



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

**HIPÓXIA-ISQUEMIA NEONATAL E O DESENVOLVIMENTO DE
CARACTERÍSTICAS RELACIONADAS AO TRANSTORNO DE
DÉFICIT DE ATENÇÃO/HIPERATIVIDADE EM RATOS WISTAR
MACHOS: ANÁLISES COMPORTAMENTAIS E DANO TECIDUAL
CEREBRAL**

Patrícia Maidana Miguel

Porto Alegre

2014

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS**

**HIPÓXIA-ISQUEMIA NEONATAL E O DESENVOLVIMENTO DE
CARACTERÍSTICAS RELACIONADAS AO TRANSTORNO DE DÉFICIT
DE ATENÇÃO/HIPERATIVIDADE EM RATOS WISTAR MACHOS:
ANÁLISES COMPORTAMENTAIS E DANO TECIDUAL CEREBRAL**

Patrícia Maidana Miguel

**Dissertação apresentada como requisito
parcial à obtenção do título de Mestre em
Neurociências pelo Programa de Pós-
graduação em Neurociências da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul.**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lenir Orlandi Pereira Silva

Porto Alegre

2014

AGRADECIMENTOS

Devo agradecer primeiramente à minha orientadora por acreditar no meu trabalho e sempre me motivar à busca de novas metas e ideias. Lenir, muito obrigada pela confiança, orientação e comprometimento com o nosso grupo.

Agradeço imensamente aos meus colegas de trabalho pela colaboração, parceria e amizade. Sem dúvidas esse trabalho não sairia sem a ajuda de vocês! Bruna, Iohanna, Ramiro, Heloísa e Micheli, muito obrigada pela ajuda com os testes comportamentais. Só a gente sabe como foram aqueles dias quebrando froot loops, cheirando potinhos, esquematizando os horários para não perdermos os jogos do Brasil na Copa ou ficarmos presos na UFRGS durante os protestos. Muito obrigada, de coração!

Devo agradecer também ao restante do grupo, pela ajuda nas demais análises deste trabalho e pelo apoio e palavras de carinho: Jaque, Cla e Josi. Muito obrigada, gurias!

Ao grupo da professora Simone, pela convivência diária, conversas, risadas e ajuda.

À minha família, que sempre me incentivou ao estudo, me apoia e se orgulha das minhas escolhas. Amo vocês demais.

Ao Fábio, pela compreensão dos meus momentos de estresse e das ausências no final de semana, pela ajuda na formatação dessa dissertação e por me confortar e me fazer mais feliz sempre. Amor, sou muito grata por tudo!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	6
LISTA DE FIGURAS.....	7
LISTA DE TABELAS.....	8
Resumo.....	9
Abstract.....	11
1 INTRODUÇÃO.....	12
1.1. Hipóxia-Isquemia.....	12
1.2. Mecanismos Neuropatológicos da Hipóxia-Isquemia.....	12
1.3. Modelos Animais de Hipóxia-Isquemia.....	15
1.4. Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade.....	16
1.5. Avaliações Atencionais em Modelos Animais.....	19
1.6. Hipóxia-isquemia e o Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade.....	20
1.7. Hipótese do trabalho.....	20
2 OBJETIVOS.....	22
2.1. Objetivo geral.....	22
2.2. Objetivos específicos.....	22
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
3.1. Animais.....	23
3.2. Procedimento de Hipóxia-Isquemia.....	24
3.3. Testes comportamentais.....	24
3.3.1 <i>Attentional set-shifting (ASS)</i>	25
3.3.2 Teste de tolerância ao atraso da recompensa.....	28
3.4. Análise morfológica.....	30
3.4.1 Perfusão.....	30
3.4.2 Volume de lesão.....	30
3.5. Análise Estatística.....	31
4. RESULTADOS.....	32
4.1 <i>Attentional set-shifting</i>	32
4.2 Teste de tolerância ao atraso da recompensa.....	34

4.3 Volume de lesão.....	37
5. DISCUSSÃO.....	39
6. CONCLUSÕES	44
7. PERSPECTIVAS.....	45
8. REFERÊNCIAS	46

LISTA DE ABREVIATURAS

5-CSRTT	- <i>5-choice serial reaction time task</i>
AMPA	- α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxasol-propionato
ANOVA	- Análise de Variância
ASS	- <i>Attentional set-shifting</i>
ATP	- Adenosina Trifosfato
Ca ²⁺	- Íon cálcio
CPF	- Córtex pré-frontal
CT	- Controle
DC	- Discriminação composta
DPN	- Dia Pós-natal
DS	- Discriminação simples
ED	- Mudança extradimensional
EPM	- Erro padrão da média
HI	- Hipóxia-isquemia
ID	- Mudança intradimensional
N ₂	- Nitrogênio
Na ⁺	- Íon sódio
NMDA	- N-metil-D-aspartato
O ₂	- Oxigênio
Rev1	- Reversão 1
Rev2	- Reversão 2
Rev3	- Reversão 3
TDAH	- Transtorno de déficit de atenção/hiperatividade
WCST	- <i>Wisconsin Card Sorting Task</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Eventos relacionados à hipóxia-isquemia.....	14
Figura 2. Procedimento de hipóxia-isquemia experimental de Levine.....	15
Figura 3. Linha do tempo dos procedimentos experimentais.....	24
Figura 4. Representação do aparato utilizado no <i>attentional set-shifting</i>	26
Figura 5. Representação do aparato utilizado no teste de tolerância ao atraso da recompensa.....	29
Figura 6. Desempenho durante o <i>attentional set-shifting</i>	33
Figura 7. Desempenho durante o teste de tolerância ao atraso da recompensa, ao longo dos diferentes tempos de espera.....	35
Figura 8. Desempenho durante o teste de tolerância ao atraso da recompensa, mostrando médias nos diferentes tempos de espera.....	36
Figura 9. Volumes encefálicos dos hemisférios totais, córtex cerebral, corpo caloso, hipocampo e estriado.....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Exemplos dos estímulos utilizados no <i>attentional set-shifting</i>	28
--	----

Resumo

A hipóxia-isquemia (HI) encefálica neonatal pode gerar sequelas neurológicas permanentes nos indivíduos que sobrevivem a este evento precoce. Dentre estas sequelas, o diagnóstico de Transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) já foi relacionado em pesquisa clínica. Sabendo que não há consenso de um modelo adequado para o estudo do TDAH em pesquisa experimental, novas abordagens que contribuam para o desenvolvimento desse modelo são necessárias. Assim, o objetivo do presente estudo foi investigar se a HI neonatal contribui para o desenvolvimento das características comportamentais relacionadas ao TDAH na fase adulta em ratos e correlacionar os resultados comportamentais com o volume da lesão encefálica. Para isso, ratos Wistar machos foram divididos em dois grupos: hipóxia-isquemia (HI, n=12) e controle (CT, n=10). O procedimento de HI consistiu na combinação da oclusão da artéria carótida comum direita no 7º dia pós-natal com exposição a uma atmosfera hipóxica (8% O₂ e 92% N₂, durante 90 minutos). Durante a fase adulta, ao atingir dois meses de idade, os animais foram testados no teste *attentional set-shifting* (ASS) para avaliar flexibilidade comportamental atencional e no teste de tolerância ao atraso da recompensa, para avaliação da escolha impulsiva. Os resultados mostraram que os animais submetidos à HI apresentaram prejuízo na função executiva, avaliado no ASS, evidenciado por uma inflexibilidade comportamental quando a regra para a execução da tarefa era mudada ($p \leq ,05$ para o número de tentativas para passar dos estágios de Reversão 2 e Reversão 3, assim como o número de erros nesses estágios, além do estágio de mudança extradimensional – Teste t não-pareado). No teste de tolerância ao atraso da recompensa, não foi observada uma maior impulsividade dos animais HI, tendo os dois grupos um comportamento similar neste teste. Além disso, as avaliações do volume encefálico pelo Método de Cavalieri demonstraram uma atrofia no grupo HI no hemisfério total, córtex cerebral, substância branca, hipocampo e estriado, principalmente no lado ipsilateral à lesão ($p \leq ,05$, Teste t não-pareado). Considerando esses resultados, podemos inferir que a HI neonatal é um fator ambiental que pode contribuir para o desenvolvimento das características

comportamentais observadas no TDAH, e que estas são associadas a uma atrofia encefálica geral.

Palavras-chave: asfixia perinatal, TDAH, *attentional set-shifting*, tolerância ao atraso da recompensa, impulsividade, atrofia encefálica

Abstract

Neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy (HI) can cause permanent neurological sequelae in survivors of this early event. Among these sequelae, the diagnosis of attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) has already been linked in clinical research. There is no consensus about an ideal ADHD model in experimental research, being necessary new approaches that contribute to the development of this model. Thus, the aim of this study was to investigate whether HI contributes to the development of characteristics related to ADHD in adult rats and correlate the behavioral results with brain damage volume. Male Wistar rats were divided into two groups: hypoxia-ischemia (HI, n=12) and control (CT, n=10). The HI procedure consist of a permanent occlusion of the right common carotid artery followed by a period of hypoxia (90 min; 8% O₂ and 92% N₂), at seventh postnatal day (PND). Two months later, animals were evaluated in *attentional set-shifting* test (ASS) for assessment of attentional flexibility and in the *tolerance to delay of reward*, for evaluation of impulsivity choice. Our results demonstrated that animals submitted to HI manifest impairments in executive function, evidenced by a behavioral inflexibility when the rule for the execution of the ASS task was changed ($p \leq ,05$ for number of trials to reach the criterion in Reversion 2 and 3 stages, as well as in number of erros in these stages, in addition to the Extradimensional shift stage – Unpaired t test). In the *tolerance to delay of reward*, no greater impulsivity of HI animals was observed, with both groups demonstrating similar behavior in this task. Moreover, the assessments of brain volume by Cavalieri method demonstrated atrophy in HI group in total hemisphere, cerebral cortex, white matter, hippocampus and striatum, especially on the side ipsilateral to the lesion ($p \leq ,05$ – Unpaired t test). Considering these results, we can infer that neonatal HI is an environmental factor that could contribute to the development of behavioral characteristics observed in ADHD which are associated to general brain atrophy.

Keywords: birth asphyxia, ADHD, attentional set-shifting, tolerance to delay of reward, impulsivity, brain atrophy

1 INTRODUÇÃO

1.1. Hipóxia-Isquemia

A hipóxia-isquemia (HI) neonatal é um evento lesivo ao sistema nervoso central que pode ocorrer devido a complicações da gravidez e do parto. O dano encefálico geralmente é provocado por asfixia intra-uterina grave após uma redução aguda na circulação uterina ou umbilical (Berger et al., 1999). A HI apresenta uma incidência de 1,5 a cada mil partos (Kurinczuk et al., 2010), sendo que dados epidemiológicos apontam uma incidência maior em países em desenvolvimento, entre 2 e 9 a cada mil partos (Palsdottir et al., 2007; Eghbalian & Monsef, 2008).

A taxa de mortalidade após um evento hipóxico-isquêmico é de 15-20% e dos indivíduos sobreviventes, 25-28% apresentam sequelas neurológicas permanentes (Lawn et al., 1995). Essas sequelas incluem paralisia cerebral, epilepsia, desordens motoras, dificuldades de aprendizagem e outras anormalidades neurológicas específicas (Lu-Emerson & Khot, 2010; Van Handel et al., 2007; Perlman, 1997). Há um grande impacto resultante sobre a vida das crianças afetadas e suas famílias, sendo que os cuidados subsequentes com a criança requerem um alto nível de comprometimento e cooperação entre pediatras, neurologistas, fisioterapeutas, fonoaudiólogos, psicoterapeutas e outros especialistas (Jensen et al., 2003).

1.2. Mecanismos Neuropatológicos da Hipóxia-Isquemia

O funcionamento normal do encéfalo é dependente de suprimento adequado de oxigênio e glicose. A redução aguda no fornecimento de oxigênio ao encéfalo vai ocasionar uma falha no metabolismo energético neuronal em poucos minutos (Berger et al., 1991). O dano cerebral hipóxico-isquêmico é um processo progressivo, o qual se inicia durante o insulto e estende-se no período de recuperação após a lesão, ocasionado por reperfusão (Sherman, 1998).

Durante a fase inicial de HI, a diminuição do aporte de oxigênio impossibilita a fosforilação oxidativa e ocorre uma mudança para o

metabolismo anaeróbico, que resultará na rápida depleção de reservas de fosfato de alta energia, incluindo a molécula de adenosina trifosfato (ATP) (McLean & Ferriero, 2004; Perlman, 2004). Com a exaustão das reservas energéticas, ocorre uma falha na bomba de Na^+/K^+ ATPase, que culmina na despolarização da membrana das células, com uma entrada de sódio (Na^+) e água causando edema citotóxico e/ou lise celular. Acúmulo de cálcio (Ca^{2+}) celular também ocorre devido à despolarização da membrana, levando à liberação de neurotransmissores excitatórios, como o glutamato (McLean & Ferriero, 2004). Este neurotransmissor possui transportadores que realizam a sua recaptção, mas estes são dependentes de energia, também sendo afetados com a falha energética que ocorre na HI. Com isso, ocorre um comprometimento na recaptção do glutamato na fenda sináptica, onde ele atuará por mais tempo (Kelmendi et al., 2006). As concentrações desse neurotransmissor podem aumentar até dez vezes nesses casos, causando uma superexcitação que leva à morte neuronal (morte celular excitotóxica) (Johnston et al., 2011).

Além dos processos já descritos, o glutamato em excesso na fenda sináptica superestimulará seus receptores pós-sinápticos, como o NMDA (N-metil-D-aspartato) e o AMPA (α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionato), resultando em um influxo de Na^+ e Ca^{2+} aos neurônios pós-sinápticos. A sobrecarga de Ca^{2+} ativa lipases, proteases e endonucleases, que por sua vez destroem o citoesqueleto (Siesjo et al., 1992). Receptores NMDA são superexpressos 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 (Johnston et al., 2011).

Embora a maioria dos trabalhos se concentre nos efeitos excitotóxicos do glutamato nos receptores NMDA, a dopamina tem um papel crucial no dano hipóxico-isquêmico. Avaliações *in vivo* em estriado de roedores demonstrou uma liberação expressiva da dopamina no espaço extracelular após a oclusão da carótida tanto no estriado (Slivka et al., 1988) quanto no hipocampo dorsal (Bhardwaj et al., 1990). O nível de dopamina extracelular liberado também já foi relacionado com a severidade do insulto isquêmico (Akiyama et al., 1991; Richards et al., 1993). Colaborando com isso, estratégias que atenuaram a liberação de dopamina induzida por isquemia (Buisson et al., 1992) ou

bloquearam os receptores dopaminérgicos (Globus et al, 1989) se mostraram neuroprotetoras.

A formação excessiva de radicais livres ocorre devido a uma variedade de vias que envolvem a xantina oxidase, óxido nítrico sintase, metabolismo do ácido araquidônico, entre outros (McLean & Ferriero, 2004). Como são muito reativos, os radicais livres vão atuar sobre as moléculas constitutivas das células, causando prejuízos funcionais importantes (Pereira, 2007). A produção excessiva de radicais livres e altos níveis extracelulares de neurotransmissores leva a uma ativação da resposta inflamatória, que ocorre de três a doze horas após reperfusão e reoxigenação do cérebro (Lai & Yang, 2011). Os principais eventos que ocorrem na lesão hipóxica-isquêmica estão descritos na figura 1.

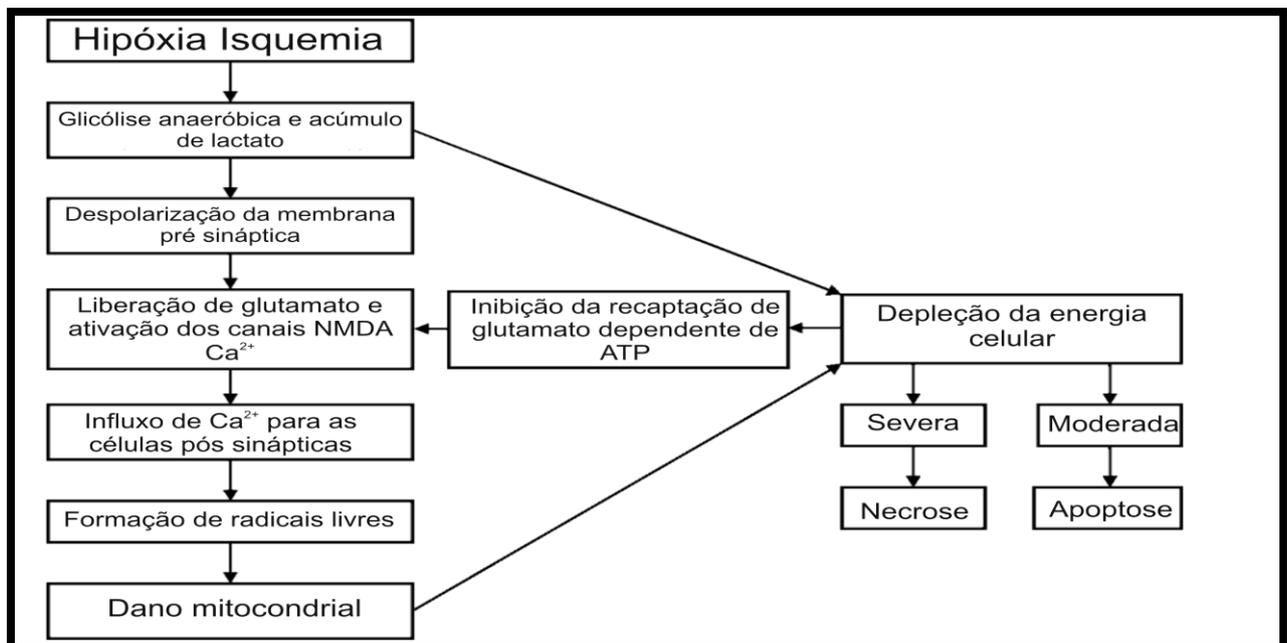


Figura 1: Diagrama mostrando os principais eventos relacionados ao dano hipóxico-isquêmico (adaptado de Huang & Castillo, 2008).

1.3. Modelos Animais de Hipóxia-Isquemia

Tendo em vista que o evento hipóxico-isquêmico apresenta mecanismos complexos, e que estratégias terapêuticas são escassas para esse transtorno, foram desenvolvidos modelos animais que mimetizam o dano encefálico sofrido por recém-nascidos para o estudo dessa patologia. O modelo animal mais utilizado para esse fim é o modelo de Levine (1960) modificado por Rice e colaboradores (1981), 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).

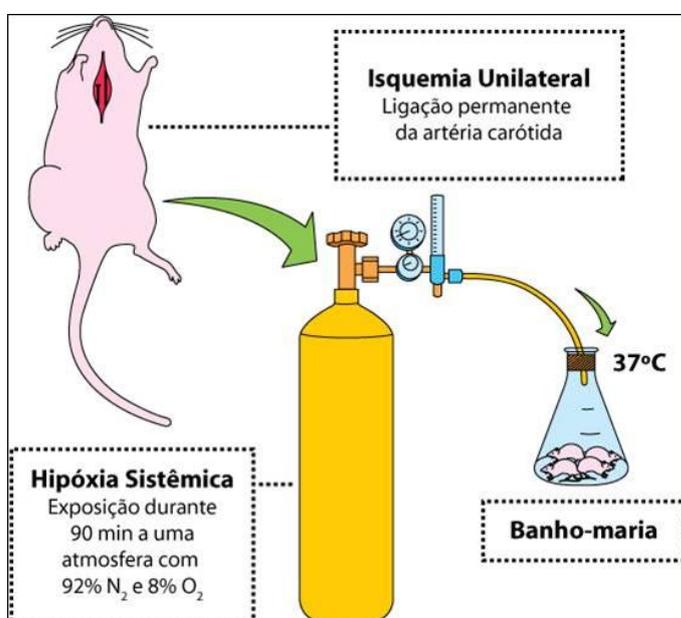


Figura 2. Procedimento de hipóxia-isquemia de Levine-Rice.

O modelo é padronizado para animais com sete dias de idade pois nessa fase os animais apresentam um encéfalo histologicamente comparado ao de um feto com 32-34 semanas de gestação ou a de um recém-nascido, onde as camadas neuronais corticais estão completas e a substância branca sofreu pouca mielinização (Vannucci & Vannucci, 1997). Os danos que ocorrem nos animais submetidos a esse modelo de HI são cognitivos, morfológicos e bioquímicos (Vannucci & Vannucci, 1997), que se comparam aos danos observados em humanos recém-nascidos (Lin, 2013). As lesões teciduais são observadas principalmente no córtex cerebral, hipocampo, estriado, tálamo, substância branca subcortical e periventricular (Pereira et al., 2008). As vantagens desse modelo incluem o fácil manuseio dos animais,

baixo custo financeiro, reprodutibilidade alta e recuperação do fluxo sanguíneo mesmo após a oclusão da artéria (Pereira et al., 2007).

Em estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa, encontramos uma série de alterações comportamentais no modelo de HI de Levine-Rice: déficits cognitivos na memória de trabalho e de referência (Pereira et al., 2007; Pereira et al., 2008), na memória aversiva (Carletti et al., 2012; Rojas et al., 2013) e também déficits sensório-motores (Rojas et al., 2013). Recentemente, vimos também que esse modelo de HI causa déficits atencionais e de controle inibitório (impulsividade e compulsividade) na fase adulta desses animais (Miguel et al., 2015).

1.4. Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade

O Transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) é uma desordem do desenvolvimento que tem uma prevalência de 8-12% em crianças (Faraone et al., 2003), persistindo na idade adulta em 4,4% da população (Kessler et al., 2006). O *Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais* (DSM-V) classifica o TDAH em três apresentações: predominantemente desatento, predominantemente hiperativo-impulsivo e o tipo combinado (desatento com impulsividade/hiperatividade) (DSM V, *American Psychiatric Association* [APA], 2013). Alguns estudos longitudinais demonstraram que a apresentação clínica do TDAH é dependente de tempo, sugerindo que os sintomas são aliviados com a idade, particularmente as características hiperativas/impulsivas (Biederman & Faraone, 2000; Hart et al., 1995).

Diversos fatores estão envolvidos na etiologia do TDAH, mas a hereditariedade é a causa mais comum e a mais estudada com relação a esse transtorno. No entanto, os agentes ambientais também podem contribuir para o desenvolvimento das características observadas no TDAH. Dentre estes fatores, podemos citar alguns relacionados à gravidez e ao parto (Millichap, 2008), como tabagismo e ingestão de álcool pela mãe (Han et al, 2015), prematuridade (Elgen et al, 2015) e baixo peso ao nascer (Pettersson et al, 2015), deficiência de iodo e hipotireoidismo maternos (Vermiglio et al, 2004) e

hipóxia-isquemia neonatal (Lou HC, 1996). Quando a este último, Getahun e colaboradores (2013) avaliaram a relação entre condições hipóxico-isquêmicas e o TDAH, e viram que crianças expostas à asfixia perinatal tiveram um maior risco de desenvolver o TDAH, quando comparado com crianças que não foram expostas a essas condições.

As características comportamentais observadas no TDAH parecem ocorrer devido a uma hipofunção dopaminérgica em áreas corticais, motoras e límbicas (Bierderman & Faraone, 2000). Colaborando com essa teoria, o Metilfenidato (a droga de escolha no tratamento do TDAH) bloqueia o transportador de dopamina, fazendo com que mais dopamina permaneça na fenda sináptica (Rosa Neto, 2002). Esse fármaco é muito eficiente para o tratamento dos sintomas do TDAH, onde demonstra uma melhora na qualidade de vida dos portadores de TDAH tratados (Seeman & Madras, 1998). Além da teoria da função dopaminérgica, já se mostrou que nesse transtorno podem ocorrer anomalias estruturais em certas regiões encefálicas, como diminuição do volume cerebral total, do córtex pré-frontal (CPF), estriado e corpo caloso (Cubillo et al., 2012; Seidman 2004). Mais especificamente, as conexões entre o CPF e o estriado desempenham um papel importante na fisiopatologia do TDAH (Cubillo et al., 2012).

Diversas teorias sugerem que o TDAH consiste em mais do que apenas seus sintomas clássicos de desatenção, impulsividade e hiperatividade. Os autores dessas teorias propõem que os sintomas clássicos do TDAH são provenientes de um déficit primário das funções executivas (Barkley, 1997; Castellanos & Tannock, 2002), um termo usado para descrever uma ampla gama de processos cognitivos que permitem flexibilidade, comportamento direcionado a uma meta, e a formulação das metas (Lezak, 1982). Esses processos incluem planejamento, memória de trabalho e controle de impulso, capacidades que são necessárias para um comportamento independente, criativo e socialmente construtivo (Castellanos et al, 2006).

O *Wisconsin card sorting task* (WCST) (Eling et al., 2008) é um teste comumente considerado como uma tarefa que exige função executiva geral, em humanos. Ele é usado para examinar tais habilidades cognitivas como a mudança de um conjunto e formação de conceitos (por exemplo, a geração de uma regra de classificação), a inibição de respostas habituais, e memória de

trabalho, a qual o sujeito utiliza para manter o princípio de classificação atual em mente (Castellanos et al., 2006). A partir desse teste, foi desenvolvido o “*Intradimensional/Extradimensional (ID/ED) shifting task*” (Owen et al., 1991; Rogers et al., 2000), que é utilizado para mensurar especificamente as habilidades de mudança atencional dos indivíduos. Uma mudança intradimensional (ID) ocorre quando um sujeito, treinado a responder a uma determinada dimensão de estímulo, como cor ou forma, precisa transferir essa regra para outro exemplar, mas que pertence ainda a mesma dimensão do estímulo (Owen et al., 1991). Como exemplo, podemos citar um indivíduo que aprende a responder sempre a cor vermelha do objeto, independente da forma do mesmo, mas em um determinado momento a regra inverte, sendo agora a cor azul que prediz uma resposta correta. Já uma mudança extra-dimensional (ED) ocorre quando o sujeito precisa responder a uma nova dimensão de estímulo, que antes era irrelevante (Owen et al., 1991), precisando mudar a atenção de um aspecto de estímulo para outro (Chase, 2012). Seguindo com o exemplo anterior, as cores não serão mais uma dimensão relevante, sendo agora a forma do objeto que caracteriza uma resposta correta. Este teste é aplicável para a avaliação de diversos tipos de distúrbios neurológicos, incluindo o TDAH, onde vários estudos demonstraram os déficits da função executiva dos sujeitos com TDAH que foram submetidos ao *ID/ED shifting task* (Kempton et al., 1999, Coghill et al., 2014, Gau & Chang, 2010a, Gau 2010b).

Comportamentos impulsivos são sintomas característicos de pacientes com TDAH e tem recebido muita atenção nos últimos anos. O termo impulsividade descreve uma série de comportamentos, que incluem a incapacidade de conter uma resposta, perseveração de uma resposta não recompensada e intolerância ao atraso da recompensa (Winstanley et al., 2006). Este último, também conhecido como “tomada de decisão impulsiva”, é exemplificado pela redução da capacidade de um indivíduo em escolher uma grande recompensa mas com atraso, dando preferência a uma pequena recompensa imediata (van Gaalen et al., 2006). Este comportamento é proeminente em pelo menos um subgrupo de pacientes com TDAH, conforme mostram alguns estudos clínicos (Sagvolden et al., 2008, Solanto et al., 2001).

1.5. Avaliações Atencionais em Modelos Animais

Para o estudo das características comportamentais relacionadas ao TDAH em modelos animais, alguns testes comportamentais são amplamente utilizados. O *5-choice serial reaction time task* (5-CSRTT) é um teste que avalia características comportamentais de atenção e impulsividade durante uma tarefa operante em que o animal deve responder a um estímulo luminoso imprevisível com o intuito de receber uma recompensa alimentar (Robbins, 2002). Embora o 5-CSRTT consiga mensurar a impulsividade dos animais através da incapacidade de conter uma resposta antes do estímulo luminoso ser apresentado, outros testes conseguem avaliar especificamente outros aspectos da impulsividade. A intolerância ao atraso da recompensa consegue ser mensurada mediante tarefas que avaliam a capacidade do animal em esperar para obter uma recompensa alimentar (Bizot et al., 2007). O teste de “tolerância ao atraso da recompensa” possibilita ao animal escolher entre dois parâmetros distintos de recompensa: uma em pequena quantidade, mas imediata e outra em grande quantidade, mas que é entregue com atraso. O comportamento impulsivo é visto quando o animal opta mais pela recompensa menor, mas que é entregue imediatamente, evitando a recompensa com atraso (Bizot et al., 2007).

Para avaliar as habilidades de mudança atencional e função executiva diante de uma situação nova, o teste *attentional set-shifting* é bastante utilizado. Neste teste, os animais são treinados a responder a uma determinada dimensão de estímulo (como odor) que é apresentada junto à outra dimensão (como o meio em que este odor é exposto). Primeiro o animal deve responder sempre a mudanças nos odores, independente do meio em que este é exposto. Depois desta regra ser estabelecida, ocorre uma mudança de dimensão de estímulo, sendo agora o meio relevante para uma resposta correta, e não mais o odor. Assim, os animais devem mudar a atenção para uma nova dimensão de estímulo, dando um índice de atenção e flexibilidade comportamental (Birrell & Brown, 2010).

1.6. Hipóxia-isquemia e o Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade

Em estudo prévio, desenvolvido durante meu trabalho de conclusão de curso (TCC) de graduação e que motivou a realização dessa dissertação, demonstramos que a HI neonatal pode estar relacionada com o desenvolvimento de características comportamentais relacionadas ao TDAH ao longo do desenvolvimento em ratos. Neste estudo, os animais HI foram submetidos a testes no 5-CSRTT na fase adulta durante seis meses e os resultados que obtivemos demonstraram déficits de aprendizagem no início do treinamento e déficits de atenção e de controle inibitório, visto que em alguns parâmetros analisados - as respostas impulsivas e perseverativas - estavam aumentadas em comparação aos controles (Miguel et al., 2015).

A relação entre eventos hipóxico-isquêmicos e o desenvolvimento de características presentes no TDAH ainda não está bem estabelecida. Embora alguns estudos cite a HI como fator de risco para o TDAH, estes estudos são escassos e apenas de base clínica, precisando de mais subsídios para concluir se esta inter-relação realmente existe e buscar entender como esta se constrói. Estudos experimentais identificando o déficit de atenção dos animais HI ainda são escassos (Ikeda et al., 2004, Mishima et al., 2004) e a questão da impulsividade e alguns parâmetros de disfunção executiva ainda não foram bem estudados, necessitando de uma maior compreensão para o entendimento dos comprometimentos da HI a longo prazo. Além disso, sabendo que não há consenso na literatura de um modelo adequado para o estudo do TDAH em pesquisa experimental, novas abordagens que contribuam para o desenvolvimento desse modelo são necessárias.

1.7. Hipótese do trabalho

A hipótese do presente estudo é de que os animais submetidos à hipóxia-isquemia neonatal apresentarão déficits atencionais na tarefa *attentional set-shifting* e também uma maior escolha impulsiva quando avaliados no Teste de tolerância ao atraso da recompensa. Além disso, espera-se encontrar uma atrofia em regiões encefálicas envolvidas nos

comportamentos atencionais e impulsivos desses animais, como no córtex cerebral e estriado.

2 OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo deste estudo é investigar se a Hipóxia-isquemia encefálica neonatal contribui para o desenvolvimento das características relacionadas ao Transtorno do déficit de atenção e hiperatividade na fase adulta em ratos através de análises comportamentais e histológicas

2.2. Objetivos específicos

- Analisar parâmetros atencionais e de disfunção executiva nos animais adultos após HI neonatal utilizando o teste *attentional set-shifting*;
- Analisar parâmetros de tomada de decisão impulsiva nos animais adultos após a HI neonatal pelo teste de tolerância ao atraso de recompensa;
- Avaliar o volume de lesão encefálica que a HI neonatal acarretou nos animais adultos nas seguintes regiões: hemisférios totais, córtex cerebral, estriado, hipocampo e substância branca (corpo caloso e cápsula externa);

3 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 25709.

3.1. Animais

Neste estudo foram utilizados 22 ratos Wistar machos (provenientes de 5 ratas fêmeas prenhes, com uma média de 4 animais machos por ninhada) originários do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL/UFRGS) e mantidos no Biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde desta Universidade, que foram divididos em grupos controle (n=10 para o comportamento e 6 para a morfologia) e HI (n=12 para o comportamento e 6 para a morfologia).

No sétimo dia pós-natal os ratos do grupo HI foram submetidos ao procedimento cirúrgico de hipóxia-isquemia e os controles à cirurgia sham. A cirurgia de hipóxia-isquemia (HI) neonatal foi baseada no modelo de Levine (1960) modificado por Rice e colaboradores (1981), o qual consiste na associação da oclusão permanente da artéria carótida comum direita com a exposição à ambiente hipóxico. Após o procedimento de HI, os filhotes permaneceram com a mãe em número máximo de 8 por ninhada até o 21º dia pós-natal, quando foram desmamados e separados em grupos de até cinco animais por caixa-moradia (caixas de poliprolileno com dimensões de 41 x 34 x 16 cm). A taxa de mortalidade após o procedimento de HI é inferior a 10%. Os animais foram mantidos em ambiente padrão de biotério, com ciclo claro/escuro de 12h em ambiente climatizado (25°C) e recebendo ração e água *ad libitum*, até atingirem a idade adulta (2 meses). Após este período, foram separados em duplas e iniciaram uma restrição alimentar para o início dos testes comportamentais, conforme apresentado na linha do tempo (figura 3).

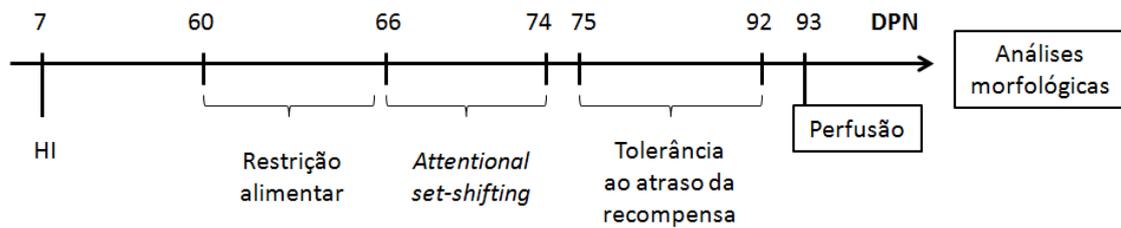


Figura 3: Linha do tempo dos procedimentos experimentais. DPN = dia pós-natal; HI = hipóxia-isquemia.

3.2. Procedimento de Hipóxia-Isquemia

O modelo de 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 à ambiente hipóxico. No 7^o 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. Após um período de recuperação (2-3h) nas caixas-moradia, os filhotes foram expostos a uma câmara (1500 mL) 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.

3.3 Testes comportamentais

A partir do momento que os animais atingiram a idade adulta (60 dias), iniciaram-se os testes comportamentais: *attentional set-shifting* e teste de

tolerância ao atraso de recompensa. Como ambos os testes utilizam recompensa alimentar, os animais foram submetidos a uma dieta de restrição alimentar moderada para motivar a busca à recompensa. A restrição foi iniciada uma semana antes da realização dos testes e se prolongou até o término destes, totalizando um mês de restrição alimentar.

Foram fornecidos entre 15-20g de ração por dia e houve uma pesagem diária para certificação de que os animais mantiveram um peso corpóreo entre 85%-90% do peso que tinham em condições normais de alimentação (Birrell & Brown, 2010; Chase et al., 2012).

3.3.1 *Attentional set-shifting (ASS)*

O teste *attentional set-shifting* empregado em ratos é um análogo ao “*ID/ED shifting task*” utilizado em humanos para estudar a função executiva avaliando a capacidade do indivíduo em mudar o comportamento em decorrência de uma nova regra que está sendo aplicada. Este teste foi adaptado para ratos por Birrell e Brown (2010) de modo que os animais são treinados a escavar em um pote que esconde uma recompensa alimentar palatável. Os potes foram sempre apresentados em pares, mas apenas um continha a recompensa alimentar. As pistas que foram utilizadas para o animal saber em qual dos dois potes a recompensa estava contida era o odor acrescentado ao meio ou o tipo de meio de escavação que cobria a recompensa.

O aparato do teste consistiu em uma caixa de acrílico preta (70 x 40 x 40cm) com uma parede utilizada para dividir um terço do comprimento da caixa em duas seções – as áreas onde ficavam os potes (potes de cerâmica, diâmetro interno de 7cm e profundidade de 4cm). Um painel removível era disposto de forma que a área onde o rato iniciava o teste ficava separada da área onde os potes eram apresentados, conforme mostra a Figura 4.

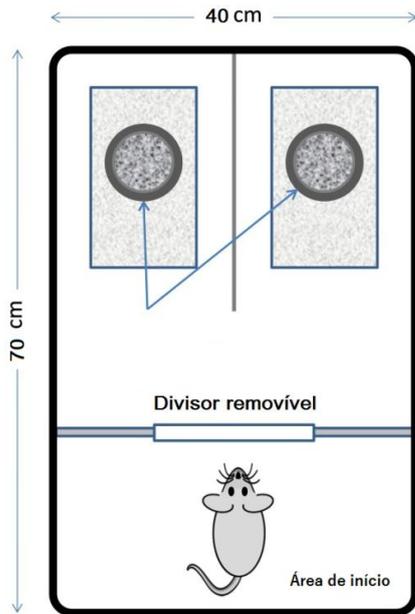


Figura 4: Representação do aparato utilizado para o *attentional set-shifting* (Tanaka et al, 2011).

Durante a habituação ao teste, os animais foram primeiro adaptados ao aparato e depois estimulados a escavar nos potes preenchidos com maravalha para obter a recompensa (pré-treino). No primeiro dia, os animais tiveram livre acesso ao aparato durante 15 minutos para familiarização ao mesmo. A partir do segundo dia, cada animal foi apresentado aos potes preenchidos com maravalha e porções da recompensa (1/4 de Froot Loops, Kellogg®) foram colocada no chão do aparato, formando um caminho até os potes, onde a recompensa também estava presente no topo dos potes. A partir do momento que o rato associou os potes com a recompensa, esta foi progressivamente escondida na maravalha ao longo das tentativas. Quando o rato conseguiu encontrar a recompensa com sucesso nos dois potes (10 escavações com alternância dos lados), iniciou-se o treinamento de discriminação simples (McCoy et al., 2007). Os ratos necessitaram entre 4 e 6 sessões diárias de habituação/pré-treino antes de iniciarem o treinamento de discriminação simples.

Primeiro os ratos foram treinados em uma série de duas discriminações simples (pré-teste) para obter a recompensa (dois tipos de odores diferentes ou dois tipos de meios de escavação diferentes), precisando de seis tentativas corretas consecutivas para cada discriminação. Todos os ratos foram treinados para as mesmas discriminações na mesma ordem, sendo que esses exemplos

de discriminações não são usados na fase de teste (McCoy et al., 2007, Birrell & Brown, 2010). O treinamento de discriminações simples foi realizado durante uma única sessão.

Após o treinamento de discriminações simples, os animais passaram para a fase de teste. Nesta, os animais foram testados em uma série de discriminações: discriminação simples, discriminação composta, reversão 1, mudança intradimensional, reversão 2, mudança extradimensional e reversão 3. Para cada série de discriminações, os animais precisavam atingir um critério de seis respostas corretas consecutivas antes de passar para a próxima etapa de discriminação. Todas as séries de discriminações foram realizadas sequencialmente, durante uma única sessão.

Na discriminação simples (DS) os potes só diferiram pelo odor que era acrescentado a eles, sendo a recompensa colocada sempre no pote que continha um *odor específico* (no caso, cheiro de orégano). Na discriminação composta (DC) uma segunda dimensão (meio de escavação) foi introduzida junto com o odor previamente apresentado, mas a recompensa continuava sendo escondida no pote com o *mesmo odor* que era garantia de acerto na sessão anterior, sendo o *meio de escavação irrelevante*. Na fase reversão 1 (Rev1), os odores e o meio continuaram os mesmos, mas o *odor que antes era correto agora era incorreto*. Tipos diferentes de odores e meios foram usados na mudança intradimensional (ID) e extradimensional (ED). A diferença é que na mudança ID o *odor continuava sendo a pista* para encontrar a recompensa, enquanto na mudança ED a dimensão/parâmetro mudava, sendo agora o *meio relevante*, e não mais o odor. Ambas as sessões de mudanças ID e ED foram seguidas de uma sessão de reversão: reversão 2 (Rev2) e reversão 3 (Rev3), respectivamente. Os exemplos de odores e meios de escavação utilizados em cada estágio do teste, são descritos na Tabela 1.

Para cada rato, foram analisados os parâmetros: número de tentativas necessários em cada estágio para atingir o critério de seis respostas corretas consecutivas, e o número de erros realizados em cada estágio antes de atingir o critério. Para a completa realização da tarefa *attentional set-shifting*, desde a habituação até o teste, os animais necessitaram entre 6 e 8 sessões diárias.

Estágio	Pote com recompensa	Pote sem recompensa
Discriminação simples (DS)	O1 (orégano) + maravalha	O2 (cravo) + maravalha
Discriminação composta (DC)	O1 (orégano) + M1 (botão) O1 (orégano) + M2 (isopor)	O2 (cravo) + M2 (isopor) O2 (cravo) + M1 (botão)
Reversão 1 (Rev1)	O2 (cravo) + M1 (botão) O2 (cravo) + M2 (isopor)	O1 (orégano) + M2 (isopor) O1 (orégano) + M1 (botão)
Mudança Intradimensional (ID)	O3 (morango) + M3 (miçanga) O3 (morango) + M4 (palha)	O4 (noz-moscada) + M4 (palha) O4 (noz-moscada) + M3 (miçanga)
Reversão 2 (Rev2)	O4 (noz-moscada) + M3 (miçanga) O4 (noz-moscada) + M4 (palha)	O3 (morango) + M4 (palha) O3 (morango) + M3 (miçanga)
Mudança Extradimensional (ED)	M5 (papelão) + O5 (canela) M5 (papelão) + O6 (baunilha)	M6 (papel) + O6 (baunilha) M6 (papel) + O5 (canela)
Reversão 3 (Rev3)	M6 (papel) + O5 (canela) M6 (papel) + O6 (baunilha)	M5 (papelão) + O6 (baunilha) M5 (papelão) + O5 (canela)

Tabela 1: exemplos de odores e meios de escavação utilizados em cada estágio do teste *attentional set-shifting*.

3.3.2 Teste de tolerância ao atraso da recompensa

Quarenta e oito horas após o término do ASS iniciou-se o “Teste de tolerância ao atraso da recompensa”. Neste teste é medida a impulsividade dos animais mediante a apresentação de *dois* parâmetros distintos de recompensa alimentar palatável: *pequena quantidade*, mas entregue de forma imediata ou outra em *grande quantidade*, mas que é entregue com atraso (Thiebot et al., 1985; Bizot et al., 2007). Utiliza-se um labirinto em “T” (cada braço com 50 cm de comprimento, 10 de largura e 40 de altura) com portas nas entradas (p1) e na região distal (p2) dos braços que podem ser fechadas e abertas, conforme mostrado na Figura 5. O animal é inserido no aparato no braço principal do labirinto, permitindo ao animal virar a esquerda ou a direita para obter a recompensa alimentar.

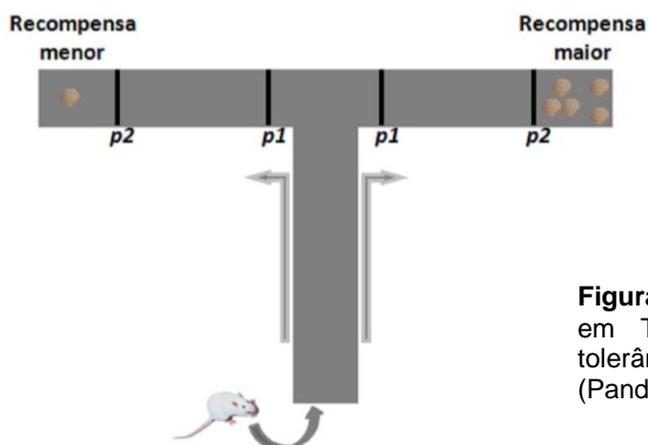


Figura 5: Representação do Labirinto em T utilizado para o teste de tolerância ao atraso da recompensa (Pandolfo, P 2010)

O protocolo utilizado nesse teste foi adaptado a partir do protocolo original de Thiebot e colaboradores (1985). No primeiro dia de habituação, os animais exploraram o labirinto por 5 minutos, e todas as portas (p1 e p2) encontravam-se abertas, possibilitando a livre exploração ao aparato e a obtenção de recompensa (mesma quantidade) nos dois braços do labirinto. A partir do segundo dia, o braço direito possuía uma recompensa maior (8 pedaços de $\frac{1}{4}$ de Froot Loops, Kellogg®) e o esquerdo uma recompensa menor (2 pedaços de Froot Loops). Todas as portas ficaram abertas durante o período de habituação (3 dias, com 2 sessões de 5 tentativas cada) e o animal foi capaz de comer a recompensa nos dois braços. Na fase de treinamento, as portas distais (P2) encontravam-se fechadas, e quando o animal escolhia um dos braços, a p1 se fechava e a p2 era imediatamente aberta, revelando a recompensa. Nessa fase de treinamento, o animal precisava aprender o paradigma de diferença no tamanho das recompensas, que foi confirmado quando o animal escolhia mais de 80% das vezes o braço da recompensa maior (em um dia de teste, 8 das 10 escolhas). Foram estipulados no mínimo três dias de treinamento antes dos animais passarem para a fase de teste.

No teste (10 dias, 5 tentativas por dia), quando o rato escolhia o braço da recompensa maior, a P1 era fechada e ele ficava confinado entre a p1 e p2 por 15 segundos (nos 5 primeiros dias) ou 30 segundos (nos 5 últimos dias), até a p2 ser aberta, apresentando a recompensa. No entanto, se o animal

escolhia o braço de recompensa menor, nenhum atraso para entrega da mesma era aplicado.

Os parâmetros avaliados foram o número de escolhas de recompensas grandes (com atraso) e pequenas (sem atraso), ao longo das sessões de teste. O comportamento impulsivo é observado quando o animal escolhe preferencialmente o braço sem o atraso na entrega da recompensa, embora esta seja menor (Bizot et al, 2007). Os animais precisaram entre 16 e 17 dias para completar todas as fases deste teste.

3.4 Análise morfológica

3.4.1 Perfusão

No dia seguinte ao fim dos testes, os ratos (n=6 por grupo) foram profundamente anestesiados com ketamina e xilazina (80mg/kg e 10mg/kg, i.p.) e então foram perfundidos com solução salina 0,9% seguido de uma solução fixadora composta por 4% de paraformaldeído diluídos em 0,1M de tampão fosfato. Após essa etapa, os encéfalos foram removidos e pós-fixados *overnight* na mesma solução fixadora utilizada para a perfusão e depois foram crioprotetidos em sacarose 30% diluída em tampão fosfato a 4°C até submergirem. A próxima etapa foi o congelamento dos encéfalos através de uma rápida imersão em isopentano e em seguida em nitrogênio líquido. Os encéfalos foram conservados em freezer -70°C até a realização das secções coronais (50 µm) em criostato.

3.4.2 Volume de lesão

Para a avaliação histológica do volume da lesão, foram realizadas secções coronais de 50 µm com intervalos de 300 µm durante toda a extensão do encéfalo utilizando um criostato (Leica, Germany) a -20°C. Os cortes foram montados em lâminas gelatinizadas que depois foram coradas pela técnica de hematoxilina-eosina. Ao final deste processo, as lâminas foram escaneadas em resolução de 1200 dpi e com auxílio do software *Image J 4.0* (Scion Corporation, Frederick, MD, USA) delimitamos as áreas das seguintes estruturas: hemisférios

totais (coordenadas entre 3.7 e -6.3), córtex cerebral (coordenadas entre 3.7 e -6.3), substância branca (corpo caloso e cápsula externa: coordenadas entre 3.72 e -7.44), hipocampo (coordenadas entre -1.72 e -6.60) e estriado (coordenadas entre 2.76 e -2.28) (Paxinos & Watson, 2004). O volume das estruturas foi calculado pela soma das áreas multiplicado pelo intervalo entre as secções, de acordo com o Método de Cavalieri (Mestriner et al., 2013; Pereira et al., 2007).

3.5 Análise Estatística

O desempenho na tarefa ASS e os volumes das regiões encefálicas foram avaliados por teste-t não-pareado. ANOVA de medidas repetidas foi aplicada para a análise do desempenho no “Teste de tolerância ao atraso da recompensa” ao longo das sessões de cada tempo de espera, tendo como *grupo* o fator independente e *sessão* como a medida repetida. Para a comparação das médias dos diferentes tempos de espera nesta mesma tarefa, foi aplicada ANOVA de dois fatores, tendo *grupo* e *sessão* como os fatores avaliados. Quando necessário, as análises foram seguidas pelo teste *post hoc* de Tukey para múltiplas comparações. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) e os resultados foram considerados significativos quando $p \leq ,05$. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Statistica® versão 10.

4. RESULTADOS

4.1 *Attentional set-shifting*

No teste ASS, os animais HI necessitaram de mais tentativas para atingir o critério de seis respostas corretas consecutivas, nos estágios de reversão 2 ($F(1,21) = 6,14, p < ,05$) e reversão 3 ($F(1,21) = 1,09, p < ,001$), quando comparado aos animais CT. Não houve diferença significativa entre os grupos quanto ao número de tentativas nos demais estágios: discriminação simples, discriminação composta, reversão 1, mudança intradimensional e mudança extradimensional (Figura 6A).

Quanto ao número de erros que os animais realizaram em cada um dos estágios, foi identificado um maior número de erros nos animais HI, comparando-se com o grupo CT, nos estágios reversão 2 ($F(1,21) = 3,5, p < ,05$) e reversão 3 ($F(1,21) = 1,9, p < ,0001$), corroborando assim com o maior número de tentativas para atingir o critério proposto nesses estágios. O número de erros no estágio de mudança extradimensional também foi maior no grupo HI ($F(1,21) = 3,43, p < ,05$) (Figura 6C).

Considerando os números totais de tentativas e erros durante o teste, os animais do grupo HI necessitaram de mais tentativas que o grupo CT ($F(1,21) = 2,86, p < ,0001$) e realizaram o dobro do número de erros dos animais controle durante toda a tarefa ($F(1,21) = 2,28, p < ,0001$), conforme mostrado na figura 6B e D, respectivamente.

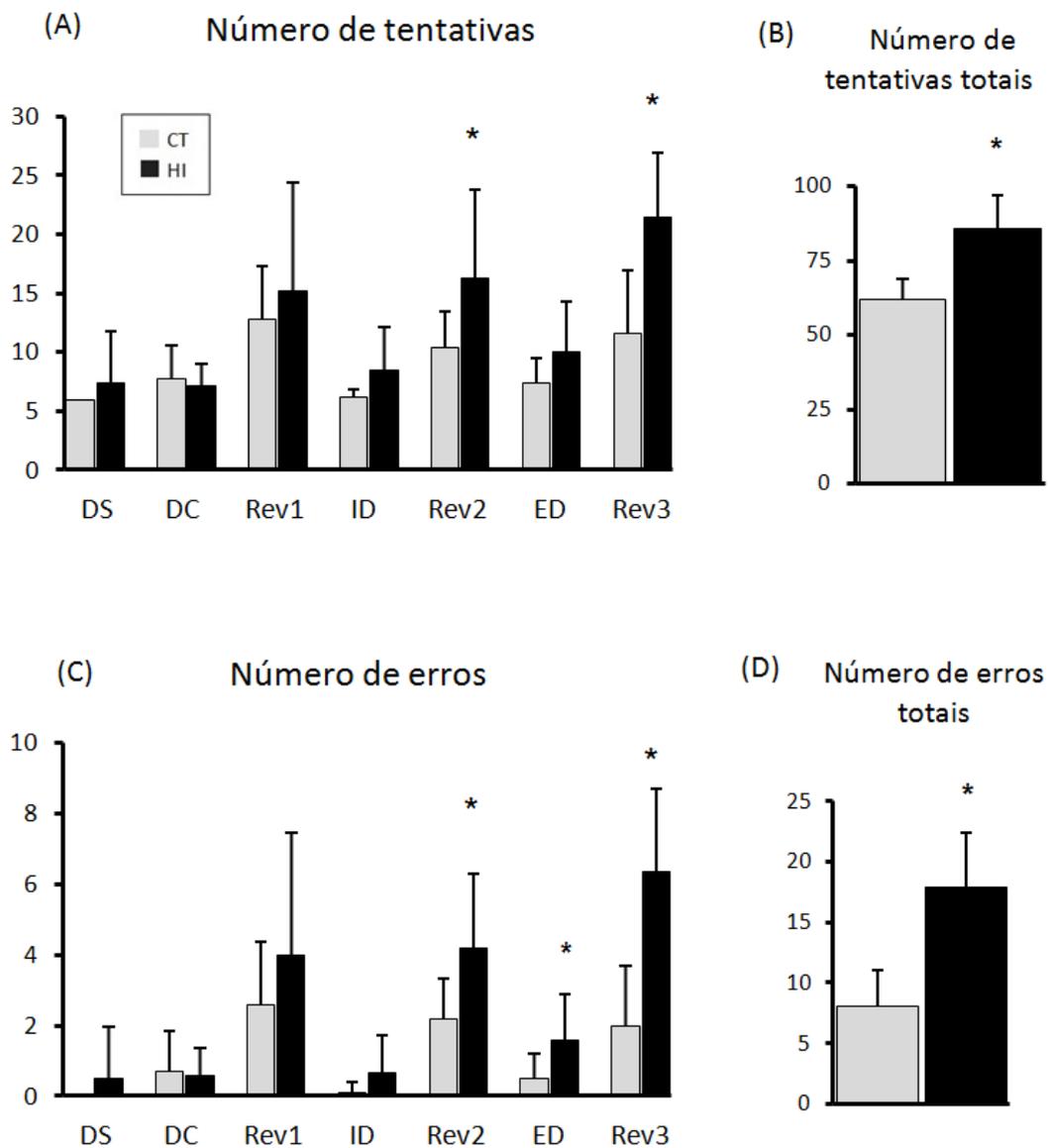


Figura 6: Desempenho durante o teste attentional set-shifting, avaliando o número de tentativas (A) e erros (C) em cada estágio até atingir o critério proposto, assim como os valores totais dessas variáveis ao final do teste (B e D). Resultados são expressos como média \pm EPM. *Diferença entre grupos. Teste-t, $p < 0,05$. DS: discriminação simples; DC: discriminação composta; Rev1: reversão 1; ID: mudança intradimensional; Rev2: reversão 2; ED: mudança extradimensional; Rev3: reversão 3; CT: controle; HI: hipóxia-isquemia.

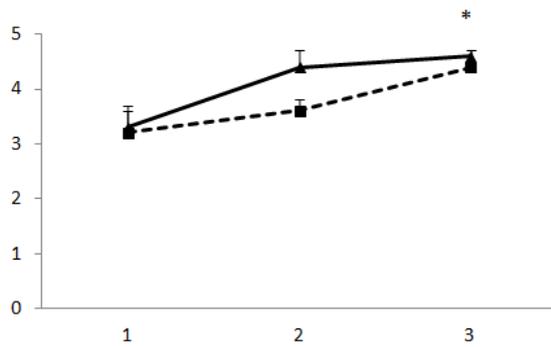
4.2 Teste de tolerância ao atraso da recompensa

Neste teste foi realizado um período de treinamento para identificação de diferentes porções de recompensa alimentar, sem o atraso para recebê-las. Durante este treinamento, foi registrada a preferência pela recompensa maior em duas sessões diárias durante 3 dias. A ANOVA de medidas repetidas apontou um efeito principal significativo da sessão ($F(1,21) = 12,1, p < ,0001$). O teste *post hoc* de Tukey demonstrou que o número de escolhas para o braço contendo a recompensa maior aumentou no 3^a dia de treinamento, quando comparada à 1^a sessão, tanto no grupo CT quanto no grupo HI (Figura 7A).

Durante o teste, foi realizada 1 sessão diária durante 5 dias, quando o atraso de 15 segundos para a entrega da recompensa maior foi inserido. A ANOVA de medidas repetidas demonstrou um efeito principal da sessão ($F(1,21) = 22,12, p < ,0001$). No teste *post hoc* de Tukey foi observada uma diminuição da escolha do braço com a recompensa maior no 3^o dia de teste, quando comparado ao 1^o dia, tanto para o grupo CT, quanto para o grupo HI (Figura 7B). Quando um tempo de espera de 30 segundos para a entrega da recompensa maior foi inserido (teste com 5 dias e sessões diárias), a ANOVA de medidas repetidas não indicou diferença significativa ao longo das sessões, em nenhum dos grupos avaliados (Figura 7C), ou seja, os grupos já apresentaram preferência pela recompensa menor desde o primeiro dia de teste.

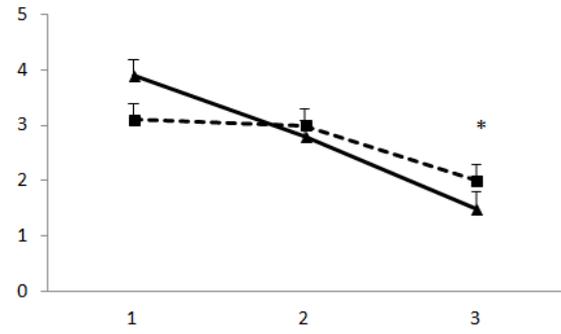
Na figura 8, são apresentadas as médias de escolhas para o braço contendo a recompensa maior ao longo de todo o teste, comparando-se os três procedimentos (0,15 ou 30 segundos de atraso para a recompensa maior). A ANOVA de dois fatores demonstrou um efeito principal do *tempo* ($F(1,21) = 309,73, p < ,0001$) onde o *post hoc* de Tukey apontou que houve uma diminuição no número de escolhas pela recompensa maior quando foi inserido um atraso para o recebimento do alimento. Ambos os grupos apresentaram menor média de escolhas da recompensa maior quando houve um atraso de 15 e 30 segundos; ressalta-se que esta diminuição foi progressiva. Em ambos os procedimentos, treino e teste, no Teste de tolerância ao atraso da recompensa não foi identificada diferença entre os grupos experimentais, nas variáveis avaliadas.

(A) Escolhas para a recompensa maior



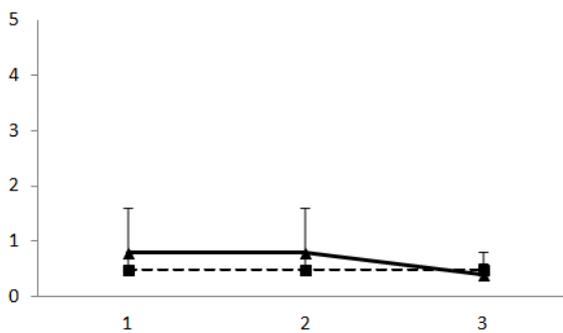
sessões com um tempo de 0 segundos antes da entrega da recompensa maior

(B) Escolhas para a recompensa maior



sessões com um tempo de 15 segundos antes da entrega da recompensa maior

(C) Escolhas para a recompensa maior



sessões com um tempo de 30 segundos antes da entrega da recompensa maior

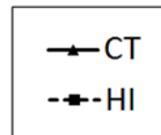


Figura 7: Número de escolhas para a recompensa maior no teste de tolerância ao atraso da recompensa, quando o tempo de espera para a entrega da recompensa maior era de 0 (A), 15 (B) e 30 segundos (C). Resultados são expressos como média \pm EPM. *Diferente da 1ª sessão. ANOVA de medidas repetidas, $p < ,05$. CT: controle; HI: hipóxia-isquemia.

Escolhas para a recompensa maior

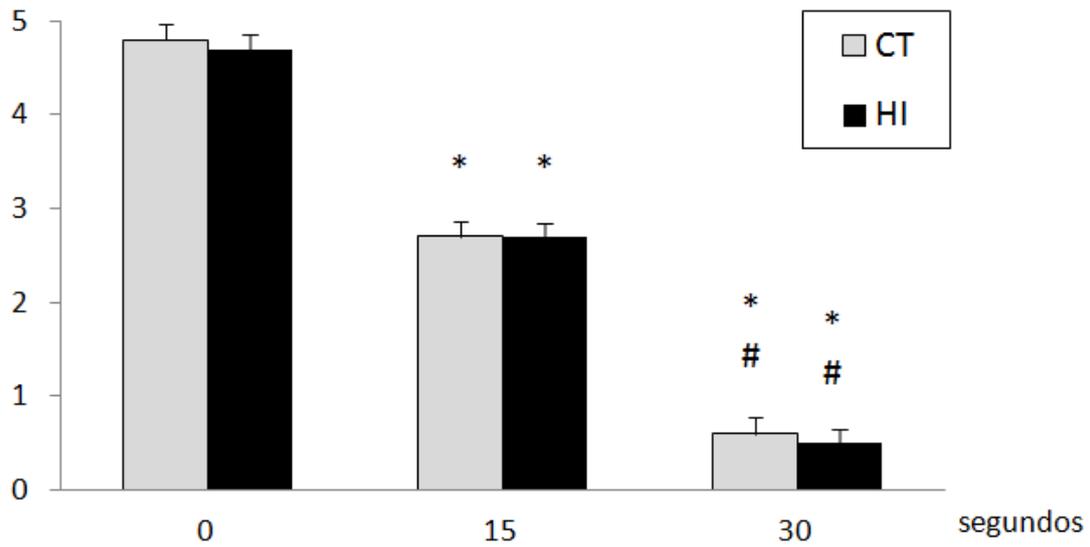


Figura 8: Média do número de escolhas para a recompensa maior no teste de tolerância ao atraso da recompensa, nos diferentes tempos de espera (0, 15 e 30 segundos). Resultados são expressos como média \pm EPM. *Diferente do tempo 0, onde não havia atraso para a entrega da recompensa. #Diferente do tempo 15 segundos. ANOVA de dois fatores, $p < ,05$. CT: controle; HI: hipóxia-isquemia.

4.3 Volume de lesão

Hemisférios totais: O volume total do hemisfério direito (ipsilateral à lesão) está diminuído em animais HI quando comparado aos controles ($F(1,11) = 1,28, p < ,001$), mas nenhuma diferença foi encontrada no hemisfério esquerdo (controlateral à lesão), como observado na figura 9A.

Córtex cerebral: Teste-t revelou que os animais HI tem um menor volume cortical ($F(1,11) = 2,34, p < ,01$; Figura 9B) apenas no lado ipsilateral à lesão (lado direito), sem diferenças significativas no lado contralateral à lesão (lado esquerdo).

Substância branca: Os animais HI demonstraram um menor volume de substância branca nos dois hemisférios cerebrais, ipsilateral à lesão ($F(1,11) = 7,02, p < ,001$; Figura 9C), assim como no lado contralateral ($F(1,11) = 2,3, p < ,01$).

Hipocampo: Uma diferença significativa foi encontrada entre os grupos, ipsilateral à lesão. Animais HI apresentaram menor volume hipocampal do lado direito quando comparado aos animais CT ($F(1,11) = 63,18, p < ,0001$; Figura 9D). No lado esquerdo não houve diferença entre os grupos.

Estriado: Uma redução no volume estriatal no lado direito foi observada no grupo HI ($F(1,11) = 2,96, p < ,01$; Figura 9E), sem diferenças no lado oposto à lesão (lado esquerdo).

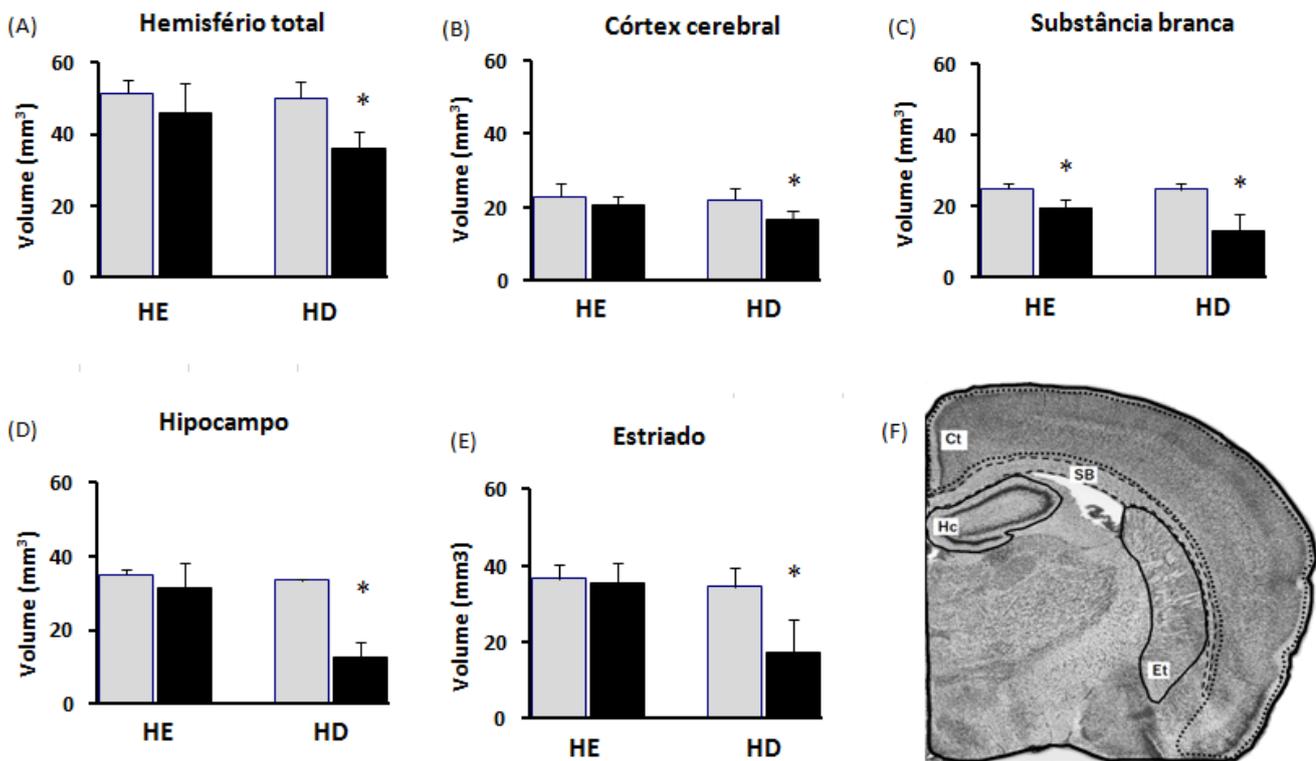


Figura 9: Volumes encefálicos dos hemisférios totais (A), córtex cerebral (B), substância branca (C), hipocampo (D) e estriado (E). Resultados são expressos como média \pm EPM. *Diferença entre grupos. Teste-t, $p < 0,05$. HE: hemisfério esquerdo (contralateral à lesão); HD: hemisfério direito (ipsilateral à lesão); CT: controle; HI: hipóxia-isquemia. (F) Fotomicrografia (Paxinos & Watson 2004; coordenada -2,04mm) representando as estruturas avaliadas. Ct: cortex cerebral; SB: substância branca (corpo caloso e cápsula externa); Hc: hipocampo; Et: estriado.

5. DISCUSSÃO

O objetivo do presente estudo foi investigar se a Hipóxia-isquemia encefálica neonatal contribui para o desenvolvimento de características relacionadas ao Transtorno do déficit de atenção e hiperatividade na fase adulta em ratos utilizando o teste *attentional set-shifting* e o teste de tolerância ao atraso da recompensa. Animais submetidos à HI apresentaram prejuízo na função executiva avaliado no ASS, enquanto o nível de impulsividade, observado no teste de tolerância ao atraso da recompensa, não foi alterado pela HI. Relacionando com os achados comportamentais, houve perda de volume no hemisfério cerebral total, córtex cerebral, substância branca, hipocampo e estriado no grupo HI, principalmente no lado ipsilateral à lesão.

O teste ASS foi desenvolvido para ratos por Birrel e Brown (2010), baseado no teste “*ID/ED set-shifting*” utilizado para avaliar função executiva em humanos (Owen et al., 1991). Em modelos experimentais, essa tarefa já foi utilizada para avaliar processos atencionais relacionados à função executiva em diversas manipulações, tais como: lobotomia frontal (Owen et al., 1991), lesões neurotóxicas (Birrel & Brown, 2010), medicamentos de ação central (Tunbridge et al., 2004), envelhecimento (Barense et al., 2002), interrupção do sono (McCoy et al., 2007), entre outros. Como previamente citado, a hipóxia-isquemia neonatal pode ser um fator desencadeante do TDAH (Getahun et al., 2013). Sendo assim, no presente estudo foi avaliado o comportamento de ratos submetidos ao modelo de hipóxia-isquemia de Levine-Rice, buscando-se relacionar os possíveis achados com aqueles identificados em humanos.

Os resultados indicaram que os animais submetidos à HI neonatal e testados na tarefa ASS apresentaram um claro prejuízo nos estágios de reversão da tarefa e também realizaram um maior número de erros no estágio de mudança extradimensional, quando o estímulo relevante passou do odor para o meio de escavação. Estes achados demonstram que a hipóxia-isquemia neonatal comprometeu seletivamente discriminações que exigiam uma mudança atencional entre as diferentes dimensões (ED - meio ou odor) ou mesmo uma mudança na mesma dimensão (REV - odor 1 para odor 2) (Culley et al., 2014). Uma vez que a HI não afetou de forma significativa a fase de mudança ID, os comprometimentos que observamos nas fases de reversão e

mudança extradimensional não podem ser interpretados como um déficit geral de aprendizagem (McCoy et al., 2010). Os erros observados nos estágios de reversão se referem a uma maior perseveração à regra empregada no estágio anterior da tarefa (McCoy et al., 2010), que são decorrentes de um comprometimento na flexibilidade comportamental desses animais. Considerando isto, é possível afirmar que esses achados indicam que os animais submetidos à HI apresentam um comportamento perseverativo. No estudo de van der Kooij et al. (2010) animais HI com 45 dias de idade foram avaliados no *modified hole board*, onde deviam aprender a discriminar diferentes cilindros para receber uma recompensa alimentar. Neste teste, na fase de reversão, os animais HI demoraram mais para concluir a tarefa, demonstrando uma flexibilidade cognitiva prejudicada. O paradigma realizado nessa tarefa é semelhante ao utilizado no teste ASS aplicado no presente estudo, e os resultados do trabalho mencionado vão de acordo com os nossos, onde os animais HI não apresentaram prejuízos significativos no aprendizado da tarefa, mas quando testados nas fases de reversão do aprendizado, os animais tinham uma maior dificuldade para executá-las. Ainda, em concordância com a presente interpretação dos resultados, respostas perseverativas aumentadas nos animais HI também foram observadas no *5-choice serial reaction time task* (5-CSRTT) (Miguel et al., 2015) e no *choice reaction time task* (CRTT), um aparato equipado com duas alavancas que são utilizadas para avaliar processos atencionais ao longo dos dias de treinamento (Ikeda et al., 2004; Mishima et al., 2004). Devemos considerar que em estudo prévio já foi demonstrado que os animais HI apresentam um comportamento motor semelhante aos controles, o que exclui a possibilidade do comprometimento na tarefa ter sido causado por algum problema motor (Miguel et al., 2015).

A capacidade de desconsiderar um estímulo originalmente relevante e atender a um novo estímulo é considerada uma função executiva do sistema nervoso (McCoy et al., 2010) e evidências sugerem que o CPF desempenha um papel importante nas funções executivas em humanos (Decker et al., 2003), primatas não-humanos (Rogers et al., 2000) e roedores (Danet et al., 2008). Os dois tipos de flexibilidade comportamental que podem ser avaliados no ASS, a flexibilidade que ocorre nas reversões de estímulos que predizem a

recompensa ou a flexibilidade na mudança extradimensional (meio de escavação ao invés de odor), requerem a integridade de diferentes regiões do CPF (Dias et al., 1996, Birrell e Brown, 2000; McAlonan e Brown, 2003). A flexibilidade nas reversões depende da integridade do córtex orbitofrontal, enquanto a flexibilidade na mudança ED depende da integridade do CPF medial ventral, como mostrado em estudos de lesão em macacos (Dias et al., 1996), ratos (Birrel & Brown, 2010) e camundongos (Bissonette et al., 2008). Os achados encontrados nesse trabalho avaliando a função executiva dos animais que foram submetidos à HI neonatal, também são mostrados em diversos estudos clínicos que utilizam o ID/ED shifting task (Kempton et al., 1999, Coghill et al., 2014, Gau & Chang, 2010a, Gau 2010b), uma tarefa que apresenta o mesmo paradigma do ASS.

No teste de tolerância ao atraso da recompensa, que avalia especificamente um aspecto de tomada de decisão impulsiva, não houve diferença no nível de impulsividade entre os animais controle e os animais que foram submetidos à hipóxia-isquemia neonatal. Os resultados encontrados apontam apenas uma diminuição progressiva na escolha do braço que prediz a recompensa maior quando o tempo de espera é inserido antes da entrega da recompensa, mas essa diminuição da escolha do braço com a recompensa maior ocorre da mesma forma para os dois grupos avaliados. Esses achados referentes à impulsividade diferem dos resultados encontrados no teste 5-CSRTT, onde foi identificado um aumento de respostas prematuras (um índice de impulsividade) nos animais adultos submetidos à HI neonatal (Miguel et al., 2015). Tais diferenças nas análises do nível de impulsividade não são inesperadas, visto que a impulsividade apresenta diferentes características comportamentais, tais como a incapacidade de conter uma resposta ou a intolerância ao atraso no recebimento de uma recompensa (Winstanley et al., 2006). No caso dos dois testes que comparamos, cada um avalia um aspecto diferente da impulsividade: o 5-CSRTT baseia-se na ação impulsiva, enquanto o teste de tolerância ao atraso da recompensa avalia tomada de decisão impulsiva. Sendo assim, a hipóxia-isquemia neonatal parece desencadear uma ação impulsiva desses animais na fase adulta, mas não interfere na tomada de decisão desses animais. Além disso, cabe também considerar que na literatura há diversos trabalhos mostrando que pacientes com TDAH podem não ter

prejuízo em tarefas que avaliam tolerância ao atraso (Marco et al, 2009; Paloyelis et al, 2009).

Em relação às análises morfológicas, os resultados demonstraram uma atrofia encefálica ipsilateral à oclusão arterial em todas as regiões analisadas: hemisférios totais, córtex cerebral, substância branca, hipocampo e estriado. Além disso, a substância branca no lado contralateral também foi afetada pelo procedimento de hipóxia-isquemia, provavelmente porque essa região apresenta alta conectividade entre os dois hemisférios cerebrais. Estes resultados confirmam os dados anteriores no modelo de HI de Levine-Rice, que demonstraram: atrofia no hipocampo, estriado, córtex e corpo caloso (Alexander et al., 2014; Almlí et al., 2000; Pereira et al., 2007; Pereira et al., 2008). Algumas dessas regiões estão implicadas nos comportamentos observados no presente estudo. Como mencionado anteriormente, diversos trabalhos sugerem que o CPF desempenha um papel importante nas funções executivas. Tendo em vista que o córtex cerebral apresentou uma diminuição de volume nos animais HI (figura 9B), essa atrofia cortical global provavelmente deve ter afetado a integridade funcional do CPF, colaborando para os déficits de inflexibilidade comportamental nos animais HI. Em um estudo em humanos, foram avaliadas as ativações encefálicas durante uma tarefa de mudança de conjunto (*set-shifting task*) e os resultados demonstraram o envolvimento do estriado e do hipocampo em diferentes estágios durante a realização da tarefa. Ocorria um pico de ativação no núcleo caudado (estriado) quando um *feedback* negativo sinalizava uma mudança na regra, já no hipocampo ocorria um pico de ativação quando a identidade da regra tinha sido estabelecida. Tal resultado sugere que o núcleo caudado desempenha um papel na geração da resposta quando a identidade da nova regra é desconhecida e o que o hipocampo ajuda a consolidar o conhecimento sobre a correta regra em uso (Graham et al., 2009). Tendo em vista que essas duas regiões que se mostraram importantes para a realização da tarefa de ASS estão atrofiadas nos animais HI (figura 9D e E), esta relação pode ter colaborado para o desempenho prejudicado na tarefa de ASS pelos animais lesionados.

Os resultados do presente estudo apontam um prejuízo na função executiva de animais submetidos à hipóxia-isquemia, evidenciado por uma inflexibilidade comportamental na tarefa *attentional set-shifting*. Além disso,

demonstramos que estruturas encefálicas envolvidas na realização dessa tarefa, como o córtex, estriado e hipocampo, estão atrofiadas nesses animais. Sabendo que indivíduos com Transtorno de déficit de atenção/hiperatividade apresentam déficits nestas funções executivas, podemos inferir que o modelo de hipóxia-isquemia, em roedores, pode desencadear comportamentos relacionados ao TDAH em humanos. Além disso, esse estudo pode contribuir para o desenvolvimento de um modelo animal para o estudo do TDAH, visto que ainda não há consenso na literatura de um modelo adequado para esse fim.

6. CONCLUSÕES

A partir dos dados obtidos nesse estudo, podemos concluir que:

- Animais submetidos à hipóxia-isquemia neonatal e avaliados na tarefa *attentional set-shifting* na fase adulta apresentaram prejuízo na função executiva, evidenciado por uma inflexibilidade comportamental nos estágios em que precisavam desconsiderar um estímulo originalmente relevante e atender a um novo estímulo;
- A hipóxia-isquemia neonatal não alterou os níveis de impulsividade dos animais na fase adulta, avaliado no teste de tolerância ao atraso da recompensa;
- O evento hipóxico-isquêmico ocasionou uma atrofia encefálica nas seguintes regiões de animais adultos: hemisfério cerebral total, córtex cerebral, substância branca, hipocampo e estriado, principalmente no lado ipsilateral à lesão.

7. PERSPECTIVAS

- Investigar se a relação entre a hipóxia-isquemia neonatal e o transtorno de déficit de atenção/hiperatividade já aparece em animais mais jovens (visto que o TDAH tem uma incidência maior em crianças e adolescentes);
- Compreender os mecanismos que podem estar envolvidos na inter-relação entre a hipóxia-isquemia neonatal e o transtorno de déficit de atenção/hiperatividade, como a análise do sistema dopaminérgico;
- Ainda, buscando-se uma relação entre a hipóxia-isquemia e o transtorno de déficit de atenção/hiperatividade, é necessário considerar a validade preditiva do modelo de asfixia perinatal para o TDAH. Para este fim, os efeitos do metilfenidato, a droga de escolha para o tratamento de TDAH, precisam ser também investigados.

8. REFERÊNCIAS

Akiyama Y, Koshimura K, Ohue T, et al. (1991). Effect of hypoxia on the activity of the dopaminergic neuron system in the rat striatum as studied by in vivo brain microdialysis. *Journal of Neurochemistry*, 57, 997-1002.

Alexander M, Garbus H, Smith AL, Rosenkrantz TS, & Fitch RH. (2013). Behavioral and histological outcomes following neonatal HI injury in a preterm (P3) and term (P7) rodent model. *Behavioural Brain Research*, 259, 85-96. doi: 10.1016/j.bbr.2013.10.038

Almli CR, Levy TJ, Han BH, Shah AR, Gidday JM, & Holtzman DM. (2000). BDNF protects against spatial memory deficits following neonatal hypoxia-ischemia. *Experimental Neurology*, 166, 99-114. doi: 10.1006/exnr.2000.7492

American Psychiatric Association. (2013). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders*. 5th ed. Arlington, VA.

Barense MD, Fox MT, Baxter MG. (2002). Aged rats are impaired on an attentional set-shifting task sensitive to medial frontal cortex damage in young rats. *Learning & Memory*, 9, 191-201.

Berger R, Garnier Y. (1999). Pathophysiology of perinatal brain damage. *Brain Research Reviews*, 30, 107-134.

Berger R, Jensen A, Krieglstein J, Steigelman JP. (1991). Effects of acute asphyxia on brain energy metabolism in fetal guinea pigs near term. *Journal of Developmental Physiology*, 16, 9-11.

Bhardwaj A, Brannan T, Martinez-Tica J, Weinberger J. (1990). Ischemia in the dorsal hippocampus is associated with acute extracellular release of dopamine and norepinephrine. *Journal of Neural Transmission*, 80, 195-201.

Biederman J, Mick E, & Faraone SV. (2000). Age-dependent decline of symptoms of attention deficit hyperactivity disorder: impact of remission definition and symptom type. *American Journal of Psychiatry*, 157, 816-818. doi:10.1176/appi.ajp.157.5.816

Birrell JM, Brown VJ. (2000). Medial frontal cortex mediates perceptual attentional set shifting in the rat. *The journal of Neuroscience*, 20, 4320–4324.

Bissonette GB, Martins GJ, Franz TM, Harper ES, Schoenbaum G, Powell EM. (2008). Double dissociation of the effects of medial and orbital prefrontal cortical lesions on attentional and affective shifts in mice. *The journal of Neuroscience*, 28, 11124–11130.

Bizot JC, Chenault N, Houzé B, Herpin A, David S, Pothion S, Trovero F. (2007). Methylphenidate reduces impulsive behaviour in juvenile Wistar rats, but not in adult Wistar, SHR and WKY rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 193, 215-23.

Buisson A, Callebert J, Mathieu E, Plotkine M, Boulu RG. (1992). Striatal protection induced by lesioning the substantia nigra of rats subjected to focal ischemia. *Journal of Neurochemistry*, 59, 1153–1157.

- Carletti JV, Deniz BF, Miguel PM, Rojas JJ, Kolling J, Scherer EB, ...Pereira, LO. (2012). Folic acid prevents behavioral impairment and Na(+), K(+) -ATPase inhibition caused by neonatal hypoxia-ischemia. *Neurochemical Research*, 37, 1624-1630. doi: 10.1007/s11064-012-0757-6
- Castellanos FX, Sonuga-Barke EJ, Milham MP, Tannock R. (2006). Characterizing cognition in ADHD: beyond executive dysfunction. *Trends in Cognitive Sciences*, 10, 117-23.
- Chase EA, Tait DS, Brown VJ. (2012). Lesions of the orbital prefrontal cortex impair the formation of attentional set in rats. *European Journal of Neuroscience*, 36, 2368-75. doi: 10.1111/j.1460-9568.2012.08141.x.
- Coghill DR, Hayward D, Rhodes SM, Grimmer C, Matthews K. (2014). A longitudinal examination of neuropsychological and clinical functioning in boys with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): improvements in executive functioning do not explain clinical improvement. *Psychological Medicine*, 44, 1087-99. doi: 10.1017/S0033291713001761.
- Cubillo A, Halari R, Smith A, Taylor E, & Rubia K. (2012). A review of fronto-striatal and fronto-cortical brain abnormalities in children and adults with Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD) and new evidence for dysfunction in adults with ADHD during motivation and attention. *Cortex*, 48, 194-215. doi: 10.1016/j.cortex.2011.04.007.
- Culley DJ, Snayd M, Baxter MG, Xie Z, Lee IH, Rudolph J, Inouye SK, Marcantonio ER, Crosby G. (2014). Systemic inflammation impairs attention and cognitive flexibility but not associative learning in aged rats: possible implications for delirium. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 6, 107. doi: 10.3389/fnagi.2014.00107.
- Richards DA, Obrenovitch TP, Symon L, Curzon G. (1993). Extracellular dopamine and serotonin in the rat striatum during transient ischemia of different severities: A microdialysis study. *Journal of Neurochemistry*, 60, 128–136.
- Danet M, Lapid-Bluhm S, Bondi CO, Doyen J, Rodriguez G, Bedard-Arana T, Morilak DA. (2008). Behavioural assays to model cognitive and affective dimensions of depression and anxiety in rats. *Journal of Neuroendocrinology*, 20, 1115–1137.
- Decker MJ, Hue GE, Candle WM, Miller GW, Keating GL, Rye DB. (2003). Episodic neonatal hypoxia evokes executive dysfunction and regionally specific alterations in markers of dopamine signaling. *Neuroscience*, 117, 417–425.
- Dias R, Robbins TW, Roberts AC. (1996). Dissociation in prefrontal cortex of affective and attentional shifts. *Nature*, 380, 69–72.
- Eghbalian F, Monsef A. (2008). Neonatal seizures; Etiology and frequency. *Iranian Journal of Child Neurology*, 2, 39–42.
- Elgen SK, Sommerfelt K, Leversen KT, Markestad T. (2015). Minor neurodevelopmental impairments are associated with increased occurrence of ADHD symptoms in children born extremely preterm. *European Child and Adolescent Psychiatry*, 24, 463-70. doi: 10.1007/s00787-014-0597-9.

Eling P, Derckx K, Maes R. (2008). On the historical and conceptual background of the Wisconsin Card Sorting Test. *Brain and Cognition*, 67, 247-253.

Castellanos FX, Tannock R. (2002). Neuroscience of attention-deficit/hyperactivity disorder: The search for endophenotypes. *Nature Reviews Neuroscience*, 3, 617–628.

Faraone SV, Sergeant J, Gillberg C, & Biederman J. (2003). The worldwide prevalence of ADHD: is it an American condition? *World Psychiatry*, 2, 104-113.

Gau SS, Shang CY. (2010). Executive functions as endophenotypes in ADHD: evidence from the Cambridge Neuropsychological Test Battery (CANTAB). *Journal of Child Psychology and Psychiatry*. 51, 838-49. doi: 10.1111/j.1469-7610.2010.02215.x.

Gau SS, Shang CY. (2010). Improvement of executive functions in boys with attention deficit hyperactivity disorder: an open-label follow-up study with once-daily atomoxetine. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 13, 243-56. doi: 10.1017/S1461145709990836.

Getahun D, Rhoads GG, Demissie K, Lu SE, Quinn VP, Fassett MJ, ...Jacobsen SJ. (2013). In utero exposure to ischemic-hypoxic conditions and attention-deficit/hyperactivity disorder. *Pediatrics*, 131, 53-61. doi: 10.1542/peds.2012-1298.

Globus MY, Dietrich WD, Busto R, Valdes I, Ginsberg MD. (1989). The combined treatment with D-1 antagonist (SCH-23390) and NMDA receptor blocker (MK-801) dramatically protects against ischemia-induced hippocampal damage. (Abstr.) *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 9 (Suppl.), S5.

Graham S, Phua E, Soon CS, Oh T, Au C, Shuter B, Wang SC, Yeh IB. (2009). Role of medial cortical, hippocampal and striatal interactions during cognitive set-shifting. *Neuroimage*, 45, 1359-67. doi: 10.1016/j.neuroimage.2008.12.040.

Han JY, Kwon HJ, Ha M, Paik KC, Lim MH, Gyu Lee S, Yoo SJ, Kim EJ. (2015). The effects of prenatal exposure to alcohol and environmental tobacco smoke on risk for ADHD: a large population-based study. *Psychiatry Research*, 225, 164-8. doi: 10.1016/j.psychres.2014.11.009.

Hart EL, Lahey BB, Loeber R, Applegate B, & Frick PJ. (1995). Developmental change in attention-deficit hyperactivity disorder in boys: a four-year longitudinal study. *Journal of Abnormal Child Psychology*, 23, 729-749.

Huang BY, Castillo M. (2008). Hypoxic-ischemic brain injury: imaging findings from birth to adulthood. *Radiographics*, 28, 417-39. doi: 10.1148/rg.282075066.

Ikeda T, Mishima K, Aoo N, Egashira N, Iwasaki K, Fujiwara M, Ikenoue T. (2004). Combination treatment of neonatal rats with hypoxia-ischemia and endotoxin induces long-lasting memory and learning impairment that is associated with extended cerebral damage. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 191, 2132-41.

Jensen A, Garnier Y, Middelani J, Berger R. (2003). Perinatal brain damage--from pathophysiology to prevention. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 110, Suppl 1:S70-9.

- Johnston MV, Fatemi A, Wilson MA, Northington F. (2011). Treatment advances in neonatal neuroprotection and neurointensive care. *The Lancet Neurology*, 10, 372-82.
- Kelmendi B, Saricicek A, Sanacora G. (2006). The role of the glutamatergic system in the pathophysiology and treatment of mood disorders. *Primary Psychiatry*, 13, 80-86.
- Kempton S, Vance A, Maruff P, Luk E, Costin J, & Pantelis C. (1999). Executive function and attention deficit hyperactivity disorder: stimulant medication and better executive function performance in children. *Psychological Medicine*, 29, 527- 538.
- Kessler RC, Adler L, Barkley R, Biederman J, Conners CK, Demler O, ...Zaslavsky AM. (2006). The prevalence and correlates of adult ADHD in the United States: results from the National Comorbidity Survey Replication. *American Journal of Psychiatry*, 163, 716-723. doi:10.1176/appi.ajp.163.4.716
- Kurinczuk JJ, White-Koning M, Badawi N. (2010). Epidemiology of neonatal encephalopathy and hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Early Human Development*, 86, 329–38.
- Lai MC, Yang SN. (2011). Perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011, 609813.
- Lawn JE, Cousens S, Zupan J. (2005). Lancet neonatal survival steering team: Four million neonatal deaths: When? Where? Why? *Lancet*, 365, 891–900.
- Leite-Almeida H, Guimarães MR, Cerqueira JJ, Ribeiro-Costa N, Anjos-Martins H, Sousa N, Almeida A. (2014). Asymmetric c-fos expression in the ventral orbital cortex is associated with impaired reversal learning in a right-sided neuropathy. *Molecular Pain*, 10, 41. doi: 10.1186/1744-8069-10-41.
- Levine S. (1960). Anoxic–ischemic encephalopathy in rats. *American Journal of Pathology*, 36, 1–17.
- Lezak MD. The problem of assessing executive functions. (1982). *International Journal of Psychology*, 17, 281–297.
- Lu-Emerson C, & Khot S. (2010). Neurological sequelae of hypoxic-ischemic brain injury. *NeuroRehabilitation*, 26, 35-45. doi: 10.3233/NRE-2010-0534
- Marco R, Miranda A, Schlotz W, Melia A, Mulligan A, Muller U et al. (2009). Delay and reward choice in ADHD: an experimental test of the role of delay aversion. *Neuropsychology*, 23, 367 – 380.
- McCoy JG, McKenna JT, Connolly NP, Poeta DL, Ling L, McCarley RW, Strecker RE. (2010). One week of exposure to intermittent hypoxia impairs attentional set-shifting in rats. *Behavioural Brain Research*, 210, 123-6. doi: 10.1016/j.bbr.2010.01.043.
- McCoy JG, Tartar JL, Bebis AC, Ward CP, McKenna JT, Baxter MG, McGaughy J, McCarley RW, Strecker RE. (2007). Experimental sleep fragmentation impairs attentional set-shifting in rats. *Sleep*, 30, 52-60.

Mclean C, Ferriero D. (2004). Mechanisms of Hypoxic-Ischemic Injury in the Term Infant. *Seminars in Perinatology*, 28, 425-432.

Mestriner RG, Miguel PM, Bagatini PB, Saur L, Boisserand LS, Baptista PP, ...Netto CA. (2013). Behavior outcome after ischemic and hemorrhagic stroke, with similar brain damage, in rats. *Behavioural Brain Research*, 244, 82-89. doi: 10.1016/j.bbr.2013.02.001

Miguel PM, Schuch CP, Rojas JJ, Carletti JV, Deckmann I, Martinato LH, Pires AV, Bizarro L, Pereira LO. (2015). Neonatal hypoxia-ischemia induces attention-deficit hyperactivity disorder-like behavior in rats. *Behavioral Neuroscience*. 129, 309-20. doi: 10.1037/bne0000063.

Millichap JG. (2008). Etiologic classification of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Pediatrics*, 121, 358-365. doi: 10.1542/peds.2007-1332.

Mishima K, Ikeda T, Yoshikawa T, Aoo N, Egashira N, Xia YX, Ikenoue T, Iwasaki K, 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, 209-17.

Owen AM, Roberts AC, Polkey CE, Sahakian BJ, Robbins TW. (1991). Extra-dimensional versus intra-dimensional set shifting performance following frontal lobe excisions, temporal lobe excisions or amygdalo-hippocampectomy in man. *Neuropsychologia*, 29, 993-1006.

Paloyelis Y, Asherson P, Kuntsi J. (2009). Are ADHD symptoms associates with delay aversion or choice impulsivity? *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*, 48, 837 – 846.

Palsdottir K, Dagbjartsson A, Thorkelsson T, et al. (2007). Birth asphyxia and hypoxic ischemic encephalopathy, incidence and obstetric risk factors. *Laeknabladid*, 93, 595–601.

Pereira LO, Strapasson AC, Nabinger PM, Achaval M, Netto CA. (2008). Early enriched housing results in partial recovery of memory déficits in female, but not in male, rats after neonatal hypoxia-ischemia. *Brain Research*, 1218, 257-266.

Pereira LO, Arteni NS, Petersen RC, da Rocha AP, Achaval M, & Netto CA. (2007). Effects of daily environmental enrichment on memory deficits and brain injury following neonatal hypoxia-ischemia in the rat. *Neurobiology of Learning and Memory*, 1, 101-108. doi: 10.1016/j.nlm.2006.07.003

Pereira, LO. (2007). A influência do enriquecimento ambiental sobre o prejuízo comportamental, bioquímico e morfológico causado pela hipóxia-isquemia neonatal em ratos. Tese de doutorado em Neurociências na UFRGS.

Perlman JM. (2004). Brain injury in the term infant. *Seminars in Perinatology*, 28, 415- 424.

Perlman JM. (1997). Intrapartum hypoxic-ischemic cerebral injury and subsequent cerebral palsy: medicolegal issues. *Pediatrics*, 6, 851-859. doi: 10.1542/peds.99.6.851

Pettersson E, Sjölander A, Almqvist C, Anckarsäter H, D'Onofrio BM, Lichtenstein P, Larsson H. (2015). Birth weight as an independent predictor of ADHD symptoms: a within-

twin pair analysis. *Journal of Child Psychology and Psychiatry*, 56, 453-9. doi: 10.1111/jcpp.12299.

Barkley RA. (1997). Behavioral inhibition, sustained attention, and executive function: Constructing a unified theory of ADHD. *Psychological Bulletin*, 121, 65–94.

Rice JE, Vannucci RC, & Brierley JB. (1981). The influence of immaturity on hypoxic–ischemic brain damage in the rat. *Annals of Neurology*, 9, 131–141.

Robbins TW. (2002). The 5-choice serial reaction time task: behavioural pharmacology and functional neurochemistry. *Psychopharmacology*. 163, 362-380.

Rogers RD, Andrews TC, Grasby PM, Brooks DJ, Robbins TW. (2000). Contrasting cortical and subcortical activations produced by attentional-set shifting and reversal learning in humans. *Journal of Cognitive Neuroscience*. 12, 142-62.

Rojas JJ, Deniz BF, Miguel PM, Diaz R, Hermel Edo E, Achaval M, ...Pereira LO. (2013). Effects of daily environmental enrichment on behavior and dendritic spine density in hippocampus following neonatal hypoxia-ischemia in the rat. *Experimental Neurology*, 241, 25-33. doi: 10.1016/j.expneurol.2012.11.026

Rosa Neto P, Lou H, Cumming P, Pryds O, Gjedde A. (2002). Methylphenidate-evoked potentiation of extracellular dopamine in the brain of adolescents with premature birth: correlation with attentional deficit. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 965, 434-9.

Sagvolden T, Aase H, Zeiner P, Berger D. (1998). Altered reinforcement mechanisms in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Behavioural Brain Research*, 94, 61-71.

Seeman P, Madras BK. (1998). Anti-hyperactivity medication: methylphenidate and amphetamine. *Molecular Psychiatry*, 5, 386-96.

Seidman LJ, Valera EM, & Bush G. (2004). Brain function and structure in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Psychiatric Clinics of North America*, 27, 323-347.

Sherman MP. (1998). Interventions for perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatrics* 102, 662.

Siesjo BK, Katsura K, Pahlmark K, Smith M-L. (1992). The multiple causes of ischemic brain damage: a speculative synthesis. In: Kriegstein J, Oberpichler-Schwenk H, editors. *Pharmacology of cerebral ischemia*. Stuttgart: Medpharm Scientific Publishers, 511-525.

Slivka A, Brannan TS, Weinberger J, Knott PJ, Cohen G. (1988). Increase in extracellular dopamine in the striatum during cerebral ischemia: a study utilizing microdialysis. *Journal of Neurochemistry*, 50, 1714–8.

Solanto MV, Abikoff H, Sonuga-Barke E, Schachar R, Logan GD, Wigal T, Hechtman L, Hinshaw S, Turkel E. (2001). The ecological validity of delay aversion and response inhibition as measures of impulsivity in AD/HD: a supplement to the NIMH multimodal treatment study of AD/HD. *Journal of Abnormal Child Psychology*, 29, 215-28.

Thiébot MH, Le Bihan C, Soubrié P, Simon P. (1985). Benzodiazepines reduce the tolerance to reward delay in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 86, 147-52.

Tunbridge EM, Bannerman DM, Sharp T, Harrison PJ. (2004). Catechol-o-methyltransferase inhibition improves set-shifting performance and elevates stimulated dopamine release in the rat prefrontal cortex. *Journal of Neuroscience*, 24, 5331-5.

van der Kooij MA, Ohl F, Arndt SS, Kavelaars A, van Bel F, Heijnen CJ. (2010). Mild neonatal hypoxia-ischemia induces long-term motor- and cognitive impairments in mice. *Brain Behavior, and Immunity*, 24, 850-6. doi: 10.1016/j.bbi.2009.09.003.

van Gaalen MM, van Koten R, Schoffelmeer AN, Vanderschuren LJ. (2006). Critical involvement of dopaminergic neurotransmission in impulsive decision making. *Biological Psychiatry*, 60, 66-73.

Van Handel M, Swaab H, de Vries LS, & Jongmans MJ. (2007). Long-term cognitive and behavioral consequences of neonatal encephalopathy following perinatal asphyxia: a review. *European Journal of Pediatrics*, 166, 645-654. doi: 10.1007/s00431-007-0437-8

Vannucci RC, Vannucci SJ. (1997). A model of perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 835, 234-249.

Vermiglio F, Lo Presti VP, Moleti M, Sidoti M, Tortorella G, Scaffidi G, Castagna MG, Mattina F, Violi MA, Crisà A, Artemisia A, Trimarchi F. (2004). Attention deficit and hyperactivity disorders in the offspring of mothers exposed to mild-moderate iodine deficiency: a possible novel iodine deficiency disorder in developed countries. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 89, 6054-60.

Winstanley CA, Eagle DM, Robbins TW. (2006). Behavioral models of impulsivity in relation to ADHD: translation between clinical and preclinical studies. *Clinical Psychology Review*, 26, 379-95.