipocampo ($r=-0,565$ $n=17$ $p=0,018$) e do estriado de forma global, tanto inteiro quanto separado em hemisférios ($r=-0,490$ $n=17$ $p=0,046$), ($r=-0,720$ $n=17$ $p=0,001$), ($r=-0,809$ $n=17$ $p=0,000$), estriado esquerdo, direito e total, respectivamente.

O número de sessões relacionou-se negativamente ao volume do córtex frontal direito ($r=-0,544$ $n=17$ $p=0,024$), ao córtex frontal inteiro ($r=-0,499$ $n=17$ $p=0,041$) e ao estriado direito ($r=-0,563$ $n=17$ $p=0,019$).

Já a acurácia, essa relacionou-se linearmente ao volume do cérebro total dos animais ($r=0,618$ $n=17$ $p=0,008$), do córtex frontal direito ($r=0,653$ $n=17$ $p=0,005$), do córtex frontal total ($r=0,571$ $n=17$ $p=0,017$), do estriado direito ($r=0,728$ $n=17$ $p=0,001$), do estriado total ($r=0,665$ $n=17$ $p=0,004$), do hipocampo direito ($r=0,593$ $n=17$ $p=0,012$) e do hipocampo total ($r=0,482$ $n=17$ $p=0,050$).

5 DISCUSSÃO

Este trabalho encontrou evidência de que a hipóxia-isquemia neonatal afeta diversos aspectos do comportamento dos animais. Os ratos submetidos à hipóxia-isquemia tiveram menor capacidade de reconhecimento social, entretanto o reconhecimento de objetos não foi afetado; tiveram déficits na aquisição da tarefa, e tiveram uma performance mais pobre na 5-CSRTT, com menor acurácia, maior número de respostas prematuras e maior latência para coleta da recompensa no alimentador. A lesão não só tornou estruturas cerebrais menores, bem como atingiu de forma abrangente diversas estruturas do hemisfério direito, destacando-se o córtex frontal, hipocampo e estriado, demonstrada nas tarefas comportamentais e confirmada na histologia.

A hipóxia-isquemia vem sendo utilizada em diversos trabalhos, com diversos resultados sobre os danos a que esse procedimento pode levar. Danos de memória espacial, por exemplo, foram observadas por Paula et al. (2009) e Arteni et al. (2010). Arteni et al. (2010) encontraram inclusive hiperatividade locomotora nos animais, dados que também corroboram com o estudo de Smith, Schmidt-Kastner, McGeary, Kaczorowski, and Knopik (2016), que indicou uma maior vulnerabilidade para TDAH (transtorno do déficit de atenção e hiperatividade) em animais HI. Por outro lado, Miguel et al. (2015), verificaram impulsividade, compulsividade, déficits em atenção, o que pode sugerir base etiológica similar para TDAH. Já, Bellot et al. (2014) encontrou mudanças em frequência respiratória, sugerindo que a lesão afeta também o tronco cerebral.

Na primeira tarefa deste estudo, realizada ao 45º dia pós-natal, os animais foram testados quanto a sua capacidade de interação e reconhecimento social. Esse estágio se relaciona com aumento na quantidade de tempo gasto em investigação social e interação com outros animais, além da busca por situações novas e exploração do desconhecido; comportamentos que se atenuam em outras fases de vida (Spear, 2000). No entanto, estudos mostram que dano cerebral pode causar diminuição na interação e reconhecimento social (Chou, Morganti, & Rosi, 2016;

Semple, Canchola, & Noble-Haeusslein, 2012), concordando com estes resultados. Mesmo que diversas estruturas tenham sido lesadas pela hipóxia-isquemia, a única estrutura que apresentou correlação linear ao desempenho dos animais na tarefa foi o córtex frontal direito, embora o hipocampo fosse a estrutura que mais se relaciona a comportamentos ligados à memória. Hipotetiza-se que o dano hipocampo foi o que produziu o prejuízo, mas a gravidade do dano flutuou devido ao dano cortical, explicando a correlação.

No 48º dia, os animais foram submetidos ao teste de Reconhecimento de Objetos, e não houve diferenças significativas, indicando diferentes circuitos de processamento entre reconhecimento social e de objetos (Warburton & Brown, 2015; Winslow & Insel, 2004). Em outros estudos, dados foram controversos, por exemplo, S. Kim et al. (2016) encontraram déficits nos mesmos dois experimentos de reconhecimento mediante lesão hipocampal oxidativa, enquanto Peres et al. (2015) verificaram alteração nos ratos somente no reconhecimento social, mas não em reconhecimento de objetos, quando o hipocampo e o estriado eram lesados com manganês. Danos no córtex frontal, encontrados neste estudo, também não alteraram a preferência por objeto novo em experimento conduzido por Cross, Brown, Aggleton, and Warburton (2013), mas houve efeito quanto à mudança de posição do objeto. A hipóxia-isquemia, por outro lado, foi significativa no recente estudo de Schuch et al. (2016) envolvendo reconhecimento de objetos. Dessa forma, pode-se inferir que os sistemas responsáveis por reconhecimento não foram totalmente esclarecidos, e que o reconhecimento social parece ser bem mais vulnerável a diferentes tipos de lesão do que o reconhecimento de objetos, talvez por uma maior exigência de estruturas intactas.

O treinamento na 5-CSRTT começou no 53º dia pós-natal, quando os ratos já haviam atingido o estágio de jovem adulto (Sengupta, 2013). Os animais HI realizaram essa tarefa de maneira inferior, o qual foi verificado a partir da menor acurácia ao responder a tarefa, maior número de respostas prematuras e, por fim, maior latência para coletar a recompensa. De acordo com Bari et al. (2008), essas variáveis podem ser traduzidas como aprendizado mais lento, impulsividade, menor velocidade de processamento e desatenção, respectivamente. A maior parte dessas variáveis (exceto o número de sessões para avançar na tarefa) correlacionaram-se ao volume do córtex frontal direito, do estriado direito e do hipocampo direito. Assim sendo, não havia como apontar num primeiro momento qual estrutura afetou o desempenho dos animais em cada parâmetro por simples causa-efeito, pois a lesão abrangeu proporcionalmente essas estruturas. Todavia, o modelo traz maior similaridade com o que ocorre no caso de um

problema obstétrico, patologia bastante prevalente em humanos e mesmo em países com alto grau de desenvolvimento (Kurinczuk, White-Koning, & Badawi, 2010) .

Contudo, o córtex frontal sozinho pode ter sido responsável pela maior parte do dano funcional, visto que a estrutura está entre as responsáveis por: atenção (i.e explicando o motivo pela menor acurácia entre o grupo experimental), controle inibitório (i.e sugerindo o maior número de respostas prematuras) e velocidade de processamento (i.e condizendo com a maior latência de recompensa) (Siddiqui, Chatterjee, Kumar, Siddiqui, & Goyal, 2008). O tempo necessário para avançar na tarefa, que indica a dificuldade em aprender a tarefa, correlacionou-se com o volume do córtex frontal (que também tem um papel na codificação da memória) e com o estriado, mas não com o hipocampo. Isso pode ser explicado pela 5-CSRTT acabar tornando-se muito mais baseada em memória processual (Bear, Connors, & Paradiso, 2007), e do que uma memória “de dados” pela repetição. Mas de forma alguma se sugere a imparcialidade do dano hipocampal no desempenho dos animais. Estudos futuros podem tentar especificar a subregião cortical mais envolvida nesse dano.

É importante mencionar que o fato da 5-CSRTT ser um ambiente desafiador e estimulante para os ratos, esta tarefa pode ter desempenhado o papel de um meio enriquecido, esse capaz de proporcionar efeitos positivos na neuroplasticidade e neuroquímica dos animais (Vega-Rivera et al., 2016), entretanto isso não foi avaliado. Todavia, o estudo desenvolvido por Yhnell, Lelos, Dunnett, and Brooks (2016), indicou uma melhora num modelo da doença de Huntington através da 5-CSRTT. Dessa forma, pode-se sugerir que os desempenhos cognitivo e comportamental dos animais deste estudo pudessem ter sido ainda inferiores do que os observados, inclusive os dados histológicos sem esse efeito benéfico da 5-CSRTT.

Estudos ainda correlacionam, em humanos, eventos isquêmicos, com certas doenças psiquiátricas. Getahun et al (2013). realizaram 2 estudos caso-controle, um envolvendo autismo e outro TDAH nos quais houve uma forte associação de condições hipóxico-isquêmicas a essas patologias (Getahun, Fassett, Wing, & Jacobsen, 2013; Getahun, Rhoads, et al., 2013). Brown (2011), em uma metanálise, cita a hipóxia perinatal como um fator de risco para esquizofrenia. Neste estudo, o comportamento dos ratos HI teve algumas características comuns a essas psicopatologias. Quanto à esquizofrenia, os animais HI também apresentaram sintomas cognitivos da doença, como pobre função executiva, déficits atencionais e de memória, pelo perfil na tarefa da 5-CSRTT (NIMH, 2009); em relação ao TDAH, a impulsividade e também o déficit de atenção; e em respeito ao transtorno do espectro autista, houve déficits sociais

(déficit em reconhecimento social, mas não de objetos). Esperava-se que houvesse respostas perseverativas com relação aos animais controle para então poder observar também a estereotipia motora nos animais HI, entretanto, em função da opção metodológica escolhida na tarefa não foi possível observar tal comportamento. Ainda assim, mesmo não abrangendo determinada patologia especificamente, a hipóxia-isquemia não deve ser descartada como meio de estudo para essas doenças, visto que conseguiu mimetizar diversos aspectos que elas possuem. Estudos futuros, então, podem concretizar a hipóxia-isquemia como essa ferramenta de estudo de grupos de sintomas específicos de patologias com déficits sociais e/ou cognitivos como o autismo, a esquizofrenia e o TDAH.

6 CONCLUSÃO

A realização deste trabalho permitiu concluir que os animais submetidos à hipóxia-isquemia neonatal apresentam desempenho cognitivo, desempenho atencional, velocidade de processamento e controle inibitório inferiores ao animais controle, além de déficits no comportamento. Esse prejuízo se correlacionou com a lesão abrangente do hemisfério direito dos animais, principalmente por danos ao córtex frontal e ao estriado, e em menor grau, ao hipocampo.

Foi possível observar que esse modelo pode ser relevante no entendimento de déficits cognitivos em sujeitos que sofreram hipóxia-isquemia neonatal, e auxiliar na compreensão de várias patologias com prevalência importante e debilitantes como o TDAH, esquizofrenia e autismo. Assim, investigações que busquem entender a base fisiopatológica dessas doenças virão a contribuir a construção de possíveis ferramentas terapêuticas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arteni, N. S., Pereira, L. O., Rodrigues, A. L., Lavinsky, D., Achaval, M. E., & Netto, C. A. (2010). Lateralized and sex-dependent behavioral and morphological effects of unilateral neonatal cerebral hypoxia-ischemia in the rat. *Behav Brain Res*, 210(1), 92-98. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2010.02.015>
- Bari, A., Dalley, J. W., & Robbins, T. W. (2008). The application of the 5-choice serial reaction time task for the assessment of visual attentional processes and impulse control in rats. *Nature protocols*, 3(5), 759-767.
- Bear, M. F., Connors, B. W., & Paradiso, M. A. (2007). *Neuroscience : exploring the brain*. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins.
- Beck, L. H., Bransome, E. D., Jr., Mirsky, A. F., Rosvold, H. E., & Sarason, I. (1956). A continuous performance test of brain damage. *J Consult Psychol*, 20(5), 343-350.
- Bellot, B., Peyronnet-Roux, J., Gire, C., Simeoni, U., Vinay, L., & Viemari, J.-C. (2014). Déficits of brainstem and spinal cord functions after neonatal hypoxia-ischemia in mice. *Pediatr Res*, 75(6), 723-730. doi:10.1038/pr.2014.42
- Bevins, R. A., & Besheer, J. (2006). Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study 'recognition memory'. *Nature protocols*, 1(3), 1306-1311.
- Bizarro, Lisiane ; Brys I. ; Johann S.P. ; BROLESE, G. ; De Oliveira A.A.(2012) . Estudo da atenção em animais por meio de uma tarefa operante. In: J. Landeira-Fernandez; Sérgio S. Fukusima. (Org.). Métodos em Neurociência. 1 ed. Barueri, SP, 2012, v. 1, p. 162-174
- Brown, A. S. (2011). The environment and susceptibility to schizophrenia. *Progress in Neurobiology*, 93(1), 23-58. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.pneurobio.2010.09.003>
- Busl, K. M., & Greer, D. M. (2010). Hypoxic-ischemic brain injury: pathophysiology, neuropathology and mechanisms. *NeuroRehabilitation*, 26(1), 5-13.
- Carli, M., & Samanin, R. (1992). Serotonin2 receptor agonists and serotonergic anorectic drugs affect rats' performance differently in a five-choice serial reaction time task. *Psychopharmacology (Berl)*, 106(2), 228-234.
- Chou, A., Morganti, J. M., & Rosi, S. (2016). Frontal Lobe Contusion in Mice Chronically Impairs Prefrontal-Dependent Behavior. *PLoS ONE*, 11(3), e0151418. doi:10.1371/journal.pone.0151418
- Cross, L., Brown, M. W., Aggleton, J. P., & Warburton, E. C. (2013). The medial dorsal thalamic nucleus and the medial prefrontal cortex of the rat function together to support associative recognition and recency but not item recognition. *Learning & Memory*, 20(1), 41-50. doi:10.1101/lm.028266.112
- de Paula, S., Vitola, A. S., Greggio, S., de Paula, D., Mello, P. B., Lubianca, J. M., . . . Dacosta, J. C. (2009). Hemispheric Brain Injury and Behavioral Déficits Induced by Severe Neonatal Hypoxia-Ischemia in Rats Are Not Attenuated by Intravenous Administration of Human Umbilical Cord Blood Cells. *Pediatr Res*, 65(6), 631-635.
- Derksen, M. J., Ward, N. L., Hartle, K. D., & Ivanco, T. L. (2007). MAP2 and synaptophysin protein expression following motor learning suggests dynamic regulation and distinct alterations coinciding with synaptogenesis. *Neurobiology of learning and memory*, 87(3), 404-415.
- Doi, K., Sameshima, H., Kodama, Y., Furukawa, S., Kaneko, M., & Ikenoue, T. (2012). Perinatal death and neurological damage as a sequential chain of poor outcome. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 25(6), 706-709.
- Engelmann, M., Wotjak, C. T., & Landgraf, R. (1995). Social discrimination procedure: an alternative method to investigate juvenile recognition abilities in rats. *Physiology & behavior*, 58(2), 315-321.
- Getahun, D., Fassett, M., Wing, D., & Jacobsen, S. (2013). 704: Association between perinatal ischemic-hypoxic conditions and autism spectrum disorder. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 1(208), S296.

- Getahun, D., Rhoads, G. G., Demissie, K., Lu, S.-E., Quinn, V. P., Fassett, M. J., . . . Jacobsen, S. J. (2013). In Utero Exposure to Ischemic-Hypoxic Conditions and Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *Pediatrics*. doi:10.1542/peds.2012-1298
- Gharbawie, O. A., Gonzalez, C. L., & Whishaw, I. Q. (2005). Skilled reaching impairments from the lateral frontal cortex component of middle cerebral artery stroke: a qualitative and quantitative comparison to focal motor cortex lesions in rats. *Behav Brain Res*, *156*(1), 125-137.
- Kim, J. J., Buchbinder, N., Ammanuel, S., Kim, R., Moore, E., O'Donnell, N., . . . Allen, R. H. (2013). Cost-effective therapeutic hypothermia treatment device for hypoxic ischemic encephalopathy. *Med Devices (Auckl)*, *6*, 1-10.
- Kim, S., Kim, T., Lee, H.-R., Jang, E.-H., Ryu, H.-H., Kang, M., . . . Kaang, B.-K. (2016). Impaired learning and memory in CD38 null mutant mice. *Molecular Brain*, *9*, 16. doi:10.1186/s13041-016-0195-5
- Kurinczuk, J. J., White-Koning, M., & Badawi, N. (2010). Epidemiology of neonatal encephalopathy and hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Early Human Development*, *86*(6), 329-338. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2010.05.010>
- Lai, M.-C., & Yang, S.-N. (2010). Perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *BioMed Research International*, *2011*.
- Levine, S. (1960). Anoxic-ischemic encephalopathy in rats. *The American journal of pathology*, *36*, 1-17.
- MacLellan, C. L., Auriat, A. M., McGie, S. C., Yan, R. H., Huynh, H. D., De Butte, M. F., & Colbourne, F. (2006). Gauging recovery after hemorrhagic stroke in rats: implications for cytoprotection studies. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, *26*(8), 1031-1042.
- Marin, J. C., Moura, P. J., Cysneiros, R. M., Colugnati, D. B., Cavalheiro, E. A., Scorza, F. A., . . . Mercadante, M. T. (2008). Temporal lobe epilepsy and social behavior: an animal model for autism? *Epilepsy Behav*, *13*(1), 43-46. doi:10.1016/j.yebeh.2008.03.004
- Miguel, P. M., Schuch, C. P., Rojas, J. J., Carletti, J. V., Deckmann, I., Martinato, L. H. M., . . . Pereira, L. O. (2015). Neonatal hypoxia-ischemia induces attention-deficit hyperactivity disorder-like behavior in rats. *Behavioral neuroscience*, *129*(3), 309.
- NIMH. (2009). Schizophrenia2016(NIH Publication No. 15-3517). Retrieved from <http://www.nimh.nih.gov/health/publications/schizophrenia-booklet-12-2015/index.shtml>
- Northington, F. J., Chavez-Valdez, R., & Martin, L. J. (2011). Neuronal cell death in neonatal hypoxia-ischemia. *Annals of neurology*, *69*(5), 743-758.
- Paxinos, G., & Watson, C. (2007). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Sydney [etc.] :: Academic Press.
- Peres, T. V., Eyng, H., Lopes, S. C., Colle, D., Gonçalves, F. M., Venske, D. K. R., . . . Leal, R. B. (2015). Developmental exposure to manganese induces lasting motor and cognitive impairment in rats. *NeuroToxicology*, *50*, 28-37. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuro.2015.07.005>
- Porzionato, A., Macchi, V., Zaramella, P., Sarasin, G., Grisafi, D., Dedja, A., . . . De Caro, R. (2015). Effects of postnatal hyperoxia exposure on the rat dentate gyrus and subventricular zone. *Brain Structure and Function*, *220*(1), 229-247.
- Rice, J. E., 3rd, Vannucci, R. C., & Brierley, J. B. (1981). The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Annals of neurology*, *9*(2), 131-141.
- Robbins, T. W. (2002). The 5-choice serial reaction time task: behavioural pharmacology and functional neurochemistry. *Psychopharmacology (Berl)*, *163*(3-4), 362-380. doi:10.1007/s00213-002-1154-7
- Schuch, C. P., Jeffers, M. S., Antonescu, S., Nguemeni, C., Gomez-Smith, M., Pereira, L. O., . . . Corbett, D. (2016). Enriched rehabilitation promotes motor recovery in rats exposed to neonatal hypoxia-ischemia. *Behav Brain Res*, *304*, 42-50.
- Semple, B. D., Canchola, S. A., & Noble-Haeusslein, L. J. (2012). Deficits in Social Behavior Emerge during Development after Pediatric Traumatic Brain Injury in Mice. *Journal of Neurotrauma*, *29*(17), 2672-2683. doi:10.1089/neu.2012.2595
- Sengupta, P. (2013). The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. *International Journal of Preventive Medicine*, *4*(6), 624-630.

- Siddiqui, S. V., Chatterjee, U., Kumar, D., Siddiqui, A., & Goyal, N. (2008). Neuropsychology of prefrontal cortex. *Indian Journal of Psychiatry*, *50*(3), 202-208. doi:10.4103/0019-5545.43634
- Smith, T. F., Schmidt-Kastner, R., McGeary, J. E., Kaczorowski, J. A., & Knopik, V. S. (2016). Pre- and Perinatal Ischemia-Hypoxia, the Ischemia-Hypoxia Response Pathway, and ADHD Risk. *Behavior Genetics : An International Journal Devoted to Research in the Inheritance of Behavior*, *46*(3), 467-477.
- Spear, L. (2000). Modeling adolescent development and alcohol use in animals. *Alcohol Res Health*, *24*(2), 115-123.
- Thor, D., & Holloway, W. (1982). Social memory of the male laboratory rat. *Journal of comparative and physiological psychology*, *96*(6), 1000.
- Vannucci, R. C., & Vannucci, S. J. (2005). Perinatal hypoxic-ischemic brain damage: evolution of an animal model. *Developmental neuroscience*, *27*(2-4), 81-86.
- Vega-Rivera, N. M., Ortiz-López, L., Gómez-Sánchez, A., Oikawa-Sala, J., Estrada-Camarena, E. M., & Ramírez-Rodríguez, G. B. (2016). The neurogenic effects of an enriched environment and its protection against the behavioral consequences of chronic mild stress persistent after enrichment cessation in six-month-old female Balb/C mice. *Behav Brain Res*, *301*, 72-83. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2015.12.028>
- Warburton, E. C., & Brown, M. W. (2015). Neural circuitry for rat recognition memory. *Behav Brain Res*, *285*, 131-139. doi:10.1016/j.bbr.2014.09.050
- Winslow, J. T., & Insel, T. R. (2004). Neuroendocrine basis of social recognition. *Current opinion in neurobiology*, *14*(2), 248-253.
- Yao, D., Zhang, W., He, X., Wang, J., Jiang, K., & Zhao, Z. (2016). Establishment and identification of a hypoxia-ischemia brain damage model in neonatal rats. *Biomedical Reports*, *4*(4), 437-443.
- Yhnell, E., Lelos, M. J., Dunnett, S. B., & Brooks, S. P. (2016). Cognitive training modifies disease symptoms in a mouse model of Huntington's disease. *Experimental Neurology*. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2016.05.008>