

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

Patrícia Maidana Miguel

**DÉFICIT DE ATENÇÃO E HIPERATIVIDADE EM RATOS
SUBMETIDOS À HIPÓXIA-ISQUEMIA ENCEFÁLICA NEONATAL:
UMA RELAÇÃO POSSÍVEL?**

Porto Alegre
2011

Patrícia Maidana Miguel

**DÉFICIT DE ATENÇÃO E HIPERATIVIDADE EM RATOS SUBMETIDOS À
HIPÓXIA-ISQUEMIA ENCEFÁLICA NEONATAL: UMA RELAÇÃO POSSÍVEL?**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Área de concentração: Neurofisiologia

Orientador: Profa. Dra. Lenir Orlandi Pereira
Silva

Porto Alegre
2011

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha orientadora, por todos os ensinamentos que me foram passados ao longo destes dois anos e meio desde que entrei no mundo da pesquisa. Agradeço principalmente por ter acreditado em mim quando começamos a desenvolver este projeto e o nome assustador do 5-Choice Serial Reaction Time Task apareceu em nossas vidas. Muito obrigada por tudo, Lenir! És um exemplo de professora, orientadora e amiga.

À professora Lisiane Bizarro, que abriu as portas do LPNEC para mim e me ofereceu todos os materiais necessários para que eu pudesse desenvolver a minha pesquisa. Obrigada por me repassar os seus ensinamentos sobre o 5-CSRTT e sempre acreditar que os meus ratos “lesadinhos” conseguiriam assimilar a tarefa em algum momento (apesar de não terem conseguido rs).

Ao Guto, por ter me explicado TODO o funcionamento do laboratório (desde a lavagem das caixas até a conversão dos dados para o Excel), ao revezamento da visita ao lab nos finais de semana, à sabedoria nerd para fazer todos os programas... etc, etc, etc. Muito obrigada por tudo, seria impossível sem a tua ajuda!

Às minhas queridas amigas e colegas de laboratório – Clarissa, Luísa, Jaque e Josi – que perseveraram junto comigo durante estes quatro meses de trabalho árduo no “5-Choice”. Sem a ajuda de vocês as duas horas de experimento seriam quatro, certamente. Muito obrigada por terem tirado tantos pellets comigo, sei que vocês vão sentir falta dessa terapia ocupacional! rs. Agradeço também à Bruninha, por ter compartilhado tantos momentos juntos comigo na faculdade e no laboratório: provas, experimentos, TCC...só tu mesmo pra entender tudo que eu passei! Ramiro, a alegria do grupo, obrigada por todas as piadas pra animar os finais de semana de experimentos, o incentivo, a amizade... LG, amo vocês!

Agradeço à minha família, por todo amor e por sempre acreditarem e apostarem em mim; aos meus amigos, pela ausência nos momentos finais da redação do tcc; e à Carol e ao Fefe, pela amizade e parceria durante toda a faculdade.

Ao Fabio, pelo companheirismo e compreensão, por me ajudar a dar comida para os ratinhos nos finais de semana, pela ajuda no Excel e no Word, e por conseguir me confortar até nos momentos de maior estresse. Muito obrigada por tudo!

Aos porteiros da Psicologia, que as 17h já estavam prontamente com a chave 2 na mão para me fornecer; e aos ratinhos que foram solidários e entraram até em regime para me ajudar.

SUMÁRIO

RESUMO.....	5
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....	6
1. INTRODUÇÃO.....	7
1.1. Encefalopatia Hipóxica-Isquêmica.....	7
1.2. Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade.....	12
1.3. 5-Choice Serial Reaction Time Task.....	13
2. TRABALHO EXPERIMENTAL NA FORMA DE ARTIGO CIENTÍFICO	15
3. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS.....	37
4. REFERÊNCIAS ADICIONAIS.....	38

RESUMO

O Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade (TDAH) pode ser causado por fatores genéticos ou ambientais. Dentre os fatores ambientais, as complicações perinatais podem estar relacionadas, como a Hipóxia-isquemia (HI) neonatal. Esse fator ainda é pouco estudado na relação com o TDAH e trabalhos experimentais ainda não foram realizados. Assim, o objetivo do nosso trabalho é investigar se a HI neonatal contribui para o desenvolvimento das características relacionadas ao TDAH na fase adulta em ratos, através do teste do campo aberto e *5-Choice Serial Reaction Time Task* (5-CSRTT). Para isso, foram utilizados ratos Wistar machos, divididos em grupo HI e CT. O procedimento de HI consistiu na combinação da oclusão da artéria carótida comum direita ao 7º dia pós-natal com exposição a uma atmosfera hipóxica (8% O₂ e 92% N₂, durante 90 minutos). Durante a fase adulta, os animais foram submetidos ao teste do campo aberto, durante uma sessão de cinco minutos; e ao teste do *5-Choice Serial Reaction Time Task*, durante 16 semanas. Neste teste, os animais são treinados a responder a um estímulo luminoso para receber uma recompensa alimentar e os aspectos atencionais e de impulsividade foram avaliados. Nossos resultados demonstraram que os animais HI apresentaram déficits de aprendizagem e atenção, evidenciado pelas alterações de diversos parâmetros: diminuição na acurácia, nas respostas corretas, e no número de tentativas na sessão, assim como o aumento das respostas incorretas, das percentagens de omissões e do tempo para completar a sessão, ao longo de todos os estágios de treinamento. Déficit no controle inibitório também foram observados pelo maior número de respostas perseverativas, enquanto a atividade locomotora global observada no campo aberto não foi comprometida. Com estes resultados, inferimos que a HI neonatal pode contribuir para o desenvolvimento das características comportamentais observadas no TDAH.

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

5-CSRTT	5-Choice Serial Reaction Time Task
AMPA	A-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxasol-propionato
ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina Trifosfato
CA1	Subcampo 1 do Corno de Amon
Ca ²⁺	Íon cálcio
CT	Controle
HI	Hipóxia-isquemia
IL	Interleucina
ITI	Intervalo entre tentativas (intertrial interval)
K ⁺	Potássio
LH	Tempo limite (limited hold)
N ₂	Nitrogênio
Na ⁺	Sódio
NMDA	N-metil-D-aspartato
O ₂	Oxigênio Molecular
TDAH	Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa
TO	Período de escuridão (time out)

1 INTRODUÇÃO

1.1 Encefalopatia hipóxico-isquêmica

A encefalopatia hipóxico-isquêmica é a causa mais comum de encefalopatia entre os neonatos a termo [1], com uma incidência de 2/1000 partos [2]. Essa incidência é até dez vezes maior nos países em desenvolvimento [3]. Nos bebês nascidos com menos de 35 semanas de gestação, estes insultos hipóxico-isquêmicos (HI) ocorrem em 20-30% dos casos [4], contribuindo significativamente para a mortalidade e morbidade neonatais, incluindo sequelas no desenvolvimento neurológico para 25% a 60% dos sobreviventes [5]. Essas sequelas podem ser vistas como paralisia cerebral, retardo mental, dificuldades de aprendizagem, epilepsia [6], transtorno de déficit de atenção/hiperatividade, comprometimento da memória e esquizofrenia [7]. A gravidade da encefalopatia neonatal pode ser classificada como leve, moderada ou grave, e a proporção de déficits neurológicos graves nessas crianças é de 0% para a fase 1 (leve), 30%-50% para a fase 2 (moderada), e >90% para a fase 3 (grave) [8].

As possíveis causas para a encefalopatia hipóxica-isquêmica incluem complicações da gravidez e do parto e asfixia fetal [9], esta sendo a causa mais comum e mais estudada [8]. A asfixia fetal ocorre primariamente como resultado de troca placentária prejudicada, sendo que o fluxo sanguíneo uterino prejudicado, a hipóxia materna, a insuficiência placentária e a compressão do cordão umbilical, entre outras causas, podem interferir com a transferência de substratos [10, 11].

Distúrbios metabólicos levando ao estresse oxidativo, fatores inflamatórios e excitotoxicidade são fatores patológicos que contribuem para a lesão cerebral após HI [12]. O dano cerebral hipóxico-isquêmico é um processo evolutivo, o qual se inicia durante o insulto e estende-se no período de recuperação após a lesão por reperfusão [13]. Durante a fase inicial de HI, a depleção de oxigênio impossibilita a fosforilação oxidativa e ocorre uma mudança para o metabolismo anaeróbico, este sendo um estado de energia ineficiente que resulta na rápida depleção de reservas de fosfato de alta energia, incluindo a molécula de adenosina trifosfato (ATP) [14, 15]. A redução do ATP leva à insuficiência da bomba de Na^+/K^+ e despolarização da membrana, com entrada de sódio (Na^+) e água na célula, causando edema citotóxico e desencadeando a morte celular por necrose. Com a falha na bomba de Na^+/K^+ também ocorre acúmulo de cálcio (Ca^{2+}) citoplasmático que resulta em

disfunção mitocondrial, falência energética, ativação de proteases e de fosfolipases, que vão culminar com a morte neuronal por apoptose [16].

Com a despolarização da membrana, ocorre também a liberação de neurotransmissores excitatórios dos terminais axônicos, especificamente o glutamato. A transmissão do glutamato é estreitamente regulada por inibição retrógrada da recaptação pré-sináptica, bem como por diversos transportadores de glutamato localizados primariamente nas células gliais. [17]. Esses transportadores são dependentes de energia e, conseqüentemente, serão prejudicados com a falência energética que ocorre na HI, comprometendo a recaptação do neurotransmissor na fenda sináptica, onde este atuará por mais tempo. [18]. As concentrações extracelulares de glutamato podem aumentar até dez vezes, e este excesso de neurotransmissão glutamatérgica induz à morte celular excitotóxica (superexcitação neuronal levando à morte celular). [19]. Com o aumento de glutamato na fenda sináptica haverá uma maior ativação de receptores de glutamato pós-sinápticos, como NMDA (N-metil-D-aspartato) e AMPA (α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionato), resultando no influxo de Na^+ e Ca^{2+} aos neurônios pós-sinápticos. Os efeitos deletérios do aumento de cálcio citosólico incluem a ativação da enzima óxido nítrico neuronal (nNOS) para formar óxido nítrico, a geração de radicais livres, e degradação de lipídios celulares por ativação de fosfolipases, de proteínas celulares pela ativação de proteases, e do DNA celular pela ativação de nucleases, bem como a acentuação de lesões mitocondriais [15, 20]. Receptores NMDA são abundantes no início da vida - pelo seu papel no desenvolvimento cerebral, diferenciação celular e crescimento axonal, significando que o cérebro imaturo é particularmente vulnerável às lesões excitotóxicas [19]. Na figura 1, apresentamos os principais mecanismos envolvidos na HI.

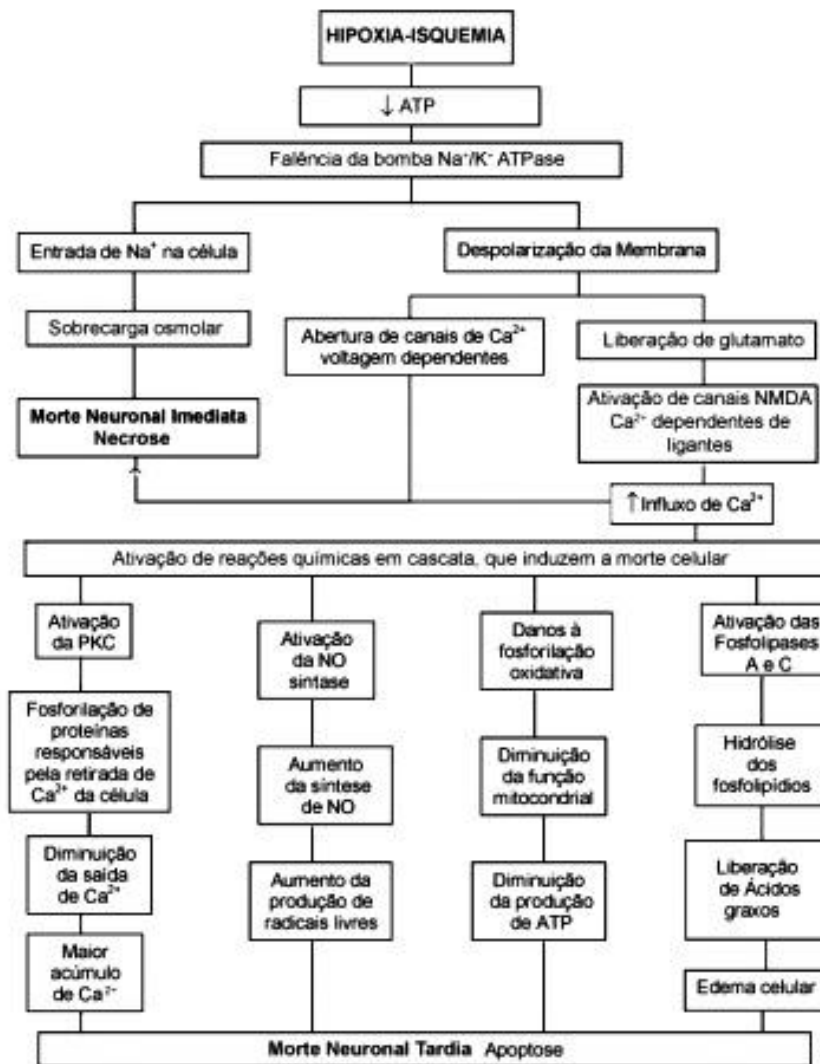


Figura 1. Mecanismos fisiopatológicos envolvidos na HI. (Adaptado da referência 25)

A produção excessiva de radicais livres e altos níveis de glutamato extracelular levam a uma ativação da resposta inflamatória, que ocorre de três a doze horas após reperfusão e reoxigenação do cérebro [21]. Citocinas inflamatórias apresentaram uma alta concentração em bebês nascidos a termo que posteriormente desenvolveram paralisia cerebral [22] e níveis elevados de IL-6 e IL-8 no líquido cefalorraquidiano de recém-nascidos têm sido correlacionados com um maior grau de encefalopatia e desenvolvimento neurológico pobre [23]. Essa resposta inflamatória pode ativar tanto citocinas pró ou anti-inflamatórias, como TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 e IL-10 [24].

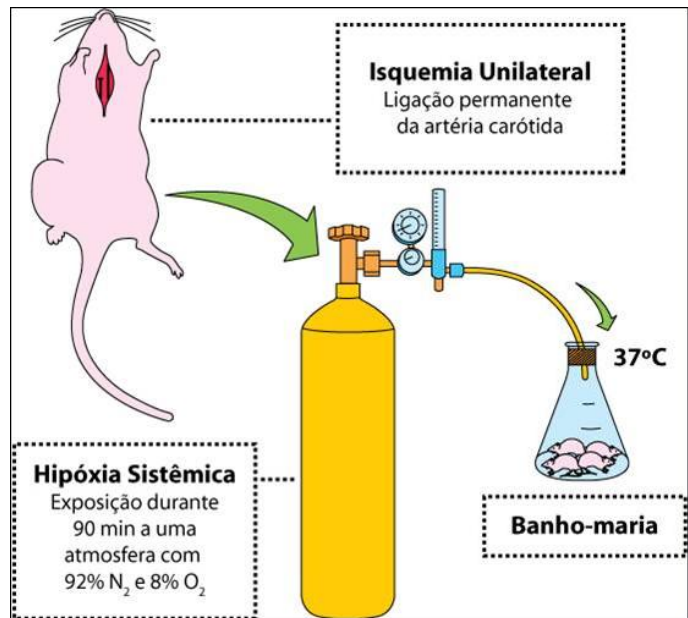
Estudos epidemiológicos e também experimentais já demonstraram haver uma relação entre isquemia cerebral e distúrbios na produção e liberação de

dopamina. No entanto, os mecanismos envolvidos e os resultados são inconclusivos e um tanto discrepantes. Um estudo com microdiálise in vivo demonstrou que há um rápido aumento na concentração de dopamina durante o início da isquemia e que logo retorna a seus níveis basais após reperfusão, enquanto um experimento de isquemia em ratos usando um modelo de embolismo demonstrou uma liberação de dopamina logo após a lesão, e depois uma diminuição ao longo do tempo [26].

Os encéfalos imaturos dos neonatos são altamente suscetíveis aos danos causados pela HI quando comparados aos encéfalos adultos [27], devido à importância do suprimento sanguíneo adequado para o seu desenvolvimento constante [16, 28]. Esta maior fragilidade do encéfalo imaturo também pode ser concedida pelo maior risco de fracasso energético, pela imaturidade da barreira hematoencefálica e da substância branca, e elevada suscetibilidade à excitotoxicidade glutamatérgica [29]. As lesões causadas pelos eventos hipóxico-isquêmicos são variadas e comprometem estruturas específicas do encéfalo: córtex cerebral, hipocampo, estriado (núcleos da base), tálamo, tronco encefálico e substância branca periventricular e subcortical [30].

Para compreender melhor a fisiopatologia da doença e proporcionar o desenvolvimento de estratégias terapêuticas eficientes [31], foram desenvolvidos modelos animais que mimetizam o dano encefálico sofrido por recém-nascidos. O modelo animal mais comumente utilizado é o modelo de Levine [32] modificado por Rice e colaboradores [27], que consiste na oclusão unilateral permanente da artéria carótida comum (isquemia) de animais com sete dias de idade, seguido de exposição a um ambiente hipóxico (8% de oxigênio) por até 3h (Figura 2).

Figura 2. Procedimento de hipóxia-isquemia de Levine-Rice.



O encéfalo dos ratos no 7º dia pós-natal é histologicamente comparado ao desenvolvimento cerebral de um feto com 32-34 semanas de gestação ou a de um recém-nascido, onde as camadas neuronais corticais estão completas, a camada germinativa está involuída e a substância branca sofreu pouca mielinização [33]. Animais submetidos a esse modelo sofrem alterações cognitivas, morfológicas e bioquímicas [34], comparadas àquelas observadas em humanos recém-nascidos [35]. As lesões teciduais são observadas no córtex cerebral, hipocampo, estriado, tálamo, substância branca subcortical e periventricular [36]. As vantagens desse modelo experimental incluem o custo financeiro modesto, o fácil manuseio dos animais, reprodutibilidade alta e recuperação do fluxo sanguíneo mesmo após à oclusão da artéria [36]. Trabalhos do nosso grupo de pesquisa já demonstraram que os animais submetidos à HI tiveram déficits cognitivos na memória de trabalho e de referência [35, 37] tanto em ratos adolescentes quanto adultos, e déficits sensório-motores também já foram encontrados [38, 39], sendo que alguns aspectos comportamentais ainda não foram estudados, como a análise da atenção desses animais após os eventos de HI.

1.2 Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade

O Transtorno do déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) é uma condição clínica neuropsicológica das mais importantes nas últimas décadas, com uma prevalência que varia de 5 a 10% no nosso país [40]. Segundo o Manual Diagnóstico

e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-IV) há três subtipos de TDAH: 1) TDAH predominantemente desatento 2) TDAH predominantemente hiperativo/impulsivo e 3) TDAH tipo combinado. Essas características apresentam graus muito diversos e co-morbidades, como deficiência na aprendizagem e transtornos de humor, que também estão relacionadas com esse transtorno [41]. Essas co-morbidades ficam mais evidentes na adolescência e na fase adulta dos sujeitos, levando a conflitos familiares, dificuldades de relacionamentos, ansiedade, depressão, tabagismo, delinquência e abuso de substâncias psicoativas [42, 43]. Os fatores genéticos são as causas primárias relacionadas ao TDAH, mas os fatores ambientais também podem contribuir como causas secundárias e são focos de várias linhas de estudo atualmente. Alguns fatores pré, peri e pós-natais já foram definidos como fatores de risco para o TDAH: tabagismo e ingestão de álcool pela mãe, prematuridade do recém-nascido, deficiência da tireóide e hipóxia-isquemia neonatal [44]. Sendo este último fator ainda pouco estudado na relação com o TDAH.

A neurobiologia do TDAH ainda não está bem estabelecida, sendo a teoria do déficit no sistema dopaminérgico a mais aceita atualmente. O Metilfenidato, a droga mais utilizada para tratar o TDAH, bloqueia a recaptação de dopamina e noradrenalina pelos seus transportadores, aumentando assim a concentração de dopamina na fenda sináptica [45, 46]. Esse fármaco é muito eficiente para o tratamento dos sintomas do TDAH, colaborando para essa teoria ganhar crédito no meio científico. A disfunção do sistema dopaminérgico pode ser resultante de um defeito primário nos neurônios dopaminérgicos ou um defeito secundário pela regulação glutamatérgica ou noradrenérgica deficientes [47]. Estudos de imagem cerebral demonstraram anomalias estruturais e funcionais em algumas regiões encefálicas de pacientes com TDAH. Um circuito cortico-estriatal tem sido proposto, onde os lobos frontais e as conexões estriatais parecem estar envolvidos na fisiopatologia do TDAH [48].

Alguns estudos já demonstraram que a prematuridade aumenta a incidência de TDAH [49, 50], mas a razão ainda não é bem estabelecida. Recém-nascidos prematuros muitas vezes experimentam episódios repetidos de hipóxia, que pode afetar os níveis de dopamina e outras monoaminas [51]. Um estudo com tomografia por emissão de pósitrons (PET) de adolescentes com TDAH que tiveram nascimento prematuro demonstrou baixos níveis extracelulares de dopamina em regiões

encefálicas estriatais [52]. Nascimento prematuro complicado pela suscetibilidade à isquemia cerebral podem contribuir para maior disponibilidade do receptor de dopamina, neurotransmissão dopaminérgica deficiente, e posterior desenvolvimento de TDAH [48]. Um estudo [53] buscou essa relação de déficit dopaminérgico em crianças com TDAH que tiveram parto prematuro e baixo fluxo sanguíneo cerebral ao nascer, e viram que a disponibilidade dos receptores dopaminérgicos nessas crianças foi alto, apoiando a hipótese da isquemia cerebral como um fator contribuinte em crianças suscetíveis ao TDAH.

1.3 5-Choice Serial Reaction Time Task (5-CSRTT)

Para o estudo das características comportamentais relacionadas aos transtornos que envolvem déficits de atenção, alguns modelos comportamentais foram desenvolvidos. O *5-choice serial reaction time task* (5-CSRTT) é um teste validado na literatura científica que avalia características comportamentais de atenção e impulsividade, tais como o TDAH [54]. Nesta tarefa operante os animais devem aprender a acompanhar um estímulo luminoso, apresentado de forma imprevisível, para receber uma recompensa comestível [55]. O aparato consiste de câmaras de acrílico onde na parede traseira encontram-se cinco aberturas equidistantes com feixes de fotocélulas infra-vermelhos e no lado oposto encontra-se um compartimento onde uma recompensa alimentar é oferecida após os animais tocarem na abertura que apresentou um estímulo luminoso (Figura 3).

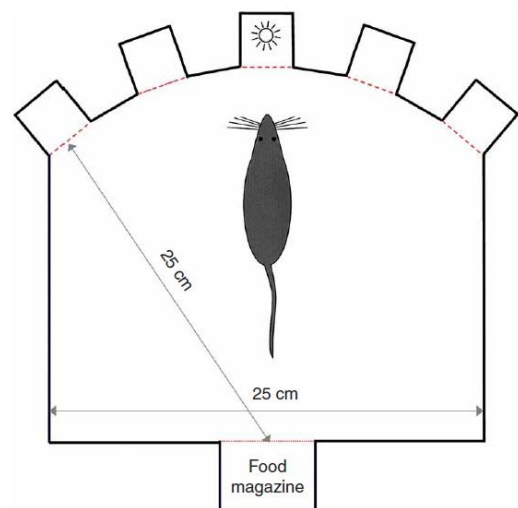


Figura 3. Diagrama esquemático do aparato do 5-CSRTT com a divisão espacial das cinco aberturas em relação ao compartimento alimentar [56].

Se os animais não conseguem responder corretamente, respondem na abertura errada ou em um momento inadequado, um curto período de escuridão (TO = time out) é apresentado como punição e nenhuma recompensa é entregue [56]. A análise do desempenho dos animais é realizada diariamente para saber se o animal pode passar para um nível de dificuldade maior, e este é medido pela acurácia e omissões, apresentados em percentagem.

As vantagens dessa tarefa incluem a confiabilidade comprovada, devido ao seu uso ser generalizado em muitos laboratórios, a análise de múltiplas medidas de desempenho, que refletem tanto atenção como velocidade nas respostas e a aquisição de dados precisos e automatizados [56,57].

A relação entre HI e TDAH em modelos animais, a nosso saber, ainda não foi estudada. Embora alguns trabalhos cite a HI como fator de risco para o TDAH, estes estudos são de base clínica e pouco estudados, precisando de uma melhor compreensão sobre esta relação e mais subsídios para concluir se esta inter-relação realmente existe. Assim, o objetivo deste trabalho é investigar se a HI neonatal contribui para o desenvolvimento das características relacionadas ao TDAH na fase adulta em ratos, através do teste do campo aberto e *5-Choice Serial Reaction Time Task*.

2 TRABALHO EXPERIMENTAL NA FORMA DE ARTIGO CIENTÍFICO

DÉFICIT DE ATENÇÃO E HIPERATIVIDADE EM RATOS SUBMETIDOS À HIPÓXIA-ISQUEMIA ENCEFÁLICA NEONATAL: UMA RELAÇÃO POSSÍVEL?

Patrícia Maidana Miguel^{ab}, Clarissa Pedrini Schuch^{ac}, Luísa Martinato^a, Joseane Jiménez Rojas^{ac}, Jaqueline Vieira Carletti^{ac}, Lisiane Bizarro^d, Lenir Orlandi Pereira^a

a) Laboratório de Histologia Aplicada, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil

b) Laboratório de Isquemia Cerebral, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil

c) Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Neurociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil

d) Laboratório de Psicologia Experimental, Neurociências e Comportamento, Departamento de Psicologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil

Resumo

O Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade (TDAH) pode ser causado por fatores genéticos ou ambientais. Dentre os fatores ambientais, as complicações perinatais podem estar relacionadas, como a Hipóxia-isquemia (HI) neonatal. Esse fator ainda é pouco estudado na relação com o TDAH e trabalhos experimentais ainda não foram realizados. Assim, o objetivo do nosso trabalho é investigar se a HI neonatal contribui para o desenvolvimento das características relacionadas ao TDAH na fase adulta em ratos, através do teste do campo aberto e *5-Choice Serial Reaction Time Task* (5-CSRTT). Para isso, foram utilizados ratos Wistar machos, divididos em grupo HI e CT. O procedimento de HI consistiu na combinação da oclusão da artéria carótida comum direita ao 7º dia pós-natal com exposição a uma atmosfera hipóxica (8% O₂ e 92% N₂, durante 90 minutos). Durante a fase adulta, os animais foram submetidos ao teste do campo aberto, durante uma sessão de cinco minutos; e ao teste do *5-Choice Serial Reaction Time Task*, durante 16 semanas. Neste teste, os animais são treinados a responder a um estímulo luminoso para receber uma recompensa alimentar e os aspectos atencionais e de impulsividade foram avaliados. Nossos resultados demonstraram que os animais HI apresentaram déficits de aprendizagem e atenção, evidenciado pelas alterações de diversos parâmetros: diminuição na acurácia, nas respostas corretas, e no número de tentativas na sessão, assim como o aumento das respostas incorretas, das percentagens de omissões e do tempo para completar a sessão, ao longo de todos os estágios de treinamento. Déficit no controle inibitório também foram observados pelo maior número de respostas perseverativas, enquanto a atividade locomotora global observada no campo aberto não foi comprometida. Com estes resultados, inferimos que a HI neonatal pode contribuir para o desenvolvimento das características comportamentais observadas no TDAH.

Palavras-chave: Hipóxia-Isquemia, Transtorno de Déficit de atenção/Hiperatividade, 5-Choice Serial Reaction Time Task

1 Introdução

A encefalopatia hipóxico-isquêmica (HI), frequentemente resultante de asfixia perinatal, é a causa mais importante de doenças neurológicas como retardo mental, epilepsia, déficit de atenção/hiperatividade e déficit de memória [1]. Estes insultos hipóxico-isquêmicos ocorrem em 20-30% dos bebês nascidos com menos de 35 semanas de gestação [2] e contribui significativamente para a mortalidade e morbidade neonatais, incluindo sequelas no desenvolvimento neurológico para 25% a 60% dos sobreviventes [3]. Atualmente, ainda não há tratamento adequado para HI neonatal, sendo os modelos animais de suma importância para o entendimento da fisiopatologia e das consequências funcionais de uma lesão prematura e também para desenvolver intervenções terapêuticas eficientes [4]. O modelo animal de HI mais utilizado é o modelo de Levine [5] modificado por Rice e colaboradores [6]. Trabalhos do nosso grupo de pesquisa já demonstraram que os animais submetidos

à este modelo de HI tiveram déficits cognitivos na memória de trabalho e de referência [7, 8], tanto em ratos adolescentes quanto adultos, e déficits sensório-motores também já foram encontrados [9, 10]. No entanto, alguns aspectos comportamentais ainda não foram estudados, como a análise da atenção desses animais após os eventos de HI.

O Transtorno do déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) é uma condição clínica neuropsicológica das mais importantes nas últimas décadas, com uma prevalência de 2,2% a 17,8% [11]. Os fatores genéticos são as causas primárias relacionadas ao TDAH, mas os fatores ambientais também podem contribuir como causas secundárias e são focos de várias linhas de estudo atualmente. Alguns fatores pré, peri e pós-natais já foram definidos como fatores de risco para o TDAH: tabagismo e ingestão de álcool pela mãe, prematuridade do recém-nascido, deficiência da tireóide e hipóxia-isquemia neonatal [12]. Sendo este último fator ainda pouco estudado na relação com o TDAH. Para o estudo das características comportamentais relacionadas aos transtornos que envolvem déficits de atenção, alguns modelos comportamentais foram desenvolvidos. O *5-choice serial reaction time task* (5-CSRTT) é um teste validado na literatura científica que avalia características comportamentais de atenção e impulsividade, tais como o TDAH [13]. Nesta tarefa operante os animais devem aprender a acompanhar um estímulo luminoso, apresentado de forma imprevisível, para receber uma recompensa comestível [14].

A relação entre HI e TDAH em modelos animais, a nosso saber, ainda não foi estudada. Embora alguns trabalhos cite a HI como fator de risco para o TDAH, estes estudos são de embasamento clínico e pouco estudados, necessitando de mais subsídios para concluir se esta inter-relação realmente existe. Assim, o objetivo deste trabalho é investigar se a HI neonatal contribui para o desenvolvimento das características relacionadas ao TDAH na fase adulta em ratos, através do teste do campo aberto e *5-Choice Serial Reaction Time Task*.

2 Materiais e Métodos

O experimento com o uso de animais foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFRGS), com o projeto de número 21122.

2.1. Animais

Ratos Wistar machos provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL/UFRGS) foram divididos em grupos controle (n=12) e HI (n=12). Até os dois meses de vida, os animais foram alojados no biotério do Departamento de Farmacologia/UFRGS, em ambiente padrão, com ciclo claro/escuro de 12h em ambiente climatizado (25°C) e recebendo ração e água *ad libitum*. Após este período, os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Psicologia Experimental, Neurociências e Comportamento (LPNeC) da UFRGS, onde foram desenvolvidos os testes comportamentais.

2.2. Procedimento de Hipóxia-Isquemia

O modelo de hipóxia-isquemia (HI) neonatal foi baseado naquele proposto por Levine [5] e modificado por Rice e colaboradores [6], o qual consiste na associação da oclusão permanente da artéria carótida comum direita com exposição à ambiente hipóxico para produzir lesão cerebral unilateral em ratos recém-nascidos. No 7º dia pós-natal os animais foram anestesiados com halotano (2-4%) e então uma incisão na superfície ventral do pescoço foi realizada para exposição e oclusão permanente da artéria carótida comum direita. Depois de 2-3h os filhotes foram expostos à uma câmara com ambiente hipóxico (8% de oxigênio e 92% de nitrogênio, com fluxo de 5L/minuto), parcialmente imersa em banho-maria a 37°C, onde permaneceram por 90 minutos em grupo de cinco animais. Os animais controles foram submetidos à cirurgia Sham, recebendo anestesia e incisão no pescoço, mas não tiveram a artéria carótida comum ocluída nem foram submetidos ao ambiente hipóxico.

Após o procedimento de HI, os animais foram mantidos com os cuidados básicos de laboratório até atingirem os dois meses de vida, quando iniciaram-se os testes comportamentais.

2.3. Testes Comportamentais

2.3.1. Teste do Campo Aberto

Para análise da atividade locomotora, os animais foram colocados em uma arena circular de madeira, na cor preta, nas dimensões de 60 cm de diâmetro X 45 cm de altura. Esta arena foi dividida em 28 quadrantes virtuais e os animais foram

colocados, individualmente, no quadrante central da arena, voltados sempre para o mesmo lado ao início do teste. Os animais permaneceram nesse aparato por cinco minutos, onde puderam explorá-lo livremente e tiveram o seu comportamento filmado. As variáveis analisadas foram: 1) distância total percorrida, 2) velocidade média de deslocamento, 3) velocidade máxima de deslocamento, 4) tempo de mobilidade, 5) tempo de imobilidade, 5) número de cruzamentos, 6) número total de rotações, 7) número de rotações no sentido horário (ipsilateral à lesão) e 8) número de rotações no sentido anti-horário (contralateral à lesão). As mensurações de todas as variáveis foram realizadas por meio do programa *Any-Maze Video Traking System 4.73* (Stoelting Co., USA).

2.3.2 5-Choice Serial Reaction Time Task (5-CSRTT)

Os animais foram treinados no 5-CSRTT de acordo com o protocolo estabelecido por Andrea Bari e colaboradores [15].

Aparato

Oito câmaras 5-CSRTT (Med Associates, Vermont, USA) foram utilizadas durante o experimento. Cada câmara (25 x 25 x 25 cm³) é equipada com ventilação, isolamento de som, luz ambiente opaca e dispensador de pellet. Em uma parede encontra-se reservatório de comida onde os pellets são liberados, e na parede oposta encontram-se as cinco aberturas equidistantes onde o estímulo visual é apresentado. Todas as aberturas na câmara, incluindo o reservatório de alimento, foram controladas por um feixe de fotocélulas infra-vermelhos [15].

Habituação

Vinte e quatro horas após a exposição ao campo aberto iniciou-se o processo de habituação e treinamento no 5-CSRTT. Os animais foram divididos em duplas por caixa e durante uma semana foram aclimatizados ao novo ambiente, começando o processo de habituação gradual à rotina do experimento: manipulação e pesagem diária, restrição alimentar e habituação ao aparato. Os animais foram pesados e começaram uma dieta de restrição alimentar onde o objetivo foi mantê-los com um peso entre 85-90% do seu peso em condições normais de alimentação. Os pellets foram inicialmente colocados dentro das caixas moradia para habituar o animal ao

gosto do mesmo, e depois estes foram colocados nas aberturas e no compartimento de comida dentro do aparato, para habituação ao novo ambiente. Após este período de habituação, iniciaram-se as sessões de treinamento.

Treinamento

As sessões de treinamento foram realizadas durante cinco dias semanais, e o critério para terminá-las foi completar 30 minutos de treinamento ou responder a 100 tentativas. Para se iniciar uma sessão de treinamento, o rato é colocado no aparato e então a luz do compartimento de recompensa alimentar é ligada e um pellet comestível é entregue. A partir do momento que o rato toca no compartimento para coletar o pellet, a sessão se inicia e a luz do compartimento cessa e começa a contar o tempo do intervalo entre tentativas (ITI = intertrial interval). Nesse período o animal precisa manter a atenção visual espacial nas cinco aberturas do painel, esperando o sinal luminoso que será apresentado no final do ITI. Esse sinal luminoso tem uma duração que começa longa (30 segundos) e vai diminuindo ao longo do treinamento, e após o momento que a luz cessa, ainda há um tempo limite (LH = limited hold), em que as respostas do sujeito serão consideradas. Se os animais respondem na abertura errada ou em um momento inadequado, um curto período de escuridão (TO = time out) é apresentado como punição e nenhuma recompensa é entregue. Os parâmetros utilizados em cada estágio do nosso experimento estão especificados na Tabela 1. As respostas do animal durante as sessões podem ser as seguintes [16]:

- 1) Respostas corretas: Se tocar com o nariz na abertura onde o estímulo luminoso está sendo apresentado ou foi apresentado (durante o LH), ganhando um pellet de recompensa alimentar;
- 2) Respostas incorretas: Se tocar com o nariz em qualquer abertura onde o estímulo não está sendo apresentado ou não foi apresentado (durante o LH), recebendo um TO como punição;
- 3) Respostas prematuras: Se tocar com o nariz em qualquer abertura antes do estímulo ser apresentado (durante o ITI), recebendo um TO como punição;
- 4) Respostas perseverativas: Se tocar com o nariz em qualquer abertura após já ter feito uma resposta correta ou incorreta, antes de recolher a recompensa alimentar;

- 5) Omissões de respostas: Se o animal não tiver nenhuma resposta durante a apresentação do estímulo + LH, recebendo um TO como punição;

Após ter recolhido a recompensa ou ter terminado o TO, um novo trial se inicia a partir do momento que o rato toca no compartimento alimentar. Além das diferentes respostas que o animal pode ter após a apresentação do estímulo, os feixes de fotocélulas infra-vermelhos captam ainda as velocidades nas respostas, como latência para as respostas certas, erradas e para o recolhimento da recompensa.

A análise do desempenho dos animais é realizada diariamente para saber se o animal pode passar para um nível de dificuldade maior, e este é medido pela acurácia e omissões, apresentadas em percentagem. A acurácia é a calculada a partir das respostas corretas/ (respostas corretas + incorretas) X100 e as omissões pelo número de omissões na sessão/ número de trials completados na sessão (respostas corretas + incorretas + omissões). Para o animal passar de estágio este deve ter um desempenho de mais de 80% de acurácia e menos de 20% de omissões, durante três dias de treinamento. Além das diversas variáveis que podem ser analisadas durante as respostas dos animais, o tempo que eles demoram pra terminar as sessões e o número de tentativas realizadas também podem ser critérios que demonstram a aprendizagem e a velocidade durante as respostas. Além disso, o número de sessões necessárias para os animais completarem cada estágio também é utilizado como um parâmetro de aquisição da tarefa.

2.4 Análise Estatística

Todas as análises foram realizadas por ANOVA (análise de variância) de uma via sendo o fator lesão a variável independente. Os dados foram expressos como média \pm erro e todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Statistica®.

3 Resultados

Dos 24 ratos que iniciaram o experimento, 2 HI morreram durante os eventos pós-cirúrgicos e 3 não atingiram os critérios propostos no 5-CSRTT, sendo excluídos das análises estatísticas. No grupo CT, 1 animal morreu durante o treinamento e outro demonstrou baixa performance no 5-CSRTT, também sendo eliminado da análise estatística. Assim, utilizamos 7 animais no grupo HI e 10 no CT para a

análise dos resultados.

3.1 *Teste do Campo Aberto*

A ANOVA de uma via demonstrou que não houve diferença significativa entre os grupos durante os cinco minutos de exploração no aparato, em todas as variáveis analisadas: distância total percorrida, velocidade média de deslocamento, velocidade máxima de deslocamento, tempo de mobilidade, tempo de imobilidade, número de cruzamentos, número total de rotações, número de rotações no sentido horário (ipsilateral à lesão) e número de rotações no sentido anti-horário (contralateral à lesão). Os animais apresentaram um comportamento exploratório similar, conforme mostra a Tabela 2.

3.2 *5-Choice Serial Reaction Time Task*

Fase de aquisição da tarefa

Considerando-se a variável número de sessões de treinamento necessárias para completar o critério de cada estágio, observou-se que os animais submetidos à HI necessitaram de mais sessões para completar o estágio 1 ($p=0,01$) e o estágio 3 ($p=0,02$) (Figura 1A), em relação ao grupo controle. Também foi maior no grupo HI o número total de sessões para completar todos os estágios de treinamento ($p=0,01$) (Figura 1B).

Avaliando-se a percentagem de acurácia, foram identificados menores índices desta variável nos animais submetidos à HI, nos estágios 1 e 3, comparando-se com os animais controles (Figura 2A). A percentagem de acurácia é calculada pelo número de respostas corretas/(respostas corretas + respostas incorretas) X 100. Tais variáveis foram também avaliadas e são apresentadas na figura 2B e C. A ANOVA indicou que o grupo HI apresentou menor número de respostas corretas nos estágios 2 e 3 (Figura 2B) e maior número de respostas incorretas no estágio 4 (Figura 2C).

A percentagem de omissões, fato que ocorre quando o animal não reage ao estímulo visual, foi expressivamente maior no grupo HI, em relação ao grupo controle, somente no estágio 1 (Figura 2D).

Quanto às respostas perseverativas e prematuras, as quais indicam um comportamento compulsivo e impulsivo, respectivamente, a ANOVA indicou que o

grupo HI apresentou maior número de respostas perseverativas no estágio 5, quando comparado ao grupo controle. Nos demais estágios e quanto à variável respostas prematuras, não houve diferença significativa entre os grupos (Figuras 2E e 2F).

As últimas variáveis apresentadas são o número de tentativas e o tempo necessário para completar cada sessão. A análise estatística demonstrou que no estágio 1 o grupo HI apresentou menor número de tentativas e maior tempo para completá-las por sessão, em relação ao grupo controle (Figura 2G e 2H).

4 Discussão

Este trabalho buscou relação entre a HI neonatal e o desenvolvimento das características comportamentais relacionadas ao TDAH na fase adulta em ratos, através do teste do campo aberto e *5-Choice Serial Reaction Time Task*. Os principais achados do nosso trabalho referem-se à aquisição da tarefa no 5-CSRTT, onde os animais submetidos à HI demonstraram déficits de aprendizagem e de atenção quando comparados aos animais controles, assim como um comportamento compulsivo, observado pelo maior número de respostas perseverativas. A atividade locomotora global, mensurada no campo aberto, não teve alterações quando comparada aos controles.

No presente estudo, analisamos no Teste do Campo Aberto a atividade locomotora global dos animais na fase adulta, após o evento lesivo de HI neonatal. Os resultados demonstraram um mesmo padrão de comportamento locomotor nos diferentes parâmetros avaliados. Alguns pesquisadores [17] já descreveram que não há diferenças na motricidade ampla entre animais HI e CT, durante atividades locomotoras e posturais. Embora muitos trabalhos corroborem os nossos achados [18, 19] outros demonstram que após lesões de HI, os animais apresentam um comportamento de hiperatividade, demonstrado pelo maior número de cruzamentos durante a exploração no campo aberto, quanto comparados aos controles [20, 21, 22]. Devemos considerar aqui que nosso teste foi realizado 60 dias após a lesão, e que o cérebro dos neonatos apresenta grande plasticidade [23], o que pode ter resultado em algum nível de recuperação sensório-motora. Trabalhos com remoção bilateral dos núcleos caudados (estriado) em gatos demonstrou uma hiperatividade no comportamento destes animais; no entanto, remoções unilaterais do caudado

não produziram este mesmo resultado de hiperatividade [24]. Como a lesão de HI compromete quase que exclusivamente apenas o hemisfério contralateral à isquemia, este pode ser um fator que ajude a compreender os nossos resultados.

Comprometimentos cognitivos após eventos de HI no modelo de Levine-Rice estão bem descritos na literatura científica, como déficits de memória no labirinto aquático de Morris [8, 25, 26, 27], esquiva inibitória [28], labirinto radial [29] e teste de reconhecimento de objetos [8]. Esses déficits são frequentemente relacionados com o hipocampo, que é predominantemente vulnerável à HI. Já foram descritos diminuição do volume hipocampal [7, 8, 25] e morte de neurônios piramidais da região CA1 imediatamente após a lesão [30]. Muitos destes testes utilizados para avaliar memória envolvem o componente atencional para realização das tarefas, porém não é claro na literatura se a HI pode gerar déficits de atenção e hiperatividade, tais como aqueles descritos pelo TDAH.

O *5-choice serial reaction time task* (5-CSRTT) é um teste validado na literatura científica que avalia diferentes tipos de desempenho que incluem aspectos de atenção e de inibição de comportamentos, como respostas compulsivas (perseverativas) e impulsivas (prematuras) [31]. Neste estudo, animais submetidos à HI neonatal foram treinados durante a fase adulta no 5-CSRTT para avaliação do desempenho durante a aquisição da tarefa operante e dos parâmetros atencionais relacionados à mesma. Nossos resultados demonstraram que os animais HI apresentaram déficits de aprendizagem, evidenciado pelas alterações de diversos parâmetros analisados: diminuição na acurácia, nas respostas corretas, e no número de tentativas na sessão, assim como o aumento das respostas incorretas, das percentagens de omissões e do tempo para completar a sessão, ao longo de todos os estágios de treinamento.

Ainda que inexistam trabalhos envolvendo o estudo do comportamento no 5-CSRTT, estudos envolvendo lesões de áreas cerebrais que são afetadas após HI já foram realizados. Le Pen e colaboradores [32] induziram lesão hipocampal em ratos de sete dias de idade (modelo de esquizofrenia), e analisaram o comportamento destes animais durante a fase adulta no 5-CSRTT. Durante a aquisição da tarefa, estes animais necessitaram de mais sessões de treinamento para atingir o critério proposto em todos os estágios, assim como tiveram uma diminuição da acurácia quando comparado aos controles. Os resultados apresentados neste estudo

corroboram os nossos achados e devido ao fato da lesão hipocampal deste estudo ser no 7º dia pós-natal, assim como o nosso modelo de lesão, essa comparação apresenta-se mais fidedigna. Com isso, podemos inferir que os déficits de aprendizagem observados na aquisição da tarefa no 5-CSRTT podem ser devido a um comprometimento da região hipocampal.

Sabe-se, porém, que o hipocampo não é a única estrutura encefálica acometida na lesão hipóxico-isquêmica. Danos nos núcleos da base e no córtex encefálico também são frequentemente descritas [33, 34, 35]. Estudos enfocando a atenção investigam também outras áreas encefálicas, tais como as afetadas na HI. Lesões estriatais também foram induzidas em ratos adultos [36] e o comportamento observado destes animais no 5-CSRTT mostrou uma diminuição na acurácia e no número de respostas corretas, assim como um aumento nas respostas incorretas e perseverativas. Acredita-se que o estriado tenha um papel crucial para a integração e a retransmissão de informações sensório-motoras, emocionais e cognitivas de áreas do córtex de associação para as áreas motoras inferiores, e no estabelecimento de hábitos motores através da aprendizagem associativa, uma função bem investigada em testes operantes [36]. Nestes testes, lesões estriatais resultam em perda de acurácia nas respostas associado à respostas perseverativas [37, 38]. Considerando-se que a HI também gera dano no estriado, é compreensível os achados do presente estudo.

Outro efeito da HI observado no 5-CSRTT foi o aumento do número de respostas perseverativas. É descrito na literatura que a perseveração refere-se a uma continuação inadequada ou repetição de uma resposta ou atividade [39]. Este comportamento é determinado pela incapacidade de inibir o controle cognitivo (função executiva), definido como um conjunto de funções de ordem superior que otimizam as funções de ordem inferior [40]. Este controle cognitivo parece ser mediado por circuitos fronto-estriatais, visto que lesões no estriado em ratos treinados no 5-CSRTT aumentou o número de respostas perseverativas e prematuras [41], assim como um estudo com remoção bilateral dos núcleos caudados em gatos demonstrou comportamento de perseveração em tarefas com recompensa alimentar [24]. Ratos com lesões no estriado medial podem desenvolver uma inflexibilidade de comportamento que resulta no desempenho inadequado das respostas, tais como as perseverativas [42]. Já é bem descrito na

literatura que indivíduos com TDAH apresentam falhas no controle inibitório [12, 43, 44, 45], assim como analisado no comportamento dos animais HI.

Alterações em sistemas de neurotransmissores também podem estar relacionadas com algumas características comportamentais observadas no 5-CSRTT. Alguns estudos já demonstraram que a prematuridade aumenta a incidência de TDAH [46, 47], propondo-se a isto o fato de que recém-nascidos prematuros muitas vezes experimentam episódios repetidos de hipóxia, podendo afetar os níveis de dopamina e outras monoaminas [48]. Como o desequilíbrio no sistema dopaminérgico é a teoria mais aceita para explicar o comportamento desatento no TDAH, o comprometimento deste sistema causado pela hipóxia pode contribuir com as características comportamentais relacionadas ao TDAH.

Considerando os achados deste estudo que indicam um déficit atencional e de controle inibitório a longo prazo nos animais submetidos à hipóxia-isquemia neonatal, é possível concluir que esta lesão pode estar relacionada com o desenvolvimento de TDAH ao longo do desenvolvimento. Para nosso conhecimento, a relação entre HI neonatal e o desenvolvimento de características comportamentais observadas no TDAH em pesquisa experimental, ainda não havia sido estudada. Embora alguns trabalhos cite a HI como fator de risco para o TDAH, estes estudos são escassos e de embasamento clínico.

Referências

1. Adriani W, Giannakopoulou D, Bokulic Z, Jernej B, Alleva E, Laviola G. Response to novelty, social and self-control behaviors, in rats exposed to neonatal anoxia: modulatory effects of an enriched environment. *Psychopharmacology* 2006; 184: 155–165.
2. Saucier DM, Yager JY, Armstrong, EA. Housing environment and sex affect behavioral recovery from ischemic brain damage. *Behavioural Brain Research* 2010; 214: 48–54.
3. Schulzke SM, Rao S, Patole SK. A systematic review of cooling for neuroprotection in neonates with hypoxic ischemic encephalopathy – are we there yet? *BMC Pediatrics* 2007; 7:30-38.
4. Bouet V, Freret T, Ankri S, Bezault M, Renolleau S, Boulouard M, Jacotot E, Chauvier D, Schumann-Bard P. Predicting sensorimotor and memory deficits after neonatal ischemic stroke with reperfusion in the rat. *Behav Brain Res* 2010;
5. Levine S. Anoxic–ischemic encephalopathy in rats. *Am. J. Pathol* 1960; 36:1–17.

6. Rice JE, Vannucci RC, Brierley JB. The influence of immaturity on hypoxic–ischemic brain damage in the rat 1981; *Ann. Neurol.* 9:131–141.
7. Pereira LO, Arteni NS, Petersen RC, Rocha AP, Achaval M, Netto CA. Effects of daily environmental enrichment on memory deficits and brain injury following neonatal hypoxia-ischemia in the rat. *Neurobiology of Learning and Memory* 2007; 87:101–108.
8. Pereira LO, Strapasson AC, Nabinger PM, Achaval M, Netto CA. Early enriched housing results in partial recovery of memory deficits in female, but not in male, rats after neonatal hypoxia-ischemia. *Brain Research* 2008; 1218:257-266.
9. Spandou E, Papadopoulou Z, Soubasi V, Karkavelas G, Simeonidou C, Pazaiti A, Guiba-tziampiri O. Erythropoietin prevents long-term sensorymotor deficits and brain injury following neonatal hypoxia-ischemia in rats. *Brain Research*, 2005; 1045:22-30.
10. Coutureau E, Galani R, Jarrard LE, Cassel JC. Selective lesions of the entorhinal cortex, the hippocampus, or the fimbria-fornix in rats: a comparison of effects on spontaneous and amphetamine-induced locomotion. *Experimental Brain Research* 2010; 131:381-392.
11. Skounti M, Philalithis A, Galanakis E. Variations in prevalence of attention deficit hyperactivity disorder worldwide. *Eur J Pediatr* 2007; 166: 117-23.
12. Millichap JG. Etiologic Classification of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *Pediatrics* 2008; 121;358-365.
13. Robbins TW. The 5-choice serial reaction time task: behavioural pharmacology and functional neurochemistry. *Psychopharmacology* 2002; 163:362-380.
14. Shoaib M, Bizarro L. Deficits in a sustained attention task following nicotine withdrawal in rats. *Psychopharmacology* 2005; 178:211–222.
15. Bari A, Dalley JW, Robbins TW. The application of the 5-choice serial reaction time task for the assessment of visual attentional processes and impulse control in rats. *Nat Protoc.* 2008; 3(5):759-67.
16. Lecourtier L, Kelly PH. Bilateral lesions of the habenula induce attentional disturbances in rats. *Neuropsychopharmacology* 2005; 30(3):484-96.
17. Jansen EM, Low WC. Long-term effects of neonatal ischemic-hypoxic brain injury on sensorimotor and locomotor tasks in rats. *Behavioral Brain Research* 1996, 78:189–194.
18. Pabello NG, Tracy SJ, Keller Jr RW. Protective effects of brief intra- and delayed postischemic hypothermia in a transient focal ischemia model in the neonatal rat. *Brain Res* 2004; 995:29–38.
19. McAuliffe JJ, Loepke AW, Miles L, Joseph B, Hughes E, Vorhees CV. Desflurane, isoflurane, and sevoflurane provide limited neuroprotection against neonatal

- hypoxia-ischemia in a delayed preconditioning paradigm. *Anesthesiology* 2009; 111(3):533-46.
20. Lubics A, Reglodi D, Tamas A, Kiss P, Szalai M, Szalontay L, et al. Neurological reflexes and early motor behavior in rats subjected to neonatal hypoxic-ischemic injury. *Behav Brain Res* 2005; 157:157–65.
 21. Balduini W, De Angelis V, Mazzoni E, Cimino M. Long-lasting behavioral alterations following a hypoxic/ischemic brain injury in neonatal rats. *Brain Res* 2000; 859:318–25.
 22. Lebedev SV, Volodin NN, Blinov DV, Lazarenko IP, Rogatkin SO, Chekhonin VP. Neurological deficit and disturbances in higher nervous activity during modeling of perinatal hypoxic-ischemic damage to the central nervous system in rat pups. *Bull Exp Biol Med* 2003; 136:242–5.
 23. De paula S, Vitola AF, Greggio S, De paula D, Mello PB, Lubianca JM, Xavier LL, Flori HH, Da costa JC. Hemispheric brain injury and behavioral deficits induced by severe neonatal hypoxia-ischemia in rats are not attenuated by intravenous administration of human umbilical cord blood cells. *Pediatrics Research* 2009; 65:631-635.
 24. Villablanca JR. Why do we have a caudate nucleus? *Acta Neurobiol Exp* 2010; 70(1):95-105.
 25. McAuliffe JJ, Miles L, Vorhees CV. Adult neurological function following neonatal hypoxia–ischemia in a mouse model of the term neonate: water maze performance is dependent on separable cognitive and motor components. *Brain Res* 2006; 1118:208–221.
 26. McClure MM, Threlkeld SW, Fitch RH. Auditory processing and learning/memory following erythropoietin administration in neonatally hypoxic–ischemic injured rats. *Brain Res* 2007; 1132:203–209.
 27. Kumral A, Uysal N, Tugyan K, Sonmez A, Yilmaz O, Gokmen N, Kiray M, Genc S, Duman N, Koroglu TF, Ozkan H, Genc K. Erythropoietin improves long-term spatial memory deficits and brain injury following neonatal hypoxia–ischemia in rats. *Behav Brain Res* 2004; 153:77–86.
 28. Arteni NS, Salgueiro J, Torres I, Achaval M, Netto CA. Neonatal cerebral hypoxia-ischemia causes lateralized memory impairments in the adult rat. *Brain Research* 2003; 973:171–178.
 29. Mishima K, Ikeda T, Aoo N, Takai N, Takahashi S, Egashira N, Ikenoue T, Iwasaki K, Fujiwara M. Hypoxia–ischemic insult in neonatal rats induced slowly progressive brain damage related to memory impairment. *Neurosci Lett* 2005; 376:194–199.
 30. Siegel G, Alberts RW, Brady S, Price D. *Basic neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects* 2006; Ch. 32 p. 561, Seventh Edition.

31. Chudasama Y, Passetti F, Rhodes SE, Lopian D, Desai A, Robbins TW. Dissociable aspects of performance on the 5-choice serial reaction time task following lesions of the dorsal anterior cingulate, infralimbic and orbitofrontal cortex in the rat: differential effects on selectivity, impulsivity and compulsivity. *Behav Brain Res* 2003; 30;146(1-2):105-19.
32. Le Pen G, Grottick AJ, Higgins GA, Moreau JL. Phencyclidine exacerbates attentional deficits in a neurodevelopmental rat model of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 2003; 28(10):1799-809.
33. Walton M, Connor B, Lawlor P, Young D, Sirimanne E, Gluckman P, Cole G, Dragunow M. Neuronal death and survival in two models of hypoxic-ischemic brain damage. *Brain Res Brain Res Rev* 1999; 29(2-3):137-68.
34. Kumral A, Uysal N, Tugyan K, Sonmez A, Yilmaz O, Gokmen N, Kiray M, Genc S, Duman N, Koroglu TF, Ozkan H, Genc K. Erythropoietin improves long-term spatial memory deficits and brain injury following neonatal hypoxia–ischemia in rats. *Behav Brain Res* 2004; 153:77–86.
35. Xia WJ, Yang M, Fok TF, Li K, Chan WY, Ng PC, Ng HK, Chik KW, Wang CC, Gu GJ, Woo KS, Fung KP. Partial neuroprotective effect of pretreatment with tanshinone IIA on neonatal hypoxia–ischemia brain damage. *Pediatr Res* 2005; 58:784–790.
36. Trueman RC, Brooks SP, Dunnett SB. Implicit learning in a serial choice visual discrimination task in the operant 9-hole box by intact and striatal lesioned mice. *Behav Brain Res* 2005; 30:159(2):313-22.
37. Brasted P, Humby T, Dunnett SB, Robbins TW. Unilateral lesions of the dorsal striatum in rats disrupt responding in egocentric space. *J Neurosci* 1997; 17:8919–26.
38. Brown VJ, Robbins TW. Simple and choice reaction time performance following unilateral striatal dopamine depletion in the rat. Impaired motor readiness but preserved response preparation. *Brain* 1991; 114:513–25.
39. Hotz G, Helm-Estabrooks N. Perseveration. Part I: a review. *Brain Inj* 1995; 9(2):151-9.
40. Miller EK, Cohen JD. An integrative theory of prefrontal cortex function. *Annu Rev Neurosci* 2001; 24:167–202.
41. Rogers RD, Baunez C, Everitt BJ, Robbins TW. Lesions of the medial and lateral striatum in the rat produce differential deficits in attentional performance. *Behavioral Neuroscience* 200; 115:799–811.
42. Eagle DM, Robbins TW. Inhibitory control in rats performing a stop-signal reaction-time task: effects of lesions of the medial striatum and d-amphetamine. *Behav Neurosci* 2003; 117(6):1302-17.

43. Demakis GJ. A meta-analytic review of the sensitivity of the Wisconsin Card Sorting Test to frontal and lateralized frontal brain damage. *Neuropsychology* 2003; 17:255–64.
44. Pliszka SR, Glahn DC, Semrud-Clikeman M, et al. Neuroimaging of inhibitory control areas in children with attention deficit hyperactivity disorder who were treatment naive or in longterm treatment. *Am J Psychiatry* 2006; 163(6):1052–1060.
45. Diamond A. Neuropsychological insights into the meaning of object concept development. *The epigenesis of mind: essays on biology and cognition* 1991; Hillsdale (NJ): Lawrence Erlbaum. p 67–110.
46. Lou HC. Etiology and pathogenesis of attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD): significance of prematurity and perinatal hypoxic-haemodynamic encephalopathy. *Acta Paediatr* 1996 Nov; 85(11):1266-71.
47. Mick E, Biederman J, Faraone SV, Sayer J, Kleinman S. Casecontrol study of attention-deficit hyperactivity disorder and maternal smoking, alcohol use, and drug use during pregnancy. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 2002; 41(4):378–385
48. Kalaria RN, Fiedler C, Hunsaker JC, Sparks DL. Synaptic neurochemistry of human striatum during development—changes in sudden-infant-deaths syndrome. *J Neurochem* 1993; 60:2098–105.

APÊNDICES

Tabela 1. Parâmetros dos diferentes estágios de treinamento no 5-CSRTT.

Estágio de treinamento	Duração do estímulo	ITI	LH	Critério para passar de estágio
1	30	2	30	>80% Acurácia <20% Omissões
2	20	2	20	>80% Acurácia <20% Omissões
3	10	5	10	>80% Acurácia <20% Omissões (em 3 sessões)
4	5	5	5	>80% Acurácia <20% Omissões (em 3 sessões)
5	2.5	5	5	>80% Acurácia <20% Omissões (em 3 sessões)

Tabela 2. Performance durante a atividade exploratória dos animais CT e HI durante 5 minutos no Campo Aberto. Dados representam média \pm erro de animais sham (n=7) e controle (n=10).

Parâmetros	Controle (CT)	Hipóxia-Isquemia (HI)
Distância percorrida (m)	16,22 \pm 1,57	18,30 \pm 1,01
Vel média (m/s)	0,054	0,061
Tempo mobilidade (s)	181,28 \pm 16,04	206,44 \pm 16,34
Tempo imobilidade (s)	118,72 \pm 16,04	93,55 \pm 16,34
Cruzamentos	195,1 \pm 16,48	207,71 \pm 14,88
Velocidade máxima (m/s)	0,73 \pm 0,03	0,79 \pm 0,04
Nº de rotações	11,6 \pm 1,06	12,42 \pm 0,71
Rotações ipsilaterais à lesão	6,7 \pm 0,78	5,85 \pm 1,1
Rotações contralaterais à lesão	4,9 \pm 0,45	6,57 \pm 0,84
Rearings	34,4 \pm 4, 06	36,85 \pm 6,16
Tempo periferia (s)	290,38 \pm 2,24	290,62 \pm 2,33
Tempo central (s)	9,62 \pm 2,24	9,37 \pm 2,33

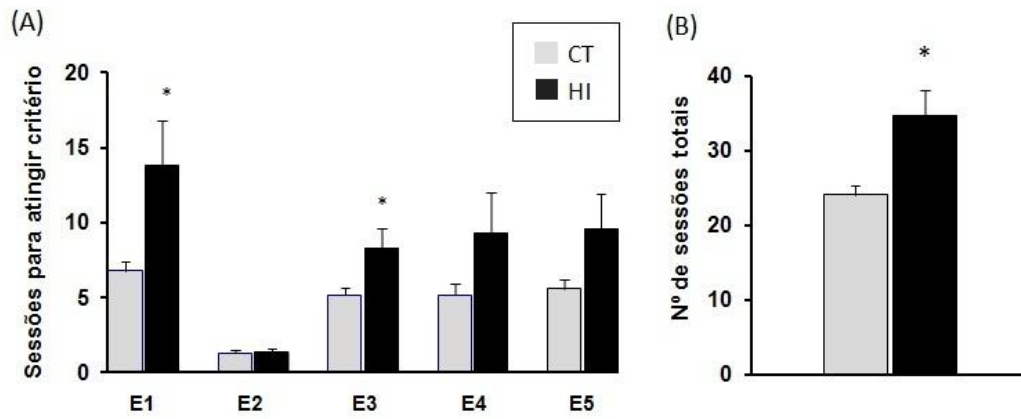


Figura 1. Sessões de treinamento necessárias para atingir os critérios propostos nos 5 estágios - E1, E2, E3, E4 e E5 (A) e nas sessões totais até completar o último estágio (B) durante o 5-CSRTT. O critério para o estágio 1 e 2 era atingir >80% de acurácia e <20% de omissões em uma sessão, e a partir do estágio 3 esse mesmo critério foi proposto mas para três sessões de treinamento. Dados representam média \pm erro de animais sham (n=7) e controle (n=10). * $p < 0,05$ (ANOVA de uma via).

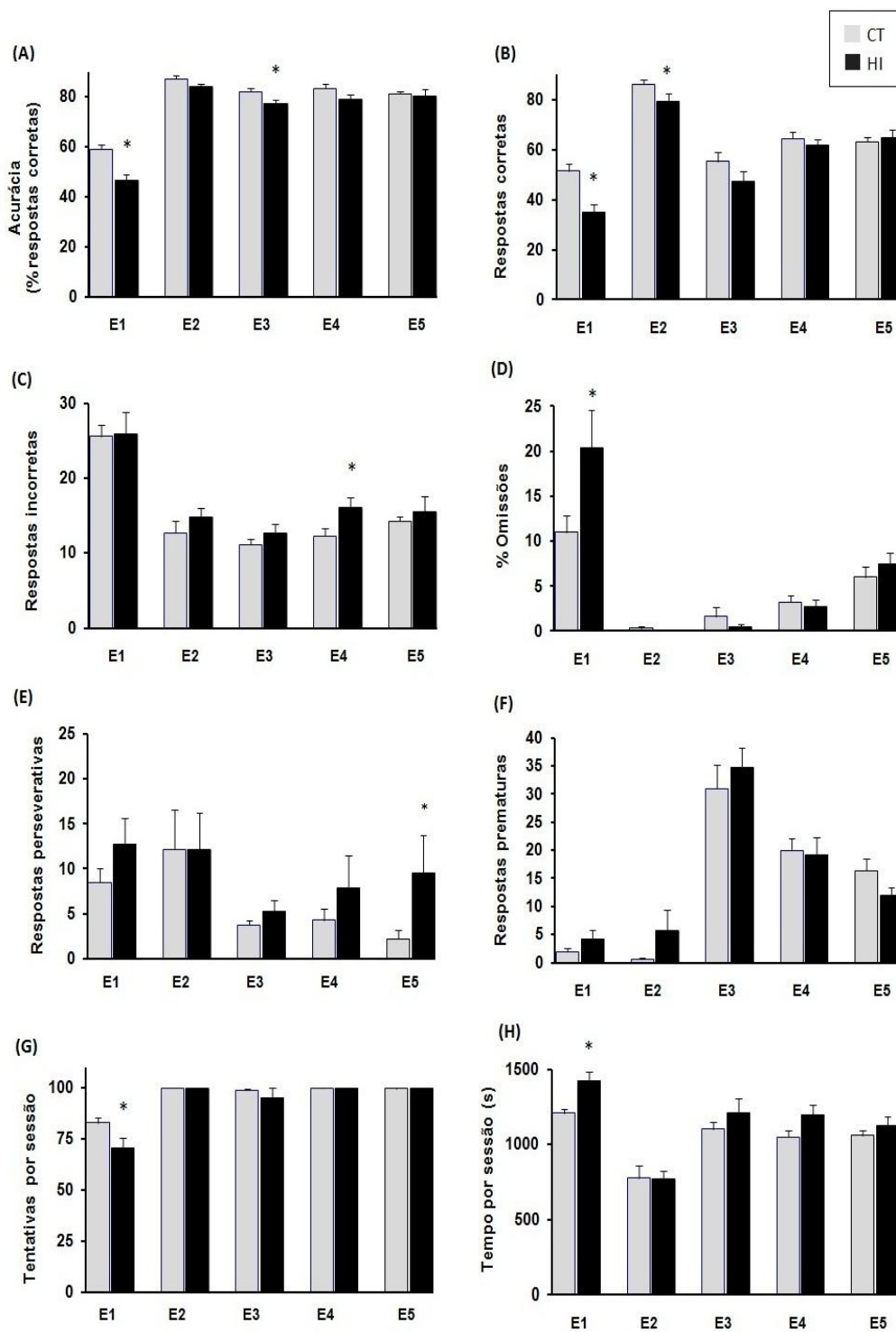


Figura 2. Performance dos animais durante a aquisição da tarefa no 5-CSRTT, nos 5 estágios de treinamento (E1, E2, E3, E4 e E5). Os parâmetros avaliados foram: acurácia (a), respostas corretas (b), incorretas (c), % omissões (d), respostas perseverativas (e), prematuras (f), tentativas (g) e tempo (h) por sessão. Dados representam média ± erro de animais sham (n=7) e controle (n=10). *p<0,05 (ANOVA de uma via).

3 CONCLUSÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Encontramos neste trabalho um déficit de controle inibitório, assim como déficits de aprendizagem, nos animais adultos submetidos à HI neonatal, quando comparado aos controles. Estes resultados observados no 5-CSRTT foram os seguintes:

- Maior número de sessões de treinamento necessárias para completar os critérios de cada estágio
- Menores índices de acurácia, assim como de respostas corretas
- Maiores índices de omissões
- Maior número de respostas perseverativas
- Menor número de tentativas completadas nas sessões
- Maior tempo para completar as sessões

Na análise da atividade locomotora global no teste do campo aberto, não verificamos diferenças significativas entre os grupos. Considerando os achados deste estudo que indicam um déficit de controle inibitório nos animais submetidos à hipóxia-isquemia neonatal, e sabendo que falhas no controle inibitório são comuns em pacientes com síndromes disexecutivas, como o TDAH, é possível concluir que esta lesão pode estar relacionada com o desenvolvimento de TDAH ao longo do desenvolvimento.

Os resultados que obtivemos no 5-CSRTT envolvem principalmente a aprendizagem da tarefa neste aparato. Embora seja necessária a atenção quando os parâmetros mudam de estágio para estágio, a análise desta é principalmente mensurada nos estágios finais, quando os animais atingem um desempenho estável e os parâmetros são manipulados de forma variada. Os resultados mostrados neste trabalho envolvem apenas a primeira parte do nosso estudo, que ainda está em desenvolvimento.

Análises histológicas dos encéfalos dos animais utilizados no nosso estudo devem ser realizadas para comprovação da lesão e do tamanho da mesma. Posteriormente, para compreensão dos mecanismos envolvidos na relação entre hipóxia-isquemia e transtorno de déficit de atenção e hiperatividade, análises dos sistemas dopaminérgicos e glutamatérgicos devem ser realizadas.

REFERÊNCIAS ADICIONAIS

1. Pierrat V, Haouari N, Liska A, Thomas D, Subtil D, Truffert P. Prevalence, causes, and outcome at 2 years of age of newborn encephalopathy: population based study. *Arch Dis Child* 2005; 90:F257–61.
2. Volpe JJ. Neurobiology of periventricular leukomalacia in the premature infant. *Pediatr Res* 2001; 50: 553–562.
3. Lawn JE, Cousens S, Zupan J. Lancet neonatal survival steering team: Four million neonatal deaths: When? Where? Why? *Lancet* 2005; 365:891–900
4. Saucier DM, Yager JY, Armstrong, EA. Housing environment and sex affect behavioral recovery from ischemic brain damage. *Behavioural Brain Research* 2010; 214: 48–54.
5. Schulzke SM, Rao S, Patole SK. A systematic review of cooling for neuroprotection in neonates with hypoxic ischemic encephalopathy – are we there yet? *BMC Pediatrics* 2007; 7:30-38.
6. Vannucci RC, Vannucci SJ: Perinatal Hypoxic-Ischemic Brain Damage: Evolution of an Animal Model. *Dev Neurosci* 2005; 27:81-86
7. Adriani W, Giannakopoulou D, Bokulic Z, Jernej B, Alleva E, Laviola G. Response to novelty, social and self-control behaviors, in rats exposed to neonatal anoxia: modulatory effects of an enriched environment. *Psychopharmacology* 2006 184:155–165.
8. Pimentel-Coelho PM, Magalhaes ES, Lopes LM, de Azevedo LC, Santiago MF, Mendez-Otero R. Human cord blood transplantation in a neonatal rat model of hypoxic-ischemic brain damage: functional outcome related to neuroprotection in the striatum. *Stem Cells* 2010; 19: 351–58.
9. Berger R, Garnier Y. Pathophysiology of perinatal brain damage. *Brain Res Brain Res Rev* 1999; 30:107-134.
10. Williams LJ, Lucci AP. Placental examination can help determine cause of brain damage in neonates. *Texas Medicine*, 1990; 86 (1):33-38.
11. Jensen FE. The role of glutamate receptor maturation in perinatal seizures and brain injury. *International Journal of Developmental Neuroscience* 2002; 20(3-5):339-347.
12. Fatemi A, Wilson MA, Johnston MV. Hypoxic Ischemic Encephalopathy in the Term Infant. *Clin Perinatol* 2009; 36(4):835-58
13. Sherman MP. Interventions for perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatrics* 1998; 102:662.
14. Golan H, Huleihel M. The effect of prenatal hypoxia on brain development: Short and long-term consequences demonstrated in rodent models. *Development Science* 2006; 9:338-349.

15. Perlman JM. Brain injury in the term infant. *Seminars in Perinatology* 2004; 28:415-424.
16. Mclean C, Ferriero D. Mechanisms of Hypoxic-Ischemic Injury in the Term Infant. *Seminars in Perinatology* 2004; 28:425-432.
17. Kelmendi B, Saricicek A, Sanacora G. The role of the glutamatergic system in the pathophysiology and treatment of mood disorders. *Primary Psychiatry* 2006; 13(10):80-86.
18. Johnston MV, Fatemi A, Wilson MA, Northington F. Treatment advances in neonatal neuroprotection and neurointensive care. *Lancet Neurol* 2011; 10(4):372-82.
19. Sanders RD, Manning HJ, Robertson NJ, Ma D, Edwards AD, Hagberg H, Maze M. Preconditioning and postinsult therapies for perinatal hypoxic-ischemic injury at term. *Anesthesiology* 2010; 113:233– 49
20. Lai MC, Yang SN. Perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *J Biomed Biotechnol* 2011; 2011:609813.
21. Fan X, Kavelaars A, Heijnen CJ, Groenendaal F, van Bel F. Pharmacological neuroprotection after perinatal hypoxic-ischemic brain injury. *Curr Neuropharmacol* 2010; 8(4):324-34.
22. Dammann O, O'Shea TM. Cytokines and perinatal brain damage. *Clin Perinatol* 2008; 35(4):643–663.
23. Savman K, Blennow M, Gustafson K, Tarkowski E, Hagberg H. Cytokine response in cerebrospinal fluid after birth asphyxia. *Pediatr Res Jun*1998; 43(6):746–751.
24. Leonardo CC, Pennypacker KR. Neuroinflammation and MMPs: potential therapeutic targets in neonatal hypoxic-ischemic injury. *J Neuroinflammation* 2009; 15;6:13.
25. Araújo AS, Pacheco SS, Oliveira AG, Imizumi C, Abreu LC. Hypothermy as a protective strategy in asphyxiated newborns after hypoxic-ischemic encephalopathy. *Revista Brasileira de Crescimento e Desenvolviemtno Humano* 2008; 18(3):346-358.
26. Maginn M, Kelly JP, Leonard BE. Protective effects of vanoxeamine (GBR 12909) against ischaemia-induced hyperactivity and neurodegeneration in the gerbil model of cerebral ischaemia. *Pharmacol Biochem Behav* 1997; 56(4):727-35.
27. Rice JE, Vannucci RC, Brierley JB. The influence of immaturity on hypoxic–ischemic brain damage in the rat. *Ann Neurol* 1981; 9:131–141.
28. Yager JY. Animal models of hypoxic-ischemic brain damage in the newborn. *Seminars in Pediatric Neurology* 2004; 11:31-46.
29. McDonald JW, Silverstein FS, Cardona D, Hudson C, Chen R, Johnston MV. Systemic administration of mk-801 protects against n-methyl-d-aspartate and quisqualate-mediated neurotoxicity in perinatal rats. *Neuroscience* 1990; 36:589–599.

30. Vannucci RC. Hypoxic-ischemic encephalopathy. *American Journal of Perinatology* 2000; 17:113-120.
31. Byl N, Roderick J, Mohamed O, Hanny M, Kotler J, Smith A, Tang M, Abrams G. Effectiveness of sensory and motor rehabilitation of the upper limb following the principles of neuroplasticity: patients stable poststroke. *Neurorehabil Neural Repair* 2003; 17(3):176-91.
32. Levine S. Anoxic–ischemic encephalopathy in rats. *Am J Pathol* 1960; 36:1–17.
33. Vannucci RC, Vannucci SJ. A model of perinatal hypoxic-ischemic brain Damage. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1997; 835:234-249.
34. Arteni NS, Salgueiro J, Torres I, Achaval M, Netto CA. Neonatal cerebral hypoxia-ischemia causes lateralized memory impairments in the adult rat. *Brain Research* 2003; 973:171–178.
35. Pereira LO, Arteni NS, Petersen RC, Rocha AP, Achaval M, Netto CA. Effects of daily environmental enrichment on memory deficits and brain injury following neonatal hypoxia-ischemia in the rat. *Neurobiology of Learning and Memory* 2007; 87:101–108.
36. Vannucci RC, Vannucci SJ. Perinatal hypoxic-ischemic brain damage: evolution of an animal model. *Developmental Neuroscience* 2005; 27:81-86.
37. Pereira LO, Strapasson AC, Nabinger PM, Achaval M, Netto CA. Early enriched housing results in partial recovery of memory deficits in female, but not in male, rats after neonatal hypoxia-ischemia. *Brain Research* 2008; 1218:257-266.
38. Spandou E, Papadopoulou Z, Soubasi V, Karkavelas G, Simeonidou C, Pazaiti A, Guiba-tziampiri O. Erythropoietin prevents long-term sensorymotor deficits and brain injury following neonatal hypoxia-ischemia in rats. *Brain Research*, 2005; 1045:22-30.
39. Coutureau E, Galani R, Jarrard LE, Cassel JC. Selective lesions of the entorhinal cortex, the hippocampus, or the fimbria-fornix in rats: a comparison of effects on spontaneous and amphetamine-induced locomotion. *Experimental Brain Research* 2000; 131:381-392.
40. Lima JMB. Transtorno do déficit de atenção/hiperatividade e síndrome alcoólica fetal: peculiar associação nosológica. *Arquivos brasileiros de psiquiatria, neurologia e medicina legal* 2005. Vol. 99 nº 02.
41. Scherer EB, da Cunha MJ, Matté C, Schmitz F, Netto CA, Wyse AT. Methylphenidate affects memory, brain-derived neurotrophic factor immunoccontent and brain acetylcholinesterase activity in the rat. *Neurobiol Learn Mem* 2010; 94(2):247-53.
42. Berger I. Diagnosis of attention deficit hyperactivity disorder: much ado about something. *Isr Med Assoc J* 2011;13(9):571-4.
43. Lynskey MT, Hall W. Attention deficit hyperactivity disorder and substance use disorders: Is there a causal link? *Addiction* 2001; 96(6):815-22.

44. Millichap JG. Etiologic Classification of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *Pediatrics* 2008; 121;358-365.
45. Solanto MV. Neuropsychopharmacological mechanisms of stimulant drug action in attention-deficit hyperactivity disorder: a review and integration. *Behav Brain Res* 1998; 94(1):127-52.
46. Castellanos FX, Tannock R. Neuroscience of attention-deficit/hyperactivity disorder: the search for endophenotypes. *Nat Rev Neurosci* 2002; 3(8):617-28.
47. Warton FL, Howells FM, Russell VA. Increased glutamate-stimulated release of dopamine in substantia nigra of a rat model for attention-deficit/hyperactivity disorder—lack of effect of methylphenidate. *Metab Brain Dis* 2009; 24(4):599-613.
48. Millichap JG. Etiologic Classification of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *Pediatrics* 2008; 121;358-365.
49. Lou HC. Etiology and pathogenesis of attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD): significance of prematurity and perinatal hypoxic-haemodynamic encephalopathy. *Acta Paediatr* 1996; 85(11):1266-71.
50. Mick E, Biederman J, Faraone SV, Sayer J, Kleinman S. Casecontrol study of attention-deficit hyperactivity disorder and maternal smoking, alcohol use, and drug use during pregnancy. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2002; 41(4):378–38.
51. Kalaria RN, Fiedler C, Hunsaker JC, Sparks DL. Synaptic neurochemistry of human striatum during development—changes in sudden-infant-deaths syndrome. *J Neurochem* 1993; 60:2098–105.
52. Rosa Neto P, Lou H, Cumming P, Pryds O, Gjedde A. Methylphenidate-evoked potentiation of extracellular dopamine in the brain of adolescents with premature birth: correlation with attentional deficit. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 965:434-9.
53. Lou HC, Rosa P, Pryds O, Karrebaek H, Lunding J, Cumming P, Gjedde A. ADHD: increased dopamine receptor availability linked to attention deficit and low neonatal cerebral blood flow. *Dev Med Child Neurol* 2004; 46(3):179-83.
54. Robbins TW. The 5-choice serial reaction time task: behavioural pharmacology and functional neurochemistry. *Psychopharmacology* 2002; 163:362-380.
55. Shoaib M, Bizarro L. Deficits in a sustained attention task following nicotine withdrawal in rats. *Psychopharmacology* 2005; 178:211–222
56. Bari A, Dalley JW, Robbins TW. The application of the 5-choice serial reaction time task for the assessment of visual attentional processes and impulse control in rats. *Nat Protoc* 2008; 3(5):759-67.
57. Levin ED, Bushnell PJ, Rezvani AH. Attention-modulating effects of cognitive enhancers. *Pharmacol Biochem Behav* 2011; 99(2):146-54.