



**DÉFICIT DE ATENÇÃO E IMPULSIVIDADE EM RATOS SUBMETIDOS À HIPÓXIA-
ISQUEMIA NEONATAL**

Juliana Raquel Jaboinski

Dissertação de Mestrado

Porto Alegre, março de 2014

**DÉFICIT DE ATENÇÃO E IMPULSIVIDADE EM RATOS SUBMETIDOS À HIPÓXIA-
ISQUEMIA NEONATAL**

Juliana Raquel Jaboinski

Dissertação apresentada como requisito parcial para
obtenção do título de Mestrado em Psicologia sob
orientação da Profa. Dra. Lisiane Bizarro

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Instituto de Psicologia

Programa de Pós-Graduação em Psicologia

Laboratório de Psicologia Experimental, Neurociências e Comportamento

Março, 2014

Agradecimentos

Sou grata à minha família que possibilitou de todas as formas que eu concluísse essa etapa. Por todos os sacrifícios e privações que tiveram que experienciar para que eu pudesse seguir no desejo da pós-graduação.

Agradeço aos colegas de laboratório Luís, Roberto, Mailton e Guto que foram generosos e compreensivos ao me auxiliarem quando não pude estar presente. Sou imensamente grata à Lisi pela orientação atenciosa, competente e paciente, pela forma como exige de seus alunos fomentando nosso processo de formação. Aos demais colegas: Keiti, que é inspiradora, Vanessa pelo apoio e simpatia, obrigada.

Aos amigos da minha praia do coração Gabriele, Verônica e Renan pela paciência em meus momentos de medo e insegurança. Pelo apoio que me prestaram e motivação que me obrigaram a ter quando tive vontade de desistir.

Agradeço também ao grupo de pesquisa da Profa. Dra. Lenir Orlandi, pela parceria nesse trabalho, ao Ramiro e Patrícia pelo auxílio com os animais pela troca de informações.

Sumário

Lista de Tabelas	5
Lista de Figuras	6
RESUMO	7
ABSTRACT	8
INTRODUÇÃO	9
Hipóxia-isquemia.....	9
Procedimento Experimental de Hipóxia-isquemia encefálica	9
Tarefa de tempo de reação serial de cinco escolhas (5-CSRTT).....	10
OBJETIVO GERAL	13
Objetivos específicos	13
MÉTODO	13
Sujeitos.....	13
Procedimento Experimental de Hipóxia-Isquemia encefálica.....	14
Equipamentos.....	15
Tarefa de tempo de reação serial de cinco escolhas (5-CSRTT).....	15
Procedimentos	16
Análise estatística	20
RESULTADOS	21
Aquisição da tarefa	21
Acurácia	23
Prematuras	23
Perseverativas	23
Omissões.....	24
Trials	24
Tempo	24
Latência de Recompensa	24
Latência de corretas	25
Latência de incorretas	25
DISCUSSÃO	26
CONCLUSÃO	30
REFERÊNCIAS	32

Lista de Tabelas

Tabela 1. <i>Construtos avaliados pela 5-CSRTT e a forma como são aferidos.....</i>	<i>19</i>
---	-----------

Lista de Figuras

Figura 1: <i>Procedimento de hipóxia-isquemia encefálica de Levine-Rice</i>	14
Figura 2: <i>Arranjo espacial da caixa de 5-CSRTT</i>	15
Figura 3: <i>Cronograma experimental</i>	20
Figura 4: <i>Número médio de sessões por estágio</i>	Error! Bookmark not defined.
Figura 5: <i>Desempenho nas sessões de teste</i>	22

Déficit de atenção e impulsividade em ratos submetidos à hipóxia-isquemia neonatal

Título em inglês: Attentional deficits and impulsivity in animals submitted to neonatal hypoxic-ischemia procedure

Autores: Juliana Raquel Jaboinski, Lisiane Bizarro

RESUMO

Esse trabalho objetivou avaliar déficits cognitivos (e.g., atenção, impulsividade, motivação e comportamento compulsivo) em animais submetidos ao procedimento de hipóxia-isquemia no sétimo dia pós-natal. A partir do sexagésimo dia pós-natal foi iniciado o treinamento na tarefa de tempo de reação serial de cinco escolhas (5CSRTT). Os resultados encontrados apontam que os animais que passaram pelo procedimento de HI apresentaram déficit de aprendizagem, interpretado pelo significativo aumento no número de sessões de treino para avançar nos estágios da tarefa. Dificuldades atencionais também foram verificadas pelo índice de acurácia significativamente menor do grupo experimental. A dificuldade atencional foi acompanhada por impulsividade observada pelo aumento de respostas prematuras do grupo HI, bem como aumento da latência de respostas corretas e de recompensa. Conclui-se que os animais HI possuem déficit de aprendizagem, prejuízo atencional e impulsividade. O modelo de HI é uma ferramenta útil para estudar o impacto de processos hipóxico-isquêmicos em neonatos em longo prazo, bem como auxiliar no entendimento de outras patologias que apresentam sintomatologia similar.

Palavras-chave: *déficit de atenção, impulsividade, hipóxia-isquemia neonatal, 5CSRTT*

ABSTRACT

This work aimed to evaluate cognitive deficits (e.g. attention, impulsivity, motivation and compulsive behavior) in rats submitted to the hypoxic-ischemia (HI) procedure on the seventh postnatal day. Training in the 5 choice serial reaction time task (5CRSTT) started on the sixtieth postnatal day. The results suggest that the animals that went through the HI procedure showed impaired learning, interpreted through the significant increase in the number of training sessions necessary to progress through the stages of the task. Attentional deficits were also observed through the significantly inferior accuracy index shown by the experimental group. This attentional impairment was accompanied by high impulsivity observed through the increase in premature responses by the HI group, as well as by the increase in the late latency of correct responses and latency of reward. So, we conclude that the experimental group presented impaired learning, attention and impulsivity. Therefore the HI model is a useful tool in the study of the long term impact of neonatal hypoxic-ischemia events, as well as in the understanding of other pathologies that show similar symptomatology.

Keywords: *attentional deficit, impulsivity, neonatal hypoxi-ischemia , 5CRSTT*

INTRODUÇÃO

Hipóxia-isquemia

A Hipóxia-isquemia neonatal (HI) é um importante problema obstétrico mesmo em países desenvolvidos. Metade das crianças que passam por um evento hipóxico-isquêmico apresenta alguma seqüela neurológica mesmo quando os melhores recursos estão disponíveis. Dentre todas as complicações a HI é responsável por 10 a 20% dos casos de paralisia cerebral, embora o número de óbitos esteja caindo a HI neonatal ainda implica em danos cerebrais (Doi et al., 2012). O processo hipóxico isquêmico também pode resultar em diversas patologias debilitantes a longo prazo como, por exemplo, a epilepsia, a paralisia cerebral dentre outros déficits cognitivos e, em menor escala, motores (Lindström et al., 2008).

A HI neonatal pode ser causada por complicações da gravidez e do parto e asfixia fetal, (Evrard, 2001) sendo essa a causa mais comum e amplamente investigada (Pimentel-Coelho et al., 2010). 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 (Lj & Ap, 1990). Distúrbios metabólicos culminando em estresse oxidativo, reações inflamatórias e excitotoxicidade são fatores patológicos que implicam em lesão cerebral após HI (Fatemi, Wilson, & Johnston, 2009). O dano cerebral hipóxico-isquêmico é um processo progressivo, o qual se inicia durante o dano ao sistema nervoso central e prolonga-se no período de recuperação após a lesão por reperfusão (Busl & Greer, 2010).

Procedimento Experimental de Hipóxia-isquemia encefálica

O procedimento experimental de hipóxia-isquemia encefálica (HI) realizado em ratos tem sido amplamente estudado por mais de três décadas e utilizado para avaliações histológicas e comportamentais (Pereira et al., 2007; Rice, Vannucci, & Brierley, 1981). Essa estratégia foi desenvolvida com o intuito de mimetizar a encefalopatia hipóxico-isquêmica em laboratório, e, dessa forma, investigar a patologia e possíveis ferramentas terapêuticas. O procedimento de HI é uma alternativa para estudar a relação entre a hipoperfusão em áreas cerebrais (e.g. hipocampo e córtex) e os prejuízos cognitivos e comportamentais comumente observados em diversas patologias (e.g. TDAH e esquizofrenia) (Chudasama & Robbins, 2004; Sagvolden, Russell, Aase, Johansen, & Farshbaf, 2005). O procedimento experimental é realizado no 7º dia de vida pós-natal. Nesse momento o encéfalo de roedores corresponde, em nível de desenvolvimento, ao

encéfalo dos humanos ao nascimento, quando a camada neuronal do córtex está completa (Vannucci & Vannucci, 2005)

Esse modelo de HI proposto por Levine em 1960 (Levine, 1960) e modificado por Rice e seus colaboradores (Rice et al., 1981) apresenta várias vantagens, a saber: causa baixa mortalidade, é bastante reproduzível e de custo acessível. Além disso, esse procedimento produz dano cerebral em 90% dos casos e permite a recuperação do fluxo sanguíneo mesmo após a oclusão da carótida (Walton et al., 1999). As estruturas mais prejudicadas com o procedimento são o córtex cerebral, estriado (núcleos da base), hipocampo, tálamo, tronco encefálico e substância branca periventricular e subcortical (Vannucci, 2000).

Após ampla utilização desse modelo de HI experimental, recentes revisões demonstram implicações, sobretudo, cognitivas (e.g. memória, atenção, aprendizagem) (Lu-Emerson & Khot, 2010, Anderson & Arciniegas 2010). As tarefas utilizadas para essas avaliações serão esclarecidas oportunamente. Entretanto, ainda há escassez de estudos comportamentais mais completos e controlados, sobretudo no que tange o impacto da HI sobre os processos atencionais e sobre a impulsividade. A tarefa descrita em seguida nos permite robusta avaliação dessas medidas comportamentais.

Tarefa de tempo de reação serial de cinco escolhas (5-CSRTT)

A tarefa de tempo de reação serial de cinco escolhas (do inglês Five Choice Serial Reaction Time Task - 5-CSRTT) é baseada na tarefa de performance contínua (CPT) desenvolvida para avaliar prejuízos atencionais em indivíduos com esquizofrenia (Beck et al., 1956), e foi adaptada para roedores por Carli e colaboradores em 1983 (Carli, Robbins, Evenden, & Everitt, 1983). A 5-CSRTT consiste numa caixa operante na qual existem 5 aberturas na parede anterior equipadas com lâmpadas de led e um alimentador na parede posterior. Os animais devem detectar o estímulo luminoso em uma das aberturas, iluminadas randomicamente, e responder corretamente a esse estímulo para então serem recompensados com um pellet de açúcar. Quando realizam respostas incorretas, antecipadas ou não realizam nenhuma resposta, são punidos por segundos de escuridão total na caixa operante. (Bari, Dalley, & Robbins, 2008).

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). A possibilidade de uma coleta de dados

extensa, com um número de variáveis expressivo e interdependente em uma performance contínua também fornece informações robustas acerca do desempenho cognitivo do animal.

O desempenho na 5-CSRTT está relacionado com as habilidades de controle atencional, incluindo atenção seletiva, sustentada e dividida. Diversos dados resultantes da tarefa podem ser de interesse no estudo da atenção: acurácia de respostas, número de erros, número de respostas prematuras, latências de resposta e de coleta da recompensa, entre outros. No formato convencional, o teste é bastante útil para medir os efeitos das manipulações sobre a atenção sustentada e dividida (Robbins, 2002). No entanto, outras manipulações (como o acréscimo de ruído na sessão de teste) podem aumentar a gama de resultados, avaliando, por exemplo, a atenção seletiva, uma vez que o animal deve selecionar o estímulo correto em meio a outro estímulo distrator (Bari et al., 2008; Robbins, 2002).

A latência de respostas pode ser medida com grande precisão, embora a interpretação dessa medida dependa das demais variáveis envolvidas (e.g. motivação, fatores motores ou ambientais) (Lloyd et al., 2013). A interpretação dos erros por omissão igualmente depende das manipulações realizadas e das variáveis às quais está exposto o animal e podem refletir fatores sensoriais, motores ou motivacionais. A motivação para realizar a tarefa está atrelada à latência para coletar o reforço: o pellet de açúcar disponibilizado no orifício alimentador. Assim, se o animal apresenta alterações significativas na latência de respostas, mas não na latência de recolhimento do reforço, a hipótese de diminuição na motivação perde espaço para a hipótese de alterações sensoriais ou motoras (Bari et al., 2008)

Respostas prematuras são aquelas que ocorrem antes do surgimento do estímulo-alvo. Elas sugerem uma diminuição desadaptativa no controle inibitório e são interpretadas como impulsividade (Bird & Schenk, 2013; McNamara, Dalley, Robbins, Everitt, & Belin, 2010). Já o comportamento perseverativo, por sua vez, é outra manifestação da diminuição do controle inibitório. Ocorre quando o animal continua respondendo nos orifícios após a apresentação do reforço (Bari et al., 2008; Robbins, 2002) (Murphy, Dalley, & Robbins, 2005)

A relativa simplicidade da tarefa da 5-CSRTT possibilita uma enorme gama de manipulações possíveis, as quais têm sido experimentadas por pesquisadores de diversas áreas. Dentre elas manipulações farmacológicas (Lu et al., 2013) (Koskinen & Sirviö, 2001), efeitos de substâncias psicoestimulantes (Bizarro & Stolerman, 2003), avaliações em animais submetidos à lesões específicas (Muir, Everitt, & Robbins, 1996), bem como avaliação de modelos de diversas

doenças como a esquizofrenia (Chudasama & Robbins, 2004) e o TDAH (Sagvolden et al., 2005).

Embora haja inúmeros argumentos que apoiam a utilização da 5-CSRTT, publicações que tenham testado o modelo de HI neonatal nessa tarefa ainda são escassos. Entretanto, trabalho recente realizado em nosso laboratório, porém ainda não publicado, demonstrou que animais HI apresentaram prejuízo na aquisição e no desempenho em uma tarefa de atenção. Além disso, esses animais apresentaram um número significativo de respostas perseverativas na mesma tarefa. O aumento de respostas perseverativas tem sido encontrado em diversos modelos animais e interpretado como um comportamento repetitivo estereotipado (Garner, 2005). Esse comportamento podem ser avaliados através da 5-CSRTT.

Outros déficits cognitivos decorrentes da HI foram demonstrados e compreendem, principalmente, prejuízos de memória espacial (Wang, Zhou, Shao, & Tang, 2002) em tarefas como o labirinto aquático de Morris (McAuliffe, Miles, & Vorhees, 2006), labirinto radial de oito braços (Mishima et al., 2005). Outros processos cognitivos também parecem ser afetados pela HI. Um estudo utilizando quatro tarefas que envolviam processos de aprendizagem, memória e atenção demonstrou que os animais HI apresentaram prejuízo na aprendizagem, ou seja, na aquisição da tarefa. Os animais experimentais também tiveram desempenho prejudicado na tarefa de reação serial de escolhas, sugerindo prejuízos atencionais. Com relação à memória, avaliada através do labirinto em cruz elevado e do labirinto aquático de Morris, esses animais também tiveram desempenho inferior com relação aos controles, sobretudo na memória de referência (Ikeda et al., 2001).

Diante disso, esse trabalho pretendeu replicar os déficits de aquisição e aprendizagem já observados e avaliar outras variáveis (e.g. atenção, impulsividade, comportamento compulsivo e motivação) através da 5-CSRTT. Também foi testado protocolo de treinamento diferenciado daquele que já foi utilizado em animais HI, com o intuito de ressaltar as diferenças entre o grupo pela supressão de excesso de treinamento. Por fim, objetivou-se analisar os déficits provocados pela HI e discutir a possibilidade desse modelo ser uma ferramenta útil no estudo de outras patologias que dividem sintomatologia semelhante, por exemplo: autismo, TDAH e esquizofrenia.

OBJETIVO GERAL

O objetivo geral desse trabalho foi avaliar parâmetros cognitivos (e.g. atenção e impulsividade) em ratos submetidos ao procedimento de HI neonatal através de uma tarefa de performance contínua, a 5CSRTT.

Objetivos específicos

- Investigar parâmetros já observados durante a execução da tarefa buscando maior compreensão dos resultados encontrados na literatura recente, sobretudo aos concernentes às respostas prematuras (impulsividade) e respostas perseverativas (compulsividade e rigidez cognitiva);
- investigar a possível diferença entre os grupos utilizando um protocolo diferenciado da tarefa, no qual os animais são submetidos às sessões de teste logo após atingirem a linha de base;
- contribuir para o entendimento do perfil cognitivo de ratos hipoxiados através da ampla avaliação comportamental subsidiada pela tarefa de escolha.

MÉTODO

Sujeitos

Foram utilizados 22 ratos Wistar machos alojados no Instituto de Ciências Básicas da Saúde, departamento de ciências morfológicas (ICBS- UFRGS). Ciclo claro/escuro, temperatura e umidade controladas. Os animais permaneceram em caixas de poliuretano medindo 24 cm de largura, 38 cm de comprimento e 15 cm de altura, com quatro animais residindo por caixa. No sétimo dia pós-natal, os ratos foram submetidos ao procedimento de hipóxia-isquemia neonatal, (grupo HI, n = 11), ou cirurgia sham (grupo controle, n = 11). Após o desmame, foram transportados para o Laboratório de Psicologia Experimental Neurociências e Comportamento LPNeC-UFRGS, randomizados e mantidos em grupos de dois ratos por caixa em estantes climatizadas, com ciclos claro/escuro de 12h, temperatura mantida entre 20-22°C e umidade relativa do ar entre 40-60%.

Esse projeto foi submetido à análise do Comitê de ética no Uso de Animais (CEUA – UFRGS) e aprovado (Nº 24030).

Procedimento Experimental de Hipóxia-Isquemia encefálica

O modelo de hipóxia-isquemia (HI) neonatal foi baseado naquele proposto por Levine (1960) e modificado por Rice e colaboradores (1981), o qual consiste na associação da oclusão permanente da artéria carótida comum direita com exposição a 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 a 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, ou seja, receberam anestesia e incisão no pescoço, mas não tiveram a artéria comum ocluída nem foram submetidos ao ambiente hipóxico. Após o procedimento de HI, os animais voltaram imediatamente para os cuidados maternos, no qual permaneceram até o 21º dia pós-natal. Neste dia, foram realizados o desmame e a separação por sexo.

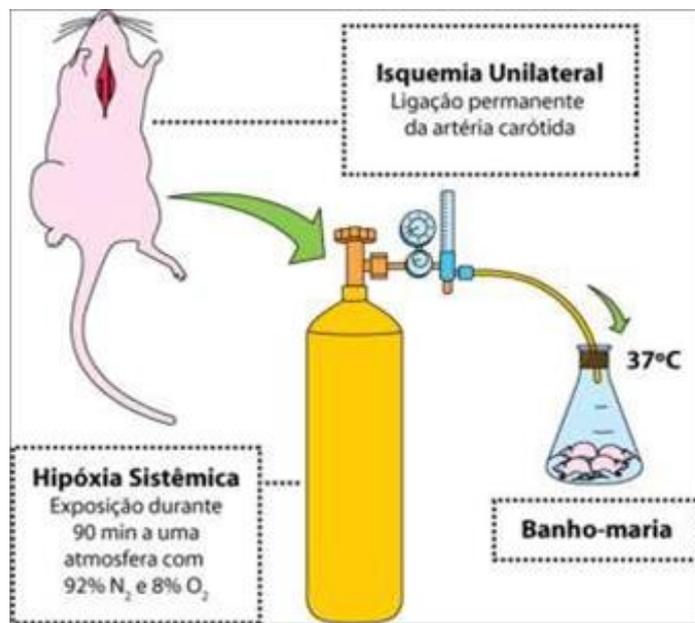


Figura 1: Procedimento de hipóxia-isquemia encefálica de Levine-Rice

Procedimento de hipóxia-isquemia encefálica de Levine-Rice. Adaptado de Levine (1960). Anoxic-ischemic encephalopathy in rats & Vannucci, Brierley (1981), "The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat".

Equipamentos

Foram utilizadas oito caixas operantes de alumínio medindo 25cmx25cmx25cm (Med Associates, St Albans, Vermont, USA). O equipamento, alojado em uma caixa ventilada a prova de som, possui cinco entradas quadradas de 2.5cm para resposta em uma parede lateral curvada, distantes 5cm do nível do chão e com distancia de 5cm entre cada uma. Na parede oposta, um alimentador de 45mg sucrose pellets (Bioserv, USA). Todas as entradas e o alimentador possuem lâmpada de iluminação e sensor infravermelho para detecção de respostas. O equipamento e o registro de respostas é controlado por computador utilizando interface e software MED-PC (Med Associates Inc., St Albans, Vermont, USA).

Tarefa de tempo de reação serial de cinco escolhas (5-CSRTT)

Em uma caixa operante os animais encontram dois painéis, um deles com apenas um orifício, conectado a um alimentador, que libera pelotas de alimento de acordo com a performance do animal na tarefa. O desempenho do animal no decorrer da tarefa é analisado pelo número de respostas corretas, incorretas, prematuras, perseverativas e omissões que podem servir como indicativo de déficit na atenção, presença de comportamento impulsivo dentre outros prejuízos (Robbins, 2002).

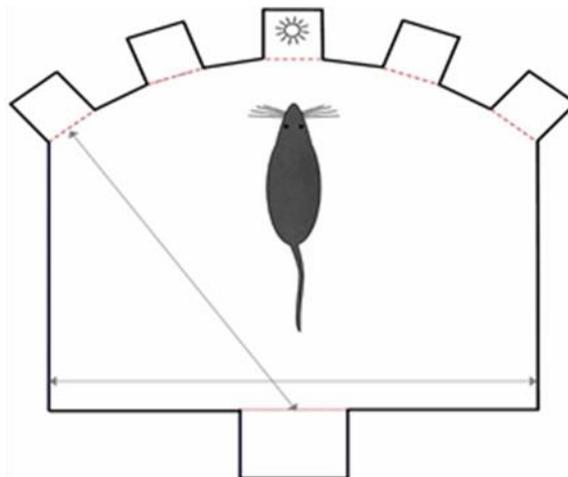


Figura 2: Arranjo espacial da caixa de 5-CSRTT

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. 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).

Procedimentos

A restrição alimentar foi iniciada quinze dias antes do início da habituação na tarefa. No primeiro dia da restrição alimentar, reduziu-se a oferta de alimento a 17g por animal/dia, até que eles chegassem a 85% do peso esperado para a sua idade. Esse cálculo foi feito comparando-se o peso desses animais com o crescimento obtido por outros não submetidos à restrição. Cabe ressaltar que alguns animais foram mantidos com livre acesso à ração e serviram como controle de crescimento. Esses ratos tinham a mesma idade e foram mantidos em condições de alojamento similares às dos animais que foram utilizados na tarefa, sendo, inclusive, pesados regularmente. Em uma semana, o peso dos animais experimentais chegou ao patamar desejado (\approx 85-90% do peso dos ratos sem restrição).

Após chegarem ao peso desejado, iniciou-se a habituação dos animais às caixas experimentais da 5-CSRTT. A habituação dos animais seguiu o protocolo descrito por (Bari, Dalley, & Robbins, 2008), com variações devido a especificidades do projeto. Por exemplo, não foi necessário habituar os animais ao manuseio dos experimentadores, pois os animais já vinham sendo manuseados há algumas semanas.

A habituação à caixa se deu da seguinte maneira: em quatro dias consecutivos os ratos foram colocados na caixa da 5-CSRTT. Em cada uma das cinco aberturas foram colocados dois pellets de açúcar, e cerca de dez pellets foram colocados no alimentador. Todas as luzes da caixa eram acesas, e o animal permanecia na caixa por 20 minutos para que pudesse coletar os pellets de açúcar. Esse procedimento foi repetido durante quatro dias, quando então todos os animais tinham ingeridos todos os pellets disponibilizados.

As sessões de treinamento tiveram duração diária de 30 minutos ou 100 tentativas, o que ocorresse primeiro, e foram realizadas cinco vezes por semana. Nessas sessões, não foram disponibilizados pellets nos orifícios do aparato. Para obtê-los, o animal deveria responder a um estímulo luminoso apresentado randomicamente em um dos cinco pequenos orifícios da caixa, com uma entrada no orifício iluminado (nose-poke). Cada resposta correta foi sempre recompensada com um pellet dispensado no alimentador e então recolhido pelo animal.

Inicialmente, os parâmetros utilizados – durante a fase de treinamento - foram os seguintes: duração de estímulo (SD) de 30 segundos; limited hold (LH) - tempo que o animal tem para responder após a apresentação do estímulo- de 30 segundos; intervalo entre tentativas (ITI)- período de tempo que antecede a apresentação de um novo estímulo- de 5 segundos. À medida que cada um foi atingindo um mínimo de 80% de acurácia (número de respostas corretas

x 100/número de respostas corretas + respostas incorretas) e taxa de omissões inferiores a 20% em três sessões consecutivas, a SD foi gradualmente diminuída e o LH aumentado conforme progressão de estágios da tarefa.

Respostas incorretas (em um orifício não iluminado), antecipatórias ou prematuras (antes da apresentação do estímulo) e omissões (ausência de resposta) foram seguidas por um período de 5 segundos em que todas as luzes do aparato foram apagadas como punição. Respostas perseverativas (em um mesmo orifício) foram registradas, mas não punidas.

As sessões foram realizadas diariamente no turno da tarde de segunda a sexta feira, entre as 13 e as 17 horas e tiveram duração de 22 semanas. Ao atingirem desempenho estável com os parâmetros: SD igual a 1 segundo e ITI igual a 5 segundos, as dez últimas sessões foram tomadas como linha de base e os ratos foram desafiados com a manipulação do SD e ITI.

As modificações da SD e do ITI tiveram como objetivo produzir um aumento na demanda atencional, uma vez que o animal teve de responder com parâmetros diferentes do que esteve habituado durante todo o tempo de treinamento. As sessões nas quais há alteração dos parâmetros são: A, na qual há diminuição da duração do estímulo. Espera-se uma queda na acurácia na manipulação A uma vez que o estímulo aparece com mais rapidez. Na manipulação B o intervalo entre tentativas aumenta, dessa forma, os animais tem mais tempo para realizar a resposta, diferente do que estavam acostumados. Na manipulação B exige-se então do animal a supressão de uma resposta programada e há maior demanda atencional diante da imprevisibilidade do intervalo, que, nesse caso, foi alterado. Maior número de respostas prematuras é esperado durante a sessão de teste B, visto que o animal estava habituado a responder a um ITI padrão, quando esse parâmetro é aumentado espera-se também dificuldade de suprimir a resposta no tempo habitual. Durante a manipulação D outro aspecto relacionado à imprevisibilidade é colocado, nesse caso o intervalo entre tentativas diminui, assim, o animal tem menos tempo para realizar o *trial*. Ao contrário da manipulação B, aqui, é esperado que aconteça diminuição no número de respostas prematuras, já que, com intervalo menor o animal tem menos tempo para realizar qualquer resposta. Ademais, aumento de omissões de resposta também podem acontecer, pois, os animais podem não conseguir identificar o estímulo luminoso a tempo, tendo em vista que o ITI diminuiu. Os parâmetros empregados na sessão de teste C foram idênticos aos já utilizados na tarefa (SD 1s e ITI 5s), a fim de comparar a linha de base dos animais com o desempenho dos mesmos nas sessões em que ocorre a manipulação dos parâmetros.

O número de respostas perseverativas fornece indicativos de comportamento repetitivo e também estereotipado e o número de sessões necessárias para progredir para estágios mais avançados da tarefa durante o treino indica aprendizado do animal. A latência de resposta constitui uma medida de velocidade de processamento, enquanto a latência para coletar o pellet indica a motivação do animal para realizar a tarefa (Robbins, 2002). Todos esses parâmetros foram analisados, a fim de comparar o desempenho dos animais controle com o grupo que sofreu o procedimento de hipóxia-isquemia neonatal.

As manipulações aconteceram em quatro sessões de teste (A, B, C, D), realizadas duas vezes por semana, sempre nas terças e quintas-feiras foram realizadas as seguintes manipulações:

A) ITI 5s; **SD 0,5s** B) **ITI 7s**, SD 1s C) ITI 5s, SD 1s D) **ITI 2s**, SD 1s

Cabe ressaltar que os animais foram sendo submetidos às sessões de teste logo após atingirem o desempenho estável no sétimo e último estágio. Todavia, nove animais do grupo experimental não foram capazes de atingir a linha de base, ou seja, chegar ao sétimo e último estágio de treinamento com acurácia mínima de 80% e omissões inferiores a 20%. Dessa forma os parâmetros foram flexibilizados para mínimo de 65% de acurácia e máximo de 20% de omissões. Mesmo assim quatro animais dentre os nove não alcançaram desempenho estável com esses parâmetros, então foram mantidos na última etapa de treinamento durante no mínimo dez dias para atingirem estabilidade na linha de base. Após esse período foram então desafiados nas sessões de teste. A flexibilização dos parâmetros, permitiu observar a diferença na performance de cada grupo.

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 $\times 100 / (\text{n}^\circ \text{ de corretas} + \text{incorretas})$
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

Construtos avaliados pela 5-CSRTT e a forma como são aferidos. Adaptado de Bari, Dalley, & Robbins, (2008). The application of the 5-choice serial reaction time task for the assessment of visual attentional processes and impulse control in rats. The 5-choice serial reaction time task: behavioural pharmacology and functional neurochemistry (Robbins, 2002).

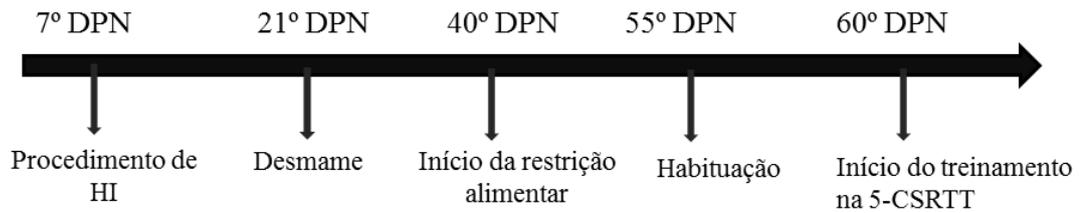


Figura 3: Cronograma experimental.

Etapas do cronograma experimental desde o procedimento de HI até o início do treinamento na 5-CSRTT

Análise estatística

Os dados foram inicialmente analisados de forma descritiva. Os pressupostos dos testes foram avaliados pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e teste de Levene, para normalidade e homocedasticidade, respectivamente. Ambos os testes apontaram que os dados são paramétricos. Portanto, foi utilizada Análise de Variância de medidas repetidas (General Linear Model) para avaliar os efeitos principais de grupo, das manipulações e a interação entre grupo e manipulações para cada variável. Quando houve interação entre grupo e a manipulação foi realizado testes T para identificar em qual manipulação a interação foi significativa. O número de sessões necessárias para adquirir o estágio subsequente (aquisição da tarefa) também foi avaliado através da Análise de Variância de Medidas Repetidas. A correção de Greenhouse-Geisser foi utilizada quando o pressuposto de esfericidade foi violado. Em todas as análises foi adotado um nível de significância de 0,05 para hipóteses unicaudal. O software utilizado foi o IBM SPSS Statistics, versão 19.

RESULTADOS

Aquisição da tarefa

Com relação à aquisição da tarefa foi observado efeito principal de grupo, ou seja, os grupos diferiram entre si com relação ao número de sessões que necessitaram para avançar para

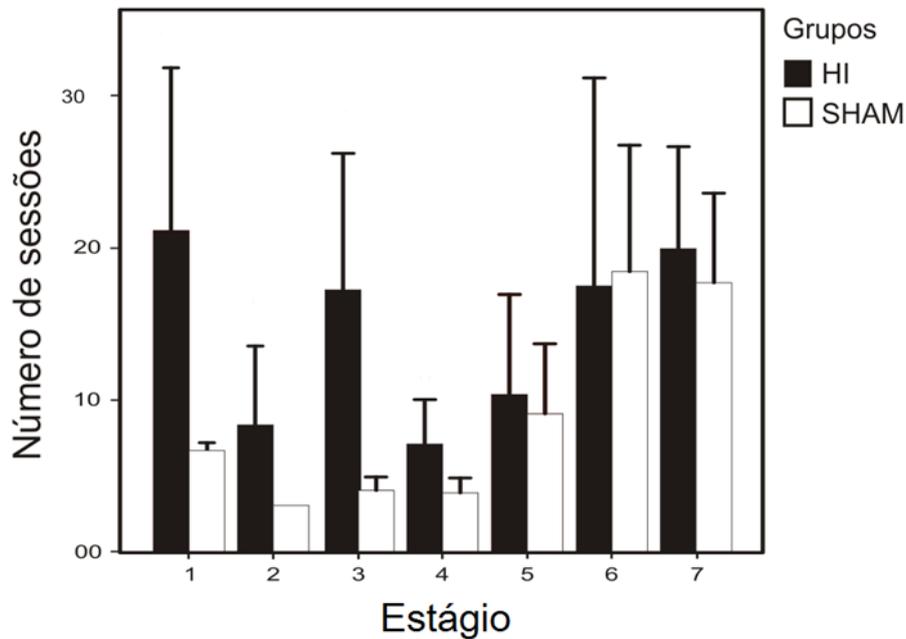


Figura 4: número médio de sessões por estágio

Número médio de sessões por estágio. São demonstradas a média e erro padrão do número de sessões necessárias para atingir os critérios desejados em cada estágio da tarefa. Barras brancas representam o grupo SHAM e barras pretas o grupo HI. O símbolo de asterisco significa efeito principal de grupo significativo, o símbolo sustentado significa efeito de manipulação significativo, enquanto o arroba significa interação significativa entre número de sessões e grupo ($p \leq 0,05$).

o estágio subsequente $F(1,20) = 14,89, p = 0,001$. O efeito de grupo foi expressivo, sobretudo, nos primeiros estágios, nesses, os animais HI necessitaram de muito mais treinamento para conseguir atingir os critérios necessários para avançar na tarefa (Fig. 4). Também foi observado efeito principal de estágio da tarefa que alterou o número de sessões necessárias para o avanço no treinamento $F(2,8; 57) = 6,14, p = 0,001$. O efeito de manipulação ficou mais evidente nos estágios mais avançados da tarefa (seis e sete), nos quais os grupos necessitaram mais sessões para atingir os critérios estabelecidos. Todavia interação entre grupo e número de sessões por estágio não foi significativa $F(2,8; 57) = 1,88, p = 0,146$.

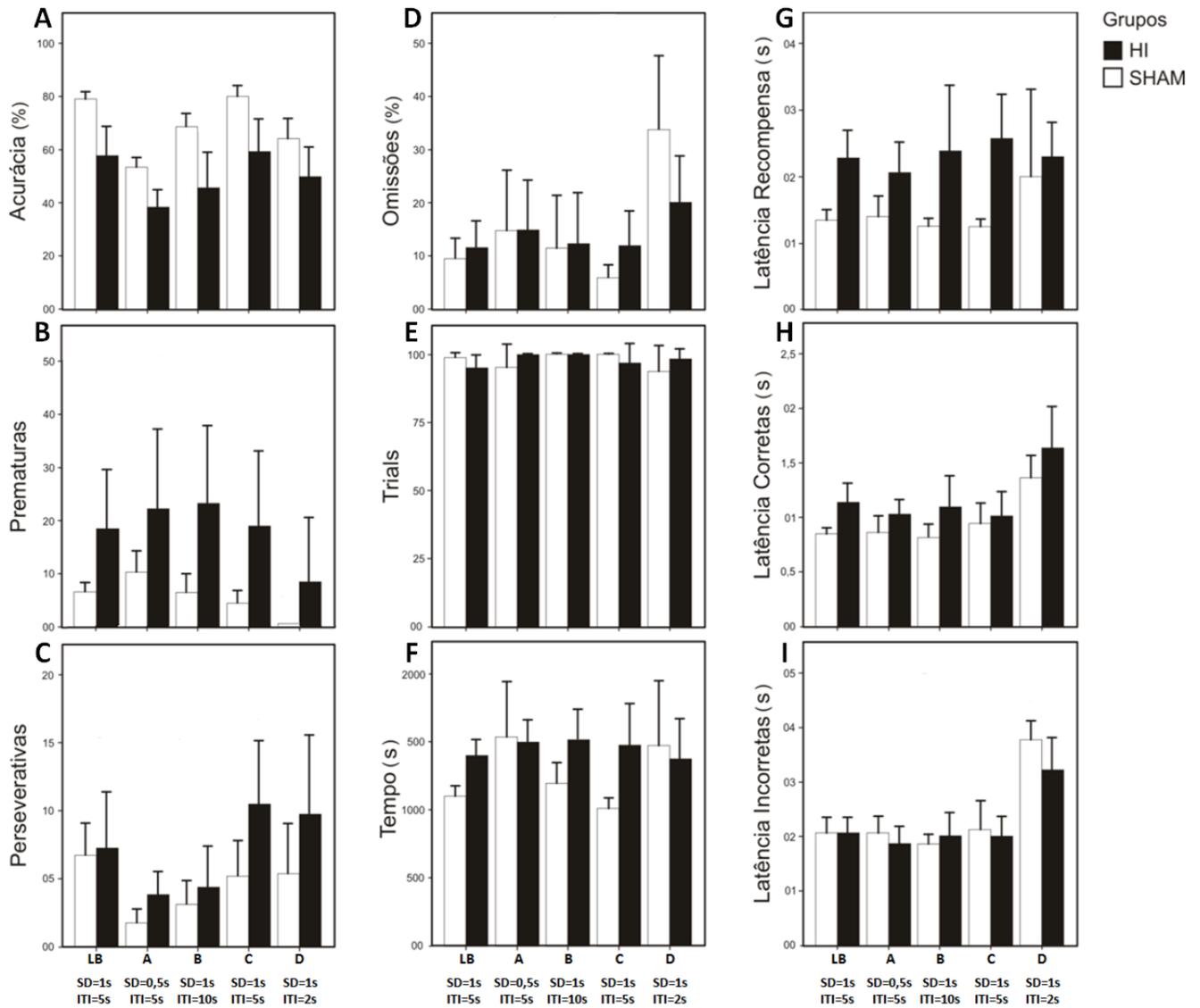


Figura 5: Desempenho nas sessões de teste

Desempenho nas sessões de teste. São demonstrados em média e erro padrão da média todos os parâmetros comportamentais avaliados para ambos os grupos, HI (barras pretas) e SHAM (barras 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.

Acurácia

Na variável acurácia o efeito principal de grupo apontou que a acurácia foi inferior no grupo HI em todas as condições quando comparado ao grupo sham, $F(1,20) = 15,47$, $p = 0,001$ (Fig. 5A). O efeito principal da manipulação apontou que a alteração dos parâmetros, como esperado, modificou a acurácia. Isto foi observado, sobretudo, na manipulação A, na qual houve decréscimo da acurácia quando a duração do estímulo diminuiu de 1 segundo para 0,5 segundos. Tal efeito também foi encontrado na manipulação D, neste caso houve uma diminuição do ITI, de 5 (nas sessões de linha de base) para 2 segundos, de modo que, os animais têm menos tempo para responder ao estímulo luminoso e fazer a coleta do pellet no alimentador, $F(4,80) = 39,27$, $p < 0,001$. Não houve interação entre os fatores manipulações e grupo para esta variável, $F(4,80) = 1,62$, $p = 0,176$.

Prematuras

O grupo HI teve a maior média de respostas prematuras em todas as condições quando comparado ao grupo sham, como indicou o efeito principal de grupo $F(1,20) = 5,35$, $p = 0,031$ (Fig. 5B). O efeito principal da manipulação dos parâmetros apontou que a alteração dos mesmos modificou o número de respostas prematuras. Observou-se um aumento do número de respostas prematuras tanto na manipulação A, quando acontece a diminuição da duração do estímulo, como na manipulação B, quando o ITI aumenta de 5 para 7 segundos. Entretanto, houve diminuição em prematuras quando a duração do estímulo diminuiu, o que ocorre na manipulação D $F(2,5; 51) = 8,73$, $p < 0,001$. Não houve interação entre as manipulações e o grupo $F(2,5; 51) = 0,97$, $p = 0,39$.

Perseverativas

A média dos grupos nas respostas perseverativas não foi diferente, pois o efeito principal de grupo não foi significativo, $F(1,20) = 3,20$, $p = 0,08$ (Fig 5C). O efeito principal da manipulação sem interação entre as manipulações e o grupo para essa variável ($F(2,6; 52) = 1,35$, $p = 0,26$) demonstrou que a alteração dos parâmetros modificou ambos os grupos da mesma maneira. Houve diminuição nas respostas perseverativas durante a diminuição da duração do estímulo (A), bem como durante o aumento do intervalo entre tentativas (B). Entretanto, foi observado o aumento desse comportamento durante a manipulação controle (C) e durante a sessão de teste D, na qual o ITI diminui $F(2,6; 52) = 7,22$, $p = 0,001$.

Omissões

O efeito principal de grupo para as omissões de resposta não apontou diferença entre os grupos $F(1,20) = 0,05$, $p = 0,82$ (Fig. 5D). Houve efeito principal de manipulação dos parâmetros, as omissões diminuíram na sessão de controle (C), e aumentaram com a diminuição do ITI, na sessão D $F(4,80) = 11,63$, $p < 0,001$. Foi observada também a interação entre as manipulações e o grupo $F(4,80) = 3,15$, $p = 0,033$, o que parece ser devido à manipulação D, com o grupo sham, quando a duração do estímulo diminuiu de 5 para 2 segundos esse grupo apresentou expressivo aumento das omissões.

Trials

Com relação à variável *trials* não foi identificado efeito principal de grupo $F(1,20) = 0,064$, $p = 0,804$ (Fig. 5E). Adicionalmente a isso, também não foi encontrado efeito significativo da manipulação de parâmetros sobre essa variável $F(2,4; 49) = 1,01$, $p = 0,384$, bem como não houve interação entre grupo e manipulação de parâmetros $F(2,4; 49) = 1,85$, $p = 0,159$. O número de *trials* não foi afetado pelas manipulações em ambos os grupos.

Tempo

A variável tempo para terminar a tarefa apresentou resultados similares aos da variável *trials*. O efeito de grupo indicou que não houve diferença entre os grupos $F(1,20) = 3,85$, $p = 0,064$ (Fig. 5F). A manipulação dos parâmetros também não afetou essa variável $F(2,7; 54) = 2,32$, $p = 0,092$. A interação grupo/manipulação de parâmetros não se mostrou significativa ($F(2,7; 54) = 2,55$, $p = 0,071$, ou seja, os grupos não foram diferentes durante a manipulação dos parâmetros.

Latência de Recompensa

O efeito principal de grupo para a variável latência de recompensa indicou diferença entre os grupos. O grupo HI teve maior latência para coletar a recompensa em todas as condições quando comparado ao grupo sham $F(1,20) = 12,48$, $p = 0,002$ (Fig. 5G). Já o efeito principal de manipulação não se mostrou significativo para esta variável $F(1,4; 29) = 0,82$, $p = 0,413$, assim, os grupos são diferentes não importando a manipulação utilizada. Por fim, não houve interação significativa entre grupo e manipulação $F(1,4; 29) = 1,30$, $p = 0,278$.

Latência de corretas

O efeito principal de grupo para a variável latência de respostas corretas indicou diferença significativa entre os grupos, sendo a média da latência de respostas corretas foi diferente em cada grupo $F(1,20) = 10, p = 0,005$ (Fig. 5H). A manipulação dos parâmetros também teve efeito significativo, sobretudo na sessão D, com a diminuição do ITI de 5 para 2 segundos, nessa manipulação a latência para respostas corretas aumentou $F(2,4; 48) = 13,85, p < 0,001$. A interação manipulação/grupo não foi significativa $F(2,4; 48) = 0,54, p = 0,616$.

Latência de incorretas

A média da latência de respostas incorretas não foi diferente entre os grupos, uma vez que o efeito principal de grupo não foi significativo para essa variável $F(1,20) = 1,11, p = 0,303$ (Fig 5I). Entretanto o efeito principal de manipulação foi significativo, $F(4,80) = 35,5, p < 0,001$, a latência para respostas corretas parece ter aumentado na manipulação D. Não houve interação com grupo $F(4,80) = 1,39, p = 0,246$.

Em suma, os efeitos principais de grupo demonstraram que os animais HI tiveram menor acurácia, maior número de prematuras, levaram mais tempo para responder corretamente ao estímulo luminoso e para coletar a recompensa quando comparados ao grupo controle. Os efeitos principais de manipulação foram significativos para a maioria das variáveis exceto para o tempo, *trials* e latência de recompensa, demonstrando que as sessões de teste impactaram o comportamento dos animais. As manipulações que mais alteraram os parâmetros dos grupos foram àquelas nas quais o estímulo luminoso e o intervalo entre tentativas diminuíram. O efeito principal das manipulações, sobretudo na diminuição da duração do estímulo e na variação do intervalo entre tentativas demonstra a efetividade dos desafios propostos pela tarefa. Com relação à interação entre o grupo e a manipulação, essa, só foi encontrada na variável “omissões”, nesse caso o grupo sham, na sessão em que o intervalo entre tentativas é diminuído, teve maior omissão de respostas.

DISCUSSÃO

Esse trabalho encontrou evidências para demonstrar que os animais que sofreram o procedimento de hipóxia-isquemia neonatal apresentaram déficit de aquisição, atenção, impulsividade e aumento na latência de respostas corretas e de recompensa utilizando a 5CSRTT.

A 5CSRTT é uma tarefa bastante consolidada no que diz respeito ao controle de funções executivas em estudos pré-clínicos. Além disso, há uma extensiva literatura sobre as alterações comportamentais utilizando a 5CSRTT, e essas estão associadas a vias neurais específicas. Estudos que induziram lesão em determinadas vias e áreas cerebrais, bem como manipulações farmacológicas utilizadas juntamente com essa tarefa comportamental estruturam seu entendimento e confiabilidade (Lloyd et al., 2013). Acurácia diminuída, alto índice de omissões, prematuras e maior latência de respostas na 5CSRTT podem representar alterações no controle inibitório ou sistema sensorial, motor, bem como nos processos atencionais (e.g. atenção sustentada e dividida). Todavia o grande benefício de utilizar esse paradigma experimental é, além de avaliar cada uma das variáveis separadamente, entendê-las em conjunto (Lloyd et al., 2013).

Os animais HI apresentaram dificuldade no quesito aquisição da tarefa, ou seja, levaram mais tempo para conseguir adquirir os parâmetros exigidos de acurácia e omissões e então avançar para os estágios finais de treinamento. Esse resultado obtido através da 5CSRTT é interpretado como prejuízo na aprendizagem (Semenova, 2012). Sameshima & Ikenoue (2013), testaram o modelo de HI em três tarefas comportamentais (i.e., CRT, labirinto aquático de Morris e labirinto radial de oito braços) identificando prejuízos na aprendizagem e na memória de referência nas tarefas de labirinto. A CRT utilizada nesse trabalho não permite ampla avaliação da aprendizagem, porém a 5CSRTT pode fornecer essa medida uma vez que exige um processo robusto de aprendizagem da tarefa desafiando o animal a passar por sete estágios nos quais os parâmetros alteram gradativamente. Estruturas cerebrais intimamente ligadas ao aprendizado e memória, como, por exemplo, o hipocampo, é altamente vulnerável ao procedimento de HI (Allen & Brandon, 2011), sendo responsável pela manifestação comportamental dessa dificuldade. Certamente que o dano em outras áreas (i.e., córtex) e a associação entre elas também contribui para esse prejuízo.

O déficit de atenção apresentado pelos animais HI foi observado a partir da acurácia inferior em todas as manipulações propostas, bem como na linha de base. Embora, como esperado, tenha havido maior dificuldade durante a manipulação dos parâmetros (SD e ITI), o grupo controle conseguiu obter uma taxa superior de acurácia. A diminuição da acurácia encontrada em nosso trabalho também foi verificada no estudo de Sameshima e Ikenoue (2012), no qual animais HI foram submetidos a três diferentes tarefas comportamentais, dentre elas a *Choice Reaction Time Task* (CRT), que se assemelha a 5CSRTT. Prejuízos na atenção de animais HI, avaliados também na CRT, também foram verificados no estudo de Mishima et al., (2004).

A dificuldade atencional pode ser explicada pela lesão provocada pelo procedimento de HI, no qual pode haver grande dano aos tecidos cerebrais, sobretudo córtex cerebral e estruturas mesencefálicas (e.g. hipocampo e núcleos da base) (Vannucci, 2000). Ademais, o trabalho de Muir e colaboradores (Muir, et.al., 1996) também demonstrou diminuição da acurácia seguida por lesões específicas (excitotóxicas realizadas bilateralmente) em diversas áreas do córtex, entre elas o córtex pré-frontal medial. Todavia, diferente do trabalho de Muir e colaboradores (1996), o procedimento de HI permite uma lesão que se aproxima daquela ocorrida em neonatos, ou seja, mimetiza uma condição existente em humanos (Walton et al., 1999). Adicionalmente a isso, trabalho anteriormente realizado em nosso laboratório com animais HI também demonstraram déficit atencional encontrado em uma tarefa de vigilância. O déficit atencional está presente em várias patologias (e.g. Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade e esquizofrenia). Na esquizofrenia os sujeitos podem ter dificuldade para alterar o foco de sua atenção selecionando no ambiente pistas relevantes, sobretudo de caráter social, bem como podem apresentar dificuldade em sustentar a atenção. Trabalhos utilizando tarefas atencionais de performance contínua, semelhantes à 5-CSRTT têm demonstrado a dificuldade no quesito atenção em sujeitos esquizofrênicos (Epstein, Keefe, Roitman, Harvey, & Mohs, 1996). Por fim, prejuízos em processos atencionais podem estar associados à intenção, distração, déficit de memória, confusão, perseveração e desinibição (Chudasama & Robbins, 2004). Esses comportamentos são encontrados em sujeitos esquizofrênicos, porém alguns deles também são comuns em pacientes com autismo (Bambini-Junior et al., 2011) e TDAH (Sagvolden, Russell, Aase, Johansen, & Farshbaf, 2005).

O déficit de atenção foi acompanhado por impulsividade, refletida pelo maior número de respostas antecipatórias ou prematuras quando comparado ao grupo controle. Aumento de respostas prematuras é esperado quando há também o aumento do ITI, como demonstrado por Hahn, Shoaib, & Stolerman (2002), no entanto, no presente trabalho observou-se alteração importante nas respostas prematuras quando a duração do estímulo diminuiu. Os animais HI apresentaram maior número de respostas prematuras em todas as manipulações, esses animais e parecem não ter conseguido inibir o comportamento de responder em um dos orifícios da caixa operante mesmo antes da aparição do estímulo luminoso. O treinamento realizado durante toda a tarefa e antes das manipulações, refletido na linha de base, foi ritmado em ITI de 5s, de forma que quando o intervalo entre tentativas aumentou o animal deveria sustentar a atenção até a apresentação do estímulo. Os animais HI parecem não ter conseguido otimizar o desempenho na nova contingência. Ao invés de aguardarem o estímulo, que, nesse caso demoraria mais acabaram por responder antes do estímulo ser apresentado, logo, realizaram as respostas prematuras.

A dificuldade em administrar o impulso e exercer o controle inibitório sobre um comportamento é descrita pelo aumento de respostas prematuras observadas na 5-CSRTT e já descritas (Bari et al., 2008; Robbins, 2002). A realização de alto número de respostas prematuras pode estar relacionada ao dano já comprovado em estruturas cortico-estriatais provocadas pelo procedimento de hipóxia-isquemia neonatal (Vannucci, 2000). Danos envolvendo córtex frontal e núcleos da base, sobretudo o estriado, podem culminar em déficit de atenção associada à impulsividade, como observado em pacientes com o Transtorno de Déficit de atenção e Hiperatividade (TDAH) (Purper-Ouakil, Ramoz, Lepagnol-Bestel, Gorwood, & Simonneau, 2011). Trabalho que discutem critérios de validade para modelos animais de TDAH têm demonstrado a necessidade de avaliar déficit de atenção sustentada e aumento de respostas perseverativas como indicativo de impulsividade (Sagvolden, Russell, Aase, Johansen, & Farshbaf, 2005). Ambos os critérios foram encontrados na avaliação de animais submetidos à hipóxia-isquemia neonatal, assim, o modelo de HI pode auxiliar no desenvolvimento de modelos de patologias com um escopo sintomatológico comum, para além de déficits comportamentais isolados.

Respostas perseverativas nem sempre são avaliadas em trabalhos que utilizam a 5CSRTT, porém, esse tipo de resposta, também obtida através de outras manipulações comportamentais é interpretada como comportamento repetitivo estereotipado (Garner, 2005; Lewis et al., 2007; Schoenecker & Heller, 2003). Trata-se, no caso da tarefa experimental

utilizada nesse trabalho, de uma resposta persistente realizada em qualquer orifício após a apresentação da recompensa (Robbins, 2002). Compulsão também é uma leitura possível quando há aumento de respostas perseverativas, combinada com rigidez cognitiva, uma vez que o animal não consegue desengajar do comportamento de realizar a resposta. Esse tipo de resposta comportamental é avaliado em modelos animais de autismo utilizando outras tarefas comportamentais (Silverman, Yang, Lord, & Crawley, 2010) bem como em modelos animais de esquizofrenia (Chudasama & Robbins, 2004).

Dados anteriormente coletados em nosso laboratório encontraram aumento de respostas perseverativas na 5-CSRTT em animais HI, porém, no presente trabalho com o mesmo modelo esse resultado não foi replicado. Embora o grupo experimental tenha realizado respostas prematuras (Fig. 5C), esse, não se diferenciou significativamente do grupo sham, pois o grupo controle também realizou essas respostas. Diferentemente dos dados encontrados por nossos colegas, nos quais os animais controle praticamente não realizavam esse tipo de resposta. Todavia acredita-se que isso foi uma particularidade do protocolo da 5CSTT utilizado no presente trabalho, no qual os animais eram desafiados com as demandas atencionais imediatamente após atingirem a linha de base. O protocolo foi realizado dessa maneira tendo em vista a necessidade de compreender melhor a diferença entre os grupos, pois, caso todos os animais continuassem em treinamento mesmo após terem atingido a linha de base algumas diferenças poderiam ser camufladas pelo excesso de treinamento. Entretanto no caso das respostas perseverativas pode ter acontecido justamente o oposto, ou seja, essa resposta aumentada no grupo controle tenderia a desaparecer com a continuidade do treino e a diferença entre o grupo experimental poderia ter sido significativa.

Diferenças no efeito principal de grupo também ficaram evidentes em duas latências, de respostas corretas e de recompensa. Os animais do grupo HI demoraram mais tempo para responder corretamente ao estímulo luminoso, bem como para coletar a recompensa. Normalmente aumento na latência pode indicar baixa motivação ou então atividade locomotora diminuída (Bari, Dalley, & Robbins, 2008; Robbins, 2002). No entanto, quando isso acontece é necessário observar todas as latências para interpretar tais resultados como dificuldades de atividade locomotora, nesse trabalho não encontramos diferença entre os grupos na latência de respostas incorretas, logo, descartamos a possibilidade de locomoção prejudicada. A possibilidade de baixa motivação também pode ser controversa uma vez que o número de respostas prematuras também indica motivação para realizar a tarefa, e, nesse caso, houve diferença nas respostas prematuras. Como a 5CSRTT permite a ampla avaliação de variáveis

como já citado, é necessário observarmos as demais, assim, embora não tenha havido diferença entre os grupos nas respostas perseverativas, elas foram realizadas, logo, os animais perderam algum tempo perseverando o que retardou a coleta da recompensa, aumentando assim a latência de coleta do *pellet*.

Com relação às omissões de resposta, o fato de também não ter havido efeito principal de grupo nessa variável reforça a interpretação do aumento de latência de outra forma que não a falta de motivação, uma vez que aumento nas omissões também pode ser interpretado como baixa motivação (Bari, Dalley, & Robbins, 2008). Nesse caso, os grupos não foram diferentes no que diz respeito ao número de omissões que realizaram. Entretanto as manipulações tiveram efeito e houve interação entre grupo e manipulação. Na sessão na qual o ITI é diminuído nota-se um aumento significativo das omissões para o grupo sham enquanto os animais HI não tiveram a mesma magnitude na resposta nessa manipulação. Parece que os animais controle foram impactados com a diminuição do ITI de forma que não tiveram tempo de finalizar o *trial*, logo, não respondendo. Por outro lado, o grupo HI, embora também tenha aumentado o número de omissões com relação à manipulação anterior teve uma magnitude menor nesse aumento. Outro aspecto interessante que pode ser discutido é com relação à estratégia de resposta, ou seja, os animais sham podem ter preferido não realizar uma resposta errada, assim, deixaram de fazê-lo, aumentando as omissões. Os ratos HI, por outro lado, realizaram respostas, mesmo com menor acurácia (Fig. 5A), e dessa forma seu número de omissões foi menor.

Não foram encontrados efeitos principais e interação nas demais variáveis analisadas. Os grupos não diferiram quanto ao tempo para realizar a tarefa e quanto ao número de *trials*. Esses dados nos informam que ambos os grupos estavam, de fato, realizando a tarefa, ou seja, cumprindo os 100 *trials* com duração de treinamento aproximada. Dessa forma podemos descartar outras variáveis intrusivas como, por exemplo, problemas de ordem mecânica com as caixas operantes ou de atividade locomotora dos animais.

CONCLUSÃO

A realização desse trabalho permitiu concluir que animais submetidos à hipóxia-isquemia neonatal apresentam déficit atencional combinado com impulsividade. Esse prejuízo é provavelmente decorrente da lesão induzida que atinge áreas cerebrais cruciais para o bom desempenho atencional e o controle inibitório dos animais, (e.g. córtex e núcleos da base). Também podemos concluir que o comportamento compulsivo, mensurado a partir do maior número de respostas perseverativas, não foi replicado em nosso trabalho. Todavia entendemos que isso pode ter ocorrido devido a uma particularidade de nosso protocolo, logo, entende-se que outros estudos são necessários para avaliar esse tipo de resposta no modelo HI.

Foi possível observar que esse modelo pode ser sumamente relevante no entendimento de déficits cognitivos existentes em sujeitos que sofreram hipóxia isquemia neonatal. Além disso, esses dados podem auxiliar na compreensão de várias patologias com prevalência importante e altamente debilitantes como o TDAH, esquizofrenia e autismo. Assim, investigações concisas que busquem entender o escopo sintomatológico dessas doenças virão a contribuir para a construção de possíveis ferramentas terapêuticas.

REFERÊNCIAS

- Anderson, C. A. and D. B. Arciniegas (2010). Cognitive sequelae of hypoxic-ischemic brain injury: a review. *NeuroRehabilitation* 26(1): 47-63.
- Allen, K. A., & Brandon, D. H. (2011). Hypoxic Ischemic Encephalopathy: Pathophysiology and Experimental Treatments. *Newborn and Infant Nursing Reviews*, 11(3), 125–133.
doi:10.1053/j.nainr.2011.07.004
- Arteni, N. S., Salgueiro, J., Torres, I., Achaval, M., & Netto, C. A. (2003). Neonatal cerebral hypoxia–ischemia causes lateralized memory impairments in the adult rat. *Brain Research*, 973(2), 171–178. doi:10.1016/S0006-8993(03)02436-3
- Bambini-Junior, V., Rodrigues, L., Behr, G. A., Moreira, J. C. F., Riesgo, R., & Gottfried, C. (2011). Animal model of autism induced by prenatal exposure to valproate: Behavioral changes and liver parameters. *Brain Research*, 1408, 8–16.
doi:10.1016/j.brainres.2011.06.015
- 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. doi:10.1038/nprot.2008.41
- Bird, J., & Schenk, S. (2013). Contribution of impulsivity and novelty-seeking to the acquisition and maintenance of MDMA self-administration. *Addiction Biology*, 18(4), 654–664.
doi:10.1111/j.1369-1600.2012.00477.x
- Bizarro, L., & Stolerman, I. P. (2003). Attentional effects of nicotine and amphetamine in rats at different levels of motivation. *Psychopharmacology*, 170(3), 271–277.
doi:10.1007/s00213-003-1543-6
- Busl, K. M., & Greer, D. M. (2010). Hypoxic-ischemic brain injury: Pathophysiology, neuropathology and mechanisms. *NeuroRehabilitation*, 26(1), 5–13. doi:10.3233/NRE-2010-0531

- Carli, M., Robbins, T. W., Evenden, J. L., & Everitt, B. J. (1983). Effects of lesions to ascending noradrenergic neurones on performance of a 5-choice serial reaction task in rats; implications for theories of dorsal noradrenergic bundle function based on selective attention and arousal. *Behavioural Brain Research*, *9*(3), 361–380. doi:10.1016/0166-4328(83)90138-9
- Chudasama, Y., & Robbins, T. W. (2004). Psychopharmacological approaches to modulating attention in the five-choice serial reaction time task: implications for schizophrenia. *Psychopharmacology*, *174*(1). doi:10.1007/s00213-004-1805-y
- Doi, K., Sameshima, H., Kodama, Y., Furukawa, S., Kaneko, M., Ikenoue, T., & for the Miyazaki Perinatal Data Groups. (2012). Perinatal death and neurological damage as a sequential chain of poor outcome. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*, *25*(6), 706–709. doi:10.3109/14767058.2011.587061
- Epstein, J. I., Keefe, R. S. E., Roitman, S. L., Harvey, P. D., & Mohs, R. C. (1996). Impact of neuroleptic medications on continuous performance test measures in schizophrenia. *Biological Psychiatry*, *39*(10), 902–905. doi:10.1016/0006-3223(95)00588-9
- Evrard, P. (2001). Pathophysiology of Perinatal Brain Damage. *Developmental Neuroscience*, *23*(3), 171–174. doi:10.1159/000046138
- Fatemi, A., Wilson, M. A., & Johnston, M. V. (2009). Hypoxic Ischemic Encephalopathy in the Term Infant. *Clinics in perinatology*, *36*(4), 835–vii. doi:10.1016/j.clp.2009.07.011
- Garner, J. P. (2005). Stereotypies and Other Abnormal Repetitive Behaviors: Potential Impact on Validity, Reliability, and Replicability of Scientific Outcomes. *ILAR Journal*, *46*(2), 106–117. doi:10.1093/ilar.46.2.106
- Ikeda, T., Mishima, K., Yoshikawa, T., Iwasaki, K., Fujiwara, M., Xia, Y. X., & Ikenoue, T. (2001). Selective and long-term learning impairment following neonatal hypoxic-

ischemic brain insult in rats. *Behavioural Brain Research*, *118*(1), 17–25.

doi:10.1016/S0166-4328(00)00287-4

Koskinen, T., & Sirviö, J. (2001). Studies on the involvement of the dopaminergic system in the 5-HT₂ agonist (DOI)-induced premature responding in a five-choice serial reaction time task. *Brain research bulletin*, *54*(1), 65–75.

Levine, S. (1960). Anoxic-Ischemic Encephalopathy in Rats. *The American Journal of Pathology*, *36*(1), 1–17.

Lindström, K., Hallberg, B., Blennow, M., Wolff, K., Fernell, E., & Westgren, M. (2008).

Moderate neonatal encephalopathy: Pre- and perinatal risk factors and long-term outcome. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*, *87*(5), 503–509.

doi:10.1080/00016340801996622

Lloyd, S. A., Oltean, C., Pass, H., Phillips, B., Staton, K., Robertson, C. L., & Shanks, R. A.

(2013). Prenatal exposure to psychostimulants increases impulsivity, compulsivity, and motivation for rewards in adult mice. *Physiology & Behavior*, *119*, 43–51.

doi:10.1016/j.physbeh.2013.05.038

Lu, C.-L., Ku, Y.-C., Lo, S.-M., Peng, C.-H., Tung, C.-S., Lin, Y.-W., & Liu, Y.-P. (2013).

Acute and subchronic effects of buspirone on attention and impulsivity in the five-choice serial reaction time task in rats. *Neuroscience Letters*, *556*, 210–215.

doi:10.1016/j.neulet.2013.10.013

McAuliffe, J. J., Miles, L., & Vorhees, C. V. (2006). 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 Research*, *1118*(1), 208–221. doi:10.1016/j.brainres.2006.08.030

- McNamara, R., Dalley, J. W., Robbins, T. W., Everitt, B. J., & Belin, D. (2010). Trait-like impulsivity does not predict escalation of heroin self-administration in the rat. *Psychopharmacology*, *212*(4), 453–464. doi:10.1007/s00213-010-1974-9
- Mishima, K., Ikeda, T., Aoo, N., Takai, N., Takahashi, S., Egashira, N., ... Fujiwara, M. (2005). Hypoxia-ischemic insult in neonatal rats induced slowly progressive brain damage related to memory impairment. *Neuroscience Letters*, *376*(3), 194–199. doi:10.1016/j.neulet.2004.11.055
- Mishima, K., Ikeda, T., Yoshikawa, T., Aoo, N., Egashira, N., Xia, Y. X., ... Fujiwara, M. (2004). Effects of hypothermia and hyperthermia on attentional and spatial learning deficits following neonatal hypoxia-ischemic insult in rats. *Behavioural Brain Research*, *151*(1–2), 209–217. doi:10.1016/j.bbr.2003.08.018
- Muir, J. L., Everitt, B. J., & Robbins, T. W. (1996). The cerebral cortex of the rat and visual attentional function: dissociable effects of mediofrontal, cingulate, anterior dorsolateral, and parietal cortex lesions on a five-choice serial reaction time task. *Cerebral Cortex*, *6*(3), 470–481.
- Murphy, E. R., Dalley, J. W., & Robbins, T. W. (2005). Local glutamate receptor antagonism in the rat prefrontal cortex disrupts response inhibition in a visuospatial attentional task. *Psychopharmacology*, *179*(1), 99–107. doi:10.1007/s00213-004-2068-3
- Pereira, L. O., Arteni, N. S., Petersen, R. C., da Rocha, A. P., Achaval, M., & Netto, C. A. (2007). Effects of daily environmental enrichment on memory deficits and brain injury following neonatal hypoxia-ischemia in the rat. *Neurobiology of Learning and Memory*, *87*(1), 101–108. doi:10.1016/j.nlm.2006.07.003
- Pimentel-Coelho, P. M., Magalhães, E. S., Lopes, L. M., deAzevedo, L. C., Santiago, M. F., & Mendez-Otero, R. (2010). Human Cord Blood Transplantation in a Neonatal Rat Model

- of Hypoxic–Ischemic Brain Damage: Functional Outcome Related to Neuroprotection in the Striatum. *Stem Cells and Development*, 19(3), 351–358. doi:10.1089/scd.2009.0049
- Purper-Ouakil, D., Ramoz, N., Lepagnol-Bestel, A.-M., Gorwood, P., & Simonneau, M. (2011). Neurobiology of Attention Deficit/Hyperactivity Disorder. *Pediatric Research*, 69(5, Part 2 of 2), 69R–76R. doi:10.1203/PDR.0b013e318212b40f
- Rice, J. E., 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. doi:10.1002/ana.410090206
- Robbins, T. (2002). The 5-choice serial reaction time task: behavioural pharmacology and functional neurochemistry. *Psychopharmacology*, 163(3-4), 362–380. doi:10.1007/s00213-002-1154-7
- Sagvolden, T., Russell, V. A., Aase, H., Johansen, E. B., & Farshbaf, M. (2005). Rodent Models of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *Biological Psychiatry*, 57(11), 1239–1247. doi:10.1016/j.biopsych.2005.02.002
- Sameshima, H., & Ikenoue, T. (2013). Hypoxic-Ischemic Neonatal Encephalopathy: Animal Experiments for Neuroprotective Therapies. *Stroke Research and Treatment*, 2013. doi:10.1155/2013/659374
- Semenova, S. (2012). Attention, impulsivity, and cognitive flexibility in adult male rats exposed to ethanol binge during adolescence as measured in the five-choice serial reaction time task: the effects of task and ethanol challenges. *Psychopharmacology*, 219(2), 433–442. doi:10.1007/s00213-011-2458-2
- Silverman, J. L., Yang, M., Lord, C., & Crawley, J. N. (2010). Behavioural phenotyping assays for mouse models of autism. *Nature Reviews Neuroscience*, 11(7), 490–502. doi:10.1038/nrn2851

- Vannucci, R. C. (2000). Hypoxic-ischemic encephalopathy. *American Journal of Perinatology*, *Volume 17*(Number 03), 113–120. doi:10.1055/s-2000-9293
- Vannucci, R. C., & Vannucci, S. J. (2005). Perinatal Hypoxic-Ischemic Brain Damage: Evolution of an Animal Model. *Developmental Neuroscience*, *27*(2-4), 81–86. doi:10.1159/000085978
- Walton, M., Connor, B., Lawlor, P., Young, D., Sirimanne, E., Gluckman, P., Dragunow, M. (1999). Neuronal death and survival in two models of hypoxic-ischemic brain damage. *Brain Research Reviews*, *29*(2–3), 137–168. doi:10.1016/S0165-0173(98)00053-8
- Wang, L. S., Zhou, J., Shao, X. M., & Tang, X. C. (2002). Huperzine A attenuates cognitive deficits and brain injury in neonatal rats after hypoxia–ischemia. *Brain Research*, *949*(1–2), 162–170. doi:10.1016/S0006-8993(02)02977-3



CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 24030

Título: DÉFICITS DE APRENDIZAGEM, ATENÇÃO, MEMÓRIA E COMPORTAMENTO SOCIAL EM ANIMAIS SUBMETIDOS À HIPÓXIA-ISQUEMIA NEONATAL: UM MODELO DE AUTISMO?

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

LISIANE BIZARRO ARAUJO - coordenador desde 01/12/2012

LENIR ORLANDI PEREIRA SILVA - coordenador desde 01/12/2012

Luís Alexandre Montecinos de Almeida - pesquisador desde 01/12/2012

Augusto Viana Pires - pesquisador desde 01/12/2012

Juliana Raquel Jaboinski - pesquisador desde 01/12/2012

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo , em reunião realizada em 04/02/2013 - Sala do 2º andar - Prédio da Reitoria - Campus Centro - UFRGS, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 36 ratos Wistar machos, de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa.

Porto Alegre, Quarta-Feira, 27 de Fevereiro de 2013

STELA MARIS KUZE RATES
Coordenador da comissão de ética