

AVALIAÇÃO DAS FUNÇÕES COGNITIVAS E COMPORTAMENTAIS EM ANIMAIS EXPOSTOS AO PARADIGMA DA INFLAMAÇÃO PRÉ-NATAL E HIPÓXIA NEONATAL

Dayane Tavares Rodrigues dos Santos (IC) e Roberta Monterazzo Cysneiros (Orientadora)

Apoio: PIBIC Mackenzie

RESUMO

A hipóxia é caracterizada por uma diminuição de oxigênio nos tecidos, sendo que, uma das regiões mais afetadas é o sistema nervoso. A lesão cerebral causada por hipóxia é uma das maiores causas de mortalidade e morbidade, onde, 25% dos sobreviventes podem apresentar algum tipo de incapacidade, como déficits motores, paralisia cerebral e epilepsia. Além disso, a hipóxia é capaz de levar a complicações cardiovasculares, respiratórias e renais. Em estudos realizados anteriormente com ratos os quais sofreram hipóxia mostraram lesões corticais e subcorticais, com comprometimento da atividade motora, sugerindo que o modelo reproduziu os danos neuropatológicos e sensorio motores da paralisia cerebral na condição humana. Considerando a relação da hipóxia com a redução de atividade locomotora, este estudo avaliou o estado de ansiedade e a atividade motora de ratos submetidos a hipóxia neonatal. Ratas com 17 dias de gestação foram divididas em grupos controle e experimental. As experimentais receberam lipopolissacarídeo (LPS, 100 µg/Kg e os controles receberam salina. Após 24 horas do nascimento, os filhotes machos das ratas experimentais foram introduzidos em uma câmara hipobárica onde a concentração de O₂ foi de 8 % e nitrogênio 92%. Os testes foram iniciados a partir do 21º dia de vida. Os resultados deste estudo sugerem que ratos Wistar machos adultos expostos a inflamação materna seguido de hipóxia neonatal exibiram hiperatividade e emocionalidade dependente do contexto. Em contexto mais aversivo, os animais experimentais apresentam comportamento de ambivalência e indecisão e no contexto menos aversivo, comportamento menos ansioso.

Palavras-chaves: hipóxia, atividade locomotora, ansiedade

ABSTRACT

Hypoxia is characterized by a decrease in oxygen in the tissues. One of the most affected regions is the nervous system. Brain damage caused by hypoxia is one of the major causes of mortality and morbidity, where 25% of survivors may have some form of disability, such as motor deficits, cerebral palsy and epilepsy. Moreover, hypoxia is capable of leading cardiovascular, respiratory and renal complications. In previous studies with rats who had hypoxia, they showed cortical and subcortical lesions, with impaired motor activity, suggesting

that the model reproduced the neuropathological and sensory damage of cerebral palsy in the human condition. Considering the relation between hypoxia and the reduction of locomotor activity, this study evaluated the state of anxiety and the motor activity of rats submitted to neonatal hypoxia. Rats with 17 days of gestation were divided into control and experimental groups. The experimental pups received lipopolysaccharide (LPS, 100 µg / kg) and the controls received saline. After 24 hours of birth, the experimental pups were introduced into a hypobaric chamber where the concentration of O₂ was 8% and nitrogen 92%. The results suggest that adult male Wistar rats exposed to maternal inflammation followed by neonatal hypoxia exhibited hyperactivity and emotionality context-dependent. In a more aversive context, the experimental animals exhibited ambivalence or indecision behavior and in the less aversive, reduced level of anxiety.

Keywords: hypoxia, locomotor activity, anxiety

1. INTRODUÇÃO

A lesão cerebral hipóxico isquêmica do recém-nascido (RN) é uma das maiores causas de mortalidade e morbidade neurológica severa em crianças, portanto é uma complicação séria tanto em RN a termo como em prematuros, com um alto risco de futuros déficits comportamentais e neurológicos (LUBICS ET AL., 2005). Insultos hipóxico isquêmicos neonatais ocorrem em média de 1-3 nascidos vivos a termo por 1.000 e esse número aumenta para 40 a cada 1.000 em crianças prematuras com muito baixo peso ao nascer. A taxa de mortalidade dos recém-nascidos que sofreram hipóxia no período neonatal é de 20-50%, sendo que mais de 25% dos sobreviventes podem exibir incapacidades, déficits motores, paralisia cerebral e epilepsia (VANNUCCI E PERLMAN, 1997; Kirby, 2012). Complicações sistêmicas da hipóxia neonatal frequentemente incluem alterações cardiovasculares, respiratórias, metabólicas e renais. Porém, o sistema nervoso central é a estrutura mais afetada (VANNUCCI, 2000).

A encefalopatia hipóxico isquêmica (EHI) se desenvolve quando há hipoperfusão tecidual significativa e diminuição da oferta de oxigênio decorrentes das mais diversas etiologias. A causa mais frequente de EHI no período neonatal é a asfixia perinatal embora outros fatores possam estar envolvidos, como: interrupção do fluxo sanguíneo umbilical, anormalidades placentárias, restrição de crescimento intrauterino e falha ao inflar o pulmão logo após o nascimento. No entanto, todas as situações patológicas que levem à hipóxia e à hipoperfusão teciduais sejam elas pré-natal, perinatal ou pós-natal são fatores etiológicos da EHI. A EHI é a causa mais comum para convulsões neonatais contribuindo com cerca dois terços dos casos registrados (SHETTY, 2015).

Após um insulto hipóxico isquêmico, ocorre transitoriamente uma diminuição de suprimentos de oxigênio e glicose cerebrais, ocasionando déficit energético e dando início à uma cascata de eventos bioquímicos que conduzem à disfunção celular e ao estresse oxidativo. Dependendo da intensidade e da duração do insulto, aumenta a propensão de ocorrência de lesões secundárias que incluem: disfunção mitocondrial, apoptose e excitotoxicidade. A cascata de eventos, pode ainda incluir efeitos terciários tais como: sensibilização a inflamação, déficits na maturação dos oligodendrócitos, gliose persistente e alterações epigenéticas (FLEISS E GRESSENS, 2012). Parte do dano cerebral produzido durante a hipóxia e isquemia, se deve a ativação de resposta inflamatória no sistema nervoso central. Esta resposta depende da ativação da micróglia, em resposta à agressão hipóxica e dos macrófagos recrutados para eliminar os restos celulares. As micróglias são as principais fontes de fator de necrose tumoral (TNF- α) e os astrócitos de interleucina 1 β , que aumentam a

síntese de óxido nítrico, que pode participar do dano neuronal. Durante a isquemia também há acúmulo de neutrófilos, monócitos e linfócitos T, que desaparecem posteriormente.

A necrose celular, secundária à hipóxia e a isquemia, acontece por mecanismos citotóxicos. A metabolização anaeróbia da glicose induz a um consumo maior de glicose pelo cérebro, com aumento da glicólise, depleção das reservas de glicogênio cerebral e redução de compostos altamente energéticos intracelulares, como fosfocreatina e adenosinatrifosfato (ATP). A queda dos níveis de ATP ocasiona uma alteração na bomba de sódio da membrana celular, permitindo a entrada de sódio e cloro na célula, com consequente entrada de água que leva ao edema.

Nos países desenvolvidos, graças aos avanços nos cuidados perinatais, mais de 90% dos bebês prematuros sobrevivem, porém muitos deles irão apresentar incapacidades motoras, cognitivas e comportamentais permanentes (FERRIERO, 2004). No entanto, apesar das melhorias na assistência perinatal, a incidência de EHI manteve-se estável ao longo de décadas (WINTER *ET AL.*, 2002) ; (WILSON-COSTELLO *ET AL.*, 2005), refletindo incertezas fisiopatológicas que impossibilitam o avanço das intervenções preventivas e terapêuticas.

Modelos animais de EHI

Devido a etiologia multifatorial da EHI ainda não se encontra disponível um modelo animal que reproduza fielmente os déficits presentes na condição humana, especialmente a espasticidade crônica. O modelo animal mais utilizado para o estudo da hipóxia-isquemia neonatal consiste em ligadura unilateral permanente da artéria carótida comum com subsequente exposição à condições de hipóxia (8% O₂) no sétimo dia pós-natal (RICE, VANNUCCI E BRIERLEY, 1981).

No entanto, outras abordagens têm sido utilizadas para o estudo dos efeitos da hipóxia no cérebro imaturo, tais como: hipóxia intermitente (MARSHALL *ET AL.*, 2008, HERMANS *ET AL.*, 1992), anóxia pós-natal (BUWALDA *ET AL.*, 1995); (TANG E NAKAZAWA, 2005) ; (STRATA *ET AL.*, 2004), hipóxia crônica pré-natal (JANICKE E COPER, 1994), hipóxia crônica pós-natal (STEWART, MENT E SCHWARTZ, 1997), combinação de infecção por endotoxina com subsequente insulto hipóxico isquêmico (EKLIND *ET AL.*, 2001, COUMANS *ET AL.*, 2003 LAROCHE *ET AL.*, 2005) entre outros.

As estruturas cerebrais mais comumente afetadas nos modelos de hipóxia são: córtex cerebral, subcortical, substância branca periventricular, corpo estriado (base e gânglios), tálamo e hipocampo. (VANNUCCI *ET AL.*, 1999) ; (RICE, VANNUCCI E BRIERLEY, 1981).

Outros modelos se baseiam em evidências epidemiológicas e clínicas que sugerem que as respostas inflamatórias fetais provocadas por infecções maternas contribuem para a ocorrência de dano cerebral perinatal, e portanto, utilizam o lipopolissacarídeo (LPS) que age como um potente gatilho do sistema imune sendo capaz de potencializar a resposta inflamatória em cérebros imaturos frente à lesão hipóxica.

Com base nessas evidências o grupo liderado por G. Sebire (LAROCHE *ET AL.*, 2005) e (GIRARD *ET AL.*, 2009) utilizou um modelo experimental de combinação de baixas doses de LPS pré-natal com insulto hipóxico isquêmico perinatal. Os autores observaram lesões bilaterais corticais e subcorticais da rede neural do controle motor bem como comprometimento da atividade motora espontânea e forçada, sugerindo que o modelo reproduziu os danos neuropatológicos e sensorio motores da paralisia cerebral na condição humana.

Em modelos animais, foi bem estabelecido que a susceptibilidade dos oligodendrócitos (OL's) ao estresse oxidativo é um fenômeno dependente da maturação, sendo que os préOLs são nitidamente mais sensíveis do que OLs maduros.

A mielinização é um processo fundamental no desenvolvimento da função cognitiva, e embora seja sabido que a hipóxia perinatal prejudica a função neurológica e o comportamento motor, a relação entre a mielinização e o resultado cognitivo tardio no modelo de hipóxia animal não está bem compreendida.

1.1 Objetivo

Avaliar em longo prazo a atividade locomotora e a ansiedade de ratos expostos ao paradigma da inflamação pré-natal com subsequente hipóxia neonatal.

2. REFERÊNCIAL TEÓRICO

Segundo Balduini et al. (2000), a hipóxia é a principal causa de danos cerebrais em recém-nascidos. Pode decorrer de vários processos, sendo alguns deles o descolamento placentário, complicações no parto ou outras complicações na gravidez. O dano causado depende do tempo de duração da hipóxia, podendo levar a paralisia cerebral, epilepsia e retardo mental.

A maior complicação é a morte da criança nas primeiras horas de vida, porém, o corpo, ao atingir a homeostase, gera possibilidades para manter os sistemas do corpo, e com isso,

vem as diversas e diferentes complicações e lesões causadas (ESQUILIANO et al., 2004). Portanto, ao chegar na idade adulta, o indivíduo que sofreu hipóxia pode demonstrar alterações em sua coordenação motora, na capacidade de aprendizagem e memória. Estudos realizados por Cai et al. (1999), indicam um aumento da atividade locomotora em ratos submetidos a hipóxia, no entanto, essa atividade pode não estar relacionada a aprendizagem comportamental.

3. MÉTODO

Animais

Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de ética no Uso de Animais (CEUA 106/02/2014) da Universidade Presbiteriana Mackenzie. Foram deste utilizados *Rattus Norvegicus*, machos albinos, linhagem Wistar, provenientes do Biotério da Universidade Presbiteriana Mackenzie. Os animais foram mantidos em ambiente climatizado ($22 \pm 2^\circ \text{C}$), com ciclo claro-escuro de 12 horas, tendo livre acesso à água e ração. *Desenho experimental*

A figura abaixo ilustra o método utilizado.

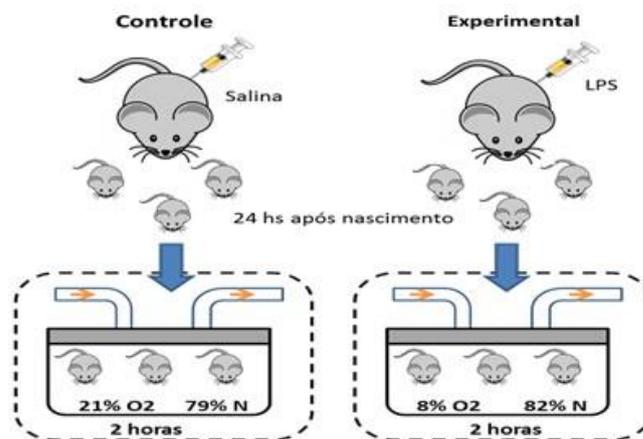


Figura 1. Paradigma da inflamação pré-natal seguida pela hipóxia neonatal.

Ratas com 17 dias de gestação foram aleatoriamente divididas em 2 grupos (experimental e controle) de 2 ratas cada. Nas experimentais administraram-se doses de lipopolissacarídeo (LPS, 100 µg/Kg, i.p, diluído em 100 µL de salina não pirogênica) e as controles receberam salina ao invés do LPS. O LPS foi administrado a cada 12 horas a partir do 17º dia gestacional até o final da gestação (LAROCHE ET AL., 2005).

Após 24 horas do nascimento, os filhotes machos das ratas experimentais foram introduzidos em uma câmara hipobárica onde a concentração de O₂ foi de 8 % e nitrogênio 92% (liberados a 5 L/min). Os filhotes das ratas controles foram expostos a uma concentração de O₂ de 21 % e nitrogênio 79%. Os animais ficaram em manta com temperatura de (36°–37°C) para manutenção dos limites fisiológicos por 120 min. Após esse período os filhotes foram devolvidos às caixas com as respectivas mães

Grupos de animais

Aos 21 dias pós-natal (PN21), os filhotes controles e experimentais foram aleatoriamente divididos em 2 grupos (Controle e Experimental) de 10 animais cada. Todos os testes comportamentais iniciaram-se a partir aos sessenta dias de vida pós-natal. Todos os testes foram filmados para auxiliar na avaliação e mensuração dos parâmetros observados. Os animais foram habituados na sala de experimentação 45 minutos precedentes às sessões. Os testes sempre foram realizados no mesmo horário para diminuir os efeitos circadianos no comportamento dos ratos, sendo os animais dos diferentes grupos observados de forma alternada. No intervalo entre as sessões, os equipamentos eram limpos com uma solução de 5% de etanol, a fim de evitar possíveis rastros de odor deixados pelo sujeito anterior.

Testes Comportamentais

Campo aberto

O teste do campo aberto foi utilizado para avaliação da atividade locomotora e ansiedade. O aparato consiste de uma arena circular de acrílico branco com 60 cm de diâmetro x 50 cm de altura subdivido em 12 zonas, sendo 8 periféricas e 4 centrais (Insight Ltda, Brasil). Os animais foram colocados na área central e observados por 10 minutos. Durante este período foram mensurados a atividade locomotora central, periférica e total. Cada unidade de locomoção correspondeu ao ato do animal entrar com as 4 patas em quaisquer um dos quadrantes do campo aberto. A locomoção central ou o tempo na zona central foram também expressos como a razão da locomoção ou tempo central pelo total.

Larinto em cruz elevado

O teste apresenta ao animal o conflito entre sua tendência natural de explorar um novo ambiente e sua relutância em se expor em território aberto no qual o risco de quedas e predadores é maior. Como consequência, os menos ansiosos exploram mais o braço aberto.

O LCE é composto de 4 braços, sendo 2 abertos (10 x 50 cm) e dois fechados (10 x 50 x 45 cm), arranjados de forma que os braços do mesmo tipo ficaram em oposição entre si, ligados por uma área central (10 x 10 cm). O aparelho está elevado a 40 cm do chão (Insight Ltda, Brasil). Cada animal foi submetido a uma única sessão de cinco minutos. Os animais eram posicionados no centro da plataforma com a face voltada para o braço aberto e foram mensurados o número de entradas e o tempo de permanência em cada um dos braços (aberto/fechado). Os parâmetros foram expressos como percentagem de entradas ou tempo nos braços abertos utilizando-se a seguinte fórmula: $[(\text{braços abertos} / \text{braços abertos} + \text{braços fechados}) \times 100]$.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos em média \pm erro padrão. Os testes de Campo aberto e Labirinto em Cruz Elevado (LCE) foram analisados ANOVA 2 vias com medidas repetidas, usando Bonferroni. Os valores de p foram considerados relevantes quando menores ou iguais a 0,05.

4. RESULTADOS

Campo aberto

Na locomoção total, os animais do grupo experimental exibiram maior atividade locomotora comparativamente ao grupo controle ($F(1,34) = 6,04$, $p=0,025$) sem diferença entre as sessões [$F(1,34) = 1,50$, $p=0,235$] ou interação entre os fatores ($F(1,34) = 1,882$, $p=0,167$). O pós-teste revelou diferença significativa entre os grupos na primeira sessão ($t=2,526$, $p < 0,05$).

Para investigar a atividade locomotora no centro do aparato, a locomoção foi expressa em percentagem da atividade locomotora total. A análise não revelou significância entre os grupos [$F(1,34) = 1,87$, $p=0,1893$] ou interação entre os fatores ($F(1,34) = 0,226$, $p=0,798$), mas apresentou significância entre as sessões ($F(1,34) = 8,71$, $p=0,0009$), sugerindo que houve habituação.

O tempo de locomoção no centro do aparato, também expresso em percentagem, foi significativamente diferente entre os grupos [$F(1,34) = 8,02$, $p=0,011$], e entre as sessões [$F(1,34) = 6,49$, $p=0,004$], mas não houve interação entre os fatores [$F(1,34) = 0,695$, $p=0,506$].

Os dados revelaram que os animais experimentais exibiram aumento da atividade locomotora e maior tempo de exposição no centro da arena campo aberto comparativamente aos animais controle, sugerindo hiperatividade e redução do comportamento relacionado à ansiedade.

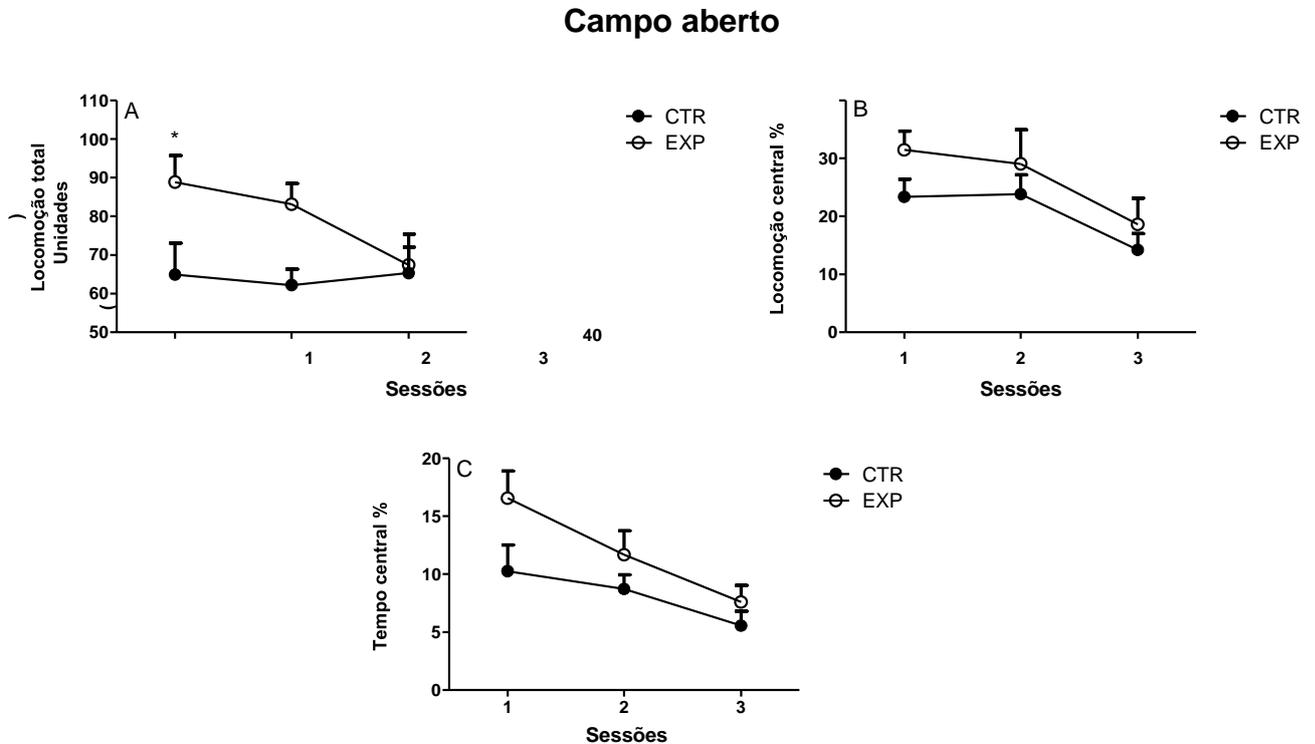


Figura 2. Campo aberto. Os dados, expressos como média \pm erro padrão do grupo controle (CTR, $n=10$) e do grupo experimental (EXP, $n=9$), são referentes a locomoção total (A), locomoção na zona central em porcentagem (B) e tempo na zona central em porcentagem. Animais experimentais exibiram hiperatividade e redução do comportamento relacionado à ansiedade.

Labirinto em cruz elevado

Na locomoção total observou-se diferença significativa entre os grupos [$F(1,34) = 5,61$, $p=0,030$], e entre as sessões [$F(1,34)=4,53$, $p=0,017$]. A entrada nos braços expressa em porcentagem da locomoção total não diferiu entre os grupos [$F(1,34) = 2,32$, $p = 0,145$], bem como entre as sessões [$F(1,34) = 0,428$, $p = 0,654$]. Também não foi encontrada significância na análise de porcentagem do tempo de locomoção nos braços abertos entre os grupos [$F(1,34) = 3,81$, $p = 0,067$], e entre as sessões [$F(1,34) = 2,52$, $p = 0,094$]. No entanto, animais experimentais despenderam mais tempo no compartimento central comparativamente aos controles [$F(1,34) = 9,14$, $p = 0,0076$] e também exibiram maior número de head-dippings [$F(1,34) = 5,81$, $p = 0,0275$].

Labirinto em cruz elevado

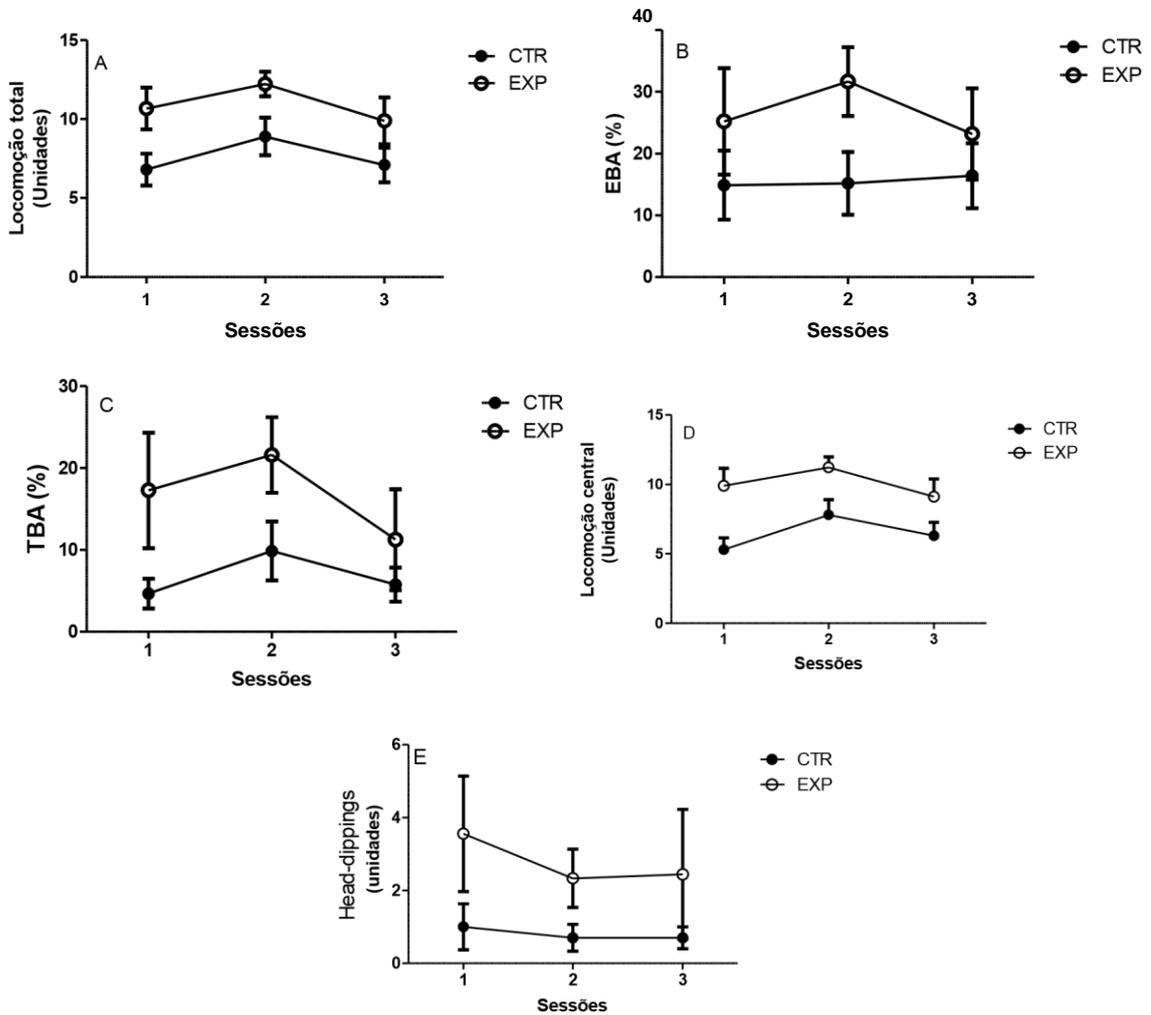


Figura 3. Labirinto em cruz elevado. Os dados, expressos como média \pm erro padrão do grupo controle (CTR, n=10) e do grupo experimental (EXP, n=9), são referentes a locomoção total (A), locomoção no braço aberto em percentagem (B) e tempo despendido no braço aberto em percentagem (C), cruzamentos central (D) e head-dippings (E). Animais experimentais exibiram aumento da atividade locomotora (A) e maior avaliação de risco (D, E).

5. DISCUSSÃO

O estudo avaliou o comportamento relacionado à ansiedade e a atividade locomotora em animais expostos a inflamação materna e a hipóxia neonatal. Os resultados preliminares mostraram que os animais experimentais exibiram hiperatividade e alteração do comportamento relacionado à ansiedade na dependência do contexto. Aumento da atividade locomotora foi também relatado por Fan et al. (2005) em animais expostos à hipóxia neonatal.

Referente à ansiedade, no campo aberto os animais experimentais exibiram redução do comportamento ansioso e exploraram por mais tempo a zona central do campo aberto, que é considerado um espaço ansiogênico. Contudo, no labirinto em cruz elevado, considerado um contexto mais aversivo, não foi observado o mesmo comportamento, e os animais experimentais apresentaram comportamento de ambivalência e indecisão. Está bem estabelecido que o campo aberto e o labirinto em cruz elevado compartilham áreas de sobreposição nas características comportamentais que procuram medir e definir, porém existem discretas, mas, importantes diferenças entre esses dois testes de ansiedade (NOSEK et al. 2008). Os testes medem aspectos diferentes do comportamento ansioso. Por exemplo, no campo aberto, a atividade locomotora geral (comportamento exploratório e cruzamento das linhas internas e externas) está inerentemente embutida na avaliação do comportamento relacionado à ansiedade, enquanto que as medidas no LCE, como o tempo gasto e as entradas nos braços abertos estão mais fortemente ligados ao comportamento relacionados à ansiedade. Tanto o campo aberto quanto o labirinto em cruz elevado são testes inerentemente estressantes, mas em graus diferentes. O campo aberto é aversivo principalmente devido à exposição a um ambiente desconhecido e o labirinto em cruz elevado é mais aversivo devido à novidade, bem como a altura do labirinto (NOSEK et al. 2008). Neste contexto, a exposição a um ambiente mais aversivo, pode alterar o comportamento do animal de modo a torná-lo mais cuidadoso ao explorar este ambiente. Nosso estudo revelou que os animais experimentais cruzaram mais vezes o compartimento central do labirinto com concomitante maior número de head-dipping. Um animal particularmente indeciso poderia usar o compartimento central para avaliar qual braço escolher de forma a explorar o labirinto com cautela. Assim, propomos que os animais experimentais apresentam em contexto mais aversivo comportamento de ambivalência e indecisão e no contexto menos aversivo, comportamento menos ansioso. Redução do comportamento relacionado à ansiedade em animais expostos à hipóxia neonatal foi também observado. Hei et al., (2012). Adicionalmente, observamos que os animais experimentais exibiram habituação no campo aberto, mas não exibiram no labirinto em cruz elevado, sugerindo alteração na emocionalidade.

6. CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo sugerem que ratos Wistar machos adultos expostos a inflamação materna seguido de hipóxia neonatal exibiram hiperatividade e emocionalidade, na dependência do contexto. Em contexto mais aversivo, os animais experimentais

apresentam comportamento de ambivalência e indecisão e no contexto menos aversivo, comportamento menos ansioso.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANG, E. et al. Alterations in spatial learning and memory after forced exercise. **Brain Research**, v. 1113, p. 186-193, 2006.

BALDUINI, W.; et al. Long-lasting behavioral alterations following a hypoxic ischemic brain injury in neonatal rats. **Brain Research**, Urbino, v. 859, n. 1, p.318-325, jan. 2000.

BARNES, C. A. Memory deficits associated with senescence - neurophysiological and behavioral-study in the rat. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 93, n. 1, p. 74-104, 1979.

BUWALDA, B. et al. Effects of early postnatal anoxia on adult learning and emotion in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 67, n. 1, p. 85-90, 1995.

CAI, Z.; et al. Prenatal hypoxia-ischemia alters expression and activity of nitric oxide synthase in the young rat brain and causes learning deficits. **Brain Research Bulletin**, Mississippi, v. 49, n. 5, p.359-365, jul. 1999.

CAROLA, V.; et al. Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice. **Behavioural Brain Research**, Rome, v. 134, n. 1, p.49-57, ago. 2002

CHEMERO, A.; HEYSER, C. Object Exploration and a Problem with Reductionism. **Synthese**. p. 403-423. dez. 2005.

CHOU, I.; et al. Behavioral/Environmental Intervention Improves Learning After Cerebral Hypoxia-Ischemia in Rats. **Stroke**. Michigan, p. 2192-2197. set. 2001.

COUMANS, A. et al. Intracisternal application of endotoxin enhances the susceptibility to subsequent hypoxic-ischemic brain damage in neonatal rats. **Pediatric Research**, v. 53, n. 5, p. 770-775, may. 2003. ISSN 0031-3998.

CRUSIO, W.; SCHWEGLER, H. Hippocampal mossy fiber distribution covaries with open-field habituation in the mouse. **Behavioural Brain Research**, Heidelberg, v. 26, n. 2-3, p.153-158, nov. 1987.

EKLIND, S. et al. Bacterial endotoxin sensitizes the immature brain to hypoxic-ischaemic injury. **European Journal of Neuroscience**, v. 13, n. 6, p. 1101-1106, mar. 2001. ISSN 0953816X.

ENNACEUR, A. One-trial object recognition in rats and mice: Methodological and theoretical issues. **Behavioural Brain Research**, v. 215, n. 2, p.244-254, dez. 2010.

ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. Behavioral data. **Behavioural Brain Research**, v. 31, n. 1, p.47-59, nov. 1988.

ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. Effect of combined or separate administration of piracetam and choline on learning and memory in the rat. **Psychopharmacology**, Berlim, v. 92, n. 1, p.58-67, jan. 1987

ENNACEUR, A; NEAVE, N.; AGGLETON, J.P. Spontaneous object recognition and object location memory in rats: the effects of lesions in the cingulate cortices, the medial prefrontal cortex, the cingulum bundle and the fornix. **Springer-verlag**, v. 113, n. 1, p.509-519, ago. 1996.

ESQUILIANO, G. R.; et al. Neurological damage due to perinatal ischemia. **Arch. Neurocienc.**, México, v. 9, n. 3, p.143-150, jul. 2004.

FAN, L.; et al. Hypoxia-ischemia induced neurological dysfunction and brain injury in the neonatal rat. **Behavioural Brain Research**, Mississippi, v. 165, n. 1, p.80-90, 30 nov. 2005.

FERRIERO, D. Medical progress - Neonatal brain injury. **New England Journal of Medicine**, v. 351, n. 19, p. 1985-1995, nov. 2004.

FILE, S E.; HYDE, J.R. CAN SOCIAL BE USED TO INTERACTION MEASURE ANXIETY? **British Journal Of Pharmacology**, London, v. 62, n. 1, p.19-24, jan. 1978.

FILE, S.E. Behavioural detection of anxiolytic action. **John Wiley e Sons Ltd**, Chichester, p.25-44, 1992.

FILE, S.E. The interplay of learning and anxiety in the elevated plus maze. **Behavioural Brain Research**, v.58, p.199-22, 1993.

FLEISS, B.; GRESSENS, P. Tertiary mechanisms of brain damage: a new hope for treatment of cerebral palsy? **Lancet Neurology**, v. 11, n. 6, p. 556-566, jun. 2012. ISSN 1474-4422.

FORDYCE, D.; WEHNER, J. Physical-activity enhances spatial-learning performance with an associated alteration in hippocampal protein-kinase-c activity in c57bl/6 and dba/2 mice. **Brain Research**, v. 619, n. 1-2, p. 111-119, aug. 1993. ISSN 0006-8993.

GIRARD, S. et al. Developmental motor deficits induced by combined fetal exposure to lipopolysaccharide and early neonatal hypoxia/ischemia: a novel animal model for cerebral palsy in very premature infants. **Neuroscience**, v. 158, n. 2, p. 673-682, jan. 2009. ISSN 03064522.

HALLER, J; BAKOS, N. Stress-induced social avoidance. **Physiology & Behavior**, v. 77, n. 2-3, p.327-332, nov. 2002.

HANDLEY, S. L.; MITHANI, S. (1984). Effects of alpha adrenoceptor agonist and antagonist in a maze-exploration mode of "fear" – motivated behavior naunyn – Schimiedeberg's Archive of Pharmacology, v. 327, p. 1-5.

HERMAN, T.; GILADI, N.; HAUSDORFF, J. Treadmill training for the treatment of gait disturbances in people with Parkinson's disease: a mini-review. **Journal of Neural Transmission**, v. 116, n. 3, p. 307-318, mar. 2009. ISSN 0300-9564.

HERMANS, R. et al. Behavioral sequelae in young-rats of acute intermittent antenatal hypoxia. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 14, n. 2, p. 119-129, apr. 1992. ISSN 0892-0362.

ISAACS, K. et al. Exercise and the brain - angiogenesis in the adult-rat cerebellum after vigorous physical-activity and motor skill learning. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 12, n. 1, p. 110-119, jan. 1992. ISSN 0271-678X.

JANICKE, B.; COPER, H. The effects of prenatal exposure to hypoxia on the behavior of rats during their life-span. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 48, n. 4, p. 863-873, aug.1994. ISSN 0091-3057.

KIRBY, R. Cerebral palsy and birth defects: what is the frame of reference? **Developmental Medicine and Child Neurology**, v. 54, n. 8, p. 677-678, aug. 2012. ISSN 0012-1622.

LAROUCHE, A. et al. Neuronal injuries induced by perinatal hypoxic-ischemic insults are potentiated by prenatal exposure to lipopolysaccharide: Animal model for perinatally acquired encephalopathy. **Developmental Neuroscience**, v. 27, n. 2-4, p. 134-142, 2005 2005. ISSN 0378-5866.

LOU, S. et al. Hippocampal neurogenesis and gene expression depend on exercise intensity in juvenile rats. **Brain Research**, v. 1210, p. 48-55, may. 2008. ISSN 0006-8993.

LUBICS, A. et al. Neurological reflexes and early motor behavior in rats subjected to neonatal hypoxic-ischemic injury. **Behavioural Brain Research**, v. 157, n. 1, p. 157-165, feb.2005. ISSN 0166-4328.

MARSHALL, H. et al. Effects of intermittent hypoxia on SaO₂, cerebral and muscle oxygenation during maximal exercise in athletes with exercise-induced hypoxemia. **European Journal of Applied Physiology**, v. 104, n. 2, p. 383-393, sep. 2008. ISSN 1439-6319.

METZ, G.; WHISHAW, I. Cortical and subcortical lesions impair skilled walking in the ladder rung walking test: a new task to evaluate fore- and hindlimb stepping, placing, and coordination. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 115, n. 2, p. 169-179, apr. 2002. ISSN 0165-0270.

MING-YAN, H et al. Hypoxic-ischemic injury decreases anxiety-like behavior in rats when associated with loss of tyrosine-hydroxylase immunoreactive neurons of the substantia nigra. **Braz J Med Biol Res**, v. 45, n. 1, p.13-9, 2012.

MORATO, S.; BRANDÃO, M. L. Paradoxical increase of exploratory behavior in the elevated plus-maze by rats exposed a two kinds of aversive stimuli. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 30, 1113-1120, 1997.

MORRIS, R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial-learning in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 11, n. 1, p. 47-60, 1984. ISSN 0165-0270.

NICOLAS, L. B.; PRINSSSEN, E. P. M. Social approach–avoidance behavior of a high-anxiety strain of rats: effects of benzodiazepine receptor ligands. **Psychopharmacology**, v. 184, n. 1, p.65-74, 3 dez. 2005.

NOSEK, K. et al. Context and strain-dependent behavioral response to stress. **Behav Brain Funct**, v. 4, n.23, p.1-8, 2008

PELLOW S.; FILE, S.E. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, v.24, p.525-29, 1986.

PINHEIRO, S.H; ZANGROSSI-Jr, H.; DEL-BEM, C.M.; GRAEFF, F.G. Elevated mazes as animal models of anxiety: effects of serotonergic agentes. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 79, p. 71-85, 2007.

RICE, J.; VANNUCCI, R.; BRIERLEY, J. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain-damage in the rat. **Annals of Neurology**, v. 9, n. 2, p. 131-141, 1981. ISSN 0364-5134.

ROJAS, J.J et al. Effects of daily environmental enrichment on behavior and dendritic spine density in hippocampus following neonatal hypoxia–ischemia in the rat. **Experimental Neurology**, v. 241, p.25-33, mar. 2013.

ROSA, I. R. M. **EVOLUÇÃO NEUROLÓGICA DE RECÉM-NASCIDOS COM ASFIXIA**

NEONATAL. 2005. 155 f. Tese (Doutorado) - Curso de Medicina, Pediatria, Unicamp,

Campinas,

2005.

Disponível

em:

<<http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=vtls000376079&opt=4>>. Acesso em: 21 out. 2015.

SHETTY, J. Neonatal seizures in hypoxic-ischaemic encephalopathy - risks and benefits of anticonvulsant therapy. **Dev Med Child Neurol**, [s.l.], v. 57, p.40-43, 19 mar. 2015. Wiley-Blackwell. DOI: 10.1111/dmcn.12724. Disponível em:

<<http://api.wiley.com/onlinelibrary/tdm/v1/articles/10.1111/dmcn.12724>>. Acesso em: 26 out. 2015.

STEWART, W.; MENT, L.; SCHWARTZ, M. Chronic postnatal hypoxia increases the numbers of cortical neurons. **Brain Research**, v. 760, n. 1-2, p. 17-21, jun. 1997.

STRATA, F. et al. Effects of sensorimotor restriction and anoxia on gait and motor cortex organization: Implications for a rodent model of cerebral palsy. **Neuroscience**, v. 129, n. 1, p. 141-156, 2004

SUN, H.; JUUL, H. M.; JENSEN, Frances E.. Models of hypoxia and ischemia-induced seizures. **Elsevier**. Philadelphia, p. 1-9. set. 2015. Disponível em: <www.elsevier.com/locate/jneumeth>. Acesso em: 23 out. 2015

TANG, A.; NAKAZAWA, M. Neonatal novelty exposure ameliorates anoxia-induced hyperactivity in the open field. **Behavioural Brain Research**, v. 163, n. 1, p. 1-9, aug. 2005.

TEIXEIRA, A. et al. Beneficial effects of an innovative exercise model on motor and oxidative disorders induced by haloperidol in rats. **Neuropharmacology**, v. 60, n. 2-3, p. 432-438, mar. 2011. ISSN 0028-3908.

TREJO, J.; CARRO, E.; TORRES-ALEMAN, I. Circulating insulin-like growth factor I mediates exercise-induced increases in the number of new neurons in the adult hippocampus. **Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 5, p. 1628-1634, mar. 2001. ISSN 0270-6474.

VAN PRAAG, H. et al. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 23, p. 13427-13431, nov. 1999.

VANNUCCI, R. et al. Rat model of perinatal hypoxic-ischemic brain damage. **Journal of Neuroscience Research**, v. 55, n. 2, p. 158-163, 1999.

VANNUCCI, R. Hypoxic-ischemic encephalopathy. **American Journal of Perinatology**, v. 17, n. 3, p. 113-120, 2000

VANNUCCI, R.; PERLMAN, J. Interventions for perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy. **Pediatrics**, v. 100, n. 6, p. 1004-1014, dec.1997.

WALL, P.M; MESSIER, C. Methodological and conceptual issues in the use of elevated plus maze as a psychological measurement instrument of animal anxiety like behavior. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v.25, p. 275, 2001.

WILSON-COSTELLO, D. et al. Improved survival rates with increased neurodevelopmental disability for extremely low birth weight infants in the 1990s. ***Pediatrics***, v. 115, n. 4, p. 997-1003, 2005.

WINTER, S. et al. Trends in the prevalence of cerebral palsy in a population-based study. ***Pediatrics***, v. 110, n. 6, p. 1220-1225, 2002.

Contatos: dayane.tavares.santos@hotmail.com e rcysneiros@yahoo.com