Universidade de São Paulo
Instituto de Psicologia

Victor Daniel Vasquez Matsuda

Hipotermia previne alterações comportamentais decorrentes
da anóxia neonatal, em ratos

São Paulo
2017

Victor Daniel Vasquez Matsuda

Hipotermia previne alterações comportamentais decorrentes
da anóxia neonatal, em ratos

Dissertação apresentada ao Instituto
de Psicologia da Universidade de São
Paulo para defesa de Mestrado em
Psicologia.

Área de concentração Neurociências e
Comportamento.

Orientador:
Gilberto Fernando Xavier, Prof. Dr.

São Paulo
2017

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catálogo na publicação
Biblioteca Dante Moreira Leite
Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo

Matsuda, Victor Daniel Vasquez.

Hipotermia previne alterações comportamentais decorrentes da anóxia neonatal, em ratos / Victor Daniel Vasquez Matsuda; orientador Gilberto Fernando Xavier. -- São Paulo, 2017.

75 f.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Psicologia. Área de Concentração: Neurociências e Comportamento) – Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo.

1. Hipotermia 2. Anóxia neonatal 3. Comportamento 4. Memória
5. Ansiedade 6. Condicionamento aversivo I. Título.

RB150.A67

Nome: Victor Daniel Vasquez Matsuda

Título: Hipotermia previne alterações comportamentais decorrentes da anóxia neonatal, em ratos.

Dissertação apresentada ao Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Psicologia. Área de concentração Neurociências e Comportamento.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

À minha madrinha “tia Meme”
Alicia Trinidad Rojas
(In memoriam)

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Gilberto Fernando Xavier, pela oportunidade de realizar a pós-graduação no Brasil, disponibilizando o seu laboratório e todo o material necessário para que o trabalho pudesse ser realizado. As discussões e sugestões me auxiliaram muito no desenvolvimento do projeto.

Agradeço muito a meus pais Patrícia e Victor que sempre me incentivaram a buscar novos caminhos. Sua confiança e dedicação motivam em mim o desejo de ser sempre uma pessoa mais capaz.

A minha namorada Melanie, quem foi a “voz da consciência” nesta etapa da minha vida. Graças a você eu encontrei forças para continuar nos momentos mais complicados.

A Aline, “minha mãe no Brasil” que soube me orientar não só nas primeiras etapas da pós-graduação, mas também na cultura brasileira e o jeito de fazer pesquisa em um país totalmente desconhecido para mim. A sua paciência e dedicação comigo são as principais responsáveis da minha aprendizagem no laboratório.

Minha gratidão a todos meus amigos do laboratório de Neurociências e Comportamento: Daniel, Elisa, Matheus, Amyres e Leopoldo. Cada contribuição e ajuda de vocês enriqueceu não somente o trabalho, mas a minha vida.

Ao técnico Manoel Brito pelo suporte no cuidado com os animais, e pelo respeito e a amizade que mostrou desde o primeiro dia.

Aos meus amigos do Grupo Hamutay – Young Peruvian Scientist Network for Bioscience Research, que me ensinaram a importância do trabalho em equipe, o papel fundamental da divulgação científica na sociedade e o incansável amor pela pátria embora se esteja longe.

Aos meus amigos do Latin American Training Program, que com seus comentários não só me ajudaram a melhorar a discussão do trabalho mas também enriqueceram a minha visão sobre a América Latina e sua rica cultura, a história comum dos nossos povos e os fortes laços que nos irmanam.

E finalmente agradeço a CAPES pelo suporte financeiro ao projeto.

“A vida não é a que a gente viveu e sim a que a gente recorda, e como recorda
para contá-la”.

Gabriel García Márquez

RESUMO

Vasquez-Matsuda V. D. (2017). Hipotermia previne alterações comportamentais decorrentes da anóxia neonatal, em ratos. Dissertação (Mestrado em Neurociências e Comportamento) – Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, Brasil.

Uma das causas mais importantes de lesão encefálica em neonatos na atualidade é a anóxia neonatal. Este é um dos problemas mais graves e comuns nos serviços de perinatologia dos hospitais no mundo, sendo ainda pior em países subdesenvolvidos, devido à carência de precauções e cuidados requeridos. Há relativamente pouco tempo estudos têm indicado que a hipotermia promove um importante efeito neuroprotetor, podendo ser usada como tratamento alternativo promissor para danos causados pela anóxia neonatal. Porém, embora diversas pesquisas mostrem a ação neuroprotetora da hipotermia, não existem evidências consistentes do seu papel preventivo em relação as alterações comportamentais decorrentes da anóxia neonatal. O objetivo deste trabalho foi avaliar se a hipotermia previne alterações comportamentais decorrentes da anóxia neonatal, incluindo funções de memória espacial, condicionamento aversivo e ansiedade. Foram incluídos no estudo 91 ratos Wistar machos organizados em 4 grupos: anóxia com hipotermia (AH), anóxia sem hipotermia (AC), controle (para anóxia) com hipotermia (CH) e controle sem hipotermia (CC). O protocolo de anóxia neonatal foi iniciado 24 horas após o nascimento dos ratos, usando uma câmara semi-hermética saturada com nitrogênio gasoso. A temperatura da câmara foi mantida a 37°C e o tempo de exposição à anóxia foi de 25 minutos. Animais controle para anóxia foram expostos à mesma câmara, exceto pelo nitrogênio que foi substituído por ar. O tratamento com hipotermia foi iniciado imediatamente após da anóxia em uma câmara a 30°C, onde os animais permaneceram durante 5 horas. O tratamento controle para hipotermia envolveu o mesmo protocolo, exceto pela temperatura da câmara que foi mantida a 37°C. No final do período, os neonatos foram colocados em uma câmara aquecida a 37°C por 40 minutos até se recuperarem. Quando os animais atingiram 70 dias de idade foram submetidos ao paradigma teste-reteste no labirinto em cruz elevado, para avaliar níveis de ansiedade, atividade locomotora e memória aversiva. Subsequentemente, quando os animais fizeram 75 dias, iniciou-se o teste de memória espacial no Labirinto Aquático de Morris. Finalmente, quando os animais atingiram 115 dias de idade, realizou-se o teste de condicionamento de medo ao som e ao contexto. A anóxia neonatal e a hipotermia não interferiram nos níveis de ansiedade no Labirinto em cruz elevado. Porém, a hipotermia aumentou a atividade locomotora e comportamentos de avaliação de risco. Os resultados obtidos no Labirinto Aquático de Morris indicam que a hipotermia previne prejuízos na memória espacial induzidos pela anóxia neonatal. Finalmente, a anóxia neonatal reduziu a taxa de extinção de memória aversivas, efeito que foi prevenido pela hipotermia. No conjunto, esses resultados mostram, por um lado, que a hipotermia previne alterações da memória espacial e de medo condicionado. Por outro lado, eles mostram que a hipotermia induz aumento da atividade locomotora e de comportamentos de avaliação de risco em ratos.

Palavras-chave: Hipotermia, anóxia neonatal, comportamento, memória, ansiedade, condicionamento aversivo.

ABSTRACT

Vasquez-Matsuda V. D. (2017). Hypothermia prevents neonatal anoxia-induced behavioral changes, in rats. Master Dissertation (Masters in Neuroscience and Behavior) – Psychology Institute, University of São Paulo, Brazil.

Neonatal anoxia is one of the main causes of brain injury in newborns. This is among the most serious problems in many hospitals around the world and is even worse in developing countries due to the lack of required precautions and care. Recent studies have indicated that hypothermia promotes important neuroprotective effects. Thus, it could constitute a promising alternative treatment to dysfunctions caused by neonatal anoxia. Although there have been studies demonstrating that hypothermia promotes neuroprotection following neonatal anoxia, there is no solid evidence showing to which extent this neuroprotection prevents behavioral changes. This study aimed at evaluating to which extent behavioral changes induced by neonatal anoxia are prevented by hypothermia, focusing on anxiety, spatial memory and fear conditioning, in rats. The study included 91 male Wistar rats organized in 4 groups: anoxia with hypothermia (AH), anoxia without hypothermia (AC), control (for anoxia) with hypothermia (CH) and control without hypothermia (CC). Neonatal anoxia protocol started 24 hours after birth, using a semi-hermetic chamber saturated with nitrogen gas. The chamber temperature was maintained at 37°C and the time of exposure to anoxic conditions was 25 minutes. Hypothermia treatment started immediately after the anoxia protocol, within a chamber at 30°C, where the newborns remained for 5 hours. At the end of this period, newborns were transferred to a chamber at 37°C for 40 minutes until its recovery. Control treatment for anoxia involved the same protocol except for the nitrogen that was substituted for air. Control treatment for hypothermia involved to maintain the subjects in the same chamber at 37°C for 5 hours. When the animals were 70 days old, they were subjected to the elevated plus maze, in order to evaluate their anxiety, locomotor activity and aversive memory. Subsequently, when the animals were 75 days old, their spatial memory was evaluated in the Morris' Water Maze. Finally, when the animals were 115 days old, they were subjected to an auditory and contextual fear conditioning task. Neonatal anoxia did not interfere with anxiety as evaluated in the elevated plus maze. In contrast, hypothermia by itself increased risk assessment behavior in the elevated plus maze. Performance in the Morris' water maze task indicated that hypothermia prevents anoxia-induced disruption of spatial memory. Extinction of both auditory and contextual fear conditioning were slowed by anoxia, and this effect was prevented by hypothermia treatment. Therefore, the present experiments show that hypothermia prevents anoxia-induced (1) disruption of spatial memory and (2) slowing of extinction of fear conditioning; however, by itself, hypothermia increases risk assessment, in rats.

Keywords: Hypothermia, neonatal anoxia, behavior, memory, anxiety, fear conditioning.

RESUMEN

Vasquez-Matsuda V. D. (2017). Hipotermia previene alteraciones comportamentales subsecuentes de la anóxia neonatal, en ratas. Disertación de Maestría (Maestría en Neurociencias y Comportamiento) – Instituto de Psicología, Universidad de Sao Paulo.

Una de las causas más importantes de lesión encefálica en neonatos es producida por anoxia neonatal. Este es uno de los problemas más graves y comunes en servicios de perinatología de hospitales en el mundo, siendo aún peor en países subdesarrollados debido a la carencia de precauciones y cuidados requeridos. Hace poco tiempo, estudios han señalado que la hipotermia promueve un efecto neuroprotector, pudiendo ser utilizada como un promisorio tratamiento alternativo para daños causados por anoxia neonatal. Sin embargo, aunque diversas investigaciones muestren la acción neuroprotectora de la hipotermia, no existen evidencias consistentes de su papel preventivo en relación a las alteraciones comportamentales subsecuentes a la anóxia neonatal. El objetivo de este trabajo fue evaluar si la hipotermia previene las alteraciones comportamentales subsecuentes a la anóxia neonatal, incluyendo funciones de memoria espacial, condicionamiento aversivo y ansiedad. Fueron incluidas 91 ratas Wistar macho organizados en 4 grupos: anoxia con hipotermia (AH), anoxia sin hipotermia (AC), control (para anóxia) con hipotermia (CH) y control sin hipotermia (CC). El protocolo de anoxia neonatal fue iniciado 24 horas después del nacimiento de las ratas, usando una cámara semi-hermética saturada con nitrógeno gaseoso. La temperatura de la cámara fue mantenida a 37°C y el tiempo de exposición a la anóxia fue de 25 minutos. Los animales control para la anóxia fueron expuestos a la misma cámara, excepto por el nitrógeno que fue substituido por aire. El tratamiento con hipotermia fue realizado inmediatamente después de la anoxia en una cámara a 30°C, donde los animales permanecieron durante 5 horas. El tratamiento control para hipotermia envolvió el mismo protocolo, excepto por la temperatura de la cámara que fue mantenida a 37°C. Al final del periodo, los neonatos fueron colocados en una cámara precalentada a 37°C por 40 minutos hasta recuperarse. Cuando los animales cumplieron 70 días de edad fueron sometidos al paradigma test-retest en el Laberinto en cruz elevado, para evaluar niveles de ansiedad, actividad locomotora y memoria aversiva. Subsecuentemente, cuando los animales tuvieron 75 días, se inició el test de memoria espacial en el Laberinto Acuático de Morris. Finalmente, a los 115 días, se realizó el test de condicionamiento de miedo al sonido y al contexto. Anóxia neonatal e hipotermia no interfieren en niveles de ansiedad en el Laberinto en cruz elevado. Sin embargo, la hipotermia aumentó la actividad locomotora y el comportamiento de evaluación de riesgo. Los resultados obtenidos en el Laberinto Acuático de Morris indican que la hipotermia previene perjuicios en la memoria espacial inducidos por anóxia neonatal. Finalmente, la anóxia neonatal redujo la tasa de extinción de memorias aversivas, efecto que fue prevenido por la hipotermia. En conjunto, estos resultados muestran, por un lado, que la hipotermia previene alteraciones en la memoria espacial y del miedo condicionado. Por otro lado, muestran que induce el aumento de la actividad locomotora y de comportamientos de evaluación de riesgo en ratas.

Palabras clave: Hipotermia, anoxia neonatal, comportamiento, memoria, ansiedad, condicionamiento aversivo.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Média (+E.P.M.) da percentagem de tempo nos braços abertos (A) e da percentagem de entradas nos braços abertos (B), nas sessões 1 e 2.	31
Figura 2. Média (+E.P.M.) do número de entradas nos braços fechados (A) e do tempo de permanência no quadrado central (B), nas sessões 1 e 2 do labirinto em cruz elevado.	32
Figura 3. Médias (+ E.P.M.) da latência expressa em segundos (A) e do trajeto expresso em centímetros (B), em função das 10 sessões do teste de memória de referência espacial.	34
Figura 4. Médias (+ E.P.M.) da velocidade de nado, em função das 10 sessões do teste de memória de referência espacial no Labirinto Aquático de Morris.	34
Figura 5. Médias (+ E.P.M.) da Percentagem de entradas (A) e do tempo (B) no contador crítico, em função dos 3 blocos de tempo de 1 minuto analisados no Probe teste no Labirinto Aquático de Morris.	36
Figura 6. Médias (+ E.P.M.) da Percentagem da distância percorrida no contador crítico, em função dos 3 blocos de tempo de 1 minuto analisados no Probe teste espacial no Labirinto Aquático de Morris.	36
Figura 7. Médias (+ E.P.M.) da Percentagem de entradas (A) e do tempo (B) no quadrante crítico em função dos 3 blocos de tempo de 1 minuto analisados no Probe teste no Labirinto Aquático de Morris. (*) $p < 0.05$	37
Figura 8. Médias (+ E.P.M.) da Percentagem da distância percorrida no quadrante crítico, em função dos 3 blocos de tempo de 1 minuto analisados no Probe teste no Labirinto Aquático de Morris.	37
Figura 9. Médias (+ E.P.M.) das latências expressa em segundos (A) e dos trajetos percorridos na piscina expresso em centímetros (B), em função das 3 tentativas nos ITI 10, 0 e 30, para os grupos CC, AC, AH e CH na tarefa de memória operacional espacial. (*) $p < 0.05$	40
Figura 10. Médias (+ E.P.M.) da velocidade média de deslocamento na piscina, expressa em centímetros por segundo, em função das três tentativas nos ITI 0, 10 e 30 para os grupos CC, AC, AH e CH na tarefa de memória operacional espacial. (*) $p < 0.05$	40
Figura 11. Médias (+ E.P.M.) da percentagem de tempo no contador (A) e quadrante (B) crítico do dia anterior em função das três tentativas nos ITI 0, 10 e 30 para os grupos CC, AC, AH e CH na tarefa de memória operacional espacial. (*) $p < 0.05$	42
Figura 12. Médias (+ E.P.M.) das latências expressas em segundos (A) e dos trajetos percorridos na piscina expresso em centímetros (B) na tarefa de plataforma visível, em função das três tentativas de cada sessão. (*) $p < 0.05$	44
Figura 13. Médias (+ E.P.M.) da velocidade média de deslocamento na piscina, expressa em centímetros por segundo, na tarefa da plataforma visível, nas três tentativas de cada sessão no Labirinto Aquático de Morris.	44
Figura 14. Médias (- E.P.M.) da Percentagem de tempo em freezing no teste de condicionamento aversivo ao contexto (A), e ao som (B); em função dos dez (para o contexto) e doze (para o som) blocos de tempo de 1 min, para os grupos CC, AC, AH e CH. (*) $p < 0.05$	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultados da ANOVA para medidas repetidas e os p-valores correspondentes, envolvendo os parâmetros coligidos no Labirinto em Cruz Elevado, em função dos fatores GRUPO, SESSÃO e interação GRUPO x SESSÃO.....	30
Tabela 2. Resultados da ANOVA de duas vias e os p-valores correspondentes, envolvendo os parâmetros coligidos no Labirinto em Cruz Elevado, em função dos fatores Anóxia, Hipotermia, SESSÃO, Anóxia x SESSÃO, Hipotermia x SESSÃO, e análises de contras.	30
Tabela 3. Resultados da ANOVA para medidas repetidas e p-valores correspondentes, envolvendo os parâmetros coligidos no labirinto aquático de Morris, versão de Memória de Referência espacial, para todos os grupos.	33
Tabela 4. Resultados da ANOVA de duas vias e p-valores correspondentes, envolvendo os parâmetros coligidos no labirinto aquático de Morris, versão de Memória de Referência espacial, para todos os grupos.	33
Tabela 5. Resultados da ANOVA para medidas repetidas e p-valores correspondentes, envolvendo os parâmetros coligidos no Probe Teste no labirinto aquático de Morris, após a tarefa de Memória de Referência espacial, para todos os grupos.	35
Tabela 6. Resultados da ANOVA de duas vias e p-valores correspondentes, envolvendo os parâmetros coligidos no Probe Teste no labirinto aquático de Morris, após a tarefa de Memória de Referência espacial, para todos os grupos.	35
Tabela 7. Resultados da ANOVA para medidas repetidas e p-valores correspondentes, envolvendo os parâmetros coligidos no labirinto aquático de Morris, versão de Memória Operacional espacial, para todos os grupos.	39
Tabela 8. Resultados da ANOVA de duas vias e p-valores correspondentes, envolvendo os parâmetros coligidos no labirinto aquático de Morris, versão de Memória Operacional espacial, para todos os grupos.	39
Tabela 9. Resultados da ANOVA para medidas repetidas e p-valores correspondentes, envolvendo os parâmetros coligidos no labirinto aquático de Morris, versão de plataforma visível, para todos os grupos.	43
Tabela 10. Resultados da ANOVA de duas vias e p-valores correspondentes, envolvendo os parâmetros coligidos no labirinto aquático de Morris, versão de plataforma visível, para todos os grupos.....	43

LISTA DE SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
EPM	Erro padrão da média
ITI	Intervalo de tempo entre as tentativas
LAM	Labirinto aquático de Morris
LCE	Labirinto em cruz elevado
CS	Estímulo condicionado
US	Estímulo não condicionado
CR	Resposta condicionada
UR	Resposta incondicionada
PA	Asfixia perinatal
HI	Hipóxia-Isquemia
HPA	Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal
CRH	Corticotropina
CC	Grupo controle
AC	Grupo anóxia
AH	Grupo anóxia com hipotermia
CH	Grupo controle com hipotermia
DA	Sistema dopaminérgico

SUMÁRIO

<i>I. INTRODUÇÃO</i>	15
I.1 ANÓXIA NEONATAL	15
I.2 MEMÓRIA ESPACIAL	16
I.3 ANSIEDADE E MEDO	17
I.4 EFEITO NEUROPROTETOR DA HIPOTERMIA	19
<i>II. OBJETIVOS</i>	21
II.1 OBJETIVO GERAL	21
II.2 METAS ESPECÍFICAS	22
<i>III. MATERIAL E MÉTODOS.</i>	22
III.1 CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS E METODOLOGIA PARA A ANÓXIA NEONATAL	23
III.2 CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS E METODOLOGIA PARA A HIPOTERMIA	23
III.3 TESTES COMPORTAMENTAIS	24
<i>III.3.1 ANSIEDADE - LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO</i>	24
<i>III.3.2 MEMÓRIA ESPACIAL - LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS</i>	24
<i>III.3.3 CONDICIONAMENTO DE MEDO AO CONTEXTO E AO SOM</i>	26
<i>III.3.3.1 TESTE DE MEDO CONDICIONADO AO CONTEXTO</i>	27
<i>III.3.3.2 TESTE DE MEDO CONDICIONADO AO SOM</i>	27
<i>IV. ANÁLISE ESTATÍSTICA.</i>	28
<i>V. RESULTADOS.</i>	29
V.1 LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO	29
V.2 LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS	32
<i>V.2.1 MEMÓRIA DE REFERÊNCIA ESPACIAL</i>	32
<i>V.2.1.1 PROBE TESTE</i>	35
<i>V.2.2 MEMÓRIA OPERACIONAL ESPACIAL</i>	38
<i>V.2.3 TAREFA COM A PLATAFORMA VISÍVEL</i>	42
V.3 CONDICIONAMENTO AVERSIVO	45
<i>VI. DISCUSSÃO</i>	47
VI. 1 LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO	47
VI. 2 LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS	51
VI. 3 CONDICIONAMENTO DE MEDO AO CONTEXTO E AO SOM	58
<i>VII. CONSIDERAÇÕES FINAIS</i>	63
<i>VIII. REFERÊNCIAS</i>	64

I. Introdução

I.1 Anóxia Neonatal

A anóxia é comumente descrita como a redução dos níveis de oxigênio no ambiente tendendo a zero. Dez por cento dos neonatos afetados por anóxia morrem no período pós-natal e 30% sobrevivem com incapacidades neurológicas (Shankaran, 2009). A anóxia foi descrita inicialmente em casos de pacientes isolados, onde se observou perda neuronal e gliose na formação reticular (Leech et al, 1977). Ela também contribui para o aumento da taxa de mortalidade infantil (Drage et al., 1964).

O encéfalo de mamíferos é extremamente sensível a reduções no suprimento de oxigênio; esta vulnerabilidade deve-se a seu alto consumo energético, que não pode ser comprometido (Lutz & Prentice, 2002). As mudanças geradas pela anóxia não raro acarretam em lesão ou morte das células mais vulneráveis do sistema nervoso central (Takada, 2011), primariamente localizadas no hipocampo, área envolvida em funções cognitivas como o aprendizado e a memória (Loidl et al., 2000). A prematuridade é um dos principais fatores de risco para a anóxia ao nascimento (Gluckman et al., 2001). Ratos nascem em um estágio de maturação encefálica que é comparável ao final do segundo trimestre em humanos. Desta forma, o nível de desenvolvimento encefálico de um rato com dez dias de vida pós-natal aproxima-se ao estágio de desenvolvimento do humano recém-nascido (Semple et al., 2013; Dobbing, 1971) e os humanos prematuros estariam em estágio de desenvolvimento encefálico correspondente a ratos neonatos. Por estas razões, estes animais vêm sendo utilizados como modelo animal para estudos envolvendo anóxia.

No presente projeto, optou-se pela utilização do modelo de anóxia neonatal no qual ratos neonatos com aproximadamente 30 horas de vida são colocados em uma câmara contendo 100% de nitrogênio, durante 25 minutos (Takada et al, 2015; Laviola et al., 2004; Nakazawa et al., 2004; Rogalska et al., 2004). Esse modelo animal tenta simular o insulto anóxico que acomete o prematuro com

cerca de 24 semanas, não é invasivo e possui menos variáveis de estresse (Takada, 2011). Além disso, este modelo animal de anóxia vem sendo extensamente utilizado, sendo sua efetividade comprovada (Takada et al., 2011, 2015, 2016).

Diversos estudos têm mostrado que esse modelo de anóxia neonatal leva a diferentes tipos e estágios de degeneração neuronal na formação hipocampal (Dell'Anna et al., 1991; Takada, 2016). Além disso, esse modelo de anóxia neonatal causa prejuízos cognitivos duradouros na memória de referência espacial (Takada et al., 2015). Embora seja largamente descrito na literatura o efeito prejudicial da anóxia ao nível neurológico, ainda há um déficit no conhecimento sobre os efeitos comportamentais subsequentes, especificamente na memória, e em possíveis tratamentos para reverter aquele quadro. Nesse contexto, o presente estudo fornece informações suficientes para complementar as investigações iniciais, solidificando o arcabouço teórico prévio e proporcionando um avanço na obtenção de uma solução para este grave problema.

1.2 Memória Espacial

A memória vem sendo definida como a capacidade que os animais apresentam para modular seu comportamento de acordo com experiências prévias (Xavier, 1993). Em termos práticos, a memória é a expressão de que a aprendizagem ocorreu. Assim, os processos de memória e aprendizagem são difíceis de estudar separadamente. Para a investigação da memória em roedores, diferentes tipos de tarefas comportamentais vêm sendo utilizadas. Dentre estas tarefas de aprendizagem, o labirinto aquático, introduzido por Richard Morris (1984), é atualmente uma das mais utilizadas nos estudos sobre a neurobiologia da memória espacial (Garthe & Kempermann, 2013). Este labirinto é intensamente utilizado em pesquisas sobre as capacidades de orientação espacial em roedores, sobre a retenção dessas informações no sistema nervoso por períodos variáveis de tempo, bem como na investigação dos mecanismos neurais subjacentes a essas capacidades (Dong et al., 2013; Miyoshi et al., 2012; Xavier et al., 1999).

Estudos envolvendo o labirinto aquático de Morris têm mostrado que a asfixia perinatal (PA) produz déficits na memória de referência espacial em ratos (Galeano et al., 2011). Durante a fase de aquisição da tarefa de memória de referência, ratos expostos a PA mostram um prejuízo na aprendizagem espacial, com latências e comprimentos de trajeto mais longos no primeiro e terceiro dia de treinamento. Além disso, no caso da hipóxia-isquemia (HI), Karalis (2011) mostrou que o grupo HI tem uma velocidade de natação significativamente mais lenta do que o grupo controle. Esses estudos indicam que as lesões hipocampais induzidas por hipóxia ou asfixia perinatal desempenham um papel importante na aprendizagem. Finalmente, no modelo de anóxia neonatal testado por Takada et al. (2015) os indivíduos exibiram latências e comprimentos de trajeto significativamente mais longos em comparação com os controles correspondentes, na avaliação da memória de referência espacial. Em contraste, não houve diferenças significantes entre as velocidades de natação dos indivíduos expostos à anóxia e os controles, indicando assim, que as diferenças relatadas acima não estão relacionadas com prejuízos motores.

I.3 Ansiedade e Medo

Nos modelos etologicamente fundamentados, estímulos desencadeiam respostas incondicionadas de medo, frente a situações e/ou estímulos que são naturalmente aversivos como, por exemplo, lugares novos ou intensamente iluminados, podendo-se citar dentre estes modelos o labirinto em cruz elevado no qual utiliza-se a percentagem de tempo e o número de entradas nos braços abertos como medidas indiretas da ansiedade, o número de entradas nos braços fechados como medida da atividade locomotora e o tempo de permanência no quadrado central como expressão do comportamento de avaliação de risco. Atualmente, o labirinto em cruz elevado figura entre os modelos animais de ansiedade mais utilizados para o estudo experimental de drogas ansiolíticas. Desenvolvido por Handley e Mithani em 1984 e posteriormente validado farmacológica, fisiológica e comportamentalmente por Pellow et al. no ano 1985, o modelo explora o conflito entre a tendência natural de roedores de explorar ambientes novos e a aversão e o

medo natural que ratos apresentam a altura e espaços abertos. Outro método bastante conveniente e sensível é o tempo de congelamento, utilizado para o estudo de medo condicionado ao contexto e ao som (Bouton & Bolles, 1980; Kumar et al., 2013; Onishi & Xavier, 2010).

Estudos recentes mostram que a percentagem de tempo nos braços abertos e no centro do labirinto é maior em ratos HI de 60 dias de idade em comparação aos ratos do grupo controle (Sanches et al., 2013). Além disso, a percentagem de entradas nos braços abertos foi maior no grupo HI em relação ao grupo controle, mostrando assim diferenças significantes na medida da ansiedade e hiperatividade em ratos com o insulto. Além disso, nas pesquisas feitas por Jun-Ming (2009; 2013) mostrou-se um forte efeito ansiogênico da HI, produzindo principalmente um dano no eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) e na expressão do hormônio liberador de corticotropina (CRH) em ninhadas cujas mães sofreram hipóxia gestacional. Já na pesquisa desenvolvida por Ming-Yan (2012), grupos de ratos com hipóxia perinatal leve e severa apresentaram níveis baixos de ansiedade em comparação com o grupo controle indicando assim o efeito ansiolítico em ratos jovens (14-28 dias).

Testes de medo condicionado em camundongos mostram uma falha na formação de memórias depois de um intervalo de 4 horas da hipóxia (Chiu et al., 2012). Nessa pesquisa, os resultados nas tarefas de medo condicionado ao contexto e à luz demonstraram que os camundongos não conseguem lembrar o contexto nem a luz depois do treino, mesmo após de 52 horas da reoxigenação. No estudo feito por Venerosi (2006) os resultados não mostraram diferenças significantes nas provas de condicionamento aversivo ao som e ao contexto em ratos machos de 180 dias de idade que foram submetidos à hipóxia neonatal. Porém, o estudo de Golanski e colaboradores (2001) mostrou diferenças significantes no medo condicionado ao contexto em ratos machos submetidos a anóxia de 9-10 ou 17-18 dias de idade, mas não conseguiu se evidenciar resultados significantes no caso das fêmeas.

De acordo com Gray (1982) o hipocampo, uma das principais regiões nervosas afetadas pela anóxia, funciona como um comparador que avalia estímulos atuais e

estímulos esperados ativando, em situações aversivas, respostas comportamentais de medo e estresse. Os animais que apresentam o hipocampo lesado deixam de reconhecer o estímulo estressor como ameaçador, aumentando, assim, sua atividade exploratória, não somente em situações aversivas (no caso dos braços abertos no labirinto em cruz elevado), como também após exposição prévia a um estímulo estressante, por exemplo, a imobilização (Andrade & Graeff, 2001). De fato, existem fortes evidências de que o hipocampo está envolvido na aprendizagem das características contextuais em que o condicionamento ocorre (Fanselow, 2000; Maren & Holt, 2000). As lesões no hipocampo, tanto eletrolítica quanto neuroquímica, levam a diminuição no condicionamento contextual de medo (Fanselow, 2000).

No presente, a literatura não demonstra conclusivamente o efeito deletério da anóxia sobre fenômenos comportamentais como o medo condicionado e a ansiedade. Embora haja pesquisas neste campo que têm obtido dados valiosos, ainda se carece de um arcabouço teórico sólido que permita estabelecer as bases de um protocolo adequado para o tratamento deste problema.

1.4 Efeito neuroprotetor da Hipotermia

A hipotermia parece atenuar a lesão cerebral que se segue ao insulto anóxico em humanos (Drury et al., 2014; Shankaran, 2014) e em ratos (Lin et al., 2014; Loidl et al., 2000; Stojanović et al., 2012). Estudos recentes mostram uma aparente associação entre a inibição da perda neuronal no hipocampo pela hipotermia e a diminuição de astrócitos e liberação de citocinas inflamatórias após a hipóxia-isquemia no cérebro de ratos em desenvolvimento (Xiong et al., 2009). Adicionalmente, os estudos comportamentais feitos por Loidl (2000) mostram que a hipotermia corrige a atividade dos ratos submetidos à asfixia perinatal (PA) no campo aberto. Este estudo avaliou a velocidade e distância de deslocamento obtendo diferenças significativas entre os grupos de PA severa e o grupo PA+hipotermia.

Estudos no labirinto aquático de Morris revelaram que os ratos com lesão cirúrgica no encéfalo e hipotermia realizam o teste significativamente mais rápido em

relação a ratos com lesão cirúrgica e normotermia (Dixon et al., 1998) mostrando que a hipotermia pode fornecer proteção contra déficits motores e de memória espacial após de uma lesão cortical. No entanto, até agora não existem estudos conclusivos que avaliem o efeito da hipotermia na memória operacional, nem o papel da neuroproteção em relação com o medo condicionado ao contexto ou ao medo condicionado ao som em ratos.

A patogênese da anóxia parece envolver três etapas. A fase de reperfusão, no caso dos insultos isquêmicos e imediata re-circulação encefálica, onde o metabolismo energético celular é restaurado em cerca de 30 minutos, com reversão da despolarização neuronal aguda induzida pela anóxia. Em seguida, acontece a fase latente, onde inicia-se uma cascata bioquímica intracelular que pode levar à lesão neuronal (Jensen et al., 2003; Volpe, 2001). Finalmente, o processo evolui para uma fase de deterioração secundária com convulsões, edema citotóxico e acúmulo de citocinas excitotóxicas extracelulares, falhas do metabolismo oxidativo e morte celular (Gunn, 2000; Johnston et al., 2011; Perlman, 2006). Assim, parece razoável pensar que o tratamento envolvendo hipotermia tenha início o mais rapidamente possível na fase latente, antes do início da deterioração secundária e depois de reiniciada a circulação encefálica (Drury et al., 2010).

A duração da hipotermia é um fator importante para a neuroproteção. Se o tempo de duração for curto (0,5-3 horas) após o insulto, a hipotermia exibirá um efeito neuroprotetor moderado. Isto se pode melhorar aumentando a duração do tratamento (Legido et al., 2007). Outro fator importante é o intervalo de tempo após o insulto. No caso da hipóxia-isquemia, se a hipotermia começa imediatamente nos primeiros 15 minutos após o insulto, o efeito é reversível com a redução da temperatura corpórea entre 1 a 3 °C (hipotermia leve). No entanto, a proteção é perdida se a hipotermia é atrasada até 30 minutos no caso de humanos (Legido et al., 2007). Por outro lado, a continuação da hipotermia durante as fases latente e secundária (hipotermia prolongada por 72 horas após hipóxia-isquemia) produz melhor neuroproteção mesmo que o seu início seja atrasado até 6 horas após o insulto (Drury et al., 2014).

O grau de hipotermia também influencia seu efeito neuroprotector. Isto é, uma diminuição moderada da temperatura corpórea, entre 4 a 6 °C, é mais eficaz do que uma diminuição ligeira, entre 1 e 3 °C, enquanto que a hipotermia profunda (diminuição da temperatura corpórea, entre 15 a 20 °C) pode produzir efeitos colaterais significantes (Hallberg et al., 2009), como parada respiratória, dando origem assim, a um novo processo de anóxia (Tattersall & Milsom, 2003).

Ainda não se sabe a temperatura ótima para promover o máximo de preservação após o insulto anóxico-isquêmico, mas fica claro que o grau de hipotermia deve ser moderado e o tempo de tratamento deve superar 3 horas. Adicionalmente, o tratamento deve ser efetuado imediatamente após o insulto.

Os mecanismos neuroprotetores da hipotermia são múltiplos. Ela (1) reduz o consumo de oxigênio encefálico, (2) retarda a diminuição de fosfocreatina/fósforo inorgânico (PCr / Pi), (3) suprime a atividade citotóxica dos aminoácidos excitatórios, (4) inibe a atividade da óxido nítrico sintetase, (5) reduz os níveis de interleucina-1 beta, (6) diminui a liberação de citocinas tóxicas pela microglia/glia, (7) suprime a atividade dos radicais livres, (8) suprime a apoptose e (9) diminui a permeabilidade da barreira hemato-encefálica, a pressão intracraniana e o edema cerebral (Gunn & Thoresen, 2006; Xiong et al, 2009). Adicionalmente, a hipotermia após asfixia perinatal, reduz a mortalidade (Shankaran, 2014) e seu uso, experimental e clínico, aumenta a taxa de sobrevivência e proteção do cérebro contra o desenvolvimento de lesões morfológicas e neuroquímicas (Drury et al., 2014; Loidl et al., 2000).

II. Objetivos

II.1 Objetivo geral

O objetivo principal deste estudo é avaliar as alterações comportamentais decorrentes da anóxia neonatal e se a hipotermia previne essas alterações, considerando diferentes funções de memória espacial, memória de medo condicionado e ansiedade em ratos Wistar.

II.2 Metas específicas

Os objetivos específicos do presente estudo incluem:

- 1 – Avaliar os efeitos da anóxia neonatal na ansiedade de ratos Wistar adultos, por meio do labirinto em cruz elevado, e se a hipotermia previne essas alterações;
- 2 – Avaliar os efeitos da anóxia neonatal na memória operacional espacial com diferentes intervalos entre as tentativas (zero, dez e trinta minutos), no labirinto aquático de Morris, em ratos Wistar adultos, e se a hipotermia previne essas alterações;
- 3 - Avaliar a possível ocorrência de alterações sensoriais nos animais submetidos a anóxia neonatal no labirinto aquático com plataforma visível, em grupos de ratos Wistar adultos, e se a hipotermia previne essas alterações;
- 4 - Avaliar os efeitos da anóxia neonatal na memória de referência espacial, no labirinto aquático de Morris em ratos Wistar adultos, e se a hipotermia previne essas alterações;
- 5 – Avaliar os efeitos da anóxia neonatal na aquisição do medo condicionado ao som e ao contexto, em grupos de ratos Wistar adultos, e se a hipotermia previne essas alterações.

III. Material e métodos.

Para o procedimento experimental foram utilizados 91 ratos albinos (*Rattus norvegicus*, linhagem Wistar), machos, neonatos (aproximadamente 30 horas de vida, pesando de 6 a 8 g), criados no biotério do Instituto de Biociências da USP, com temperatura constante ($23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), ciclo claro/escuro de 12:12h, início do claro às 7:00h, e água e comida *ad libitum*. Os animais foram organizados em 4 grupos: anóxia sem hipotermia (AC: n=21), anóxia com hipotermia (AH: n=23), controle (para anóxia) com hipotermia (CH: n=23) e controle (para anóxia) sem hipotermia (CC: n=24). Todos os procedimentos e cuidados com os animais estão em acordo com as normas nacionais e internacionais de uso de animais em

pesquisa, e foram apreciados e aprovados pelo Comitê de Ética em pesquisas com animais, do IBUSP.

III.1 Condições experimentais e metodologia para a anóxia neonatal

Para a exposição dos animais à anóxia neonatal, se utilizou uma câmara semi-hermética de polycarbonato (31,0 × 14,0 × 19,5 cm), com entrada e saída de gás, acoplada a manômetro, fluxímetro e a cilindro de nitrogênio gasoso. A temperatura da câmara foi mantida entre 35° e 37° C através da imersão parcial da mesma em água aquecida por resistência elétrica. Para a anóxia, saturou-se completamente a câmara com nitrogênio 100% a um fluxo de 3L/minuto e pressão de 101,7 kPa. Os animais de 30 horas de vida permaneceram na câmara durante 25 minutos nestas condições, parâmetro este que garante a ocorrência de anóxia prolongada, porém, sem a morte dos neonatos. O grupo controle foi exposto às mesmas condições experimentais. No entanto, ao invés de fluxo de nitrogênio estes animais foram expostos a fluxo de ar ambiente (Takada et al., 2010).

III.2 Condições experimentais e metodologia para a hipotermia

A hipotermia foi produzida pela exposição dos animais a uma câmara resfriada a 30°C onde foram depositados os ratos recém-nascidos. A duração da hipotermia foi de 5 horas, e ocorreu imediatamente após a retirada da câmara de indução de anóxia (Sabir et al., 2012). Ao final das 5 horas de exposição à hipotermia os filhotes foram transferidos para uma câmara aquecida a 37°C, onde estiveram ao longo de 40 min. Após a recuperação dos animais (evidenciada pela coloração, respiração e movimentação ativa), eles foram devolvidos para suas mães com quem permaneceram até o desmame (21 dias). Posteriormente, foram mantidos em caixas de polietileno (medindo 40 x 33 x 16 cm) forradas com maravalha (serragem), 4 ratos por gaiola até o final do procedimento experimental.

III.3 Testes comportamentais

III.3.1 Ansiedade - Labirinto em cruz elevado

O labirinto em cruz elevado, construído com acrílico branco, tem braços que medem 50 cm de comprimento e 10 cm de largura, sendo dois deles, opostos pelo centro, com paredes laterais de 40 cm de altura, denominados braços fechados, e dois deles, também opostos pelo centro, com paredes de um cm de altura, denominados braços abertos. Os animais com 60 dias de vida foram individualmente colocados no centro do labirinto, podendo percorrê-lo livremente ao longo de duas sessões de cinco minutos cada com um intervalo de 5 minutos entre elas. O programa computacional X-Plo-Rat permitiu registrar o número de entradas nos braços abertos e fechados, o número de vezes que o animal passa pelo centro do labirinto, o tempo de permanência nos braços abertos, fechados e no centro do labirinto. Ao término da primeira sessão e entre as sessões o labirinto foi limpo com solução de álcool a 10%, para minimizar a interferência de odores eventualmente deixados pelos animais.

III.3.2 Memória espacial - Labirinto aquático de Morris

O labirinto aquático de Morris permitiu avaliar a memória de referência e a memória operacional, ambas espaciais. Quando os animais estavam com 65 dias de idade, foi iniciado o teste para avaliar a memória de referência espacial. A plataforma foi mantida em uma única localização, em todas as tentativas e durante todos os dias de treinamento. Cada animal foi submetido ao treinamento envolvendo quatro tentativas por dia, durante dez dias; o intervalo de tempo entre as tentativas foi de dez minutos. O ponto de onde os animais foram liberados na piscina variou a cada dia e a cada tentativa, numa ordem aleatória e balanceada para não enviesar a busca espacial do animal. Desta forma, o animal aprendeu a localização espacial independentemente do ponto inicial onde foi liberado, formando um mapa cognitivo espacial.

No dia 11 de começado o treinamento, foi realizado o Probe teste. Esta tarefa no labirinto aquático de Morris permite avaliar a memória de referência espacial e

também a flexibilidade comportamental dos indivíduos. O teste consiste em colocar o indivíduo na piscina sem a plataforma, partindo de qualquer ponto aleatório nas bordas dela, por 3 minutos e deixa-lo nadar livremente. Avalia-se o direcionamento do comportamento do animal na piscina e a relação deste direcionamento com experiências anteriores do animal em relação a busca pela plataforma.

A tendência do rato para permanecer perto do local onde a plataforma de escape ficou durante as sessões previas é também uma medida de memória espacial da localização da plataforma (Markowska et al. 1993). Em vista que o indivíduo passou inicialmente pelas 10 sessões de treino da tarefa anterior, é razoável supor que o local onde a plataforma ficou durante esse tempo será o mais procurado, pelo menos inicialmente. O teste é dividido em 3 blocos de 1 minuto para avaliar a insistência ou adoção de novas estratégias de busca, quando o animal percebe que não há plataforma na piscina no local anteriormente reforçado.

Durante os testes com a plataforma, a estratégia ideal é ir para a localização do objetivo e escapar na plataforma. Entretanto, durante o *probe teste*, a plataforma de escape não está presente em nenhum lugar da piscina. Os animais desconhecem esse informação. Assim, depois de uma busca inicial no local inicialmente reforçado, passam a buscar a plataforma em outros setores da piscina, passando a evitar o local anteriormente reforçado e que não contém mais a plataforma. Em qualquer caso, o *probe test* torna-se um ensaio de extinção com contingências que são diferentes daquelas para o teste com a plataforma (Markowska et al. 1993).

Quando os animais alcançaram 80 dias de idade, foi iniciado o teste para avaliar a memória operacional espacial com intervalo entre as tentativas (ITIs) de dez minutos. Posteriormente, o ITI foi modificado para 30 minutos e finalmente a zero minutos. No teste de memória operacional se manipulou o intervalo entre as tentativas com o intuito de avaliar a extensão de eventuais prejuízos na memória operacional. A variação do ITI é fundamental para testar se o animal pode reter a nova informação aprendida por períodos de tempo prolongados, ou apenas por

períodos curtos. No presente caso, por exemplo, pode-se evidenciar se a informação espacial pode ser mantida por 30 minutos e também por zero minutos. A localização da plataforma variou a cada dia de teste. Na primeira tentativa, os animais desconhecem a localização da plataforma encontrando-a por escaneamento e busca. Desta forma, a informação obtida pode ser utilizada nas demais tentativas, desde que os animais sejam capazes de reter essa informação na memória operacional. Cada animal foi submetido ao treinamento fazendo três tentativas por dia. Durante seis dias o intervalo foi de dez minutos. Após o sexto dia, o intervalo passou para trinta minutos por quatro dias e posteriormente para zero minutos durante quatro dias.

No dia 103 foi feito o teste com a plataforma visível. Os animais foram submetidos ao treinamento envolvendo três tentativas por dia, durante três dias de testes. A plataforma variou de localização a cada tentativa para forçar o uso de uma estratégia de guiamento pela pista visual e prevenir o uso de estratégias espaciais. O objetivo do teste foi avaliar eventuais alterações motoras e/ou perceptuais mostrando que o rato se guia pelo seu sistema sensorial-motor e não pelo conhecimento prévio da localização da plataforma.

Uma câmera de vídeo foi posicionada aproximadamente a 180 cm acima do centro da piscina, conectada a um microcomputador, onde foi possível registrar e armazenar numericamente todos os dados referentes à trajetória dos animais dentro da piscina. O programa Ethovision permitiu calcular diferentes parâmetros, incluindo (1) a latência - o tempo decorrido desde a liberação do animal na piscina até que ele encontre e suba na plataforma, (2) o comprimento do trajeto traçado na piscina e (3) a velocidade do nado.

III.3.3 Condicionamento de medo ao contexto e ao som

Para o teste de condicionamento aversivo foi utilizada uma caixa acrílica de esQUIVA inibitória de dimensões 30 X 28 X 40 cm. O compartimento tem duas paredes pretas (paredes laterais) e duas paredes brancas com figuras geométricas pretas e o assoalho consiste de barras de aço de 0,32 cm de diâmetro com distância

de cerca de 1.5 cm entre si. As barras de aço do assoalho foram conectadas a um gerador de choque com “scrambler”. Nas paredes do compartimento estão instaladas três alto falantes, os quais, quando acionadas por computador, liberam um som de 550 Hz e 80 dB.

Foram administrados cinco pareamentos de som e choque no 107º. dia, com intervalos de 30 segundos entre eles. Os animais foram introduzidos diretamente na caixa permanecendo ali durante 2 min antes da administração dos pareamentos envolvendo som e choque. O som durou 5 segundos se sobrepondo ao choque no último segundo deste período. Após o último pareamento de som e choque, se aguardou 30 segundos para a retirada do animal do aparelho.

III.3.3.1 Teste de medo condicionado ao contexto

O mesmo aparelho utilizado no treino de condicionamento clássico aversivo foi utilizado no teste de medo condicionado ao contexto. O animal foi introduzido no mesmo compartimento de treino, onde permaneceu por um período de dez minutos; nenhum estímulo sonoro nem tampouco o choque foram apresentados ao animal. Ao fim desse período, se retirou o animal do aparelho experimental e foi transportado de volta à sua gaiola. As sessões foram gravadas em vídeo e posteriormente analisadas para se mensurar as respostas de congelamento, usando o software QBasic, em dez blocos de um minuto cada.

III.3.3.2 Teste de medo condicionado ao som

O teste foi realizado em uma sala experimental diferente ao do condicionamento aversivo ao contexto e em um aparelho de teste distinto, consistindo de um cilindro de acrílico cinza, de 40 cm de altura e 37 cm de diâmetro. Três alto falantes foram conectados à parede do aparelho, de modo que quando acionadas por computador, produziram um som idêntico (550 Hz, 80 dB, 5 s) ao empregado durante o treino de condicionamento aversivo.

O animal foi transportado em sua gaiola para a sala de experimentação e em seguida foi introduzido no aparelho, onde, após dois minutos, foram realizadas vinte apresentações do som, cada qual por um período de cinco segundos, com intervalos de 30 segundos entre eles. O animal permaneceu no aparelho até o término do 12º. minuto, quando então, foi retirado, colocado de volta em sua gaiola e transportado de volta ao biotério. Em nenhum momento se apresentou o choque ao animal durante este teste.

A sessão foi gravada para posterior mensuração das respostas de congelamento ao longo de doze blocos de um minuto cada.

IV. Análise estatística.

Para o teste do labirinto em cruz elevado foi realizada a ANOVA para medidas repetidas para cada um dos parâmetros comportamentais relevantes, incluindo a percentagem de entradas nos braços abertos, a percentagem de tempo nos braços abertos, o número de entradas nos braços fechados e o tempo de permanência no quadrado central, sendo considerado o GRUPO como fator entre-sujeitos e SESSÕES como fator intra-sujeitos. Adicionalmente, foi realizada a ANOVA de duas vias com o objetivo de analisar o efeito da anóxia e da hipotermia. As sessões também foram consideradas como fator na análise. O teste de Fisher foi utilizado como teste *post-hoc*.

No teste de memória de referência espacial, memória operacional e plataforma visível, foi utilizada ANOVA para medidas repetidas para cada um dos parâmetros mensurados, incluindo latência, comprimento do trajeto e velocidade do nado, porcentagem de tempo de permanência nos quadrante críticos e contadores críticos, tendo grupos como fator entre sujeitos, e tentativas e sessões como fatores intra-sujeitos. Para analisar o efeito da anóxia e hipotermia foi realizada a ANOVA de duas vias adicionando o fator SESSOES como repetição. Utilizou-se teste *post hoc* de Tukey-Kramer.

Finalmente, os dados comportamentais referentes aos testes de medo condicionado ao som e ao contexto também foram analisados através de uma ANOVA para medidas repetidas, com grupo como fator entre-sujeito e blocos como fator intra-sujeito. A porcentagem de tempo total em *freezing* e o tempo em *freezing* em cada bloco exibidos pelos animais durante o teste foram tomados como variáveis dependentes. A ANOVA de duas vias foi também utilizada para avaliar o efeito da anóxia e hipotermia. Utilizou-se o teste *post-hoc* de Duncan.

Em todas as análises o p-valor é apresentado para possibilitar ao leitor uma reflexão sobre os resultados. P-valores menores do que 0,05 foram considerados significante. P-valores entre 0,05 e 0,1 foram analisados com cautela pois podem indicar fatores relevantes. P-valores maiores do que 0,1 foram considerados não-significantes.

V. Resultados.

V.1 Labirinto em Cruz elevado

Em relação a porcentagem de tempo nos braços abertos (Figura 1A), a ANOVA revelou diferença significativa em relação ao fator SESSÃO, e ausência de diferenças significantes em relação ao fator GRUPO e na interação envolvendo GRUPO x SESSÃO (Tabela 1). Similarmente, em relação a porcentagem de entradas nos braços abertos (Figura 1B), a ANOVA revelou efeito significativo envolvendo o fator SESSÃO, e ausência de diferenças significantes envolvendo os fatores GRUPO e a interação GRUPO x SESSÃO (Tabela 1). Não foram observadas diferenças significantes no efeito “anóxia” nem “hipotermia” quando analisados na ANOVA de duas vias.

Tabela 1. Resultados da ANOVA para medidas repetidas e os p-valores correspondentes, envolvendo os parâmetros coligidos no Labirinto em Cruz Elevado, em função dos fatores GRUPO, SESSÃO e interação GRUPO x SESSÃO.

Variáveis	Percentagem de tempo no braço aberto	Percentagem de entradas no braço aberto	Numero de entradas no braço fechado	Tempo no quadrado central
Grupo	$F_{(3,87)} = 0.50$, $p=0.68$	$F_{(3,87)} = 1.00$, $p=0.40$	$F_{(3,87)} = 1.27$, $p=0.29$	$F_{(3,87)} = 2.08$, $p=0.08$
Sessão	$F_{(1,87)} = 32.14$, $p<0.01$	$F_{(1,87)} = 15.54$, $p<0.01$	$F_{(1,87)} = 3.54$, $p=0.06$	$F_{(1,87)} = 1.89$, $p=0.17$
Grupo x Sessão	$F_{(3,87)} = 0.66$, $p=0.58$	$F_{(3,87)} = 0.32$, $p=0.81$	$F_{(3,87)} = 0.92$, $p=0.43$	$F_{(3,87)} = 0.44$, $p=0.72$

Tabela 2. Resultados da ANOVA de duas vias e os p-valores correspondentes, envolvendo os parâmetros coligidos no Labirinto em Cruz Elevado, em função dos fatores Anóxia, Hipotermia, SESSÃO, Anóxia x SESSÃO, Hipotermia x SESSÃO, e análises de contras.

Variáveis	Percentagem de tempo no braço aberto	Percentagem de entradas no braço aberto	Numero de entradas no braço fechado	Tempo no quadrado central
Anóxia	$F_{(1,87)} = 0.22$, $p=0.64$	$F_{(1,87)} = 2.65$, $p=0.11$	$F_{(1,87)} = 0.11$, $p=0.74$	$F_{(1,87)} = 0.02$, $p=0.88$
Hipotermia	$F_{(1,87)} = 0.89$, $p=0.35$	$F_{(1,87)} = 0.30$, $p=0.59$	$F_{(1,87)} = 1.95$, $p=0.17$	$F_{(1,87)} = 6.31$, $p<0.05$
Sessão	$F_{(1,87)} = 32.36$, $p<0.01$	$F_{(1,87)} = 15.72$, $p<0.01$	$F_{(1,87)} = 3.34$, $p=0.07$	$F_{(1,87)} = 1.83$, $p=0.18$
Anóxia x Sessão	$F_{(1,87)} = 0.04$, $p=0.84$	$F_{(1,87)} = 0.12$, $p=0.73$	$F_{(1,87)} = 0.40$, $p=0.53$	$F_{(1,87)} = 0.02$, $p=0.86$
Hipotermia x Sessão	$F_{(1,87)} = 0.01$, $p=0.96$	$F_{(1,87)} = 0.86$, $p=0.36$	$F_{(1,87)} = 1.49$, $p=0.23$	$F_{(1,87)} = 0.72$, $p=0.40$
Anóxia (sessão 1)	$F_{(1,87)} = 0.20$, $p=0.64$	$F_{(1,87)} = 2.53$, $p=0.12$	$F_{(1,87)} = 0.01$, $p=0.97$	$F_{(1,87)} = 0.01$, $p=0.94$
Hipotermia (sessão 1)	$F_{(1,87)} = 0.45$, $p=0.50$	$F_{(1,87)} = 0.01$, $p=0.93$	$F_{(1,87)} = 4.13$, $p<0.05$	$F_{(1,87)} = 5.18$, $p<0.05$
Anóxia (sessão 2)	$F_{(1,87)} = 0.11$, $p=0.75$	$F_{(1,87)} = 1.18$, $p=0.28$	$F_{(1,87)} = 0.31$, $p=0.58$	$F_{(1,87)} = 0.03$, $p=0.86$
Hipotermia (sessão 2)	$F_{(1,87)} = 0.91$, $p=0.34$	$F_{(1,87)} = 0.90$, $p=0.36$	$F_{(1,87)} = 0.29$, $p=0.59$	$F_{(1,87)} = 5.32$, $p<0.05$

Figura 1. Média (+E.P.M.) da percentagem de tempo nos braços abertos (A) e da percentagem de entradas nos braços abertos (B), nas sessões 1 e 2.

O número de entradas nos braços fechados (Figura 2A) é considerado uma medida de atividade locomotora. A ANOVA para medidas repetidas revelou ausência de efeitos significantes para os fatores GRUPO, SESSÃO e interação GRUPO x SESSÃO (Tabela 1). Porém, a ANOVA de duas vias revelou efeito da Hipotermia na primeira sessão (Tabela 2). Não foram observadas diferenças significantes entre os grupos submetidos à anóxia neonatal (AC e AH) e o grupo controle (CC). Mesmo assim, a Figura 2A parece indicar que existe uma tendência do grupo AC a apresentar níveis de locomoção inferiores na segunda sessão quando comparado aos demais grupos. Isto é importante destacar já que os resultados do grupo AH, diferente do grupo AC, permaneceram próximos aos grupos CC e CH permitindo sugerir que, a hipotermia em relação à locomoção no LCE, pode gerar efeito neuroprotetor nos indivíduos tratados.

Em relação ao tempo despendido no quadrado central (Figura 2B), considerado um comportamento de avaliação de risco, a ANOVA de medidas repetidas revelou ausência de efeitos significantes em todos os fatores considerados. Diferentemente, a ANOVA de duas vias revelou a existência de efeito significativo da hipotermia na primeira e segunda sessões.

Figura 2. Média (+E.P.M.) do número de entradas nos braços fechados (A) e do tempo de permanência no quadrado central (B), nas sessões 1 e 2 do labirinto em cruz elevado.

V.2 Labirinto aquático de Morris

V.2.1 Memória de Referência Espacial

Em relação a Latência (Figura 3A), a ANOVA revelou efeitos significantes nos fatores GRUPO, SESSÃO e TENTATIVA (Tabela 3). Os resultados indicam que todos os animais foram capazes de aprender a tarefa e apresentar melhoras no desempenho ao longo das sessões, indistintamente de terem sido ou não submetidos à anóxia neonatal ou hipotermia. Não foram observadas diferenças significantes na interação GRUPO x SESSÃO, refletindo que a taxa de aquisição dos grupos ao longo das sessões de teste não diferiu. No caso do Trajeto Percorrido (Figura 3B), a ANOVA mostrou efeitos significantes em relação aos fatores GRUPO, SESSÃO e TENTATIVA (Tabela 3) e interações significantes em relação aos fatores GRUPO x SESSÃO e SESSÃO x TENTATIVA (Tabela 3).

Todos os grupos apresentaram trajetos menores a cada dia podendo-se observar uma tendência menor na taxa de aquisição no caso do grupo anóxia (AC) nas primeiras sessões em relação aos demais grupos. O teste *post-hoc* revelou diferenças significantes entre os grupos CC, AH e CH em relação ao grupo AC, apresentando os primeiros um percurso menor, portanto mais eficiente, para encontrar a plataforma do que os animais expostos a anóxia sem hipotermia. É

importante destacar que o percurso realizado pelo grupo AC na primeira sessão foi significativamente maior em comparação com os outros grupos (Figura 3B).

Tabela 3. Resultados da ANOVA para medidas repetidas e p-valores correspondentes, envolvendo os parâmetros coligidos no labirinto aquático de Morris, versão de Memória de Referência espacial, para todos os grupos.

Variáveis	Latência	Trajetos Percorrido	Velocidade
Grupo	$F_{(3, 320)} = 3.76$, $p < 0.05$	$F_{(3, 320)} = 4.61$, $p < 0.01$	$F_{(3, 320)} = 13.23$, $p < 0.01$
Sessão	$F_{(9, 2880)} = 289.85$, $p < 0.01$	$F_{(9, 2880)} = 80.70$, $p < 0.01$	$F_{(9, 2880)} = 17.37$, $p < 0.01$
Tentativa	$F_{(3, 320)} = 34.09$, $p < 0.01$	$F_{(3, 320)} = 47.71$, $p < 0.01$	$F_{(3, 320)} = 3.82$, $p < 0.05$
Grupo x Sessão	$F_{(27, 2880)} = 1.26$, $p = 0.17$	$F_{(27, 2880)} = 4.44$, $p < 0.01$	$F_{(27, 2880)} = 1.46$, $p = 0.06$
Grupo x Tentativa	$F_{(9, 320)} = 0.57$, $p = 0.82$	$F_{(9, 320)} = 0.43$, $p = 0.92$	$F_{(9, 320)} = 0.24$, $p = 0.99$
Sessão x Tentativa	$F_{(27, 2880)} = 4.29$, $p < 0.01$	$F_{(27, 2880)} = 3.99$, $p < 0.01$	$F_{(27, 2880)} = 2.22$, $p < 0.01$
Grupo x Sessão x Tentativa	$F_{(81, 2880)} = 0.77$, $p = 0.93$	$F_{(81, 2880)} = 1.25$, $p = 0.06$	$F_{(81, 2880)} = 1.51$, $p < 0.01$

Tabela 4. Resultados da ANOVA de duas vias e p-valores correspondentes, envolvendo os parâmetros coligidos no labirinto aquático de Morris, versão de Memória de Referência espacial, para todos os grupos.

Variáveis	Latência	Trajetos Percorrido	Velocidade
Anóxia	$F_{(1, 80)} = 0.38$, $p = 0.54$	$F_{(1, 80)} = 0.14$, $p = 0.71$	$F_{(1, 80)} = 0.59$, $p = 0.45$
Hipotermia	$F_{(1, 80)} = 2.18$, $p = 0.14$	$F_{(1, 80)} = 5.32$, $p < 0.05$	$F_{(1, 80)} = 13.36$, $p < 0.01$
Sessão	$F_{(9, 728)} = 229.59$, $p < 0.01$	$F_{(9, 728)} = 65.85$, $p < 0.01$	$F_{(9, 728)} = 16.39$, $p < 0.01$
Sessão x Anóxia	$F_{(9, 728)} = 1.00$, $p = 0.44$	$F_{(9, 728)} = 5.53$, $p < 0.01$	$F_{(9, 728)} = 2.80$, $p < 0.01$
Sessão x Hipotermia	$F_{(9, 728)} = 1.61$, $p = 0.11$	$F_{(9, 728)} = 3.04$, $p < 0.01$	$F_{(9, 728)} = 0.85$, $p = 0.57$
Tentativa	$F_{(3, 242)} = 60.45$, $p < 0.01$	$F_{(3, 242)} = 53.35$, $p < 0.01$	$F_{(3, 242)} = 6.90$, $p < 0.01$
Tentativa x Anóxia	$F_{(3, 242)} = 1.22$, $p = 0.30$	$F_{(3, 242)} = 3.24$, $p < 0.05$	$F_{(3, 242)} = 0.28$, $p = 0.84$
Tentativa x Hipotermia	$F_{(3, 242)} = 0.09$, $p = 0.98$	$F_{(3, 242)} = 0.50$, $p = 0.68$	$F_{(3, 242)} = 0.95$, $p = 0.41$
Sessão x Tentativa	$F_{(27, 2186)} = 4.71$, $p < 0.01$	$F_{(3, 26)} = 3.36$, $p < 0.01$	$F_{(27, 2186)} = 2.25$, $p < 0.01$
Sessão x Tentativa x Anóxia	$F_{(27, 2186)} = 0.81$, $p = 0.74$	$F_{(3, 26)} = 0.91$, $p = 0.59$	$F_{(3, 2186)} = 2.95$, $p < 0.01$
Sessão x Tentativa x Hipotermia	$F_{(27, 2186)} = 1.00$, $p = 0.46$	$F_{(3, 26)} = 0.94$, $p = 0.55$	$F_{(3, 2186)} = 1.01$, $p = 0.45$

Figura 3. Médias ($\pm$ E.P.M.) da latência expressa em segundos (A) e do trajeto expresso em centímetros (B), em função das 10 sessões do teste de memória de referência espacial. Os valores de cada sessão expressam as médias dos animais dos grupos, sendo cada animal representado pela média das 4 tentativas. (*) $p < 0.05$.

Em relação a Velocidade média de nado (Figura 4), a ANOVA mostrou efeito significativo em relação aos fatores GRUPO, SESSÃO e TENTATIVA (Tabela 3) podendo-se observar que a velocidade de nado, depois das sessões iniciais de treinamento, foi relativamente constante ao longo das sessões de treino em todos os grupos. Ademais, a análise estatística revelou interação significativa em SESSÃO x TENTATIVA e GRUPO x SESSÃO x TENTATIVA (Tabela 3). O teste *post-hoc* revelou diferenças significantes entre o grupo AH e os grupos CC e AC. Do mesmo modo, o grupo CH apresentou diferenças significantes quanto comparado ao grupo AC. Isto parece indicar que os grupos tratados com hipotermia tendem a realizar a tarefa utilizando uma velocidade menor em relação aos grupos não tratados.

Figura 4. Médias ($\pm$ E.P.M.) da velocidade de nado, em função das 10 sessões do teste de memória de referência espacial no Labirinto Aquático de Morris. Os valores de cada sessão expressam as médias dos animais dos grupos, sendo cada animal representado pela média das 4 tentativas.

V.2.1.1 Probe teste

No caso da percentagem de entradas e distância percorrida no contador crítico (Figura 5A e 6 respectivamente) a ANOVA para medidas repetidas mostrou ausência de diferenças significantes para os fatores testados. Mesmo assim, é importante destacar que no resultado da percentagem da distância percorrida no contador crítico a ANOVA indicou um valor $p=0.05$ em relação ao fator BLOCO DE TEMPO, indicando que o trajeto percorrido pelos animais no contador crítico foi diminuído ao longo do tempo. Em relação a percentagem de tempo no contador crítico (Figura 5B) e as percentagens de entradas, tempo e distância percorrida no quadrante crítico (Figuras 7A, 7B e 8 respectivamente) a ANOVA para medidas repetidas mostrou efeito significativo no fator BLOCO DE TEMPO.

Tabela 5. Resultados da ANOVA para medidas repetidas e p-valores correspondentes, envolvendo os parâmetros coligidos no Probe Teste no labirinto aquático de Morris, após a tarefa de Memória de Referência espacial, para todos os grupos.

Variáveis	%E Contador	%T Contador	%D Contador	%E Quadrante	%T Quadrante	%D Quadrante
Grupo	$F_{(3, 36)} = 0.30$, $p=0.82$	$F_{(3, 36)} = 0.47$, $p=0.71$	$F_{(3, 36)} = 0.27$, $p=0.71$	$F_{(3, 36)} = 1.43$, $p=0.25$	$F_{(3, 36)} = 2.25$, $p=0.10$	$F_{(3, 36)} = 0.73$, $p=0.54$
Bloco de tempo	$F_{(2, 72)} = 2.02$, $p=0.14$	$F_{(2, 72)} = 3.45$, $p<0.05$	$F_{(2, 72)} = 3.10$, $p=0.05$	$F_{(2, 72)} = 7.02$, $p<0.01$	$F_{(2, 72)} = 17.59$, $p<0.01$	$F_{(2, 72)} = 15.46$, $p<0.01$
Grupo x Bloco de tempo	$F_{(6, 72)} = 0.48$, $p=0.82$	$F_{(6, 72)} = 0.57$, $p=0.76$	$F_{(6, 72)} = 0.40$, $p=0.88$	$F_{(6, 72)} = 0.71$, $p=0.64$	$F_{(6, 72)} = 1.26$, $p=0.29$	$F_{(6, 72)} = 1.15$, $p=0.34$

* %E Contador: Percentagem de entradas no contador crítico.

* %T Contador: Percentagem do tempo no contador crítico.

* %D Contador: Percentagem da distância percorrida no contador crítico.

* %F Quadrante: Percentagem de entradas no quadrante crítico.

* %T Quadrante: Percentagem do tempo no quadrante crítico.

* %D Quadrante: Percentagem da distância percorrida no quadrante crítico.

Tabela 6. Resultados da ANOVA de duas vias e p-valores correspondentes, envolvendo os parâmetros coligidos no Probe Teste no labirinto aquático de Morris, após a tarefa de Memória de Referência espacial, para todos os grupos.

Variáveis	%E Contador	%T Contador	%D Contador	%E Quadrante	%T Quadrante	%D Quadrante
Anóxia	$F_{(1, 36)} = 0.73$, $p=0.40$	$F_{(1, 36)} = 1.11$, $p=0.30$	$F_{(1, 36)} = 0.58$, $p=0.45$	$F_{(1, 36)} = 4.02$, $p=0.05$	$F_{(1, 36)} = 4.67$, $p<0.05$	$F_{(1, 36)} = 1.73$, $p=0.20$
Hipotermia	$F_{(1, 36)} = 0.05$, $p=0.82$	$F_{(1, 36)} = 0.08$, $p=0.77$	$F_{(1, 36)} = 0.08$, $p=0.78$	$F_{(1, 36)} = 0.19$, $p=0.67$	$F_{(1, 36)} = 0.00$, $p=0.95$	$F_{(1, 36)} = 0.09$, $p=0.76$
Bloco de tempo	$F_{(2, 73)} = 2.58$, $p=0.08$	$F_{(2, 73)} = 3.80$, $p<0.05$	$F_{(2, 73)} = 3.14$, $p<0.05$	$F_{(2, 73)} = 6.36$, $p<0.01$	$F_{(2, 73)} = 17.50$, $p<0.01$	$F_{(2, 73)} = 14.73$, $p<0.01$
Anóxia x Bloco de tempo	$F_{(2, 72)} = 0.85$, $p=0.43$	$F_{(2, 72)} = 0.96$, $p=0.39$	$F_{(2, 72)} = 0.93$, $p=0.40$	$F_{(2, 72)} = 1.01$, $p=0.37$	$F_{(2, 72)} = 3.02$, $p=0.055$	$F_{(2, 72)} = 2.33$, $p=0.10$
Hipotermia x Bloco de tempo	$F_{(2, 72)} = 0.53$, $p=0.59$	$F_{(2, 72)} = 0.38$, $p=0.68$	$F_{(2, 72)} = 0.29$, $p=0.75$	$F_{(2, 72)} = 0.39$, $p=0.68$	$F_{(2, 72)} = 0.01$, $p=0.99$	$F_{(2, 72)} = 0.56$, $p=0.58$

* %E Contador: Percentagem de entradas no contador crítico.

* %T Contador: Percentagem do tempo no contador crítico.

* %D Contador: Percentagem da distância percorrida no contador crítico.

* %F Quadrante: Percentagem de entradas no quadrante crítico.

* %T Quadrante: Percentagem do tempo no quadrante crítico.

* %D Quadrante: Percentagem da distância percorrida no quadrante crítico.

Figura 5. Médias ($\pm$ E.P.M.) da Percentagem de entradas (A) e do tempo (B) no contador crítico, em função dos 3 blocos de tempo de 1 minuto analisados no Probe teste no Labirinto Aquático de Morris.

Figura 6. Médias ($\pm$ E.P.M.) da Percentagem da distância percorrida no contador crítico, em função dos 3 blocos de tempo de 1 minuto analisados no Probe teste espacial no Labirinto Aquático de Morris.

Figura 7. Médias ($\pm$ E.P.M.) da Percentagem de entradas (A) e do tempo (B) no quadrante crítico em função dos 3 blocos de tempo de 1 minuto analisados no Probe teste no Labirinto Aquático de Morris. (*) $p < 0.05$.

Figura 8. Médias ($\pm$ E.P.M.) da Percentagem da distância percorrida no quadrante crítico, em função dos 3 blocos de tempo de 1 minuto analisados no Probe teste no Labirinto Aquático de Morris.

V.2.2 Memória operacional espacial

Em relação a latência no teste de memória operacional (Figura 9A), a ANOVA mostrou efeito significativo para os fatores ITI e TENTATIVA (Tabela 7), indicando que os animais melhoraram seu desempenho ao longo das tentativas, independentemente do grupo. Portanto, não parece haver prejuízos causados pela anóxia ou pela hipotermia. No caso do ITI, o teste *post hoc* revelou diferenças significantes entre o ITI 10 minutos e os restantes, mas não entre os ITIs 0 e 30 minutos, sendo a tarefa de ITI 10 minutos na qual se observou as maiores latências médias em relação aos outros ITIs. Provavelmente, esse efeito está relacionado com o fato do treinamento com o ITI 10 ter sido o primeiro a ser treinado, de modo que os animais ainda estariam em fase da aquisição da tarefa.

Por outro lado, é interessante que não tenha havido diferenças significantes entre os ITIs 0 e 30, pois isso indica que a memória operacional dos animais encontra-se intacta mesmo quando devem manter a informação crítica na memória ao longo de 30 minutos. Adicionalmente, a ANOVA de 2 vias revelou efeito de hipotermia e anóxia na primeira tentativa do ITI 10, talvez por causa da adaptação inicial ao desempenho de uma nova tarefa, e efeito da hipotermia na última tentativa do ITI 30, evidenciando um possível efeito benéfico da hipotermia sobre a memória operacional espacial.

Em relação ao trajeto percorrido (Figura 6B), a ANOVA para medidas repetidas revelou diferenças significantes em TENTATIVA e ITI, demonstrando que os animais conseguiram diminuir o percurso na piscina ao longo das tentativas independentemente do grupo. Novamente os animais mostraram maiores escores de trajeto no ITI 10 em relação aos outros intervalos de tempo entre as tentativas, diferença evidenciada no teste *post hoc*. Por outro lado, foi observada a existência de efeito significativo da anóxia na primeira tentativa do ITI 10 e na terceira tentativa do ITI 30. Adicionalmente, foi observado efeito significativo da hipotermia na segunda tentativa do ITI 10, na primeira, segunda e terceira tentativas do ITI 0, e na terceira tentativa do ITI 30.

Tabela 7. Resultados da ANOVA para medidas repetidas e p-valores correspondentes, envolvendo os parâmetros coligidos no labirinto aquático de Morris, versão de Memória Operacional espacial, para todos os grupos.

Variáveis	Latência	Trajetos Percorrido	Velocidade	%T Contador-ant*	%T Quadrante-ant*
Grupo	$F_{(3, 720)} = 0.39$, $p=0.76$	$F_{(3, 720)} = 5.82$, $p<0.01$	$F_{(3, 720)} = 3.10$, $p<0.05$	$F_{(3, 719)} = 1.14$, $p=0.33$	$F_{(3, 720)} = 0.63$, $p=0.60$
Tentativa	$F_{(2, 720)} = 304.66$, $p<0.01$	$F_{(2, 720)} = 283.63$, $p<0.01$	$F_{(2, 720)} = 9.15$, $p<0.01$	$F_{(2, 719)} = 164.04$, $p<0.01$	$F_{(2, 720)} = 76.78$, $p<0.01$
ITI	$F_{(2, 720)} = 40.68$, $p<0.01$	$F_{(2, 720)} = 24.85$, $p<0.01$	$F_{(2, 720)} = 16.46$, $p<0.01$	$F_{(2, 719)} = 1.00$, $p=0.37$	$F_{(2, 720)} = 6.74$, $p<0.01$
Grupo x Tentativa	$F_{(6, 720)} = 2.84$, $p<0.05$	$F_{(6, 720)} = 1.71$, $p=0.12$	$F_{(6, 720)} = 4.45$, $p<0.01$	$F_{(6, 719)} = 3.35$, $p<0.01$	$F_{(6, 720)} = 4.28$, $p<0.01$
Grupo x ITI	$F_{(6, 720)} = 1.35$, $p=0.24$	$F_{(6, 720)} = 2.18$, $p<0.05$	$F_{(6, 720)} = 3.02$, $p<0.01$	$F_{(6, 719)} = 1.91$, $p=0.08$	$F_{(6, 720)} = 0.48$, $p=0.82$
Tentativa x ITI	$F_{(4, 720)} = 15.60$, $p<0.01$	$F_{(4, 720)} = 10.98$, $p<0.01$	$F_{(4, 720)} = 3.76$, $p<0.01$	$F_{(4, 719)} = 2.08$, $p=0.08$	$F_{(4, 720)} = 0.36$, $p=0.83$
Grupo x Tentativa x ITI	$F_{(12, 720)} = 1.29$, $p=0.23$	$F_{(12, 720)} = 1.29$, $p=0.22$	$F_{(12, 720)} = 1.72$, $p=0.06$	$F_{(12, 719)} = 1.31$, $p=0.21$	$F_{(12, 720)} = 2.66$, $p<0.01$

* %T Contador-ant = Percentagem de tempo ponderado no Contador Crítico do dia anterior.

* %T Quadrante-ant = Percentagem de tempo no Quadrante Crítico do dia anterior.

Tabela 8. Resultados da ANOVA de duas vias e p-valores correspondentes, envolvendo os parâmetros coligidos no labirinto aquático de Morris, versão de Memória Operacional espacial, para todos os grupos.

Variáveis	Latência	Trajetos Percorrido	Velocidade	%T Contador-ant*	%T Quadrante-ant*
Anóxia	$F_{(1, 80)} = 0.82$, $p=0.37$	$F_{(1, 80)} = 1.21$, $p=0.27$	$F_{(1, 80)} = 0.69$, $p=0.41$	$F_{(1, 80)} = 2.06$, $p=0.16$	$F_{(1, 80)} = 0.02$, $p=0.89$
Hipotermia	$F_{(1, 80)} = 0.11$, $p=0.74$	$F_{(1, 80)} = 15.49$, $p<0.01$	$F_{(1, 80)} = 8.47$, $p<0.01$	$F_{(1, 80)} = 0.28$, $p=0.60$	$F_{(1, 80)} = 1.89$, $p=0.17$
ITI	$F_{(2, 161)} = 41.21$, $p<0.01$	$F_{(2, 161)} = 26.01$, $p<0.01$	$F_{(2, 161)} = 15.63$, $p<0.01$	$F_{(2, 161)} = 1.26$, $p=0.29$	$F_{(2, 161)} = 6.80$, $p<0.01$
ITI x Anóxia	$F_{(2, 161)} = 2.90$, $p=0.06$	$F_{(2, 161)} = 4.34$, $p<0.05$	$F_{(2, 161)} = 5.71$, $p<0.01$	$F_{(2, 161)} = 0.02$, $p=0.99$	$F_{(2, 161)} = 0.69$, $p=0.50$
ITI x Hipotermia	$F_{(2, 161)} = 1.29$, $p=0.28$	$F_{(2, 161)} = 1.46$, $p=0.23$	$F_{(2, 161)} = 0.63$, $p=0.53$	$F_{(2, 161)} = 2.17$, $p=0.19$	$F_{(2, 161)} = 0.65$, $p=0.52$
Tentativa	$F_{(2, 161)} = 310.91$, $p<0.01$	$F_{(2, 161)} = 287.27$, $p<0.01$	$F_{(2, 161)} = 8.91$, $p<0.01$	$F_{(2, 159)} = 149.46$, $p<0.01$	$F_{(2, 161)} = 79.21$, $p<0.01$
Tentativa x Anóxia	$F_{(2, 161)} = 4.56$, $p<0.05$	$F_{(2, 161)} = 2.91$, $p=0.06$	$F_{(2, 161)} = 7.76$, $p<0.01$	$F_{(2, 159)} = 1.96$, $p=0.14$	$F_{(2, 161)} = 3.83$, $p<0.05$
Tentativa x Hipotermia	$F_{(2, 161)} = 3.71$, $p<0.05$	$F_{(2, 161)} = 0.24$, $p=0.79$	$F_{(2, 161)} = 4.58$, $p<0.05$	$F_{(2, 159)} = 6.51$, $p=0.01$	$F_{(2, 161)} = 7.91$, $p<0.01$
ITI x Tentativa	$F_{(4, 323)} = 15.71$, $p<0.01$	$F_{(4, 323)} = 11.24$, $p<0.01$	$F_{(4, 323)} = 3.45$, $p<0.01$	$F_{(4, 319)} = 2.59$, $p<0.05$	$F_{(4, 323)} = 0.30$, $p=0.88$
ITI x Tentativa x Anóxia	$F_{(4, 323)} = 0.89$, $p=0.47$	$F_{(4, 323)} = 0.99$, $p=0.41$	$F_{(4, 323)} = 0.90$, $p=0.46$	$F_{(4, 319)} = 2.47$, $p<0.05$	$F_{(4, 323)} = 3.50$, $p<0.01$
ITI x Tentativa x Hipotermia	$F_{(4, 323)} = 2.78$, $p<0.05$	$F_{(4, 323)} = 2.57$, $p<0.05$	$F_{(4, 323)} = 2.54$, $p<0.05$	$F_{(4, 319)} = 0.11$, $p=0.97$	$F_{(4, 323)} = 4.16$, $p<0.01$

* %T Contador-ant = Percentagem de tempo ponderado no Contador Crítico do dia anterior.

* %T Quadrante-ant = Percentagem de tempo no Quadrante Crítico do dia anterior.

Figura 9. Médias ($\pm$ E.P.M.) das latências expressa em segundos (A) e dos trajetos percorridos na piscina expresso em centímetros (B), em função das 3 tentativas nos ITI 10, 0 e 30, para os grupos CC, AC, AH e CH na tarefa de memória operacional espacial. (*) $p < 0.05$.

A medida de Velocidade média de deslocamento na piscina (Figura 10) mostrou dados similares aos observados anteriormente no teste de memória de referência espacial. A ANOVA para medidas repetidas revelou diferença significativa em relação a GRUPO, TENTATIVA, ITI (Tabela 7) e efeito “hipotermia” (Tabela 8). Adicionalmente foram observadas interações significantes em GRUPO $\times$ ITI, TENTATIVA $\times$ ITI e GRUPO $\times$ TENTATIVA $\times$ ITI. Isto indica que os animais testados apresentaram variações na velocidade entre as tentativas e ITIs, sendo os grupos tratados com hipotermia quem realizaram a tarefa com uma velocidade menor.

Figura 10. Médias ($\pm$ E.P.M.) da velocidade média de deslocamento na piscina, expressa em centímetros por segundo, em função das três tentativas nos ITI 0, 10 e 30 para os grupos CC, AC, AH e CH na tarefa de memória operacional espacial. (*) $p < 0.05$.

As medidas percentagem de tempo no contador e quadrante crítico do dia anterior (Figura 11, A e B respectivamente), isto é, o contador e o quadrante onde a plataforma estava na sessão do dia anterior, foram realizadas a fim de verificar a flexibilidade comportamental do animal em deixar de realizar a busca do local onde a plataforma estava previamente. No caso da percentagem de tempo no contador crítico foram observadas diferenças significantes em TENTATIVA e na interação GRUPO x TENTATIVA. Isto indica que todos os animais, independentemente do grupo, compreendem que a plataforma não está mais no local do dia anterior e diminuem o tempo de busca dela nessa localização. Além disso, evidencia-se que este comportamento é diferente entre os grupos ao longo das tentativas.

Quanto a percentagem de tempo no quadrante crítico do dia anterior, a análise estatística indicou diferenças significantes em relação aos fatores TENTATIVA, ITI e nas interações GRUPO x TENTATIVA e GRUPO x TENTATIVA x ITI. Isto indica que o desempenho dos animais foi diferente entre os ITIs, além de se evidenciar novamente que a diminuição do tempo de busca é diferente entre os grupos ao longo das tentativas.

Adicionalmente, foi observado efeito da anóxia na segunda tentativa do ITI 10 e na terceira tentativa do ITI 0, além de efeito da hipotermia na segunda e terceira tentativas do ITI 0, respectivamente. É importante destacar que a ANOVA mostrou diferenças significantes em TENTATIVA como era esperado. De fato, todos os animais, independentemente do grupo e do ITI, evidenciaram uma menor percentagem de tempo no contador e quadrante crítico ao longo das tentativas. Adicionalmente, a ANOVA indicou também interação significativa em GRUPO x TENTATIVA tanto para o contador quanto no quadrante crítico do dia anterior.

Figura 11. Médias ($\pm$ E.P.M.) da percentagem de tempo no contador (A) e quadrante (B) crítico do dia anterior em função das três tentativas nos ITI 0, 10 e 30 para os grupos CC, AC, AH e CH na tarefa de memória operacional espacial. (*) $p < 0.05$.

V.2.3 Tarefa com a plataforma visível

Em relação à Latência (Figura 12A), a ANOVA revelou diferenças significantes envolvendo os fatores SESSÃO e TENTATIVA (Tabela 9). Análises *post hoc* revelaram diferenças significantes no grupo controle (CC) em relação aos outros grupos experimentais. Adicionalmente, na primeira sessão e na primeira tentativa as latências foram significativamente maiores. A ANOVA revelou ainda efeitos significantes envolvendo a interação entre os fatores GRUPO x TENTATIVA e SESSÃO x TENTATIVA. Em relação ao trajeto percorrido na piscina (Figura 12B), a ANOVA revelou efeito significativo envolvendo os fatores principais GRUPO, SESSÃO e TENTATIVA (tabela 9). Isto quer dizer que o desempenho dos ratos variou ao longo das tentativas. Também foram encontradas interações significativas em SESSÃO x TENTATIVA. A ANOVA de duas vias revelou a existência de efeito significativo envolvendo o fator anóxia (Tabela 10).

Tabela 9. Resultados da ANOVA para medidas repetidas e p-valores correspondentes, envolvendo os parâmetros coligidos no labirinto aquático de Morris, versão de plataforma visível, para todos os grupos.

Variáveis	Latência	Trajetos Percorridos	Velocidade
Grupo	$F_{(3, 35)} = 1.94$, $p=0.14$	$F_{(3, 35)} = 3.52$, $p<0.05$	$F_{(3, 35)} = 1.53$, $p=0.22$
Sessão	$F_{(2, 71)} = 5.80$, $p<0.01$	$F_{(2, 71)} = 8.10$, $p<0.01$	$F_{(2, 71)} = 13.20$, $p<0.01$
Tentativa	$F_{(2, 71)} = 3.75$, $p<0.05$	$F_{(2, 71)} = 5.51$, $p<0.01$	$F_{(2, 71)} = 6.04$, $p<0.01$
Grupo x Sessão	$F_{(6, 71)} = 0.14$, $p=0.99$	$F_{(6, 71)} = 1.38$, $p=0.23$	$F_{(6, 71)} = 2.68$, $p<0.05$
Grupo x Tentativa	$F_{(6, 71)} = 2.25$, $p<0.05$	$F_{(6, 71)} = 2.02$, $p=0.07$	$F_{(6, 71)} = 0.53$, $p=0.78$
Sessão x Tentativa	$F_{(4, 143)} = 3.97$, $p<0.01$	$F_{(4, 143)} = 3.73$, $p<0.01$	$F_{(4, 143)} = 5.08$, $p<0.01$
Grupo x Sessão x Tentativa	$F_{(12, 143)} = 1.46$, $p=0.15$	$F_{(12, 143)} = 1.28$, $p=0.26$	$F_{(12, 143)} = 1.49$, $p=0.14$

Tabela 10. Resultados da ANOVA de duas vias e p-valores correspondentes, envolvendo os parâmetros coligidos no labirinto aquático de Morris, versão de plataforma visível, para todos os grupos.

Variáveis	Latência	Trajetos Percorridos	Velocidade
Anóxia	$F_{(1, 36)} = 0.52$, $p=0.47$	$F_{(1, 36)} = 0.30$, $p=0.58$	$F_{(1, 36)} = 0.05$, $p=0.82$
Hipotermia	$F_{(1, 36)} = 1.36$, $p=0.25$	$F_{(1, 36)} = 8.15$, $p<0.01$	$F_{(1, 36)} = 3.81$, $p=0.06$
Sessão	$F_{(2, 73)} = 6.84$, $p<0.01$	$F_{(2, 73)} = 11.58$, $p<0.01$	$F_{(2, 73)} = 7.84$, $p<0.01$
Sessão x Anóxia	$F_{(2, 73)} = 0.13$, $p=0.87$	$F_{(2, 73)} = 2.40$, $p=0.10$	$F_{(2, 73)} = 1.12$, $p=0.33$
Sessão x Hipotermia	$F_{(2, 73)} = 0.02$, $p=0.98$	$F_{(2, 73)} = 0.66$, $p=0.52$	$F_{(2, 73)} = 0.52$, $p=0.60$
Tentativa	$F_{(2, 73)} = 5.81$, $p<0.01$	$F_{(2, 73)} = 6.95$, $p<0.01$	$F_{(2, 73)} = 8.13$, $p<0.01$
Tentativa x Anóxia	$F_{(2, 73)} = 3.84$, $p<0.05$	$F_{(2, 73)} = 4.60$, $p<0.05$	$F_{(2, 73)} = 0.17$, $p=0.84$
Tentativa x Hipotermia	$F_{(2, 73)} = 0.28$, $p=0.76$	$F_{(2, 73)} = 0.03$, $p=0.97$	$F_{(2, 73)} = 1.08$, $p=0.36$
Sessão x Tentativa	$F_{(4, 147)} = 5.08$, $p<0.01$	$F_{(4, 147)} = 4.23$, $p<0.01$	$F_{(4, 147)} = 5.12$, $p<0.01$
Sessão x Tentativa x Anóxia	$F_{(4, 147)} = 2.49$, $p<0.05$	$F_{(4, 147)} = 2.10$, $p=0.08$	$F_{(4, 147)} = 1.87$, $p=0.12$
Sessão x Tentativa x Hipotermia	$F_{(4, 147)} = 1.53$, $p=0.20$	$F_{(4, 147)} = 1.72$, $p=0.15$	$F_{(4, 147)} = 2.71$, $p<0.05$

Figura 12. Médias ($\pm$ E.P.M.) das latências expressas em segundos (A) e dos trajetos percorridos na piscina expresso em centímetros (B) na tarefa de plataforma visível, em função das três tentativas de cada sessão. (*) $p < 0.05$.

No caso da velocidade média de deslocamento na piscina (Figura 13), a ANOVA revelou diferenças significantes em relação aos fatores SESSÃO e TENTATIVA (Tabela 9). A ANOVA também revelou efeitos significantes nas interações envolvendo GRUPO x SESSÃO e SESSÃO x TENTATIVA. Isto indica que a motivação dos animais para realizar a tarefa variou em relação a tentativa e sessão, sendo o grupo AH quem evidenciou uma maior velocidade ao longo das tentativas.

Figura 13. Médias ($\pm$ E.P.M.) da velocidade média de deslocamento na piscina, expressa em centímetros por segundo, na tarefa da plataforma visível, nas três tentativas de cada sessão no Labirinto Aquático de Morris.

V.3 Condicionamento aversivo

A percentagem de tempo em “freezing” na tarefa de condicionamento aversivo ao contexto (Figura 14A) analisada pela ANOVA exibiu diferenças significantes em relação ao fator GRUPO (Tabela 11), sendo possível observar escores maiores no grupo AC em relação aos demais grupos (CC, AH e CH). Adicionalmente, foi observado efeitos significantes em relação ao BLOCO DE TEMPO (Tabela 11). A ANOVA de duas vias detectou ausência de efeitos significantes em relação aos fatores ANÓXIA e HIPOTERMIA, mas efeito significativo em relação ao fator BLOCO DE TEMPO (Tabela 12). Isto indica que (1) independentemente do grupo, todos os animais conseguem diminuir o tempo em freezing ao longo dos blocos de tempo evidenciando assim a capacidade de extinguir memórias aversivas e (2) a anóxia neonatal gera prejuízos nesta capacidade já que a diminuição de tempo em freezing é menor quando comparada com os demais grupos.

No caso do condicionamento aversivo ao som foram observadas diferenças significantes em relação aos fatores principais GRUPO, BLOCO DE TEMPO e também na interação GRUPO x BLOCO DE TEMPO. Além disso, a ANOVA de duas vias mostrou diferenças significantes na interação BLOCO DE TEMPO x ANÓXIA. Isto indica que independentemente do grupo, todos os animais conseguem aprender que o estímulo sonoro não está mais ligado ao choque elétrico.

Tabela 11. Resultados da ANOVA para medidas repetidas e *p-values* correspondentes, envolvendo os parâmetros coligidos no Condicionamento aversivo ao Contexto e ao Som.

Variáveis	Tempo em freezing	
	CA – Contexto	CA - Som
Grupo	$F_{(3, 43)} = 6.32, p < 0.01$	$F_{(3, 43)} = 6.31, p < 0.01$
Bloco de tempo	$F_{(9, 395)} = 16.11, p < 0.01$	$F_{(9, 395)} = 96.90, p < 0.01$
Grupo x Bloco de tempo	$F_{(9, 395)} = 1.39, p = 0.09$	$F_{(9, 395)} = 3.45, p < 0.01$

- CA-Contexto: Condicionamento aversivo ao contexto.
- CA- Som: Condicionamento aversivo ao som.

Tabela 12. Resultados da ANOVA de duas vias e *p-values* correspondentes, envolvendo os parâmetros coligidos no Condicionamento aversivo ao Contexto e ao Som.

Variáveis	Tempo em freezing	
	CA – Contexto	CA - Som
Anóxia	$F_{(1, 44)} = 0.89, p=0.35$	$F_{(1, 44)} = 0.63, p=0.43$
Hipotermia	$F_{(1, 44)} = 1.05, p=0.31$	$F_{(1, 44)} = 0.02, p=0.89$
Bloco de tempo	$F_{(9, 404)} = 15.90, p<0.01$	$F_{(11, 494)} = 89.05, p<0.01$
Bloco de tempo x Anóxia	$F_{(9, 404)} = 1.19, p=0.30$	$F_{(11, 494)} = 4.53, p<0.01$
Bloco de tempo x Hipotermia	$F_{(9, 404)} = 1.34, p=0.21$	$F_{(11, 494)} = 0.43, p=0.94$

- CA-Contexto: Condicionamento aversivo ao contexto.
- CA- Som: Condicionamento aversivo ao som.

Figura 14. Médias ($\pm$ E.P.M.) da Percentagem de tempo em *freezing* no teste de condicionamento aversivo ao contexto (A), e ao som (B); em função dos dez (para o contexto) e doze (para o som) blocos de tempo de 1 min, para os grupos CC, AC, AH e CH. (*) $p < 0.05$.

VI. Discussão

VI. 1 Labirinto em cruz elevado

Os resultados do presente conjunto de experimentos mostram, no teste do LCE, que a anóxia e hipotermia não produziram quaisquer alterações nos níveis de ansiedade (evidenciadas pela percentagem de tempo e entradas no braço aberto, Figura 1). Além disso, foram observados níveis maiores de ansiedade na segunda sessão para todos os grupos indicando que a anóxia e hipotermia não produzem alterações comportamentais quando os indivíduos são enfrentados por segunda vez ao labirinto. Por outro lado, os resultados indicam que os animais expostos à hipotermia têm maior atividade locomotora (evidenciada pelo número de entradas no braço fechado, Figura 2A) e um maior comportamento de avaliação de risco (evidenciado pelo tempo de permanência no quadrado central, Figura 2B).

A avaliação dos níveis de ansiedade utilizando os braços abertos no LCE foi validada em ratos por Pellow et al., (1985). Os resultados dessa pesquisa mostraram o aumento do comportamento exploratório nos braços abertos em animais inoculados com drogas ansiolíticas e a diminuição deste comportamento em ratos inoculados com drogas ansiogênicas, permitindo assim relacionar estas medidas com comportamentos que denotam ansiedade.

Segundo Ming-Yan Hei et al. (2014) o insulto hipoxico-isquêmico neonatal tem a capacidade de produzir efeito ansiolítico em ratos Sprague-Dawley quando testados no LCE em P21 e P28. Nos nossos resultados, a percentagem do número de entradas nos braços abertos (Figura 1B) sugere que existe uma tendência dos grupos submetidos à anóxia neonatal (AC e AH) a apresentar níveis menores de ansiedade quando comparados aos grupos restantes (CC e CH). Porém, não foram observadas diferenças significantes na avaliação desse tipo de efeito.

Galeano et al. (2011), do mesmo modo que o nosso trabalho, não observaram diferenças nos comportamentos relacionados à ansiedade em ratos de 3 meses de idade submetidos a asfixia perinatal. Contrariamente, Hoeger et al. (2000), usando o mesmo modelo de asfixia perinatal, observaram que ratos com longa exposição a hipóxia (15 e 20 min de asfixia) apresentaram comportamento ansiolítico no labirinto em cruz elevado.

Assim, é possível que os níveis de ansiedade estejam sendo prejudicados diretamente pela anóxia neonatal, mas, também existe a possibilidade que este sutil comportamento não seja facilmente observável no LCE, como já foi descrito em pesquisas anteriores (Cruz et al, 2012). É preciso complementar a avaliação deste comportamento utilizando talvez outro tipo de testes em conjunto que permitam realizar uma análise mais detalhada.

Por outro lado, os gráficos da Figura 1 também indicam ausência de prejuízos comportamentais decorrentes do protocolo terapêutico de hipotermia. O grupo submetido apenas à hipotermia (CH) não mostrou diferenças significantes em relação ao grupo controle (CC) na primeira e segunda sessões do LCE. Além disso, a ANOVA de duas vias não mostrou efeito significativo para hipotermia nas percentagens de tempo nem no número de entradas nos braços abertos. Esses resultados, como esperado, mostram que a hipotermia não produziu alterações nos níveis de ansiedade.

Adicionalmente, a Figura 1 permite observar que os escores de percentagem de entradas e percentagem de tempo nos braços abertos ficam entre 10 e 35% indicando que de fato os animais evitam os braços abertos do labirinto preferindo permanecer nos braços fechados. Lister et al. (1990) tem demonstrado que os roedores apresentam aversão natural aos espaços abertos, preferindo ambientes fechados. Os nossos resultados parecem corroborar este comportamento em todos os grupos. Assim, esses resultados levam à conclusão de que a anóxia neonatal e o tratamento com hipotermia não interferem neste comportamento.

Outro aspecto importante que os gráficos da Figura 1 permitem discutir é a redução significativa na percentagem de tempo e de entradas no braço fechado da primeira para a segunda sessão. É razoável hipotetizar que os animais adquirem informações sobre as características do ambiente durante a primeira sessão e se utilizem dessas informações na segunda sessão. Tendo identificado os braços abertos como ambiente aversivo, passam a evita-los adicionalmente durante a segunda sessão.

No conjunto, esses resultados indicam que roedores apresentam aversão natural a ambientes abertos e elevados, evitando-os. Esse comportamento de esquiva se torna mais evidente na segunda sessão, pois o animal adquiriu informações sobre a aversividade desse ambiente, evitando-o adicionalmente na segunda sessão. Isto foi descrito anteriormente por File, em 1993. No presente estudo, este comportamento foi observado em todos os grupos, permitindo concluir que a anóxia neonatal e a hipotermia não geram prejuízos comportamentais relacionados à aprendizagem sobre locais aversivos.

O número de entradas nos braços fechados é uma medida validada por Rodgers & Jhonson (1995) para avaliar a atividade locomotora de ratos no LCE. Esta variável (Figura 2A) mostrou um aumento significativo nos animais expostos a hipotermia (AH e CH) em relação aos animais não expostos a hipotermia (AC e CC), particularmente na primeira sessão de testes. Na segunda sessão de testes observa-se tendência similar que se aproxima da significância estatística ($p=0.06$). Esta é a primeira vez, que tenhamos conhecimento, de que a hipotermia neonatal aumente a atividade locomotora na vida adulta.

A avaliação de risco pode ser descrita como a obtenção de informações sobre uma situação nova e um meio para determinar se uma ameaça real está presente. Isto parece representar um equilíbrio entre dois objetivos opostos; Investigar o estímulo de ameaça e simultaneamente permanecer tão protegido quanto possível a partir dele (Augustsson et al., 2005). Se os riscos são detectados, o indivíduo muda para uma estratégia de defesa mais específica. Caso contrário, o animal

retorna gradualmente a comportamentos normais, não defensivos (Blanchard & Blanchard, 1989).

Interessantemente, os resultados de tempo de permanência no quadrado central (Figura 2B) revelaram que os grupos expostos à hipotermia (AH e CH) exibiram escores significativamente maiores que os animais não expostos à hipotermia (AC e CC) indicando que a hipotermia per se leva a um aumento num comportamento considerado de avaliação de risco. Isto permite deduzir que os ratos tratados com hipotermia são, na média, mais cautelosos ou indecisos em comparação com os grupos não tratados. Este é o primeiro relato, de que temos conhecimento, de que a hipotermia neonatal induz a um aumento desse tipo de comportamento na vida adulta.

Em ratos, as manipulações sistêmicas da atividade do sistema dopaminérgico mesocorticolímbico (DA) ou a inativação do córtex pré-frontal (PFC) medial obstruem a tomada de decisão sobre riscos e recompensas (St Onge & Floresco, 2009). A DA modula funções cognitivas múltiplas mediadas por diferentes regiões do PFC, tais como flexibilidade comportamental, memória operacional e processos atencionais (Williams e Goldman-Rakic, 1995, Chudasama e Robbins, 2004; Floresco et al., 2006). Recentemente St Onge et al. (2011), demonstrou que a DA no PFC faz uma contribuição crítica e complexa na avaliação de risco/recompensa em ratos Wistar. Assim, é possível sugerir que a hipotermia pode estar causando alterações no DA na região do córtex pré frontal o que levaria a escores maiores de tempo no quadrado central no LCE.

Adicionalmente, Takada et al. (2016) mostraram que os ratos submetidos à anóxia neonatal exibem menores percentagens de tempo no quadrado central em comparação com o grupo controle. Isto foi observado em ratos com 90 dias de idade o que sugere que o efeito comportamental da anóxia pode variar em relação à idade dos indivíduos.

VI. 2 Labirinto aquático de Morris

Os resultados do presente conjunto de experimentos no Labirinto aquático de Morris mostram, no teste de memória de referência espacial, que os animais anóxicos exibem prejuízos comportamentais na capacidade de aprendizagem e memória de logo prazo decorrentes do insulto anóxico, sendo a hipotermia capaz de prevenir estes danos (Figura 3B). Por outro lado, os resultados do Probe teste mostram que, independentemente da anóxia anóxico ou hipotermia, todos os animais conseguem aprender a localização da plataforma. Porém, existe uma menor flexibilidade comportamental nos animais expostos ao insulto anóxico, efeito que não foi revertido pelo tratamento com hipotermia. Em relação ao teste de memória operacional espacial, os resultados da Figura 9B sugerem que a hipotermia é capaz de melhorar a memória espacial operacional. Além disso, os resultados da percentagem de tempo no contador crítico do dia anterior (Figura 11A) indicam que existe novamente uma menor flexibilidade comportamental nos ratos submetidos à anóxia neonatal, efeito que sim foi revertido pelo tratamento com hipotermia. Finalmente os resultados obtidos no teste com a plataforma visível mostraram que tanto a anóxia quanto a hipotermia não geram alterações sensoriais e/ou motoras mensuráveis nos animais testados. Isto confirma que os resultados obtidos no labirinto aquático de Morris correspondem inequivocamente a aspectos comportamentais dos indivíduos testados, sem a influência de danos motores ou sensoriais. .

No teste de memória de referência espacial, é esperado que nas primeiras sessões todos os animais exibam medidas similares, já que nenhum deles possui a informação necessária para se orientar com sucesso na piscina. Naturalmente, ao longo das sessões de experimento os animais vão adquirindo as informações da localização da plataforma e melhoram gradualmente seu desempenho. No entanto, quando existe algum prejuízo das áreas envolvidas na aprendizagem e orientação espacial, surgem escores de latência para encontrar a plataforma na piscina maiores, assim como trajetos também maiores.

Os resultados mostraram a existência de um prejuízo comportamental nos animais submetidos à anóxia neonatal quando comparados aos grupos controle (CC), anóxia com hipotermia (AH) e controle com hipotermia (CH), exibindo uma tendência menor na taxa de aprendizagem e retenção da informação sobre a localização da plataforma (Figura 3B). Estudos anteriores têm mostrado que a anóxia neonatal produz déficits na aquisição da memória e aprendizado espacial (Buwalda et al., 1995; Dell' Anna et al., 1991), havendo também diferenças nos testes de memória operacional (Takada et al., 2015). Porém, é importante destacar que mesmo que o prejuízo ocorra, os animais adquirem a tarefa por treinamento repetitivo, sendo capazes de se orientar no ambiente.

Xavier et al. (1999) observaram um marcado prejuízo de desempenho no labirinto aquático de Morris, em animais submetidos a lesão seletiva das células do giro denteado. Mesmo assim, os animais exibiram diferentes graus de melhora ao longo do treino. Os autores interpretaram que essa melhora estaria relacionada à utilização de outras estratégias de orientação espacial por parte dos animais lesados, provavelmente envolvendo guiamento por pista preponderante ou orientação egocêntrica, mas não mapeamento cognitivo, o que possibilitaria melhorar o desempenho ao longo do treinamento repetitivo. O uso de outras estratégias de orientação espacial quando é possível se guiar por pistas distais ou egocentricamente torna a busca menos eficiente e isso se reflete em escores piores dos que os obtidos por animais saudáveis. Adicionalmente, vários estudos indicam que os animais lesados possuem certa capacidade de melhora (e.g., Shohan et al., 2003; Sallai, 2005; Tanhoffer, 2006).

Os animais anóxicos submetidos ao teste de memória de referência exibem maior trajeto percorrido em relação aos demais grupos (Figura 3B), particularmente nas primeiras sessões (ver dados do grupo AC), sendo essa diferença significativa em relação aos demais grupos. Mais importante, os animais do grupo anóxia expostos também à hipotermia (AH) apresentam medidas similares aos animais controle (CC) ao longo das sessões, o que apoia a hipótese inicial que a hipotermia é capaz de prevenir os danos causados pelo insulto anóxico, além de indicar que o

tratamento experimental não produz danos na capacidade de aprendizagem e memória de longo prazo. De fato, os resultados também indicam que todos os grupos testados têm a capacidade de aprender a tarefa e se desenvolver normalmente depois das primeiras 3 sessões do teste. Isto é destacável porque reforça a ideia de que os animais anóxicos não perdem a capacidade de melhorar na tarefa, como foi descrito em pesquisas anteriores. Por exemplo, Takada et al. em 2015 obteve resultados similares para latência e trajeto percorrido no teste de memória de referência espacial nos grupos submetidos à anóxia neonatal e controle.

Por outro lado, os dados da velocidade média de deslocamento na piscina mostraram que os grupos tratados com hipotermia (AH e CH) têm menores escores em relação aos demais grupos, revelando um claro efeito da hipotermia ao longo das sessões.

Assim, os resultados observados abrem duas grandes possibilidades enquanto a natureza da possível explicação: (1) existência de prejuízos psicomotores ou (2) alterações comportamentais geradas pelo tratamento com hipotermia. Porém os resultados mostrados no testes envolvendo a plataforma visível (Figuras 12 e 13) parecem desmentir a primeira hipótese. Portanto, o padrão observado na figura 4 poderia estar relacionado exclusivamente a fenômenos comportamentais.

Segundo Ji Zhang (2013), a velocidade de nado está relacionada à motivação dos indivíduos durante o desempenho da tarefa. Deste modo, animais que apresentam baixas velocidades de natação são relacionadas com uma menor motivação para se desempenhar na tarefa e os que exibem maiores escores são relacionados com uma maior motivação ou hiperatividade. Assim, as velocidades de natação observadas nos animais tratados com hipotermia sugerem que a hipotermia poderia estar causando uma diminuição da motivação.

Como esperado, nos resultados do Probe Teste é possível observar que todos os grupos apresentam maiores percentagens de entradas, tempo e distância percorrida no contador e quadrante crítico que continha a plataforma, particularmente durante o primeiro minuto do teste (Figuras 5-8). Uma vez que a percentagem de entradas, tempo e distância percorrida no contador e quadrante crítico supera o 25%, que corresponde ao nível de acaso, deve-se concluir que efetivamente os animais estão direcionando sua busca para este setor da piscina. Esses resultados indicam que independentemente do insulto anóxico ou do tratamento com hipotermia, todos os animais conseguiram aprender a localização da plataforma na tarefa de memória de referência, buscando-a com maior intensidade durante no primeiro minuto do Probe Teste.

Adicionalmente, é possível observar que durante o segundo bloco de tempo existem diferenças entre os grupos testados (Figuras 5-8). Deste modo, os grupos submetidos ao insulto anóxico (AC e AH) mostraram maiores percentagens de entradas, tempo de permanência e distância percorrida tanto no contador quanto no quadrante crítico. Este resultado indica que existe uma menor plasticidade comportamental nos animais expostos ao insulto anóxico. No caso dos grupos não submetidos a anóxia neonatal (CC e CH) as percentagens de entradas, tempo de permanência e trajeto percorrido tanto no contador e no quadrante crítico diminuíram no segundo bloco de tempo como esperado em animais saudáveis.

Finalmente, no último bloco de tempo do Probe Teste, os resultados de todos os grupos são similares, indicando a ocorrência de extinção da busca pela plataforma no local inicialmente treinado.

Pode-se concluir então que a taxa de extinção dos animais expostos a anóxia tornou-se mais lenta em relação aos animais não expostos a anóxia. É importante destacar também que foram observadas diferenças entre o grupo AH e os grupos CC e CH indicando que o protocolo de hipotermia não foi capaz de reverter os prejuízos gerados pela anóxia neste caso.

Em estudo recente Takada et al. (2015) descreveram a existência de diferenças entre ratos controle e os submetidos à anóxia neonatal quando testados na tarefa de memória de referência espacial. Destaca-se nessa pesquisa que os ratos anóxicos não foram capazes de exibir o padrão típico de diminuição de escores na latência, o que sugere que os ratos anóxicos não conseguem reter a informação espacial durante o período necessário para desempenhar a tarefa. Baseados nos resultados obtidos nessa pesquisa, realizamos o teste de memória operacional incluindo três diferentes intervalos de tempo (ITI 0, 10 e 30 minutos) o que permitiu avaliar se de fato a retenção da informação pode estar influenciando no déficit na memória operacional.

Segundo Olton et al. (1978), a região nervosa responsável pelo arquivamento temporário da informação espacial seria a formação hipocampal. No teste de memória de referência espacial o contexto temporal perde sua relevância ao longo das sessões, pois a plataforma permanece sempre no mesmo local ao longo dos vários dias de treino e, portanto, a informação de um dia será relevante para o próximo dia. Em contrapartida, o contexto temporal se torna particularmente relevante quando a informação sobre a localização da plataforma é crítica apenas para as tentativas daquele dia, deixando de ser útil para as tentativas dos dias seguintes.

Curiosamente, os resultados obtidos da latência e no comprimento do trajeto (Figura 9, A e B respectivamente) não revelaram as mesmas diferenças e, ao contrário do esperado, foi observado um claro padrão de melhora ao longo das três tentativas por dia nos animais, independentemente do grupo aos quais pertenciam. Porém, foi claro observar que existem diferenças entre os grupos tratados com hipotermia (AH e CH) e aqueles que não (AC e CC). A ANOVA de duas vias revelou que existe efeito de hipotermia (ver Figura 9B).

Entretanto, os resultados sugerem que a hipotermia poderia melhorar a memória espacial operacional já que o desempenho dos indivíduos tratados foi melhor, nas tentativas 2 e 3, em comparação aos controle (Figura 9B). Atualmente, na

literatura existe a ausência de evidências do efeito benéfico da hipotermia na memória operacional. Contudo, isto poderia ser uma das primeiras evidências das propriedades da hipotermia na memória operacional em ratos Wistar.

Em relação à velocidade de natação no teste de memória operacional espacial (Figura 10), os resultados mostraram novamente uma tendência dos grupos tratados com hipotermia exibirem velocidades menores em relação aos demais grupos. Isto é corroborado na análise estatística onde é possível observar um claro efeito de hipotermia ($p < 0.01$). Esta diferença se manteve também na tarefa de memória de referência espacial, o que sugere que os ratos submetidos à hipotermia possivelmente possuíam uma menor motivação no cumprimento das tarefas. É importante destacar que a capacidade de se deslocar rapidamente na piscina possibilita descartar que os ratos apresentem prejuízos motores que possam influir na medição das demais variáveis. Do mesmo modo, o fato que os ratos dos grupos submetidos à anóxia neonatal (AC e AH) apresentem medidas similares ao grupo controle (CC) mostra que o insulto não prejudica o desempenho motor deles.

As variáveis percentagem de tempo no contador e no quadrante crítico do dia anterior (Figura 11) permitiram avaliar capacidade de retenção, por 24 horas, da informação espacial sobre a localização da plataforma, e também a flexibilidade comportamental dos animais para se adequar a novas contingências ambientais, envolvendo buscar pela plataforma numa nova localização. Neste caso, os resultados mostram que todos os animais conseguiram desenvolver a tarefa independentemente do intervalo de tempo entre as tentativas e do grupo experimental. Porém, existe uma taxa de sucesso distinta entre eles. É possível observar mais claramente isto na Figura 11A, no ITI 30, onde o grupo AC apresenta uma maior percentagem de tempo no contador crítico do dia anterior na segunda tentativa, em comparação com os grupos restantes. Note-se também que além da maior percentagem de tempo na tentativa dois do ITI 30, o grupo AC é quem menos diminuiu os valores desta variável entre a primeira e segunda tentativa. Isto

parece indicar que existe uma menor flexibilidade comportamental nos ratos submetidos unicamente ao insulto anóxico, sem tratamento por hipotermia.

É importante ressaltar que resultados similares já foram anteriormente observados na pesquisa feita por Takada et al. (2016) onde foram observadas diferenças na percentagem de tempo no contador e quadrante crítico do dia anterior quando comparados o grupo submetido a anóxia neonatal e o grupo controle, em ratos Wistar de 90 dias de idade.

Outro aspecto importante para destacar são os escores observados no grupo AH. A Figura 11A mostra um desenvolvimento da tarefa similar ao observado nos indivíduos do grupo controle (CC). Mais interessante ainda, esses resultados se mantêm similares na tarefa com ITI 30, o que parece demonstrar que os ratos tratados com hipotermia depois da anóxia neonatal não experimentam o prejuízo de flexibilidade comportamental mostrada pelos ratos do grupo AC. Do mesmo modo, os indivíduos do grupo CH apresentam comportamentos similares ao grupo CC o que também apoia a interpretação de que a hipotermia não gera efeitos comportamentais por si mesma. A ANOVA de duas vias robustece este conceito mostrando nenhuma diferença significativa onde esteja envolvido o fator HIPOTERMIA.

No caso da percentagem de tempo no quadrante crítico do dia anterior (Figura 11B), o padrão do desenvolvimento da tarefa é menos marcado, dificultando a análise dos resultados. Porém, é interessante ressaltar o comportamento observado pelos grupos tratados com hipotermia (AH e CH) na segunda tentativa do ITI 0. Espera-se que ao longo das tentativas os indivíduos diminuam o tempo de procura da plataforma no mesmo quadrante crítico do dia anterior. Esse comportamento é observado facilmente nos grupos CC e AC mas, ao contrário do esperado, os grupos tratados com hipotermia mostram um aumento desta percentagem de tempo, sugerindo que, na segunda sessão, a busca da plataforma é realizada preferentemente nas zonas adjacentes ao contador crítico do dia anterior.

No caso do teste na plataforma visível, avaliou-se em que extensão os animais submetidos à anóxia neonatal ou tratados com o protocolo de hipotermia experimental exibiam prejuízos decorrentes de funções não cognitivas, por exemplo, deficiências sensoriais e/ou motoras. Os resultados da Figura 12 mostram que parece haver um período inicial de reconhecimento da nova tarefa na primeira sessão. Os resultados mostram que a principal diferença ocorre na primeira tentativa da primeira sessão, em que a latência e o trajeto percorrido pelo grupo AC foram significativamente maiores em relação aos grupos restantes. Assim, excluído essa tentativa, os resultados mostram que todos os grupos apresentaram resultados similares na tarefa de plataforma visível do labirinto aquático de Morris, indicando que tanto a anóxia quanto a hipotermia não geram alterações sensoriais e/ou motoras mensuráveis nos animais testados. A diferença exibida pelo grupo AC descrita acima pode estar relacionada mais com aspectos cognitivos, de como os animais devem lidar com os requisitos da nova tarefa.

Em relação à velocidade média de deslocamento na piscina, como esperado, não foram observadas diferenças significantes ao longo das três tentativas da tarefa. Isto novamente permite confirmar que os resultados obtidos no labirinto aquático de Morris correspondem inequivocamente a aspectos comportamentais dos indivíduos testados, sem a influência de possíveis danos motores ou sensoriais.

VI. 3 Condicionamento de medo ao contexto e ao som

Os resultados do presente conjunto de experimentos de condicionamento de medo ao contexto (Figura 14A) mostram que, todos os indivíduos, independentemente do protocolo experimental, foram capazes de relacionar o ambiente com o choque elétrico. Adicionalmente, os animais submetidos unicamente a anóxia neonatal mostram uma menor taxa de extinção de memórias aversivas, efeito que foi revertido pelo tratamento com hipotermia. Por outro lado, os resultados do condicionamento de medo ao som (Figura 14B) mostram que a hipotermia e a anóxia geram alterações comportamentais na resposta de freezing em ambientes

novos e/ou que esses tratamentos levam a uma generalização da memória sobre a experiência aversiva. Além disso, os resultados mostram uma lentificação da taxa de extinção de memórias aversivas nos animais que foram submetidos unicamente à anóxia neonatal.

O condicionamento de medo ao som e ao contexto é comumente usado em estudos que envolvem aprendizado associativo aversivo. Esta tarefa permite avaliar processos associativos envolvendo representações sensoriais de estímulos inicialmente neutros (US) com estímulos naturalmente aversivos (CS) (Maren et al., 2000). Baseado nas robustas mudanças do comportamento em resposta ao CS, é comumente aceito que durante o condicionamento o CS associa-se com algo (Rescorla et al., 1975; Myers et al., 2002) mas, a natureza exata dessa associação permanece ainda controversa. É predominantemente pensado que uma associação ocorre entre as representações de CS e US, as quais são definidas pelo seu conteúdo sensorial e o isomorfismo com estímulos ambientais (Delamater et al., 2004; Debiec et al., 2010; Rescorla et al., 1978; Gallistel, 1990).

Em alguns modelos, o termo associação descreve uma ligação que une o CS com a representação do US no cérebro (Bouton 1993). Assim, um CS ativa a representação do CS, que, por meio de associações excitatórias, aciona a representação do US. Por sua vez, a representação do US suscita uma resposta condicionada (CR). Em vez de ligações, o modelo de convergência considera as associações como os locais de sobreposição entre as representações do CS e US dentro da amígdala basolateral (Maren et al., 2004).

Essas teorias tradicionais têm dominado o campo, apesar da falta de evidência direta da codificação das representações do US. A noção de uma representação do US é adicionalmente complicada, particularmente no condicionamento aversivo pelo fato de que: (1) o condicionamento geralmente envolve apenas um breve US, o que pode não ser suficiente para formar uma representação duradoura do US; (2) A CR é o comportamento de congelamento, mesmo que a ativação direta de uma representação do US possa desencadear um CR que seja semelhante a uma

resposta incondicionada (UR); (3) O medo também pode ser adquirido na ausência de um US, através de um condicionamento de segunda ordem (Falls 1998), instrução ou observação (Olsson & Phelps 2007; LeDoux 2000).

Já que um aspecto do US pode ser uma condição para o aprendizado sem ser ele mesmo envolvido nesse aprendizado (Rescorla 1975), essas observações sugerem fortemente que a formação de uma representação do US não é crítica para o condicionamento aversivo, deixando aberta a questão do que está sendo realmente associado com o CS.

Atualmente, diversas evidências mostram que o hipocampo está envolvido diretamente no condicionamento aversivo ao contexto, mas o papel que desempenha no condicionamento aversivo ao som parece ser secundário (Kim e Fanselow, 1992; Maren et al., 1998; Anagnostaras et al., 1999). Assim, o hipocampo é responsável pela codificação e manutenção temporária da representação configuracional do contexto associado ao estímulo aversivo (Anagnostaras et al., 2001).

Os dados aqui apresentados mostram que, no caso do condicionamento aversivo ao contexto (Figura 14A), todos os grupos apresentaram elevados níveis de freezing nos primeiros minutos da tarefa. Isto sugere que todos os indivíduos, independentemente do protocolo experimental, foram capazes de relacionar o ambiente com o choque elétrico. É interessante destacar que, nos primeiros 3 minutos de iniciada a tarefa, foram observadas diferenças significantes entre o grupo AC e os grupos AH e CC. Esta parece ser uma clara evidencia que o tratamento experimental com hipotermia reverteu o prejuízo inicial produzido pela anóxia, no nível comportamental.

Existe uma tendência acentuada a extinguir as lembranças aversivas no caso dos grupos CC e AH e, por contrapartida, uma tendência a consolidar as lembranças aversivas no caso do grupo AC. Isto é interessante já que mostra grandes diferenças no processo de evocação e extinção de lembranças aversivas em ratos

anóxicos. Parece razoável inferir que, baseados na evidência mostrada, a anóxia gera problemas nesta condição e poderia se relacionar com danos produzidos no hipocampo (já que este fenômeno só foi observado em lembranças aversivas multimodais). É preciso obter maiores detalhes mediante a utilização de provas celulares e moleculares a fim de confirmar o sugerido. Cabe destacar que, a ANOVA não mostrou diferenças significantes entre o grupo CH e CC.

Por outro lado, a partir do sexto minuto de iniciada a tarefa, é possível observar diferenças significantes entre os grupos AC-CH e AH-CC (Figura 14A). Estes últimos grupos apresentam uma clara diminuição do tempo em freezing, padrão que continua diminuindo ao longo dos blocos de tempo subsequentes. Porém, o grupo AC apresenta níveis maiores de freezing, sendo a diminuição destes muito menor em comparação com os grupos antes mencionados. No caso do grupo CH, a taxa de diminuição de tempo se mantém igual ao grupo AC até o oitavo minuto. Isto parece sugerir que a hipotermia per se mesma tem a capacidade de gerar prejuízos menores na taxa de extinção de memórias aversivas. Depois do oitavo minuto, o tempo em freezing dos indivíduos do grupo CH mostraram valores muito similares aos grupos AH e CC sugerindo que o efeito da hipotermia não impede a aquisição de novas informações do mesmo ambiente e a extinção de memórias aversivas.

Assim, os resultados mostrados na Figura 14A parecem apoiar a ideia de que a anóxia neonatal é capaz de produzir prejuízos comportamentais na taxa de extinção de memórias aversivas. Isto pode ser devido a dificuldade do grupo AC para adquirir novas informações sobre um ambiente antes visto. É importante ressaltar que os indivíduos deste grupo apresentam sim uma diminuição do tempo de freezing o que demonstra de fato que eles ainda têm a capacidade de extinguir memórias aversivas mas, como foi reportado anteriormente, este comportamento parece se desenvolver limitadamente produto do insulto anóxico.

O desempenho dos animais na tarefa de condicionamento aversivo ao som (Figura 14B) mostra, como esperado, níveis relativamente baixos de resposta de freezing nos 2 minutos que precedem a apresentação do CS. Observa-se também que o

tempo em *freezing* dos grupos AC, AH e CH apresentaram um claro aumento destes valores no segundo minuto do teste quando comparados ao grupo controle. Isto parece indicar que a hipotermia e a anóxia geram alterações comportamentais na resposta de *freezing* em ambientes novos e/ou que esses tratamentos levam a uma generalização da memória sobre a experiência aversiva na caixa de condicionamento para o novo ambiente. Mais estudos seriam necessários para esclarecer a origem dessa resposta.

Após a apresentação do estímulo auditivo condicionado (Figura 14B, a partir do bloco 3), foi observado um acentuado aumento do tempo em *freezing* em todos os grupos. Como era esperado, a apresentação do som previamente pareado com o choque nas patas levou ao aparecimento da característica resposta de *freezing* em todos os indivíduos. Por outro lado, é interessante destacar que existe uma marcada tendência de manter o estado de *freezing* no grupo AC ao longo dos blocos de tempo. Em contraste, o grupo CC mostrou uma taxa maior de extinção do medo condicionado ao som. Esta lentificação da taxa de extinção do grupo AC foi observada também na tarefa envolvendo o condicionamento aversivo ao contexto, permitindo inferir que as alterações comportamentais tem sua origem em mudanças nervosas que não se restringem a poucas estruturas nervosas. Isto é, sabe-se que o condicionamento de medo ao contexto, mas não o condicionamento de medo ao som, é sensível a função hipocampal (Akagi et al., 2015; Onishi & Xavier, 2010) , Assim, no conjunto, esses resultados sugerem que a anóxia e/ou tratamento por hipotermia, interfere no funcionamento de regiões nervosas que não se restringem a função hipocampal.

Do mesmo modo, o grupo CH também apresentou uma taxa de extinção de memórias aversivas menor em comparação com o grupo CC e AH. Isto novamente evidencia que a hipotermia per se gera alterações no comportamento relacionadas à extinção de memórias.

Diferentes teorias consideram vários processos como o mecanismo subjacente à extinção. A habituação é um processo de aprendizagem não associativo em que a

apresentação repetida de um CS reduz a ativação da representação do CS e, conseqüentemente, da CR (McSweeney & Swindell, 2002). Outros processos envolvem o esquecimento, uma degradação da ligação CS-US resultando em uma CR diminuída (Rescorla & Wagner, 1972), ou na aprendizagem de novas associações.

Em suma, a anóxia neonatal não parece ter afetado a capacidade natural dos animais de associar o ambiente com experiências negativas (choque elétrico) o que sugere que o insulto anóxico não influencia na aprendizagem das características contextuais em que o condicionamento ocorre. Esta afirmação também é válida para o tratamento experimental com hipotermia já que os resultados mostraram um padrão similar. Porém, parece existir

VII. Considerações finais

Os resultados do presente estudo mostram que a anóxia neonatal é capaz de alterar o comportamento de animais em idade adulta gerando prejuízos na memória de longo prazo, flexibilidade comportamental e na taxa de extinção de memórias aversivas. Além disso, foi comprovado que o tratamento com hipotermia causa a reversão do prejuízo na capacidade de aprendizagem e navegação espacial (teste de memória de longo prazo) observada em ratos submetidos ao insulto anóxico só, mostrando-se como uma forte alternativa terapêutica. Adicionalmente, foi comprovado que o tratamento não gera prejuízos motores nem sensoriais e conseguiu melhorar o desempenho dos indivíduos na tarefa de memória operacional. Porém, os nossos resultados sugerem que a hipotermia parece também influir na capacidade dos indivíduos na avaliação de risco, motivação e na taxa de extinção de memórias aversivas destacando a nossa pesquisa como uma das primeiras em advertir estes efeitos.

VIII. Referências

- Akagi Jordão EM, Onishi BKA, Xavier GF (2015) Pre-Training Reversible Inactivation of the Basal Amygdala (BA) Disrupts Contextual, but Not Auditory, Fear Conditioning, in Rats. *PLOS ONE* 10(4): e0125489. doi: 10.1371/journal.pone.0125489
- Anagnostaras, S.G., Maren, S., Fanselow M.S. (1999) Temporally graded retrograde amnesia of contextual fear after hippocampal damage in rats: within-subjects examination. *The journal of Neuroscience*. 19(3), 1106-14 (1999).
- Andrade, T. G. C. S., & Graeff, F. G. (2001). Effect of electrolytic and neurotoxic lesions of the median raphe nucleus on anxiety and stress. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 70(1), 1-14. doi:10.1016/S0091-3057(01)00512-3
- Anglade F, Bizot JC, Dodd RH, Baudoin C, Chapouthier G. (1994). Opposite effects of cholinergic agents and benzodiazepine receptor ligands in a passive avoidance task in rats. *Neurosci Lett*. 182:247-50.
- Augustsson, H. Dahlborn, K. Meyerson, B.J (2005). Exploration and risk assessment in female wild house mice (*Mus musculus musculus*) and two laboratory strains. *Physiology & Behavior* 84 (2005) 265–277.
- Blanchard RJ, Blanchard DC. (1989). Antipredator defensive behaviors in a visible burrow system. *J Comp Psychol*; 103(1):70– 82.
- Bouton, M. E., & Bolles, R. C. (1980). Conditioned fear assessed by freezing and by the suppression of three different baselines. *Animal Learning & Behavior*, 8(3), 429-434. doi:10.3758/BF03199629
- Bouton M.E. (1993). Context, time, and memory retrieval in the interference paradigms of Pavlovian learning. *Psychol Bull*. 1993; 114:80–99. [PubMed: 8346330]
- Bristow LJ, Cook GP, Gay JC, Kulagowski JJ, Landon L, Murray F et al (1996). The behavioural and neurochemical profile of the putative dopamine D3 receptor agonist, (+)-PD128907, in the rat. *Neuropharmacology* 35: 285–294.
- Browman KE, Curzon P, Pan JB, Molesky AL, Komater VA, Decker MW et al (2005). A-412997, a selective dopamine D4 agonist, improves cognitive performance in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 82: 148–155.

- Buwalda, B., Nyakas, C., Vosselman, H. J., & Luiten, P. G. M. (1995). Effects of early postnatal anoxia on adult learning and emotion in rats. *Behavioural Brain Research*, 67(1), 85-90. doi:10.1016/0166-4328(94)00108-R
- Crawley J, Goodwin F. K. (1980). Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacol Biochem Behav*. Aug;13(2):167-70.
- Chiu, G. S., Chatterjee, D., Darmody, P. T., Walsh, J. P., Meling, D. D., Johnson, R. W., & Freund, G. G. (2012). Hypoxia/Reoxygenation Impairs Memory Formation via Adenosine-Dependent Activation of Caspase 1. *The Journal of Neuroscience*, 32(40), 13945-13955. doi:10.1523/JNEUROSCI.0704-12.2012
- Chudasama Y, Robbins TW (2004) Dopaminergic modulation of visual attention and working memory in the rodent prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology* 29:1628 –1636.
- Costello, A. M., & Manandhar, D. S. (1994). Perinatal asphyxia in less developed countries. *Archives of Disease in Childhood Fetal and Neonatal edition*, 71(1), F1-F3.
- Cruz, A. P. Landeira-Fernandez J. (2012). Modelos animais de ansiedade e o estudo experimental de drogas serotoninérgicas. *Seção III Métodos em psicopatologia*, 13, 192-217.
- Debiec J, et al. (2010). The amygdala encodes specific sensory features of an aversive reinforcer. *Nat Neurosci*. 2010; 13:536–537. [PubMed: 20348916]
- Delamater AR. (2004). Experimental extinction in Pavlovian conditioning: behavioural and neuroscience perspectives. *Q J Exp Psychol B*. 2004; 57:97–132. [PubMed: 15204112]
- Dell'Anna, M. E., Calzolari, S., Molinari, M., Iuvone, L., & Calimici, R. (1991). Neonatal anoxia induces transitory hyperactivity, permanent spatial memory deficits and CA1 cell density reduction in developing rats. *Behavioural Brain Research*, 45(2), 125-134. doi:10.1016/S0166-4328(05)80078-6
- Dixon, C. E., Markgraf, C. G., Angileri, F., Pike, B. R., Wolfson, B., Newcomb, J. K., Hayes, R. L. (1998). Protective Effects of Moderate Hypothermia on Behavioral Deficits But Not Necrotic Cavitation Following Cortical Impact Injury in the Rat. *Journal of Neurotrauma*, 15(2), 95-103. doi:10.1089/neu.1998.15.95

- Dobbing, J. (1971). Undernutrition and the Developing Brain: the use of Animal Models to Elucidate the Human Problem. En G. B. A. S. M. D & J. J. V. D. W. T. B. M. D (Eds.), *Normal and Abnormal Development of Brain and Behaviour* (pp. 20-38). Springer Netherlands. Recuperado a partir de http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-010-2921-6_2
- Dong, Z., Bai, Y., Wu, X., Li, H., Gong, B., Howland, J. G., ... Wang, Y. T. (2013). Hippocampal long-term depression mediates spatial reversal learning in the Morris water maze. *Neuropharmacology*, 64, 65-73. doi:10.1016/j.neuropharm.2012.06.027
- Drage J. S., Kennedy C., Schwarz B. K. (1964) The Apgar score as an index of neonatal mortality. A report from the Collaborative Study of Cerebral Palsy, *Obstet Gynecol* 24, 222.
- Drury, P. P., Bennet, L., & Gunn, A. J. (2010). Mechanisms of hypothermic neuroprotection. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*, 15(5), 287-292. doi:10.1016/j.siny.2010.05.005
- Drury, P. P., Gunn, E. R., Bennet, L., & Gunn, A. J. (2014). Mechanisms of Hypothermic Neuroprotection. *Clinics in Perinatology*, 41(1), 161-175. doi:10.1016/j.clp.2013.10.005
- Falls, WA. (1998). Extinction: A Review of Theory and the Evidence Suggesting That Memories Are Not Erased with Nonreinforcement. In: O'Donohue, WT., editor. *Learning and Behavior Therapy*. Pearson Higher Education; 1998. p. 205-229.
- Fan, X., & van Bel, F. (2010). Pharmacological neuroprotection after perinatal asphyxia. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*, 23(S3), 17-19. doi:10.3109/14767058.2010.505052
- Fanselow, M. S. (2000). Contextual fear, gestalt memories, and the hippocampus. *Behavioural Brain Research*, 110(1-2), 73-81. doi:10.1016/S0166-4328(99)00186-2
- Fava D. A., Riccio D. C., (2014). Mild hypothermia can disrupt extinction learning but not original conditioning. *Physiology & Behavior* 125, 54-56. doi:10.1016/j.physbeh.2013.11.003.
- Floresco SB, Magyar O (2006) Mesocortical dopamine modulation of executive functions: beyond working memory. *Psychopharmacology* 188:567-585.
- File, S. E. (1993). The interplay of learning and anxiety in the elevated plus-maze

- Galeano, P., Blanco Calvo, E., Madureira de Oliveira, D., Cuenya, L., Kamenetzky, G. V., Mustaca, A. E., ... Capani, F. (2011). Long-lasting effects of perinatal asphyxia on exploration, memory and incentive downshift. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 29(6), 609-619. doi:10.1016/j.ijdevneu.2011.05.002
- Garthe, A., & Kempermann, G. (2013). An old test for new neurons: refining the Morris water maze to study the functional relevance of adult hippocampal neurogenesis. *Frontiers in Neuroscience*, 7. doi:10.3389/fnins.2013.00063
- Gluckman, P. D., Pinal, C. S., & Gunn, A. J. (2001). Hypoxic-ischemic brain injury in the newborn: pathophysiology and potential strategies for intervention. *Seminars in Neonatology*, 6(2), 109-120. doi:10.1053/siny.2001.0042
- Golanski, A. J., McKay, B. E., Persinger M. A., (2001). Postnatal anoxia from CO₂ for 1min produces sex-specific changes in contextual fear conditioning in rats, *Percept.Motor Skills* 93, 677-678.
- Granon S, Passetti F, Thomas KL, Dalley JW, Everitt BJ, Robbins TW (2000) Enhanced and impaired attentional performance after infusion of D1 dopaminergic receptor agents into rat prefrontal cortex. *J Neurosci* 20:1208-1215.
- Gray, J. A. (1982). On mapping anxiety. *Behavioral and Brain Sciences*, 5, pp 506-534. doi:10.1017/S0140525X00013297.
- Gunn, A. J. (2000). Cerebral hypothermia for prevention of brain injury following perinatal asphyxia. *Current Opinion in Pediatrics*, 12(2), 111-115.
- Gunn, A. J., & Thoresen, M. (2006). Hypothermic Neuroprotection. *NeuroRX*, 3(2), 154-169. doi:10.1016/j.nurx.2006.01.007
- Hall CS. (1934). Emotional behavior in the rat: I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *J Comp Psychol.* 8:385-403
- Hallberg, B., Olson, L., Bartocci, M., Edqvist, I., & Blennow, M. (2009). Passive induction of hypothermia during transport of asphyxiated infants: a risk of excessive cooling. *Acta Pædiatrica*, 98(6), 942-946. doi:10.1111/j.1651-2227.2009.01303.x
- Hill, C. A., & Fitch, R. H. (2012). Sex Differences in Mechanisms and Outcome of Neonatal Hypoxia-Ischemia in Rodent Models: Implications for Sex-Specific Neuroprotection in Clinical Neonatal Practice. *Neurology Research International*, 2012, e867531. doi:10.1155/2012/867531

- Hoeger H, Engelmann M, Bernert G, Seidl R, Bubna-Littitz H, Mosgoeller W, Lubec B, Lubec G (2000) Long term neurological and behavioral effects of graded perinatal asphyxia in the rat. *Life Sci* 66:947–962.
- Ito, P. (2010). Avaliação comportamental de ratos submetidos à anóxia neonatal. Universidade de São Paulo. Recuperado a partir de <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/47/47135/tde-30072010-112514/>
- 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, Supplement, S70-S79. doi:10.1016/S0301-2115(03)00175-1
- Ji Zhang, Ying Li,² Zhong-Guo Chen, Hui Dang, Jian-Hua Ding, Yi Fan & Gang Hu. (2013). Glia Protein Aquaporin-4 Regulates Aversive Motivation of Spatial Memory in Morris Water Maze. *CNS Neuroscience & Therapeutics* 19 (2013) 937–944.
- Johnston, M. V., Fatemi, A., Wilson, M. A., & Northington, F. (2011). Treatment advances in neonatal neuroprotection and neurointensive care. *The Lancet Neurology*, 10(1), 372-382. doi:10.1016/S1474-4422(11)70016-3
- Jun-Ming F., Xi W., Ke H., Yuan Y. Xue-Qun C., Ji-Zeng D. (2013). Upregulation of PVN CRHR1 by gestational intermittent hypoxia selectively triggers a male-specific anxiogenic effect in rat offspring, *Hormones and Behavior* 63 (1), 25-31. doi:10.1016/j.yhbeh.2012.11.005.
- Jun.-Ming, F., Xue-Qun C., Jin H., Ji-Zeng. D. (2009). Gestational hypoxia alone or combined with restraint sensitizes the hypothalamic–pituitary–adrenal axis and induces anxiety-like behavior in adult male rat offspring. *Neuroscience* 159 (4), 1363-1373. doi: 10.1016/j.neuroscience.2009.02.009
- Kim , J.J. & Fanselow, M. S. (1992) Modality-specific retrograde amnesia of fear. *Science* 256, 675-77.
- Kumar, V., Bhat, Z. A., & Kumar, D. (2013). Animal models of anxiety: A comprehensive review. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 68(2), 175-183. doi:10.1016/j.vascn.2013.05.003
- Laviola, G., Adriani, W., Rea, M., Aloe, L., & Alleva, E. (2004). Social withdrawal, neophobia, and stereotyped behavior in developing rats exposed to neonatal asphyxia. *Psychopharmacology*, 175(2), 196-205. doi:10.1007/s00213-004-1800-3

- LeDoux JE. Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci.* 2000; 23:155–184. [PubMed: 10845062].
- Leech RW, Alvord EC, Jr. (1977). Anoxic-Ischemic Encephalopathy in the Human Neonatal Period: The Significance of Brain Stem Involvement. *Arch Neurol*, 34(2):109-113. doi:10.1001/archneur.1977.00500140063013.
- Legido, A., Valencia, I., Katsetos, C. D., & Delivoria-Papadopoulos, M. (2007). [Neuroprotection in perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy. Effective treatment and future perspectives]. *Medicina*, 67(6 Pt 1), 543-555.
- Lin, E. P., Miles, L., Hughes, E. A., McCann, J. C., Vorhees, C. V., McAuliffe, J. J., & Loepke, A. W. (2014). A Combination of Mild Hypothermia and Sevoflurane Affords Long-Term Protection in a Modified Neonatal Mouse Model of Cerebral Hypoxia-Ischemia: Anesthesia & Analgesia, 1. doi:10.1213/ANE.0000000000000262
- Lister, R. (1990) Ethologically-based animal models of anxiety disorders. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 46, n. 3, p. 321-340.
- Loidl, C. F., Gavilanes, A. W. D., Van Dijk, E. H. J., Vreuls, W., Blokland, A., Vles, J. S. H., ... Blanco, C. E. (2000). Effects of hypothermia and gender on survival and behavior after perinatal asphyxia in rats. *Physiology & Behavior*, 68(3), 263-269. doi:10.1016/S0031-9384(99)00125-0
- Lutz, P. L., & Prentice, H. M. (2002). Sensing and Responding to Hypoxia, Molecular and Physiological Mechanisms. *Integrative and Comparative Biology*, 42(3), 463-468. doi:10.1093/icb/42.3.463
- Maren S. (1998). Overtraining does not mitigate contextual fear conditioning deficits produced by neurotoxic lesions of the basolateral amygdala. *The journal of Neuroscience*, 18 (8), 3088-3097.
- Maren, S., & Holt, W. (2000). The hippocampus and contextual memory retrieval in Pavlovian conditioning. *Behavioural Brain Research*, 110(1–2), 97-108. doi:10.1016/S0166-4328(99)00188-6
- Maren S, Quirk GJ. (2004). Neuronal signalling of fear memory. *Nature Reviews Neuroscience*. 2004;5:844–852.
- Markowska AL, Long JM, Johnson CT, Olton DS. (1993). Variable-interval probe test as a tool for repeated measurements of spatial memory in the water maze. *Behav Neurosci* 1993;107:627–632.

- Mazur JE (1988). Choice between small certain and large uncertain reinforcers. *Anim Learn Behav* 16: 199–205.
- Mazur JE (1997). Choice, delay, probability, and conditioned reinforcement. *Anim Learn Behav* 25: 131–147.
- McSweeney FK, Swindell S. Common processes may contribute to extinction and habituation. *J Gen Psychol.* 2002; 129:364–400. [PubMed: 12494990]
- Ming-Yan, Hei, Luo, Ya-Li, Zhang, Xiao-Chun, Liu, Hong, Gao, Ru, & Wu, Jing-Jiang. (2012). Hypoxic-ischemic injury decreases anxiety-like behavior in rats when associated with loss of tyrosine-hydroxylase immunoreactive neurons of the substantia nigra. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 45(1), 13-19. doi: 10.1590/s0100-879x2011007500161.
- Misanin J. R., Anderson M. J., Christianson J. P., Collins M. M., Goodhart M. G., Rushanan S. G., Hinderliter C. F. (2002). Low Body Temperature, Time Dilation, and Long-Trace Conditioned Flavor Aversion in Rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, 78 (1), 167-177. doi:10.1006/nlme.2001.4048.
- Miyoshi, E., Wietzikoski, E. C., Bortolanza, M., Boschen, S. L., Canteras, N. S., Izquierdo, I., & Da Cunha, C. (2012). Both the dorsal hippocampus and the dorsolateral striatum are needed for rat navigation in the Morris water maze. *Behavioural Brain Research*, 226(1), 171-178. doi:10.1016/j.bbr.2011.09.011
- Mobini S, Body S, Ho MY, Bradshaw CM, Szabadi E, Deakin JF et al (2002). Effects of lesions of the orbitofrontal cortex on sensitivity to delayed and probabilistic reinforcement. *Psychopharmacology* 160: 290–298.
- Mobini S, Chiang TJ, Ho MY, Bradshaw CM, Szabadi E (2000). Effects of central 5-hydroxytryptamine depletion on sensitivity to delayed and probabilistic reinforcement. *Psychopharmacology* 152: 390–397.
- Morris R. (1984). Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat, *Journal of Neuroscience Methods*, 11(1) 47-60, ISSN 0165-0270, [http://dx.doi.org/10.1016/0165-0270\(84\)90007-4](http://dx.doi.org/10.1016/0165-0270(84)90007-4).
- Mulligan J. C., Painter M. J., O'Donoghue P.A.(1980). Neonatal asphyxia. II. Neonatal mortality and long-term sequelae. *J Pediatr* 96:903.
- Myers KM, Davis M. (2002). Behavioral and neural analysis of extinction. *Neuron*. 2002; 36:567–584.

- Nakazawa, K., McHugh, T. J., Wilson, M. A., & Tonegawa, S. (2004). NMDA receptors, place cells and hippocampal spatial memory. *Nature Reviews Neuroscience*, 5(5), 361-372. doi:10.1038/nrn1385
- Onishi, B. K. A., & Xavier, G. F. (2010). Contextual, but not auditory, fear conditioning is disrupted by neurotoxic selective lesion of the basal nucleus of amygdala in rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, 93(2), 165-174. doi:10.1016/j.nlm.2009.09.007
- Olton, D. S. (1978). Mazes, maps and memory. *American Psychologist*, 34, 583-596.
- Olsson A, Phelps EA. Social learning of fear. *Nat Neurosci*. 2007; 10:1095–1102. [PubMed: 17726475].
- Pellow , S. Chopin, P. File, S. Briley, M. (1985). Validation of open" closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, 14 149-167.
- Perlman, J. M. (2006). Intervention strategies for neonatal hypoxic-ischemic cerebral injury. *Clinical Therapeutics*, 28(9), 1353-1365. doi:10.1016/j.clinthera.2006.09.005
- Rescorla, R.; Wagner, A. A theory of Pavlovian conditioning: variations in the effectiveness of reinforcement and nonreinforcement. In: Black, A.; Prokasy, W., editors. *Classical conditioning II: current research and theory*. Appleton-Century Crofts; 1972. p. 64-99.
- Rescorla RA, Heth CD. Reinstatement of fear to an extinguished conditioned stimulus. *J Exp Psychol Anim Behav Process*. 1975; 1:88–96.
- Rescorla RA, Cunningham CL. Within-compound flavor associations. *J Exp Psychol Anim Behav Process*. 1978; 4:267–275. [PubMed: 690565]
- Rodgers R.J, Jhonson J. T. (1995). Factor Analysis of Spatiotemporal and Ethological Measures in the Murine Plus-Maze Test of Anxiety. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, Vol. 52, No. 2, pp. 297-303.
- Rogalska, J., Caputa, M., Wentowska, K., & Nowakowska, A. (2004). Stress-induced behaviour in juvenile rats: effects of neonatal asphyxia, body temperature and chelation of iron. *Behavioural Brain Research*, 154(2), 321-329. doi:10.1016/j.bbr.2004.02.020
- Sabir, H., Scull-Brown, E., Liu, X., & Thoresen, M. (2012). Immediate Hypothermia Is Not Neuroprotective After Severe Hypoxia-Ischemia and Is Deleterious

- When Delayed by 12 Hours in Neonatal Rats. *Stroke*, 43(12), 3364-3370. doi:10.1161/STROKEAHA.112.674481
- Sallai, C. M. Amifostine minimiza a perda celular hipocampal e previne os efeitos amnésicos induzidos pela radiação ionizante neonatal em ratos. São Paulo, 2005. 109p. Tese (Doutorado). Instituto de biociências, departamento de fisiologia Universidade de São Paulo.
- Sanches, E. F., Arteni, N. S., Nicola, F., Boisserand, L., Willborn, S., & Netto, C. A. (2013). Early hypoxia-ischemia causes hemisphere and sex-dependent cognitive impairment and histological damage. *Neuroscience*, 237, 208-215. doi:10.1016/j.neuroscience.2013.01.066
- Saraceno, G. e., Ayala, M. v., Badorrey, M. s., Holubiec, M., Romero, J. i., Galeano, P., ... Capani, F. (2012). Effects of perinatal asphyxia on rat striatal cytoskeleton. *Synapse*, 66(1), 9-19. doi:10.1002/syn.20978
- Schultz W (2006). Behavioral theories and the neurophysiology of reward. *Annu Rev Psychol* 57: 87–115.
- Schultz W, Dickinson A (2000). Neuronal coding of prediction errors. *Annu Rev Neurosci* 23: 473–500.
- Semple, B. D., Blomgren, K., Gimlin, K., Ferriero, D. M., & Noble-Haeusslein, L. J. (2013). Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Progress in Neurobiology*, 106–107, 1-16. doi:10.1016/j.pneurobio.2013.04.001
- Shah AA, Sjovold T, Treit D (2004). Selective antagonism of medial prefrontal cortex D4 receptors decreases fear-related behaviour in rats. *Eur J Neurosci* 19: 3393–3397.
- Shankaran, S. (2009). Neonatal Encephalopathy: Treatment with Hypothermia. *Journal of Neurotrauma*, 26(3), 437-443. doi:10.1089/neu.2008.0678
- Shankaran, S. (2014). Outcomes of Hypoxic-Ischemic Encephalopathy in Neonates Treated with Hypothermia. *Clinics in Perinatology*, 41(1), 149-159. doi:10.1016/j.clp.2013.10.008
- Shoham, S.; Bejar, C.; Kovalev, E.; Weinstock, M. (2003). Intracerebroventricular injection of streptozotocin causes neurotoxicity to myelin that contributes to spatial memory deficits in rats. *Exp Neurol*. v.184. n.2. p.1043-52.

- Sigala S, Missale C, Spano P (1997). Opposite effects of dopamine D2 and D3 receptors on learning and memory in the rat. *Eur J Pharmacol* 336: 107–112.
- St Onge, J. R. & Floresco, S. B. (2009). Dopaminergic modulation of risk-based decision making. *Neuropsychopharmacology* 34, 681–697.
- St Onge, J. R., Abhari, H. & Floresco, S. B. (2011). Dissociable contributions by prefrontal D1 and D2 receptors to risk-based decision making. *J. Neurosci.* 31, 8625–8633.
- Stojanović, V., Vučković, N., Spasojević, S., Barišić, N., Doronjski, A., & Žikić, D. (2012). The influence of EPO and hypothermia on the kidneys of rats after perinatal asphyxia. *Pediatric Nephrology*, 27(1), 139-144. doi:10.1007/s00467-011-1950-6
- Sweet, D. G., Carnielli, V., Greisen, G., Hallman, M., Ozek, E., Plavka, R., ... Halliday, H. L. (2013). European Consensus Guidelines on the Management of Neonatal Respiratory Distress Syndrome in Preterm Infants - 2013 Update. *Neonatology*, 103(4), 353-368. doi:10.1159/000349928
- Takada S. H., Sampaio C. A., Allemandi W, Ito P. H., Takase L. F., Nogueira M. I. (2011). A modified rat model of neonatal anoxia: development and evaluation by pulse oximetry, arterial gasometry and Fos immunoreactivity. *J Neurosci Methods* 198, 62–69.
- Takada S. H., C.A. dos Santos Haemmerle, L.C. Motta-Teixeira, A.V. Machado-Nils, V.Y. Lee, L.F. Takase, R.J. Cruz-Rizzolo, A.H. Kihara, G.F. Xavier, I.-S. Watanabe, M.I. Nogueira. (2015). Neonatal anoxia in rats: Hippocampal cellular and subcellular changes related to cell death and spatial memory. *Neuroscience* 284 (22) 247-259,
- Nakazawa, M. (2005). Neonatal novelty exposure ameliorates anoxia-induced hyperactivity in the open field. *Behavioural Brain Research*, 163(1), 1-9. doi:10.1016/j.bbr.2005.03.025
- Tanhoffer, E.A. (2006). Perda celular hipocampal e efeitos amnésicos induzidos pelo metotrexate e isquemia cerebral: Estudos in vivo e em cultura organotípica de secções de hipocampo e efeitos do amifostine. São Paulo. Tese (Doutorado em Fisiologia Geral) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.
- Tattersall, G. J., & Milsom, W. K. (2003). Hypothermia-induced respiratory arrest and recovery in neonatal rats. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 137(1), 29-40. doi:10.1016/S1569-9048(03)00112-5

- Treit D. (1985). Animal models for the study of anti-anxiety agents: a review. *Neurosci Bio behav Rev* 9:203-22
- Van den Bergh FS, Bloemarts E, Groenink L, Olivier B, Oosting RS (2006). Delay aversion: effects of 7-OH-DPAT, 5-HT_{1A}/1B receptor stimulation and D-cycloserine. *Pharmacol Biochem Behav* 85: 736–743.
- Van Gaalen MM, van Koten R, Schoffelman ANM, Vanderschuren LJMJ (2006). Critical involvement of dopaminergic neurotransmission in impulsive decision making. *Biol Psychiatry* 60:66–73.
- Venerosi A., Cutuli D., Chiarotti F., Calamandrei G. (2006). C-section birth per se or followed by acute global asphyxia altered emotional behaviour in neonate and adult rat. *Behavioural Brain Research* 168 (1), 56-63, ISSN 0166-4328, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2005.10.010>.
- Volpe, J. J. (2001). Perinatal brain injury: From pathogenesis to neuroprotection. *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews*, 7(1), 56-64. doi:10.1002/1098-2779(200102)7:1<56::AID-MRDD1008>3.0.CO;2-A
- Wade TR, de Wit H, Richards JB (2000). Effects of dopaminergic drugs on delayed reward as a measure of impulsive behavior in rats. *Psychopharmacology* 150: 90–101.
- Weiner I (1990). Neural substrates of latent inhibition: the switching model. *Psychol Bull* 108: 443–461.
- Williams GV, Castner SA (2006). Under the curve: critical issues for elucidating D1 receptor function in working memory. *Neuroscience* 139: 263–276.
- Williams GV, Goldman-Rakic PS (1995) Modulation of memory fields by dopamine D1 receptors in prefrontal cortex. *Nature* 376:572–575.
- Winstanley CA, Theobald DE, Dalley JW, Robbins TW (2005). Interactions between serotonin and dopamine in the control of impulsive choice in rats: therapeutic implications for impulse control disorders. *Neuropsychopharmacology* 30: 669–682.
- Xavier, G. F. (1993). A modularidade da memória e o sistema nervoso. *Psicologia USP*, 4(1-2), 61-115.
- Xavier, G. F., Oliveira-Filho, F. J., & Santos, A. M. (1999). Dentate gyrus-selective colchicine lesion and disruption of performance in spatial tasks: difficulties in «place strategy» because of a lack of flexibility in the use of

environmental cues? Hippocampus, 9(6), 668-681.
doi:10.1002/(SICI)1098-1063(1999)9:6<668::AID-HIPO8>3.0.CO;2-9

Xiong, M., Yang, Y., Chen, G.-Q., & Zhou, W.-H. (2009). Post-ischemic hypothermia for 24 h in P7 rats rescues hippocampal neuron: Association with decreased astrocyte activation and inflammatory cytokine expression. *Brain Research Bulletin*, 79(6), 351-357. doi:10.1016/j.brainresbull.2009.03.011

Zack M, Poulos CS (2004). Amphetamine primes motivation to gamble and gambling-related semantic networks in problem gamblers. *Neuropsychopharmacology* 29: 195–207.

Zahrt J, Taylor JR, Mathew RG, Arnsten AF (1997). Supranormal stimulation of D1 dopamine receptors in the rodent prefrontal cortex impairs spatial working memory performance. *J Neurosci* 17: 8528–8535.

Zhang K, Grady CJ, Tsapakis EM, Andersen SL, Tarazi FI, Baldessarini RJ (2004). Regulation of working memory by dopamine D4 receptor in rats. *Neuropsychopharmacology* 29: 1648–1655.