

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

**Deficiência de tiamina e isolamento social afetam aspectos do
comportamento motor e níveis centrais de GABA e glutamato**

Ana Raquel Pereira Caixeta

BELO HORIZONTE

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

**Deficiência de tiamina e isolamento social afetam aspectos do
comportamento motor e níveis centrais de GABA e glutamato**

Ana Raquel Pereira Caixeta

Orientadora: Angela Maria Ribeiro

Co-Orientadora: Danielle Marra de Freitas Silva

Colaboradores:

Enrico Antônio Colosimo e Glaura da Conceição Franco

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências
Biológicas da Universidade Federal de Minas
Gerais – Programa de Pós-graduação em
Neurociências como parte dos requisitos para
obtenção do Título de Mestre em Neurociências.

BELO HORIZONTE

2011

REITOR

Profº Clélio Campolinana

PRÓ-REITORA DE PÓS-GRADUAÇÃO

Profª Andréa Gazzinelli Corrêa de Oliveira

DIRETOR DO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Profº Tomaz Aroldo da Mota Santos

**COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
NEUROCIÊNCIAS**

Profª Angela Maria Ribeiro

COLEGIADO DA PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

Profº Antônio Lúcio Teixeira Júnir (Subcoordenador)

Profº Helton José dos Reis

Profº Carlos Júlio Tierra Criollo

Profº Vitor Geraldi Haase

Profº Fabrício de Araújo Moreira

Kenia de Oliveira Bueno (Representante discente)

Dedico este trabalho aos meus pais, Amâncio Fernandes Caixeta e Glívea Mara Pereira, ao Eduardo Gomes Souza e amigos queridos pelo amor, incentivo, confiança e compreensão durante essa caminhada.

AGRADECIMENTOS

À DEUS por ter colocado em meu caminho pessoas especiais que contribuíram para a realização deste mestrado.

Aos meus pais e irmão pelo amor, incentivo e confiança depositados.

Ao Eduardo pelo companheirismo em todos os momentos, respeito e amor.

À professora Angela Ribeiro e à saudosa Professora Sílvia Pereira pelos ensinamentos e imensa contribuição para minha formação profissional e pessoal.

Aos professores Enrico Antônio Colosimo e Glaura da Conceição Franco pelos ensinamentos estatísticos e fundamental contribuição.

Às amigas de longa data, Marília e Maíra, que sempre me incentivaram.

Aos amigos Ari, Cida, Cristiane, Daniel, Danielle, Fábio, Iêda, Igor, Kênia, Letícia, Patrícia, Polliana, Rafael, Rosária e Talita por toda ajuda e pelos inúmeros, bons e inesquecíveis momentos vividos.

Aos amigos da Clínica Aprendizagem & Cia, Clínica Equilíbrio e JD SPORTS pelo apoio e compreensão nos momentos de ausência.

À Dada, Lili e Sol pela alegria de viver.

Muito obrigada a todos que, de alguma forma, participaram desta história e tornaram possível este sonho.

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais volta ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

Lista de Figuras e Tabelas.....	x
Abreviaturas e Símbolos.....	xv
Resumo.....	xvii
Abstract.....	xix
Introdução.....	01
1. Coordenação Motora e Equilíbrio: Aspectos Neuroanatômicos e Funcionais.....	01
1.1. Avaliações do Desempenho Motor.....	08
1.2. Distúrbio Motores em Processos Neurodegenerativos.....	11
2. A tiamina e sua Deficiência e Aspectos Motores.....	13
3. Isolamento Social e Aspectos Motores.....	18
4. Circuito Glutamatérgico, GABAérgico e Comportamento Motor.....	21
Justificativa.....	25
Objetivos.....	28
Material e Métodos.....	29
1. Delineamento Experimental.....	29

2. Estudo Comportamental.....	32
2.1. Trave de Equilíbrio (<i>Beam Balance</i>).....	33
2.1.1. Equipamento.....	33
2.1.2. Procedimento.....	33
2.2. Teste <i>Rotarod</i>	34
2.2.1. Equipamento.....	34
2.2.2. Procedimento.....	35
2.3. Teste de Impressão de Patas.....	36
2.3.1. Equipamento.....	36
2.3.2. Procedimento.....	36
3. Dissecção do Cérebro.....	37
4. Estudos Bioquímicos.....	38
4.1. Processamento das amostras.....	38
4.2. Procedimento de Derivatização.....	39
4.3. Equipamento cromatográfico e princípios de funcionamento.....	39
4.4. Condições cromatográficas.....	41

5. Análise Estatística.....	42
Resultados	45
1. Modelo Experimental.....	45
2. Estudos Comportamentais.....	50
3. Estudos Bioquímicos.....	56
4. Estudos de Correlação.....	64
Discussão	65
Considerações Finais e Perspectivas	78
Anexos	81
Referências Bibliográficas	111

Figuras

Figura 1	Esquema das principais vias envolvidas no controle motor.....	3
Figura 2	Representação esquemática dos circuitos neuroquímicos dos núcleos da base, tálamo e córtex cerebral.....	8
Figura 3	Esquema das vias metabólicas indicando duas das enzimas dependentes de tiamina.....	15
Figura 4	Esquema de um terminal sináptico glutamatérgico.....	22
Figura 5	Esquema de um terminal sináptico GABAérgico.....	23
Figura 6	Representação esquemática do delineamento experimental.....	30
Figura 7	Fotografia do equipamento utilizado para o teste <i>Beam Balance</i>	33
Figura 8	Fotografia do equipamento utilizado para o teste <i>Rotarod</i>	34
Figura 9	Fotografia do equipamento utilizado para o teste de impressão das patas...	37
Figura 10	Esquema da reação de derivatização com orto-oftaldeído (OPA).....	39
Figura 11	Representação esquemática dos componentes de um aparelho de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (<i>HPLC</i>).....	40
Figura 12	Representação esquemática de um cromatograma indicando o tempo de eluição dos neurotransmissores.....	41
Figura 13	Gráfico com dados do peso corporal dos animais	47
Figura 14	Gráfico com dados do consumo de ração dos animais.....	48
Figura 15	Gráfico com dados do consumo de água dos animais.....	49
Figura 16	Gráfico com dados do desempenho dos animais no <i>Beam Balance</i>	51
Figura 17	Gráfico com dados do desempenho dos animais no <i>Rotarod</i>	53

Figura 18	Representação das pegadas dos animais e gráficos com os dados quantitativos do desempenho no teste de impressão das patas.....	55
Figura 19	Gráficos com dados das concentrações em $\mu\text{g/g}$ de tecido de glutamato e GABA cerebelo.....	57
Figura 20	Gráficos com dados das concentrações em $\mu\text{g/g}$ de tecido de glutamato e GABA no estriado.....	59
Figura 21	Gráficos com dados das concentrações em $\mu\text{g/g}$ de tecido de glutamato e GABA no tálamo.....	61
Figura 22	Gráficos com dados das concentrações em $\mu\text{g/g}$ de tecido de glutamato e GABA no córtex pré-frontal.....	63

Tabelas

Tabela 1	Composição da ração produzida no laboratório.....	31
Tabela 2	Composição da mistura de sais.....	31
Tabela 3	Composição da mistura de vitaminas.....	32
Tabela 4	Dados referentes ao desempenho dos animais no <i>Beam Balance</i>	50
Tabela 5	Dados referentes ao desempenho dos animais no <i>Rotarod 5rpm</i>	52
Tabela 6	Dados referentes ao desempenho dos animais no <i>Rotarod 25rpm</i>	52

Anexos

Tabela 7	Dados do peso corporal dos animais Padrão-isolados.....	83
Tabela 8	Dados do peso corporal dos animais Deficientes-isolados.....	84
Tabela 9	Dados do peso corporal dos animais Padrão-grupo.....	85
Tabela 10	Dados do peso corporal dos animais Deficientes-grupo.....	86
Tabela 11	Dados do consumo de ração dos animais Padrão-isolados.....	87
Tabela 12	Dados do consumo de ração dos animais Deficientes-isolados.....	88
Tabela 13	Dados do consumo de ração dos animais Padrão-grupo.....	89
Tabela 14	Dados do consumo de ração dos animais Deficientes-grupo.....	90

Tabela 15	Dados do consumo de água dos animais Padrão-isolados.....	91
Tabela 16	Dados do consumo de água dos animais Deficientes-isolados.....	92
Tabela 17	Dados do consumo de água dos animais Padrão-grupo.....	93
Tabela 18	Dados do consumo de água dos animais Deficientes-grupo.....	94
Tabela 19	Dados referentes ao desempenho dos animais Padrão-isolados no teste <i>Beam Balance</i>	95
Tabela 20	Dados referentes ao desempenho dos animais Deficientes-isolados no teste <i>Beam Balance</i>	96
Tabela 21	Dados referentes ao desempenho dos animais Padrão-grupo no teste <i>Beam Balance</i>	97
Tabela 22	Dados referentes ao desempenho dos animais Deficientes-grupo no teste <i>Beam Balance</i>	98
Tabela 23	Dados referentes ao desempenho dos animais Padrão-isolados no teste <i>Rotarod 5 RPM</i>	99
Tabela 24	Dados referentes ao desempenho dos animais Deficientes-isolados no teste <i>Rotarod 5 RPM</i>	100
Tabela 25	Dados referentes ao desempenho dos animais Padrão-grupo no teste <i>Rotarod 5 RPM</i>	101
Tabela 26	Dados referentes ao desempenho dos animais Deficientes-grupo no teste <i>Rotarod 5 RPM</i>	102
Tabela 27	Dados referentes ao desempenho dos animais Padrão-isolados no teste <i>Rotarod 25 RPM</i>	103
Tabela 28	Dados referentes ao desempenho dos animais Deficientes-isolados no teste <i>Rotarod 25 RPM</i>	104
Tabela 29	Dados referentes ao desempenho dos animais Padrão-grupo no teste <i>Rotarod 25 RPM</i>	105
Tabela 30	Dados referentes ao desempenho dos animais Deficientes-grupo no teste <i>Rotarod 25 RPM</i>	106

Tabela 31	Dados do teste de Impressão das Patas referente às larguras e aos comprimentos dos passos dos animais Padrão-isolados.....	107
Tabela 32	Dados do teste de Impressão das Patas referente às larguras e aos comprimentos dos passos dos animais Deficientes-isolados.....	108
Tabela 33	Dados do teste de Impressão das Patas referente às larguras e aos comprimentos dos passos dos animais Padrão-grupo.....	109
Tabela 34	Dados do teste de Impressão das Patas referente às larguras e aos comprimentos dos passos dos animais Deficientes-grupo.....	110

γ - gama

μ - Micro

α KGDH- Alfa-cetogluturato desidrogenase

5-HIAA- Ácido 5-hidroxi-indolacético

AIDS- Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

CPF – Córtex pré-frontal

Da- Dopamina

ERO- Espécie Reativa de Oxigênio

EW- Encefalopatia de Wernicke

GABA- Ácido γ -aminobutírico

GABA-T- GABA transaminase

GAD- Ácido glutâmico descarboxilase (glutamato descarboxilase);

GAT- Proteínas de membrana transportadoras de GABA

Glu- Glutamato

GP- Globo pálido

GPm- Globo pálido interno (medial)

HIV- Vírus da Imunodeficiência Humana

HPLC- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

IL- Interleucina

m- Mili

M- Molar

nm- Nanômetro

NMDA- N-metil-D-aspartato

NO – Óxido nítrico

OPA- Orto-oftaldeído

PDH- Piruvato desidrogenase

SNC- Sistema Nervoso Central

SNr- Substância negra porção reticular

STN- Núcleo subtalâmico

TDP- Tiamina difosfato

TNF α - Fator de Necrose Tumoral Alfa

TPP- Tiamina Pirofosfato

v/v- Volume por volume

WHO- Organização Mundial de Saúde

O fenômeno central abordado no presente estudo é o comportamento motor, avaliado após dois diferentes tipos de estímulos ambientais, o consumo de dieta deficiente em vitamina B1 e/ou o isolamento social. A tiamina, vitamina B₁, é um nutriente essencial para o tecido nervoso. Em estudos prévios, nosso grupo de pesquisa demonstrou que a deficiência maternal de tiamina pode levar a diminuição do peso cerebral, provocar modificações no comportamento motor e alterações neuroquímicas no Sistema Nervoso Central (SNC) da prole. O isolamento social, por sua vez, é considerado um empobrecimento ambiental, e tem sido observado como um paradigma relevante nos estudos de estresse crônico leve, e na compreensão da gênese da depressão e distúrbios emocionais e cognitivos. Até a presente data, pelo que podemos observar, não existem dados na literatura dos efeitos do isolamento social sobre aspectos motores. Considerando a importância da tiamina e do convívio social para homeostase da neuroquímica cerebral o objetivo do presente estudo foi investigar os efeitos da deficiência grave de tiamina e ou do isolamento social na motricidade e em parâmetros neuroquímicos de ratos na idade adulta. Quarenta e dois ratos *Wistar*, 3 meses de idade, foram divididos em quatro grupos experimentais: deficientes isolados (n=13), deficientes em grupo (n=8), padrões isolados (n=13) e padrões em grupo (n=8). Todos os animais foram submetidos a testes comportamentais (*Beam Balance*, *Rotarod* e *Impressão das patas*) para análise de aspectos do comportamento motor (coordenação e equilíbrio, largura e comprimento dos passos). Após os testes comportamentais os animais foram mortos por decapitação e o cerebelo, corpo estriado, tálamos e córtex pré-frontal foram retirados para análise da concentração de GABA e glutamato através do método de cromatografia líquida de alta eficiência (*HPLC: High Performance Liquid Chromatography*). Observamos que a deficiência de tiamina reduziu significativamente o tempo de permanência dos animais no *Beam Balance* [p = 0,000] e no *Rotarod 5rpm* [p = 0,001] e *25 rpm* [p = 0,000], assim como o isolamento social no *Beam Balance* [p = 0,002] e no *Rotarod 5rpm* [p = 0,002] e *25 rpm* [p = 0,000]. Houve um efeito significativo da deficiência sobre o aumento da largura do

passo [$F_{(1,34)} = 47,86$; $p = 0,000$]. A deficiência de tiamina também diminuiu de forma significativa as concentrações de glutamato [$F_{(1,34)} = 5,032$; $p = 0,032$] e GABA [$F_{(1,34)} = 9,471$; $p = 0,004$], no cerebelo. O isolamento além de diminuir significativamente as concentrações de glutamato [$F_{(1,34)} = 186,044$; $p = 0,000$] e GABA [$F_{(1,34)} = 26,498$; $p = 0,000$] no cerebelo, também diminuiu a concentração de glutamato no tálamo [$F_{(1,34)} = 129,557$; $p = 0,000$], no córtex pré-frontal [$F_{(1,34)} = 100,511$; $p = 0,000$] e aumentou a concentração de GABA no estriado [$F_{(1,34)} = 11,610$; $p = 0,002$]. Não observamos correlação significativa entre os parâmetros motores avaliados e parâmetros neuroquímicos. Concluímos que tanto a tiamina quanto a interação social entre os indivíduos estão envolvidos na manutenção dos níveis dos aminoácidos – GABA e glutamato - em regiões do SNC e, também em aspectos da atividade motora. Além disto, os dados indicam que: (i) o efeito da deficiência de tiamina sobre aspectos do comportamento motor depende das condições (isolados ou em grupo) em que os animais são mantidos e (ii) nível de GABA no CPF parece desempenhar um papel em ajustes de aspecto motor.

PALAVRAS-CHAVES: isolamento social – deficiência de tiamina – equilíbrio – marcha – cerebelo – corpo estriado – tálamo – córtex pré-frontal – ácido γ -aminobutírico (GABA) – glutamato.

The main phenomenon approached in this study is the motor behavior, evaluated after two different types of environmental stimuli, the consumption of diet deficient in B1 vitamin and/or social isolation. The B1 vitamin, thiamine, is an essential nutrient for the nervous tissue. In previous studies, our research group has shown that the maternal thiamine deficiency can lead to decreased brain weight, induces modifications in the motor behavior and neurochemical changes in the Central Nervous System (CNS) of the offspring. Social isolation, on the other hand, is considered an environmental impoverishment, and has been seen as an important paradigm in studies of mild chronic stress, and in understanding the genesis of depression, emotional disturbances and cognitive deficit. As far as you know, there are no literature data about the effects of social isolation on behavioral motor. Considering the importance of thiamine and social life for brain neurochemistry homeostasis, the objectives of the present study were to investigate the effects of severe thiamine deficiency and/or social isolation on the motor activity and neurochemical parameters of rats in adulthood. Forty-two *Wistar* rats, 3 months old, were divided in four experimental groups: isolated deficient (n=13), grouped deficient (n=8), isolated standard (n=13) and grouped standard (n=8). All animals were submitted to behavioral tests (*Beam Balance*, *Rotarod* e *Paw print*) for analysis of the motor behavior aspects (balance, path length and width path). After behavioral tests, the animals were killed by decapitation and the cerebellum, striatum, thalamus and prefrontal cortex were removed for analysis of the GABA and glutamate concentrations using the *High Performance Liquid Chromatography (HPLC)* method. It was observed that the thiamine deficiency reduced significantly the animals' permanency on the *Beam Balance* [p = 0,000] and the *Rotarod 5rpm* [p = 0,0012] and *25 rpm* [p = 0,000]. Similarly, the social isolation also decreased the animal's permanence on the *Beam Balance* [p = 0,002] and the *Rotarod 5rpm* [p = 0,002] and *25 rpm* [p = 0,000]. Thiamine deficiency significantly increased the animals path width [$F_{(1,34)} = 47,861$; p = 0,000]. Thiamine deficiency also significantly decreased cerebellar glutamate [$F_{(1,34)} = 5,032$;

p = 0,032] and GABA [$F_{(1,34)} = 9,471$; p = 0,004] concentrations. Besides decreasing significantly the glutamate [$F_{(1,34)} = 186,044$; p = 0,000] and GABA [$F_{(1,34)} = 26,498$; p = 0,000] concentrations , the isolation also decreases the glutamate concentration in the thalamus [$F_{(1,34)} = 129,557$; p =0,000], in the prefrontal cortex [$F_{(1,34)} = 100,511$; p =0,000] and increased the GABA concentration in the striatum [$F_{(1,34)} = 11,610$; p = 0,002]. A significant correlation was not observed between the motor parameters evaluated and neurochemical parameters. In conclusion, thiamine and relationship among subjects are important to the central GABA/glutamate homeostatic balance and motor activity. In addition, the results suggest that: (i) the thiamine effect on behavioral motor aspects depends on the environmental conditions – animals kept in group or isolated, and (ii) cortical levels of GABA seem to be involved in tuning motor activity.

KEYWORDS: social isolation – thiamine deficiency – balance – gait – cerebellum – striatum – thalamus – prefrontal cortex – γ -aminobutyric acid (GABA) – glutamate.

1. Coordenação Motora e Equilíbrio: Aspectos Neuroanatômicos e Funcionais

O fenômeno central abordado no presente estudo é o comportamento motor, avaliado após dois diferentes tipos de estímulos ambientais, o consumo de dieta deficiente em vitamina B1 e/ou o isolamento social.

Resultados obtidos em estudos neuroanatômicos e funcionais sugerem a presença de quatro áreas encefálicas relacionadas à organização e ao controle do movimento: motora primária, motora suplementar, pré-motora e motora cingular (He *et al.*, 1993; Kurata, 1994; Godschalk *et al.*, 1995; Wise, 1996). Segundo Grillner & Wallen (1985) essas áreas influenciam vias descendentes e interneurônios medulares através de suas conexões no nível do tronco encefálico, núcleos da base e cerebelo (Nair *et al.*, 2003) para possibilitar a ocorrência do movimento.

Grande parte do conhecimento sobre aspectos envolvidos no movimento tem sido obtida através de trabalhos realizados em modelos experimentais, gatos e macacos, principalmente no que diz respeito ao estudo da postura (Grillner & Wallen, 1985) e marcha (Eidelberg *et al.*, 1981; Morie *et al.*, 1999). Em 1981, Eidelberg *et al.* ao estimularem eletricamente o tegmento mesencefálico de macacos observaram alterações no comportamento motor e na iniciação da marcha. Ainda, conforme estes mesmos autores, regiões mesencefálicas específicas, juntamente com suas projeções para formação reticular ponte-medular, regiões subtalâmicas e cerebelo compõem as principais regiões e vias responsáveis pela marcha (locomoção). Segundo Grillner & Wallen (1985) a postura e a marcha são fundamentados em programas motores espinhais automatizados que são iniciados e regulados por circuitos supra-espinhais. Vários desses circuitos supra-espinhais, no tronco encefálico e cerebelo, têm sido

identificados através de estimulações químicas e elétricas pontuais nestas regiões (Shik & Orlovsky, 1976; Whelan, 1996; Mori *et al.*, 2001).

De acordo com vários autores (Chambers & Sprague, 1955a, b; Dichgans & Diener, 1984; Thach *et al.*, 1992; Thach & Bastian, 2004; Morton & Bastian, 2004), o cerebelo, mais especificamente a região medial (vérmis), merece atenção especial quando se analisa a marcha, uma vez que fica sob o seu comando a adequação da postura e a manutenção do equilíbrio durante a caminhada. Em trabalhos publicados por Udo *et al.* (1980) e Yu & Eidelberg, (1983) demonstrou-se que lesões ocorridas no cerebelo de gatos são capazes de induzir alterações (hipermetria) na marcha desses animais, corroborando o envolvimento do cerebelo durante a locomoção (Ito, 1984; Orlovsky *et al.*, 1999; Morton & Bastian, 2004).

Jahn *et al.* (2008) analisando imagens de ressonância magnética funcional em humanos, também mostraram a participação do cerebelo, juntamente com o tálamo e núcleos da base, quando os indivíduos mentalizavam diferentes situações que envolviam aspectos relacionados à postura e à marcha, como ficar de pé, caminhar e correr. Esses autores mostraram a complexidade na organização dos substratos neurobiológicos relacionados a esses comportamentos e a importância desses para a coordenação motora.

A coordenação motora é definida como a capacidade de produzir a contração dos músculos de tal forma que sua atividade orquestrada resulta em um movimento adequado ao contexto. Para a realização de um ato motor, o sujeito deve poder produzir ou ter arquivada uma estimativa interna dos parâmetros necessários para a sua execução (Vargas *et al.*, 2008). Em um modelo proposto por Wolpert & Kawato (1998), o sistema motor é visto como uma alça sensório-motora fechada: comandos motores geram contrações musculares, que, por sua vez, acionam uma alça de realimentação sensorial que desencadeia um novo movimento. Essa retroação é

composta pelas informações sensoriais derivadas tanto do próprio movimento como das modificações nas relações físicas entre as partes do sistema músculo esquelético e as informações provenientes do ambiente. O novo comando motor incorpora essas informações, gera outro comando motor e assim por diante.

Fazem parte dos comandos motores a correção e a execução dos movimentos que estão organizados em três níveis de controle: a medula espinhal, os sistemas descendentes do tronco encefálico e as áreas motoras do córtex cerebral. A integração é realizada por retroalimentação (*feedback*), por controle antecipatório (*feed-forward*) e por mecanismos adaptativos, distribuídos entre os três níveis de controle motor. Os três níveis dos sistemas motores recebem entradas sensoriais e estão sob a influência de dois sistemas sub-corticais: os núcleos da base e o cerebelo (Fig. 1) (Kandel *et al.*,1997; Shumway-Cook & Woollacott, 2006).

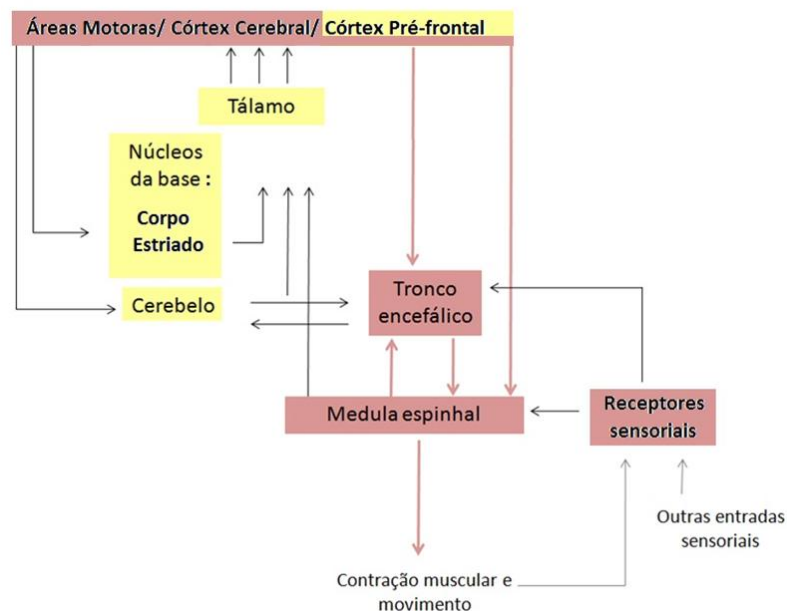


Figura 1. Esquema das principais vias envolvidas no controle motor. Os sistemas motores são organizados hierarquicamente, em três níveis, e em paralelo. As áreas motoras do córtex cerebral podem influenciar a medula espinhal diretamente e por meio dos sistemas descendentes do tronco encefálico. Os três níveis dos sistemas motores estão sob a influência de dois sistemas sub-corticais: os núcleos da base e o cerebelo, que atuam sobre o córtex por meio de núcleos talâmicos de retrotransmissão (Figura retirada de Kandel *et al.*, 1997, com modificações).

O cerebelo e os núcleos da base participam tanto do planejamento motor quanto do controle da execução do movimento. Essas regiões cerebrais sub-corticais projetam para o córtex cerebral por meio de núcleos talâmicos distintos. O cerebelo melhora a precisão do movimento pela comparação entre os comandos motores descendentes e a informação sobre a ação motora resultante. Essas correções pelo cerebelo dependem da atividade cerebelar sobre o tronco encefálico e as áreas motoras corticais, que se projetam diretamente para a medula espinhal, monitorizando tanto sua atividade como os sinais de retroalimentação que recebem da periferia (Miall *et al.*, 1993). Presume-se que o cerebelo armazene uma grande quantidade de informações codificadas em sua rede neuronal, de forma que possa corrigir qualquer tipo de atividade nas vias envolvidas no controle motor (Martin, 1998; Fox, 2002; Correia *et al.*, 2003).

Os núcleos da base representam uma importante conexão sub-cortical entre o córtex motor e o restante do córtex cerebral. Eles são constituídos por grandes estruturas bem delimitadas, dentre as quais se destacam o corpo estriado (caudado e putamen), o globo pálido e a substância negra. O principal circuito motor do qual os núcleos da base participam origina-se nas áreas de associação. Dos núcleos da base, estas fibras projetam-se para o córtex-motor através do tálamo. As principais conexões aferentes do estriado originam-se do globo pálido constituindo a *ansa lenticulares* e o *fasciculus lenticulares*, feixes de fibras que se projetam aos núcleos talâmicos que, por sua vez, projetam-se ao córtex motor. Essas conexões formam o circuito cortico-estriado-tálamo-cortical. Através dessa os núcleos da base implementam o processamento cortical e influenciam outros sistemas motores descendentes (Brandão, 1991).

De acordo com Jenkins *et al.* (1994) o cerebelo é ativado em fases iniciais do processo de aprendizagem motora, ao passo que o estriado é significativamente mais ativo durante a

execução de tarefas já aprendidas (Grafton, 1994). Até pouco tempo atrás, considerava-se que o cerebelo e os núcleos da base não eram interconectados, entretanto, achados contradizem essa visão e outros autores propõem uma importante interconexão entre essas estruturas (Hoshi *et al.*, 2005).

O córtex pré-frontal está envolvido no planejamento de comportamentos complexos. Para executar um planejamento, o córtex pré-frontal envia instruções ao córtex pré-motor, que produz sequências complexas de movimentos apropriados à tarefa. Se o córtex motor for lesionado, tais sequências não poderão ser coordenadas e o objetivo não poderá ser alcançado (Kolb & Whishaw, 2009).

Para sequências coordenadas de movimento, o equilíbrio motor - que é definido como a capacidade física que permite ao indivíduo controlar qualquer posição do corpo sobre uma base de apoio, que esteja estacionária ou em movimento - é fundamental (Shumway-Cook & Woollacott, 2006). O equilíbrio estático caracteriza-se pelo tipo de equilíbrio conseguido em determinada posição, ou pela capacidade de manter certa postura sobre uma base estática. O equilíbrio dinâmico é aquele conseguido com o corpo em movimento, determinando sucessivas alterações da base de sustentação, mantendo, dessa forma, uma resposta natural do organismo ao desequilíbrio provocado pelo deslocamento (Shumway-Cook & Woollacott, 2006).

Manchester *et al.*(1989) definem o equilíbrio como a manutenção do corpo em posição onde o centro de massa encontra-se dentro de uma base de suporte, sem que haja oscilações significantes, ou seja, nos limites da estabilidade. Para que haja manutenção do equilíbrio é necessário que os elementos anatômicos e funcionais estejam íntegros. De acordo com esses autores estes elementos compreendem: (i) o aparelho vestibular, baseado

nas forças gravitacionais; (ii) receptores visuais, informações sobre o ambiente e a localização, direção e a velocidade do movimento do indivíduo; (iii) o sistema somatossensorial, informações relacionadas ao contato e posição do corpo, incluindo os receptores cutâneos, receptores musculares, tendões, ligamentos, articulações que informam sobre a posição dos membros e do tronco; e (iv) o aparelho locomotor. A respeito dos circuitos neuroquímicos envolvidos com o equilíbrio e coordenação motora, Mora *et al.*, (2007) sugeriram que a interação entre o glutamato, o GABA e a dopamina nos núcleos da base tem um importante papel como substrato neuronal para a organização de diversas funções relacionadas a atividade motora. Embora a natureza destas interações seja ainda pouco entendida, as diversas disfunções envolvendo estes sistemas neurotransmissores têm sido estudadas (Mora *et al.*, 2007; Cauli *et al.*, 2009). Na doença de Parkinson, por exemplo, fica evidente a interdependência das interações entre esses sistemas de neurotransmissores para a geração de respostas motoras, haja vista que, conforme Kickler *et al.* (2009) nesta doença o distúrbio inicial provém de alterações na transmissão dopaminérgica na substância negra e, conseqüentemente, em disfunções nas transmissões GABAérgicas e glutamatérgicas capazes de promover importantes alterações na motricidade do indivíduo.

Alguns pesquisadores, utilizando modelo experimental, têm demonstrado uma relação entre os três sistemas de neurotransmissores, GABAérgico, glutamatérgico e dopaminérgico. Segundo Cauli *et al.* (2009) a ativação de receptores glutamatérgicos no núcleo *accumbens* é capaz de melhorar respostas motoras, em modelos de encefalopatia hepática, através da ativação de mecanismos envolvendo o GABA e o glutamato no córtex cerebral. Kalivas & Duffy, (1997) utilizando modelos experimentais também observaram que aferências dopaminérgicas no estriado e núcleo *accumbens* são capazes de regular a neurotransmissão GABAérgica e glutamatérgica em circuitos corticoestriatais (Cepeda *et*

al., 1993; West *et al.*, 2003; Bamford *et al.*, 2004; Surmeier *et al.*, 2007), corroborando o papel destes neurotransmissores na execução de respostas motoras.

Uma vez que os circuitos estriatais recebem aferências glutamatérgicas de diferentes regiões corticais, do cerebelo e do tálamo (Carrilo-Reid *et al.*, 2008) é possível propor que, projeções que chegam até estas estruturas, sejam elas de qualquer origem, tenham a capacidade de modular indiretamente o funcionamento dos circuitos estriatais e, possivelmente, ajustar respostas específicas durante a execução de tarefas motoras. Os dados obtidos por Centozane *et al.* (2008) fornecem suporte à esta suposição indicando que, através da facilitação de sinapses glutamatérgicas, o cerebelo é capaz de influenciar a atividade estriatal para produzir respostas motoras adaptativas e compensar os déficits cerebelares apresentados por animais experimentais em consequência de uma hemicerebelectomia.

Além do exposto acima, através das vias motoras direta e indireta, envolvidas no controle do movimento, o estriado com suas aferências dopaminérgica e glutamatérgica e suas aferências GABAérgicas é capaz de influenciar neurônios nigrais, palidais e talâmicos e modular as respostas motoras (Mora *et al.*, 2007; Dostrovsky *et al.*, 2002; Kreitzer *et al.*, 2008) como um todo. A organização desses sistemas, conforme apresentado na figura 2, está de acordo com a participação dos neurotransmissores GABA e glutamato no controle dessas respostas.

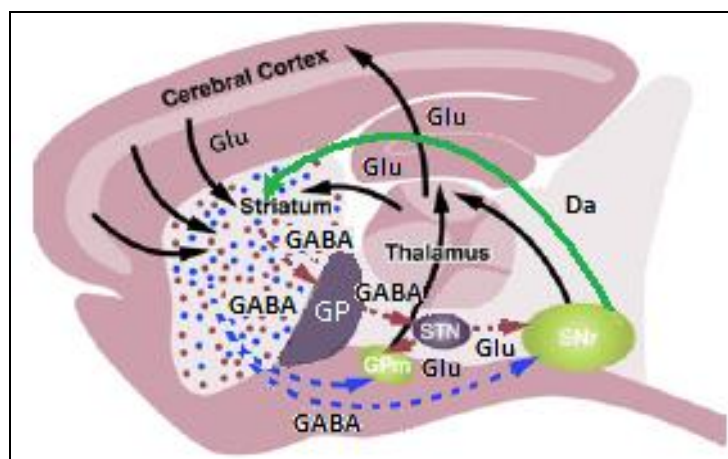


Figura 2: Representação esquemática dos circuitos neuroquímicos dos núcleos da base, tálamo e córtex cerebral envolvidos no controle de respostas motoras. Em destaque (pontilhado) as vias motoras direta e indireta (Figura Adapta a partir de Kreitzer, A.C. & Malenka, R.C. *Striatal Plasticity and Basal Ganglia Circuit Function*. *Neuron*. 2008; 60: 543-545). Cerebral cortex= córtex cerebral; Thalamus= tálamo; Striatum= estriado; GP= globo pálido; GPM= globo pálido interno(medial); STN= núcleo subtalâmico; SNr= substância negra reticular; Glu= glutamato; GABA= ácido γ -aminobutírico; Da= dopamina. As linhas pontilhadas representam, a via motora direta (estriado \rightarrow GPM e SNr \rightarrow tálamo \rightarrow córtex cerebral) e indireta (estriado \rightarrow GP \rightarrow STN \rightarrow GPM e SNr \rightarrow tálamo \rightarrow córtex cerebral).

1.1. Avaliações do Desempenho Motor

Freqüentemente, as avaliações motoras e do equilíbrio auxiliam no diagnóstico diferencial de doenças como Parkinson, Acidente Vascular Encefálico (AVE), Neuropatias periféricas, entre outras (Douglas, 2002).

A avaliação motora baseia-se na exploração da força muscular, a partir da palpação da unidade músculo-tendinosa durante o movimento, verificação da amplitude de movimento e da capacidade de oposição à força da gravidade e à resistência manual. A aplicação do método requer o conhecimento preciso da função muscular, além dos fatores que interferem nos resultados da avaliação, tais como sexo, idade, mão dominante, atividade profissional,

variações anatômicas, movimentos de substituição, vantagens mecânicas e presença de dor, entre outros (Daniels & Worthingham, 1975; Arvello, 1978; Kendall, Kendall & Wadsworth, 1979; Arvello, 1980).

O equilíbrio estático pode ser avaliado utilizando-se os testes: (i) apoio unipodal, onde o indivíduo tem que equilibrar-se em apenas um dos pés com os olhos abertos por, no máximo, 30 segundos, (ii) teste Romberg, no qual o indivíduo tem que equilibrar-se mantendo os pés juntos e os braços estendidos ao longo do corpo e, (iii) teste Romberg-Barré, no qual o indivíduo tem que equilibrar-se permanecendo com um pé adiante do outro, em linha reta. E, para testar o equilíbrio dinâmico, pode-se utilizar o teste Babinski Weil, onde o paciente caminha de olhos fechados, para frente e para trás, num percurso aproximado de 1,5 m e o pesquisador observa se há desvio da marcha para lateral (Douglas, 2002).

Vários modelos experimentais e testes comportamentais em animais de outras espécies foram desenvolvidos para avaliar os mecanismos patofisiológicos de lesões do SNC, fazer comparações funcionais, morfológicas e eletrofisiológicas. Por exemplo, a utilização de ratos lesados, nos quais os dados encontrados se assemelham aos observados em seres humanos (Metz *et al.*, 2000). Uma vantagem do modelo é o fato de ser preconizado e reprodutível, isso é particularmente importante para examinar agentes terapêuticos, protocolos de tratamento e procedimentos clínicos (Metz *et al.*, 2000).

Vários testes têm sido empregados para avaliar o comportamento motor em modelos experimentais, dentre eles podem-se citar os seguintes testes: campo aberto (*Open-field*), *Rotarod*, trava de equilíbrio (*Beam Balance*) e Impressão de Patas. O teste no ***Rotarod***, desenvolvido inicialmente por Dunham e Miya (1957) é uma tarefa frequentemente utilizada para testar coordenação motora grossa, com os animais sob efeitos de drogas que agem no

SNC. O procedimento requer que o animal mantenha o equilíbrio e a coordenação motora em uma base giratória, sendo, portanto, uma ferramenta útil para avaliar a função motora. O teste no **Beam Balance**, desenvolvido por Feeney et al. (1981), é também conhecido pelo nome trave de equilíbrio ou teste vestibulo motor e tem sido utilizado para avaliar a coordenação motora fina. Esse teste é útil para medir a recuperação funcional em modelos experimentais, uma vez que mimetizam as atividades dos pacientes, como equilíbrio e coordenação motora (Fujimoto *et al.*, 2004). O sistema vestibular, além de estabilizar a imagem na retina e participar do equilíbrio, fornece informações ao SNC para orientação espacial e percepção de movimento (Buccafusco, 2001). Do ponto de vista funcional, a percepção estática e de movimento e o controle do equilíbrio necessitam da integração dos sistemas vestibular, proprioceptivo e visual, o que torna essas funções multisensoriais (Buccafusco, 2001). Já o teste de **Impressão de Patas**, adaptado a partir do método descrito por Lagrán *et al.* (2004), avalia o padrão da marcha dos animais através da análise quantitativa do comprimento e da largura dos passos. Pode-se inferir, conforme Stolze *et al.* (2002), que um padrão de marcha alterado reflete um efeito compensatório para minimizar possíveis distúrbios no equilíbrio e coordenação motora.

Todos esses testes permitem a avaliação da etiologia de disfunções motoras e os substratos neurobiológicos associados a esses distúrbios. Muitos pontos obscuros ainda persistem com relação aos mecanismos moleculares de processos motores, tanto no campo da fisiologia quanto da patologia.

1.2. Distúrbio motores em processos neurodegenerativos

Vários processos neurodegenerativos causam distúrbios motores, mas, como mencionado acima, alguns mecanismos patofisiológicos das disfunções motoras ainda não foram esclarecidos.

A doença de Parkinson (DP) é uma doença neurodegenerativa que afeta milhões de pessoas e que vem crescendo em número a cada ano, especialmente na população em envelhecimento. Enquanto o sistema dopaminérgico encefálico tem sido reconhecido por participar do aperfeiçoamento do desempenho motor e da coordenação sensitiva motora (Hornykiewicz, 1972; Grossman & Kelly, 1976), a perda gradual de neurônios nigroestriatais e a depleção do neurotransmissor dopamina (DA) têm sido consideradas como a base fisiopatológica dos transtornos motores da DP. Em estudos mais recentes, Greco et al, (2010) mostraram evidências da importância do sistema glutamatergico no mecanismo das disfunções motoras observadas na DP. No entanto, apesar dos avanços do conhecimento nessa área, muitos pontos permanecem obscuros com relação aos mecanismos e as sequências de reações que culminam com a perda funcional de sistemas neuroquímicos em regiões específicas associadas ao desempenho motor.

Algumas das características clínicas da DP são, entre outras, a fadiga muscular, a dificuldade de recrutamento da unidade neuromotora e a rigidez de tronco que, juntas, criam dificuldades para a manutenção da postura ereta e de uma marcha normal, com ritmo e velocidade (Schaafsma *et al.*, 2003).

Outra doença neurodegenerativa, a esclerose múltipla (EM) tem como sintoma mais frequente e incapacitante a fadiga, que atinge cerca de 75 a 90% dos pacientes (Mendes *et*

al., 2000; Ward & Winters, 2003). Ela é definida como sintoma subjetivo e inespecífico, como “uma sensação de cansaço físico ou mental profundo, perda de energia ou mesmo exaustão, com características diferentes daquelas observadas na depressão ou fraqueza muscular” (Mendes *et al.*, 2000).

Novos estudos são necessários para que seja possível compreender melhor a fadiga na EM. Aparentemente existem mecanismos centrais e periféricos envolvidos na fisiopatologia da fadiga, porém, não é conhecida a relação entre a fadiga observada nos pacientes com EM e a fadiga muscular (Vercoulen *et al.*, 1996; Iriarte & Castro, 1998).

Uma doença menos comum, mas que também afeta o sistema motor é a ataxia de Friedreich. Conhecida pela degeneração espinocerebelar é uma doença progressiva de herança autossômica recessiva (OMIM, 229300), descrita pela primeira vez por Nicholas Friedreich, em 1863. O principal sintoma é a ataxia – no início mais evidente nos membros inferiores e, posteriormente, nos superiores. A dificuldade da marcha é progressiva e, por volta de 10-15 anos de evolução da doença, o paciente perde a capacidade de deambular. Os testes cerebelares, a resposta plantar e a sensibilidade vibratória e cinestésica, via de regra, estão alteradas e a fala apresenta um fluxo lento (Salisachs, 1974). A força e o trefismo muscular, em geral, mostram-se normais, alterando-se de forma mais evidente no final da doença, mais pela falta de movimentação – quando os pacientes já se encontram em cadeira de rodas. A abolição dos reflexos profundos e a presença de escoliose e de pés cavos constituem achados bastante característicos da doença (Salisachs, 1974).

Rötig *et al.* (1997) mostraram que, na ataxia de Friedreich, há uma deficiência múltipla das enzimas da cadeia respiratória ferro-enxofre dependentes, que são extremamente sensíveis aos radicais livres, gerando um estresse oxidativo decorrente do acúmulo de ferro na matriz

mitocondrial. Assim, os antioxidantes, quelantes de ferro e de cálcio, e as substâncias inibidoras da apoptose, constituem terapêuticas potenciais para as doenças neurodegenerativas. A possibilidade de utilização de um marcador para se monitorizar a eficácia do tratamento dessa doença – o 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8OH2'dG) surgiu na literatura como importante opção terapêutica, não só para a ataxia de Friedreich, como também para outras doenças neurodegenerativas como Alzheimer, doença de Parkinson e de Huntington (Shulz *et al.*, 2000; Sherer & Greenamyre, 2000) .

Em resumo, apesar do crescente progresso do conhecimento nessa área de distúrbios do movimento, todas as doenças mencionadas acima, exemplificam que até a presente data não se conhece as relações entre aspectos específicos do comportamento motor e os mecanismos moleculares que atuam como substratos desses sistemas. Portanto, independentemente da causa primária ou da evolução dos processos que resultam em diferentes tipos de disfunções motoras, muitos estudos são necessários para se entender essas associações entre eventos neuroquímicos centrais e periféricos e manifestações clínicas. Como um dos reflexos desses pontos obscuros, podemos citar as dificuldades no planejamento de intervenções fisioterapêuticas ou quimioterápicas sustentadas por um conhecimento dos mecanismos neurobiológicos/neuromusculares, os quais poderiam contribuir para se desenhar tratamentos mais racionais relacionados com os eventos interligados a esses distúrbios.

2. A tiamina, sua deficiência e aspectos motores

Dados obtidos por diferentes autores têm demonstrado que importantes estruturas encefálicas envolvidas na modulação e integração das respostas motoras (Lalonde & Strazielle, 2007) são seletivamente comprometidas na deficiência de tiamina, também conhecida como vitamina B1, destacando-se o cerebelo (Butterworth, 2003, Martin *et al.*, 2003), o corpo estriado

(Sjöquist *et al.* 1988, Yamashita *et al.*, 1993) e o córtex pré-frontal (Carvalho *et al.*, 2006). Portanto, modelos experimentais da deficiência de tiamina podem ser utilizados como instrumentos importantes em estudos que se pretende contribuir para o esclarecimento de aspectos relacionados à mecanismos neurobiológicos das funções ou disfunções motoras.

A tiamina foi isolada em 1926 por Jansen & Donath e, sintetizada pela primeira vez na década de trinta (Williams & Cline, 1936). A síntese dessa vitamina ocorre naturalmente em plantas, fungos e muitos outros microorganismos (Singleton & Martin, 2001). Entretanto, humanos e outros mamíferos não biossintetizam a tiamina, sendo dependentes de uma suplementação exógena.

A tiamina é hidrossolúvel e após ser captada pelos tecidos, pode ser fosforilada dando origem à forma ativa da tiamina, denominada tiamina pirofosfato ou difosfato (TPP ou TDP). Este derivado atua como cofator das enzimas transcetolase, complexo piruvato desidrogenase e α -cetoglutarato desidrogenase, enzimas chaves no metabolismo energético celular (Berg *et al.*, 2004). A figura 3 mostra um esquema indicando a participação de duas dessas enzimas. A atividade reduzida das três enzimas, devido à deficiência de tiamina, pode levar a uma redução na síntese de ATP, que por sua vez, pode causar danos/morte celular. Se o mecanismo responsável pelas disfunções e lesões observadas no sistema nervoso central (SNC) estivesse exclusivamente relacionado com uma redução na síntese de ATP, seria de se esperar que todos os neurônios, por serem aeróbicos, fossem afetados e, portanto, todas as regiões cerebrais seriam igualmente comprometidas. No entanto, apenas algumas regiões do SNC são susceptíveis aos efeitos da deficiência de tiamina (Irle & Markowitsch, 1983) e a privação, mesmo que parcial dessa vitamina desencadeia disfunções bioquímicas que podem preceder a morte celular.

Além do papel de tiamina no metabolismo energético celular, diversos autores têm proposto funções específicas dessa vitamina no SNC. Por exemplo, evidências obtidas em estudos com cultura primária de neurônios têm indicado uma possível função da tiamina na modulação de canais iônicos (Oliveira *et al.*, 2007). O papel da tiamina trifosfato (TTP) ainda permanece incerto, embora existam indícios que esta forma trifosforilada da vitamina tem um papel funcional na membrana da célula nervosa (Hass, 1988) e na modulação de canais de cloreto (Bettendorf *et al.*, 1993).

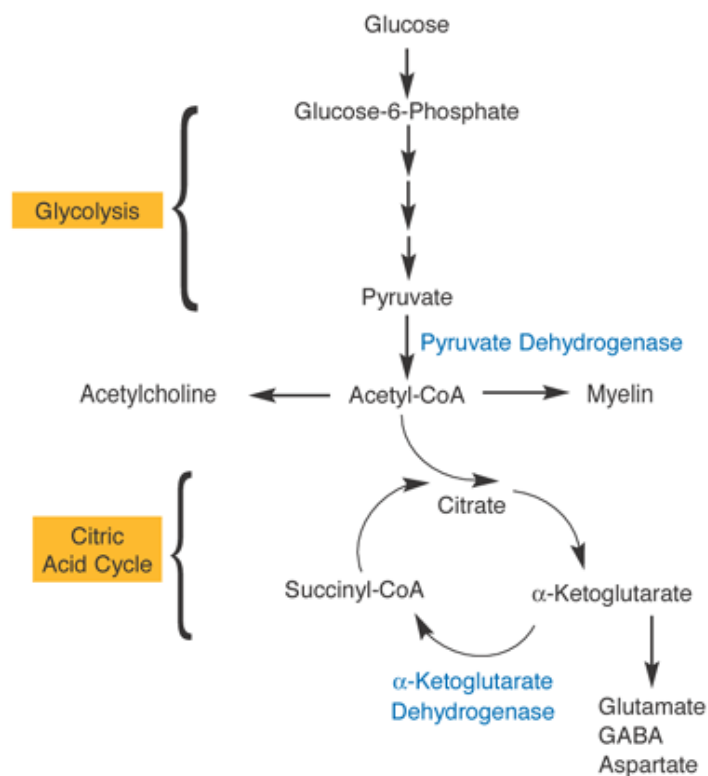


Figura 3. Esquema das vias metabólicas indicando duas das enzimas dependentes de tiamina: complexo piruvato desidrogenase e α -cetoglutarato desidrogenase, no metabolismo energético celular (Figura retirada de Martin *et al.*, 2003).

No SNC de pacientes com deficiência de tiamina foram observadas lesões predominantemente no tálamo, corpos mamilares, região periaquedutal, assoalho do quarto ventrículo, hipotálamo e vermis cerebelar (Torvik, 1987; Vitor *et al.*, 1989).

Experimentalmente, é possível reproduzir lesões em cérebros de ratos através da administração de uma dieta deficiente de tiamina associada ou não a uma administração parenteral de pirritiamina, um inibidor da pirofosfoquinase, enzima responsável pela produção da forma ativa da tiamina, a TPP (Hakim & Colmant, 1983; Hass, 1988; Vortmeyer & Colmant, 1988; Langlais *et al.*, 1996). Os sinais característicos da deficiência de tiamina em animais são anorexia, queda de pêlo, hiperatividade a estímulos, hipotonia postural, ataxia, perda do reflexo de endireitamento e convulsões, podendo evoluir para a morte (Mousseau *et al.*, 1996; Ciccia & Langlais, 2000). Em ratos, as perdas celulares causadas pela deficiência de tiamina podem ocorrer no hipocampo, cerebelo, amígdala, tálamo, colículo inferior e complexo olivar superior (Irle & Markowitsch, 1983; Vortmeyer & Colmant, 1988), além da degeneração de axônios do córtex, perda de neurônios e células da glia no tálamo medial e corpos mamilares (Langlais & Zhang, 1997).

Apesar dos vários estudos realizados, os mecanismos moleculares responsáveis pelas lesões cerebrais induzidas pela deficiência de tiamina não são completamente conhecidos. Alguns autores relacionaram a morte neuronal ao estresse oxidativo gerado por danos mitocondriais (Park *et al.*, 2000), descontrole do metabolismo oxidativo (Pannunzio *et al.*, 2000), acidose (Hakim & Pappius, 1983), estresse do retículo endoplasmático (Wang *et al.*, 2007) e à redução de atividade das enzimas α -cetoglutarato desidrogenase (Butterworth *et al.*, 1986), transcetolase (Guigère & Butterworth, 1987) e complexo piruvato desidrogenase (Butterworth, 1985), que levam a um déficit energético no cérebro (Lavoie & Butterworth, 1995). A redução na atividade da α -cetoglutarato desidrogenase pode também levar a um aumento na concentração do glutamato extracelular causando um mecanismo de excitotoxicidade que induziria a morte neuronal (Hazell, 1993). Deste modo, é provável que os mecanismos pelos quais a deficiência de tiamina cause lesões neuropatológicas sejam múltiplos e regiões cerebrais diferentes possuam vulnerabilidade distinta. Além disso, outros

aspectos devem ser considerados, como o fato do complexo piruvato desidrogenase ser necessário para produzir acetil-CoA, precursor do neurotransmissor acetilcolina e também de ácidos graxos importantes na produção de mielina, garantindo assim um funcionamento neuronal apropriado. No ciclo do ácido cítrico a α -cetoglutarato desidrogenase, que depende de TDP, também desempenha um papel na manutenção dos níveis dos neurotransmissores glutamato, ácido γ -aminobutírico (GABA) e aspartato, assim como na síntese protéica (Martins *et al.*, 2003).

Como mencionado no início desta sessão, a deficiência de tiamina compromete seletivamente diferentes estruturas encefálicas, entre elas o cerebelo (Butterworth, 2003; Martin *et al.*, 2003). A degeneração do cerebelo é encontrada tanto em alcoolistas com *Síndrome de Wernicke Korsakoff* (SWK) quanto sem SWK, o que indica que a deficiência de tiamina provavelmente é a causa predominante dessa degeneração em alcoolistas (Charness, 1993). A SWK é a doença neurológica mais claramente associada com DT em humanos, a qual caracteriza-se por perda severa de memória, déficits colinérgicos e seletiva morte celular em regiões específicas do cérebro (Victor *et al.*, 1989; Todd e Butterworth, 1999; Ke *et al.*, 2003). Em estudos de autópsia, 40% dos alcoolistas apresentaram sinais de lesão (Torvik, 1987), que é caracterizada por retração de determinadas regiões do cerebelo, área envolvida principalmente na coordenação muscular.

A fim de entender alguns dos aspectos motores, Freeman *et al.* (1987), em estudo usando modelo experimental de deficiência de tiamina, relataram a diminuição do comportamento exploratório no teste em “campo aberto” (*open field*), tanto no que diz respeito à distância percorrida quanto ao número de levantamentos sob as patas traseiras, o que pode indicar, além de disfunção no componente motivacional, alterações relacionadas à função motora dos animais. Os efeitos da deficiência de tiamina no desenvolvimento motor de animais também

foram avaliados nas proles de mães submetidas à deficiência de tiamina durante a lactação e a gestação (Bâ & Seri, 1993, 1995; Bâ, 2008). Conforme resultados apresentados por esses autores, a deficiência de tiamina está associada aos baixos níveis de desenvolvimento funcional para algumas habilidades relacionadas ao controle motor dos animais (Bâ, 2008). Da mesma forma, nosso grupo de pesquisa (Ferreira-Vieira *et al.*, 2011 submetido) observou que animais provenientes de mães restritas de tiamina, no período perinatal, apresentam alterações em aspectos motores quando avaliados no *Rotarod* e no teste de impressão de patas. Foram verificadas uma redução significativa no tempo de permanência na barra giratória do *Rotarod*, na velocidade de 25 rpm, e um aumento na largura do passo. Nesse mesmo estudo, as análises neuroquímicas mostraram um aumento e uma diminuição significativas das concentrações de GABA no tálamo e glutamato no cerebelo, respectivamente, dos animais nascidos de mães restritas. Esses resultados sugerem que os indivíduos provenientes de mães restritas de tiamina apresentam déficits relacionados à função motora e, além disto, análises de regressão indicam um papel do GABA em aspectos específicos da função motora.

3. Isolamento Social e aspectos motores

Criação de roedores em condições de isolamento social produz uma grande variedade de alterações comportamentais, quando os animais isolados são comparados com animais alojados em grupo (Valzelli, 1973; Eison & Morgan, 1977; Heidbreder *et al.*, 2000; Lapid *et al.*, 2003). Coletivamente as mudanças comportamentais observadas são consistentes com a proposta de que os ratos criados em isolamento social são incapazes de processar adequadamente os estímulos ambientais. No período de desmame, o isolamento social representa um modelo que leva a alterações comportamentais, neuroquímicas e fenotípicas associadas à depressão, ansiedade e esquizofrenia (Eison e Morgan, 1977, Weiss e Feldon, 2001; Pryce *et al.*, 2005; Fone & Porkess, 2008).

Mesmo nas primeiras experiências, realizadas na década de 1960 e 1970, ratos criados em isolamento social apresentaram hipersensibilidade à manipulação, sobressaltos e reações que caracterizavam ansiedade (Koch & Arnold, 1972; Morgan, 1973; Sahakian *et al.*, 1977). Esses dados foram a base para a descrição da “síndrome de estresse induzida por isolamento” (Valzelli, 1973, Holson *et al.*, 1991). O isolamento social em animais é considerado um empobrecimento ambiental, e tem sido usado como um paradigma em estudos de estresse crônico leve, e em estudos que visam compreender a gênese da depressão e distúrbios emocionais (Heidbreder *et al.*, 2000; Miura *et al.*, 2002; Sáenz *et al.*, 2006; Günther *et al.*, 2008). Autores que estudaram o papel do sistema endócrino em condições indutoras de estresse, como a privação social, sugeriram que os organismos apresentam adaptações sequenciais, desenvolvendo reações e sintomas indicativos de irritabilidade (Gersh & Fowles, 1979). Outros estudos constataram que tanto as ondas eletroencefalográficas quanto a secreção de hormônios indicadores de estresse são modificadas em animais sob isolamento (Ehlers *et al.*, 1996; Genaro *et al.*, 2004).

Este isolamento social altera a atividade de vários circuitos neuroquímicos em ratos adultos, especialmente os níveis de monoaminas cerebrais (Schulkin *et al.*, 1998; Miura *et al.*, 2002) mesmo durante diferentes períodos de isolamento (Rilke *et al.*, 1998a; Miura *et al.*, 2002; Dronjak & Gavrilovic, 2006, Sáenz *et al.*, 2006). Dados da literatura relativos a mudanças no sistema serotoninérgico em animais submetidos ao isolamento social são contraditórios. O nível de serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) em animais isolados, por até quatro semanas, é mais elevado no córtex pré-frontal, núcleo accumbens, hipocampo e mesencéfalo, mas sem alteração em núcleos da rafe (Heidbreder *et al.*, 2000; Miura *et al.*, 2006; Brenes *et al.*, 2008). No entanto, animais isolados apresentam uma menor concentração do ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA), metabolito da serotonina (5-HT), com redução no striatum dorsal e no hipocampo (Bakshi *et al.*, 1996). Rilke *et al.* (1998a) encontraram uma redução na taxa de

renovação, 5-HIAA/5-HT, do sistema serotoninérgico em todo o cérebro. Em contraste, foi observado um nível mais elevado da taxa de renovação 5-HT no córtex pré-frontal em ratos isolados, logo após o desmame (Brenes *et al.*, 2008). Além das alterações serotoninérgicas, foram observados uma hipersensibilidade dos receptores adrenérgicos e hipossensibilidade dos receptores dopaminérgicos no córtex cerebral de ratos isolados (Isovich *et al.*, 2001). Em outros estudos, há evidências de uma redução nos marcadores de interneurônios GABAérgicos (Lipska *et al.*, 2003; Pillai-Nair *et al.*, 2005; Penschuck *et al.*, 2006; Endo *et al.*, 2007). A proteína marcadora de interneurônio (reelin) está envolvida no desenvolvimento do córtex pré-frontal, uma estrutura intimamente relacionada com as respostas comportamentais. Cassidy *et al.*, (2010) associaram a alteração da expressão da proteína (reelin) com o surgimento de déficits comportamentais em animais isolados.

O isolamento de um animal para análises experimentais é uma das situações mais comumente utilizadas por cientistas para estudar alterações na dieta, efeito de drogas e/ou aspectos comportamentais (Ehlers *et al.*, 1996; Genaro & Schmidek, 2002; Genaro *et al.*, 2004). Em diferentes trabalhos foi demonstrado que o comportamento social influencia o desenvolvimento de ratos de laboratório, principalmente alterando as relações hormonais do eixo hipotálamo-hipófise. Essas alterações devem ser levadas em consideração em determinados estudos que visam avaliar aspectos fisiológicos, patológicos ou o efeito de drogas. Estudos realizados com diferentes espécies como peixes, macacos e ratos demonstraram que os animais submetidos ao isolamento apresentaram mudanças comportamentais, como alterações no padrão de conduta, modificações no comportamento exploratório, manifestações de agressividade, de ansiedade, depressão e estresse (Gomes & Morgan, 1993; Pérez *et al.*, 1997; Genaro *et al.*, 2004).

Em diversos trabalhos, nos quais os autores usaram ratos isolados, foram observadas alterações comportamentais como hiperatividade locomotora (Sahakian *et al.*, 1977; Gentsch *et al.*, 1982; Heidbreder *et al.*, 2000; Elliot e Grunberg, 2005; Bianchi *et al.*, 2006; McLean *et al.*, 2008), aumento da ansiedade (Weiss *et al.*, 2004), prejuízos em tarefas de aprendizagem e memória (Larsson *et al.*, 2002; Schrijver *et al.*, 2002; Bianchi *et al.*, 2006; McLean *et al.*, 2008), e aumento da imobilidade no teste de natação forçada (Brenes *et al.*, 2008; Brenes & Fornaguera, 2008). Além disso, dados obtidos em uma série de estudos *in vivo* e *pós-mortem*, com ratos isolados, mostraram níveis de dopamina aumentados no núcleo accumbens, e diminuídos no estriado e na amígdala (Jones *et al.*, 1992; Heidbreder *et al.*, 2000; Leng *et al.*, 2004) e diminuição dos níveis de serotonina no córtex e no hipocampo (Bickerdike *et al.*, 1993; Jaffe *et al.*, 1993; Rilke *et al.*, 2001; Miura *et al.*, 2002, 2005; Brenes *et al.*, 2008; Brenes & Fornaguera, 2008). Com relação à função cognitiva, um período de quatro semanas de isolamento social, em ratos adultos, foi suficiente para causar déficits de memória no teste de reconhecimento de objeto (Bianchi *et al.*, 2006).

4. Circuitos Glutamatérgico, GABAérgico e Comportamento Motor

Glutamato é o principal aminoácido envolvido em respostas sinápticas excitatórias no SNC, local onde se encontra distribuído de maneira ampla e uniforme (Salinska & Stafiej, 2003). De acordo com Watkins & Jane (2006), a participação desse aminoácido em respostas excitatórias é possível pela sua capacidade de ativar, após sua liberação no espaço extracelular, uma variedade de receptores pós-sinápticos específicos, que em última instância, culminam com a abertura de canais permeáveis aos íons cálcio e sódio (Meldrum, 2000).

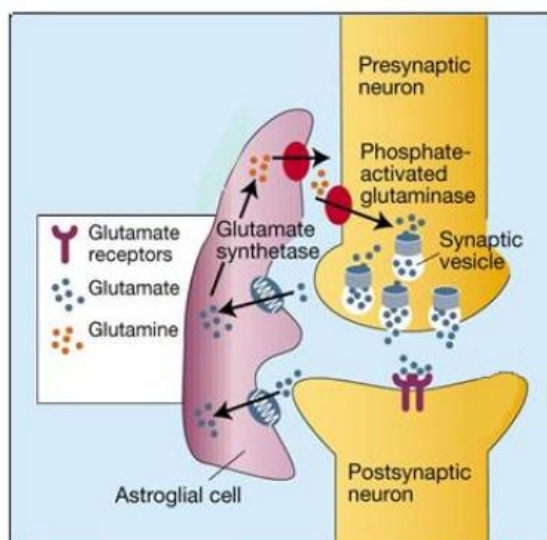


Figura 4. Representação esquemática de um terminal glutamatérgico mostrando o ciclo de liberação e recaptação do neurotransmissor na fenda sináptica pelo neurônio e astrócito (Figura retirada de Rothstein, J. D. *Neurobiology: bundling up excitement. Nature. 2000; 407: 141-143*).

A figura 4 (acima) apresenta de maneira esquemática o ciclo de liberação e recaptação do glutamato na fenda sináptica pelo neurônio e astrócito. O glutamato liberado na fenda sináptica, após um evento excitatório pré-sináptico, difunde-se para o terminal pós-sináptico onde se liga aos receptores específicos desencadeando uma cascata de reações celulares. Um dos mecanismos de inativação do processo é a recaptação do neurotransmissor, via transportadores específicos, para o neurônio pré-sináptico e/ou astrócito (Rothstein, 2000).

Diversos autores descrevem a participação do glutamato em vários processos fisiológicos como a neurogênese, migração celular, plasticidade neuronal e processos de aprendizagem e memória (McGee & Brecht, 2003). Além disto, resultados obtidos por Ozawa e cols. (1998) também têm sugerido a participação deste neurotransmissor em atividades relacionadas a funções motoras.

Wardas e cols. (1997), ao realizarem ensaios com ligantes radioativos em ratos jovens e adultos, mostraram evidências da participação do sistema glutamatérgico em processos relacionados à motricidade, sugerindo que distúrbios motores encontrados em ratos idosos

podem estar relacionados às alterações em subunidades de receptores glutamatérgicos centrais. Sanchez- Perez e cols. (2005) também mostraram que os receptores de glutamato cerebelares do tipo N-Metil D-Aspartato (NMDA) são essenciais para a aquisição do aprendizado motor e para a execução de atividades relacionadas à coordenação motora, corroborando a participação do circuito glutamatérgico no controle motor.

O aminoácido γ -aminobutírico (GABA) é um neurotransmissor inibitório presente nos sistemas nervoso central e periférico. Ele é sintetizado a partir do glutamato e promove a redução da excitabilidade neuronal ao se ligar em receptores ionotrópicos (GABA_A e GABA_C) que são canais iônicos permeáveis ao íon cloreto e a receptores metabotrópicos (GABA_B), acoplados a proteína G, que regulam a condutância de canais de potássio e cálcio (Ben-Ari *et al.*, 2007). A figura 5 mostra um esquema com os componentes da transmissão GABAérgica.

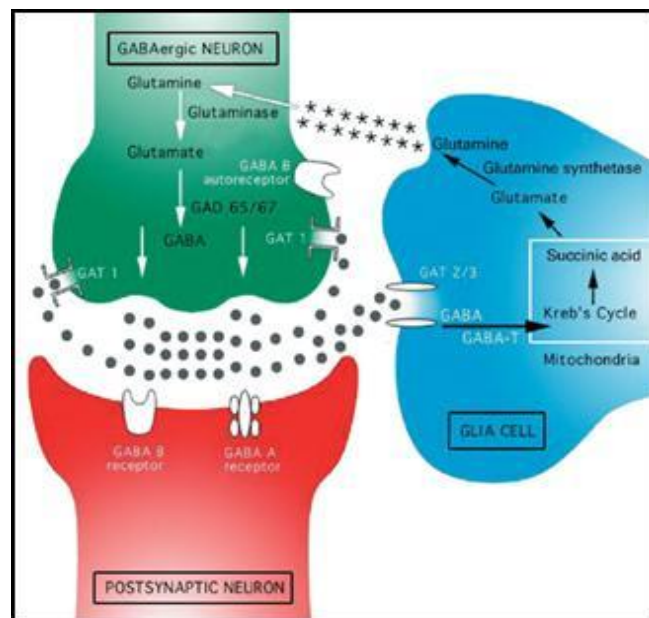


Figura 5: Representação esquemática de um terminal sináptico. O GABA é sintetizado a partir do glutamato. Após liberado na fenda sináptica ele pode se ligar a receptores específicos nos neurônios pós-sinápticos ou ser recaptado por transportadores localizados nas células gliais e neurônios pré-sinápticos. (Figura foi retirada de Brambilla, P.; Perez, J.; Barale, F.; Schettini, G. & Soares, J.C. GABAergic dysfunction in mood disorders. *Molecular Psychiatry*. 2003; 8: 721-737).

No córtex cerebral já foi descrito o papel do GABA no controle inibitório neuronal e processamento de informação (Krnjevic, 1997), na plasticidade neuronal (Jones, 1993) e na sincronização da rede neuronal (Buszaki & Chrobak, 1995). Além dessas funções, de acordo com Chevalier & Deniau, (1990) é possível também que o GABA atue na modulação de circuitos motores, uma vez que foi observada a presença de importantes vias GABAérgicas nos núcleos da base, os quais, dentre outras funções auxiliam no controle motor (Chen & Yung, 2004).

Consideração Geral:

Dada a importância da tiamina em regiões cerebrais específicas (Torvik, 1987; Vitor *et al.*, 1989) e a influência do isolamento social em aspectos comportamentais (Gomes & Morgan, 1993; Pérez *et al.*, 1997; Genaro *et al.*, 2004), estudos que objetivam esclarecer os mecanismos neuroquímicos afetados pela deficiência dessa vitamina e pela privação social são importantes para se compreender a relação entre disfunções neurais e aspectos comportamentais específicos, como por exemplo, motores. Estes estudos podem auxiliar na elucidação dos mecanismos neurofisiológicos que atuam como substratos biológicos dessas funções comportamentais e, além disto, podem contribuir para o conhecimento dos distúrbios causados pela deficiência e/ou isolamento social.

Vários pesquisadores, incluindo o grupo de pesquisa do Laboratório de Neurociência Comportamental e Molecular (LaNec) da Universidade Federal de Minas Gerais têm investigado os efeitos deletérios da deficiência de tiamina no sistema nervoso de ratos adultos. Esse modelo experimental é um importante instrumento para se estudar os mecanismos e sistemas envolvidos com processos neurodegenerativos e suas relações com disfunções em aspectos comportamentais. Os dados obtidos indicam que a deficiência dessa vitamina resulta em alterações neuroquímicas, emocionais, cognitivas e motoras. No entanto, os mecanismos moleculares responsáveis pelas lesões/disfunções causadas pela deficiência dessa vitamina, assim como a sequência de eventos que culminam com o aparecimento dos sinais clínicos ainda não estão completamente esclarecidos.

Estudos prévios realizados pelo nosso grupo mostraram também que a deficiência maternal de tiamina pode causar, na prole, distúrbios motores e no equilíbrio, relacionados com os níveis de GABA e glutamato em regiões específicas do SNC (Ferreira-Vieira *et al.*, 2011 submetido) Esses aminoácidos podem funcionar como neurotransmissores modulatórios no SNC e ter um papel importante em funções motoras. Entretanto, até o presente momento, não foram estudados os efeitos da deficiência dessa vitamina, em animais adultos, sobre parâmetros motores e as suas possíveis relações com concentrações de GABA e glutamato em regiões específicas do SNC.

Outro aspecto importante a ser considerado é o fato de que a deficiência de tiamina ainda é um fator preocupante em países em desenvolvimento, países atingidos por guerras e catástrofes naturais que necessitam de ajuda humanitária e países asiáticos cuja base da alimentação é o arroz polido. Uma população carente dessa vitamina pode sofrer alterações no SNC, com consequências em diferentes aspectos do processo de desenvolvimento e comportamento dos indivíduos. O entendimento do papel da tiamina em aspectos

comportamentais pode contribuir para um melhor entendimento da relação entre parâmetros neurobiológicos e disfunções em aspectos específicos do comportamento. Esse conhecimento pode ser utilizado como base para estudos em diferentes populações carentes, resultando na implantação de políticas públicas mais adequadas. Além disso, a carência de tiamina pode adquirir caráter mais significativo devido ao crescente número de indivíduos com dependência alcoólica, uma vez que o consumo crônico de etanol pode levar à deficiência de tiamina (Thompson *et al.*, 1988; Langlais & Savage, 1995).

A utilização do modelo experimental de deficiência de tiamina requer o isolamento dos animais, para viabilizar os registros individuais de consumo de ração e água. No entanto, sabe-se que condições ambientais, tais como o isolamento social, também podem afetar o funcionamento do SNC. Diversos métodos têm sido utilizados para analisar as relações entre o isolamento social e a manutenção dos animais em grupos, merecendo destaque as avaliações da atividade exploratória, interação social, atividade locomotora, reatividade, comportamento de vigilância e vocalização (Renner *et al.*, 1992). Evidências científicas mostram que a privação social, em ratos, desencadeia alterações no padrão emocional refletindo em mudanças comportamentais e endócrinas (Genaro *et al.*, 2004). Neste sentido, tem sido observado que ratos submetidos ao isolamento social apresentam modificações na homeostasia dos sistemas nervoso e endócrino. A preservação da homeostasia requer adaptações contínuas neurais, endócrinas e comportamentais para controlar alterações causadas por estressores internos ou externos. Respostas comportamentais incluem alterações cognitivas e sensoriais, aumento do alerta, intensificação da memória seletiva, supressão de comportamentos e analgesia (McEwen, 2000; Pacak & McCarty 2000). Portanto, considerando o exposto, desenhos experimentais no qual os efeitos do isolamento são avaliados/controlados se tornam relevantes.

É importante também salientar que os efeitos do isolamento, em ratos, sobre os parâmetros motores e as suas possíveis relações com concentrações de GABA e glutamato em regiões específicas do SNC ainda não foram estudados.

Trabalhos que possibilitem ampliar os conhecimentos acerca das disfunções cerebrais causadas pela deficiência de tiamina e/ou pelo isolamento social adquirem relevância à medida que podem contribuir para o esclarecimento dos mecanismos que envolvem comprometimento de funções biológicas e comportamentais devido à ausência dessa vitamina associada ou não ao fator isolamento social. O entendimento desses aspectos pode ter importantes implicações para a prevenção, identificação e tratamento das doenças relacionadas à deficiência de tiamina e/ou ao isolamento social. Além disso, é importante salientar que a investigação das alterações bioquímicas decorrentes da deficiência de tiamina e/ou da privação social pode auxiliar no entendimento dos substratos biológicos relacionados aos aspectos comportamentais, como atividade motora e, também dos papéis da tiamina e da interação social nesses processos. Por exemplo, estudos são necessários para se entender as associações entre eventos neuroquímicos centrais e periféricos e manifestações clínicas de distúrbios motores. A relativa falta de estudos nesse campo se reflete nas dificuldades encontradas no planejamento de intervenções fisioterápicas ou quimioterápicas sustentadas por um conhecimento dos mecanismos neurobiológicos/neuromusculares.

1. Geral

Estudar, em modelo experimental animal, os efeitos da deficiência crônica de tiamina e/ou do isolamento social, sobre parâmetros neuroquímicos e sobre aspectos comportamentais motores de ratos adultos.

2. Específicos

2.1. Estabelecer as condições para aplicação do método de avaliação do desempenho motor dos animais - equilíbrio e coordenação motora fina através do teste *Beam Balance*.

2.2. Em ratos adultos, submetidos ou não à deficiência de tiamina e/ou ao isolamento social, avaliar:

2.2.1. o desempenho em tarefas de atividade motora nos Testes *Beam Balance*, *Rotarod* e Impressão de Patas.

2.2.2. as concentrações de GABA e glutamato no cerebelo, estriado, tálamo e córtex pré-frontal.

2.2.3. as possíveis correlações entre os parâmetros comportamentais e neuroquímicos (itens 2.2.1 e 2.2.2).

1. Delineamento Experimental

Foram utilizados 42 ratos machos da linhagem Wistar, com aproximadamente três meses de idade, provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, mantidos no biotério em ciclo de 12 horas claro/escuro, recebendo água e ração *ad libitum* durante todo o experimento. Todos os procedimentos experimentais foram registrados e submetidos ao Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA), com o número de protocolo 171/11.

Os animais foram divididos em grupos de acordo com os seguintes tratamentos: (i) animais tratados com ração padrão e mantidos um animal por gaiola (isolamento social) = **grupo padrão isolado** (n = 13), (ii) animais tratados com ração deficiente em tiamina e mantidos um animal por gaiola (isolamento social) = grupo DT isolado (n = 13), (iii) animais tratados com ração padrão e em mantidos em grupo de 4 por gaiola = grupo padrão agrupado (n = 8) e (iv) animais tratados com ração deficiente em tiamina e mantidos em grupo de 4 por gaiola= grupo DT agrupado (n = 8). O peso corporal dos animais assim como o consumo de água e ração foram registrados ao longo de todo o experimento.

As rações, padrão e deficiente em tiamina, foram produzidas no próprio Laboratório (LaNeC), conforme detalhado nas tabelas abaixo, identificadas com os números 1, 2 e 3. O episódio de DT foi exclusivamente alimentar e foi mantido até os animais apresentarem sinais clínicos neurológicos, como convulsões e/ou perda de reflexo de endireitamento (Mosseau *et al.*, 1996; Ciccia & Langlais, 2000). Essas alterações ocorreram por volta do 55º dia após o início do episódio de DT, sendo interrompido

com injeções intraperitoneais de tiamina (1mg/kg de peso). Após o período de recuperação clínica (25-30 dias) os ratos foram submetidos aos testes comportamentais para avaliações motoras, conforme detalhado abaixo. Vinte e quatro horas após o término dos testes comportamentais, os animais foram mortos por decapitação para a avaliação dos parâmetros neuroquímicos. A **figura 6** apresenta um esquema do delineamento experimental descrito acima.

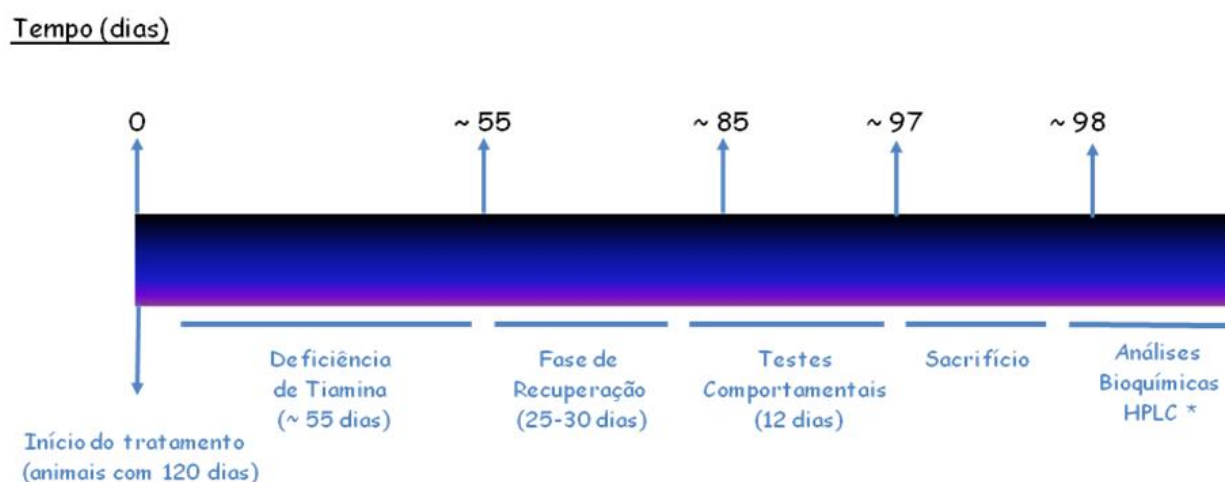


Figura 6 - Esquema do delineamento experimental adotado no trabalho. A escala temporal em dias corresponde à cronologia experimental.

Nutrientes	Quantidade em g/Kg de ração
Amido de Milho	507
Polvilho	169
Caseína*	200
Óleo de Soja	50
Mistura de Sais ^a	50
Mistura de Vitaminas ^b	10
Celulose	10
Colina-HCl	4,0
Tocoferol (vitamina E)	0,4
BHT (conservante)	0,1

Tabela 1: Lista dos nutrientes (g/kg de ração) constituintes das rações produzidas no laboratório. *A caseína da ração deficiente em tiamina foi autoclavada, secada e triturada antes do uso para garantir a ausência de vitamina B1 na mesma.

^a Ver tabela 2

^b Ver tabela 3

Sais minerais	% por mistura de sais
NaCl	13,93
KI	0,08
MgSO ₄ .7H ₂ O	5,73
CaCO ₃	38,14
MnSO ₄ .H ₂ O	0,40
FeSO ₄ .7H ₂ O	2,70
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,05
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,05
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,02
KH ₂ PO ₄	38,90

Tabela 2: Composição da mistura de sais

Vitaminas	% por mistura de vitaminas
Acetato de Retinol	0,40
Colecalciferol	0,06
Menadiona	0,05
i-Inositol	1,00
Niacina	0,40
Pantotenato de Cálcio	0,40
Riboflavina	0,08
Tiamina-HCl*	0,05
Piridoxina-HCl	0,05
Ácido fólico	0,02
Biotina	0,004
Vitamina B ₁₂	0,0003
Sacarose	97,49

Tabela 3: Composição da mistura de vitaminas.

* A ração deficiente em tiamina foi produzida sem a adição de Tiamina-HCl. A constituição dos dois tipos de rações - padrão e deficiente - foi a mesma, exceto com relação à presença ou não de tiamina.

2. Estudo Comportamental

AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO MOTOR: Coordenação e equilíbrio

2.1. Trave de Equilíbrio (Beam Balance)

O teste *Beam Balance* (Trave de Equilíbrio) foi utilizado para medir o grau de coordenação motora fina e o equilíbrio. Foi o primeiro teste comportamental realizado, um dia após o período de recuperação da deficiência de tiamina. O método, com modificações, foi executado de acordo com os seguintes autores: Feeney *et al.*, (1981), Fujimoto *et al.*, (2004) e Kharatishvili, *et al.*, (2009) e se encontra detalhado abaixo.

2.1.1. Equipamento

O aparelho (Fig. 7) consiste de uma base de madeira medindo 31,5 cm de comprimento e 1,8 cm de largura, elevada a 80 cm acima do chão por um suporte de madeira.

2.1.2. Procedimento

O teste foi realizado durante três dias consecutivos. A cada dia os ratos eram colocados individualmente sobre a base durante 60 segundos em uma única tentativa. Uma caixa contendo maravalha foi colocada abaixo do equipamento com o objetivo de amortecer a queda do animal. Quando o animal caía era retirado do equipamento e o tempo de permanência (latência) sobre a base era registrado (Feeney *et al.*, 1981, Fujimoto *et al.*, 2004; Kharatishvili, *et al.*, 2009). Os dados foram expressos em percentagem como a média da latência para cada um dos quatro grupos em cada tentativa. Os testes foram filmados com o auxílio de uma câmera digital *Sony Cybershot*, 7.2 megapixels para uma posterior avaliação do desempenho dos animais.



Figura 7 - Fotografia do equipamento - Trave de equilíbrio - utilizado para a avaliação do equilíbrio e coordenação motora fina dos animais.

2.2. Teste Rotarod

O teste do *Rotarod* foi utilizado para avaliar o equilíbrio e a coordenação motora grossa dos ratos. Foi realizado imediatamente após o último dia de teste no *Beam Balance* e foi adaptado a partir dos métodos descritos por Shi *et al.*, 2007 e Simola *et al.* 2008.

2.2.1. Equipamento

O equipamento *Rotarod* utilizado (Fig. 8) no presente estudo é um aparelho composto por um cilindro giratório de 5 cm de diâmetro e 28 cm de comprimento posicionado horizontalmente a 40 cm de uma plataforma. O cilindro giratório está conectado a um motor elétrico que funciona em diferentes velocidades.



Figura 8 - Fotografia do equipamento *Rotarod* utilizado para a avaliação do equilíbrio e coordenação motora dos animais.

2.2.2. Procedimento

O protocolo utilizado foi adaptado a partir do descrito por Shi et al., 2007 e Simola *et al.* (2008) e consistiu de uma etapa de aclimatação, uma de treinamento e uma de teste. Durante as *sessões de aclimatação*, que foram realizadas por três dias consecutivos, os ratos foram colocados e deixados sobre o cilindro giratório por 5 minutos, com o aparelho desligado, em três tentativas/dia, sendo os intervalos inter tentativa de 30 minutos. Posteriormente, foram realizadas as *sessões de treinamento*, na qual os animais foram treinados durante três dias consecutivos a permanecerem sobre o cilindro giratório a uma velocidade constante de 5 rpm. As sessões de treinamento constituíram-se de duas tentativas/dia para cada rato, durante 5 minutos e, também com intervalos de 30 minutos entre as tentativas. Durante o treino, se o animal caísse, era reconduzido à barra pelo experimentador. As *sessões de teste* foram realizadas em dois dias, 24 e 48 horas após o final do último dia de treinamento. Durante o treinamento e teste, o animal foi colocado sobre o cilindro em rotação e, para permanecer sobre a barra giratória o animal tinha que tentar manter o corpo em equilíbrio, realizando todos os ajustes posturais necessários, através da coordenação dos movimentos de suas quatro patas (Wang *et al.*, 2006).

O primeiro dia de teste, realizado 24 horas após o final do treinamento, consistiu em três tentativas com duração de 5 minutos cada, com velocidade constante de 5 rpm e com intervalos de 30 minutos entre as tentativas. Para o teste realizado 48 horas após o último dia de treinamento, a velocidade constante do aparelho foi ajustada para 25 rpm e o animal foi submetido às três tentativas com intervalos também de 30 minutos (Dhir *et al.*, 2008). Quando o animal sofria uma queda, o mesmo era retirado do aparelho e o tempo de permanência (latência) sobre o cilindro era registrado. Os dados foram

expressos em percentagem como a média da latência para cada um dos quatro grupos em cada tentativa. Em todas as tentativas da aclimação, treino e testes, os animais foram colocados perpendicularmente ao eixo do cilindro, com a cabeça voltada em direção oposta ao sentido da rotação.

2.3. Teste de Impressão de Patas

Esse teste foi utilizado com a finalidade de avaliar o padrão da marcha dos animais. Ele foi realizado imediatamente após o último dia de teste no *Rotarod* e foi adaptado a partir do método descrito por Lagrán *et al.* (2004), conforme detalhado abaixo.

2.3.1. Equipamento

O aparato (Fig. 9) consiste em um “corredor” de madeira (10x10x70cm), forrado com papel branco, contendo uma caixa escura em uma de suas extremidades (reforço positivo) e posicionado em uma sala iluminada (estímulo aversivo).

2.3.2. Procedimento

Os roedores naturalmente procuram se alojar em ambientes mais seguros e pouco iluminados, assim, quando o animal foi colocado na extremidade do corredor oposta à caixa, ele tende naturalmente a caminhar em direção à mesma. As patas traseiras dos animais foram previamente pintadas com tinta preta não tóxica, para que ao caminhar sobre o papel, as pegadas de suas patas fossem impressas/registradas. Este procedimento foi repetido pelo menos quatro vezes (4 tentativas) para cada animal.



Figura 9 - Fotografia do equipamento utilizado no Teste de Impressão de Patas, para a avaliação dos componentes da marcha dos ratos, comprimento e largura dos passos.

O padrão da marcha, de cada animal, foi registrado através de quatro ciclos de marcha para cada tentativa e os dados foram expressos como a média de pelo menos três tentativas. Um ciclo completo de marcha foi definido previamente por Lagrán *et al.* (2004), como a distância de um par de patas traseiras para o próximo par de patas traseiras. Dois parâmetros foram avaliados: o comprimento e a largura do passo. O comprimento do passo foi medido como a distância média de locomoção entre uma pata e a próxima imediatamente à frente, e a largura foi medida como a distância média entre as patas traseiras, direita e esquerda. Essas variáveis foram expressas em milímetros.

3. Dissecação do cérebro

Um dia após o último teste comportamental, os animais foram decapitados, o encéfalo foi rapidamente retirado da cavidade craniana e as regiões de interesse foram dissecadas de acordo com as coordenadas estereotáxicas apresentadas por Paxinos & Watson (2004). O cerebelo foi retirado e o cérebro foi colocado ventralmente sobre uma superfície com indicações de escala milimetrada. Tomando-se como ponto zero a parte mais distal da região anterior, um corte coronal foi feito a 2 mm na região antero-

posterior para a retirada do córtex pré-frontal. Posteriormente, foi realizado um corte sagital, separando os dois hemisférios, para possibilitar a visualização da região medial diencefálica e permitir a retirada dos tálamos. Em seguida, o cérebro foi cortado em fatias coronais de 1 mm para a remoção do estriado. A partir de quarta fatia era possível visualizar o estriado, região caracterizada por estrias visíveis a olho nu. Todos os procedimentos para a separação das regiões encefálicas foram executados a baixa temperatura, sobre uma *Placa de Petri* invertida e sobreposta em pedaços de gelo.

4. Estudos Bioquímicos

Determinação da concentração de GABA e glutamato

A determinação das concentrações dos aminoácidos GABA e glutamato nas amostras biológicas foi realizada através da técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC= *High Performance Liquid Chromatography*), usando o método desenvolvido por nosso grupo (Freitas-Silva *et al.*, 2009), conforme descrito abaixo.

4.1. Processamento das amostras

As amostras de cerebelo, estriado, tálamo e córtex pré-frontal foram separadamente homogeneizadas, e um volume correspondente a 10mg de cada estrutura foi homogeneizada em 15 volumes de solução constituída por metanol e água (85:15 v/v). Em seguida, a suspensão foi centrifugada (Sorvall RC-5B), a 4° C, durante 15 minutos, em uma força centrífuga relativa de 7.800 x g. O sobrenadante obtido foi coletado e mantido no gelo até ser submetido ao processo de derivatização.

4.2. Procedimento de Derivatização

O objetivo da derivatização é aumentar a sensibilidade de detecção e a seletividade da separação cromatográfica. A derivatização das amostras foi realizada conforme descrito previamente por Mengerink *et al.* (2002) e Kutlán & Molnar-Perl (2003). A reação de derivatização (Fig. 10) foi feita misturando-se 200 μL de amostra (sobrenadante), 40 μL de orto-oftaldeído (OPA) metanólico (5 mg/mL) preparado no dia do ensaio, 150 μL de tampão borato (pH 9,9) e 10 μL de ácido 3-mercaptopropiônico (MPA). A solução resultante foi agitada e injetada no sistema cromatográfico em um tempo máximo de 1 minuto, à temperatura ambiente.

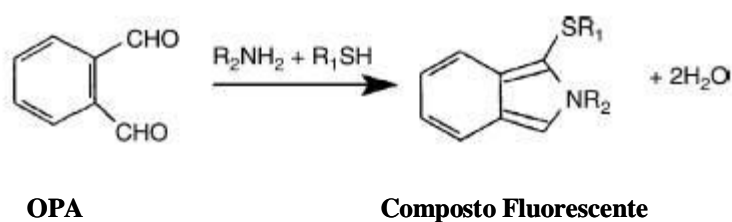


Figura 10 - Representação esquemática da reação de derivatização de aminas primárias com orto-oftaldeído (OPA) em presença de tiol gerando composto fluorescente.

4.3. Equipamento cromatográfico e princípios de funcionamento

Conforme esquema apresentado na **figura 11**, o equipamento de cromatografia líquida utilizado, HPLC, é composto de um reservatório para o tampão de separação (fase móvel), bomba, válvula de injeção, pré-coluna, coluna (fase estacionária), detector de fluorescência e integrador. A seguir, uma descrição simplificada dos componentes e do princípio de funcionamento: a bomba impulsiona a fase móvel pelo sistema até a coluna e, nesse trajeto a fase móvel arrasta a amostra até a coluna, local onde ocorrerá a

separação dos componentes da mistura, de acordo com o grau de polaridade. Após a separação, os componentes da amostra passam pelo detector, neste caso um fluorímetro, o qual através de determinados comprimentos de onda, excitação e emissão, permite a detecção dos componentes de interesse que são eluídos da coluna em tempos diferentes. O integrador capta a intensidade de fluorescência emitida pelo detector e a transforma em dados digitais. Os picos gerados pela fluorescência de cada composto podem ser visualizados, no formato digital ou impresso, e constituem o perfil cromatográfico de uma determinada amostra. Com a utilização de uma curva padrão, constituída por soluções de concentrações conhecidas dos compostos de interesse aplicados no sistema, análises quantitativas podem ser obtidas a partir do programa associado ao integrador. O resultado é expresso em concentrações de GABA ou glutamato ($\mu\text{g/g}$ de tecido fresco) calculadas através da área dos picos de cada componente separado e detectado.

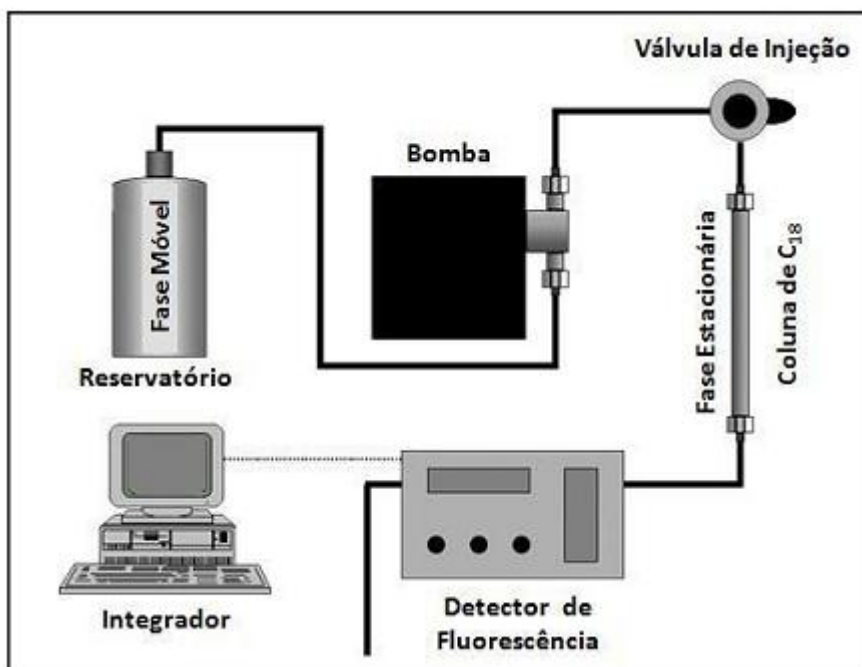


Figura 11 - Representação esquemática dos componentes de um aparelho de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

4.4. Condições Cromatográficas

O sistema cromatográfico utilizado foi um cromatógrafo *Shimadzu* (LC-10AD, *Tokyo*, Japão) com válvula injetora de 200 μ L (*Rheodyne* 7725-I, California, USA) e detector fluorescente (FLD - *Shimadzu spectrofluorometric detector* RF-551, *Tokyo*, Japan) acoplado a uma bomba modelo LC-10. Os comprimentos de onda, de excitação e emissão, utilizados foram de 337 e 454 nm, respectivamente. Uma coluna cromatográfica analítica de fase reversa C18 (150 mm \times 4,6 mm, ID) e uma pré-coluna (RT 250-4 E. *Merck*, *Darmstadt* E.R., Germany) foram utilizadas nas análises. O integrador (*Shimadzu* C-R7Ae plus) acoplado ao sistema cromatográfico forneceu a área dos picos dos cromatogramas, a partir da intensidade de fluorescência obtida nas análises. A fase móvel isocrática consistiu de uma solução 0,05M de acetato de sódio, tetrahydrofurano e metanol (50:1:49 v/v), pH 4,0 e o fluxo utilizado foi de 1ml/min. O tempo médio de eluição do glutamato e do GABA foi de aproximadamente 3,16 e 8,24 minutos, respectivamente. Na **figura 12** encontra-se ilustrado o perfil cromatográfico de uma amostra obtida do tálamo retirado do cérebro de um animal do grupo “padrão mantido em grupo”.

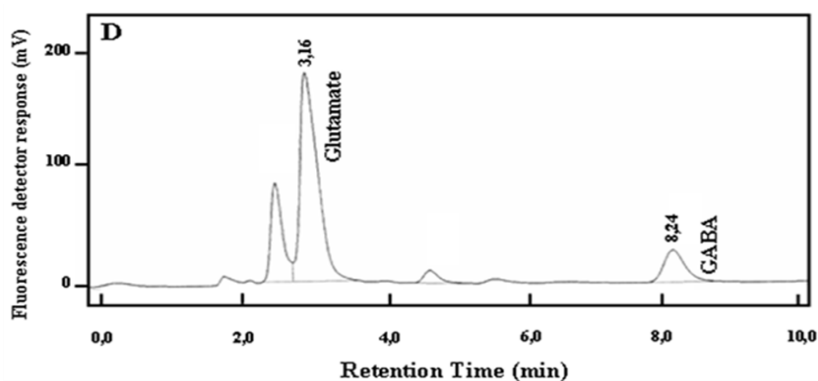


Figura 12 - Cromatograma representativo da análise das concentrações de glutamato e GABA em amostras obtidas do tálamo de animal do grupo “padrão mantido em grupo”.

5. Análises Estatísticas

Como primeiro passo, todos os dados obtidos foram avaliados com relação ao tipo de distribuição, usando-se o teste de normalidade *Kolmogorov-Smirnov*.

Os dados - média de cada grupo por tentativa - obtidos nos testes comportamentais *Beam Balance* e *Rotarod* 5 e 25 RPM foram analisados utilizando o Modelo de Cox para Análise de Sobrevivência. Esse modelo se aplica para o caso de uma distribuição não paramétrica, com o uso de um critério de censura, referente ao tempo limite de 60” de permanência do animal na trava de equilíbrio ou 300” de permanência na barra giratória do *Rotarod* – no modelo de Cox denominado “tempo de sobrevivência”. Essas análises foram executadas através do programa estatístico ‘R’ versão 2.13.0.

Na análise de sobrevivência, a variável repostada é aquela mensurada até ocorrência de um evento de interesse, denominado tempo de falha, que nos testes *Beam Balance* e *Rotarod* significa o tempo até a queda do animal do aparato. A variável aleatória não negativa T , que representa o tempo de falha, é usualmente especificada em análise de sobrevivência pela sua função de sobrevivência ou pela taxa de falha ou risco. A função de sobrevivência $S(t)$ é uma das principais funções probabilísticas usadas para descrever estudos de sobrevivência, e pode ser definida como a probabilidade de uma observação não falhar até determinado tempo t , ou seja: $S(t) = P(T \geq t)$ (Colosimo, 2006). A principal característica em estudos de sobrevivência é a presença de censura, que é a observação parcial da resposta. Por exemplo, como mencionado acima, o tempo de observação no teste *Beam Balance*, foi 60 segundos o que caracteriza uma censura, pois alguns animais, provavelmente, conseguiriam se manter por mais tempo em cima do aparato ultrapassando a latência máxima, previamente estipulada.

As médias do comprimento e da largura dos passos em quatro tentativas, obtidas no teste de Impressão de Patas, foram analisadas por Análise de Variância (ANOVA) 2 x 2, sendo os fatores deficiência de tiamina (dois níveis) e isolamento (dois níveis). As análises neuroquímicas foram realizadas em triplicata e a média foi analisada também por ANOVA 2 x 2, seguida pelo teste *Post Hoc* Bonferroni.

As análises dos dados dos pesos corporais, consumo de ração e água dos animais foram feitas separadamente antes, durante e após o episódio de deficiência de tiamina. As comparações entre os pesos corporais, consumo de ração e água dos animais, nos período anterior, durante e posterior ao episódio de deficiência de tiamina foram feitas utilizando-se ANOVA 4x1 (antes do episódio de deficiência), ANOVA fatorial 2 x 2 x 7 (durante o episódio de deficiência) e ANOVA fatorial 2 x 2 x 3 (depois do período de recuperação da deficiência), com medidas repetidas no último elemento, sendo os fatores: deficiência de tiamina (dois níveis), isolamento (dois níveis), peso ou consumo de ração ou água dos animais ao longo das últimas sete semanas do episódio de deficiência (7 medidas repetidas) ou ao longo das últimas três semanas do período de recuperação (3 medidas repetidas).

Análises de regressão linear (Winer, 1962) foram usadas para verificar a correlação entre parâmetros bioquímicos e comportamentais.

Todos os dados obtidos no teste de Impressão de Patas, nos ensaios neuroquímicos, peso corporal, consumo de água e ração foram analisados através dos testes mencionados acima, usando-se o programa estatístico *Statistical Package for the Social Sciences (SPSS)*, versão 17.0

Todos os valores foram expressos como média \pm erro-padrão (S.E.M), exceto os dados do *Beam Balance* e *Rotarod* que foram apresentados na forma gráfica em termos de percentagem expressando a média de cada tentativa para cada grupo. Diferenças foram consideradas significativas ao nível de 5 % ($p < 0,05$).

Considerações Sobre o Tamanho da Amostra

O estudo foi iniciado com uma amostra total de 42 animais (n=13 para os animais de cada um dos dois grupos padrão-isolados e deficiente-isolados e n=8 para os animais de cada um dos dois grupos padrão-grupo e deficiente-grupo). No entanto, 2 animais do grupo padrão-grupo morreram de causa desconhecida e 2 animais do grupo deficiente-isolado morreram durante o episódio de deficiência de tiamina. Portanto, os dados coletados no presente estudo se referem a uma amostra total de 38 animais.

1. Modelo Experimental

As figuras 13, 14 e 15 mostram, respectivamente, a variação do peso corporal, do consumo de ração e de água dos animais. A semana identificada com o número “0” corresponde ao período anterior ao episódio de deficiência de tiamina. As semanas de 1 a 7 correspondem às últimas sete semanas do episódio de deficiência de cada animal, sendo que na semana 7 os animais apresentaram os sinais neurológicos e a deficiência de tiamina foi revertida, como descrito em ***Material e Métodos***. As semanas 1', 2' e 3' correspondem ao final do período de recuperação, período imediatamente anterior ao início dos testes comportamentais.

Conforme descrito na sessão de ***Material e Métodos***, o critério para interrupção do episódio de deficiência de tiamina foi um critério clínico (sinais neurológicos). Devido à variação individual, a diferença entre os indivíduos foi de dias e, em alguns casos, até de semanas. Apresentamos, na forma gráfica, os resultados do peso corporal, do consumo de água e ração das últimas sete semanas de deficiência e das últimas três semanas do

período de recuperação. Todos os dados estão apresentados nas tabelas 7-18 na sessão de Anexos.

Com relação ao peso dos animais, consumo de ração e consumo de água na semana “0”, ou seja, antes do episódio de deficiência de tiamina, não foram observadas diferenças significativas entre os animais dos 4 grupos experimentais no teste ANOVA 4x1. Peso corporal [$F_{(1,34)} = 0,105$; $p = 0,957$]; consumo de ração [$F_{(1,34)} = 1,435$; $p = 0,250$]; consumo de água [$F_{(1,34)} = 2,483$; $p = 0,077$].

Durante o episódio de deficiência de tiamina, com relação ao peso dos animais, o teste ANOVA 2x2x7 mostrou efeito significativo da deficiência de tiamina [$F_{(1,34)} = 245,386$; $p = 0,000$], sendo que os animais deficientes apresentaram menor peso em relação aos não-deficientes. Foi também observado um efeito significativo do tempo [$F_{(6,34)} = 23,310$; $p = 0,000$]. Não houve efeito do isolamento [$F_{(1,34)} = 2,640$; $p = 0,116$] e também não houve interação significativa entre os fatores deficiência de tiamina e isolamento [$F_{(1,34)} = 0,080$; $p = 0,779$].

No final do período de recuperação do episódio de deficiência, correspondente as semanas 3', 2' e 1' antes do início dos testes comportamentais, o teste ANOVA 2x2x3 mostrou efeitos significativos da deficiência [$F_{(1,34)} = 40,194$; $p = 0,000$], do isolamento [$F_{(1,34)} = 8,178$; $p = 0,007$] e do tempo [$F_{(2,34)} = 34,921$; $p = 0,0004$]. Não houve interação entre os fatores deficiência e isolamento [$F_{(1,34)} = 1,702$; $p = 0,201$].

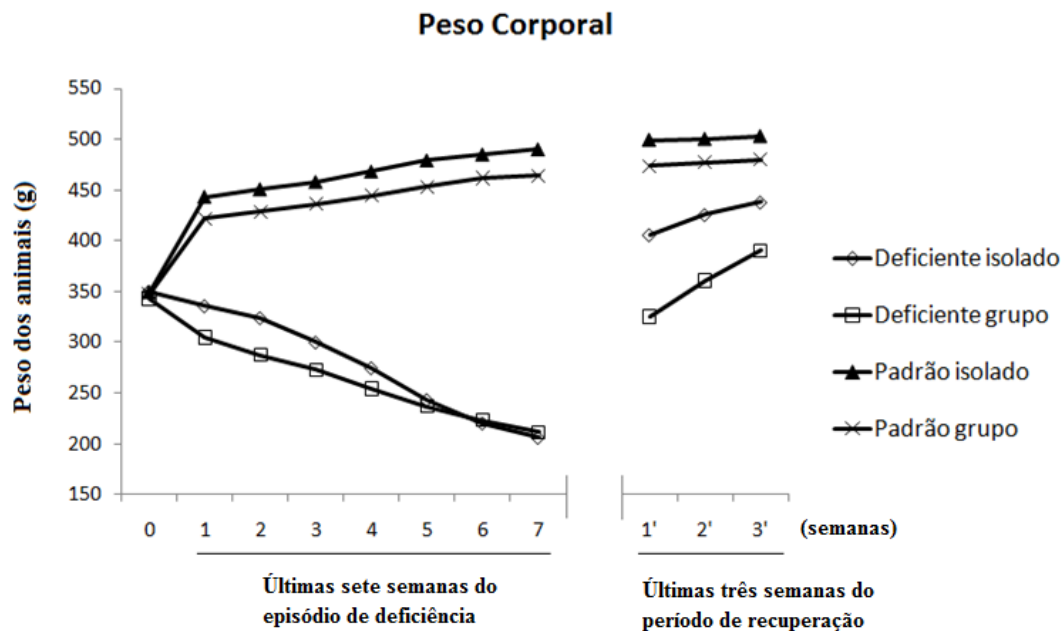


Fig. 13: Média \pm erro padrão do peso corporal dos animais dos 4 grupos experimentais, expresso em gramas. Na abcissa, “0”, 1-7 e 1’-3’, correspondem aos seguintes períodos (i) uma semana antes, (ii) durante (últimas sete semanas) e após (semanas 1’, 2’ e 3’) o episódio de deficiência de tiamina. Os dados brutos dos pesos dos animais encontram-se na sessão “Anexos”, nas tabelas 7, 8, 9 e 10.

Durante o episódio de deficiência de tiamina, com relação ao consumo de ração dos animais, o teste ANOVA 2x2x7 mostrou efeito significativo da deficiência de tiamina [$F_{(1,34)} = 459,728$; $p = 0,000$], sendo que os animais deficientes apresentaram menor consumo de ração em relação aos não-deficientes. Foi também observado um efeito significativo do tempo [$F_{(6,34)} = 49,968$; $p = 0,000$]. Não houve efeito do isolamento [$F_{(1,34)} = 2,438$; $p = 0,128$] e também não houve interação significativa entre os fatores deficiência de tiamina e isolamento tratamentos [$F_{(1,34)} = 0,080$; $p = 0,779$].

No final do período de recuperação do episódio de deficiência, correspondente as semanas 3’, 2’ e 1’ antes do início dos testes comportamentais, o teste ANOVA 2x2x3 mostrou efeitos significativos da deficiência [$F_{(1,34)} = 7,420$; $p = 0,010$], do isolamento

$[F_{(1,34)} = 19,289; p = 0,000]$ e do tempo $[F_{(2,34)} = 4,236; p = 0,018]$. Não houve interação entre os fatores deficiência e isolamento $[F_{(1,34)} = 3,069; p = 0,089]$.

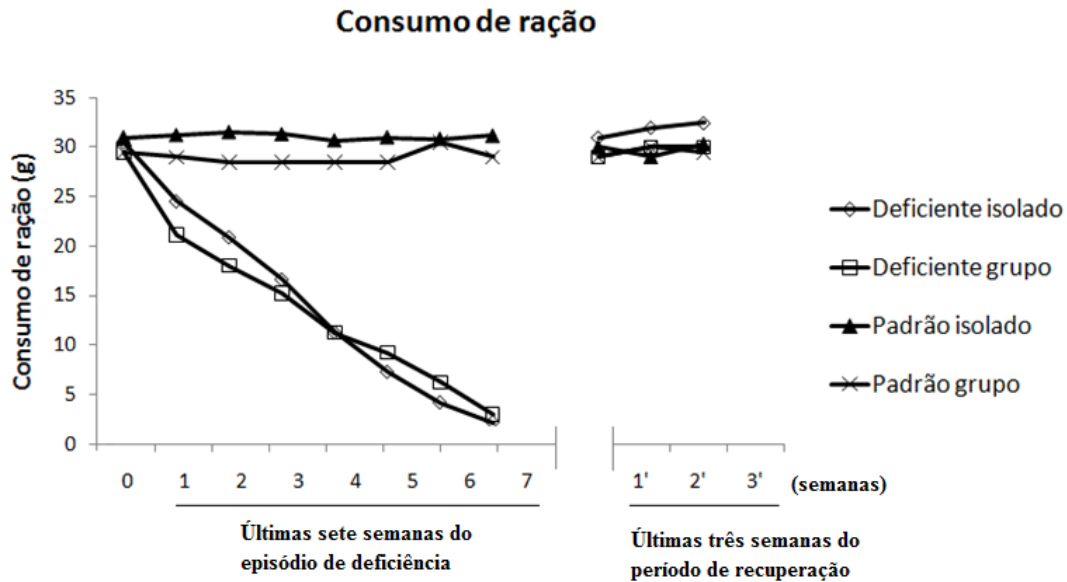


Fig. 14: Média \pm erro padrão do consumo de ração dos animais dos 4 grupos experimentais, expresso em gramas. Na abcissa, "0", 1-7 e 1'-3', correspondem aos seguintes períodos (i) uma semana antes, (ii) durante (últimas sete semanas) e após (semanas 1', 2' e 3') o episódio de deficiência de tiamina.

Durante o episódio de deficiência de tiamina, com relação ao consumo de água, o teste ANOVA $2 \times 2 \times 7$ mostrou efeito significativo da deficiência de tiamina $[F_{(1,34)} = 302,943; p = 0,000]$, sendo que os animais deficientes apresentaram maior consumo de água em relação aos não-deficientes. Foi também observado um efeito significativo do tempo $[F_{(6,34)} = 74,192; p = 0,000]$. Não houve efeito do isolamento $[F_{(1,34)} = 0,572; p = 0,455]$ e também não houve interação significativa entre os fatores deficiência de tiamina e isolamento tratamentos $[F_{(1,34)} = 0,012; p = 0,915]$.

No final do período de recuperação do episódio de deficiência, correspondente as semanas 3', 2' e 1' antes do início dos testes comportamentais, o teste ANOVA $2 \times 2 \times 3$

mostrou efeitos significativos da deficiência [$F_{(1,34)} = 12,092$; $p = 0,001$], do isolamento [$F_{(1,34)} = 10,799$; $p = 0,002$] e do tempo [$F_{(2,34)} = 6,558$; $p = 0,002$]. Houve interação significativa entre os fatores deficiência e isolamento [$F_{(1,34)} = 6,736$; $p=0,014$].

O teste *Post Hoc* mostrou que os animais deficientes-isolados apresentaram maior consumo de água em relação aos animais do grupo deficiente-mantidos em grupo ($p = 0,001$) e em relação ao animais dos grupos padrão-isolado ($p = 0,000$) e padrões-mantidos em grupo ($p = 0,000$).

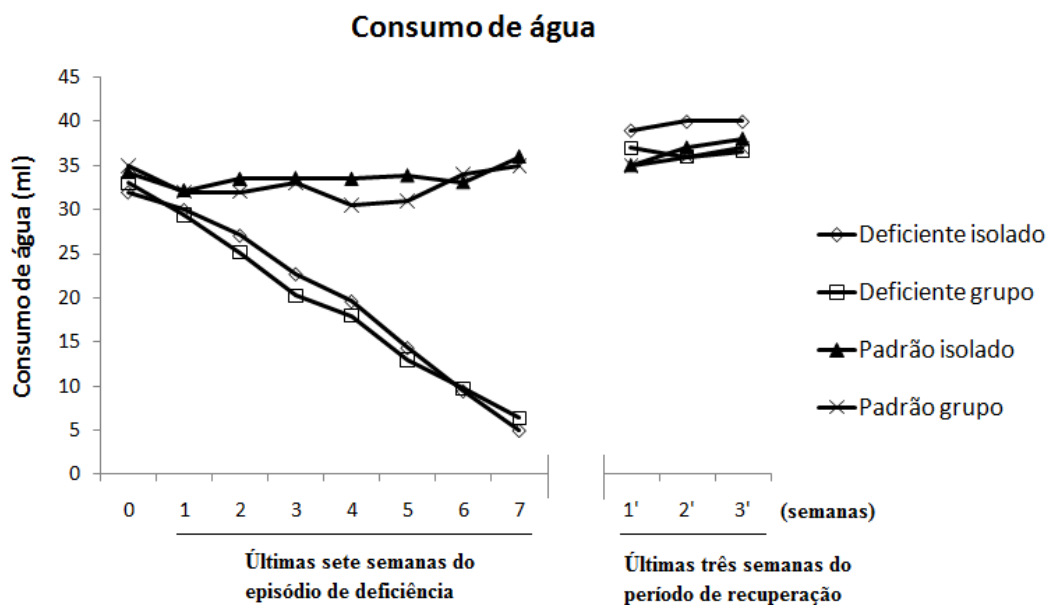


Fig. 15: Média \pm erro padrão do consumo de água dos animais dos 4 grupos experimentais, expresso em gramas. Na abcissa, "0", 1-7 e 1'-3', correspondem aos seguintes períodos (i) uma semana antes, (ii) durante (últimas sete semanas) e após (semanas 1', 2' e 3') o episódio de deficiência de tiamina.

2. Estudos Comportamentais

2.1. Teste Trave de Equilíbrio (*Beam Balance*)

O modelo de Cox para Análise de Sobrevida mostrou que o desempenho dos animais no *Beam Balance* foi significativamente afetado, tanto pela deficiência de tiamina quanto pelo isolamento (dados em anexo, tabelas 19 a 22).

Animais deficientes (isolados e mantidos em grupo) apresentaram significativa redução da média dos tempos (latência) que permaneceram sobre o *Beam Balance*, quando comparados aos animais Padrões (isolados e mantidos em grupo) ($p < 0,00001$). A taxa de falha dos deficientes é 6 vezes a taxa de falha dos animais padrões (Figura 16 e Tabela 4).

Animais isolados (dieta padrão e deficiente) também apresentaram significativa redução da média dos tempos (latência) que permaneceram sobre o *Beam Balance*, quando comparados aos animais mantidos em Grupo (dieta padrão e deficiente) ($p = 0,00159$). A taxa de falha dos isolados é, aproximadamente, 4 vezes a taxa de falha dos animais em grupo (Figura 16 e Tabela 4). O efeito do isolamento é diferente se o animal é tratado com ração padrão ou deficiente. O efeito do isolamento é maior nos animais deficientes.

Tratamentos	Taxa de Falha	P
Deficiência	5,99	< 0,00001
Isolamento	3,69	0,00159

Tabela 4: Dados referentes ao desempenho dos animais no teste *Beam Balance*.

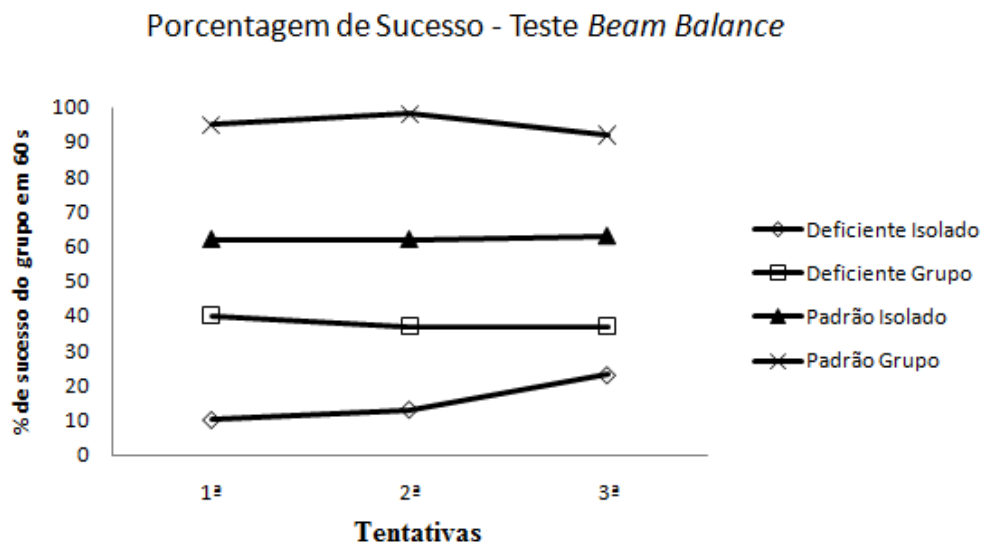


Figura 16: Dados do desempenho de todos os animais no teste do *Beam Balance*. Média da porcentagem de sucesso dos animais, em cada tentativa, por grupo. Porcentagem de sucesso equivale ao tempo (segundos) de permanência sobre o *Beam Balance*, sendo que 60 segundos = 100% de sucesso.

2.2. Teste Rotarod

O modelo de Cox para Análise de Sobrevivência mostrou que o desempenho dos animais no *Rotarod* 5 e 25 rpm foi significativamente afetado tanto pela deficiência de tiamina quanto pelo isolamento (dados em anexo, tabelas 26 a 29).

Animais deficientes (mantidos isolados e em grupo) apresentaram significativa redução da média dos tempos (latência) que permaneceram sobre a barra do *rotarod* na velocidade constante de 5 rpm, teste realizado 24 horas após o treino, quando comparados aos animais dos grupos Padrões (mantidos isolados e em grupo) ($p = 0,00115$). A taxa de falha dos deficientes, para a velocidade de 5 rpm, é 6 vezes a taxa de falha dos animais do grupo padrão (Figura 17, Painel A e Tabela 5). Para a velocidade constante de 25 rpm, teste realizado 48 horas após o treino, também foi

observado diferença significativa entre os animais dos grupos deficiente e padrão ($p < 0,00001$). A taxa de falha dos deficientes, para a velocidade de 25 rpm, é, aproximadamente, 17 vezes a taxa de falha dos animais do grupo padrão (Figura 17, Painel B e Tabela 6).

Animais isolados (dieta padrão e deficiente) também apresentaram significativa redução da média dos tempos (latência) que permaneceram sobre a barra do *rotarod* na velocidade constante de 5 rpm quando comparados aos animais mantidos em Grupo (dieta padrão e deficiente) ($p = 0,00146$). A taxa de falha dos isolados, na velocidade de 5 rpm, é 22 vezes a taxa de falha dos animais em grupo (Figura 17, Painel A e Tabela 5). Para a velocidade constante de 25 rpm também foi observado diferença significativa entre os isolados e os animais mantidos em grupo ($p < 0,00001$). A taxa de falha dos isolados, na velocidade de 25 rpm, é, aproximadamente, 5 vezes a taxa de falha dos animais em grupo (Figura 17, Painel B e Tabela 6).

Tratamentos	Taxa de Falha	p
Deficiência	5,70	0,00115
Isolamento	22,07	0,00146

Tabela 5: Dados referentes ao desempenho dos animais no teste *Rotarod 5 rpm*.

Tratamentos	Taxa de Falha	p
Deficiência	16,84	$< 0,00001$
Isolamento	4,95	$< 0,00001$

Tabela 6: Dados referentes ao desempenho dos animais no teste *Rotarod 25 rpm*.

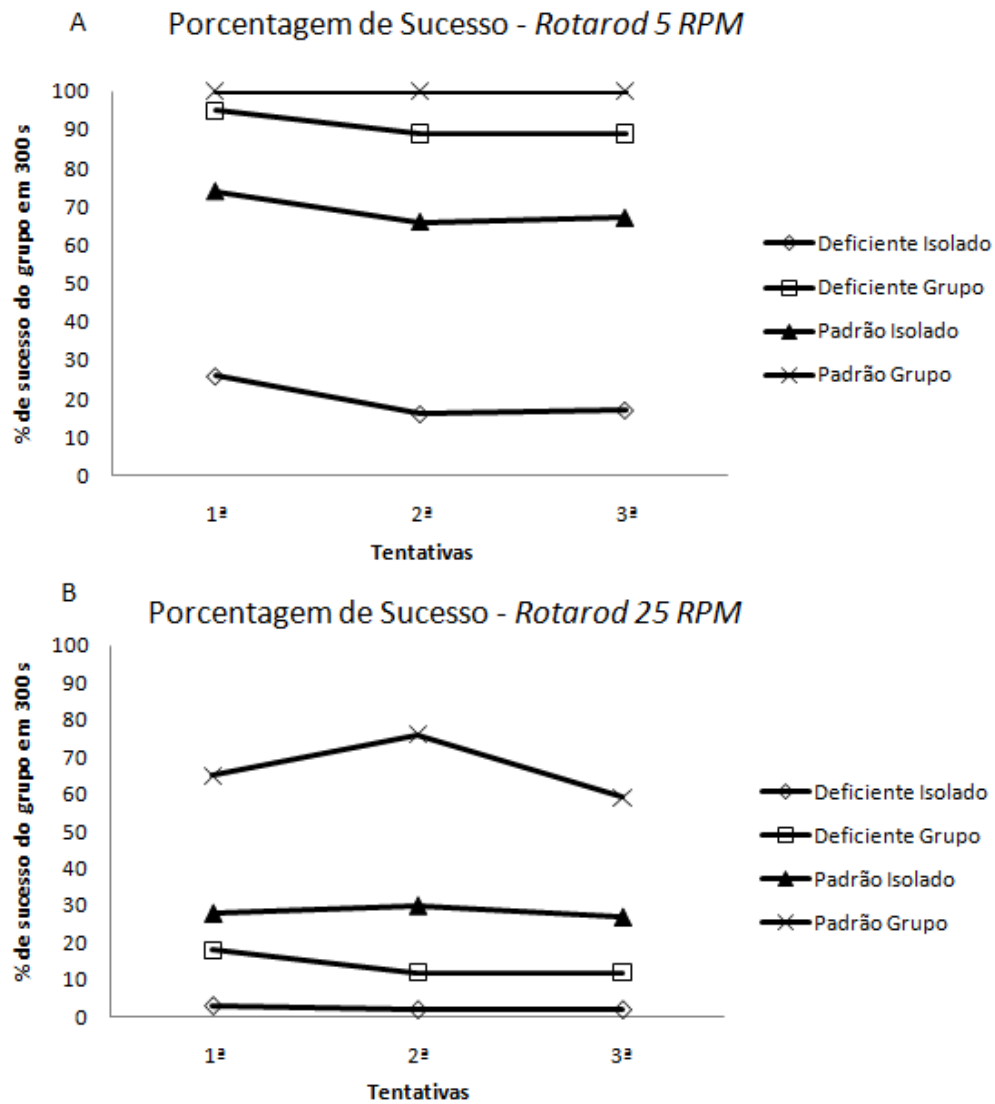


Figura 17: Dados do desempenho dos animais no teste do Rotarod nas velocidades de 5 rpm (Painel A) e 25 rpm (Painel B). Média da porcentagem de sucesso, de cada tentativa, por grupo. Porcentagem de sucesso equivale ao tempo (segundos) de permanência sobre o Rotarod, sendo que 300 segundos = 100% de sucesso.

1.3. Teste de Impressão das Patas

Conforme mencionado na sessão “Material e Métodos”, através deste teste foram analisadas duas variáveis: o comprimento e a largura do passo das patas traseiras dos animais, conforme apresentado na figura 18, painel A (dados em anexo, tabelas 26 a 29).

O teste ANOVA 2x2 mostrou efeito significativo da deficiência de tiamina [$F_{(1,34)} = 47,861$; $p = 0,000$]. Houve um aumento na média da largura dos passos dos animais Deficientes em relação aos Padrões (Figura 14, painel B). Entretanto, não houve efeito significativo do isolamento [$F_{(1,34)} = 0,188$; $p = 0,668$]. Também não foi observada interação entre deficiência e isolamento [$F_{(1,34)} = 0,48$; $p = 0,828$] (Figura 18, painel B).

Não foram observados efeitos significativos da deficiência [$F_{(1,34)} = 0,762$; $p = 0,389$] nem do isolamento [$F_{(1,34)} = 0,000$; $p = 0,983$] no comprimento dos passos . Também não foi observada interação entre os dois tratamentos [$F_{(1,34)} = 2,629$; $p = 0,114$] (Figura 18, painel C).

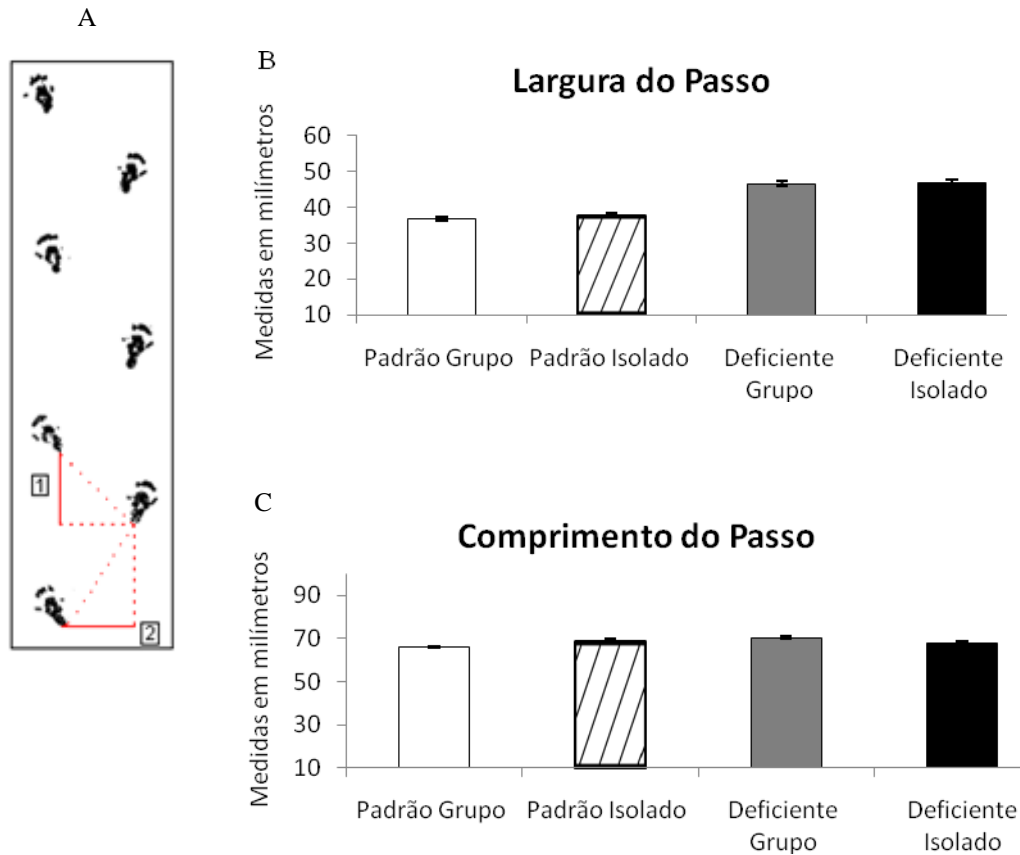


Figura 18: Dados do desempenho dos animais no teste de impressão das patas. Painel A: Representação das pegadas dos animais. As linhas contínuas, em vermelho, com as marcações 1 (vertical) e 2 (horizontal) representam, respectivamente, o comprimento e a largura do passo. **Painel B:** Dados quantitativos, Média \pm Erro Padrão da largura dos passos, em milímetros, dos animais durante a marcha. **Painel C:** Dados quantitativos, Média \pm Erro Padrão do comprimento dos passos, em milímetros, dos animais durante a marcha. O padrão da marcha foi analisado utilizando-se um mínimo de 5 ciclos de marcha para cada tentativa, e a média de pelo menos 4 tentativas.

3. Estudos Bioquímicos

3.1. Determinações das concentrações de glutamato e GABA

CEREBELO

Glutamato. Figura 19, painel A: ANOVA (2x2) mostrou efeitos significativos da deficiência de tiamina [$F_{(1,34)} = 5,032$; $p = 0,032$] e do isolamento [$F_{(1,34)} = 186,044$; $p = 0,000$] sobre a concentração média de glutamato, no cerebelo. Não houve interação significativa entre os tratamentos [$F_{(1,34)} = 2,620$; $p = 0,114$].

GABA Figura 19, painel B: No cerebelo, foram observados efeitos significativos da deficiência de tiamina [$F_{(1,34)} = 9,471$; $p = 0,004$] e do isolamento [$F_{(1,34)} = 26,498$; $p = 0,000$] nas concentrações médias do conteúdo total de GABA. Houve interação significativa entre os tratamentos, deficiência e isolamento [$F_{(1,34)} = 6,132$; $p = 0,018$].

Cerebelo

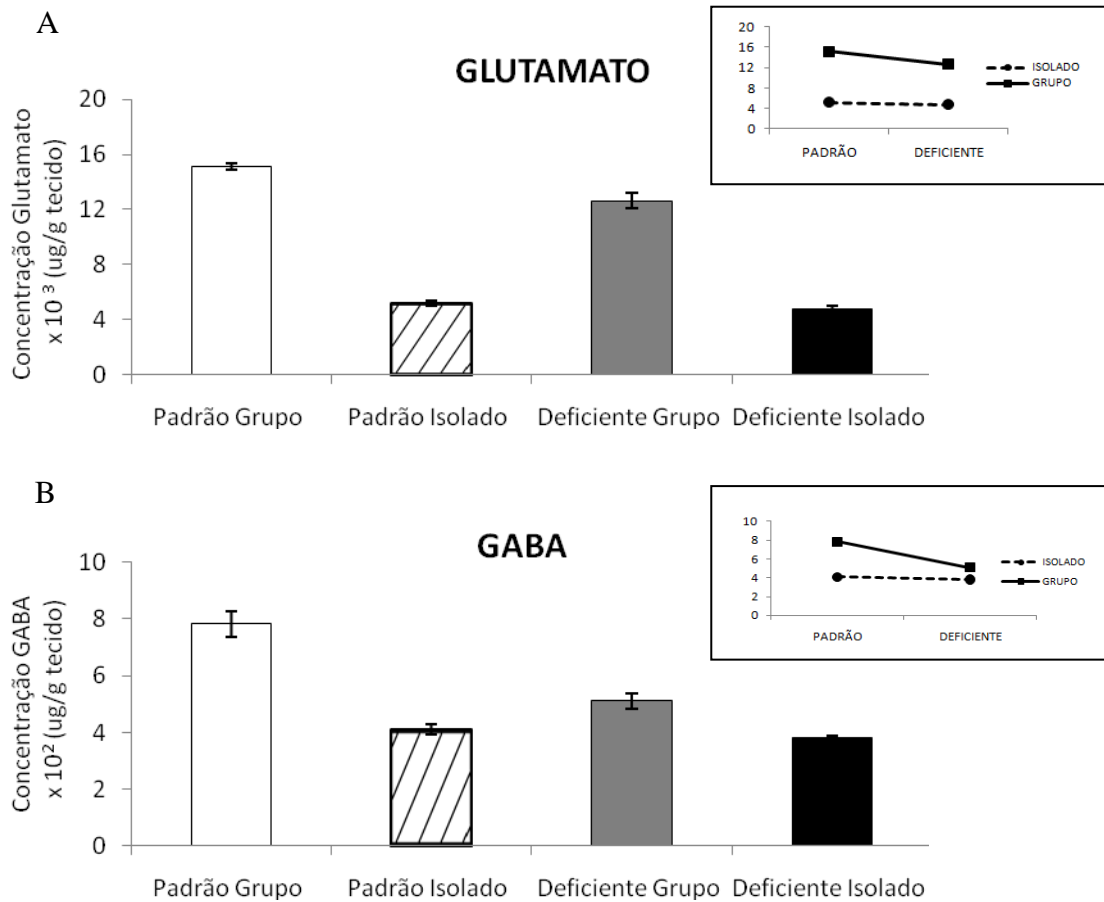


Figura 19: Concentrações em $\mu\text{g/g}$ de tecido (média \pm erro padrão) de glutamato (Painel A) e GABA (Painel B) no CEREBELO dos animais dos 4 grupos experimentais. Dados estão apresentados em dois formatos gráficos, de barras e de linhas.

CORPO ESTRIADO

Glutamato. Figura 20, painel A: ANOVA (2x2) não mostrou efeito significativo da deficiência de tiamina [$F_{(1,34)} = 2,216$; $p = 0,115$] na concentração de glutamato no corpo estriado. Também não houve efeito significativo do isolamento [$F_{(1,34)} = 0,72$; $p = 0,791$] e nem interação entre os dois tratamentos [$F_{(1,34)} = 1,926$; $p = 0,174$].

GABA Figura 20, painel B: No estriado, não foi observado efeito da deficiência nas concentrações médias do conteúdo de GABA [$F_{(1,34)} = 2,722$; $p = 0,108$], conforme apresentado na figura 20, painel B. No entanto, houve efeito significativo do isolamento [$F_{(1,34)} = 11,610$; $p = 0,002$]. Os animais isolados tiveram a média do conteúdo total de GABA significativamente maior que a dos animais em grupo. Houve interação significativa entre os tratamentos, deficiência e isolamento [$F_{(1,34)} = 7,397$; $p = 0,010$].

Estriado

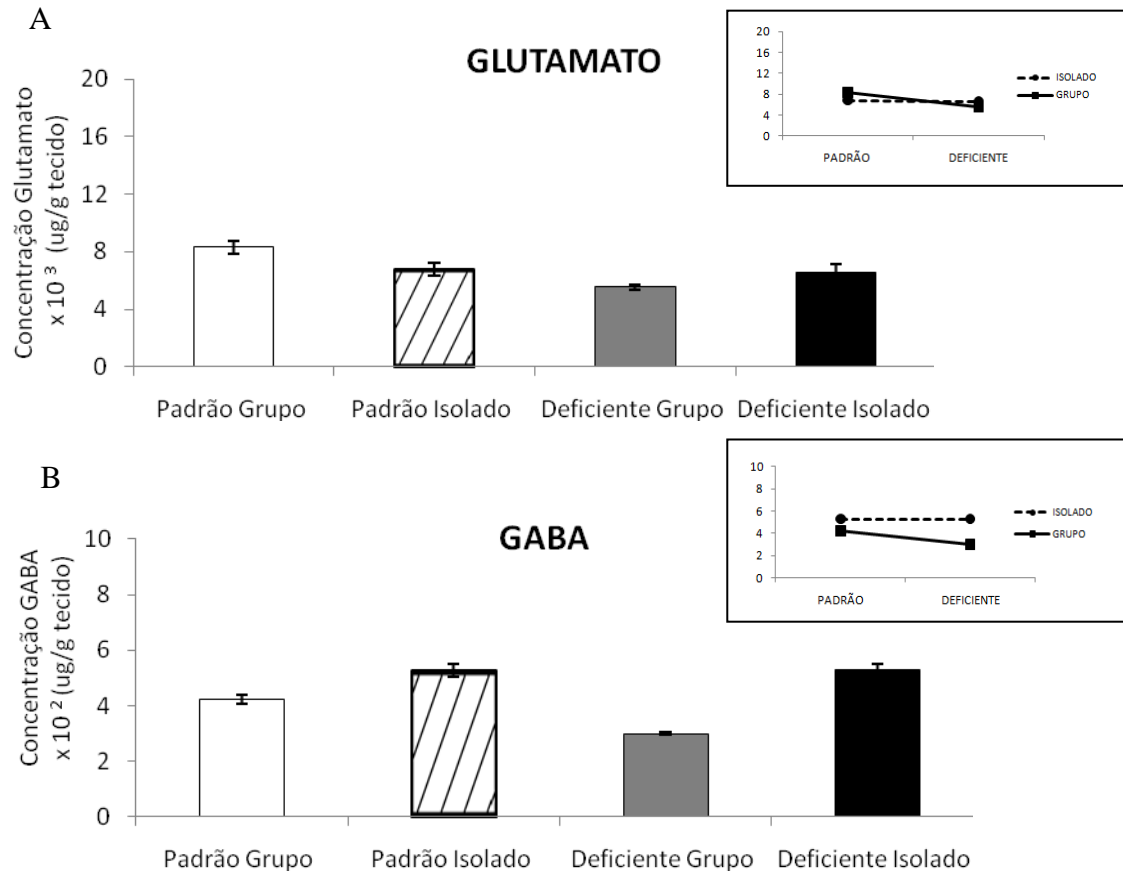


Figura 20: Concentrações em $\mu\text{g/g}$ de tecido (média \pm erro padrão) de glutamato (Painel A) e GABA (Painel B) no CORPO ESTRIADO dos animais dos 4 grupos experimentais. Dados estão apresentados em dois formatos gráficos, de barras e de linhas.

TÁLAMO

Glutamato. Figura 21, painel A: ANOVA (2x2) não mostrou efeito significativo da deficiência de tiamina [$F_{(1,34)} = 0,648$; $p = 0,426$] na concentração de glutamato no tálamo. Houve efeito significativo do isolamento [$F_{(1,34)} = 129,557$; $p = 0,000$]. A concentração média de glutamato, no tálamo, dos animais isolados foi significativamente menor que a dos animais em grupo. Não foi observado interação entre os dois tratamentos [$F_{(1,34)} = 0,858$; $p = 0,361$].

GABA. Figura 21, painel B: No tálamo, não foi observado efeito da deficiência nas concentrações médias do conteúdo de GABA [$F_{(1,34)} = 1,102$; $p = 0,301$]. Também não houve efeito significativo do isolamento [$F_{(1,34)} = 0,337$; $p = 0,566$] e nem interação entre os [$F_{(1,34)} = 0,420$; $p = 0,521$].

Tálamo

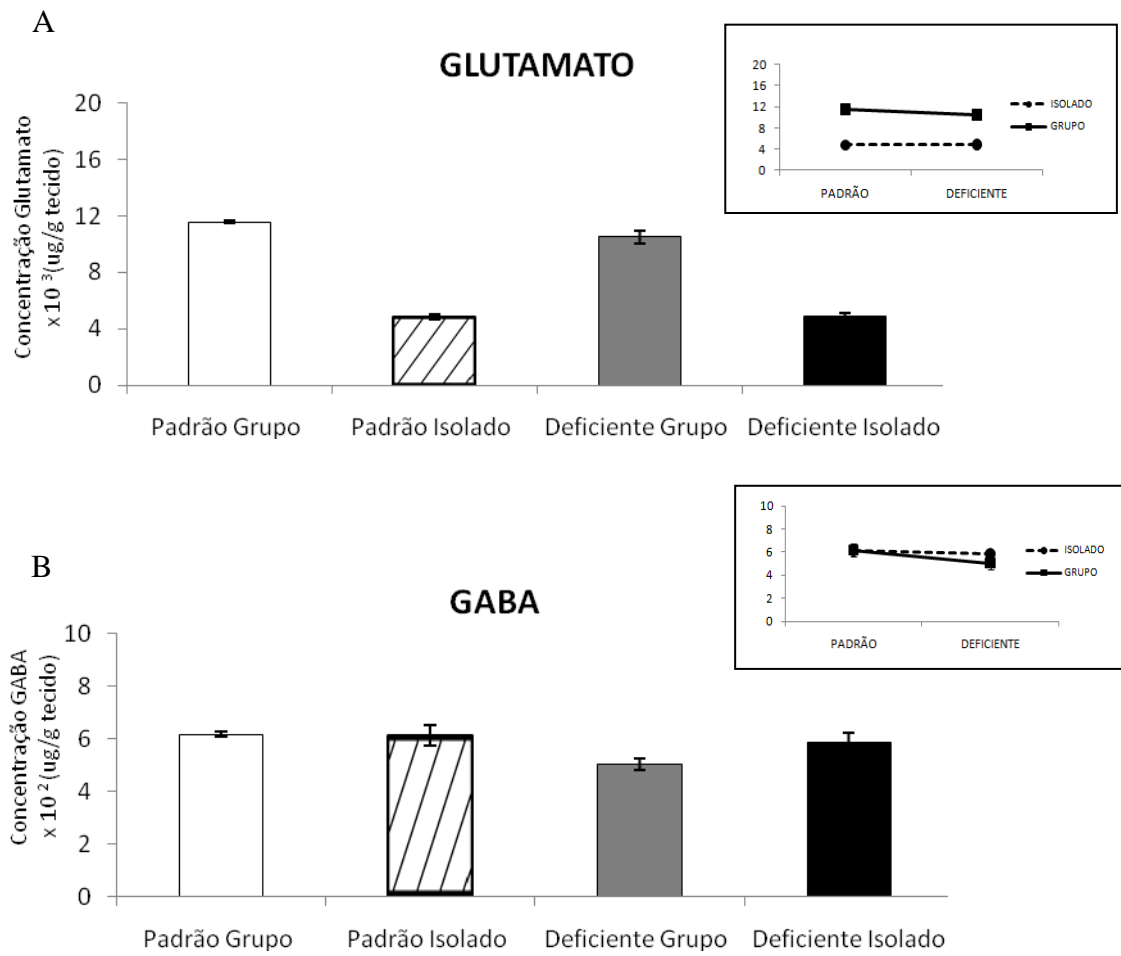


Figura 21: Concentrações em $\mu\text{g/g}$ de tecido (média \pm erro padrão) de glutamato (Painel A) e GABA (Painel B) no TÁLAMO dos animais dos 4 grupos experimentais. Dados estão apresentados em dois formatos gráficos, de barras e de linhas.

CÓRTEX PRÉ-FRONTAL

Glutamato. Figura 22, painel A: ANOVA (2x2) não mostrou efeito significativo da deficiência de tiamina [$F_{(1,34)} = 2,258$; $p = 0,142$] na concentração total de glutamato no córtex pré-frontal. Houve efeito significativo do isolamento [$F_{(1,34)} = 100,511$; $p = 0,000$]. A concentração média de glutamato, no córtex pré-frontal, dos animais isolados foi significativamente menor que a dos animais em grupo. Houve interação entre os tratamentos, deficiência e isolamento [$F_{(1,34)} = 4,774$; $p = 0,036$].

GABA. Figura 22, painel B: No córtex pré-frontal, não foi observado efeito da deficiência nas concentrações médias do conteúdo de GABA [$F_{(1,34)} = 1,861$; $p = 0,182$]. Também não houve efeito significativo do isolamento [$F_{(1,34)} = 0,095$; $p = 0,760$].

Córtex Pré-frontal

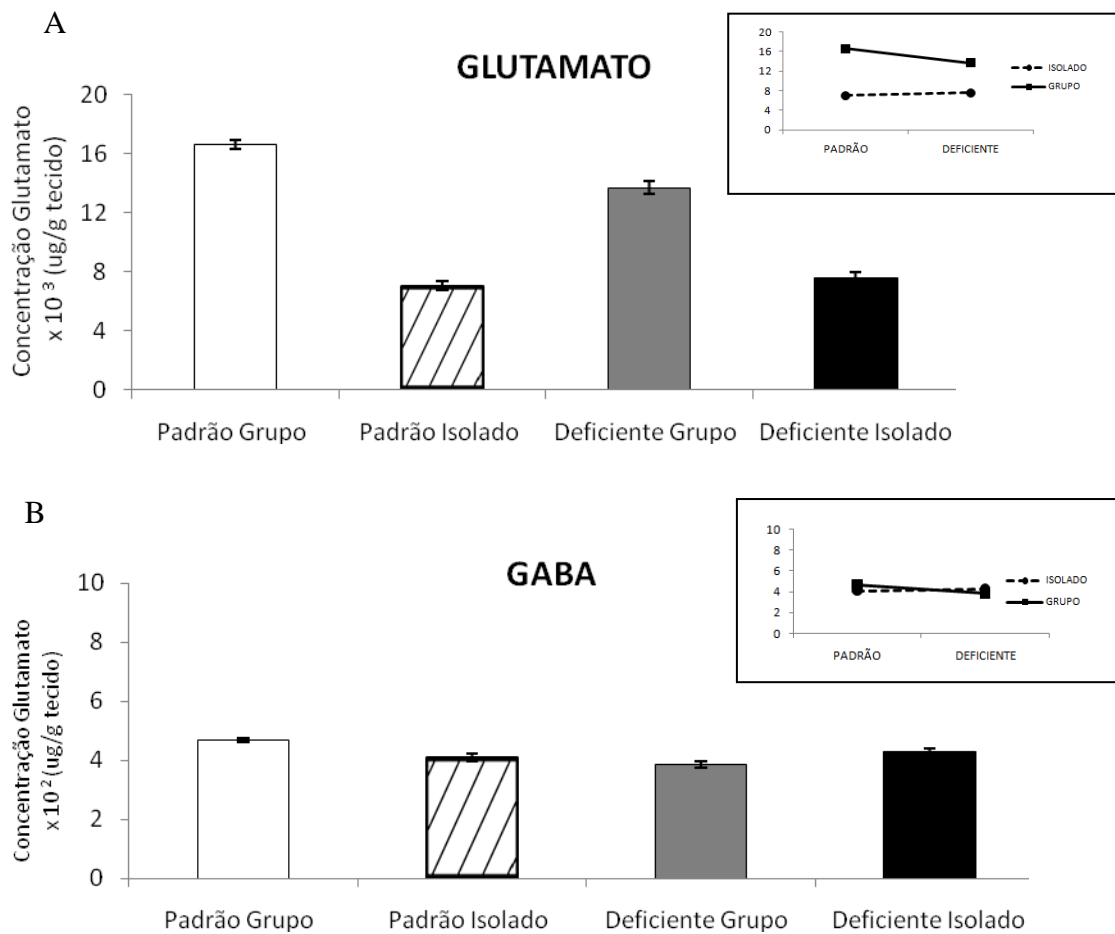


Figura 22: Concentrações em $\mu\text{g/g}$ de tecido (média \pm erro padrão) de glutamato (Painel A) e GABA (Painel B) no córtex pré-frontal dos animais dos 4 grupos experimentais. Dados estão apresentados em dois formatos gráficos, de barras e de linhas.

4. 4. Estudos de Correlação

De posse dos dados bioquímicos e comportamentais, *Análises de Regressão Linear* foram realizadas para avaliar a existência de possíveis correlações significativas entre os diversos parâmetros determinados. Os dados obtidos nos testes *Beam Balance* e *Rotarod*, por envolverem valores que correspondem ao estipulado como “censura” – valor temporal limite para a análise do comportamento – não foram utilizados nas análises de regressão. Não observamos correlação significativa entre os parâmetros avaliados no teste de impressão de patas e parâmetros neuroquímicos.

No presente estudo foram avaliados os efeitos de uma **dieta deficiente em tiamina e/ou isolamento social** sobre parâmetros motores e neuroquímicos. Os dados obtidos indicam que a **deficiência de tiamina e/ou o isolamento social** afetam os animais quanto ao: (a) peso corporal, consumo de ração e água; (b) equilíbrio e a coordenação motora incluindo o padrão da marcha e; (c) níveis de glutamato e GABA, em regiões específicas do sistema nervoso central. Importante destacar o resultado relevante e inédito desse trabalho com relação ao efeito do isolamento social sobre aspectos do comportamento motor.

Modelo Experimental

Um dos modelos experimentais utilizados no presente trabalho, roedores submetidos à deficiência de tiamina, tem se mostrado um importante instrumento para se estudar aspectos específicos do comportamento e seus substratos neurobiológicos (p.ex. Carvalho *et al.*, 2006, Pires *et al.*, 2007, Savage *et al.*, 2011). A deficiência de tiamina provoca uma série de anormalidades comportamentais em seres humanos (Charness, 1993) e em animais experimentais (Gibson *et al.*, 1982), as quais podem ser avaliadas através de testes específicos da neuropsicologia e psicologia experimental (Whishaw & Kolb, 2005).

Outro modelo utilizado nesse estudo foi o isolamento social que, em humanos pode ocorrer, por exemplo, por perda de autonomia e de papéis sociais, por morte de parentes e amigos, por declínio na saúde ou por restrições financeiras. Sabe-se que em outros primatas o isolamento social produz alterações comportamentais, como modificações no caráter exploratório, manifestações de agressividade, reações psicofisiológicas indutoras

de ansiedade, depressão e estresse (Gomez-Laplaza & Morgan 1993; Washburn & Rumbaugh, 1991). Em ratos, o isolamento não só produz déficit no comportamento exploratório, como também pode levar a um comportamento agressivo (Standford et al. 1988; Kostowski et al., 1977; Fuste & Vidal, 1993). Até a presente data, estudos dos efeitos do isolamento social sobre o comportamento foram centralizados em componentes emocionais e cognitivos e, até onde foi possível observar, não existem estudos dos efeitos desse fator sobre o comportamento motor.

Com a finalidade de acompanhar a variação de peso e consumo de alimentos dos animais experimentais, durante todas as etapas do estudo, esses foram mantidos em gaiolas individuais. Como mencionado acima, o isolamento dos animais pode interferir em aspectos do comportamento e provocar alterações no SNC (Troncoso *et al.*, 1981; Pannunzio *et al.*, 2000; Fone & Porkess, 2008). Portanto, essa variável foi incluída no delineamento experimental do presente estudo, com o propósito de avaliar os efeitos do isolamento, associado ao não à deficiência de tiamina, sobre aspectos motores e neuroquímicos.

A progressiva e significativa perda de peso, observada nos animais alimentados com ração deficiente de tiamina, a partir das primeiras semanas de tratamento, é devido a uma significativa queda no consumo de ração. Esse achado está de acordo com resultados obtidos em estudos prévios, pelo nosso grupo (Pires *et al.*, 2001; Freitas-Silva *et al.*, 2010) e também por outros autores (p.ex. Ciccia & Langlai, 2000), que observaram uma queda no consumo de ração e no peso dos animais, como sendo um dos primeiros sinais clínicos da deficiência de tiamina. Também observamos uma queda no consumo de líquidos pelos animais do grupo deficiente a partir das primeiras

semanas do episódio de deficiência de tiamina, provavelmente, devido à diminuição no consumo de ração. Sabe-se que em várias espécies os consumos de água e de sólidos estão correlacionados positivamente (Mosseau *et al.*, 1996).

Após o período de recuperação da deficiência de tiamina também se observou uma diferença significativa entre o peso corporal dos animais deficientes e dos animais tratados com dieta padrão (não deficientes). Os efeitos metabólicos da deficiência de tiamina parecem ser parcialmente irreversíveis, pelo menos até aonde foi medido, ou seja, 30 dias após o final do episódio de deficiência. Esse resultado confirma observações prévias realizadas pelo nosso grupo (Pires *et al.*, 2005). Não podemos descartar a possibilidade de que, pelo menos em parte, o fator idade possa ter contribuído para esse efeito da deficiência de tiamina sobre o peso corporal. Ou seja, existe a possibilidade de uma interação entre os efeitos da idade e da deficiência. Nesse caso, o efeito da deficiência ao longo do processo poderia ser mais acentuado devido a uma associação com os efeitos do envelhecimento. O episódio da deficiência de tiamina teve início quando os animais tinham 3 meses e, considerando o período de deficiência e de recuperação, os animais chegaram a completar 7 meses de vida. Nessa idade os ratos são considerados adultos de meia idade. Lembramos, no entanto, que os animais tratados com dieta padrão também passaram por períodos correspondentes de tratamento e, portanto, foram pareados em idade. Ou seja, o efeito observado nos animais deficientes, comparados aos não-deficientes, se refere exclusivamente ao tratamento com dieta deficiente de tiamina, que nesse caso poderia ser mais pronunciado devido a uma crescente susceptibilidade dos animais ao longo do tempo. Também, após o período de recuperação, foi observado efeitos da deficiência e do isolamento em relação ao consumo de água e ração. Animais deficientes, após a

reversão dos sinais graves da deficiência passaram a consumir quantidades crescentes de água e ração. Nesse período, os animais do grupo “deficientes-isolados” apresentaram uma tendência a consumir mais ração, o que refletiu também em uma tendência para um maior ganho de peso, quando comparados aos animais “deficientes mantidos em grupo”. Esse efeito do isolamento sobre o consumo de alimentos está de acordo com o observado por Morinan & Parker (1985), que mostraram que o isolamento social produziu um aumento da ingestão de alimentos.

Alterações Comportamentais e Bioquímicas

No presente estudo, através da utilização de testes que avaliam equilíbrio e coordenação motora, *Beam Balance* (Feeney *et al.*, 1981) e *Rotarod* (Shi *et al.*, 2007; Simola *et al.* 2008), foi observado que animais alimentados com dieta **deficiente em tiamina e/ou isolados** apresentaram pior desempenho quando comparados com os animais alimentados com dieta padrão e/ou em grupo. Interessante destacar que o efeito do isolamento no desempenho dos animais no *Rotarod* foi mais pronunciado do que o efeito da deficiência. Nesse aspecto também é importante ressaltar que o efeito do isolamento foi pronunciado mesmo com a tarefa aplicada em um nível de dificuldade menor - rotação de 5rpm. Por outro lado, o efeito da deficiência sobre o desempenho dos animais no *Rotarod* foi mais pronunciado – taxa de falha de 17 vezes a taxa dos animais não-deficientes – apenas quando a dificuldade da tarefa foi maior (25rpm). Para a tarefa executada em 5 rpm a taxa de falha dos deficientes foi de 5 vezes a taxa de falha dos animais não deficientes, enquanto – nessa baixa rotação - a taxa de falha dos animais isolados foi 22 vezes a taxa de falha dos animais em grupo. Na mesma direção estão os efeitos dos dois tratamentos sobre as concentrações de GABA e glutamato no

cerebelo, glutamato no tálamo e CPF e GABA no estriato, ou seja, o isolamento, comparado com a deficiência, causou efeitos mais pronunciados sobre a concentração desses aminoácidos nessas regiões cerebrais. Um achado interessante e inédito do presente estudo é que o efeito da deficiência de tiamina depende do contexto ambiental, ou seja, o efeito é diferente se o indivíduo se encontra isolado ou não, sendo mais pronunciado se o indivíduo estiver em condição de isolamento. Shi *et al.* (2007) observaram que animais adultos submetidos a deficiência de tiamina apresentaram redução, em até 97%, no desempenho do teste *Rotarod*, o que está de acordo com os resultados encontrados no presente estudo. No entanto, com relação ao isolamento, na literatura não existe estudos do efeito dessa condição sobre esse comportamento.

O baixo desempenho nos testes *Beam Balance* e *Rotarod* de animais expostos a episódios de **deficiência de tiamina** pode ser explicado, pelo menos em parte, pela vulnerabilidade seletiva, à deficiência desta vitamina, de algumas estruturas encefálicas (Lavoie & Butterworth, 1995) especializadas em integrar e modular respostas relacionadas ao equilíbrio e coordenação motora do indivíduo (Lalonde & Strazielle, 2007). Segundo Martin *et al.* (2003) o cerebelo, estrutura a qual é atribuída estes papéis (Lalonde & Strazielle, 2007), apresenta-se seletivamente comprometido na deficiência de tiamina, principalmente a região do *vérmis* cerebelar (Lavoie & Butterworth, 1995; Baker *et al.*, 1999). Análises histológicas desta região após um episódio de deficiência de tiamina indicaram significativa redução no número e no tamanho das células de Purkinje (Philips *et al.*, 1987). Além disso, de acordo com Jahn *et al.* (2008) uma lesão na região do *vérmis* cerebelar é condizente com quadro clínico de perda de equilíbrio e coordenação motora.

A ocorrência dos déficits de equilíbrio e coordenação motora nos animais **deficientes de tiamina** pode, pelo menos em parte, também ser explicada por uma neuropatia periférica, uma axonopatia caracterizada por uma redução da velocidade de condução axonal (Tanaka & Cooper, 1968, Tanaka, 1973, Kumar, 2011). A tiamina é importante na condução nervosa (Cooper & Pincus, 1979) e enzimas a utilizam como cofator para formação da bainha de mielina dos nervos. Uma redução da velocidade de condução foi mostrada em nervos surais de ratos deficientes de tiamina por McLane *et al.* (1987), e se deve a diversas alterações, incluindo uma diminuição no limiar de excitação, atribuído ao canal de sódio (von Muralt, 1962; Goldberg & Cooper, 1975). A descoberta que os derivados de tiamina fosforilada estão associados com o canal de sódio levou à hipótese de que a tiamina trifosforilada pode desempenhar um papel fundamental na condutância das membranas axonais (Schoffeniels, 1983). Tais alterações podem contribuir para prejuízos do sistema motor, como fraqueza muscular, comprometimento na regulação de tempo de contração, organização entre músculos sinérgicos e limitações na capacidade de adaptar os movimentos para o equilíbrio (Shumway-Cook & Woollacott, 2006). No entanto, as alterações em parâmetros neuroquímicos observadas no presente estudo, mostram que disfunções centrais também são importantes na fisiopatologia desse processo.

Outra hipótese para a ocorrência dos déficits de equilíbrio e coordenação motora observada nos **animais deficientes e/ou isolados** seria em relação à perda ou redução do equilíbrio neuroquímico entre comunicação excitatória e inibitória de sistemas cerebelares com outras estruturas encefálicas relacionadas com a motricidade. Devido à existência de conexões do cerebelo com os núcleos da base, principalmente o estriado, via núcleos talâmicos, (Ichinohe *et al.*, 2000; Hoshi *et al.*, 2005) também é plausível

considerar que danos na estrutura cerebelar provoque interrupção da comunicação excitatória glutamatérgica (Uusisaari *et al.*, 2007) do cerebelo para estriato. Disfunções nessa via resultaria na diminuição da modulação (Dostrovsky *et al.*, 2002) talâmica sobre células nigroestriatais dopaminérgicas, interferindo, portanto, na organização dos circuitos motores subcorticais e possibilitando o surgimento dos sinais clínicos apresentados pelos animais. Esta hipótese é corroborada pelos dados obtidos no presente estudo que mostram uma diminuição significativa na concentração de glutamato no cerebelo dos **animais isolados e/ou deficientes**. Essa hipótese da ocorrência de uma disfunção glutamatérgica que poderia refletir no sistema dopaminérgico nigroestriatal é compatível com as evidências obtidas por Kirik *et al.* (1998); Barneoud *et al.* (2000); Deumens *et al.* (2002), que mostraram que tanto déficits moderados quanto mínimos no tônus dopaminérgico são capazes de afetar a coordenação motora de animais submetidos à depleção de dopamina nos núcleos da base. O fato do sistema dopaminérgico também ser afetado pela **deficiência de tiamina** (Nakagawasai *et al.*, 2007) torna possível, conforme mencionado acima, que os déficits motores apresentados pelos animais **deficientes e/ou isolados** sejam também devidos à bloqueios na transmissão sináptica dopaminérgica, causados por alterações em vias motoras neuromodulatórias de origem cerebelar.

Conforme Stolze *et al.* (2003), neste contexto, também seria esperado que os animais **deficientes e/ou isolados** apresentassem, além de déficits no equilíbrio postural, um padrão de marcha alterado, caracterizado por alargamento da base de apoio (marcha atáxica), refletindo um efeito compensatório para minimizar o distúrbio no equilíbrio postural. Os dados obtidos para os animais deficientes estão de acordo com Stolze *et al.* (2003) e com os achados apresentados por Hudson & Krebs, (2002) para indivíduos que

apresentavam distúrbio cerebelar e déficits de equilíbrio. Os **animais deficientes** apresentaram aumento da base de apoio (largura do passo).

Mais um aspecto a ser considerado é a ocorrência de mudanças adaptativas nesses sistemas excitatórios/inibitórios do estriado. Centonze *et al.* (2008) sugerem que mudanças adaptativas em sinapses glutamatérgicas e/ou GABAérgicas estriatais são capazes de mediar a recuperação espontânea e a manutenção de estados compensatórios de origem cerebelar. Ou seja, quando ocorrem adaptações com mudanças GABAérgicas no estriado, como possivelmente no caso dos animais **isolados**, não é observada a ataxia de marcha, mas quando essas adaptações não ocorrem, como no caso dos **deficientes**, uma maior largura do passo (ataxia) é observada. Outra hipótese para explicar o fato dos **animais isolados** não terem apresentado aumento na largura do passo, poderia ser a ausência de lesão e/ou atrofia na região de *vérmis* cerebelar como observado por Lavoie & Butterworth (1995), nos animais deficientes de tiamina. Conforme Walberg, (1972) a ocorrência da marcha atáxica pode ser atribuída a uma perda de conexão entre vias neurais cerebelares e vias vestibulares levando a uma perda de controle postural e conseqüentemente, como mecanismo compensatório, a realização da marcha com o alargamento da base de apoio. Em um estudo em que foram analisados cerebelos de humanos que sofreram **deficiência de tiamina**, Baker *et al.* (1999) relataram perda da conexão entre vias vestibulo-cerebelares, além de significativa diminuição na densidade celular e atrofia da camada molecular do *vérmis* cerebelar. De acordo com Jahn *et al.* (2008), indivíduos com lesão e/ou atrofia nessa região cerebelar podem apresentar ataxia. Essa lesão pode resultar na diminuição do tônus glutamatérgico cerebelar sobre estruturas do sistema vestibular e pode contribuir para induzir alterações neuroquímicas e ativar mecanismos compensatórios em outras estruturas corticais e/ou subcorticas,

como por exemplo, o estriado e provocar o surgimento da marcha atáxica. Destacamos, conforme mencionado acima, que esta região cerebelar é a mais vulnerável à deficiência de tiamina (Lavoie & Butterworth 1995; Baker *et al.*, 1999).

A hipótese de que uma redução no número de neurônios glutamatérgicos no cerebelo dos **animais deficientes e isolados**, induziriam uma diminuição do tônus excitatório glutamatérgico sobre os neurônios GABAérgicos das células de Purkinje cerebelar, está de acordo com os resultados que obtivemos com relação a reduções nas concentrações de GABA, no cerebelo, de ratos **deficientes de tiamina** achados relatados por vários autores (Hamel *et al.*, 1979; Butterworth, 1982, Gaitonde, 1982).

Ainda com relação ao aumento da largura do passo nos animais deficientes, é importante considerar que essa alteração pode ter ocorrido também devido a disfunções em componentes emocionais centrais, causadas pela deficiência de tiamina, interferindo com o desempenho dos animais durante o teste. Langlais & Zhang, (1997) e Markowitsch (1988) mostraram que além das perdas neuronais no tálamo, corpos mamilares, região de vérmis cerebelar que ocorrem na deficiência de tiamina, há degeneração de tratos do sistema límbico - fimbria / fórnix e trato mamilo-talâmico. Esses achados estão de acordo com a hipótese de que o sistema emocional pode estar alterado nos animais deficientes. A percepção ou o valor dado ao estímulo aversivo - luminosidade ou a exposição do rato a um novo ambiente (corredor para impressão de patas) – dos animais deficientes poderia estar alterado, interferindo no padrão de marcha desses animais em relação aos animais padrões. Por exemplo, uma marcha relativamente mais lenta dos animais deficientes comparada com a dos animais tratados com dieta padrão, poderia refletir na largura do passo. No entanto, os dados obtidos nos

testes *Beam Balance* e *Rotarod* indicam uma maior probabilidade do efeito sobre a marcha ser devido a um problema motor – central ou também periférico.

A ausência de efeito da deficiência de tiamina sobre parâmetros neuroquímicos no estriado poderia ser explicada por um possível ajuste neurobiológico em outros sistemas de neurotransmissão, restaurando a função de GABA e glutamato nessa região. Ou uma relativa menor susceptibilidade do estriado aos efeitos da deficiência de tiamina.

Uma possível explicação para o baixo desempenho motor dos **animais isolados** seria a existência de disfunção em vias córtico-estriatais e estriado-nigrais envolvidas na regulação da transmissão dopaminérgica. Huong *et al.* (2005) mostraram que o isolamento social por 6-8 semanas causou um aumento de óxido nítrico (NO) no cérebro de camundongos. É interessante notar que já havia evidências de que níveis de NO aumentados associados à ausência das atividades sociais, em ratos, especialmente nos grupos de jovens, podiam prejudicar a memória e a aprendizagem como foi observado por Estall *et al.*, em 1993. Existem também evidências de que o NO exerce uma influência excitatória primária sobre as neurotransmissões mediadas por dopamina (DA) em condições fisiológicas (West *et al.*, 2002). Mais especificamente, o NO aumenta a liberação de DA e inibe sua recaptação, enquanto que agentes inibidores da síntese de NO promovem efeito oposto (Kiss & Vizi, 2001; West & Galloway, 1997). Dessa forma, o NO pode desempenhar um papel importante na integração da informação transmitida aos núcleos da base, mediando e/ou regulando aspectos diversos da neurotransmissão dopaminérgica. West *et al.*, (2002) sugerem através de um modelo teórico que uma hiperatividade do sistema nitrérgico pode agir paralelamente à hiperfunção dopaminérgica, característica da esquizofrenia. De acordo com este

modelo, uma disfunção em vias córtico-estriatais dependentes de NO poderia prejudicar a operação de circuitos de retropropagação estriado-nigrais envolvidos na regulação da transmissão dopaminérgica. Esta disfunção dopaminérgica poderia alterar o processamento de informações sensório-motoras em projeções neuronais e resultar em uma seleção imprópria ou inativação dos circuitos de saída do estriado envolvidos no controle de áreas pré-motoras do tronco cerebral e tálamo (West *et al.*, 2002). É sugerido que o NO tenha um importante papel regulador na sinalização das vias de dopamina e de glutamato, neurotransmissores envolvidos na integração das estruturas motoras. No presente estudo foi observado efeito do “isolamento” sobre as concentrações de GABA no estriado. No entanto, os níveis de glutamato nessa região não foram afetados pelo isolamento. Um dado interessante é que o isolamento produz uma diminuição da atividade de receptores dopaminérgicos, tipo D2 (Sundstrom *et al.*, 2002), e que a catalepsia dependente de receptores dopaminérgicos envolve a modulação por receptores glutamatérgicos, do tipo NMDA, no estriado, *nucleus accumbens e substantia nigra* (Ozer *et al.*, 1997).

Por outro lado, no tálamo o “isolamento” não afeta a concentração de GABA, mas induz um aumento na concentração de glutamato nessa região e no CPF. Embora outros estudos sejam necessários para esclarecer as relações dessas alterações com funções específicas, esses achados são interessantes, pois, mostram que as condições ambientais causam alterações neurobiológicas em regiões do SNC que podem afetar de forma significativa aspectos do comportamento.

Seja qual for o mecanismo que fundamenta as alterações observadas, é importante destacar que a **deficiência de tiamina e o isolamento** podem repercutir na forma de

distúrbios no equilíbrio, na coordenação motora e na marcha. Os tratamentos, deficiência de tiamina ($r=0,13$, $p=0,60$) e isolamento ($r=0,33$, $p=0,12$) parecem interferir com esse papel funcional do GABA, rompendo com a correlação detectada para a condição fisiológica. Uma possível explicação para esse efeito é que alterações em vias GABAérgicas provenientes do cerebelo – região em que tanto a deficiência quanto o isolamento afetam os níveis de GABA – podem refletir no CPF, resultando em reajustes dos circuitos excitatórios e inibitórios, com conseqüente perda da correlação significativa ($r=0,83$, $p=0,04$) existente nas condições controle (animais mantidos em grupo e com dieta padrão).

Pode-se argumentar que as concentrações totais de glutamato e GABA são medidas inadequadas de seus papéis como neurotransmissores, porque esses dois aminoácidos existem em várias regiões dentro do tecido cerebral. Em vez de alterações dos neurotransmissores, as mudanças relatadas poderia ser o resultado de distúrbios nos níveis de glicose e de enzimas que sintetizam ou metabolizam o glutamato e GABA. Se fosse esse o caso, a mudança observada ocorreria em todas as regiões avaliadas do cérebro. No entanto, vale a pena notar que os efeitos da deficiência de tiamina e/ou isolamento sobre os níveis dos dois aminoácidos foram regiões-cerebrais-específicas. Entre as quatro regiões em que estes aminoácidos foram determinados, apenas no cerebelo os níveis estavam alterados devido à deficiência, enquanto o efeito do isolamento ocorreu, além do cerebelo, também no estriado, tálamo e CPF.

A partir dos dados obtidos no presente estudo, levantamos a seguinte hipótese: ajustes neuroquímicos compensatórios devem acontecer na tentativa de compensar de forma adaptativa, ou seja, de acordo com a relevância do aspecto comportamental afetado, os

prejuízos causados pela **deficiência de tiamina e/ou isolamento social**, de modo a alterar a atividade de circuitos neuroquímicos para assegurar aspectos comportamentais relevantes para a sobrevivência do animal.

Através da observação de sinais clínicos, na ausência da aplicação de testes específicos, poderia não ser possível visualizar diferenças no comprimento, largura do passo, equilíbrio e coordenação motora de indivíduos que sofreram **deficiência de tiamina e/ou isolamento social**. Entretanto atividades que requerem uma maior demanda de coordenação e controle preciso de movimentos podem ser prejudicadas. Esta idéia está de acordo com os resultados observados no *Beam Balance* e *Rotarod*, onde foram observados efeitos **da deficiência e do isolamento**. Os dados obtidos no presente trabalho sugerem que avaliações quantitativas, com diferentes níveis de complexidade, de aspectos motores específicos podem ser relevantes para detecção de possíveis distúrbios decorrentes da deficiência de tiamina e do isolamento social.

Outro ponto a ser destacado é a importância dos modelos de deficiência de tiamina e modelo comportamental de isolamento social para se estudar as bases neurobiológicas de funções motoras específicas. O uso desses modelos, em estudos futuros, pode contribuir para o entendimento não apenas dos mecanismos fisiológicos dessas funções como das bases moleculares dos distúrbios relacionados a essas funções.

A deficiência de tiamina e/ou o isolamento social afetam a motricidade dos animais o que clinicamente é manifestada sob a forma de distúrbios no equilíbrio e coordenação motora e por modificações no padrão da marcha - aumento da largura do passo causado pela deficiência de tiamina. Esses dois fatores também interferem com os níveis dos aminoácidos glutamato e/ou GABA em regiões cerebrais específicas. Pode-se concluir que tanto a tiamina quanto o estímulo induzido pelo convívio em grupo desempenham papel importante na manutenção funcional de componentes neurobiológicos relacionados ao sistema de equilíbrio e coordenação motora.

Além disto, pela primeira vez, mostramos que o efeito da deficiência de uma vitamina sobre aspectos comportamentais está relacionado com as condições de estímulos ambientais provenientes de interações sociais entre indivíduos. Os efeitos da deficiência são mais pronunciados em indivíduos em condições de isolamento social. A interação entre os efeitos desses dois fatores, deficiência de tiamina e isolamento, acontece não apenas no nível comportamental – desempenho no *Beam Balance* e *Rotarod* - como no nível de GABA no estriado e cerebelo e glutamato no CPF.

A partir dos dados obtidos, levantamos a hipótese de que ajustes neuroquímicos compensatórios acontecem na tentativa de compensar os prejuízos causados pela **deficiência de tiamina e/ou isolamento social**, de modo a alterar a atividade de circuitos neuroquímicos com a finalidade de assegurar aspectos comportamentais relevantes para a sobrevivência do animal.

Os resultados obtidos nesse trabalho indicam que o modelo comportamental do isolamento social e o modelo da deficiência de tiamina são instrumentos úteis para se

estudar a relação entre um fator que causa neurodegeneração e um estímulo do meio ambiente. A utilização desses modelos poderá contribuir no entendimento das bases neurobiológicas responsáveis pela relação entre diferentes processos que levam à morte neuronal e estímulos do meio ambiente.

Algumas das perspectivas originadas a partir dos resultados do presente estudo:

Considerando que **a deficiência de tiamina e/ou o isolamento** alteram a motricidade dos animais e interfere com as concentrações dos aminoácidos GABA e glutamato, relacionados ao comportamento motor, seria interessante incluir, em pesquisas futuras, outras avaliações, como por exemplo:

(i) liberação de neurotransmissores, em condições basais e estimuladas; (ii) atividades de receptores; (iii) conteúdo e liberação da dopamina, dada sua íntima relação entre circuitos motor e modulação GABAérgica e glutamatérgica; (iv) determinações de parâmetros neuroquímicos e fisiológicos no sistema nervoso periférico; (v) análises morfométricas em regiões do SNC e SNP; (vi) aplicações de outros testes motores que demandam componentes motores diferentes.

ANEXOS

Semanas	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
	400	402	421	428	439	453	457	469	471	470	477	484	483	494	492	498	506	512
	371	378	387	396	407	413	427	432	438	445	449	469	471	473	488	489	491	498
	310	313	324	333	351	362	377	390	397	406	408	418	426	431	438	448	447	450
	356	366	371	379	391	407	406	419	423	430	442	459	467	468	478	483	480	491
	349	351	365	373	379	392	415	426	432	437	445	464	474	483	480	481	479	487
Padrão Isolados	328	330	333	343	358	362	371	378	384	393	411	410	422	434	443	456	458	460
	309	315	345	377	414	434	440	459	466	472	490	499	498	500	503	509	508	507
Peso corporal (g)	328	336	366	392	438	457	471	486	488	496	513	515	517	516	523	522	527	526
	379	381	299	315	337	360	376	387	389	393	400	405	418	438	459	460	462	461
	438	342	354	381	423	440	452	452	465	467	472	479	488	490	500	506	507	506
	361	365	381	407	436	460	482	488	498	507	513	539	551	553	550	553	551	550
	350	352	375	412	456	471	491	502	517	535	556	558	559	560	559	557	560	559
	305	307	328	352	401	424	435	475	491	501	509	528	530	530	528	531	530	534

TABELA 7: Dados referentes aos pesos corporais dos animais Padrão-isolados, tratados com ração padrão, aferidos durante 17 semanas. As 17 semanas equivalem aos períodos: imediatamente anterior à deficiência (semana 0), deficiência e recuperação dos animais tratados com ração deficiente em B1.

Semanas	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Deficientes Isolados	401	408	448	459	402	338	289	250	305	406	462	543	567	574	577	587	588	490
	359	363	388	392	338	304	284	248	218	207	172	170	285	301	380	407	423	430
	318	320	331	333	320	223	217	204	192	180	214	265	381	399	409	439	458	460
	348	351	371	366	337	309	304	283	275	255	235	230	212	210	302	387	422	438
	315	318	336	342	310	290	274	260	254	247	241	238	217	213	324	401	437	503
	361	367	278	290	281	242	229	237	252	291	320	348	366	389	398	401	455	469
	306	312	329	336	300	249	217	206	200	221	249	279	306	328	344	387	397	399
	322	327	339	348	306	231	212	204	260	277	291	310	337	348	363	370	381	389
	349	355	370	388	380	361	343	320	309	290	261	211	234	274	301	355	378	386
	337	343	357	378	350	306	277	237	203	189	226	279	314	361	374	385	392	391
382	389	317	354	338	305	288	243	230	222	259	279	308	319	325	346	352	365	

TABELA 8: Dados referentes aos pesos corporais dos animais Deficientes-isolados, tratados com ração deficiente, aferidos durante 17 semanas. As 17 semanas equivalem aos períodos: imediatamente anterior à deficiência (semana 0), deficiência e recuperação dos animais tratados com ração deficiente em B1. O grifo preto representa a semana em que cada animal teve o processo de deficiência revertido , ou seja, após os sinais neurológicos graves, os animais receberam injeção intraperitoneal de tiamina e voltaram a se alimentar com ração padrão.

Semanas	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Padrão Grupo	357	360	364	375	379	381	389	392	411	412	423	428	440	456	450	467	473	469
	321	324	337	356	366	374	391	402	413	425	437	444	451	460	460	477	479	478
	395	397	406	418	429	430	437	435	433	452	453	468	476	480	487	498	508	513
Peso corporal (g)	342	345	361	368	379	384	393	404	421	429	437	443	452	461	462	467	469	472
	339	342	349	373	395	399	411	424	431	437	445	458	460	462	475	482	480	487
	314	318	328	342	379	388	393	407	422	417	424	427	441	453	450	452	454	461

TABELA 9: Dados referentes aos pesos corporais dos animais Padrão-grupo, tratados com ração padrão, aferidos durante 17 semanas. As 17 semanas equivalem aos períodos: imediatamente anterior à deficiência (semana 0), deficiência e recuperação dos animais tratados com ração deficiente em B1.

Semanas	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
	300	302	319	334	320	299	274	241	232	197	219	241	297	314	342	350	357	369
	331	337	341	356	342	306	258	237	228	219	207	200	196	194	240	253	303	354
Deficientes	344	348	361	378	359	325	299	259	246	231	217	210	203	268	301	357	388	403
Grupo	351	356	360	363	334	301	287	240	233	214	212	277	302	365	391	407	431	435
	316	322	343	361	352	345	322	310	298	269	253	212	298	349	391	407	414	423
Peso corporal (g)	363	367	371	386	367	348	321	313	300	298	284	262	249	241	229	268	317	381
	313	319	329	346	332	324	318	316	307	296	285	259	243	231	280	308	368	387
	391	393	408	403	392	378	357	304	273	264	241	236	227	218	211	253	309	372

TABELA 10: Dados referentes aos pesos corporais dos animais Deficientes-grupo, tratados com ração deficiente, aferidos durante 17 semanas. As 17 semanas equivalem aos períodos: imediatamente anterior à deficiência (semana 0), deficiência e recuperação dos animais tratados com ração deficiente em B1. O grifo preto representa a semana em que cada animal teve o processo de deficiência revertido , ou seja, após os sinais neurológicos graves, os animais receberam injeção intraperitoneal de tiamina e voltaram a se alimentar com ração padrão.

Semanas	0	1	2	3	4	5	6	7	1'	2'	3'
Padrão Isolados Consumo de ração (g)	30	29	27	30	32	30	29	29	28	29	30
	30	31	33	32	31	32	30	32	31	30	31
	31	32	35	33	32	33	32	31	32	30	29
	32	32	30	31	31	30	31	33	31	32	32
	32	33	33	32	31	30	34	32	30	31	31
	33	34	33	32	31	32	33	33	31	32	31
	32	32	30	29	31	31	30	31	31	30	31
	31	32	31	32	29	30	29	31	29	30	30
	30	29	29	30	31	30	29	29	31	29	30
	29	30	34	30	31	32	33	31	30	29	29
	28	27	32	30	29	30	28	30	29	31	29
	33	34	33	34	31	33	32	33	31	32	31
	32	31	30	32	29	30	31	30	29	28	30

TABELA 11: Dados referentes ao consumo de ração dos animais Padrão-isolados, tratados com ração padrão. A semana identificada com o número “0” corresponde ao período anterior ao episódio de deficiência de tiamina. As semanas de 1 a 7 correspondem às últimas sete semanas do episódio de deficiência de cada animal, sendo que na semana 7 os animais apresentaram os sinais neurológicos e a deficiência de tiamina foi revertida, como descrito em material e métodos. As semanas 1’, 2’ e 3’ correspondem ao final do período de recuperação, período imediatamente anterior ao início dos testes comportamentais.

Semanas	0	1	2	3	4	5	6	7	1'	2'	3'
	28	26	30	28	19	9	6	2	30	30	32
	34	18	12	8	8	10	6	3	30	29	30
	27	31	22	16	11	6	3	1	30	31	32
	30	10	12	11	8	6	3	1	33	32	32
Deficientes Isolados	29	11	10	8	8	5	2	2	30	31	33
	28	28	33	30	14	6	2	2	33	32	34
Consumo de ração (g)	34	31	29	12	16	10	5	3	32	30	33
	31	31	29	34	11	9	7	2	32	31	32
	29	19	17	11	11	6	6	4	33	33	34
	30	34	20	13	11	5	3	1	31	30	31
	36	31	16	12	7	8	3	3	33	34	34

TABELA 12: Dados referentes ao consumo de ração dos animais Deficientes-isolados, tratados com ração deficiente. A semana identificada com o número “0” corresponde ao período anterior ao episódio de deficiência de tiamina. As semanas de 1 a 7 correspondem às últimas sete semanas do episódio de deficiência de cada animal, sendo que na semana 7 os animais apresentaram os sinais neurológicos e a deficiência de tiamina foi revertida, como descrito em material e métodos. As semanas 1’, 2’ e 3’ correspondem ao final do período de recuperação, período imediatamente anterior ao início dos testes comportamentais.

Semanas	0	1	2	3	4	5	6	7	1'	2'	3'
Padrão Grupo	29	30	26	28	30	29	30	28	30	31	30
	29	30	26	28	30	29	30	28	29	30	30
	29	30	26	28	30	29	30	28	30	31	30
Consumo de ração (g)	30	28	31	29	27	28	31	30	28	30	29
	30	28	31	29	27	28	31	30	29	28	29
	30	28	31	29	27	28	31	30	27	29	29

TABELA 13: Dados referentes ao consumo de ração dos animais Padrão-grupo, tratados com ração deficiente. A semana identificada com o número “0” corresponde ao período anterior ao episódio de deficiência de tiamina. As semanas de 1 a 7 correspondem às últimas sete semanas do episódio de deficiência de cada animal, sendo que na semana 7 os animais apresentaram os sinais neurológicos e a deficiência de tiamina foi revertida, como descrito em material e métodos. As semanas 1', 2' e 3' correspondem ao final do período de recuperação, período imediatamente anterior ao início dos testes comportamentais.

Semanas	0	1	2	3	4	5	6	7	1'	2'	3'
	30	29	21	20	14	11	6	2	30	30	31
	30	29	21	20	14	11	6	2	29	29	31
	30	29	21	20	14	11	6	2	31	30	31
Deficientes Grupo	31	20	18	13	9	10	7	3	30	28	30
Consumo de ração (g)	31	20	18	13	9	10	7	3	30	31	30
	28	14	15	12	10	7	6	4	28	29	29
	28	14	15	12	10	7	6	4	29	30	29
	28	14	15	12	10	7	6	4	29	30	29

TABELA 14: Dados referentes ao consumo de ração dos animais Deficientes-grupo, tratados com ração deficiente. A semana identificada com o número “0” corresponde ao período anterior ao episódio de deficiência de tiamina. As semanas de 1 a 7 correspondem às últimas sete semanas do episódio de deficiência de cada animal, sendo que na semana 7 os animais apresentaram os sinais neurológicos e a deficiência de tiamina foi revertida, como descrito em material e métodos. As semanas 1', 2' e 3' correspondem ao final do período de recuperação, período imediatamente anterior ao início dos testes comportamentais.

Semanas	0	1	2	3	4	5	6	7	1'	2'	3'
	32	31	33	29	31	34	35	36	35	36	36
	34	30	32	30	34	33	31	35	36	38	38
	39	33	31	37	32	38	37	36	37	38	39
	37	36	32	34	35	37	33	34	37	36	37
	33	33	34	35	32	34	31	33	37	37	38
Padrão Isolados	35	29	34	36	33	31	34	32	38	38	38
	38	40	39	36	39	33	36	36	37	38	37
Consumo de água (g)	35	30	32	33	35	32	32	34	35	34	36
	31	29	32	33	36	35	32	39	38	37	39
	33	34	33	35	36	32	30	37	35	36	37
	32	30	32	30	28	31	32	34	37	37	38
	36	27	37	32	33	32	31	33	32	34	37
	38	36	34	36	31	38	36	34	35	35	36

TABELA 15: Dados referentes ao consumo de água dos animais Padrão-isolados, tratados com ração padrão. A semana identificada com o número “0” corresponde ao período anterior ao episódio de deficiência de tiamina. As semanas de 1 a 7 correspondem às últimas sete semanas do episódio de deficiência de cada animal, sendo que na semana 7 os animais apresentaram os sinais neurológicos e a deficiência de tiamina foi revertida, como descrito em material e métodos. As semanas 1', 2' e 3' correspondem ao final do período de recuperação, período imediatamente anterior ao início dos testes comportamentais.

Semanas	0	1	2	3	4	5	6	7	1'	2'	3'
	37	37	36	31	27	13	7	4	37	36	38
	32	27	22	18	10	10	7	5	31	32	32
	35	30	23	20	22	18	11	4	33	32	34
	31	30	21	19	15	16	11	6	32	33	33
Deficientes Isolados	35	30	27	23	21	16	12	5	34	35	35
	34	32	29	25	22	12	11	6	32	32	33
Consumo de água (g)	37	38	35	24	19	13	10	7	37	36	38
	31	30	31	24	21	16	8	3	34	33	34
	35	23	19	21	18	14	9	6	31	34	32
	33	27	28	23	19	13	7	5	32	30	30
	32	29	27	22	22	17	11	4	32	34	34

TABELA 16: Dados referentes ao consumo de água dos animais Deficientes-isolados, tratados com ração padrão. A semana identificada com o número “0” corresponde ao período anterior ao episódio de deficiência de tiamina. As semanas de 1 a 7 correspondem às últimas sete semanas do episódio de deficiência de cada animal, sendo que na semana 7 os animais apresentaram os sinais neurológicos e a deficiência de tiamina foi revertida, como descrito em material e métodos. As semanas 1', 2' e 3' correspondem ao final do período de recuperação, período imediatamente anterior ao início dos testes comportamentais.

Semanas	0	1	2	3	4	5	6	7	1'	2'	3'
	34	36	30	36	31	33	35	39	38	39	38
Padrão Grupo	34	36	30	36	31	33	33	39	39	39	38
	34	36	30	36	31	33	35	39	37	38	38
Consumo de água (g)	32	30	31	34	30	29	34	31	35	36	36
	32	30	31	34	30	29	34	31	36	37	36
	32	30	31	34	30	29	34	31	34	36	36

TABELA 17: Dados referentes ao consumo de água dos animais Padrão-grupo, tratados com ração padrão. A semana identificada com o número “0” corresponde ao período anterior ao episódio de deficiência de tiamina. As semanas de 1 a 7 correspondem às últimas sete semanas do episódio de deficiência de cada animal, sendo que na semana 7 os animais apresentaram os sinais neurológicos e a deficiência de tiamina foi revertida, como descrito em material e métodos. As semanas 1’, 2’ e 3’ correspondem ao final do período de recuperação, período imediatamente anterior ao início dos testes comportamentais.

Semanas	0	1	2	3	4	5	6	7	1'	2'	3'
	35	31	28	22	24	18	14	5	38	37	38
	35	18	14	11	12	9	7	5	37	38	38
	35	24	18	14	11	12	9	5	38	39	38
Deficientes Grupo	36	37	33	29	30	24	10	6	36	36	37
Consumo de água (g)	36	33	29	30	24	11	9	6	35	37	37
	36	31	24	16	19	11	9	8	36	35	35
	36	30	31	24	16	19	11	8	36	34	35
	36	31	24	16	19	11	9	8	35	37	35

TABELA 18: Dados referentes ao consumo de água dos animais Deficientes-grupo, tratados com ração padrão. A semana identificada com o número “0” corresponde ao período anterior ao episódio de deficiência de tiamina. As semanas de 1 a 7 correspondem às últimas sete semanas do episódio de deficiência de cada animal, sendo que na semana 7 os animais apresentaram os sinais neurológicos e a deficiência de tiamina foi revertida, como descrito em material e métodos. As semanas 1', 2' e 3' correspondem ao final do período de recuperação, período imediatamente anterior ao início dos testes comportamentais.

Animais	<i>Beam Balance</i> (segundos)			
	Padrões Isolados	Tentativa 1	Tentativa 2	Tentativa 3
1		60	16	40
2		41	20	8
3		52	17	29
4		14	60	19
5		6	5	2
6		15	17	23
7		12	4	37
8		60	60	60
9		28	42	36
10		16	60	60
11		60	60	60
12		60	60	60
13		60	60	60
Média ± Erro Padrão		37 ± 6	37 ± 7	38 ± 6

TABELA 19: Dados referentes ao desempenho dos animais Padrão Isolados no teste *Beam Balance*. Os resultados representam a latência de cada animal em cada uma das três tentativas. As médias ± erro padrão são apresentadas na última linha.

Animais	<i>Beam Balance</i> (segundos)			
	Deficientes Isolados	Tentativa 1	Tentativa 2	Tentativa 3
1		1	2	3
2		4	2	8
3		1	3	1
4		13	6	3
5		2	2	7
6		14	14	29
7		13	29	35
8		6	4	3
9		3	16	10
10		3	2	5
11		8	10	45
Média ± Erro Padrão		6 ± 2	8 ± 3	14 ± 5

TABELA 20: Dados referentes ao desempenho dos animais Deficientes Isolados no teste *Beam Balance*. Os resultados representam a latência de cada animal em cada uma das três tentativas. As médias ± erro padrão são apresentadas na última linha.

Animais	<i>Beam Balance</i> (segundos)			
	Padrões Grupo	Tentativa 1	Tentativa 2	Tentativa 3
1		60	60	49
2		60	60	60
3		60	60	60
4		60	60	60
5		44	60	60
6		60	52	42
Média ± Erro Padrão		57 ± 3	59 ± 1	55 ± 3

TABELA 21: Dados referentes ao desempenho dos animais Padrão Grupo no teste *Beam Balance*. Os resultados representam a latência de cada animal em cada uma das três tentativas. As médias ± erro padrão são apresentadas na última linha.

Animais Deficientes Grupo	<i>Beam Balance</i> (segundos)		
	Tentativa 1	Tentativa 2	Tentativa 3
1	4	4	4
2	60	60	60
3	9	7	6
4	8	5	4
5	11	14	7
6	20	10	19
7	23	13	16
8	60	60	60
Média ± Erro Padrão	24 ± 8	22 ± 8	22 ± 8

TABELA 22: Dados referentes ao desempenho dos animais Deficientes Grupo no teste *Beam Balance*. Os resultados representam a latência de cada animal em cada uma das três tentativas. As médias ± erro padrão são apresentadas na última linha.

Animais	Rotarod 5 RPM (segundos)		
	Padrões Isolados	Tentativa 1	Tentativa 2
1	300	300	300
2	300	300	300
3	50	31	28
4	300	300	300
5	300	300	300
6	300	300	300
7	124	34	23
8	2	2	2
9	300	300	300
10	300	300	300
11	8	7	12
12	300	102	268
13	300	300	300
Média ± Erro Padrão	222 ± 35	198 ± 38	210 ± 37

TABELA 23: Dados referentes ao desempenho dos animais Padrão Isolados no teste *Rotarod 5 RPM*. Os resultados representam a latência de cada animal em cada uma das três tentativas. As médias ± erro padrão são apresentadas na última linha.

Animais	Rotarod 5 RPM (segundos)			
	Deficientes Isolados	Tentativa 1	Tentativa 2	Tentativa 3
1		18	11	4
2		275	223	300
3		8	3	3
4		300	63	35
5		8	5	14
6		3	6	6
7		6	8	26
8		5	6	8
9		9	21	15
10		4	5	16
11		232	164	132
Média ± Erro Padrão		79 ± 37	47 ± 23	51 ± 27

TABELA 24: Dados referentes ao desempenho dos animais Deficientes Isolados no teste *Rotarod 5 RPM*. Os resultados representam a latência de cada animal em cada uma das três tentativas. As médias \pm erro padrão são apresentadas na última linha.

Animais	Rotarod 5 RPM (segundos)			
	Padrões Grupo	Tentativa 1	Tentativa 2	Tentativa 3
1		300	300	300
2		300	300	300
3		300	300	300
4		300	300	300
5		300	300	300
6		300	300	300
Média ± Erro Padrão		300 ± 0	300 ± 0	300 ± 0

TABELA 25: Dados referentes ao desempenho dos animais Padrão Grupo no teste Rotarod 5 RPM. Os resultados representam a latência de cada animal em cada uma das três tentativas. As médias ± erro padrão são apresentadas na última linha.

Animais Deficientes Grupo	Rotarod 5 RPM (segundos)		
	Tentativa 1	Tentativa 2	Tentativa 3
1	300	300	300
2	300	300	300
3	300	300	300
4	188	41	33
5	300	300	300
6	300	300	300
7	300	300	300
8	300	300	300
Média ± Erro Padrão	24 ± 8	22 ± 8	22 ± 8

TABELA 26: Dados referentes ao desempenho dos animais Deficientes Grupo no teste *Rotarod 5 RPM*. Os resultados representam a latência de cada animal em cada uma das três tentativas. As médias ± erro padrão são apresentadas na última linha.

Animais	Rotarod 25 RPM (segundos)			
	Padrões Isolados	Tentativa 1	Tentativa 2	Tentativa 3
1		78	95	80
2		287	258	272
3		18	6	8
4		188	208	145
5		67	82	93
6		66	69	72
7		10	7	7
8		2	2	2
9		123	104	116
10		106	102	82
11		7	4	4
12		80	89	59
13		66	153	95
Média ± Erro Padrão		84 ± 22	91 ± 22	80 ± 21

TABELA 27: Dados referentes ao desempenho dos animais Padrão Isolados no teste *Rotarod 25 RPM*. Os resultados representam a latência de cada animal em cada uma das três tentativas. As médias ± erro padrão são apresentadas na última linha.

Animais Deficientes Isolados	Rotarod 25 RPM (segundos)		
	Tentativa 1	Tentativa 2	Tentativa 3
1	3	3	3
2	15	6	5
3	2	3	3
4	28	27	27
5	2	3	3
6	7	7	8
7	8	12	4
8	6	7	6
9	10	6	3
10	4	2	5
11	4	2	4
Média ± Erro Padrão	8 ± 2	7 ± 2	6 ± 2

TABELA 28: Dados referentes ao desempenho dos animais Deficientes Isolados no teste *Rotarod 25 RPM*. Os resultados representam a latência de cada animal em cada uma das três tentativas. As médias ± erro padrão são apresentadas na última linha.

Animais	Rotarod 25 RPM (segundos)			
	Padrões Grupo	Tentativa 1	Tentativa 2	Tentativa 3
1		124	285	131
2		300	261	204
3		125	207	157
4		167	154	185
5		154	165	90
6		300	300	290
Média ± Erro Padrão		195 ± 3	229 ± 1	176 ± 3

TABELA 29: Dados referentes ao desempenho dos animais Padrão Grupo no teste *Rotarod 25 RPM*. Os resultados representam a latência de cada animal em cada uma das três tentativas. As médias ± erro padrão são apresentadas na última linha.

Animais Deficientes Grupo	Rotarod 25 RPM (segundos)		
	Tentativa 1	Tentativa 2	Tentativa 3
1	43	35	31
2	34	23	29
3	23	40	63
4	29	12	16
5	47	42	42
6	64	44	19
7	108	34	14
8	93	52	69
Média ± Erro Padrão	55 ± 11	35 ± 5	35 ± 7

TABELA 30: Dados referentes ao desempenho dos animais Deficientes Grupo no teste *Rotarod 25 RPM*. Os resultados representam a latência de cada animal em cada uma das três tentativas. As médias ± erro padrão são apresentadas na última linha.

Animais Padrões Isolados	Distâncias referentes às pegadas dos animais (mm)	
	Largura do passo	Comprimento do passo
1	36	71
2	39	84
3	37	69
4	42	68
5	38	74
6	41	59
7	37	69
8	33	68
9	41	67
10	32	64
11	38	71
12	36	68
13	42	67
Média ± Erro Padrão	38 ± 1	69 ± 2

Tabela 31: Dados do teste de Impressão das Patas referente às larguras e aos comprimentos dos passos dos animais Padrão Isolados. Os resultados apresentados representam, para cada animal, a média de quatro tentativas e pelo menos cinco ciclos de marcha. As médias ± erro padrão são apresentadas na última linha.

Animais Deficientes Isolados	Distâncias referentes às pegadas dos animais (mm)	
	Largura do passo	Comprimento do passo
1	48	75
2	41	75
3	38	71
4	44	61
5	49	63
6	47	70
8	50	64
9	53	72
	43	70
10	47	63
11	53	61
Média ± Erro Padrão	47 ± 2	68 ± 2

Tabela 32: Dados do teste de Impressão das Patas referente às larguras e aos comprimentos dos passos dos animais Deficientes Isolados. Os resultados apresentados representam, para cada animal, a média de quatro tentativas e pelo menos cinco ciclos de marcha. As médias ± erro padrão são apresentadas na última linha.

Animais Padrões Grupo	Distâncias referentes às pegadas dos animais (mm)	
	Largura do passo	Comprimento do passo
1	37	63
2	38	69
3	35	61
4	32	67
5	40	68
6	40	70
Média ± Erro Padrão	37 ± 1	66 ± 1

Tabela 33: Dados do teste de Impressão das Patas referente às larguras e aos comprimentos dos passos dos animais Padrão Grupo.

Os resultados apresentados representam, para cada animal, a média de quatro tentativas e pelo menos cinco ciclos de marcha. As médias ± erro padrão são apresentadas na última linha.

Animais Deficientes Grupo	Distâncias referentes às pegadas dos animais (mm)	
	Largura do passo	Comprimento do passo
1	43	69
2	48	76
3	44	73
4	41	76
5	45	73
6	54	62
7	49	67
8	50	68
Média ± Erro Padrão	46 ± 1	70 ± 2

Tabela 34: Dados do teste de Impressão das Patas referente às larguras e aos comprimentos dos passos dos animais Deficientes Grupo. Os resultados apresentados representam, para cada animal, a média de quatro tentativas e pelo menos cinco ciclos de marcha. As médias \pm erro padrão são apresentadas na última linha.

- Arvello, J.J. Exploração funcional da nulo. Caracas, OMS, 1978, p. 23-39.
- Arvello, J.J. Exploración funcional del pie. Caracas, OMS, 1980, p. 23-7.
- B. Greco, S. Lopez, H. van der Putten, P. J. Flor, and M. Amalric (2010) Metabotropic Glutamate 7 Receptor Subtype Modulates Motor Symptoms in Rodent Models of Parkinson's Disease. *The Journal of Pharmacology and experiemntal therapeutics* Vol. 332, No. 3.
- Bâ, A. & Seri, B.V. 1993. Functional development of central nervous system in the rat: ontogeny of nociceptive thresholds. *Physiol Behav.* 54: 403-405.
- Bâ, A. & Seri, B.V. 1995. Psychomotor functions in developing rats: ontogenetic approach to structure-function relationships. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 19: 413-425.
- Bâ, A. Metabolic and Structural Role of Thiamine in Nervous Tissues. 2008. *Cell Mol Neurobiol.* 28: 923-931.
- Baenninger LP (1967) Comparison of behavioral development in socially isolated and grouped rats. *Animal Behaviour* 15, 312-23.
- Baker, K.G.; Harding, A.J.; Halliday, G.M.; Kril, J.J.; Harper, C.G. 1999. Neuronal loss in functional zones of the cerebellum of chronic alcoholics with and without Wernicke's encephalopathy. *Neuroscience* 91: 429–438.
- Bakshi VP, Schwarzkopf SB, Braff DL, Geyer MA. Long term behavioral and neurochemical changes after isolation rearing in rats. *Biol. Psychiatry*, 1996; 39: 555.
- Bamford, N.S.; Zhang, H.; Schmitz, Y.; Wu, N.P.; Cepeda, C.; Levine, M.S.; Schmauss, C.; Zakharenko, S.S.; Zablow, L. & Sulzer, D. Heterosynaptic dopamine neurotransmission selects sets of corticostriatal terminals. *Neuron.* 2004; 42: 653–663.
- Barneoud, P.; Descombris, E.; Aubin, N.; Abrous, D.N. Evaluation of simple and complex sensorimotor behaviours in rats with a partial lesion of the dopaminergic nigrostriatal system. *Eur J Neurosci.* 2000;12:322–336.
- Barnett S (1963) *A Study in Behaviour: Principles of Ethology and Behavioural Physiology displayed mainly in the Rat.* London: Methuen.

- Baumgartner R.N., Koehler K.M., Gallagher D., Romero L, Heymsfield S.B., Ross R.R., Garry P.J., Lindeman R.D. Epidemiology of sarcopenia among the elderly in New Mexico. *Am J Epidemiol.* 1998;147:755-763.
- Bean G, Lee T (1991) Social isolation and cohabitation with haloperidol-treated partners: effect on density of striatal dopamine D-sub-2 receptors in the developing rat brain. *Psychiatry Research* 36(3), 307-17.
- Ben-Ari, Y.; Gaiarsa, J.L; Tyzio, R. & Khazipov, R. GABA: A pioneer transmitter that excites immature neurons and generates primitive oscillations. 2007. *Physiol. Rev.* 87: 1215-1284.
- Berg, J. M.; Tymoczko, J. L.; Striyer, L. *Biochemistry.* 2004. New York, Freeman and Company, VI edição, 1026p.
- Bethany, C. , Reeb-Sutherland and Akaysha, C. T. Dissociation between Neonatal Novelty-Induced Preferential Maternal Care and Enhancement in Cognitive, Social, and Emotional Functions. BC Reeb-Sutherlan - Behavioural Brain Research, 2011 – Elsevier.
- Bianchi, L. Galleti, F. Bolam, J.P & Della Corte, L. 2003. The effect of 6-hydroxydopamine lesions on the release of amino acids in the direct and indirect pathways of the basal ganglia: a dual microdialysis probe analysis. *European Journal of Neuroscience* 18: 856-868.
- Bickerdike, M.J., Wright, I.K., Marsden, C.A., 1993. Social isolation attenuates rat forebrain 5-HT release induced by KCI stimulation and exposure to a novel environment. *Behav. Pharmacol.* 4, 231-236.
- Brambilla, P.; Perez, J.; Barale, F.; Schettini, G. & Soares, J.C. GABAergic dysfunction in mood disorders. *Molecular Psychiatry.* 2003; 8: 721-737.
- Brandão, M.L. 1991. *As Bases Psicofisiológicas do Comportamento.* São Paulo. EPU. 119p.
- Brenes, J.C., Fornaguera, J. 2008. The effect of chronic fluoxetine on social isolation-induced changes on sucrose consumption, immobility behavior, and on serotonin and dopamine function in hippocampus and ventral striatum. *Behav. Brain.*
- Brenes, J.C., Rodríguez, O., Fornaguera, J. Differential effect of environment enrichment and social isolation on depressive-like behavior, spontaneous activity and serotonin and

- norepinephrine concentration in prefrontal cortex and ventral striatum. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 2008;89: 85-93.
- Buccafusco, J. J. 2001. *Methods of behavior analysis in neuroscience*. CRC Press. Washington, DC.
 - Buszaki, G. & Chrobak, J.J. 1995. Temporal structure in spatially organized neuronal assemblies: a role for interneuronal networks. *Curr. Opin. Neurobiol.* 5: 504- 510.
 - Butterworth, R. F. 1982. Regional amino acid neurotransmitter distribution in thiamin deficiency. *Ann. NY Acad. Sci.* 378:464--{i5.
 - Butterworth, R.F. 2003. Thiamin deficiency and brain disorders. *Nutrition Research Reviews* 16: 277–283.
 - Butterworth, R.F.; Giguère, J.F.; Besnard, A.M. 1986. Activities of thiamine-dependent enzymes in two experimental models of thiamine-deficiency encephalopathy. 2. aketoglutarate dehydrogenase. *Neurochemical Research* 11: 567-577.
 - Carrillo-Reid, L.; Tecuapetla, F.; Tapia, D.; Hernandez-Cruz, A.; Galarraga, E.; Drucker-Colin, R. & Vargas, J. Encoding Network States by Striatal Cell Assemblies. *J Neurophysiol.* 2008; 99: 1435–1450.
 - Carvalho, F.M.; Pereira, S.R.C.; Pires, R.G.W.; Ferraz, V.P.; Romano-Silva, M.A.; Oliveira-Silva, I.F. and Ribeiro A.M. 2006. Thiamine deficiency decreases glutamate uptake in the prefrontal cortex and impairs spatial memory performance in a water maze test. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 83: 481–489.
 - Cassidy AW, Mulvany SK, Pangalos MN, Murphy KJ, Regan CM. Developmental emergence of reelin deficits in the prefrontal cortex of Wistar rats reared in social isolation. *Neuroscience*. 2010 Mar 17;166(2):377-85. Epub 2009 Dec 24.
 - Cauli, O.; Regina, R.; Llansola, M.; Montoliu, C.; Monfort, P.; Piedrafita, B.; Mlili, N.; Boix, J.; Agustí, A. & Felipo, V. Glutamatergic and gabaergic neurotransmission and neuronal circuits in hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis.* 2009; 24: 69–80.

- Celada, P.; Paladini, C.A. and Tepper, J.M. GABAergic control of rat substantia nigra dopaminergic neurons: role of globus pallidus and substantia nigra pars reticulata. *Neuroscience*. 1999; 89: 813-825.
- Centonze, D.; Rossi, S.; De Bartolo, P.; De Chiara, V.; Foti, F.; Musella, A.; Mataluni, G.; Rossi, S.; Bernardi, G.; , G. & Petrosini, L. Adaptations of glutamatergic synapses in the striatum contribute to recovery from cerebellar damage. *European Journal of Neuroscience*. 2008; 27: 2188–2196.
- Cepeda, C.; Buchwald, N.A. & Levine, M.S. Neuromodulatory actions of dopamine in the neostriatum are dependent upon the excitatory amino acid receptor subtypes activated. *Proc.Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1993; 90: 9576–9580.
- Chambers, W.W. & Sprague, J.M. Functional localization in the cerebellum. I. Organization in longitudinal cortico-nuclear zones and their contribution to the control of posture, both extrapyramidal and pyramidal. *J Comp Neurol*. 1955a; 103: 105–29.
- Chambers, W.W. & Sprague, J.M. Functional localization in the cerebellum. II. Somatotopic organization in cortex and nuclei. *AMA Arch Neurol Psychiatry*. 1955b; 74: 653–80.
- Charness, M.E. 1993. Brain lesions in alcoholics. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 17: 2–11.
- Chen, L. & Yung, W.H. 2004. GABAergic neurotransmission in globus pallidus and its involvement in neurologic disorders. *Acta Physiologica Sinica*. 56 (4): 427-435.
- Chevalier, G. & Deniau, J.M. 1990. Desinhibition as a basic process in the expression of striatal functions. *Trends Neurosci*. 13: 277-280.
- Ciccia, R.M. & Langlais, P.J. 2000. An examination of the synergistic interaction of the ethanol and thiamine deficiency in the development of neurological signs and long-term cognitive and memory impairments. *Alcohol. Clin. Exp. Res*. 24: 622-634.
- Cohen AD, Tillerson JL, Smith AD, Schallert T, Zigmond MJ. Neuroprotective effects of prior limb use in 6-hydroxydopamine-treated rats: possible role of GDNF. *J Neurochem*. 2003;85(2):299-305.

- Colosimo, E.A., Giolo, S.R. *Análise de Sobrevivência Aplicada*. São Paulo: Edgard Blucher, 2006.
- Cooper, J. R . , Pincus, J. H. 1979. The role of thiamine in nervous tissue. *Neurochem. Res.* 4:223-39.
- Correia, P.; Amanda, P.; Espanha, M. (2003). *Organização e Controle dos Movimentos*. In Correia, P. (Ed.), *Anatomofisiologia Tomo II – Função neuromuscular* (pp. 123-160). Lisboa: Edições FMH.
- Daniels, L. & Worthingham, C. *Provas de função muscular*. 35 ed. Rio de Janeiro, Interamericana, 1975.
- Deumens, R.; Blokland, A. & Prickaerts, J. Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. *Exp Neurol.* 2007;175:303–317.
- Dhir, A.; Akula, K.K. & Kulkarni, S.K. 2008. Tiagabine, GABA uptake inhibitor, attenuates 3-nitropropionic acid-induced alterations in various behavioral and biochemical parameters in rats. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry.* 32: 835–843.
- Dichgans, J. & Diener, H.C. Clinical evidence for functional compartmentalization of the cerebellum. In: Bloedel, J.R.; Dichgans, J.; Precht, W. editors. *Cerebellar functions*. Berlin: Springer Verlag; 1984. p. 126–47.
- Dostrovsky, J.O.; Hutchison, W.D & Lozano, A.M. The Globus Pallidus, Deep Brain Stimulation, and Parkinson's Disease. *Neuroscientist.* 2002; 8: 284-290.
- Douglas CR. *Tratado de fisiologia aplicado à fisioterapia*. 5nd.ed. São Paulo: Robe; 2002.
- Dronjak S, Gavrilovic L. Effects of stress on catecholamine stores in central and peripheral tissues of long-term socially isolated rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2006;39: 785-790.
- Dumitriu, D.; Cossart, R.; Huang, J. & Yuste, R. 2007. Correlation between axonal morphologies and synaptic input kinetics of interneurons from mouse visual cortex. *Cereb. Cortex*: 17: 81-9.

- Dunham, N.W. & T.S. Miya (1957) *J. Amer. Pharm. Assoc.* 46: 253-9.
- Ehlers CL, Kanebo WM, Owens MT, Nemeroff CB (1993) Effects of gender and social isolation on electroencephalogram and neuroendocrine parameters in rats. *Biological Psychiatry* 33(51, 358-66).
- Eibl-Eibesfeldt L (1967) Concepts of ethology and human behavior. In: *Early Behavior: Comparative and Developmental Approaches* (Stevenson HW, Hess EH, Reinegold HL, eds). New York: John Wiley, pp. 137-41.
- Eidelberg, E.; Walden, J.G. & Nguyen, L.H. Locomotor control in Macaque monkeys. *Brain*. 1981; 104: 647–663.
- Einon, D.F., Morgan, M.J., 1977. A critical period for social isolation in the rat. *Dev. Psychobiol.* 10, 123-132.
- Elliott BM, Grunberg NE (2005) Effects of social and physical enrichment on open field activity differ in male and female Sprague-Dawley rats. *Behav Brain Res* 165: 187-196.
- Estall LB, Grant SJ, Cicala GA. Inhibition of nitric oxide (NO) production selectively impairs learning and memory in the rat. *Pharmacol Biochem. Behav* 1993; 46:959-962.
- Feeney DM, Boyeson MG, Linn RT, Murray HM, Dail WG. Responses to cortical injury. I. Methodology and local effects of contusions in the rat. *Brain Res* 1981;211:67–77.
- Ferreira-Vieira, 2011 submetido. Maternal thiamine restriction affects central GABA and glutamate concentrations and motor performances in adult rat offspring. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação de Neurociências. Universidade Federal de Minas Gerais.
- Fiatarone-Singh MA. Body composition and weight control in older adults. In: Lamb DR, Murray R (eds). *Perspectives in exercise science and sports medicine: exercise, nutrition and weight control*. Carmel: Cooper; 1998 a. p. 243-288. v.11.
- Fone, K.C., Porkess, M.V., 2008. Behavioural and neurochemical effects of post-weaning social isolation in rodents - relevance to developmental neuropsychiatric disorders (Review). *Neurosci. Biobehav. Rev.* 32, 1087-1102.

- Fox, S. (2002). *Human Physiology* (7th Ed.) New York: McGraw-Hill.
- Freeman, G.B.; Nielsen, P.E. & Gibson, G.E. 1987. Effect of age on behavioral and enzymatic changes during thiamin deficiency. *Neurobiol Aging* 8 (5): 429-434.
- Freitas-Silva, D.M.; Ferraz, V. P. & Ribeiro, A.M. 2011. Improved high-performance liquid chromatographic method for GABA and glutamate determination in regions of the rodent brain. *Journal of Neuroscience Methods* 177(2): 289-293.
- Fujimoto, S.T.; Longhi, L.; Saatman, K.E.; McIntosh, T.K. 2004. Motor and cognitive function evaluation following experimental traumatic brain injury. *Biobehavioral Reviews* 28: 365-378.
- Fuste A, Vidal J (1993) Antibody response to rat erythrocytes and some behaviors in two strains of mice after social isolation. *Journal of General Psychology* 120(2), 165-76.
- Gaitonde, M. K. 1982. Neurotransmitter function in thiamine-deficiency encephalopathy. *Neurochem. Int.* 4:465.
- Genaro G. & W.R. Schmidek. 2002. Exploratory activity of rats in three different environment. *Physiol. Behav.* 75: 681-688.
- Genaro G.; W.R. Schmidek & C.R. Franci, 2004. Social condition affects hormone secretion and exploratory behavior in rats. *Braz. J. Med. Biol.Res.* 37: 833-840.
- Gentsch, C., Lichtsteiner, M. and Feer, H., Locomotor activity, defecation score and corticosterone level during an open field exposure: A comparison among individually and group-housed rats, and genetically selected rat lines, *Physiol. Behav.*, 27 (1981) 183-186.
- Gersh, F.S. & D.C. Fowles. 1979. Neurotic depression; the concept of anxious depression. In: *Depression: The Psychobiology of the depressive disorders*, New York, Academic Press, p. 81-104.
- Gibson, G.; Barclay, L.; Blass, J. 1982 The role of the cholinergic system in thiamin deficiency. *Ann NY Acad Sci* 378: 382-40.

- Giguère, J. F. & Butterworth R. F. 1987. Activities of thiamine-dependent enzymes in two experimental models of thiamine deficiency encephalopathy: 3. Transketolase. *Neurochemical Research* 12 (3): 305-10.
- Godschalk, M.; Mitz, A.R.; Van Duin, B. & Van Der Burg, H. Somatotopy of monkey premotor cortex examined with microstimulation. *Neurosci Res.*1995; 23: 269-279.
- Going, S., Williams, D., Lohman, T. Aging and body composition: biological changes and methodological issues. In: Hollozy JO (ed.) *Exer. Sport Sci. Reviews*. Baltimore: Williams & Wilkins; 1995. p. 411- 449. v.23.
- Goldberg, D. J., Cooper, J. R. 1975. Effects of thiamine antagonists on nerve conduction I. Actions of antimetabolites and fern extract on propagated action potentials. 1. *Neurobiol.* 6:435-52.
- Gomez-Laplaza LM, Morgan E (1993) Social isolation, aggression, and dominance in attacks in juvenile angelfish, *Pterophyllum scalare*. *Aggressive Behaviour* 9(31, 213-22).
- Grafton, S.T. 1994. Cortical control of movement. *Ann. Neurol.* 36: 3–4.
- Greco B, Lopez S, van der Putten H, Flor PJ, Amalric M Metabotropic glutamate 7 receptor subtype modulates motor symptoms in rodent models of Parkinson's disease. *J Pharmacol Exp Ther.* 2010 Mar;332(3):1064-71.
- Grillner, S. & Wallen, P. Central pattern generators for locomotion, with special reference to vertebrates. *Annu. Rev. Neurosci.* 1985; 233–261.
- Grossman RG, Kelly PJ. Physiology of the basal ganglia in relation to dystonia. *Adv Neurol.* 1976;14:49-57.
- Günther L, Liebscher S, Jähkel M, Oehler J. Effects of chronic citalopram treatment on 5-HT1A and 5-HT2A receptors in group- and isolation-housed mice. *European Journal of Pharmacology*, 2008;593: 49-61.
- Haas, R.H. 1988. Thiamine and the brain. *Annu. Rev. Nutr.* 8: 483-515.

- Hakim, A.M. & Pappius, H.M. 1983. Sequence of metabolic, clinical and histological events in experimental thiamine deficiency. *Ann. Neurol.* 13: 365-375.
- Hamel, E., Butterworth, R. F., Barbeau, A. 1979. Effect of thiamine deficiency on levels of putative amino acid transmitters in affected regions of the rat brain. *J. Neurochem.* 33: 575-77.
- Hazell, A. S.; Butterworth, R. F.; Hakim, A. M. Cerebral vulnerability is associated with selective increase in extracellular glutamate concentration in experimental thiamine deficiency. *J. Neurochem.* 1993; 61: 1155-1158.
- He, S.Q.; Dum, R.P. & Strick, P.L. Topographic organization of corticospinal projections from the frontal lobe: motor areas on the lateral surface of the hemisphere. *J Neurosci.* 1993; 13: 952-980.
- Heidbreder, C.A., Weiss, I.C., Domeney, A.M., Pryce, C., Homberg, J., Hedou, G., Feldon, J., Moran, M.C., Nelson, P., 2000. Behavioral, neurochemical and endocrinological characterization of the early social isolation syndrome. *Neuroscience* 100, 749-768.
- Hornykiewicz O. Dopamine and extrapyramidal motor function and dysfunction. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis.* 1972;50:390-415.
- Hoshi, E.; Tremblay, L.; Feger, J.; Carras, P.L. & Strick, P.L. 2005. The cerebellum communicates with the basal ganglia. *Nat. Neurosci.* 8: 1491–1493.
- Hülya Özer, Ahmet C. Ekinçi, Michael S. Starr Dopamine D₁- and D₂-dependent catalepsy in the rat requires functional NMDA receptors in the corpus striatum, nucleus accumbens and substantia nigra pars reticulata Original Research Article *Brain Research*, Volume 777, Issues 1-2, 28 November 1997, Pages 51-59.
- Huong NTT, Murakami Y, Tohda M, Watanabe H, Matsumoto K. Social isolation stress-induced oxidative damage in mouse brain and its modulation by majonoside- R2, a Vietnamese ginseng saponin. *Biol.Pharm Bull* 2005; 28:1389-1393.
- Ichinohe, N.; Mori, F. & Shoumura, K. A di-synaptic projection from the lateral cerebellar nucleus to the laterodorsal part of the striatum via the central lateral nucleus of the thalamus in the rat. *Brain Res.* 2000; 880: 191–197.

- Iriarte J, Castro P. Correlation between symptom fatigue and muscular fatigue in multiple sclerosis. *Eur J Neurol* 1998;5:579-585.
- Irle, E. & Markowitsch, H. J. 1983. Widespread neuroanatomical damage and learning deficits following chronic alcohol consumption or vitamin B1 (thiamine) deficiency in rats. *Behav. Brain Research* 9: 277-294.
- Isovich, E.; M. Engelmann; R. Landgraf & E. Fuchs, 2001. Social isolation after a single defeat reduces striatal dopamine transporter binding. *Eur. J. Neurosci.* 13 (6): 1254-1256.
- Ito, M. *The cerebellum and neural control*. New York: Raven Press, 1984.
- J. M. Sundstrom, F. S. Hall, J. R. Stellar and E. J. Waugh Effects of isolation-rearing on intracranial self-stimulation reward of the lateral hypothalamus: Baseline assessment and drug challenges. *Life Science*, Volume 70, Issue 23, 26 April 2002, Pages 2799-2810.
- Jahn, K.; Deutschländer, A.; Stephan, T.; Kalla, R.; Wiesmann, M.; Strupp, M. & Brandt, T. Imaging human supraspinal locomotor centers in brainstem and cerebellum. *NeuroImage*. 2008; 39: 786–792.
- Jansen, B.C.P. & Donath, W.F. 1926. On the isolation of antiberiberi vitamin. *Proc. Kon. Ned. Akad. Wet.* 29:1390 – 1400.
- Jenkins, I.H.; Brooks, D.J.; Frackowiak, R.S.J.; Passingham, F.E. 1994. Motor Sequence Tomography Learning : A Study with Positron. *Learning* 14: 3775-3790.
- Jones GH, Hernandez TD, Kendall DA, Marsden CA, Robbins TW. Dopaminergic and serotonergic function following isolation rearing in rats: study of behavioural responses and post-mortem and in vivo neurochemistry. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 1992;43: 17-35.
- Jones, E. G. 1993. GABAergic neurons and their role in cortical plasticity. *Cereb. Cortex* 3: 361-372.
- Kalivas, P.W. & Duffy, P. Dopamine regulation of extracellular glutamate in the nucleus accumbens. *Brain Res.* 1997; 761: 173–177.

- Kandel, E.R.; Shwartz, J. H.; Kandel, E.R. 1997. Fundamentos da Neurociência e do Comportamento. Rio de Janeiro. Prentice-Hall do Brasil. 591p.
- Ke, Z.J., Gibson, G.E. (2004) Selective response of various brain cell types during neurodegeneration induced by mild impairment of oxidative metabolism. *Neurochem. Int.* 45, 361–369.
- Kendall, H.O.; Kendall, F.P. & Wadsworth, G.E. *Musculos: pruebas y funciones*. 22 ed. Barcelona, JIMS, 1979.
- Kharatishvili, I.; Sierra, A.; Immonen, R.J.; Gröhn, O.H.J. Pitkänen, A. 2009. Quantitative T2 mapping as a potential marker for the initial assessment of the severity of damage after traumatic brain injury in rat. *Experimental Neurology* 217(1): 154-164.
- Kickler, N.; Lacombe, E.; Chassain, C.; Durif, F.; Krainik, A.; Farion, R.; Provent, P.; Segebarth, C.; Rémy, C & Savasta, M. Assessment of metabolic changes in the striatum of a rat model of parkinsonism: an in vivo 1H MRS study. *NMR Biomed.* 2009;22:207–212.
- Kirik, D.; Rosenblad, C. & Bjorklund, A. Characterization of behavioral and neurodegenerative changes following partial lesions of the nigrostriatal dopamine system induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine in the rat. *Exp Neurol.* 1998;152:259–277.
- Kolb Whishaw, Bryan Kolb, Ian Q. Whishaw - *Fundamentals of Human Neuropsychology*. Author: Tino Gara Date: 2009-01-20 16:51:00.
- Kolb, B., Gorny, G., Limebeer, C. L. and Parker, L. A., 2006. Chronic treatment with Delta-9-tetrahydrocannabinol alters the structure of neurons in the nucleus accumbens shell and medial prefrontal cortex of rats. *Synapse.* 60, 429-436.
- Kostowski W, Czlonkowski A, Rewerski W, Piechocki T (1977) Morphine action in grouped and isolated rats and mice. *Psychopharmacology (Berl)* 53(2), 191-3.
- Kreitzer, A.C. & Malenka, R.C. Striatal Plasticity and Basal Ganglia Circuit Function. *Neuron.* 2008; 60: 543-545.
- Krnjevic, K. 1997. Role of GABA in cerebral cortex. *Can. J. Physiol. Pharm.* 75: 439- 451.

- Kumar N. Acute and subacute encephalopathies: deficiency States (nutritional). *Semin Neurol.* 2011 Apr;31(2):169-83. Epub 2011 May 17.
- Kurata, K. Information processing for motor control in primate premotor cortex. *Behav Brain Res.* 1994; 61: 135-142.
- Kutlán, D. & Molnár-Perl, I. New aspects of the simultaneous analysis of amino acids and amines as their o-phthaldialdehyde derivatives by high-performance liquid chromatography. Analysis of wine, beer and vinegar. *J. Chrom. A.* 2003; 987: 311-322.
- Lagrán, M.M.; Altafaj, X.; Gallego, X.; Martí, E.; Estivill, X.; Sahún, I.; Fillat, C. & Dierssen, M. 2004. Motor phenotypic alterations in TgDyrk1a transgenic mice implicate DYRK1A in Down syndrome motor dysfunction. *Neurobiology of Disease* 15: 132–142.
- Lalonde, R. & Strazielle, C. 2007. Brain regions and genes affecting postural control. *Progress in Neurobiology* 81: 45–60.
- Langlais, P. J.; Zhang, S. X.; Savage, L. M. 1996. Neuropathology of thiamine deficiency: an update on the comparative analysis of human disorders and experimental models. *Metab. Brain Dis.* 11: 19-37.
- Langlais, P.J. & Savage, L.M. 1995. Thiamine deficiency in rats produces cognitive and memory deficits on spatial tasks which correlate with tissue loss in diencephalon, cortex and white matter. *Behav. Brain Res.* 68: 75 –89.
- Langlais, P.J. & Zhang, S.X. 1997. Cortical and subcortical white matter damage without Wernicke's encephalopathy after recovery from thiamine deficiency in the rat. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 21: 434-443.
- Lapis MD , Fulford A , S Muchimapura , Mason R , T Parker , Marsden CA . Influência do pós-desmame isolamento social em ratos no desenvolvimento do cérebro, o comportamento condicionado, e neurotransmissão. *Neurosci Behav Physiol* 2003 Jan; 33 (1) :13-29.
- Lavoie, J. R.; Butterworth, R. F. 1995. Reduced Activities of Thiamine-Dependent Enzymes in Brains of Alcoholics in the Absence of Wernicke's Encephalopathy. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 19: 1073.

- Leng, A., Feldon, J., Ferger, B., 2004. Long-term social isolation and medial prefrontal cortex: dopaminergic and cholinergic neurotransmission. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 77, 371-379.
- Lipska, B. K. (2004). Using animal models to test a neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia. *Journal of Psychiatry & Neuroscience*, 29, 282-286.
- Lipska, B. K., & Weinberger, D. R. (2000). To model a psychiatric disorder in animals: Schizophrenia as a reality test. *Neuropsychopharmacology*, 23, 223-239.
- Manchester, D.; Woollacott, M.; Zederbauer-Hylton, N.; Marin, G. 1989. Visual, vestibular and somatosensory contribution to balance control in older adult. *J. Gerontology* 44 (4): 118-127.
- Martin, J.H. (1998). *Neuroanatomia. Texto e Atlas (2ª Ed.)* Porto Alegre: Artes Médicas.
- Martin, P.R.; Singleton, C.K. & Hiller–Sturmhöfel, S. 2003. The Role of Thiamine Deficiency in Alcoholic Brain Disease. *Alcohol Res Health.* 27 (2):134-42.
- McEwen, B.S. 2000. Definitions and concepts of stress. In: FINK, G. (Ed.) *Encyclopedia of Stress.* USA: Academic Press, v.2.
- McGee, A. W. & Brecht, D. S. 2003. Assembly and plasticity of glutamatergic postsynaptic specialization. *Curr. Opin. Neurobiol.* 13: 111-1.
- McLane, J. A., Khan, T., Held, I. R. 1987. Increased axonal transport in peripheral nerves of thiamine-deficient rats. *Exp. Neurol.* 95:482-91.
- McLean, S., Grayson, B., Harris, M., Protheroe, C., Bate, S., Woolley, M., Neill, J., 2008. Isolation rearing impairs novel object recognition and attentional set shifting performance in female rats. *J. Psychopharmacol.*
- Meldrun, B.S. 2000. Glutamate as a Neurotransmitter in the Brain: Review of Physiology and Pathology. *J. Nutr.* 130: 1007–1015.
- Mendes MF, Tilbery CP, Felipe E, Balsimelli S, Moreira MA, Barão-Cruz AM. Fadiga na forma remitente recorrente da esclerose múltipla. *Arq Neuropsiquiatr* 2000;58:471-475.

- Mengerink Y.; Kutlán, D.; Tóth, F.; Csámpai, A. & Molnár-Perl, I. 2002. Advances in the evaluation of the stability and characteristics of the amino acid and amine derivatives obtained with the o-phthalaldehyde/3-mercaptopropionic acid and phthalaldehyde N-acetyl-L-cysteine reagents high-performance liquid chromatography mass spectrometry study. *J. Chrom. A.* 949: 99-124.
- Metz G.A., Curt A., Van De Meent H., et al: Validation of the weightdrop contusion model in rats: comparative study of human spinal cord injury. *J Neurotrauma* 17: 1-17, 2000.
- Miall, S.; Chess, D.; Johnson, J & King, G. (1995). Accuracy of an electromagnetic tracking device: A study of optimal operating range and metal interference. *Journal Biomechanics*, 29, 790-793.
- Miura H, Qiao H, Ohta T. Attenuating effects of the isolated rearing condition on increased brain serotonin and dopamine turnover elicited by novelty stress. *Brain Res*, 2002; 926: 10-17.
- Mora F, Segovia G, Del Arco A. Aging, plasticity and environmental enrichment: structural changes and neurotransmitter dynamics in several areas of the brain. *Brain Res Rev.* 2007;55:78-88.
- Morgan M, Einon D (1975) Incentive motivation and behavioural inhibition in socially-isolated rats. *Physiology and Behavior* 15(4), 405-9.
- Mori, S.; Matsuyama, K.; Mori, F. & Nakajima, K. 2001. Supraspinal sites that induce locomotion in the vertebrate central nervous system. In: Ruzicka, E.; Hallet, M.; Jankovic, J. (Eds.), *Advances in Neurology. Gait Disorders*, vol. 87. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, pp. 25–39.
- Morie, S.; Matsui, T.; Kuze, B.; Asanome, M.; Nakajima, K. & Matsuyama, K. Stimulation of a restricted region in the midline cerebellar white matter evokes coordinated quadrupedal locomotion in the decerebrate cat. *J. Neurophysiol.* 1999; 82:290–300.
- Morinan A, Parker V (1985) Are socially isolated rats anxious? *British Journal of Pharmacology* 86 (suppl), 460.
- Morton, S.M. & Bastian, A.J. Cerebellar control of balance and locomotion. *Neuroscientist.* 2004; 10: 247–59.

- Mousseau, D.D.; Rao, V.L.; Butterworth, R.F. 1996. Alterations in serotonin parameters in brain on thiamine-deficient rats are evident prior to the appearance of neurological symptoms. *J. Neurochem.* 67: 1113-1123.
- Nair, D.G.; Purcott, K.L.; Fuchs, A.; Steinberg, F. & Kelso, J.A. Cortical and cerebellar activity of the human brain during imagined and executed unimanual and bimanual action sequences: a functional MRI study. *Cogn Brain Res.* 2003; 15:250-260.
- Nakagawasai, O.; Murata, A.; Arai, A.; Ohbal, A.; Wakul, K.; Mitazakil, S; Nijjima, F.; Tanno, K. Tadano, T. 2007 a. Enhanced head-twitch response to 5-HT related agonists in thiamine deficient mice. *J. Neural Transm.* 114: 1003-1010.
- Oliveira, F.A.; Galan, D.T.; Ribeiro, A.M.; Cruz, J.S. 2007. Thiamine deficiency during pregnancy leads to cerebellar neuronal death in rat offspring: Role of voltage-dependent K⁺ channels. *Brain Research:* 1134: 79-86.
- OMIM. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM (TM). Baltimore: Center for Medical Genetics of the Johns Hopkins University; 1996. Available from URL: <http://www.3.ncbi.nlm.nih.gov:80/htbin-post/Omim/dispmim/229300>.
- Orlovsky, G.N.; Deliagna, T.G. & Grillner, S. Neural control of locomotion: from mollusc to man. Oxford University Press, 1999.
- Ozawa, S.; Kamiya, H. & Tsuzuki, K. 1998. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog. Neurobiol.* 54: 581-618.
- Pacak, K. & R. McCarty. 2000. Acute Stress response: Experimental. In: FINK, G. (Ed.). *Encyclopedia of Stress.* USA: Academic Press, v.2.
- Pannunzio, P.; Hazell, A.S.; Pannunzio, M.; Rao, K.V.; Butterworth, R.F. 2000. Thiamine deficiency results in metabolic acidosis and energy failure in cerebellar granule cells: an in vitro model for the study of cell death mechanisms in Wernicke' encephalopathy. *J. Neuroscience* 62: 286-292.
- Park, L.C.H.; Calingasan, K.U.; Zhang, H.; Gibson, G.E. 2000. Metabolic impairment elicits brain cell type-selective changes in oxidative stress and cell death in culture. *J. Neurochemistry.* 74: 114-124.

- Paxinos, G. & Watson, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 1986. London, Academy Press. 209p.
- Pérez, C.; J.R. Canal; E. Dominguez; J.E. Campillo; M. Guillén & M.D. Torres. 1997. Individual housing influences certain biochemical parameters in the rat. *Laboratory. Animal.* 31: 357-361.
- Phillips, S. C. 1990. Cerebellar white matter after long-term ethanol consumption in mice. *J Stud Alcohol* 51:14–18.
- Pires, R. G. W.; Pereira, S. R. C.; Pittella, J. E. H.; Franco, G. C.; Ferreira, C. L. M.; Fernandez, P. A.; Ribeiro, A. M. The contribution of mild thiamine deficiency and ethanol consumption to central cholinergic parameter dysfunction and rat's open-field performance impairment. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior.* 2001; 70: 227-235.
- Porter, M.M., Vandervoort A. A., Lexell J. Aging of human muscle: structure, function and adaptability. *Scand J Med Sci Sports.* 1995; 5:129-142.
- Pryce, C.R., Rüedi-Bettschen, D., Dettling, A.C., Weston, A., Russig, H., Fergert, B., Feldon, J., 2005. Long-term effects of early-life environmental manipulations in rodents and primates: potential animal models in depression research (Review). *Neurosci. Biobehav. Rev.* 29, 649-674.
- Renner, M.J.; A.J. Bennett & J.C. White. 1992. Age and sex as factors influencing spontaneous exploration and object investigation by pre adult rats (*Rattus norvegicus*). *J. Comp. Physiol.* 106: 217-227.
- Rilke O, Freier D, Jahkel M, Oehler J. Dynamic alterations of serotonergic metabolism and receptors during social isolation of low and high active mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 1998a;59: 891-896.
- Rothstein, J. D. 2000. Neurobiology: bundling up excitement. *Nature* 407: 141-143.
- Rötig A, De Lonlay P, Chretien D, Foury F, Foury F, Koenig M, et al. Aconitase and mitochondrial iron-sulfur protein deficiency in Friedreich ataxia. *Nat Genet* 1997;17:215-7.

- Sáenz BJC, Villagra OR, Fornaguera TJ. Factor analysis of Forced Swimming test, Sucrose Preference test and Open Field test on enriched, social and isolated reared rats. *Behav. Brain Res.*, 2006;169:57-65.
- Sahakian, B.J., Robbins, T.W., Iversen, S.D., 1977. Effects of isolation rearing on exploration in rat. *Anim. Learn. Behav.* 5, 193-198.
- Sahakian, B.J., Robbins, T.W., Morgan, M.J. and Iversen, S.D. The effects of psychomotor stimulants on stereotypy and locomotor activity in socially-deprived and control rats, *Brain Res.*, 84 (1977) 195-205.
- Salinska, E. & Stafiej, A. 2003. Metabotropic glutamate receptors (mGluRs) are involved in early phase of memory formation: possible role of modulation of glutamate release. *Neurochem. Int.* 43: 469-474.
- Salisachs P. La historia natural de la enfermedad de Friedreich: a proposito de 13 casos. *Med Clin* 1974;63:1-10.
- Sanchez-Perez, A.; Llansola, M.; Cauli, O. & Felipo, V. 2005. Modulation of NMDA receptors in the cerebellum. II. Signaling pathways and physiological modulators regulating NMDA receptor function. *Cerebellum* 4 (3): 162-70.
- Schaafsma JD, Giladi N, Balash Y, Bartels AL, Gurevich T, Hausdorff JM. Gait dynamics in Parkinson's disease: relationship to Parkinsonian features, falls and response to levodopa. *J Neurol Sci.* 2003;212(1-2):47-53.
- Schereus KMG, Ridder DTD, Bensig JM. Fatigue in multiple sclerosis: reciprocal relationship with physical disabilities and depression. *JPsychosom Res* 2002;53:775-781.
- Schoffeniels, E. 1983. Thiamine phosphorylated derivatives and bioelectrogenesis. *Arch. Int. Physiol. Biochim.* 91 :233-43.
- Schrijver, N.C., Bahr, N.I., Weiss, I.C., Würbel, H., 2002. Dissociable effects of isolation rearing and environmental enrichment on exploration, spatial learning and HPA activity in adult rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 73, 209-224.

- Schulkin J, Gold PW, McEwen BS. Induction of corticotropin-releasing hormone gene expression by glucocorticoids: implication for understanding the states of fear and anxiety and allostatic load. *Psychoneuroendocrinology* , 1998; 23: 219-43.
- Sedelis M, Schwarting RK, Huston JP. Behavioral phenotyping of the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Behav Brain Res.* 2001;125 (1-2):109-25.
- Sequeira Lopes da Silva JT, Almaraz Velarde R, Olgado Ferrero F, Robles Marcos M, Pérez Civantos D, Ramírez Moreno JM, Luengo Pérez LM. Wernicke's encephalopathy induced by total parental nutrition. *Nutr Hosp.* 2010 Nov-Dec;25(6):1034-6.
- Sherer T, Greenamyre JT. A therapeutic target and biomarker in Friedreich's ataxia. *Neurology* 2000;55:1600-1.
- Shi, Q.; Karuppagounder, S.S.; Xu, H.; Pechman, D.; Chen, H. & Gibson, G.E. 2007. Responses of the mitochondrial alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex to thiamine deficiency may contribute to regional selective vulnerability. *Neurochemistry International* 50: 921–931.
- Shik, M.L. & Orlovsky, G.N. Neurophysiology of locomotor automatism. *Physiol. Rev.* 1976; 56: 465–501.
- Shulz JB, Dehmer T, Schöls L, Mende H, Hardt C, Vorgerd M, et al. Oxidative stress in patients with Friedreich's ataxia. *Neurology* 2000;55:1719-21.
- Shumway-Cook, A.; Woollacott, M. H. 2006. *Motor Control: Theory and Practical Applications.* Lippincott Williams & Wilkins. 552 p.
- Simola, N.; Bustamante, D.; Pinna, A.; Pontis, S.; Morales, P.; Morelli, M. & Herrera-Marschitz, M. 2008. Acute perinatal asphyxia impairs non-spatial memory and alters motor coordination in adult male rats. *Exp Brain Res.*185: 595–601.
- Singleton, C.K. & Martin, P.R. 2001. Molecular Mechanisms of thiamine utilization. *Curr. Mol. Med.* 1 (2):197-207.
- Sjöquist, B.; Johnson, H. A.; Neri, A.; Lindén, S. 1988. The influence of thiamine deficiency and ethanol on rat brain catecholamines. *Drug and Alcohol Dependence* 22 (3): 187-193.

- Spirduso, W. *Physical Dimensions of Aging*. 1st ed. Champaign: Human Kinetics, 1995.
- Standford SC, Parker V, Morinan A (1988) Deficits in exploratory behaviour in socially isolated rats are not accompanied by changes in cerebral cortical adrenoceptor binding. *Journal of Affective Disorders* 15(2), 175-80.
- Stolze, H.; Klebe, S.; Petersen, G.; Raethjen, J.; Wenzelburger, R.; Witt, K. & Deuschl, G. Typical features of cerebellar ataxic gait. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2002; 73: 310–12.
- Surmeier, D.J.; Ding, J.; Day, M.; Wang, Z.; Shen, W. D1 and D2 dopamine-receptor modulation of striatal glutamatergic signaling in striatal medium spiny neurons. *Trends Neurosci*. 2007; 30:228–235.
- Tanaka, C., Cooper, J. R. 1968. The fluorescent microscopic localization of thiamine in nervous tissue. 1. *Histochem. J.* 16:362-65.
- Tanaka, C., Itokawa, Y., Tanaka, S. 1973. The axoplasmic transport of thiamine in rat sciatic nerve. 1. *Histochem. J.* 21(1):81-86.
- Thach, W.T. & Bastian, A.J. Role of the cerebellum in the control and adaptation of gait in health and disease. *Prog Brain Res*. 2004; 143: 353–66.
- Thach, W.T.; Goodkin, H.P. & Keating, J.G. The cerebellum and the adaptive coordination of movement. *Annu Rev Neurosci*. 1992; 15: 403–42.
- Thompson, A. D.; Pratt, O. E.; Jeyasingham, M.; Shaw, G. K. 1988. Alcohol and brain damage. *Hum. Toxicol*. 7: 455-463.
- Tillerson JL, Caudle WM, Reverón ME, Miller GW. Exercise induces behavioral recovery and attenuates neurochemical deficits in rodent models of Parkinson’s disease. *Neuroscience*. 2003; 119 (3):899-911.
- Todd, K.G. & Butterworth, R.F. Mechanisms of selective neuronal cell death due to thiamine deficiency. *Ann. N. Y. Acad. Sci*. 1999; 893:404-411.
- Torvik, A. 1987. Topographic distribution and severity of brain lesions in Wernicke’s encephalopathy. *Clin. Neuropathology* 6: 25-29.

- Udo, M.; Matsukawa, K.; Kamei, H. & Oda, Y. Cerebellar control of locomotion: effects of cooling cerebellar intermediate cortex in high decerebrate and awake walking cats. *J Neurophysiol.* 1980; 44: 119–34.
- Uylings, H.B.M. & Van Eden, C.G. 1990. Qualitative and quantitative comparison of the prefrontal cortex in rat and in primates, including humans. In: Uylings, H.B.M, Van Eden, C.G.; De Bruin, J.P.C.; Corner, M.A.; Feenstra, M.P.G. (editors). *The prefrontal cortex: its structure, function and pathology.* Progress in brain research, vol. 85. Amsterdam: Elsevier. 31–62p.
- Vargas, C.D.; Rodrigues, E. C.; Fontana, A. 2008. Controle Motor. In Lent, R. *Neurociência da Mente e do Comportamento.* Rio de Janeiro. Guanabara Koogan S.A 203-225p.
- Vercoulen, JHMM, Hommes OR, Swanink CMA, et al. The measurement of fatigue in patients with multiple sclerosis. *ArchNeurol* 1996;53:642-649.
- Victor, M.; Adams, R.D.; Collins G. H. 1989. *The Wernicke–Korsakoff Syndrome and Related Neurologic Disorders Due to Alcoholism and Malnutrition.* Philadelphia. F. A. Davis Company. 231 p.
- Vigil FA, Oliveira-Silva IF, Ferreira LF, Pereira SR, Ribeiro AM. Spatial memory deficits and thalamic serotonergic metabolite change in thiamine deficient rats. *Behav Brain Res*, 2010; 210(1): 140-142.
- Von Muralt, A. 1962. The role of thiamine in neurophysiology. *Ann. NY Acad. Sci.* 98:499-507.
- Vortmeyer, A.O. & Colmant, H.J. 1988. Differentiation between brain lesions in experimental thiamine deficiency. *Virchows Arch. A. Pathol. Anat. Histopathol.:* 414: 61-67.
- Walberg, F. Cerebellovestibular relations: anatomy. *Prog. Brain. Res.* 1972; 37: 361-376.
- Wang, X.; Gao, X.; Zhang, X.; Tu, Y.; Jim, M.; Zhao, G.; Yu, L.; Jing, N. & Li, B. 2006. The negative cell cycle regulator, Tob (transducer of ErbB-2), is involved in motor skill learning. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 340: 1023.

- Wang, X.; Wang, B.; Fan, Z.; Shi, X.; Ke, Zun-Ji; Luo, J. 2007. Thiamine Deficiency Induces Endoplasmic Reticulum Stress in Neurons. *Neuroscience*: 144: 1045–1056.
- Ward N, Winters S. Results of a fatigue management programme in multiple sclerosis. *Br J Nursing* 2003; 12:1075-1080.
- Wardas, J.; Pietraszek, M.; Schulze, G.; Ossowska, K. & Wolfarth, S. 1997. Age-related changes in glutamate receptors: An autoradiographic analysis. *Polish J. Pharmacol.* 49: 401-10.
- Washburn DA, Rumbaugh DM (1991) Impaired performance from brief social isolation of rhesus monkeys (*Macaca mulata*): a multiple video-task assessment. *Journal of Comparative Psychology* 105(2), 145-51.
- Watkins, J.C & Jane, D.E. 2006. The glutamate story. *British Journal of Pharmacology* 947 (1): 122-30.
- Weiss, I.C., Feldon, J., 2001. Environmental animal models for sensorimotor gating deficiencies in schizophrenia. *Psychopharmacology* 156, 305-326.
- Weiss, I.C., Pryce, C.R., Jongen-Rêlo, A.L., Nanz-Bahr, N.I., Feldon, J., 2004. Effect of social isolation on stress-related behavioural and neuroendocrine state in the rat. *Behav. Brain Res.* 152, 279-95.
- Welker WI (1961) An analysis of exploratory and play behavior in animals. In: *Functions of Varied Experience* (Fiske DW, Maddi SR, eds). Homewood, Illinois: The Dorsey Press.
- West, A.R.; Floresco, S.B.; Charara, A.; Rosenkranz, J.A. & Grace, A.A. Electrophysiological interaction between striatal glutamatergic and dopaminergic systems. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2003; 1003: 53–74.
- Whelan, P.J. Control of locomotion in the decerebrate cat. *Prog. Neurobiol.* 1996; 49: 481–515.
- Whishaw, I.Q & Kolb, B. Oxford. 2005. *The behavior of the laboratory: A handbook with tests.*

- Williams, R.R. & Cline, J.K. 1936. Synthesis of Vitamin B1. J. Am. Chem. Soc. 58:1504-1505.
- Winer, B.J. Statistical principles in experimental design. New York: McGraw-Hill; 1962, p. 672.
- Wise, S.P. In: Luders HO, editor. Evolutionary and comparative neurobiology of the supplementary sensorimotor area, Supplementary sensorimotor area, advances in neurology, vol. 70. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven; 1996. pp. 71-84.
- Wolpert, DM. & Kawato, M. 1998. Multiple paired forward and inverse models for motor control. Neural Netw. 11 (7):1317-1329.
- Yamashita, H.; Zhang, Y.X.; Nakamura, S. 1993. The effects of thiamin and its phosphate esters on dopamine release in the rat striatum. Neuroscience Letters 158: 229–231.
- Yu, J. & Eidelberg, E. Recovery of locomotor function in cats after localized cerebellar lesions. Brain Res. 1983; 273: 121–31.