

Danielle Marra de Freitas Silva Azevedo

Efeitos da restrição de tiamina durante o desenvolvimento sobre o desempenho cognitivo espacial e níveis cerebrais de GABA e glutamato em ratos jovens e adultos.

Belo Horizonte

Instituto de Ciências Biológicas

Universidade Federal de Minas Gerais

2010

Danielle Marra de Freitas Silva Azevedo

Efeitos da restrição de tiamina durante o desenvolvimento sobre o desempenho cognitivo espacial e níveis cerebrais de GABA e glutamato em ratos jovens e adultos.

Tese apresentada ao Departamento de Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Bioquímica.

Orientadora: Prof.^a Ângela M. Ribeiro

Co-orientadora: Prof.^a Sílvia R. C. Pereira

*“A ciência humana de maneira nenhuma nega a existência de Deus.
Quando considero quantas e quão maravilhosas coisas o homem
compreende, pesquisa e consegue realizar, então reconheço
claramente que o espírito humano é obra de Deus, e a mais notável.”*

Galileu Galilei

Agradeço:

À Ângela Ribeiro e Silvia Pereira pelos quatro anos de convivência, pelos ensinamentos científicos e pela parceria de trabalho.

À Aparecida Guerra pelo auxílio técnico nos experimentos.

A todos os colegas do Laboratório de Neurociência Comportamental e Molecular pelos bons momentos vividos e pela partilha dos conhecimentos científicos.

A todos que de alguma forma contribuíram para a minha formação e realização deste trabalho: Vitor Purri, professores e técnicos do Departamento de Bioquímica e Imunologia e equipe do Cebio.

Aos meus amigos de dentro e fora da UFMG.

À minha mãe Lúcia e meu pai João Bosco que me ensinaram os valores éticos e morais que norteiam a minha vida.

À família que construí: Tito, meu companheiro de jornada; Luísa e Lara, presentes de Deus e razão do meu existir.

A deficiência de tiamina (vitamina B1) induz lesões em diversas regiões cerebrais podendo afetar os circuitos glutamatérgico e GABAérgico do sistema nervoso central, os quais estão relacionados com vários aspectos comportamentais. Diversos trabalhos sobre alterações cognitivas e bioquímicas em ratos adultos submetidos à deficiência de tiamina têm sido realizados, entretanto, raros estudos abordam este tema utilizando animais que foram submetidos à deficiência durante fases precoces do desenvolvimento. Deste modo, no presente trabalho, avaliou-se os efeitos da restrição de tiamina durante a lactação (Parte I) ou o período peri-natal (Parte II) sobre o desempenho cognitivo espacial e níveis cerebrais de GABA e glutamato da prole. Em ambos os delineamentos, as avaliações foram realizadas na fase jovem (idade = 30 dias) e adulta (idade = 75 dias) de forma independente. As variáveis comportamentais, aprendizado e memória, foram avaliadas durante treze dias utilizando um teste de navegação espacial, o Labirinto Aquático de Morris. No dia seguinte ao término dos testes, os ratos foram decapitados e os níveis de glutamato e GABA presentes no tálamo, hipocampo e córtex pré-frontal (CPF) determinados através de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC). Para este propósito um método cromatográfico para determinação dos dois aminoácidos em uma mesma amostra foi desenvolvido no presente trabalho e implantado no laboratório. A restrição de tiamina durante a lactação (Parte I) não afeta a razão entre peso encefálico e peso corporal nem dos ratos jovens nem dos adultos. Embora a capacidade de aprendizado da tarefa espacial não tenha sido afetada pela restrição de tiamina durante a lactação, a velocidade de aprendizado dos ratos jovens foi significativamente alterada [$F_{(1,27)} = 5,91$; $p = 0,022$]. Nenhum dos aspectos comportamentais – aprendizado e memória espacial - avaliados na fase adulta foram afetados. Com relação às avaliações bioquímicas, as concentrações de glutamato nas três regiões cerebrais analisadas [tálamo: $F_{(1,26)} = 37,98$; $p = 0,0001$; hipocampo: $F_{(1,26)} = 13,35$; $p = 0,001$; PFC: $F_{(1,26)} = 12,74$; $p = 0,001$] e de GABA no tálamo [$F_{(1,26)} = 11,38$; $p = 0,002$] dos animais adultos foram significativamente diminuídas pela restrição de tiamina durante a lactação. Todavia, não foram observadas diferenças significativas na concentração desses neurotransmissores quando a avaliação foi realizada em ratos jovens. Quando a restrição de tiamina foi realizada no período peri-natal (Parte II) observou-se um efeito significativo desse tratamento sobre a razão peso encefálico e peso corporal dos animais jovens [$F_{(1,15)} = 9,00$; $p = 0,009$]. Todos os animais jovens foram capazes de aprender a tarefa de navegação espacial, mas a velocidade de aquisição foi prejudicada pelo tratamento [$F_{(1,15)} = 4,56$; $p = 0,049$]. A relação entre os pesos encefálico e corporal e os aspectos comportamentais não foram alterados na fase adulta pela restrição peri-natal de tiamina. Esse tratamento também não afetou os níveis de glutamato e GABA em nenhuma das

regiões cerebrais analisadas dos ratos jovens e adultos. Os dados obtidos no presente estudo mostram pela primeira vez que a restrição maternal de tiamina pode induzir alterações cognitivas e neuroquímicas na prole, indicando a importância dos níveis de tiamina na mãe durante os processos de gestação e lactação. Alterações na concentração dessa vitamina em períodos precoces do desenvolvimento podem afetar a neurobiologia e o comportamento dos animais da prole. Embora os estudos sobre os efeitos da restrição de tiamina durante a lactação ou durante o período peri-natal tenham sido independentes, uma observação preliminar dos resultados referentes aos efeitos desses tratamentos sobre os parâmetros bioquímicos nos permite supor que a restrição maternal de tiamina durante a lactação (Parte I) parece ocasionar efeitos mais pronunciados na prole do que a restrição no período peri-natal (Parte II). Tanto a restrição durante a lactação quanto a peri-natal causam déficit no aprendizado espacial da prole avaliada na fase jovem. Um estudo fatorial considerando, em um mesmo experimento, essas duas variáveis independentes e um controle do período de recuperação deve ser realizado no futuro.

Thiamine (vitamin B1) deficiency causes lesions in different brain regions and may affect glutamatergic and GABAergic circuits of the central nervous system, which are related to a range of behavioral aspects. Several studies on cognitive and biochemical changes in adult rats subjected to thiamine deficiency have been published; however, few studies address this issue using animals that underwent deficiency during the early stages of development. Thus, in the present study, we evaluated the effects of thiamine restriction during lactation (Part I) or peri-natal period (Part II) on spatial cognitive performance and cerebral levels of glutamate and GABA in the offspring. In both designs, evaluations were conducted in the young (age = 30 days) and adult stage (age = 75 days). Behavioral parameters were assessed for thirteen days using a test of spatial navigation, the Morris Water Maze. At the end of the tests, rats were decapitated and the levels of glutamate and GABA present in the thalamus, hippocampus and prefrontal cortex (PFC) were determined by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). For this purpose, a chromatographic method for determination of the two amino acids was developed in the present work. Thiamine restriction during lactation (Part I) does not affect the relationship between encephalic weight and body weight in either young or adult rats. Although spatial learning was not affected by thiamine restriction during lactation, the speed of learning of young rats was significantly altered [$F_{(1,27)} = 5,91$; $p = 0,022$]. None of the behavioral aspects - spatial learning and memory - evaluated in adults were affected. The concentrations of glutamate in the three brain regions examined [thalamus: $F_{(1,26)} = 37,98$; $p = 0,0001$; hippocampus: $F_{(1,26)} = 13,35$; $p = 0,001$; PFC: $F_{(1,26)} = 12,74$; $p = 0,001$] and those of GABA in the thalamus [$F_{(1,26)} = 11,38$; $p = 0,002$] of adult rats were significantly decreased by thiamine restriction. However, no significant differences in levels of these neurotransmitters were observed in young rats. When thiamine restriction was carried out in the peri-natal period (Part II) there was a significant effect of treatment on the relationship of encephalic weight and body weight of young animals [$F_{(1,15)} = 9,00$; $p = 0,009$]. All young animals were able to learn the spatial navigation task, but the acquisition speed was affected by treatment [$F_{(1,15)} = 4,56$; $p = 0,049$]. The relationship between encephalic/body weight and behavioral aspects was not affected at adulthood by the thiamine restriction during the perinatal period. This treatment did not affect the levels of glutamate and GABA in any of the brain regions analyzed in young and adult rats. The data obtained in this study show for the first time that maternal thiamine restriction can lead to cognitive and neurochemical changes in the offspring, indicating the importance of thiamine during pregnancy and lactation processes. Changes in the concentration of this vitamin during early periods of development can affect the neurobiology and behavior of the offspring. Although

the studies on the effects of thiamine restriction during lactation or during the perinatal period were independent, preliminary observations of the effects of these treatments on biochemical parameters allow us to suppose that maternal thiamine restriction during lactation (Part I) causes stronger effects in the offspring than restriction in the perinatal period (Part II). Both restrictions during lactation and during the peri-natal period cause deficits in spatial learning in the offspring evaluated at the juvenile stage. A factorial study considering these two independent variables and a control of the recovery period should be conducted in the future.

Tabela 1	Composição das rações produzidas no laboratório.....	16
Tabela 2	Composição da mistura de sais.....	17
Tabela 3	Composição da mistura de vitaminas.....	17
Tabela 4	Planilha geral de dados obtidos em uma sessão do teste comportamental.....	24
Tabela 5	Planilha detalhada de dados obtidos em uma tentativa do teste comportamental.....	25
Tabela 6	Concentrações de tiamina em rações.....	29
Tabela 7	Reprodutibilidades intra-dia e inter-dia.....	39
Tabela 8	Porcentagem de recuperação de GABA e glutamato	41
Tabela 9	Peso encefálico e corporal das proles - Parte I.....	43
Tabela 10	Desempenho no teste comprobatório do Labirinto Aquático de Morris – Parte I.....	46
Tabela 11	Peso encefálico e corporal das proles - Parte II.....	53
Tabela 12	Desempenho no teste comprobatório do Labirinto Aquático de Morris – Parte II.....	56
Tabela 13	Resumo dos resultados partes I e II.....	61
Figura 1	Representação esquemática de terminais glutamatérgico e GABAérgico.....	07
Figura 2	Fases do ciclo estral de ratas Wistar.....	15
Figura 3	Representação esquemática do delineamento experimental – Restrição de tiamina durante a lactação (Parte I).....	19
Figura 4	Foto do Labirinto Aquático de Morris.....	21

Figura 5	Representação dos dados qualitativos de uma tentativa no Labirinto Aquático de Morris.....	23
Figura 6	Reação de derivatização de tiamina com ferricianeto de potássio.....	28
Figura 7	Cromatograma representativo de tiamina presente nas rações.....	28
Figura 8	Reação de derivatização de aminas primárias com OPA.....	31
Figura 9	Representação esquemática do delineamento experimental – Restrição de tiamina no período peri-natal (Parte II).....	33
Figura 10	Cromatogramas representativos de soluções padrão, “branco” e amostra de hipocampo.....	37
Figura 11	Curvas padrão de glutamato e GABA.....	38
Figura 12	Curvas de estabilidade dos derivados de OPA.....	40
Figura 13	Efeitos da restrição de tiamina durante a lactação no peso corporal das proles – Parte I.....	42
Figura 14	Curvas de aprendizado no Labirinto Aquático de Morris – Parte I.....	45
Figura 15	Níveis de glutamato e GABA em regiões cerebrais de ratos jovens – Parte I.....	49
Figura 16	Níveis de glutamato e GABA em regiões cerebrais de ratos adultos – Parte I.....	50
Figura 17	Efeitos da restrição de tiamina durante o período peri-natal no peso corporal das proles – Parte II.....	52
Figura 18	Curvas de aprendizado no Labirinto Aquático de Morris – Parte II.....	55
Figura 19	Níveis de glutamato e GABA em regiões cerebrais de ratos jovens – Parte II.....	59
Figura 20	Níveis de glutamato e GABA em regiões cerebrais de ratos adultos – Parte II.....	60

AMC - adultos provenientes de mães controles

AMPAR - receptor α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico

AMR - adultos provenientes de mães restritas

ANOVA - Análise de Variância

ATP - adenosina trifosfato

BHT - butilhidroxitolueno

cm - centímetros

CPF - córtex pré-frontal

GABA - aminoácido γ -aminobutírico

HPLC - cromatografia líquida de alta eficiência

JMC - jovens provenientes de mães controles

JMR - jovens provenientes de mães restritas

$K_2[Fe(CN)_6]$ - ferricianeto de potássio

LAM - Labirinto Aquático de Morris

LTD - depressão de longa duração

LTP - potencialização de longa duração

min – minutos

mL - mililitro

mM - milimolar

MPA - ácido 3-mercaptopropiónico

mV - milivolts

Nac - núcleo acumbente

NaOH - hidróxido de sódio

NE - nordeste

nm - nanômetros

NMDA - N-metil D-aspartato

NW - noroeste

OPA - ortoftaldeído

PPI - inibição por pré-pulso

s - segundos

SE - sudeste

SNC - Sistema Nervoso Central

SW - sudoeste

TDP - tiamina difosfato

v/v - volume por volume

VTA - área tegumentar ventral

WHO - Organização Mundial de Saúde

μg - micrograma

Resumo	i
<i>Abstract</i>	iii
Lista de Tabelas e Figuras	v
Abreviaturas e Símbolos	vii
Introdução	01
Considerações iniciais.....	01
Aprendizagem e memória.....	02
A deficiência de tiamina.....	03
Alterações cognitivas e deficiência de tiamina.....	05
Alterações neuroquímicas e deficiência de tiamina.....	06
Deficiência maternal de tiamina.....	10
Objetivos	13
Material e Métodos	14
Parte I – Restrição de tiamina durante a lactação	14
1. Obtenção e manuseio de ratas grávidas controles e restritas em tiamina.....	14
2. Delineamento Experimental.....	18

3. Estudos Comportamentais.....	20
4. Dissecção do cérebro para obtenção das regiões cerebrais.....	26
5. Estudos Bioquímicos.....	26
6. Análise Estatística.....	31
Parte II – Restrição de tiamina durante o período peri-natal.....	32
1. Obtenção e manuseio de ratas grávidas controles e restritas em tiamina.....	32
2. Delineamento Experimental.....	32
3. Estudos Comportamentais.....	34
4. Dissecção do cérebro para obtenção das regiões cerebrais.....	34
5. Estudos Bioquímicos.....	35
6. Análise Estatística.....	35
Resultados.....	36
Estabelecimento do método cromatográfico para dosagem de glutamato e GABA em amostras de tecido cerebral.....	36
Parte I – Restrição de tiamina durante a lactação.....	41
1. Desenvolvimento do modelo animal.....	41
2. Estudos comportamentais.....	43

3. Estudos Bioquímicos.....	47
Parte II – Restrição de tiamina durante o período peri-natal.....	51
1. Desenvolvimento do modelo animal.....	51
2. Estudos comportamentais.....	53
3. Estudos Bioquímicos.....	57
Discussão.....	62
Estabelecimento do modelo experimental.....	62
Estabelecimento do método cromatográfico para dosagem de glutamato e GABA em amostras de tecido cerebral.....	64
Restrição de tiamina durante a lactação ou o período Peri-natal (Partes I e II).....	65
Considerações Finais.....	74
Perspectivas.....	78
Referências Bibliográficas.....	79
Anexos.....	93

Introdução

Considerações iniciais

Diversos tipos de paradigmas são empregados para o estudo das relações entre processos biológicos e cognitivos. Inúmeros trabalhos utilizam métodos comparativos em pacientes com prejuízos cognitivos decorrentes de disfunção ou lesão no sistema nervoso central - SNC (Fitzgerald *et al.*, 2010; Lundqvist *et al.*, 2010). Entretanto, neste tipo de abordagem, existem diversas limitações éticas e/ou práticas. Neste sentido, o uso de modelos experimentais animais é importante para estudar os mecanismos biológicos envolvidos no funcionamento do SNC. Considerando as evidências de que os substratos neurais dos processos cerebrais envolvidos em percepção, aprendizagem e memória possuem similaridades entre as diferentes espécies, sistemas como o cérebro do rato podem ser modelos úteis para estudar os fundamentos básicos de relações entre aspectos comportamentais e parâmetros neurobiológicos (Ribeiro & Pereira, 1998).

Nosso grupo de pesquisa tem se dedicado à investigação das bases biológicas dos aspectos comportamentais, utilizando modelos de neurodegeneração como o envelhecimento fisiológico (Oliveira-Silva *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2010) e os processos que ocasionam injúrias cerebrais como deficiência de tiamina (Vigil *et al.*, 2010), administração crônica de etanol associada ou não à deficiência de tiamina (Pires *et al.*, 2001, 2005; Carvalho *et al.*, 2006; Oliveira-Silva *et al.*, 2007) e à restrição alimentar (Pinto *et al.*, 2006).

Em relação à linha de pesquisa utilizando modelos animais submetidos à deficiência de tiamina, observamos que um episódio de privação dessa vitamina em ratos durante a fase adulta causa déficits de aprendizado e memória espaciais (Pires *et al.*, 2005; Carvalho *et al.*, 2006; Vigil *et al.*, 2010), além de alterações nos circuitos colinérgico (Pires *et al.*, 2005), glutamatérgico (Carvalho *et al.*, 2006) e serotoninérgico (Vigil *et al.*, 2010) de regiões cerebrais intimamente relacionadas aos comportamentos avaliados. Considerando os efeitos observados da deficiência de tiamina na fase adulta e a importância dessa vitamina no desenvolvimento, questionamos quais seriam as conseqüências de um episódio de deficiência durante a gestação e/ou lactação sobre aspectos comportamentais e neuroquímicos da prole em fases posteriores da vida. Portanto, no presente estudo, estabelecemos um modelo de deficiência materna de tiamina para avaliar os efeitos da carência desta vitamina sobre o aprendizado e a memória espacial e sobre parâmetros neuroquímicos de diferentes regiões cerebrais da prole nas fases jovem e adulta.

Aprendizagem e Memória

Aprendizagem é o processo através do qual o organismo adquire conhecimento sobre o mundo. Já memória é o processo pelo qual o conhecimento é codificado, retido e, posteriormente, recuperado (Kandel *et al.*, 2003). A memória é um fenômeno dinâmico, podendo ser modificada através de re-consolidação e o desempenho alterado através da extinção de um comportamento (Abel & Lattal, 2001). A extinção se refere à inibição de um comportamento aprendido quando a resposta não é mais reforçada, sendo um processo ativo de aprendizagem e não a perda da mesma, podendo inclusive se sobrepor à aprendizagem inicial (Santini *et al.*, 2001; Abel & Lattal, 2001).

Diversas classificações para a memória considerando função, conteúdo e tempo de duração têm sido propostas. A existência de dois sistemas de memória classificados em sistema de curta duração, responsável pelo arquivamento temporário de informações; e sistema de longa duração, responsável pelo arquivamento de informações por períodos mais longos (Peterson & Peterson, 1959) é conhecida há algum tempo. Na década de 80, uma nova classificação de memória que considera o fator determinante para a manutenção da informação o tipo de processamento inicial que a originou e não mais o tempo cronológico foi proposta por Olton (1979) e Olton e cols. (1979). De acordo com este conceito, informações apresentadas em contextos temporais específicos seriam manipuladas por um sistema de memória denominado operacional (ou memória de trabalho), sendo as informações mantidas por períodos de tempo durante os quais fossem relevantes, devendo ser posteriormente apagadas. Já informações que são usadas em diferentes situações e que, portanto, independem do contexto específico em que foram adquiridas, seriam arquivadas sob a forma de memória de referência, podendo ser mantidas por diferentes intervalos de tempo.

A memória também pode ser classificada de acordo com o conteúdo da informação, sendo denominada explícita ou declarativa e implícita ou não-declarativa (Cohen, 1984; Squire & Zola-Morgan, 1991; Squire, 1992a). As memórias declarativas incluem lembranças de fatos e eventos e são armazenadas em estruturas do lobo temporal medial e diencéfalo. Já as implícitas, também chamadas de procedurais, referem-se a um conjunto de habilidades e hábitos e envolvem estruturas como cerebelo, amígdala e gânglios da base (Squire & Zola, 1996; Kandel *et al.*, 2003). Independente da classificação adotada, a ocorrência de sistemas de memória com características distintas tanto de processamento quanto de tempo de manutenção da informação é bem estabelecida.

Em 1981 Morris propôs uma técnica para avaliar o aprendizado e a memória espacial em modelo experimental animal utilizando um labirinto aquático. Neste experimento os animais eram capazes de aprender a localização de uma plataforma submersa através da formação de um mapa espacial a partir de pistas externas ao labirinto. No teste comportamental proposto por Morris (1981), a memória de trabalho pode ser definida como a recuperação da informação adquirida para a utilização em uma única sessão, mas não para sessões subsequentes. Por outro lado, a memória de referência seria a recuperação de informações que são úteis por várias sessões ao longo de todo o experimento (Honig, 1978).

A deficiência de tiamina

A vitamina B1, também conhecida como tiamina, é um nutriente essencial encontrado em altas concentrações em músculos, órgãos e tecido cerebral. A tiamina após ser captada pelas células pode ser fosforilada dando origem à forma tiamina pirofosfato ou TDP. Este derivado atua como co-fator das enzimas transcetolase, complexo piruvato desidrogenase e α -cetoglutarato desidrogenase, enzimas chaves no processo de produção de energia celular (Pannunzio *et al.*, 2000; Berg *et al.*, 2004). As enzimas dependentes de tiamina, além de serem importantes para a manutenção do metabolismo energético da célula, também atuam de forma indireta na síntese de lipídeos e nucleotídeos (Berg *et al.*, 2004).

No sistema nervoso central, além da bem descrita função metabólica da tiamina como co-fator de enzimas envolvidas no metabolismo de glicose (Bâ, 2008; Navarro *et al.*, 2008) e síntese de neurotransmissores (Molholland, 2006), diversos trabalhos têm sugerido outros papéis não-metabólicos para a tiamina. Dentre essas funções podem-se destacar a estabilização da estrutura e função da membrana plasmática (Goldberg *et al.*, 2004), participação em vias de transdução de sinais fosforilativas (Czerniecki *et al.*, 2004) e atuação contra agentes indutores de citotoxicidade (Bâ *et al.*, 1996; Aberle *et al.*, 2004). Além disso, resultados de estudo realizado por Oliveira e cols. (2007) em cultura primária de neurônios, sugere a atuação da tiamina na modulação de canais iônicos. O aumento do conteúdo desta vitamina durante a sinaptogênese, também fornece suporte para o seu envolvimento na condução nervosa (Ramakrishna, 1999).

Segundo Martin e cols. (2003), dada a importância da tiamina no organismo, uma redução na sua concentração tecidual pode interferir em numerosos mecanismos celulares,

desencadeando processos neurodegenerativos, com consequentes alterações em funções cerebrais. Esses distúrbios podem resultar em uma doença denominada Encefalopatia de Wernicke (Butterworth, 2003), cujos principais sintomas são: oftalmoplegia, ataxia, perda de memória, confusão mental (Butterworth, 2009) e hipoatividade da marcha e da postura (Zubaran *et al.*, 1997). A deficiência de tiamina também é encontrada em estados graves de desnutrição associada ou não ao alcoolismo (Harper, 2009; Kopelman *et al.*, 2009), na Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (Alcaide *et al.*, 2003), em doenças gastrointestinais (Butterworth, 2009) e em estados fisiológicos de aumento do aporte desta vitamina como gestação e lactação (WHO, 1999).

Lesões cerebrais similares às lesões que ocorrem em indivíduos com Encefalopatia de Wernicke podem ser induzidas experimentalmente em ratos através da utilização de dieta deficiente em tiamina, administração parenteral de pirritiamina (inibidor da pirofosfoquinase) ou uma combinação desses dois procedimentos (Langlais *et al.*, 1996). A deficiência de tiamina leva a perdas celulares no hipocampo, cerebelo, amígdala, tálamo, colículo inferior e complexo olivar superior (Irle & Markowitsch, 1983; Vortmeyer & Colmant, 1988), além de degeneração de axônios do córtex, extensa perda neuronal e gliose dentro do tálamo medial e corpo mamilar (Langlais & Zhang, 1997). Os sinais característicos da deficiência de tiamina em animais são: queda de pêlo, hiperatividade a estímulos, postura relaxada, ataxia e anorexia, perda do reflexo de endireitamento e convulsões; podendo evoluir para a morte (Mosseau *et al.*, 1996; Ciccia & Langlais, 2000).

Os mecanismos patofisiológicos responsáveis pelas lesões cerebrais ocorridas na deficiência de tiamina e pela vulnerabilidade seletiva de regiões do cérebro a essas lesões não são bem conhecidos. Diversos pesquisadores têm relacionado a morte neuronal observada na deficiência de tiamina ao estresse oxidativo gerado por danos mitocondriais (Park *et al.*, 2000; Hazell & Butterworth, 2009) e por altas taxas de metabolismo oxidativo (Todd & Butterworth, 1999; Pannunzio *et al.*, 2000). Outros autores têm sugerido que a morte celular pode estar relacionada com a redução dos níveis de TDP e conseqüente diminuição da atividade das enzimas α -cetoglutarato desidrogenase, piruvato desidrogenase e transcetolase. Essas alterações metabólicas provavelmente levariam a uma redução no conteúdo do ATP celular, acúmulo de lactato e acidose (Hakim, 1984). A redução na atividade da enzima α -cetoglutarato desidrogenase pode também levar a um aumento na concentração do glutamato extracelular e induzir a morte neuronal por um mecanismo de excitotoxicidade (Hazell *et al.*, 1993; Hazell & Butterworth, 2009). A morte celular ocorrida durante a deficiência de tiamina

pode também ser atribuída a processos apoptóticos desencadeados pelo íon cálcio. Resultados obtidos em diversos trabalhos têm sugerido que o aumento dos níveis de cálcio intracelular induz a expressão de genes como c-fos e c-jun, que participam da via de transdução de sinais, conduzindo a célula à apoptose (Munujos *et al.*, 1993; Hazell *et al.*, 1998). Estudos *in vivo* realizados por Matsushima e cols. (1997) também identificaram a ocorrência de morte celular por apoptose no tálamo, umas das áreas cerebrais mais afetadas em ratos e em seres humanos deficientes em tiamina. Deste modo, os mecanismos pelos quais a deficiência de tiamina provoca lesões neuropatológicas são múltiplos.

Independente dos mecanismos patofisiológicos envolvidos na deficiência de tiamina, disfunções cognitivas e suas relações com alterações morfológicas e/ou neuroquímicas causadas pela privação desta vitamina têm sido amplamente investigadas pelo nosso grupo de pesquisa (Pires *et al.*, 2001, 2005; Carvalho *et al.*, 2006) e por outros (Mumby *et al.*, 1999; Nakagawasai *et al.*, 2007a; Nakagawasai *et al.*, 2007b; Vetreno *et al.*, 2008).

Alterações cognitivas e deficiência de tiamina

Diversos estudos realizados em modelos experimentais têm demonstrado que a deficiência de tiamina pode ocasionar alterações cognitivas, representadas principalmente por déficit no aprendizado e memória espacial (Mair *et al.*, 1991; Mumby *et al.*, 1999; Pires *et al.*, 2005; Carvalho *et al.*, 2006). Esses prejuízos cognitivos são frequentemente atribuídos a danos em estruturas diencefálicas e corticais, como tálamo, hipocampo e córtex pré-frontal. Além disso, a severidade dos déficits no aprendizado e memória espacial são dependentes do grau de lesão diencefálica e cortical (Langlais *et al.*, 1992; Langlais & Savage 1995, Pitkin & Savage, 2004).

O hipocampo, estrutura do lobo temporal medial, é uma área que desempenha função importante no processo de memória dos mamíferos (Squire, 1992b) e torna-se especialmente relevante quando é necessário combinar e relacionar informações de múltiplas fontes para tarefas de memória espacial (O'Keefe & Nadel, 1978). Em humanos, macacos e roedores, danos na região hipocampal provocam prejuízos no desempenho em uma variedade de tarefas de aprendizado e memória (Eichenbaum & Cohen, 2001). Diversas alterações na morfologia (Irle & Markowitsch, 1983), na neuroquímica (Savage *et al.*, 2003; Savage *et al.*, 2007) e na neurogênese (Zhao *et al.*, 2008) foram encontradas na região hipocampal de ratos deficientes

em tiamina, sugerindo que essas disfunções podem contribuir para os déficits de aprendizado e memória espacial observados nesses animais.

Além do hipocampo, o córtex pré-frontal (CPF) também é uma estrutura envolvida com o desempenho em tarefas de navegação espacial. Dados de estudos neuropsicológicos em animais e humanos e morfológicos no córtex pré-frontal demonstram que o desenvolvimento desta estrutura se correlaciona com o desenvolvimento das funções cognitivas, sendo que as áreas laterais estão envolvidas com funções executivas (Fuster, 2002). O CPF possui papel fundamental na memória, pois em modelos animais, lesões nesta estrutura ocasionam piora na recuperação e ordenamento temporal de memórias (Winocur & Moscovitch, 1999).

A deficiência de tiamina causa disfunções neuroquímicas (Carvalho *et al.*, 2006) e perda de tecido (Langlais & Savage, 1995) no córtex pré-frontal. Além disso, devido à existência de inúmeras conexões entre CPF e diversos núcleos talâmicos (Fuster, 2002), e esta região ser uma das mais afetadas pela deficiência de tiamina, uma disfunção no tálamo poderia causar alterações em áreas do CPF associadas a aspectos cognitivos.

Alterações neuroquímicas e deficiência de tiamina

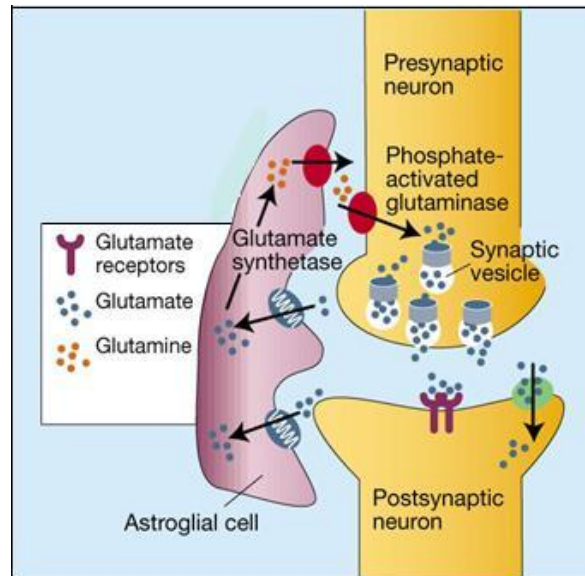
De acordo com diversos autores (Langlais & Zhang, 1997; Calingasan *et al.*, 1998; Todd & Butterworth, 1999; Gibson & Zhang, 2002) lesões morfológicas causadas pela deficiência de tiamina, geralmente são precedidas por alterações funcionais em sistemas de neurotransmissão. Diversos trabalhos indicam que a deficiência de tiamina pode causar perturbações nos circuitos colinérgico (Pires *et al.* 2001; 2005; Vetreno *et al.*, 2008; Roland *et al.*, 2010), serotoninérgico (Nakagawasai *et al.*, 2007a; Vigil *et al.*, 2010), dopaminérgico e noradrenérgico (Nakagawasai *et al.*, 2007b), glutamatérgico (Todd & Butterworth, 1998; Savage *et al.*, 1999; Kawakami *et al.*, 2010) e GABAérgico (Butterworth *et al.*, 1979; Butterworth, 1989; Roland & Savage, 2009).

Dentre os inúmeros circuitos envolvidos na neurotransmissão no sistema nervoso central de mamíferos, a interação coordenada entre os estímulos excitatórios e inibitórios originados nos sistemas glutamatérgico e GABAérgico, respectivamente (Figura 1, painéis A e B) é fundamental tanto para o desenvolvimento quanto para a manutenção de funções cognitivas complexas como aprendizado e memória (Foster & Kemp, 2006). Uma vez que a

deficiência de tiamina pode causar perturbações nos circuitos GABAérgico e glutamatérgico, é plausível supor que as alterações cognitivas observadas nos animais deficientes em B1 devam-se, pelo menos em parte, a distúrbios relacionados a esses sistemas.

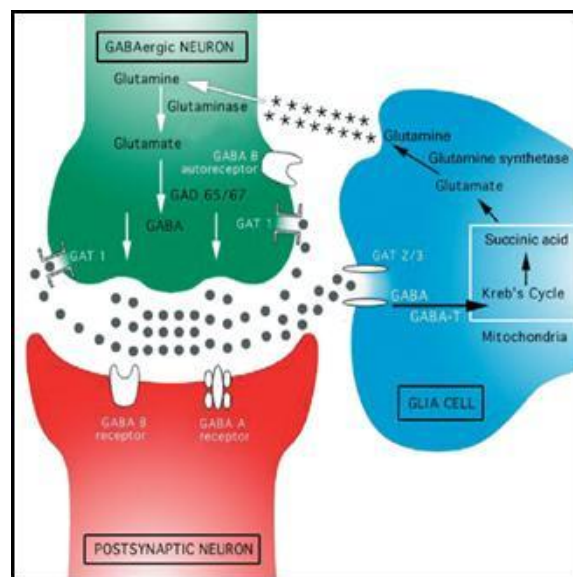
Representação esquemática de terminais glutamatérgico e GABAérgico

A



Fonte: Rothstein, J. D. *Neurobiology: bundling up excitement. Nature. 2000; 407: 141-143.*

B



Fonte: Bambrilla et al. *GABAergic dysfunction in mood disorders. Molecular Psychiatry. 2003; 8: 721-37.*

Figura 1: Esquema de um terminal glutamatérgico (painel A) e GABAérgico (painel B) representando o ciclo de síntese a partir da glutamina, exocitose e recaptação de glutamato e GABA, respectivamente. Os neurotransmissores após liberados na fenda sináptica podem se ligar a receptores específicos ou serem recaptados por transportadores predominantemente localizados nas células gliais.

De acordo com Salinska & Stafiej (2003) glutamato é o principal aminoácido envolvido em respostas sinápticas excitatórias no sistema nervoso central, onde se encontra distribuído de maneira ampla e uniforme, participando de vários processos fisiológicos como neurogênese, migração celular, plasticidade neuronal e processos de aprendizado e memória (Nacher *et al.*, 2002; McGee & Brecht, 2003).

Dentre os vários sistemas envolvidos nos processos cognitivos, o circuito glutamatérgico possui papel significativo (Steckler *et al.*, 2005; Antzoulatos & Byrne, 2004; Gravius *et al.*, 2010). Inúmeras evidências suportam o envolvimento do receptor glutamatérgico n-metil-D-aspartato (NMDA) na potencialização de longa duração (LTP), processo eletrofisiológico provavelmente envolvido na formação de memória (Riedel *et al.*, 1996; Whitlock *et al.*, 2006). Manipulações farmacológicas envolvendo a LTP parecem estar associadas a alterações comportamentais, dependentes do hipocampo, que podem ser quantificadas por um déficit no desempenho de tarefas que envolvem aprendizado espacial (Boast *et al.*, 1999, Bikbaev *et al.*, 2008, Neyman & Manahan-Vaughan, 2008). Embora evidências da importância da LTP na função hipocampal sejam claras, a LTP não é um fenômeno exclusivo do hipocampo, sendo observado em outras regiões cerebrais, como córtex pré-frontal (Vickery *et al.*, 1997). Assim, a neurotransmissão glutamatérgica no córtex pré-frontal é necessária para induzir tanto LTP quanto LTD (depressão de longa duração). Além disso, a ativação glutamatérgica no córtex pré-frontal proveniente do hipocampo é crucial para a formação da memória espacial (Vickery *et al.*, 1997; Lee & Kesner, 2003), pois lesões ou inativações desse circuito induzem déficit de desempenho em tarefas cognitivas espaciais (Kesner *et al.*, 1996; Floresco *et al.*, 1997).

Comparado com o receptor NMDA, existem menos estudos sobre a contribuição dos receptores glutamatérgicos do tipo amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpro-prionato (AMPA) no processo de formação de memória. Entretanto, vários trabalhos sugerem que tais receptores possam desempenhar papel específico na regulação e modulação da excitação neuronal, favorecendo o fortalecimento sináptico (Riedel *et al.*, 2003).

Já o neurotransmissor inibitório, o aminoácido γ -aminobutírico (GABA), promove a redução da excitabilidade neuronal ao se ligar a receptores ionotrópicos (GABA_A e GABA_C) que são canais iônicos permeáveis ao íon cloreto e a receptores metabotrópicos (GABA_B) acoplados à proteína G e que regulam a condutância de canais de potássio e cálcio (Bambrilla *et al.*, 2003; Ben-Ari *et al.*, 2007). Diversos trabalhos sugerem o envolvimento do GABA em

funções sinalizadoras. Por exemplo, no córtex já foi descrito o papel do GABA no controle da excitabilidade neuronal e processamento de informação (McCormick *et al.*, 1993; Krnjevic, 1997), na plasticidade neuronal (Jones, 1993) e na sincronização da rede neuronal (Buszaki & Chrobak, 1995). Devido ao papel importante da sinalização GABAérgica na fisiologia do cérebro, disfunções neste circuito podem resultar em condições patológicas, como por exemplo, epilepsia (Ben-Ari *et al.*, 2007).

O sistema GABAérgico também está envolvido em processos cognitivos como aprendizado e memória (Ramirez *et al.*, 2005; Toso *et al.*, 2007; Shahidi *et al.*, 2008; McNally *et al.*, 2008; Makkar *et al.*, 2010). No hipocampo, estrutura envolvida em aprendizado e memória foram descritos diversos tipos de interneurônios GABAérgicos formando sinapses em diferentes domínios das células alvo pós-sinápticas, exercendo importante papel modulatório (Han *et al.*, 1993; Freund & Buzsáki, 1996).

Diversos estudos utilizando agonistas e antagonistas de receptores GABAérgicos corroboram o importante papel deste circuito no aprendizado e memória. Assim, drogas que ativam o sistema GABAérgico promovem prejuízo na formação da memória quando administradas no ventrículo lateral, prosencéfalo basal, hipocampo e amígdala (Nagahara & McGaugh, 1992; Spanis *et al.*, 1999; Maruki *et al.*, 2001; Zarrindast *et al.*, 2004; McEown & Treit, 2010).

Além disso, um aumento da função inibitória GABAérgica provocado pela administração sistêmica de diazepam induz prejuízo cognitivo quando os indivíduos são avaliados no labirinto aquático de Morris (Arolfo & Brioni, 1991; McNamara *et al.*, 1993). Por outro lado, drogas que inibem o sistema GABAérgico, promovem melhora no aprendizado e na memória (Nutt & Malizia, 2001; Getova & Dimitrova, 2007; Ochalski *et al.*, 2010).

Mott & Lewis (1991) sugerem que a transmissão GABAérgica também está envolvida no mecanismo de LTP, pois a administração de antagonistas GABAérgicos resultou na facilitação da indução de LTP. Assim, LTP pode estar pelo menos em parte relacionada a um aumento da atividade excitatória glutamatérgica e diminuição da atividade inibitória GABAérgica, corroborando o papel desses sistemas no aprendizado e memória.

Deficiência maternal de tiamina

A desnutrição neonatal constitui um problema social mundial, ocorrendo com frequência, principalmente, em países em desenvolvimento (WHO, 1999). A gravidade da desnutrição neste período decorre do fato de que os principais sistemas biológicos se desenvolvem na idade fetal e infância. Especificamente em relação ao sistema nervoso, no período pré-natal ocorre intensa proliferação neuronal e nas fases pós-natais iniciais um acentuado desenvolvimento das células gliais, mielinização e maturação bioquímica. Desta forma, alterações nessas etapas do desenvolvimento podem provocar danos permanentes nos indivíduos (Wurtmam & Wurtmam, 1975).

Segundo Baker e cols. (2002), em média, 20 a 30% das mulheres grávidas apresentam deficiência de alguma vitamina e esse valor é ainda maior, cerca de 75%, em mulheres que não obtêm suplementação alimentar. Além disso, dentre as vitaminas pesquisadas, a carência de tiamina é uma das mais recorrentes nos três trimestres da gravidez (Baker *et al.*, 2002). De acordo com estudos realizados pela Organização Mundial de Saúde (1999), isso ocorre porque o requerimento de tiamina é significativamente aumentado em gestantes e lactentes, sendo recomendado uma quantidade adicional de 0,4 mg/dia e 0,5 mg/dia durante a gravidez e a lactação, respectivamente. Os pesquisadores que analisaram a concentração de tiamina em mulheres grávidas e lactentes, por razões éticas, se limitaram a determinar os níveis desta vitamina sem avaliar os efeitos da deficiência no desenvolvimento da prole. Neste sentido, tornam-se relevantes os estudos realizados em modelos experimentais com o intuito de compreender os efeitos da deficiência maternal de tiamina na prole, e de forma mais ampla, o papel da tiamina no desenvolvimento do sistema nervoso central.

Estudos das alterações cognitivas, morfológicas e neuroquímicas em ratos adultos submetidos à deficiência de tiamina têm sido realizados pelo nosso grupo de pesquisa (Pires *et al.*, 2001, 2005; Carvalho *et al.*, 2006) e por outros (Langlais *et al.*, 1992; Langlais & Savage, 1995; Mumby *et al.*, 1999; Vetreno *et al.*, 2008). Entretanto, poucos trabalhos abordam os efeitos da deficiência maternal de tiamina (Trostler *et al.*, 1977, Roecklein *et al.*, 1985, Butterworth, 1987; Hass, 1988, Fournier & Butterworth, 1990), apesar de o cérebro ser especialmente vulnerável à deficiência dessa vitamina durante a ontogênese (Greenwood *et al.*, 1985; Greenwood & Craig, 1987) e o requerimento de tiamina ser muito aumentado durante a gravidez e a lactação (Ramakrishnan *et al.*, 1999; WHO, 1999).

Dados anteriormente publicados indicam que a deficiência maternal de tiamina induz retardo no desenvolvimento do feto (Roeklein *et al.*, 1985), diminuição do peso cerebral e da mielogênese (Trostler *et al.*, 1977) e alterações em parâmetros neuroquímicos no sistema nervoso central da prole (Butterworth, 1987).

Fournier & Butterworth (1990) também verificaram que a deficiência de tiamina durante a gestação induz alterações bioquímicas na prole. As atividades das enzimas transcetolase, complexo piruvato desidrogenase e α -cetoglutarato desidrogenase foram avaliadas em mães deficientes de tiamina e em seus filhotes. As ratas grávidas apresentaram progressão mais acentuada dos sinais provocados pela deficiência em relação às ratas não-grávidas, porém, em nenhum dos dois grupos experimentais foi verificada alteração na atividade cerebral das três enzimas dependentes de tiamina. No mesmo trabalho, ao se avaliar os filhotes provenientes de mães deficientes, foi verificado que a atividade dessas três enzimas, presentes no córtex cerebral, sofreu uma redução significativa em relação aos filhotes provenientes de mães controles. Devido à importância das enzimas dependentes de tiamina para o estabelecimento do metabolismo energético cerebral adulto e para a síntese de mielina, é pertinente inferir que a deficiência maternal de B1, em um período tão vulnerável do desenvolvimento cerebral, possa ter consequências metabólicas graves e sequelas neurológicas na prole que irão refletir em alterações na fase adulta.

Estudos histológicos realizados no hipocampo de ratos submetidos à deficiência maternal de tiamina corroboram a importância desta vitamina para o desenvolvimento cerebral, pois sua carência ocasiona lesões teciduais que permanecem em épocas posteriores da vida (Bâ *et al.*, 1999; Bâ *et al.*, 2005). Nesses trabalhos a deficiência de tiamina na dieta foi realizada em três períodos distintos denominados de pré-natal (deficiência durante a gestação), peri-natal (deficiência do sétimo dia de gestação ao décimo dia de amamentação) e pós-natal (deficiência durante todo o período de amamentação). As avaliações morfométricas realizadas nos animais com 45 dias de idade (jovens) indicaram significativas atrofia e diminuição da densidade das células piramidais CA1, CA2 e CA3 e das células granulares do hipocampo nos animais provenientes de mães deficientes em tiamina.

Oliveira e cols. (2007) utilizando cultura de neurônios granulares do cerebelo mostraram que a deficiência de tiamina durante a gestação pode ocasionar morte neuronal devido à redução na condutância dos canais de potássio dependentes de voltagem, sugerindo um possível papel desta vitamina na modulação de canais iônicos.

Deste modo, os trabalhos realizados sobre os efeitos da deficiência maternal de tiamina, apesar do pequeno número, sugerem que esta vitamina é fundamental para o desenvolvimento cerebral da prole. Sua falta induz diminuição do peso cerebral e da mielogênese (Trostler *et al.*, 1977), alterações em parâmetros neuroquímicos centrais (Butterworth, 1987), redução na atividade da transcetolase, complexo piruvato desidrogenase e α -cetoglutarato desidrogenase (Fournier & Butterworth, 1990), enzimas essenciais para o metabolismo cerebral; além de induzir alterações histológicas no hipocampo (Bâ *et al.*, 1999; Bâ *et al.*, 2005).

Uma vez que a deficiência maternal de B1 provoca alterações cerebrais - bioquímicas e morfológicas - que permanecem em épocas posteriores da vida, é possível que déficits cognitivos também possam ocorrer nesses animais. Até o momento, nenhum estudo abordou o tema das relações entre as disfunções cerebrais e os possíveis prejuízos comportamentais em ratos cujas mães foram submetidas à deficiência de tiamina. Portanto, no presente trabalho, avaliou-se pela primeira vez, em dois experimentos independentes, os efeitos da restrição maternal de tiamina durante a lactação ou o período peri-natal sobre parâmetros neuroquímicos e o desempenho em testes de aprendizado/memória espaciais, da prole nas fases jovem e adulta.

Dada a importância da tiamina no sistema nervoso central, trabalhos que possam gerar conhecimento acerca das disfunções cerebrais e dos prejuízos cognitivos causados pela deficiência maternal desta vitamina adquirem relevância. Esses estudos podem contribuir para o esclarecimento dos mecanismos responsáveis pelo comprometimento de funções biológicas e ou comportamentais na fase adulta induzidas por injúrias feitas durante o desenvolvimento. Além disso, é importante salientar que a investigação das alterações bioquímicas decorrentes da deficiência de tiamina pode auxiliar no entendimento dos mecanismos biológicos e das disfunções comportamentais que ocorrem em processos neurodegenerativos.

Objetivos

1. Geral

Estudar, em modelo experimental animal, os efeitos da restrição maternal de tiamina sobre parâmetros comportamentais e bioquímicos, em fases posteriores do desenvolvimento da prole.

2. Específicos

2.1. Estabelecer o modelo de restrição de tiamina durante a lactação ou o período peri-natal em ratos da linhagem Wistar;

2.2. Desenvolver, em colaboração com a Escola de Engenharia Elétrica da UFMG, um programa de análise de imagens para automatizar a coleta dos dados durante os testes no Labirinto Aquático de Morris;

2.3. Estabelecer o método de dosagem de tiamina nas rações através da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC);

2.4. Estabelecer o método de dosagem de GABA e glutamato em amostras de tecido cerebral através da técnica de HPLC;

Avaliar nos ratos jovens e adultos, submetidos à restrição de tiamina durante a lactação (Parte I) ou período peri-natal (Parte II):

2.5. o desempenho e a flexibilidade comportamental (extinção) em tarefas de aprendizado espacial;

2.6. aspectos da memória espacial de referência e de trabalho;

2.7. as concentrações de GABA e glutamato no hipocampo, tálamo e córtex pré-frontal;

2.8. as possíveis correlações entre os parâmetros bioquímicos e comportamentais.

Material e Métodos

O trabalho foi realizado com ratos machos e fêmeas da linhagem Wistar mantidos no biotério em ciclo de 12 horas claro/escuro, recebendo água e ração *ad libitum* durante todos os experimentos. Os procedimentos experimentais utilizados neste trabalho estão em concordância com as normas internacionais de uso e manutenção de animais em laboratório (National Research Council, 1985).

A restrição maternal de tiamina foi realizada nas ratas durante a lactação ou o período peri-natal em dois delineamentos independentes (Partes I e II, respectivamente). Para cada episódio de restrição de tiamina, as avaliações comportamentais e bioquímicas das proles foram efetuadas em dois períodos distintos do desenvolvimento: fase jovem e fase adulta, também de forma independente. Deste modo, a parte I do presente trabalho agrupa os dados referentes aos efeitos da restrição de tiamina durante a **lactação** e a parte II durante o **período peri-natal**. Nas duas partes do estudo, todas as variáveis foram determinadas nas proles em dois períodos – fases jovem e adulta.

Parte I – Restrição de tiamina durante a Lactação

1. Obtenção e manuseio de ratas grávidas controles e restritas em tiamina

O ciclo estral de ratas pode ser subdividido em quatro períodos distintos, de acordo com a concentração sanguínea de estrógeno: diestro, proestro, estro e metaestro. A oscilação hormonal ao longo do ciclo induz alterações no epitélio vaginal que podem ser associadas às suas diversas fases (Cooper *et al*; 1993). O monitoramento diário do ciclo foi feito através de esfregaço vaginal com solução salina (0,9% cloreto de sódio) e visualização das células em microscópio óptico. Durante o diestro a concentração de estrógeno no sangue é baixa e o epitélio vaginal contém uma mistura de tipos celulares com predominância de leucócitos (Fig. 2A). O aumento da concentração de estradiol induz ação proliferativa no epitélio vaginal e predominância de células polinucleadas dispersas ou agrupadas características do proestro, fase em que ocorre a ovulação (Fig. 2B). Após a liberação do óvulo, ocorre formação do corpo lúteo e queda do nível plasmático de estradiol levando a uma redução da proliferação do epitélio vaginal e o predomínio de células cornificadas que caracterizam a fase de estro (Fig. 2C). O estágio de transição entre estro e diestro, denominado metaestro, contém tanto células cornificadas quanto leucócitos (Fig. 2D).

Fases do ciclo estral de ratas Wistar

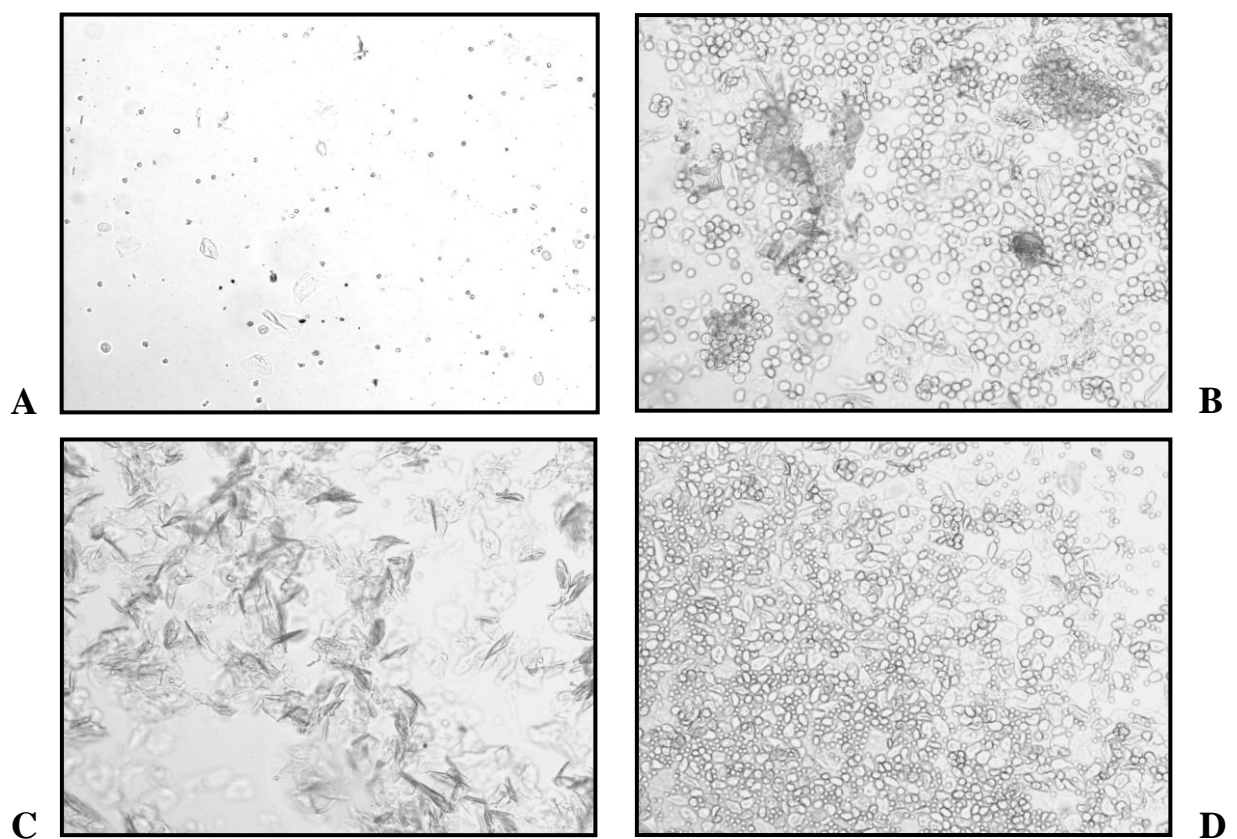


Figura 2: Fotomicrografia da citologia exfoliativa vaginal de ratas Wistar durante o ciclo estral. As fases constituintes do ciclo encontram-se representadas nos painéis: **A** (Diestro), **B** (Proestro), **C** (Estro) e **D** (Metaestro).

O ciclo estral das ratas foi acompanhado por cerca de 12 dias e, após este período fêmeas em proestro foram acasaladas na proporção de duas fêmeas para um macho. O acasalamento foi confirmado pela presença de espermatozóides no esfregaço vaginal, e este dia foi considerado o primeiro da gestação. As fêmeas grávidas foram mantidas individualmente por todo o período gestacional (aproximadamente 21 dias) recebendo ração comercial “Nuvilab”. No dia seguinte ao parto, a prole foi inspecionada e somente os machos permaneceram com as mães na proporção de seis a oito filhotes por fêmea. Neste mesmo dia, as mães com suas respectivas proles foram aleatoriamente divididas em dois grupos: controles e restritas em tiamina. As fêmeas do grupo controle receberam ração padrão produzida no laboratório (Tabelas 1, 2, 3) durante todo o período de amamentação (30 dias). As fêmeas restritas receberam pelo mesmo período de tempo, ração produzida no laboratório contendo 10% de tiamina em relação ao nível normal desta vitamina contido na ração padrão (controle). Após o desmame, os ratos machos provenientes de mães controles e restritas em tiamina foram alocados por grupo em caixas plásticas na proporção de cinco animais por caixa e mantidos com ração comercial “Nuvilab” até o fim dos experimentos. As mães do grupo controle, após um período de descanso de 45 dias foram novamente acasaladas e utilizadas em outros experimentos. Já as mães restritas foram descartadas após o desmame da prole.

Composição das rações produzidas no laboratório

Nutrientes	Quantidade em g/Kg de ração
Amido de Milho	507,0
Polvilho	169,0
Caseína*	200,0
Óleo de Soja	50,0
Mistura de Sais ^a	50,0
Mistura de Vitaminas ^b	10,0
Celulose	10,0
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 restrita 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.

Composição da mistura de sais

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: Porcentagem de todos os sais utilizados na composição da mistura de sais.*Composição da mistura de vitaminas*

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: Porcentagem de todas as vitaminas utilizadas na composição da mistura de vitaminas.

* A porcentagem de Tiamina-HCl na ração restrita foi de 0,005 % (valor correspondente a 10% da quantidade utilizada na ração padrão).

2. Delineamento Experimental

O delineamento experimental consistiu de dois experimentos independentes (Fig. 3), nos quais as avaliações dos efeitos da restrição de tiamina, induzida durante o período da lactação, foram realizadas em épocas distintas do desenvolvimento da prole: fase jovem (30 dias) e adulta (75 dias).

Para as avaliações na fase jovem foram utilizados 29 ratos, sendo 11 provenientes de 3 mães controles e 18 provenientes de 3 mães restritas, denominados grupos *Jovens Mães Controles* (JMC) e *Jovens Mães Restritas* (JMR), respectivamente. Os animais foram submetidos aos testes comportamentais no dia seguinte ao desmame, ou seja, com 31 dias de vida. As avaliações comportamentais foram realizadas durante treze dias e 48 horas após o término, os ratos com 45 dias de idade foram sacrificados por decapitação e as avaliações bioquímicas iniciadas (Fig. 3).

Delineamento experimental semelhante foi adotado para as avaliações realizadas na fase adulta. Em experimento independente foram utilizados 28 ratos, sendo 11 provenientes de três mães controles e 17 provenientes de três mães restritas em tiamina, denominados grupos *Adultos Mães Controles* (AMC) e *Adultos Mães Restritas* (AMR), respectivamente. Após o desmame, os ratos passaram por um período de recuperação de 45 dias, sendo submetidos ao início dos testes comportamentais com 75 dias de idade. As avaliações comportamentais foram realizadas durante treze dias. Quarenta e oito horas após o término dos testes, os ratos com 90 dias de idade foram decapitados e as avaliações bioquímicas realizadas (Fig. 3).

O peso corporal dos ratos jovens foi aferido semanalmente a partir do sétimo dia de vida. A última aferição foi realizada no dia do sacrifício, totalizando seis medidas. Já para o grupo dos animais adultos, as aferições de peso corporal foram iniciadas na quarta semana de vida. Como a última aferição foi feita no dia do sacrifício, um total de nove medidas foi obtido. Os animais foram decapitados e o encéfalo retirado da caixa craniana. Após a remoção do cerebelo, o restante do encéfalo dos ratos jovens e adultos foi pesado.

Delineamento Experimental – Parte I

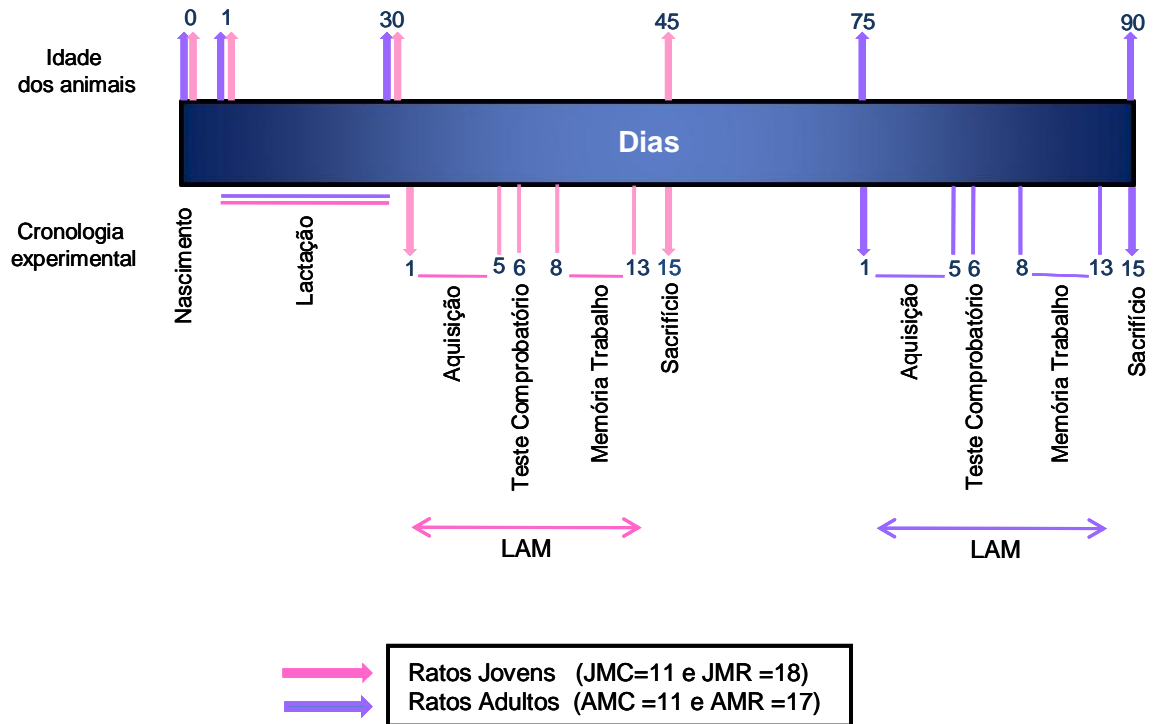


Figura 3: Esquema do delineamento experimental para a parte I do estudo (Restrição de Tiamina durante Lactação). A escala temporal em dias corresponde à idade dos animais (linha superior) e à cronologia experimental (linha inferior). J e A: jovens e adultos; MC e MR: ratos provenientes de mães controles e restritas, respectivamente. LAM: Labirinto Aquático de Morris.

As avaliações comportamentais foram realizadas no Labirinto Aquático de Morris – LAM (1981). A aquisição da informação espacial (aprendizado) foi feita durante cinco dias consecutivos. No dia seguinte, os ratos foram submetidos ao teste comprobatório para se avaliar aspectos da memória espacial de referência e o comportamento de extinção (ver detalhes abaixo, item 3.3). Quarenta e oito horas após o término do teste os ratos foram novamente treinados durante cinco dias consecutivos, porém com a posição da plataforma alternada diariamente (ver detalhes abaixo, item 3.4). No sexto dia a memória de trabalho foi avaliada.

3. Estudos Comportamentais

3.1. Equipamento

As avaliações comportamentais, aspectos dos processos de aprendizagem, memória e extinção, realizadas através do Labirinto Aquático de Morris (LAM) foram conduzidas em uma piscina circular de fibra de vidro, com aproximadamente 1,80 m de diâmetro e 43 cm de altura, contendo água a 25°C até o nível de 30 cm. A piscina é dividida em quatro quadrantes imaginários denominados NW (noroeste), SW (sudoeste), NE (nordeste) e SE (sudeste). Uma plataforma circular de acrílico (15 cm de diâmetro) foi colocada a 2 cm abaixo do nível da água em um dos quadrantes, denominado quadrante alvo. Para impedir a localização visual da plataforma, a água foi turvada com a adição de 80 g de leite em pó. A piscina não possui nenhuma pista, marca ou sinal interno, mas se encontra alocada numa sala de 3 x 3 m, com pistas estáveis visuais extra-labirinto que servem de referência para que o animal localize a plataforma (Fig. 4). Uma câmera de televisão com lente angular foi fixada no teto da sala bem acima da piscina para registrar os testes.

3.2. Treino – Aprendizagem espacial

O treino (aquisição) foi realizado em cinco sessões consecutivas, sendo cada sessão constituída de quatro tentativas com rodízio dos animais entre as tentativas. Durante o treino a plataforma estava localizada em uma posição constante no centro do quadrante NW (quadrante alvo). Cada tentativa consistiu em colocar o animal dentro da piscina, junto à borda e virado para esta, em um quadrante aleatoriamente escolhido. O animal foi deixado na piscina por no máximo 60 segundos. A tentativa era finalizada quando o animal encontrava a plataforma ou o tempo de 60 segundos era atingido e, neste último caso, o animal era conduzido até a plataforma. Depois de encontrar ou ser guiado até a plataforma, os ratos eram deixados neste local por 15 segundos e em seguida retirados da piscina. A latência (tempo em segundos gasto pelo animal para encontrar a plataforma) e a distância total percorrida (centímetros) foram utilizadas como unidades quantitativas do desempenho do animal durante o treino no LAM. A atividade motora dos animais também foi avaliada ao longo das sessões através da velocidade de natação expressa em cm/s. Em cada sessão a latência, a distância percorrida e a velocidade de cada animal foram obtidas através do cálculo da mediana dos valores nas quatro tentativas.

3.3. Teste comprobatório – Memória de referência e extinção

Um dia após a última sessão do treino foi realizado o teste comprobatório para avaliar a memória espacial de referência e o comportamento de extinção dos animais. Neste teste, a plataforma foi retirada da piscina e cada rato foi colocado para nadar uma única vez por um tempo de dois minutos. A atividade motora dos ratos foi avaliada através da velocidade de nado no primeiro e segundo minutos. A distância média ao alvo durante o primeiro minuto (d1) e o tempo de permanência no quadrante alvo também no primeiro minuto (t1) foram utilizados para avaliar a memória espacial de referência. O comportamento de extinção foi analisado através da relação entre o segundo e o primeiro minuto do teste. Assim, através das razões $d2/d1$ (distância ao alvo no segundo minuto pelo primeiro minuto) e $t2/t1$ (tempo de permanência no quadrante alvo no segundo minuto pelo primeiro minuto) o índice de extinção obtido foi utilizado para avaliar o comportamento de extinção.

Foto do Labirinto Aquático de Morris (LAM)



Figura 4: Foto da sala onde foram realizados os testes no Labirinto Aquático de Morris. Nessa foto pode-se observar: uma piscina no centro da sala e algumas das pistas visuais extra-labirinto (p.ex. torneira e mangueira à esquerda, caixa azul à direita). O círculo branco indica a localização da plataforma submersa e a seta vermelha um animal nadando durante um teste.

3.4. Avaliação da memória espacial de trabalho

Um dia após o teste comprobatório foram realizadas cinco sessões consecutivas de treino com duas tentativas alternadas em cada sessão conforme anteriormente descrito por Gorgi e cols. (2008). Durante este treino a plataforma foi aleatoriamente posicionada no centro de um dos quatro quadrantes. Os animais foram colocados com a face voltada para a borda da piscina nos dois quadrantes diametralmente opostos à localização da plataforma naquele dia. Cada tentativa teve a duração máxima de 60 segundos. Após cinco dias o comportamento dos animais estava estabilizado, ou seja, eram capazes de encontrar a plataforma na segunda tentativa, indicando que as novas regras da tarefa haviam sido aprendidas. No dia seguinte à estabilização do comportamento (sexto dia) foi realizado o teste para avaliar a memória espacial de trabalho. A latência (segundos), a distância total percorrida (centímetros) e a velocidade de nado (centímetros/segundo) da segunda tentativa foram registradas.

3.5. Obtenção e processamento dos dados comportamentais

A coleta dos dados comportamentais foi realizada de forma automatizada, através de um programa de análise de imagens no sistema operacional *Linux*. O programa foi desenvolvido em colaboração com um estudante do Departamento de Engenharia Elétrica da UFMG, Vitor Purri. Uma câmera de televisão posicionada acima da piscina transmitia imagens para um computador que registrava os sinais. Após o término do experimento, as imagens gravadas foram submetidas a quatro etapas distintas: edição, processamento, pós-processamento e geração de resultados. Na edição o experimentador definia a posição da plataforma, os limites da piscina, os quadrantes, o início e o término de cada tentativa. Depois de editado, os testes foram processados, ou seja, a trajetória média de cada rato para cada tentativa foi calculada. Na etapa seguinte, o processamento foi conferido pelo experimentador e caso necessário, a trajetória traçada pelo programa poderia ser corrigida.

Na última etapa, os resultados dos testes foram gerados de forma qualitativa (uma imagem representando a trajetória de cada animal por tentativa - Fig. 5) e quantitativa (planilhas de dados – Tabelas 4 e 5). Para cada sessão no LAM foram gerados dois tipos de planilha de dados: uma geral com os dados de todos os ratos e que continha as seguintes informações: latência, tempo que o animal permaneceu em cada quadrante, distância total percorrida e velocidade média (Tabela 4). Como cada sessão era composta por quatro tentativas, planilhas detalhadas de cada tentativa por animal também foram obtidas. A Tabela

5 ilustra uma planilha detalhada em que a cada instante de tempo a presença do rato nos quadrantes, a distância à plataforma, a distância percorrida e a velocidade de nado podem ser visualizadas.

Representação dos dados qualitativos de uma tentativa no LAM

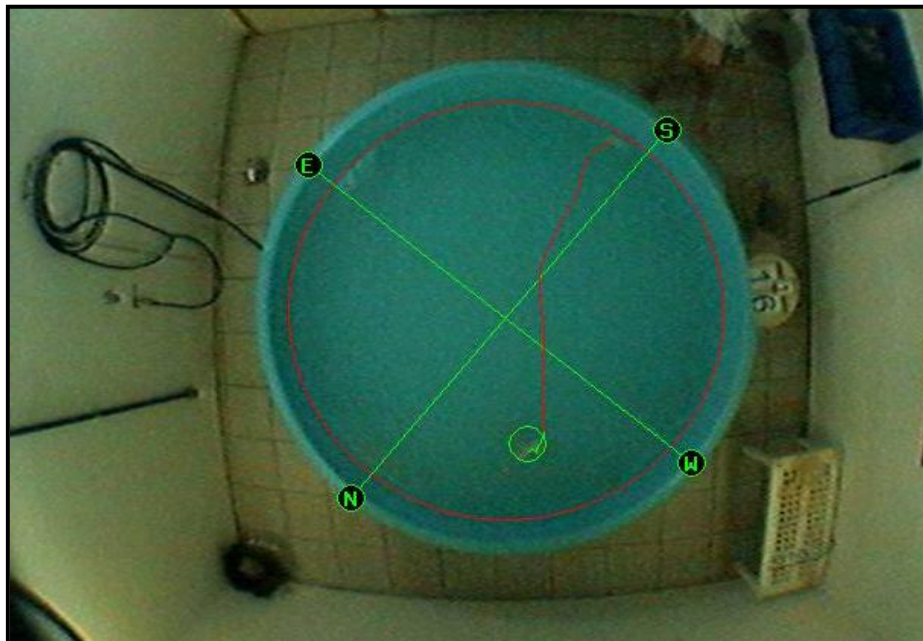


Figura 5: Representação ilustrativa dos dados qualitativos gerados para uma tentativa no Labirinto Aquático de Morris (LAM). As posições E, S, N e W estão conectadas entre si pelas linhas verdes formando os quadrantes imaginários da piscina: NW, SW, NE e SE. O círculo vermelho, traçado pelo programa, indica os limites internos da piscina e a linha vermelha a trajetória percorrida pelo animal, depois da aprendizagem, da borda até à plataforma submersa (círculo verde).

Planilha geral de dados quantitativos de uma sessão no LAM

Rato	Duração	SW	NW	SE	NE	Distancia	Velocidade
rato1/1	60,2	12,46	11,01	20,33	16,05	1610,13	26,746
rato2/1	60,2	30,6	6,43	17,89	5,08	1205,39	20,023
rato3/1	60,01	16,6	15,15	18,04	9,67	1696,93	28,28
rato4/1	60,19	30,25	12,61	7,18	9,17	1491,89	24,786
rato5/1	60,2	25,71	5,43	17,14	11,51	1437,81	23,884
rato6/1	60,2	22,03	6,13	26,01	4,93	1436,67	23,867
rato7/1	36,6	9,7	11,83	11,19	3,28	965,64	26,386
rato1/2	60	23,45	18,5	11	6,25	1448,3	24,138
rato2/2	60,2	39,42	11,41	3,79	5,08	1527,25	25,37
rato3/2	60	25,76	21,08	5,63	6,03	1509,98	25,166
rato4/2	60	18,04	14,95	14,3	12,21	1630,11	27,167
rato5/2	47,59	11,4	34,9	0	0,9	1201,17	25,238
rato6/2	60,2	7,1	22,3	9,3	20,9	1604,37	26,653
rato7/2	20,19	3	6,45	5,8	4,85	648,49	32,114
rato1/3	60	14,14	9,01	17,97	17,47	1719,78	28,662
rato2/3	23,41	0,8	13,1	0	8,1	545,66	23,312
rato3/3	17,8	0,25	6,4	6,15	4,75	497,2	27,933
rato4/3	60,21	18,24	19,19	5,38	16,6	1568,59	26,053
rato5/3	42,8	7,12	22,64	3,38	9,36	1052,93	24,603
rato6/3	21,41	4,06	4,81	3,27	8,87	530,89	24,799
rato7/3	8,8	3,18	2,69	1,86	0,98	295,27	33,545
rato1/4	8,6	0	3,81	0,1	4,1	191,99	22,327
rato2/4	13,6	0	4,38	0,74	7,98	245,78	18,078
rato3/4	27,8	12,64	7,15	3,73	3,88	731,1	26,301
rato4/4	60	18,5	19,8	6,95	14,05	1393,67	23,228
rato5/4	60,2	10,22	18,39	14,6	16,19	1656,18	27,513
rato6/4	12,2	0	5,1	0,1	6,9	271,52	22,259
rato7/4	12,2	0,7	9,35	0	2	333,32	27,313

Tabela 4: Exemplo de planilha de dados obtida em uma sessão no Labirinto Aquático de Morris (LAM). A primeira coluna da tabela contém a identificação do rato/ número da tentativa e as demais colunas os parâmetros avaliados. A duração de cada tentativa (latência) e o tempo gasto em cada quadrante são dados em segundos (s), a distância total percorrida em centímetros (cm) e a velocidade média em cm/s.

Planilha detalhada da tentativa de um rato no LAM

Quadro	Tempo	SW	SE	NE	NW	Plat. Dist	Distancia	Velocidade
0	0	0	0	0	100	50,6	0	0
1	0,05	0	0	0	100	49,69	1,76	35,275
2	0,1	0	0	0	100	48,71	1,74	34,842
3	0,15	0	0	0	100	47,52	1,74	34,79
4	0,2	0	0	0	100	45,98	1,84	36,709
5	0,25	0	0	0	100	44,03	2,07	41,457
6	0,3	0	0	0	100	41,83	2,25	44,935
7	0,35	0	0	0	100	39,62	2,23	44,602
8	0,4	0	0	0	100	37,64	1,99	39,778
9	0,45	0	0	0	100	36,06	1,59	31,76
10	0,5	0	0	0	100	34,72	1,35	26,97
11	0,55	0	0	0	100	33,37	1,36	27,11
12	0,6	0	0	0	100	31,76	1,61	32,22
13	0,65	0	0	0	100	29,71	2,05	40,989
14	0,7	0	0	0	100	27,34	2,37	47,42
15	0,75	0	0	0	100	24,85	2,49	49,838
16	0,8	0	0	0	100	22,44	2,41	48,236
17	0,85	0	0	0	100	20,26	2,18	43,569
18	0,9	0	0	0	100	18,25	2,01	40,282
19	0,95	0	0	0	100	16,28	1,99	39,735
20	1	0	0	0	100	14,23	2,1	42,029
21	1,05	0	0	0	100	12,01	2,32	46,465
22	1,1	0	0	0	100	9,7	2,47	49,409
23	1,15	0	0	0	100	7,46	2,49	49,695
24	1,2	0	0	0	100	5,38	2,37	47,289
25	1,25	0	0	0	100	3,58	2,14	42,698
26	1,3	0	0	0	100	2,14	1,91	38,289
27	1,35	0	0	0	100	1,21	1,77	35,389
28	1,4	0	0	0	100	1,02	1,79	35,87
29	1,45	0	0	0	100	1,8	2,06	41,125
30	1,5	0	0	0	100	3,37	2,33	46,621
31	1,55	0	0	0	100	5,39	2,46	49,217
32	1,6	0	0	0	100	7,53	2,41	48,128
33	1,65	0	0	0	100	9,54	2,19	43,8
34	1,7	0	0	0	100	11,42	1,99	39,791
35	1,75	0	0	0	100	13,26	1,88	37,565
36	1,8	0	0	0	100	15,16	1,9	37,974
37	1,85	0	0	0	100	17,21	2,08	41,6
38	1,9	0	0	0	100	19,42	2,3	45,941
39	1,95	0	0	0	100	21,77	2,46	49,184
40	2	0	0	0	100	24,23	2,55	50,915
41	2,05	0	0	0	100	26,75	2,57	51,299
42	2,1	0	0	0	100	29,27	2,55	50,937
43	2,15	100	0	0	0	31,74	2,49	49,855
44	2,2	100	0	0	0	34,11	2,4	48,044
45	2,25	100	0	0	0	36,35	2,29	45,843
46	2,3	100	0	0	0	38,48	2,21	44,23

Tabela 5: Exemplo de planilha de dados de um rato obtida em uma tentativa no Labirinto Aquático de Morris (LAM). A cada instante de tempo, a permanência nos quadrantes (0: ausência e 100: presença), a distância à plataforma/distância percorrida (cm) e a velocidade (cm/s) estão representadas.

4. Dissecção do cérebro para obtenção das regiões cerebrais

Após o sacrifício dos animais por decapitação, os encéfalos foram rapidamente retirados da cavidade craniana, pesados e dissecados, sobre placa de Petri invertida e no gelo, de acordo com as coordenadas estereotáxicas apresentadas por Paxinos & Watson (2004). Os encéfalos foram posicionados 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. Em seguida, um dos hemisférios foi aleatoriamente escolhido e o tálamo foi retirado da superfície medial da região diencefálica. Depois da remoção do mesencéfalo, o hipocampo exposto foi cuidadosamente dissecado da região cortical. As amostras de córtex pré-frontal, tálamo e hipocampo foram então armazenadas a -80°C para a realização dos ensaios bioquímicos, que foram executados dentro de no máximo 15 dias.

5. Estudos Bioquímicos

5.1. Determinação da concentração de tiamina presente nas rações

Conforme mencionado anteriormente, a restrição maternal de tiamina foi induzida em ratas através do consumo de ração produzida no laboratório. Deste modo, para confirmar que a ração oferecida aos animais era de fato restrita em tiamina, quando comparada à ração padrão, o conteúdo desta vitamina foi determinado através de técnica cromatográfica, conforme detalhado abaixo. A quantidade de tiamina encontrada na ração comercial “Nuvilab” foi utilizada como valor de referência.

5.1.1. Processamento das amostras de ração

As amostras foram processadas conforme anteriormente descrito por Tange e cols. (2006) com algumas modificações. As rações comercial e produzidas no laboratório (padrão e restrita) foram trituradas e homogeneizadas em 10 volumes de HCl 0,1 M. As amostras foram então colocadas sob agitação a 65°C durante 30 minutos e em seguida sonificadas em aparelho ultrassom pelo mesmo período de tempo. O homogenato resultante foi centrifugado a 7.800 x g por 5 minutos (Sorvall RC-5B) e o sobrenadante depois de filtrado em membrana de 0,45 µm foi armazenado a 4°C até o momento da derivatização.

5.1.2. Procedimento de Derivatização

A oxidação alcalina de tiamina que ocorre durante a reação de derivatização induz a formação de um composto altamente fluorescente e facilmente detectável por cromatografia líquida de alta eficiência - HPLC (Lynch & Young, 2000). Deste modo, diversos estudos cromatográficos utilizando derivatização pré-coluna com ferricianeto de potássio têm sido realizados com o intuito de avaliar o conteúdo de tiamina presente em alimentos (Valls *et al*, 1999; Tange *et al*, 2006; Batifoulier *et al*, 2006). A figura 6 mostra um esquema da reação de derivatização de tiamina com ferricianeto de potássio.

Neste trabalho, a derivatização foi realizada conforme descrito anteriormente por Losa e cols. (2005). A solução derivatizante constituída por 12,14 mM de ferricianeto de potássio e 3,35 M de hidróxido de sódio foi preparada no dia do ensaio e acrescentada à amostra (1:1 v/v). Após um minuto à temperatura ambiente, o produto da reação de derivatização foi neutralizado com 1,43 M de ácido fosfórico (1:1 v/v) e injetado no sistema cromatográfico.

5.1.3. Condições cromatográficas

O sistema cromatográfico utilizado consistiu de um cromatógrafo Shimadzu (LC-10AD, Tokyo, Japan) 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 LC-10. Os comprimentos de onda de excitação e emissão utilizados foram de 365 e 435 nm, respectivamente. Uma coluna cromatográfica analítica de fase reversa C18 (150 mm \times 4,6 mm, ID) e pré-coluna (RT 250-4 E. Merck, Darmstadt E.R., Germany) foram utilizadas nas análises. A fase móvel isocrática consistiu de uma solução 0,2 M de fosfato de potássio monobásico, 0,72 mM de trietilamina e 25 % de metanol. Esta fase depois de filtrada em membrana de 0,45 μ m foi degazeificada e injetada no sistema com um fluxo constante de 1,0 mL/min.

Um integrador (Shimadzu C-R7Ae plus) contendo um programa de análise de dados acoplado ao sistema cromatográfico forneceu a área dos picos dos cromatogramas a partir da intensidade de fluorescência. Em um tempo médio de 7,0 minutos a tiamina foi eluída de forma isocrática (Fig. 7). A concentração desta vitamina expressa em mg/Kg de ração foi calculada de acordo com a área do pico relativa à curva padrão. Os dados obtidos indicam que a ração padrão produzida no laboratório e utilizada no presente estudo, apresentou nível

semelhante de tiamina em relação à ração comercial e que a ração restrita apresentou cerca de 10% do conteúdo de tiamina em relação à ração padrão. (Tabela 6).

Reação de derivatização de tiamina

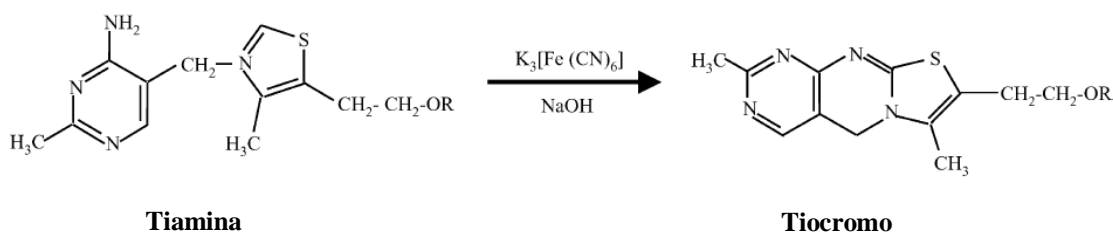


Figura 6: Representação esquemática da reação de derivatização de tiamina com ferricianeto de potássio em condições alcalinas gerando tiocromo (composto fluorescente).

Cromatograma de tiamina

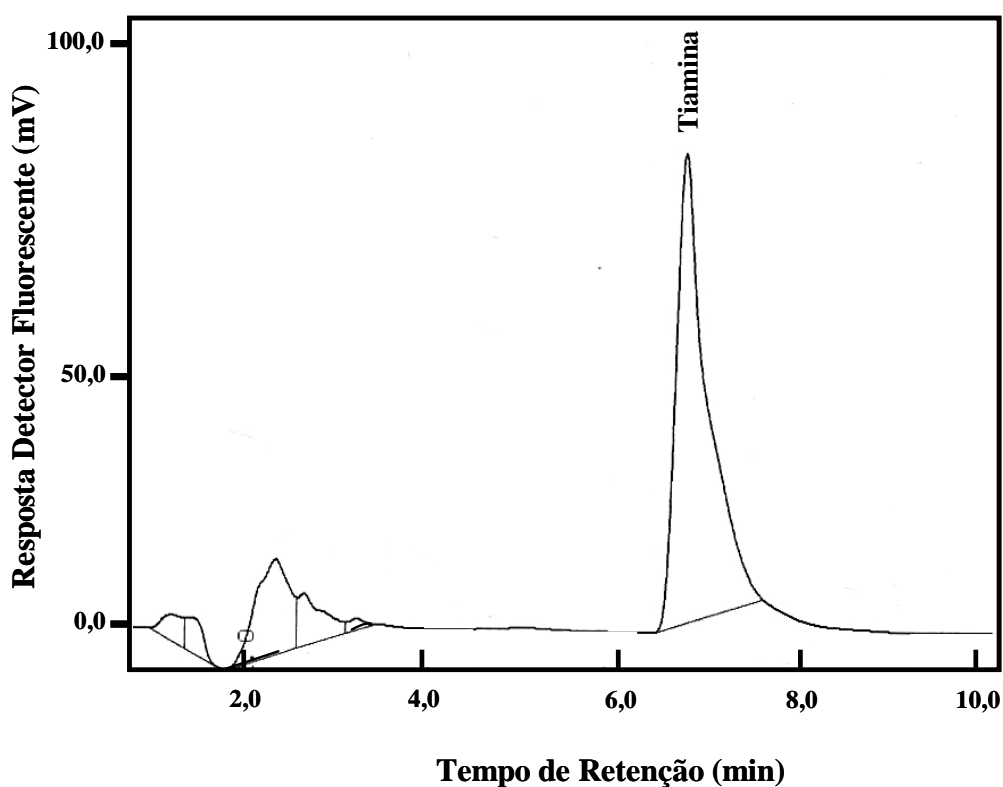


Figura 7: Cromatograma representativo do perfil obtido nas análises de tiamina presente nas rações. A eluição de tiamina ocorreu em um tempo médio de 7,0 minutos.

Concentração de tiamina nas rações

Tipo de Ração	Concentração de tiamina (mg/Kg ração \pm dpa)
Comercial “Nuvilab”	0,95 \pm 0,035
Padrão produzida no laboratório	1,19 \pm 0,006
Restrita produzida no laboratório	0,11 \pm 0,001

Tabela 6: Concentrações de tiamina (mg/kg) presente nas rações comercial “Nuvilab” e produzidas no laboratório (padrão e restrita). dpa: desvio padrão.

5.2. Estabelecimento do método cromatográfico para dosagem de glutamato e GABA em amostras de tecido cerebral

As condições estabelecidas e os experimentos realizados para a validação do método cromatográfico utilizado nas dosagens de glutamato e GABA são parte dos objetivos do presente estudo e encontram-se compilados em um trabalho publicado em 2009 na revista científica *Journal of Neuroscience Methods* (**vide Anexo**).

5.2.1. Manuseio dos animais

Vinte ratos Wistar machos pesando entre 250-300 gramas foram utilizados para o estabelecimento do método cromatográfico de dosagem de glutamato e GABA. Os animais foram alocados em caixas plásticas em grupos de cinco e mantidos no biotério em ciclo de 12 horas claro/escuro, recebendo água e ração *ad libitum*. Após a decapitação dos ratos o cérebro foi dissecado conforme anteriormente descrito na seção 4 e as amostras de tálamo, hipocampo e córtex pré-frontal foram processadas (ver detalhes abaixo, item 5.2.2).

5.2.2. Processamento das amostras

As amostras de tálamo, hipocampo ou córtex pré-frontal foram pesadas e homogeneizadas em 15 volumes de solução metanol: água (85:15 v/v) em homogeneizador automático. Em seguida, o homogenato foi centrifugado, a 4°C, durante 15 minutos em uma rotação de 7.800 x g (Sorvall RC-5B). O sobrenadante obtido após centrifugação foi coletado e mantido no gelo até ser submetido à derivatização.

5.2.3. Procedimento de Derivatização

Devido à ausência de características eletroativas ou fluorescentes intrínsecas nos aminoácidos GABA e glutamato, diversos trabalhos têm utilizado a técnica de derivatização pré-coluna para a separação e identificação cromatográfica desses compostos. Um dos agentes derivatizantes mais utilizados é o ortoftaldeído (OPA), que reage com aminas primárias na presença de tiol (Fig. 8) e gera derivados que são eletroativos e fluorescentes (Carlson *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2005; Sheng *et al.*, 2005; Devall *et al.*, 2007).

No presente trabalho a derivatização pré-coluna foi realizada conforme descrito previamente por Mengerink e cols. (2002) e Kutlán & Molnár-Perl (2003). A reação de derivatização foi feita misturando-se 100 µL de amostra, 20 µL de OPA metanólico (5 mg/mL) preparado no dia do ensaio, 75 µL de tampão borato (pH 9,9) e 5 µL de ácido 3-mercaptopropiônico (MPA). A solução resultante foi levemente agitada e injetada no sistema cromatográfico após 1 minuto, à temperatura ambiente.

5.2.4. Condições cromatográficas

O sistema cromatográfico utilizado para as determinações de GABA e glutamato foi o mesmo descrito na seção 5.1.3. utilizado para dosagem de tiamina, porém, os comprimentos de onda de excitação e emissão utilizados foram de 337 e 454 nm, respectivamente. A fase móvel isocrática consistiu de uma solução 0,05 M de acetato de sódio, tetrahidrofurano e metanol (50:1:49 v/v), pH 4,0. GABA e glutamato foram eluídos em um tempo inferior a 9 minutos e as concentrações desses neurotransmissores nas amostras de tecido cerebral foram calculadas de acordo com as áreas dos picos e respectivas curvas padrões.

Reação de derivatização utilizando OPA

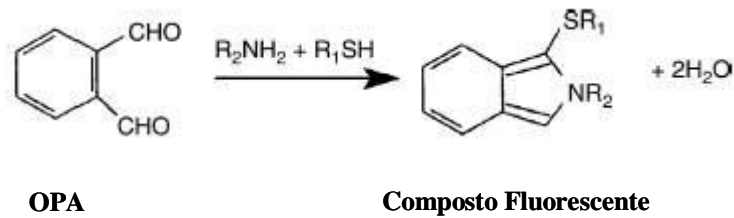


Figura 8: Representação esquemática da reação de derivatização de aminas primárias com orto-ftaldeído (OPA) em presença de tiol gerando composto fluorescente.

6. Análise Estatística

Os dados comportamentais e bioquímicos coletados nas fases jovem e adulta das proles submetidas à restrição de tiamina durante a lactação foram tratados de forma independente, pois os experimentos foram feitos em épocas diferentes. A análise dos dados foi feita através do programa *Statistical Package for the Social Sciences (SPSS)* versão 12.0. A normalidade dos dados foi verificada através do teste *Kolmogorov-Smirnov*. Os dados relativos ao aprendizado foram analisados por Análise de Variância (ANOVA) 2 x 5, com medidas repetidas no último elemento, sendo os fatores deficiência de tiamina (dois níveis) e desempenho nas cinco sessões consecutivas de treino no labirinto aquático. O peso corporal dos ratos jovens e adultos foi analisado por ANOVA 2 x 6 e 2 x 9, respectivamente; com medidas repetidas no último elemento da variável peso analisada. As variáveis tempo gasto no quadrante alvo e distância média à plataforma durante o primeiro minuto do teste comprobatório, índice de extinção, teste da memória espacial de trabalho e peso encefálico foram analisados utilizando ANOVA *One-Way*. As avaliações bioquímicas foram realizadas em triplicata e a média também foi analisada por ANOVA *One-Way*. Todos os valores foram expressos como média \pm erro-padrão (S.E.M). Diferenças foram consideradas significativas ao nível de 5 % ($p < 0,05$). Análises de regressão linear (Winer, 1962) foram usadas para determinar a correlação entre parâmetros bioquímicos e comportamentais.

Parte II - Restrição de tiamina durante o Período Peri-Natal

1. Obtenção e manuseio de ratas grávidas controles e restritas em tiamina

O acompanhamento do ciclo estral das ratas foi semelhante ao descrito na parte I do presente trabalho. O acasalamento foi confirmado pela presença de espermatozóides no esfregaço vaginal, e este dia foi considerado o primeiro da gestação. As fêmeas grávidas foram mantidas individualmente por todo o período gestacional (aproximadamente 21 dias). A restrição de tiamina foi realizada durante o período peri-natal: do décimo primeiro dia de gestação ao quinto dia de lactação. Este intervalo temporal foi escolhido porque de acordo com Bayer & Altman (1995) este período é crucial para a formação das estruturas cerebrais avaliadas no presente estudo – tálamo, hipocampo e córtex pré-frontal.

No início do episódio de restrição (11^o dia de gestação) as fêmeas foram aleatoriamente divididas em dois grupos: controles e restritas. As fêmeas do grupo controle receberam ração padrão produzida no laboratório (ver Tabelas 1, 2, 3) e as fêmeas do grupo restrito ração contendo 10% de tiamina em relação ao conteúdo presente na ração padrão (controle). A partir do sexto dia de lactação até o término dos experimentos todos os animais (mães e proles) foram tratados com ração comercial “Nuvilab”. A separação e o manuseio dos filhotes machos foram feitos de forma semelhante ao anteriormente descrito na parte I.

2. Delineamento Experimental

O delineamento consistiu de dois experimentos independentes (Fig. 9), nos quais as avaliações dos efeitos da restrição de tiamina, induzida durante o período peri-natal, foram realizadas em épocas distintas do desenvolvimento da prole: fase jovem (30 dias) e adulta (75 dias).

Para as avaliações na fase jovem foram usados 17 ratos, sendo 7 provenientes de 3 mães controles e 10 provenientes de 3 mães restritas em tiamina, denominados grupos *Jovens Mães Controles* (JMC) e *Jovens Mães Restritas* (JMR), respectivamente. Já as avaliações na fase adulta foram realizadas a partir de um experimento independente com um total de 22 ratos, 11 provenientes de 3 mães controle e 11 provenientes de 3 mães restritas, denominados grupos *Adultos Mães Controles* (AMC) e *Adultos Mães Restritas* (AMR), respectivamente.

Os animais jovens foram submetidos aos testes comportamentais no dia seguinte ao desmame, ou seja, com 31 dias de vida. Os ratos adultos foram avaliados após um período de recuperação de 45 dias, isto é, com 75 dias de idade. Em ambos os experimentos os testes comportamentais foram realizados durante treze dias e 48 horas após seu término os ratos foram decapitados (Fig. 9).

O peso corporal dos ratos jovens foi aferido semanalmente a partir do sétimo dia de vida até o dia do sacrifício, totalizando seis medidas. A aferição de peso corporal dos ratos adultos foi realizada de forma semelhante aos jovens, porém um total de doze medidas foi obtido. Os ratos foram decapitados e após a retirada dos cerebelos, as demais estruturas encefálicas dos ratos jovens e adultos foram pesadas.

Delineamento Experimental – Parte II

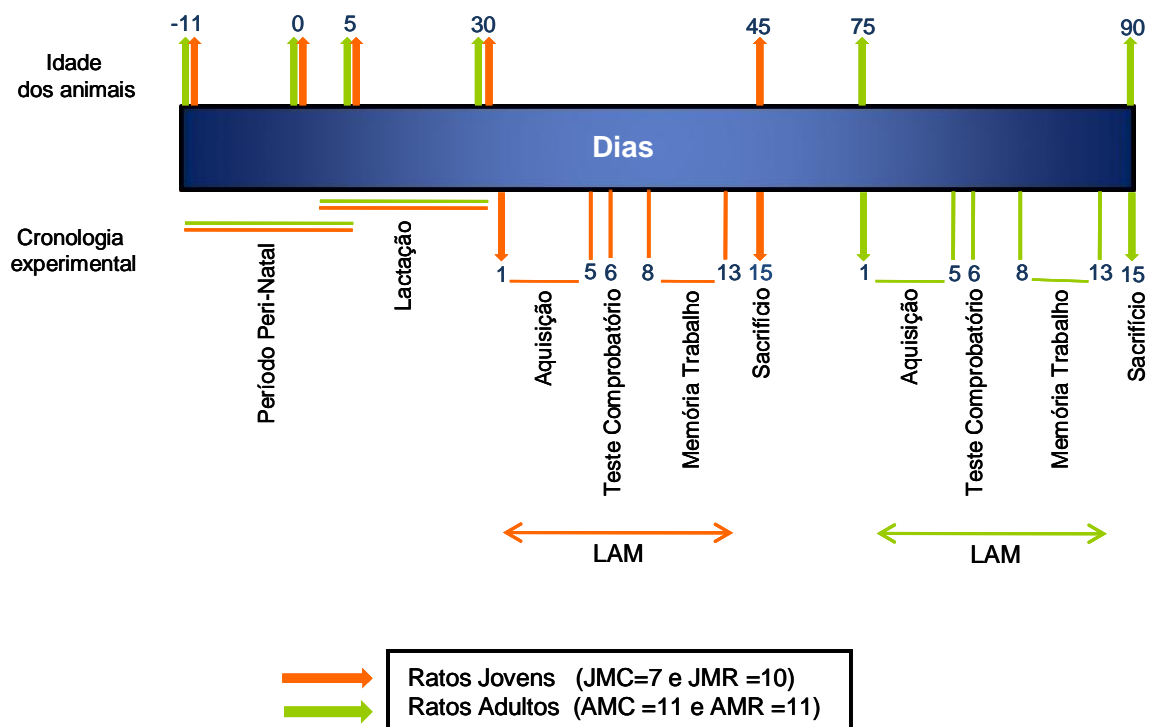


Figura 9: Esquema do delineamento experimental para a parte II do estudo (Restrição de Tiamina durante o período peri-natal). A escala temporal em dias corresponde à idade dos animais (linha superior) e à cronologia experimental (linha inferior). J e A: jovens e adultos; MC e MR: ratos provenientes de mães controles e restritas, respectivamente. LAM: Labirinto Aquático de Morris.

3. Estudos Comportamentais

Os ratos jovens e adultos submetidos à restrição de tiamina durante o período peri-natal foram submetidos às avaliações comportamentais utilizando-se o Labirinto Aquático de Morris (1981). O equipamento utilizado, a gravação das imagens e a análise dos dados foram exatamente os mesmos descritos anteriormente na parte I deste trabalho. As variáveis comportamentais analisadas foram: aquisição da informação espacial (aprendizado), comportamento de extinção, memória espacial de referência e memória espacial de trabalho.

O protocolo experimental adotado também foi semelhante ao previamente descrito na primeira parte deste trabalho. Resumidamente: os ratos foram treinados durante cinco dias consecutivos e a latência e a distância total percorrida foram utilizadas como unidades quantitativas para avaliar a aquisição da informação espacial. No dia seguinte, os animais foram submetidos ao teste comprobatório. A distância média ao alvo e o tempo que o animal permaneceu no quadrante alvo durante o primeiro minuto do teste foram utilizados para avaliar a memória de referência. O índice de extinção foi utilizado para se avaliar o comportamento de extinção. Quarenta e oito horas após o término do teste comprobatório, os ratos foram novamente treinados durante cinco dias consecutivos, entretanto a posição da plataforma foi alternada diariamente. No dia seguinte à estabilização do comportamento (sexto dia) foi realizado o teste para avaliar a memória espacial de trabalho. A latência, a distância total percorrida e a velocidade de nado da segunda tentativa foram registradas.

4. Dissecção do cérebro para obtenção das regiões cerebrais

Após quarenta e oito horas do término do teste comportamental, os ratos foram decapitados, os encéfalos foram retirados da cavidade craniana, pesados e dissecados conforme previamente descrito. As amostras de córtex pré-frontal, tálamo e hipocampo foram então separadamente armazenadas por no máximo 15 dias a -80°C para a realização dos ensaios bioquímicos.

5. Estudos Bioquímicos

As concentrações de glutamato e GABA presentes no córtex pré-frontal, tálamo e hipocampo dos ratos jovens e adultos submetidos à restrição de tiamina durante o período peri-natal foram avaliadas através da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). O preparo das amostras cerebrais, o procedimento de derivatização e as condições cromatográficas utilizados estão descritos na parte I e foram publicados em 2009 (Freitas-Silva *et al.*, 2009).

6. Análise Estatística

Os dados comportamentais e bioquímicos coletados nas fases jovem e adulta das proles submetidas à restrição de tiamina durante o período peri-natal foram tratados de forma independente, pois os experimentos foram feitos em épocas diferentes. A análise dos dados foi feita através do programa *Statistical Package for the Social Sciences (SPSS)* versão 12.0. A normalidade dos dados foi verificada através do teste *Kolmogorov-Smirnov*. As variáveis biológicas relativas ao aprendizado, comportamento de extinção, memória espacial de referência e trabalho, peso encefálico e concentrações cerebrais de glutamato e GABA foram submetidos à análise estatística conforme descrito na parte I. O peso corporal dos ratos jovens e adultos foi analisado por ANOVA 2 x 6 e 2 x 12, respectivamente. Todos os valores foram expressos como média \pm erro-padrão (S.E.M). Diferenças foram consideradas significativas ao nível de 5 % ($p < 0,05$). Análises de regressão linear (Winer, 1962) foram usadas para determinar a correlação entre parâmetros bioquímicos e comportamentais.

Resultados

Estabelecimento do método cromatográfico para dosagem de glutamato e GABA em amostras de tecido cerebral

O processamento das amostras e as condições cromatográficas foram anteriormente descritos na Seção 5.2 do tópico Material e Métodos. Todos os experimentos de validação do método foram feitos com amostras de hipocampo de ratos Wistar. A figura 10 painéis A, B, C e D ilustra os cromatogramas das soluções padrão de GABA e glutamato, solução “branco” e amostra de hipocampo, respectivamente. A solução “branco” foi obtida através da mistura da solução de homogeneização (metanol: água, 85:15 % v/v) com OPA (orto-ftaldeído) metanólico, tampão borato e MPA (ácido 3-mercaptopropiônico) na mesma proporção usada nas reações de derivatização. Os tempos médios de eluição de glutamato e GABA foram $3,1 \pm 0,03$ e $8,2 \pm 0,03$ minutos, respectivamente. Deste modo, em um tempo total de corrida de menos de 9 minutos, ambos os neurotransmissores foram eluídos de forma isocrática.

A linearidade da resposta do detector para soluções padrão de glutamato e GABA foi determinada. A figura 11 (painéis A e B) ilustra as curvas de calibração obtidas a partir de cinco soluções de glutamato (1,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0 $\mu\text{g/mL}$) e quatro de GABA (0,1; 0,25; 0,5; 0,75 $\mu\text{g/mL}$), respectivamente. Os resultados são mostrados como a média de três amostras em triplicata. Um coeficiente de correlação maior que 0,99 foi obtido na análise de regressão para as curvas dos dois neurotransmissores. As concentrações dos padrões utilizadas estão dentro do limite de linearidade para a quantificação de glutamato e GABA nas regiões cerebrais examinadas. O cálculo da concentração dos neurotransmissores presentes nas amostras biológicas foi feito através das equações da reta obtidas nas curvas de calibração das soluções padrão.

Cromatogramas representativos das análises de GABA e glutamato

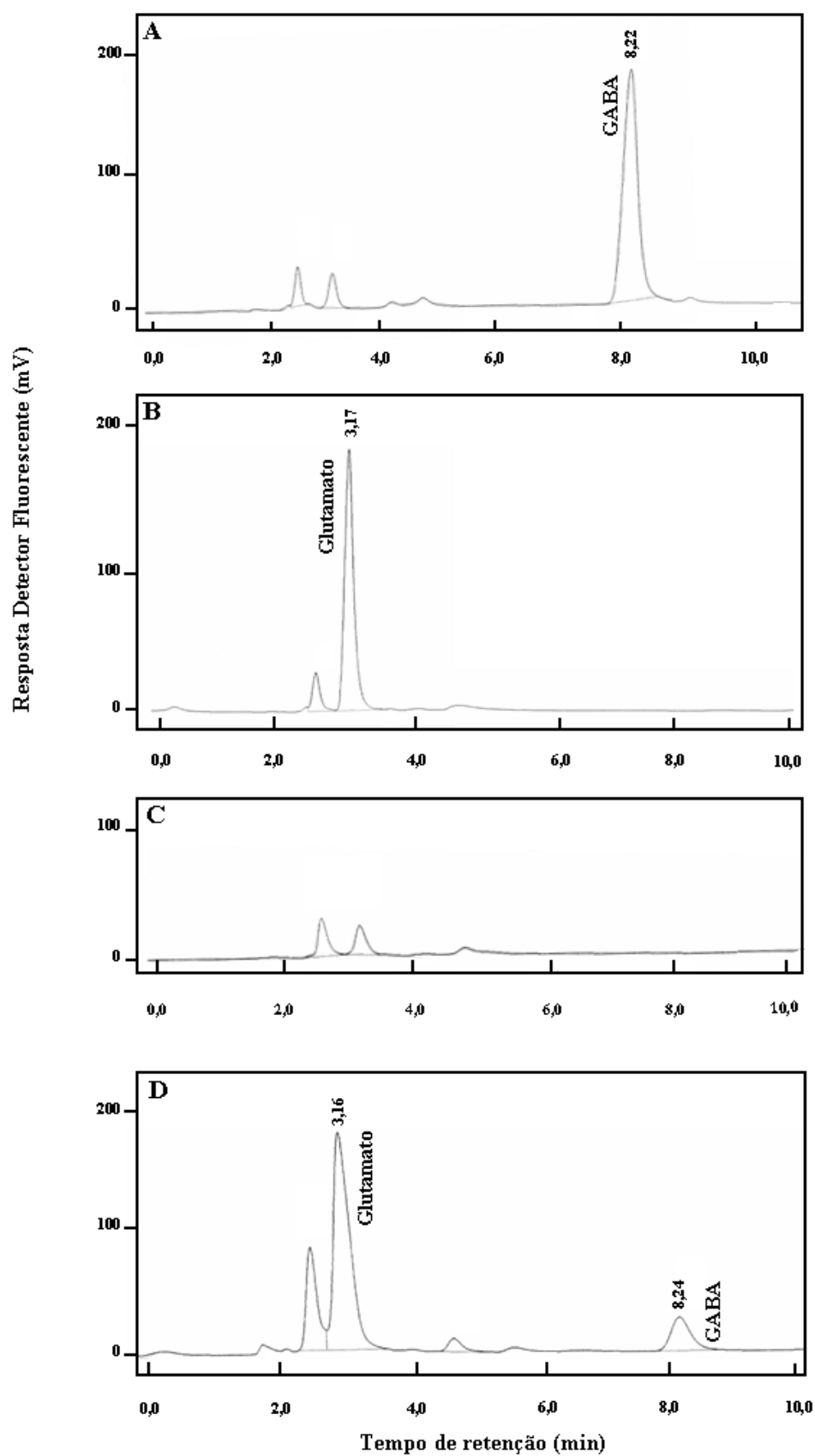
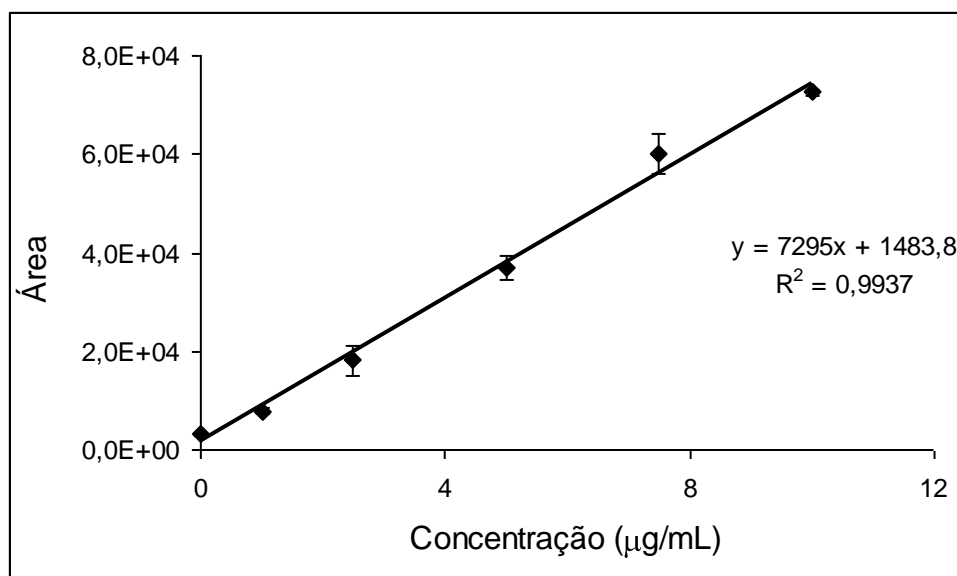


Figura 10: Cromatogramas de soluções padrão 0,1µg de GABA (A) e 0,75 µg de glutamato (B), solução “branco” (C) e amostra de hipocampo (D).

Curva padrão de glutamato

A



Curva padrão de GABA

B

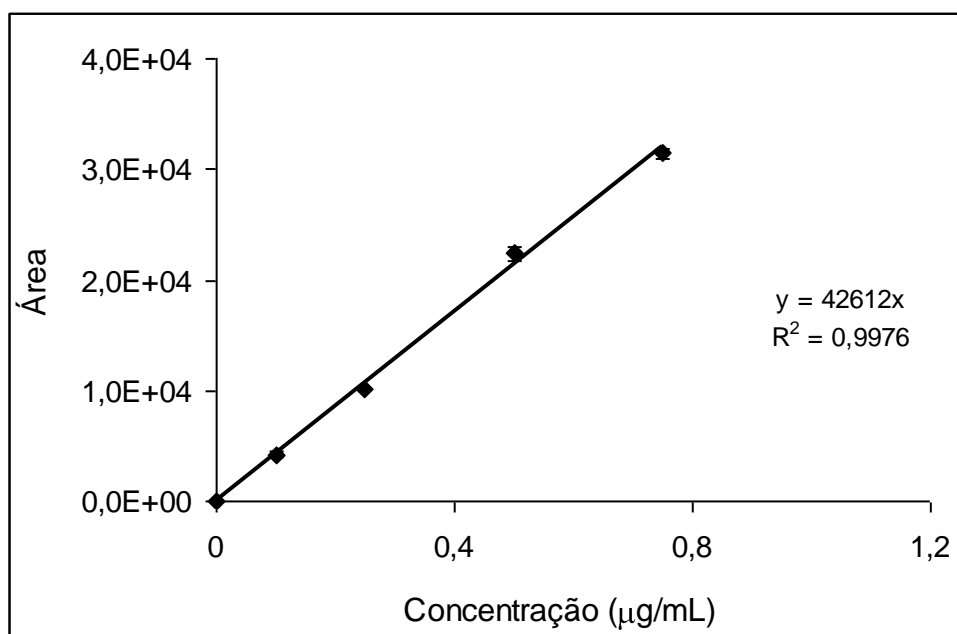


Figura 11: Curvas de calibração dos padrões de glutamato (A) e GABA (B). As respostas lineares para as soluções de glutamato (1-10 µg/mL) e GABA (0,1-0,75 µg/mL) são representadas como a média \pm erro padrão.

As reprodutibilidades intra-dia e inter-dia estão representadas na tabela 7 como a porcentagem do desvio padrão relativo. A reprodutibilidade intra-dia foi obtida através de 10 injeções consecutivas de amostras de hipocampo devidamente processadas e derivatizadas. Já a reprodutibilidade inter-dia foi obtida através da média de 10 injeções das mesmas amostras de hipocampo injetadas em dois dias consecutivos.

A estabilidade da amostra após a derivatização com OPA é mostrada na figura 12. À temperatura ambiente, tanto glutamato (painel A) quanto GABA (painel B) apresentaram estabilidade inferior a 30 minutos, confirmando resultados previamente publicados (Nussbaum *et al.*, 1992; Rowley *et al.*, 1995; Shah *et al.*, 2002). Entretanto, como no presente trabalho as amostras derivatizadas foram injetadas no sistema cromatográfico após 1 minuto à temperatura ambiente, os resultados obtidos não foram afetados.

A acurácia do método foi estimada através de ensaios de recuperação (Tabela 8). Soluções de GABA nas concentrações finais de 5,04; 6,50; 7,47 e 9,12 mM e de glutamato nas concentrações finais de 18,99; 28,10; 35,80 e 43,49 mM foram adicionadas a amostras de hipocampo no momento do processamento. A porcentagem de recuperação desses aminoácidos nas diversas concentrações variou entre 96,12% e 104,23%, indicando que os conteúdos totais de GABA e glutamato são mantidos durante o processamento das amostras. Após a validação do método cromatográfico, as dosagens de glutamato e GABA em amostras de tecido cerebral foram realizadas.

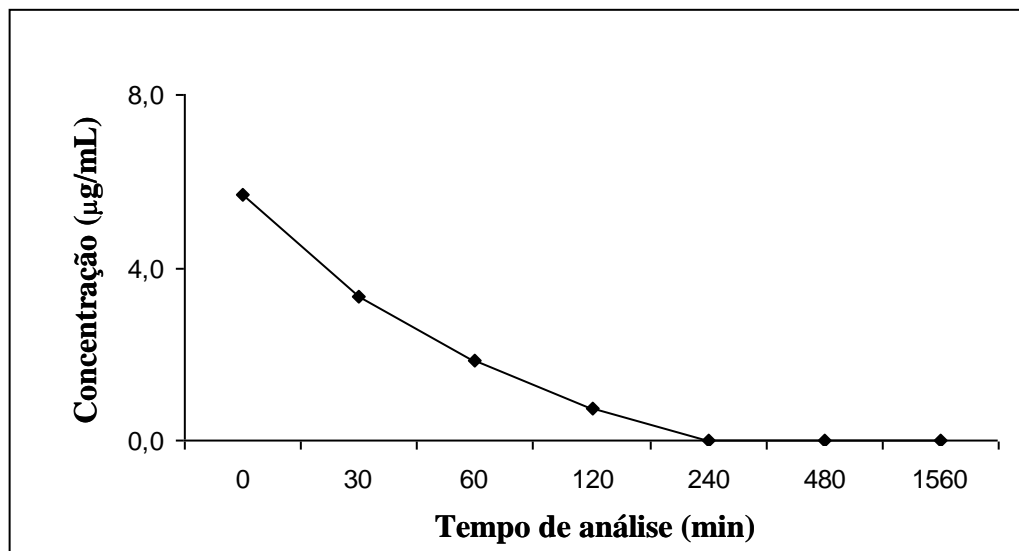
Reprodutibilidades intra-dia e inter-dia

Neurotransmissor	Desvio Padrão Relativo (%)	
	Intra-dia	Inter-dia
GABA	3.00	2.91
Glutamato	3.30	6.29

Tabela 7: Reprodutibilidades intra-dia e inter-dia das análises de GABA e glutamato representada como a porcentagem do desvio padrão relativo.

Curvas de estabilidade dos derivados de OPA

A



B

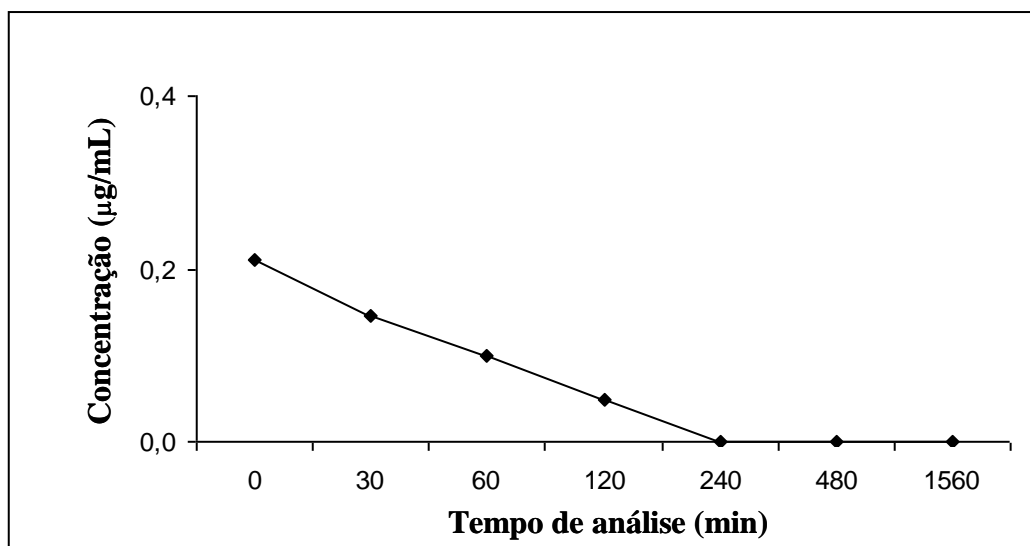


Figura 12: Estabilidade dos derivados de OPA. As concentrações ($\mu\text{g/mL}$) de glutamato (A) e GABA (B) presentes nas amostras de hipocampo estão representadas em função do tempo (min) decorrido entre a reação de derivatização com OPA e a detecção no sistema cromatográfico.

Porcentagem de recuperação de GABA e glutamato

Concentração do aminoácido adicionado (mM)		Concentração do aminoácido encontrado (mM)		% Recuperação	
GABA	Glutamato	GABA	Glutamato	GABA	Glutamato
0,0	0,0	2,23	27,51	—	—
5,04	18,99	7,27	46,63	100,00	100,68
6,50	28,10	8,80	56,80	101,07	104,23
7,47	35,80	9,41	64,08	96,12	102,15
9,12	43,49	11,44	71,18	100,99	100,41

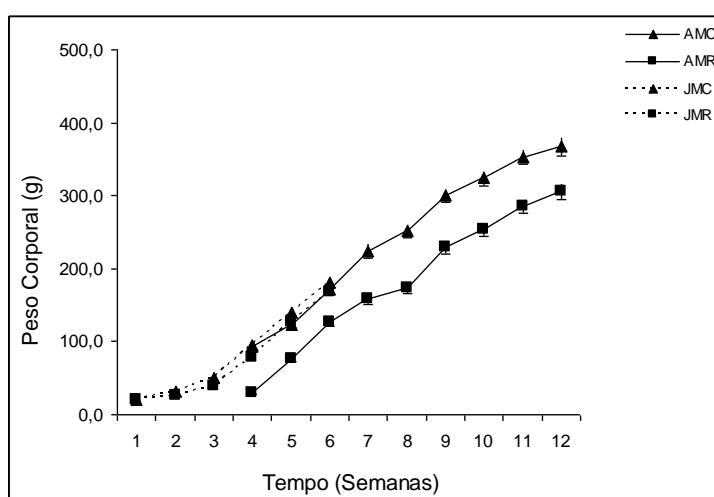
Tabela 8: Porcentagem de recuperação de GABA e glutamato após ensaio de adição de padrões. As concentrações (mM) de GABA e glutamato adicionadas e detectadas nas amostras estão representadas nas quatro primeiras colunas. A porcentagem de recuperação desses aminoácidos é mostrada na quinta e sexta colunas.

Parte I – Restrição de tiamina durante a Lactação

1. Desenvolvimento do modelo animal

O ganho de peso corporal dos ratos jovens e adultos submetidos à restrição de tiamina durante a lactação é mostrado na figura 13, painel A. As aferições de peso foram realizadas a partir da primeira e quarta semanas de vida, para os ratos jovens e adultos, respectivamente. Verificou-se efeito significativo do tempo [$F_{(5,135)} = 2172,33$; $p = 0,0001$], da restrição de tiamina durante a lactação [$F_{(1,27)} = 22,09$; $p = 0,0001$] e interação entre esses fatores [$F_{(5,135)} = 6,30$; $p = 0,0001$] para os ratos jovens. Similarmente, para os ratos adultos, foi observado efeito significativo do tempo [$F_{(8,208)} = 889,39$; $p = 0,0001$], do tratamento [$F_{(1,26)} = 39,99$; $p = 0,0001$] e interação entre esses fatores [$F_{(8,208)} = 2,80$; $p = 0,006$]. Deste modo, ratos jovens e adultos ganharam peso ao longo do tempo, entretanto, a restrição de tiamina durante a lactação prejudicou significativamente este ganho para ambos os grupos. Os valores do peso corporal médio, registrados a cada semana, estão apresentados na seção Anexo (Tabela 1). Neste trabalho utilizou-se como parâmetro de desenvolvimento corporal a aferição semanal de peso, entretanto, como caráter ilustrativo, a figura 13B mostra um rato proveniente de mãe controle (MC) e um de mãe restrita (MR) com um mês de idade.

A: Curvas de ganho de peso dos ratos jovens e adultos-prole



B: Prole - 1 mês de idade

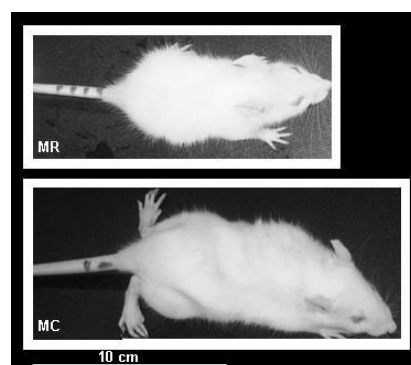


Figura 13: Efeitos da restrição de tiamina durante a lactação no peso corporal das proles. **Painel A:** Curvas de ganho de peso corporal dos ratos jovens (J) e adultos (A) representado como a média do grupo \pm erro padrão ao longo do tempo. **Painel B:** Fotos ilustrativas de ratos com um mês de idade. MC e MR: ratos provenientes de mães controles e restritas durante a lactação, respectivamente.

O peso encefálico (exceto cerebelo) dos ratos adultos foi significativamente reduzido pela restrição de tiamina durante a lactação [$F_{(1, 26)} = 6,94$; $p = 0,012$]. Entretanto, nos ratos jovens, não foi verificado efeito significativo do tratamento [$F_{(1, 27)} = 0,02$; $p = 0,14$]. Quando o peso encefálico foi analisado em função do peso corporal, o efeito da restrição de tiamina não foi mais detectado em nenhum dos grupos [jovens: $F_{(1,27)} = 3,85$; $p = 0,06$; adultos: $F_{(1,26)} = 2,94$; $p = 0,09$] (Tabela 9).

Peso encefálico e corporal das proles

		Peso Encefálico	Peso Corporal	Peso Encefálico /Peso Corporal
Ratos Jovens	JMC (n=11)	1,32 ± 0,01	181,64 ± 2,75	0,0073 ± 0,0001
	JMR (n=18)	1,29 ± 0,01	167,67 ± 4,28	0,0078 ± 0,0002
Ratos Adultos	AMC (n=11)	1,38 ± 0,01	367,64 ± 12,37	0,0038 ± 0,0001
	AMR (n=17)	1,28 ± 0,04 *	306,00 ± 10,09	0,0043 ± 0,0002

Valores representam a média ± erro padrão (S.E.M.).

* p = 0,012

Tabela 9: Peso encefálico (exceto cerebelo) e corporal de ratos jovens (J) e adultos (A) submetidos à restrição de tiamina durante a lactação. MC e MR: ratos provenientes de mães controles e restritas, respectivamente.

2. Estudos Comportamentais

Treino no Labirinto Aquático de Morris: os desempenhos na tarefa espacial dos ratos jovens e adultos controles e submetidos à restrição de tiamina durante a lactação são mostrados na figura 14. A aquisição da informação (aprendizado) é expressa em latência (tempo gasto pelo animal para encontrar a plataforma) durante as cinco sessões de treino no labirinto Aquático de Morris. Análise de variância (ANOVA) 2 x 5 mostrou efeito significativo do tempo [$F_{(4,108)} = 35,75$; $p = 0,0001$] e da restrição maternal de tiamina [$F_{(1,27)} = 5,91$; $p = 0,022$] para os animais jovens (Fig. 14A). Não foi observada interação significativa entre tempo e tratamento [$F_{(4,108)} = 1,80$; $p = 0,16$]. Os ratos jovens provenientes de mães restritas gastam mais tempo para aprender a tarefa, apresentando latência maior nas sessões 2 [$F_{(1,27)} = 5,71$; $p = 0,024$] e 3 [$F_{(1,27)} = 5,52$; $p = 0,026$] do treino. Entretanto, após cinco dias de treino, os animais de ambos os grupos são capazes de localizar a plataforma submersa. Análise estatística semelhante realizada com os dados obtidos na fase adulta demonstrou efeito significativo do tempo [$F_{(4,104)} = 20,68$; $p = 0,0001$] (Fig. 14B). Todavia, não foi observado efeito da restrição de tiamina durante a lactação [$F_{(1,26)} = 1,47$; $p = 0,24$] e interação entre tempo e tratamento [$F_{(4,104)} = 0,27$; $p = 0,82$].

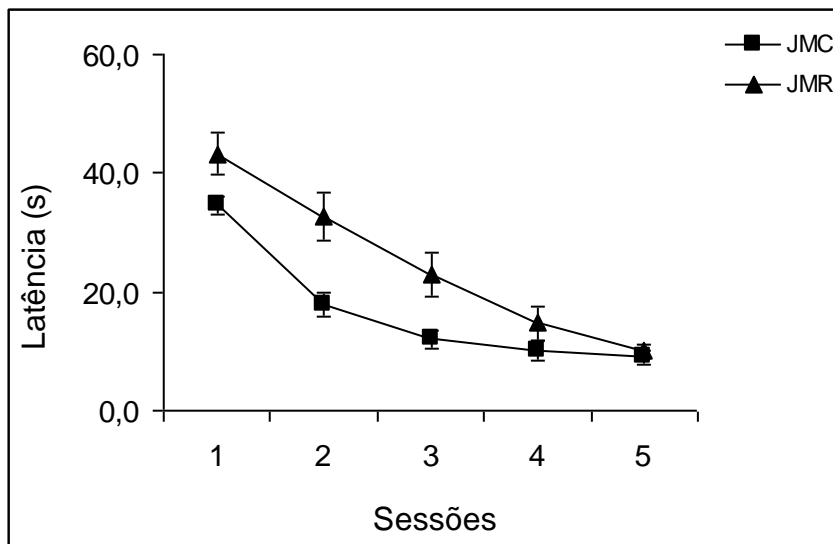
Resultados similares foram encontrados quando o teste ANOVA 2 x 5 foi realizado com os dados da distância total percorrida pelos animais durante o treino (dados não mostrados na

forma gráfica). Para os ratos jovens observou-se efeito significativo do tempo [$F_{(4,108)} = 30,04$; $p = 0,0001$] e da restrição maternal de tiamina [$F_{(1,27)} = 7,13$; $p = 0,013$], não sendo detectado interação entre esses fatores [$F_{(4, 108)} = 1,87$; $p = 0,15$]. Para os ratos adultos observou-se efeito significativo somente do tempo [$F_{(4, 104)} = 20,85$; $p = 0,0001$], não sendo verificado efeito do tratamento [$F_{(1,26)} = 0,41$; $p = 0,53$] e interação entre tempo e tratamento [$F_{(4, 104)} = 0,45$; $p = 0,69$].

A porcentagem de tempo em que os animais permaneceram em cada quadrante ao longo das sessões foi avaliada através de ANOVA 2 x 5. Observou-se aumento significativo do tempo gasto no quadrante alvo ao longo das sessões para os ratos jovens [$F_{(4, 108)} = 40,64$; $p = 0,0001$] e adultos [$F_{(4, 104)} = 29,84$; $p = 0,0001$], confirmando a ocorrência do aprendizado espacial para ambos os grupos.

Curvas de aprendizado no Labirinto Aquático de Morris

A



B

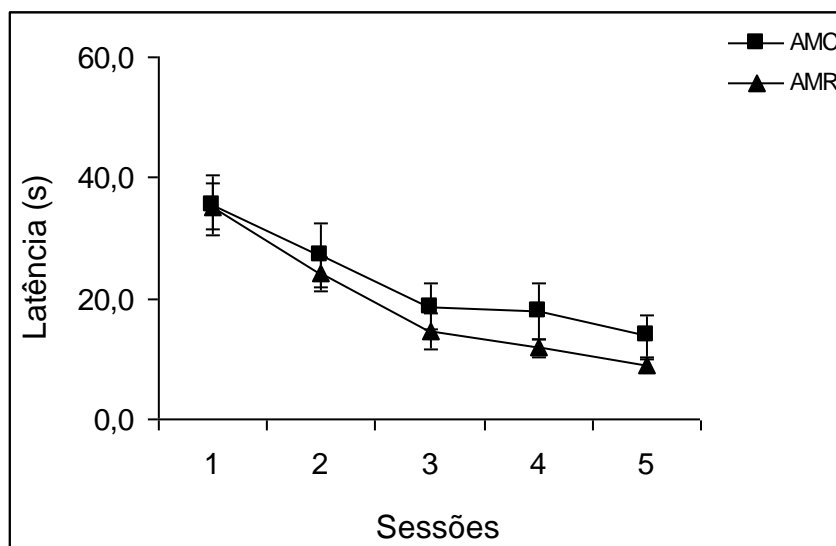


Figura 14: Curvas de aquisição durante o treino no Labirinto Aquático de Morris. As latências em segundos estão representadas como a média do grupo \pm erro padrão ao longo de cinco sessões. Nos painéis A e B estão representados os desempenhos dos animais jovens (J) e adultos (A), respectivamente. MC e MR: ratos provenientes de mães controles e restritas durante a lactação, respectivamente.

A atividade motora também foi avaliada ao longo das sessões através de ANOVA 2 x 5 dos dados referentes à velocidade de nado durante o treino. A restrição de tiamina não afetou a atividade motora dos animais jovens [$F_{(1,27)} = 2,60$; $p = 0,12$] e adultos [$F_{(1,26)} = 2,77$; $p = 0,10$]. Entretanto, com o decorrer das sessões, a velocidade tanto dos ratos jovens [$F_{(4,108)} = 3,73$; $p = 0,013$] quanto dos adultos [$F_{(4,104)} = 4,31$; $p = 0,007$] diminuí significativamente.

Teste Comprobatório - Memória Espacial de Referência e Extinção: o tempo de permanência no quadrante alvo e a distância média à plataforma durante o primeiro minuto do teste comprobatório foram utilizados para avaliar a memória espacial de referência. ANOVA *One-Way* indicou que a restrição maternal de tiamina não afetou significativamente o tempo de permanência no quadrante alvo tanto para os ratos jovens [$F_{(1,27)} = 0,76$; $p = 0,39$] quanto para os adultos [$F_{(1,26)} = 0,001$; $p = 0,98$]. Resultados similares foram observados quando a distância média à plataforma foi analisada [jovens: $F_{(1,27)} = 0,08$; $p = 0,78$; adultos: $F_{(1,26)} = 0,003$; $p = 0,96$], indicando que a memória espacial de referência não foi afetada pela restrição de tiamina durante a lactação (Tabela 10). A distância total percorrida durante o primeiro minuto do teste comprobatório foi significativamente aumentada pelo tratamento nos ratos jovens [$F_{(1,27)} = 4,30$; $p = 0,05$], não sendo detectado efeito nos ratos adultos [$F_{(1,26)} = 0,82$; $p = 0,37$]. Similarmente, a velocidade de natação no primeiro minuto do teste também foi aumentada pelo tratamento somente nos ratos jovens [$F_{(1,27)} = 4,30$; $p = 0,05$], não sendo alterada nos adultos [$F_{(1,26)} = 0,82$; $p = 0,37$] (Tabela 10).

Desempenho no Labirinto Aquático de Morris – Teste comprobatório

		Parâmetros Comportamentais			
		Tempo no quadrante alvo (s)	Distância ao alvo (cm)	Distância percorrida (cm)	Velocidade de natação (cm/s)
Ratos Jovens	JMC (n=11)	28,53 ± 1,94	56,69 ± 3,36	1699,00 ± 37,40	28,29 ± 0,87
	JMR (n=18)	25,44 ± 2,50	58,26 ± 3,81	1811,85 ± 22,86 *	30,17 ± 0,48 **
Ratos Adultos	AMC (n=11)	30,05 ± 1,83	51,67 ± 3,03	1474,21 ± 28,70	24,55 ± 0,63
	AMR (n=17)	30,11 ± 2,63	51,38 ± 3,85	1535,38 ± 41,36	25,57 ± 0,81

Valores representam a média ± erro padrão (S.E.M.). *p = 0,05; **p = 0,05

Tabela 10: Parâmetros comportamentais de ratos jovens (J) e adultos (A) coletados durante o primeiro minuto do teste comprobatório. MC e MR: ratos provenientes de mães controles e restritas durante a lactação, respectivamente.

A restrição maternal de tiamina durante a lactação não causou efeito significativo no índice de extinção calculado a partir do tempo de permanência no quadrante alvo [jovens: $F_{(1,27)} = 0,06$; $p = 0,80$; adultos: $F_{(1,26)} = 0,74$; $p = 0,40$] e da distância média ao alvo [jovens: $F_{(1,27)} = 0,07$; $p = 0,80$; adultos: $F_{(1,26)} = 0,73$; $p = 0,40$]. O teste ANOVA *One-Way* também indicou não haver diferença significativa entre a velocidade de natação no primeiro e segundo minutos do teste comprobatório para ratos jovens (JMC: [$F_{(1,20)} = 0,34$; $p = 0,56$]; JMR: [$F_{(1,34)} = 0,045$; $p = 0,83$]) e adultos (AMC: [$F_{(1,20)} = 0,06$; $p = 0,81$]; AMR: [$F_{(1,32)} = 0,40$; $p = 0,53$]).

Memória Espacial de Trabalho (Operacional): após cinco dias de treino com a plataforma alternada diariamente, a memória espacial de trabalho foi avaliada na segunda tentativa do sexto dia. O teste ANOVA *One-Way* indicou que a restrição de tiamina durante a lactação não afetou significativamente a latência [$F_{(1,27)} = 1,22$; $p = 0,28$], a distância total percorrida [$F_{(1,27)} = 1,55$; $p = 0,22$] e a velocidade de nado [$F_{(1,27)} = 0,56$; $p = 0,46$] dos ratos jovens. Resultados similares foram encontrados nos animais adultos [latência: $F_{(1,26)} = 1,20$; $p = 0,28$; distância percorrida: $F_{(1,26)} = 1,07$; $p = 0,31$; velocidade: $F_{(1,26)} = 0,66$; $p = 0,42$].

3. Estudos Bioquímicos

As concentrações de glutamato e GABA presentes no tálamo, hipocampo e córtex pré-frontal (CPF) dos ratos jovens e adultos encontram-se representadas nas figuras 15 e 16, respectivamente. ANOVA *One-Way* indicou que a restrição de tiamina durante a lactação não alterou significativamente a concentração de glutamato [tálamo: $F_{(1,27)} = 1,34$; $p = 0,26$; hipocampo: $F_{(1,27)} = 2,59$; $p = 0,12$; CPF: $F_{(1,27)} = 1,70$; $p = 0,20$] (Fig. 15A) ou GABA [tálamo: $F_{(1,27)} = 1,82$; $p = 0,19$; hipocampo: $F_{(1,27)} = 2,46$; $p = 0,13$; CPF: $F_{(1,27)} = 0,013$; $p = 0,91$] (Fig. 15B) em nenhuma das regiões cerebrais analisadas nos ratos jovens.

Os níveis de glutamato e GABA avaliados nas mesmas regiões cerebrais dos ratos adultos são mostrados na figura 16. A restrição de tiamina durante a lactação provocou uma significativa diminuição na concentração de glutamato em todas as regiões analisadas [tálamo: $F_{(1,26)} = 37,98$; $p = 0,0001$; hipocampo: $F_{(1,26)} = 13,35$; $p = 0,001$; PFC: $F_{(1,26)} = 12,74$; $p = 0,001$] (Fig. 16A). Todavia, redução significativa nos níveis de GABA foi observado somente no tálamo [$F_{(1,26)} = 11,38$; $p = 0,002$]. No hipocampo [$F_{(1,26)} = 1,25$; $p = 0,27$] e córtex pré-frontal [$F_{(1,26)} = 0,24$; $p = 0,62$] as concentrações de GABA não foram afetadas pelo tratamento (Fig. 16B). As concentrações médias de glutamato e GABA

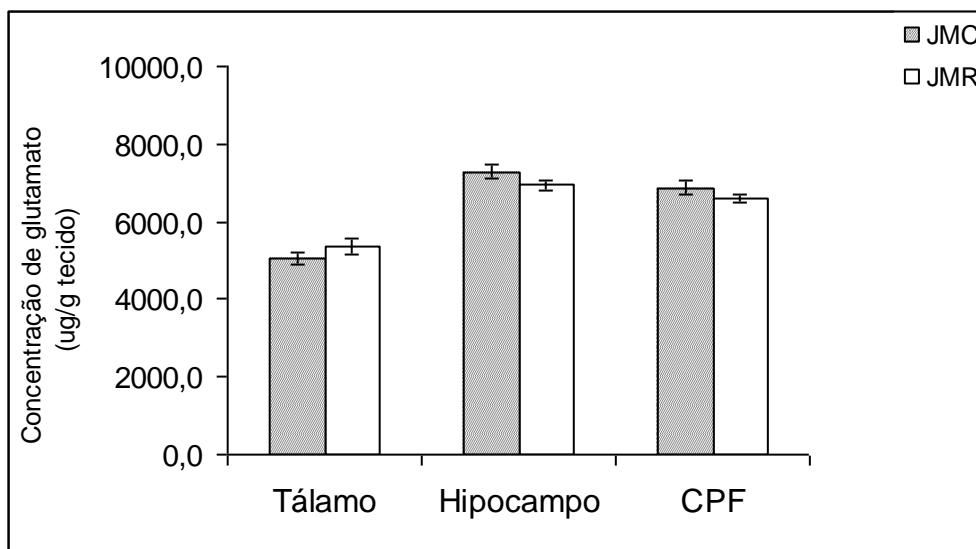
presentes em todas as regiões analisadas dos ratos jovens e adultos são apresentadas na seção Anexo (Tabela 2).

Análises de regressão linear entre os parâmetros comportamentais e bioquímicos: não foram verificadas correlações significativas entre glutamato ou GABA nas três regiões analisadas e os desempenhos dos ratos jovens nas sessões 2 e 3 do treino. Também não foram verificadas correlações significativas entre glutamato e os seguintes parâmetros comportamentais: índices de extinção, distâncias ao alvo no primeiro minuto do teste comprobatório e no teste da memória de trabalho para os ratos jovens e adultos. Resultados similares foram observados com o neurotransmissor GABA. Esses dados sugerem que os níveis de glutamato e GABA das regiões estudadas não estão diretamente envolvidos com o desempenho dos animais nas tarefas comportamentais avaliadas neste trabalho. Os dados das análises de regressão linear encontram-se sumarizados na seção Anexo (Tabela 3).

Os resultados comportamentais e bioquímicos avaliados durante as fases jovem e adulta de ratos submetidos à restrição de tiamina durante a lactação foram compilados em um trabalho publicado na revista *Behavioural Brain Research* em Março de 2010 (**Anexo cópia do artigo**).

Níveis de glutamato e GABA em regiões cerebrais de ratos jovens

A



B

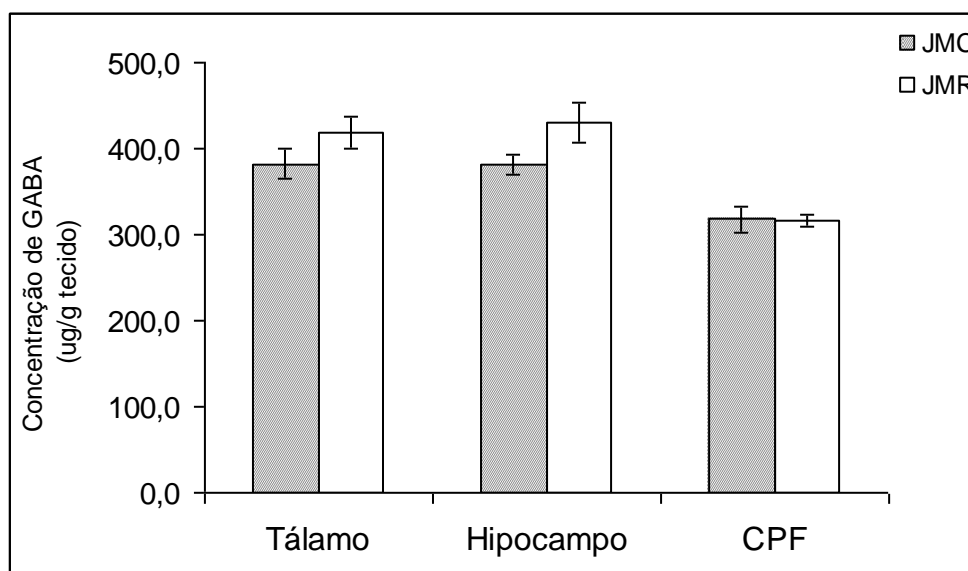
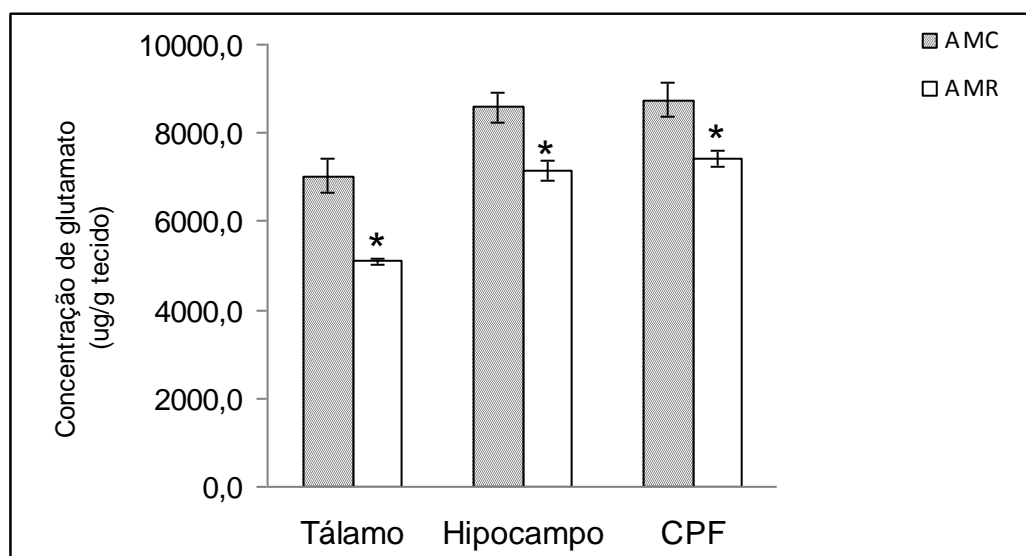


Figura 15: Concentrações em $\mu\text{g/g}$ de tecido (média \pm erro padrão) de glutamato (painel A) e GABA (painel B) em regiões cerebrais de ratos jovens submetidos à restrição de tiamina durante a lactação. MC e MR: ratos provenientes de mães controles e restritas, respectivamente. CPF = córtex pré-frontal.

Níveis de glutamato e GABA em regiões cerebrais de ratos adultos

A



B

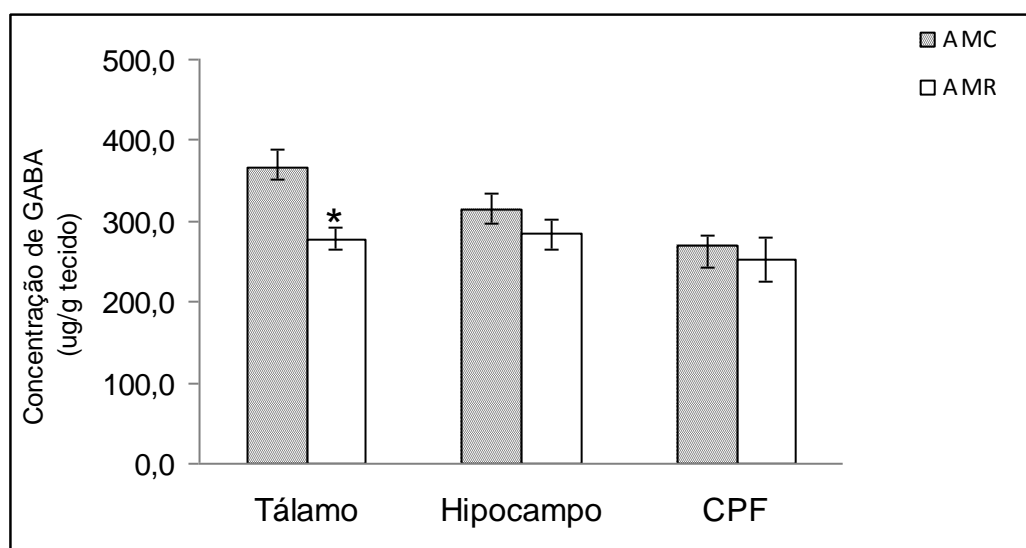


Figura 16: Concentrações em $\mu\text{g/g}$ de tecido (média \pm erro padrão) de glutamato (painel A) e GABA (painel B) em regiões cerebrais de ratos adultos submetidos à restrição de tiamina durante a lactação. MC e MR: ratos provenientes de mães controles e restritas, respectivamente. CPF = córtex pré-frontal. * $p < 0,01$.

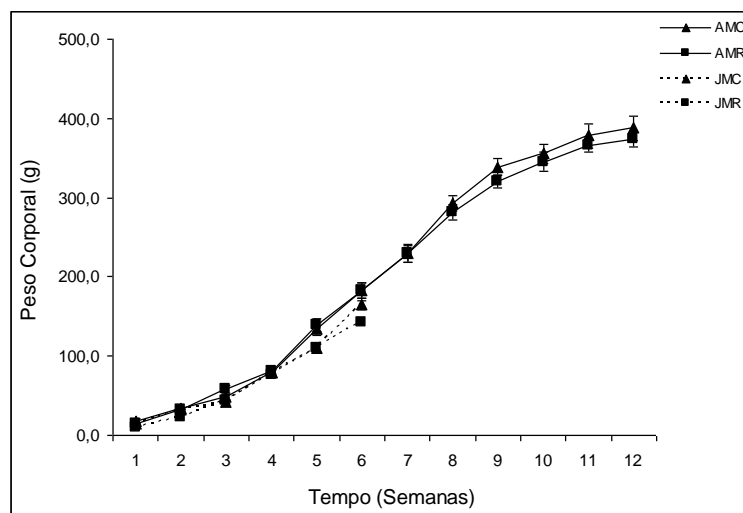
Parte II – Restrição de tiamina durante o Período Peri-Natal

1. Desenvolvimento do modelo animal

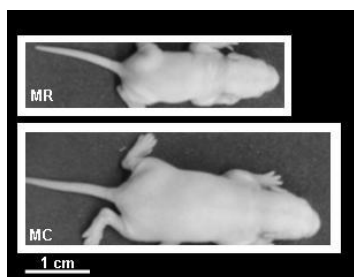
O ganho de peso corporal, dos ratos jovens e adultos, calculado a partir da primeira semana de vida até o dia do sacrifício (seis e doze aferições, respectivamente) é mostrado na figura 17, painel A. Para os ratos jovens verificou-se efeito significativo do tempo [$F_{(5,75)} = 537,11$; $p = 0,0001$], da restrição de tiamina durante o período peri-natal [$F_{(1,15)} = 21,29$; $p = 0,0001$] e interação entre esses fatores [$F_{(5,75)} = 3,70$; $p = 0,05$]. Entretanto, para os ratos adultos foi observado efeito significativo somente do tempo [$F_{(11,220)} = 1480,84$; $p = 0,0001$]. Não há efeito da restrição maternal de tiamina [$F_{(1,20)} = 0,24$; $p = 0,63$] ou interação entre tempo e tratamento [$F_{(11,220)} = 1,39$; $p = 0,26$]. Ratos provenientes de mães controles e restritas ganharam peso ao longo do tempo, porém a restrição no período peri-natal prejudicou significativamente este ganho somente durante a fase jovem. Os valores do peso corporal médio, registrados a cada semana, estão apresentados na seção Anexo (Tabela 4). Na figura 17 painéis B e C estão representados ratos proveniente de mãe controle (MC) e mãe restrita (MR) com uma semana e um mês de idade, respectivamente.

A restrição de tiamina durante o período peri-natal não causou efeito significativo no peso encefálico (exceto cerebelo) dos ratos jovens [$F_{(1,15)} = 0,69$; $p = 0,42$] e adultos [$F_{(1,20)} = 0,011$; $p = 0,92$]. Todavia, quando o peso encefálico foi analisado em relação ao peso corporal, um efeito significativo da restrição de tiamina foi encontrado em ratos jovens [$F_{(1,15)} = 9,00$; $p = 0,009$], mas não em adultos [$F_{(1,20)} = 0,64$; $p = 0,43$] (Tabela 11).

A: Curvas de ganho de peso dos ratos jovens e adultos-prole



B: Prole – 1 semana de idade



C: Prole – 1 mês de idade

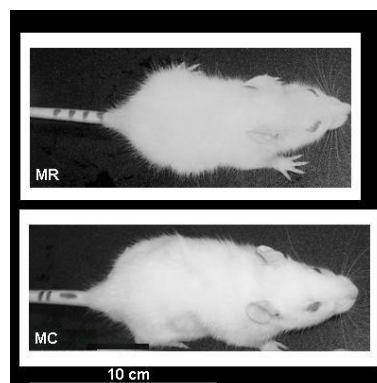


Figura 17: Efeitos da restrição de tiamina durante o período peri-natal no peso corporal das proles. **Painel A:** Curvas de ganho de peso corporal dos ratos jovens (J) e adultos (A) representado como a média do grupo \pm erro padrão ao longo do tempo. **Painéis B e C:** Fotos ilustrativas de ratos com uma semana e um mês de idade, respectivamente. MC e MR: ratos provenientes de mães controles e restritas durante o período peri-natal, respectivamente.

Peso encefálico e corporal das proles

		Peso Encefálico	Peso Corporal	Peso Encefálico /Peso Corporal
Ratos Jovens	JMC (n=07)	1,35 ± 0,02	164,57 ± 5,70	0,008 ± 0,0002
	JMR (n=10)	1,38 ± 0,02	141,60 ± 4,30	0,010 ± 0,0003*
Ratos Adultos	AMC (n=11)	1,43 ± 0,02	388,09 ± 15,35	0,0037 ± 0,0001
	AMR (n=11)	1,43 ± 0,01	373,64 ± 9,27	0,0038 ± 0,0001

Valores representam a média ± erro padrão (S.E.M.).

* p = 0,009

Tabela 11: Peso encefálico (exceto cerebelo) e corporal de ratos jovens (J) e adultos (A) submetidos à restrição de tiamina durante o período peri-natal. MC e MR: ratos provenientes de mães controles e restritas, respectivamente.

2. Estudos Comportamentais

Treino no Labirinto Aquático de Morris: a figura 18 representa o desempenho durante o aprendizado espacial dos ratos jovens (painel A) e adultos (painel B) submetidos ou não (controles) à restrição de tiamina durante o período peri-natal. O teste ANOVA 2 x 5 mostrou efeito significativo do tempo [$F_{(4,60)} = 12,98$; $p = 0,0001$] e da restrição de tiamina [$F_{(1,15)} = 4,56$; $p = 0,049$] para os ratos jovens, porém não há interação significativa entre esses fatores [$F_{(4,60)} = 0,50$; $p = 0,73$]. Os ratos jovens provenientes de mães restritas durante o período peri-natal gastam mais tempo para aprender a tarefa, apresentando latência maior na sessão 2 [$F_{(1,15)} = 5,43$; $p = 0,034$]. Entretanto, ao término do treino, os dois grupos (JMC e JMR) são capazes de localizar com precisão a plataforma submersa. Já nos ratos adultos foi verificado efeito significativo somente do tempo [$F_{(4,80)} = 17,05$; $p = 0,0001$], não sendo observado efeito da restrição de tiamina [$F_{(1,20)} = 1,21$; $p = 0,30$] e interação entre esses fatores [$F_{(4,80)} = 0,50$; $p = 0,74$] durante o aprendizado (Fig. 18B).

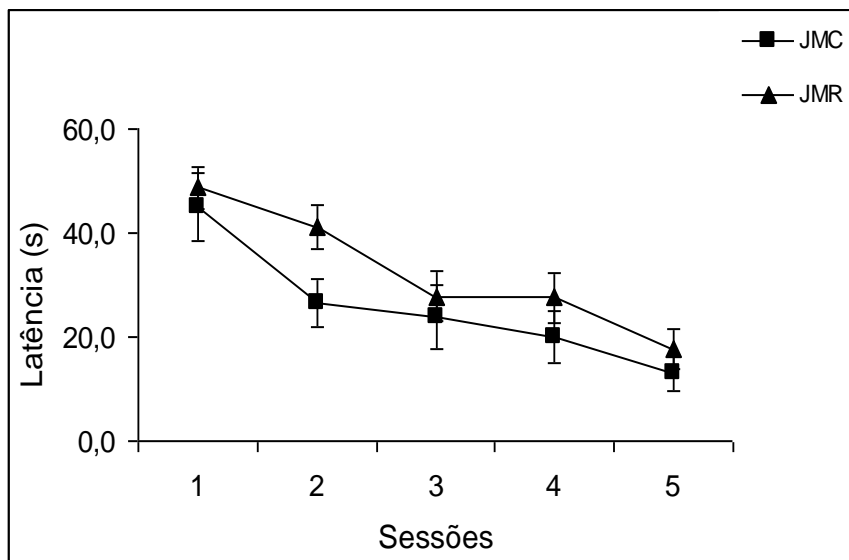
Resultados similares foram encontrados quando o aprendizado espacial foi expresso como a distância total percorrida pelos animais durante o treino (dados não mostrados na forma gráfica). Observou-se efeito significativo do tempo [$F_{(4,60)} = 10,72$; $p = 0,0001$] e da restrição maternal de tiamina [$F_{(1,15)} = 5,19$; $p = 0,038$] para os ratos jovens; entretanto, não foi detectada interação entre esses fatores [$F_{(4,60)} = 0,65$; $p = 0,56$]. Para os ratos adultos

observou-se efeito significativo somente do tempo [$F_{(4,80)} = 9,87$; $p = 0,0001$], não sendo verificado efeito do tratamento [$F_{(1,20)} = 0,88$; $p = 0,36$] e interação entre tempo e tratamento [$F_{(4,80)} = 0,21$; $p = 0,93$]. A porcentagem de tempo em que os ratos jovens [$F_{(4,60)} = 15,73$; $p = 0,0001$] e adultos [$F_{(4,80)} = 9,86$; $p = 0,0001$] permaneceram no quadrante alvo também foi significativamente aumentada ao longo do treino.

Em resumo, apesar dos ratos de todos os grupos estudados ao final do treino aprenderem a localização da plataforma submersa, os ratos jovens submetidos à restrição de tiamina tanto durante a lactação (Parte I) quanto o período peri-natal (Parte II) demoram mais para realizar esta tarefa. Quando as análises são realizadas posteriormente, ou seja, na fase adulta, o déficit comportamental não é mais detectado.

Curvas de aprendizado no Labirinto Aquático de Morris

A



B

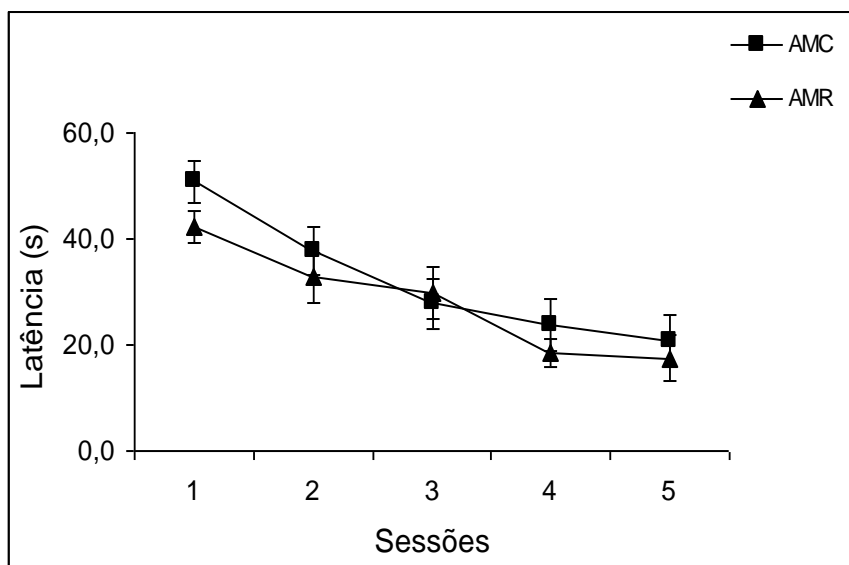


Figura 18: Curvas de aquisição durante o treino no Labirinto Aquático de Morris. As latências em segundos estão representadas como a média do grupo \pm erro padrão ao longo de cinco sessões. Nos painéis A e B estão representados o desempenho dos animais jovens (J) e adultos (A), respectivamente. MC e MR: ratos provenientes de mães controles e restritas durante o período peri-natal, respectivamente.

Similarmente ao observado na parte I deste trabalho, restrição durante a lactação, a velocidade de nado no treino não foi afetada pela restrição de tiamina durante o período peri-natal tanto nos ratos jovens [$F_{(1,15)} = 2,70$; $p = 0,12$] quanto nos adultos [$F_{(1,20)} = 0,002$; $p = 0,96$]. Entretanto, ao longo das sessões, ocorre diminuição significativa da velocidade de nado para ambos os grupos [jovens: $F_{(4,60)} = 5,37$; $p = 0,001$ e adultos: $F_{(4,80)} = 8,37$; $p = 0,0001$].

Teste Comprobatório – Memória Espacial de Referência e Extinção: a tabela 12 contém os parâmetros comportamentais obtidos no primeiro minuto do teste comprobatório dos ratos jovens e adultos. A restrição de tiamina durante o período peri-natal não alterou o tempo de permanência no quadrante alvo [$F_{(1,15)} = 0,27$; $p = 0,61$] ou a distância média à plataforma [$F_{(1,15)} = 0,45$; $p = 0,51$] dos ratos jovens. Quando a avaliação comportamental foi realizada na fase adulta, resultados similares foram encontrados [permanência no quadrante alvo: $F_{(1,20)} = 0,74$; $p = 0,40$; distância média à plataforma: $F_{(1,20)} = 0,47$; $p = 0,50$]. Os dados obtidos indicam que a memória espacial de referência tanto na fase jovem quanto na adulta não foi afetada pela restrição de tiamina durante o período peri-natal. A distância total percorrida durante o primeiro minuto do teste foi significativamente aumentada pelo tratamento somente nos ratos jovens [$F_{(1,15)} = 5,84$; $p = 0,029$], não sendo observado efeito nos ratos adultos [$F_{(1,20)} = 0,23$; $p = 0,63$]. Resultados similares foram observados para a velocidade de natação [jovens: [$F_{(1,15)} = 4,91$; $p = 0,043$]; adultos: $F_{(1,20)} = 0,47$; $p = 0,50$] (Tabela 12).

Desempenho no Labirinto Aquático de Morris – Teste comprobatório

		Parâmetros Comportamentais			
		Tempo no quadrante alvo (s)	Distância ao alvo (cm)	Distância percorrida (cm)	Velocidade de natação (cm/s)
Ratos Jovens	JMC (n=07)	16,33 ± 3,14	53,79 ± 4,72	1639,30 ± 78,38	27,30 ± 1,30
	JMR (n=10)	18,53 ± 2,76	58,10 ± 4,24	1815,70 ± 38,56 *	30,24 ± 0,64 **
Ratos Adultos	AMC (n=11)	21,61 ± 1,47	63,34 ± 2,88	1765,78 ± 64,46	29,40 ± 1,07
	AMR (n=11)	24,30 ± 2,76	59,91 ± 4,04	1696,77 ± 77,48	28,26 ± 1,29

Valores representam a média ± erro padrão (S.E.M.). * $p = 0,029$, ** $p = 0,043$.

Tabela 12: Parâmetros comportamentais de ratos jovens (J) e adultos (A) avaliados durante o primeiro minuto do teste comprobatório. MC e MR: ratos provenientes de mães controles e restritas durante o período peri-natal, respectivamente.

O Índice de Extinção calculado a partir do tempo de permanência no quadrante alvo [jovens: $F_{(1,15)} = 0,096$; $p = 0,76$; adultos: $F_{(1,20)} = 1,62$; $p = 0,22$] e da distância média ao alvo [jovens: $F_{(1,15)} = 0,002$; $p = 0,97$; adultos: $F_{(1,20)} = 1,03$; $p = 0,32$] não foi alterado pela restrição maternal de tiamina durante o período peri-natal. Além disso, não foi verificada diferença significativa entre a velocidade de natação no primeiro e segundo minutos do teste comprobatório para ratos jovens (JMC: [$F_{(1,12)} = 3,78$; $p = 0,076$]; JMR: [$F_{(1,12)} = 2,28$; $p = 0,15$]) e adultos (AMC: [$F_{(1,20)} = 0,14$; $p = 0,71$]; AMR: [$F_{(1,20)} = 0,08$; $p = 0,77$]).

Memória Espacial de Trabalho (Operacional): a restrição maternal de tiamina não afetou de forma significativa a memória de trabalho dos ratos jovens avaliada no sexto dia de teste [latência: $F_{(1,15)} = 1,19$; $p = 0,29$; distância total percorrida: $F_{(1,15)} = 0,98$; $p = 0,34$; velocidade de nado: $F_{(1,15)} = 0,54$; $p = 0,47$]. Resultados similares foram encontrados para os ratos adultos [latência: $F_{(1,20)} = 1,38$; $p = 0,25$; distância total percorrida: $F_{(1,20)} = 0,95$; $p = 0,34$; velocidade: $F_{(1,20)} = 0,27$; $p = 0,61$].

Em resumo, a restrição maternal de tiamina realizada no período peri-natal e lactação (Parte I) apresentou efeitos similares em todas as variáveis comportamentais medidas no teste comprobatório e no teste da memória de trabalho, tanto na fase jovem quanto na fase adulta das proles.

3. Estudos Bioquímicos

Nas figuras 19 e 20 estão apresentadas as concentrações de glutamato e GABA presentes no tálamo, hipocampo e córtex pré-frontal (CPF) dos ratos jovens e adultos, respectivamente. A restrição de tiamina durante o período peri-natal não alterou significativamente a concentração de glutamato [tálamo: $F_{(1,15)} = 1,65$; $p = 0,22$; hipocampo: $F_{(1,15)} = 0,97$; $p = 0,34$; CPF: $F_{(1,15)} = 0,12$; $p = 0,74$] (Fig. 19A) ou GABA [tálamo: $F_{(1,15)} = 0,02$; $p = 0,90$; hipocampo: $F_{(1,15)} = 0,11$; $p = 0,75$; CPF: $F_{(1,15)} = 2,33$; $p = 0,15$] (Fig. 19B) em nenhuma das regiões cerebrais analisadas dos ratos jovens.

Resultados similares foram encontrados quando os níveis de glutamato e GABA foram avaliados nos ratos adultos. Os níveis de glutamato [tálamo: $F_{(1,20)} = 0,02$; $p = 0,90$; hipocampo: $F_{(1,20)} = 0,96$; $p = 0,34$; CPF: $F_{(1,20)} = 0,07$; $p = 0,80$] (Fig. 20A) e GABA [tálamo: $F_{(1,20)} = 0,01$; $p = 0,92$; hipocampo: $F_{(1,20)} = 0,06$; $p = 0,81$; CPF: $F_{(1,20)} = 0,01$; $p = 0,98$] (Fig. 20B) não foram afetados pela restrição de tiamina em nenhuma das regiões cerebrais

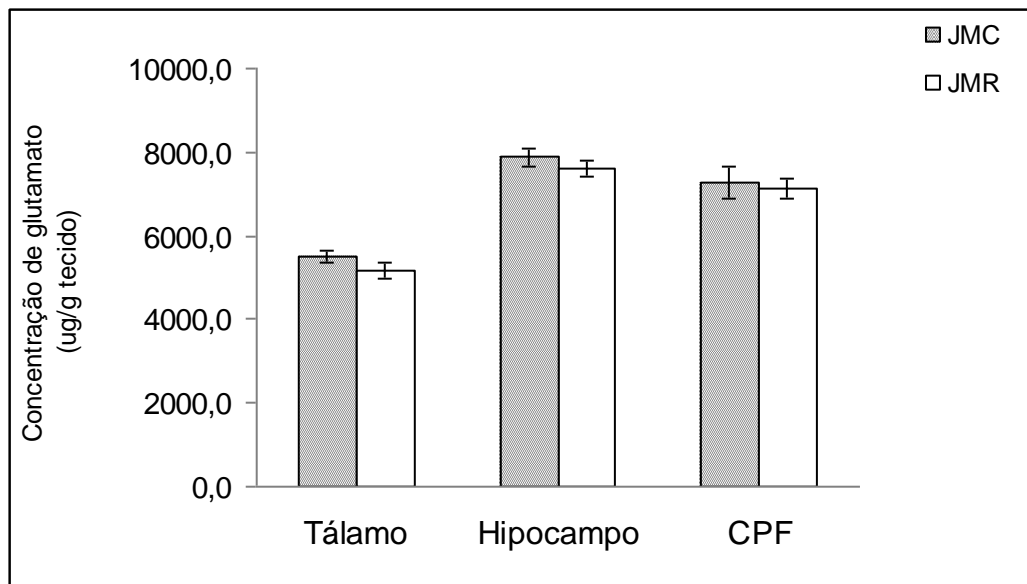
estudadas. As concentrações médias de glutamato e GABA presentes em todas as regiões analisadas dos ratos jovens e adultos estão apresentadas na seção Anexo (Tabela 5).

Análises de regressão linear entre os parâmetros comportamentais e bioquímicos: não foram verificadas correlações significativas entre glutamato ou GABA nas três regiões analisadas e o desempenho dos ratos jovens na sessão 2 do treino. Também não foram verificadas correlações significativas entre glutamato ou GABA e a distância ao alvo no primeiro minuto do teste comprobatório para os ratos jovens e adultos. As correlações significativas foram: concentração de glutamato [tálamo: $F_{(1,15)} = 11,92$; $p = 0,003$; córtex pré-frontal: $F_{(1,15)} = 5,30$; $p = 0,04$] e desempenho dos ratos jovens no teste da memória de trabalho; concentração de GABA no tálamo [$F_{(1,20)} = 6,05$; $p = 0,02$] e índices de extinção apresentados pelos ratos adultos. Os dados das análises de regressão linear encontram-se sumarizados na seção Anexo (Tabela 6).

Os dados comportamentais e bioquímicos determinados nas fases jovem e adulta de ratos submetidos à restrição de tiamina durante o período peri-natal foram compilados em um manuscrito submetido à revista *Behavioural Brain Research* (**Anexo cópia do manuscrito**).

Níveis de glutamato e GABA em regiões cerebrais de ratos jovens

A



B

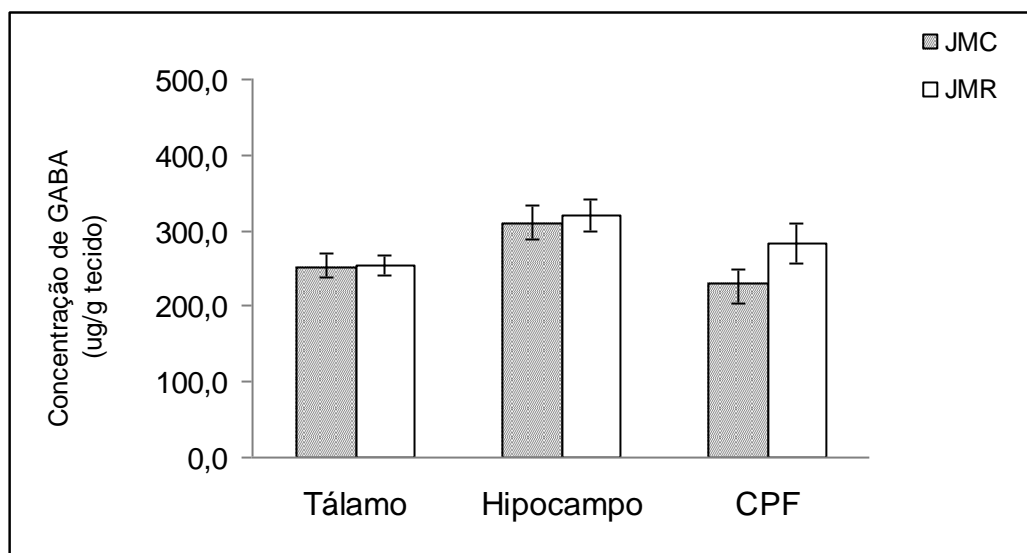
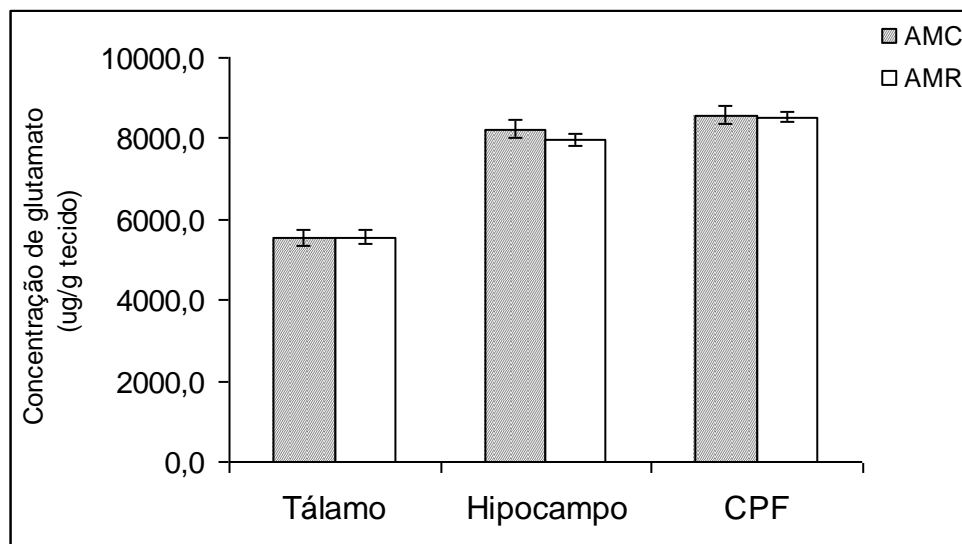


Figura 19: Concentrações em $\mu\text{g/g}$ de tecido (média \pm erro padrão) de glutamato (painel A) e GABA (painel B) em regiões cerebrais de ratos jovens submetidos à restrição de tiamina durante o período peri-natal. MC e MR: ratos provenientes de mães controles e restritas, respectivamente. CPF = córtex pré-frontal.

Níveis de glutamato e GABA em regiões cerebrais de ratos adultos

A



B

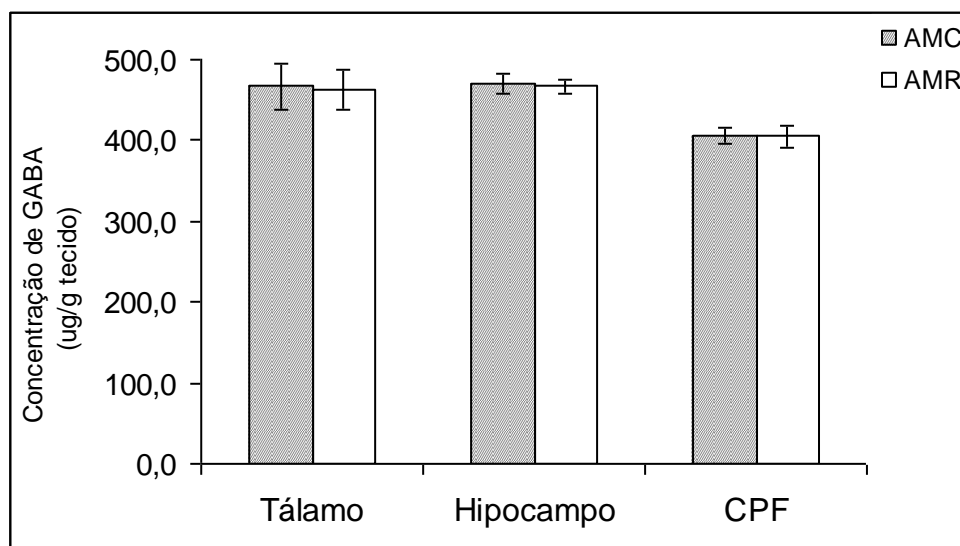


Figura 20: Concentrações em $\mu\text{g/g}$ de tecido (média \pm erro padrão) de glutamato (painel A) e GABA (painel B) em regiões cerebrais de ratos adultos submetidos à restrição de tiamina durante o período peri-natal. MC e MR: ratos provenientes de mães controles e restritas, respectivamente. CPF = córtex pré-frontal.

Resumo dos Resultados

Parâmetros Comportamentais e Bioquímicos	Avaliações na fase Jovem (30 dias)	Avaliações na fase Adulta (75 dias)	
RESTRIÇÃO DE TIAMINA DURANTE A LACTAÇÃO (PARTE I)			
Aprendizado Espacial	Efeito da restrição	n.s.	
Velocidade de nado no treino	n.s.	n.s.	
Memória de Referência			
Memória de Trabalho			
Índice de Extinção			
Concentrações de Glutamato	Tálamo	n.s.	Redução significativa
	Hipocampo		
	CPF ¹		
Concentrações de GABA	Tálamo	n.s.	Redução significativa
	Hipocampo		n.s.
	CPF		
Correlações Significativas	n.s.	n.s.	
Ganho de peso corporal	Efeito da restrição	Efeito da restrição	
Peso encefálico	n.s.	Redução significativa	
Peso encefálico/Peso corporal		n.s.	
RESTRIÇÃO DE TIAMINA DURANTE O PERÍODO PERI-NATAL (PARTE II)			
Aprendizado espacial	Efeito da restrição	n.s.	
Velocidade de nado no treino	n.s.	n.s.	
Memória de Referência			
Memória de Trabalho			
Índice de Extinção			
Concentrações de Glutamato	Tálamo	n.s.	n.s.
	Hipocampo		
	CPF		
Concentrações de GABA	Tálamo	n.s.	n.s.
	Hipocampo		
	CPF		
Correlações Significativas	Concentrações glutamato (tálamo e CPF) X teste da memória de trabalho	Concentrações GABA no tálamo X índice de extinção	
Ganho de peso corporal	Efeito da restrição	n.s.	
Peso encefálico	n.s.		
Peso encefálico/Peso corporal	Efeito da restrição		

Tabela 13: Resumo dos resultados das partes I (restrição de tiamina durante a lactação) e II (restrição de tiamina no período peri-natal). n.s. = não significativo. ¹CPF = córtex pré-frontal.

Discussão

No presente estudo foram independentemente avaliados os efeitos de uma dieta restrita em tiamina, durante a lactação ou o período peri-natal, sobre parâmetros comportamentais e neuroquímicos da prole nas fases jovem e adulta. Os resultados obtidos indicam, pela primeira vez, que a restrição de tiamina durante a lactação causa na prole déficit cognitivo espacial detectável somente na fase jovem e alterações nas concentrações cerebrais de glutamato e GABA dos ratos adultos. Quando a restrição maternal de tiamina é feita no período peri-natal, observa-se prejuízo cognitivo na fase jovem, entretanto, a restrição nesse período, não altera os níveis de glutamato e GABA em nenhuma das duas fases do desenvolvimento, jovens e adultos. Abaixo discutimos esses dados e apresentamos algumas hipóteses que poderiam explicar esses resultados.

Estabelecimento do modelo experimental

Sabe-se que o desenvolvimento do cérebro começa no período pré-natal e continua após o nascimento (Bayer & Altman, 1995). No rato, os períodos peri e pós-natal (lactação) concentram a diferenciação celular (Miller, 1986), a mielogênese e o estabelecimento das conexões sinápticas (Johnson e Quarles, 1986), respectivamente. Portanto, essas fases são importantes para o perfeito funcionamento do sistema nervoso central (SNC). A restrição durante a lactação (Parte I) iniciou-se no dia do parto e perdurou por 30 dias, momento em que os ratos foram separados da mãe. De forma independente, realizou-se a restrição de tiamina no período peri-natal (Parte II): do décimo primeiro dia de gestação ao quinto de lactação, totalizando 16 dias. Este intervalo temporal foi escolhido porque de acordo com Bayer & Altman (1995) este período é crucial para a formação das estruturas cerebrais – tálamo, hipocampo e córtex pré-frontal. Estudos prévios indicam que essas estruturas são importantes substratos neurobiológicos da cognição espacial (Squire, 1992; Eichenbaum & Cohen, 2001; Fuster, 2002), uma das variáveis dependentes a ser quantificada no presente estudo. Além disto, trabalhos anteriores também indicam que a deficiência de tiamina afeta o tálamo (Langlais *et al.*, 1992; Langlais & Savage, 1995; Pitkin & Savage, 2004), hipocampo (Irle & Markowitsch, 1983; Savage *et al.*, 2003, 2007; Zhao *et al.*, 2008) e o córtex pré-frontal (Langalis & Savage, 1995; Carvalho *et al.*, 2006).

Para se estabelecer o modelo experimental de deficiência maternal de tiamina, optou-se por realizar a privação de B1 primeiramente no período peri-natal. Inúmeras dificuldades experimentais foram observadas, sendo a morte recorrente da prole o principal desafio. Inicialmente tentou-se estabelecer um modelo no qual as mães recebiam ração 100% deficiente em tiamina. Contudo, o índice de mortalidade das ratas grávidas foi alto, e as que conseguiam chegar ao término da gestação frequentemente morriam após o parto, abandonavam ou matavam a prole. Os filhotes sobreviventes dificilmente chegavam à fase adulta ou porque não conseguiam se alimentar sozinhos após o desmame ou porque havia muricídio entre eles.

Tendo em vista as dificuldades encontradas para estabelecer o modelo experimental de deficiência de tiamina durante a fase peri-natal, resolveu-se estudar os efeitos dessa deficiência durante a lactação, pois nesse período não teríamos os problemas relacionados à gestação e ao parto. Além disso, com a finalidade de diminuir o índice de mortalidade, diversas alterações foram efetuadas: (i) a formulação da ração deficiente foi alterada, de tal forma que esta passou a ser produzida contendo 10% da quantidade de tiamina presente na ração padrão e, portanto, não mais totalmente deficiente em tiamina. Deste modo, os efeitos observados referem-se à restrição de B1. (ii) As ratas destinadas ao acasalamento eram fêmeas de segunda cria, ou seja, experientes na gestação e cuidado, com sucesso, da prole. Assim, evitavam-se fêmeas que poderiam apresentar dificuldades naturais de parto ou de amamentação. (iii) A sexagem dos filhotes foi realizada no dia seguinte ao parto, permanecendo com a mãe somente filhotes machos em número de seis a oito por fêmea para se evitar a competição excessiva pelo leite materno. (iv) Extensão no período de amamentação. O período de amamentação também foi modificado, sendo estendido de 21 para 30 dias, com o objetivo de retirar os filhotes das mães apenas depois destes apresentarem maior probabilidade de sobrevivência. (v) Alterações nas condições ambientais e manuseio dos animais. As condições de manutenção dos animais foram melhoradas: evitava-se o barulho externo e a entrada de pessoas no local onde os animais eram mantidos, as caixas nas quais os ratos estavam alocados eram conservadas sempre muito limpas e, por último, a manipulação dos filhotes era evitada ao máximo. Depois da adoção destas medidas, ratos provenientes de mães restritas foram obtidos. Uma vez que o modelo de restrição durante a lactação foi estabelecido, condições experimentais semelhantes foram adotadas e filhotes provenientes de mães restritas em tiamina durante o período peri-natal também foram obtidos com sucesso. Após o episódio de restrição maternal de tiamina durante a lactação (Parte I) ou

o período peri-natal (Parte II), os filhotes provenientes de mães controles e restritas foram avaliados em dois momentos distintos: fase jovem e adulta, de forma independente. Os dados referentes ao modelo experimental, como ganho de peso corporal e encefálico, estão discutidos abaixo.

Estabelecimento do método cromatográfico para dosagem de glutamato e GABA em amostras de tecido cerebral

No presente trabalho estabelecemos um método cromatográfico para a dosagem de GABA e glutamato utilizando derivatização pré-coluna com ortoftaldeído (OPA) e fase móvel isocrática. O método por nós descrito permitiu a análise desses neurotransmissores em amostras de tecido cerebral de ratos de forma rápida e com alta reprodutibilidade e acurácia.

No cromatograma da solução branco observa-se a presença de substâncias no início da corrida que provavelmente são originadas da reação de derivatização e possuem um tempo de retenção muito similar ao glutamato. Por este motivo, o gráfico da curva de calibração do glutamato não intercepta o eixo Y na origem. A detecção de picos desconhecidos relativos a substâncias presentes em reações de derivatização, incluindo OPA, foi previamente descrito por outros autores (Rowley *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 2005; Devall *et al.*, 2007).

A baixa estabilidade das amostras derivatizadas com OPA não influenciou nos resultados obtidos porque um minuto após a derivatização as amostras foram injetadas no sistema cromatográfico. Além disso, a utilização de OPA como agente derivatizante apresenta diversas vantagens, dentre elas a rapidez da reação que otimiza o tempo de análise e a baixa toxicidade de OPA quando comparado a outros agentes derivatizantes (Shah *et al.*, 1999; Dawson *et al.*, 2004; Clarke *et al.*, 2007).

A reprodutibilidade da análise cromatográfica é alta, pois tanto para GABA quanto para glutamato as variações intra-dia e inter-dia são pequenas. Além disso, a alta acurácia obtida nos ensaios de recuperação ($99,6 \pm 2,3\%$ e $101,9 \pm 1,8\%$ para GABA e glutamato, respectivamente) indica que o método pode ser usado para análises quantitativas de tecidos cerebrais de ratos. Os valores de reprodutibilidade e acurácia do método estão de acordo com estudos cromatográficos prévios para determinação de GABA e glutamato (Shah *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2005; Devall *et al.*, 2007).

As concentrações de glutamato e GABA determinadas no tálamo, hipocampo e córtex pré-frontal através do método por nós descrito são maiores que os valores previamente publicados na literatura (Liu *et al.*, 2003; Jin *et al.*, 2005). Uma explicação para esta diferença pode estar no processamento das amostras. No presente estudo, a solução de homogeneização utilizada (metanol:água - 85:15 v/v) apresenta constante dielétrica menor que os tampões descritos por outros autores para homogeneizar tecidos cerebrais. Deste modo, é possível que a baixa constante dielétrica do meio dificulte a ionização das moléculas de GABA e glutamato, aumentando a solubilidade dessas substâncias no meio, resultando em um procedimento de extração mais eficiente. Outra possibilidade a ser considerada é a maior apolaridade da solução de homogeneização com metanol em relação às soluções utilizadas por outros autores. Uma solução mais apolar poderia facilitar a solubilização das membranas biológicas propiciando maior liberação dos aminoácidos no sobrenadante.

A análise cromatográfica descrita para a dosagem de GABA e glutamato em amostras de tecido cerebral mostra-se vantajosa em relação aos métodos anteriormente publicados, pois utilizando fase móvel isocrática, separa com alta resolução os dois aminoácidos em uma única corrida e com um tempo de eluição inferior a 9 minutos. Além disso, o processamento das amostras cerebrais é mais eficiente que os anteriormente descritos, pois níveis relativamente altos, comparados àqueles obtidos por outros autores, de GABA e glutamato foram detectados nos três tecidos cerebrais analisados.

Restrição de tiamina durante a Lactação ou o período peri-natal (Partes I e II)

A primeira avaliação realizada nas proles foi a aferição semanal do peso corporal. Como mencionado anteriormente, a restrição de tiamina durante a lactação foi o primeiro modelo experimental estabelecido, nesse estudo, com sucesso. Devido às dificuldades enfrentadas inicialmente para se estabelecer o modelo de deficiência de tiamina peri-natal, quando grande parte dos recém-nascidos não sobreviveu, decidiu-se re-iniciar os experimentos após algumas alterações no método. Uma dessas alterações foi tentar manipular o mínimo possível os ratos provenientes de mães restritas e controles e apenas iniciar as avaliações na fase adulta. Portanto, dando um tempo maior para recuperação dos animais provenientes das mães restritas antes de submetê-los aos testes. Por este motivo, no primeiro

delineamento experimental, as aferições de peso nos ratos adultos foram realizadas a partir da quarta semana de vida. Quando as condições experimentais para a obtenção das proles já estavam bem estabelecidas, foram realizadas as avaliações na fase jovem. Nesses animais a aferição do peso corporal (manipulação dos animais) foi iniciada na primeira semana de vida.

A restrição de tiamina durante a lactação significativamente prejudicou o ganho de peso corporal das proles, tanto em fases iniciais quanto posteriores da vida. Durante o desenvolvimento, todos os animais ganham peso, entretanto ratos provenientes de mães restritas apresentam o peso reduzido em relação aos ratos provenientes de mães controles, corroborando o importante papel da tiamina no metabolismo energético celular (Berg *et al.*, 2004).

Embora a restrição de tiamina durante a lactação tenha afetado o peso corporal de ratos jovens e adultos, uma redução significativa no peso encefálico (exceto cerebelo) foi detectada somente nos ratos mais velhos. Uma das possíveis explicações para este achado pode ser a manipulação diferencial dos filhotes. Dados da literatura sugerem que o manuseio pós-natal, definido como uma curta separação maternal durante o período da lactação (Chapillon *et al.*, 2002), pode induzir efeitos positivos na prole como aumento do comportamento exploratório (Nunez *et al.*, 1995) e ganho de peso corporal (Van de Weerd *et al.*, 1997). No presente trabalho os ratos jovens foram manipulados para a pesagem a partir da primeira semana de vida, enquanto os ratos adultos foram manuseados somente após um mês. Deste modo, é possível que os ratos jovens por serem mais estimulados apresentassem um comportamento mais ativo, com maior atividade exploratória e em consequência maior acesso ao leite. Por outro lado, conforme detalhado abaixo, esses animais jovens diferentemente dos adultos, apresentaram déficit no aprendizado espacial. Assim, outra possibilidade para explicar os resultados encontrados é que a diferença entre as médias dos pesos dos animais dos dois grupos poderia aumentar gradativamente ao longo do tempo, sendo apenas possível detectar uma diferença significativa em fases posteriores da vida, onde a variação seria maior. É importante ressaltar que quando o peso encefálico é expresso em relação ao peso corporal, o efeito da restrição de tiamina durante a lactação não é mais detectado nos ratos jovens e adultos. Todavia, nos ratos jovens, foi verificada uma diferença estatística de 6%, ou seja, uma tendência que a restrição de tiamina durante a lactação afete a relação entre peso encefálico e corporal nesses animais. Esses dados corroboram a importância da manutenção da relação entre peso encefálico e corporal para a execução das funções biológicas mesmo em estados de privação nutricional.

Durante o treino no Labirinto Aquático de Morris observou-se efeito significativo do tempo para os ratos jovens e adultos, indicando que ao longo das cinco sessões ambos os grupos são capazes de aprender a tarefa espacial (localização da plataforma submersa). Entretanto, a restrição de tiamina durante a lactação ocasionou déficit cognitivo detectável somente no desempenho dos ratos jovens, que foram capazes de aprender a tarefa espacial, mas de uma forma mais lenta do que os animais controles. Efeitos similares na aquisição da informação espacial no LAM foram anteriormente descritos pelo nosso grupo de pesquisa quando a deficiência de tiamina foi feita em ratos adultos (Carvalho *et al.*, 2006; Vigil *et al.*, 2010). Além disso, Schneider & Koch (2005) utilizando outro tipo de modelo experimental, lesão cerebral com ácido ibotênico, encontraram resultados semelhantes aos nossos, pois observaram que um insulto cerebral no córtex pré-frontal durante a lactação induziu alteração no comportamento de inibição de pré-pulso (PPI) em ratos jovens, mas não em ratos adultos.

A restrição de tiamina durante a lactação não afetou a velocidade de nado dos ratos jovens e nem dos ratos adultos, sugerindo que o déficit de aprendizado observado nos primeiros deve-se a um prejuízo cognitivo e não a um problema motor. Esta conclusão é corroborada pelo fato de que a velocidade de nado é similar para ambos os grupos. Além disso, a velocidade de nado dos ratos jovens e dos adultos foi significativamente reduzida ao longo das sessões. Uma possível explicação para este fato é que no começo do treino o ambiente é novo e os animais, por não saberem a localização da plataforma, nadam mais rápido e em todas as direções, demonstrando um típico comportamento exploratório. À medida que os ratos aprendem a tarefa, a velocidade de nado diminui, favorecendo uma busca mais minuciosa para encontrar o alvo com precisão.

A memória espacial de referência dos ratos jovens e adultos avaliada no primeiro minuto do teste comprobatório não foi afetada pela restrição de tiamina durante a lactação. Uma vez que os ratos provenientes de mães restritas de ambos os experimentos (jovens ou adultos) apresentaram desempenho similar na última sessão do treino, este resultado não é inesperado. Além disso, Baydas e cols. (2007) ao induzirem uma hiperhomocisteinemia materna crônica e avaliar o aprendizado e a memória espacial da prole no LAM também observaram que um insulto materno foi capaz de ocasionar déficit no aprendizado da prole, sem, entretanto alterar a memória espacial.

De acordo com Schutz e cols. (2004), sessões no Labirinto Aquático de Morris sem o reforço (plataforma submersa) podem induzir um comportamento de imobilidade, refletindo

um estado de desamparo, com baixa motivação e fadiga. Seguindo esta hipótese, um aumento da mobilidade poderia ser interpretado como maior atividade motora e/ou motivação do animal. No presente trabalho a velocidade de nado e conseqüentemente a distância total percorrida durante o primeiro minuto do teste comprobatório foram significativamente aumentadas pela restrição maternal de tiamina nos ratos jovens. Este achado sugere que os animais jovens, comparado aos adultos poderiam apresentar um ou mais dos seguintes sinais: 1) uma maior motivação; 2) uma maior atividade motora; 3) uma maior alteração emocional (p.ex. medo) perante o estímulo aversivo na ausência do reforço.

Ainda com relação ao teste comprobatório, a restrição de tiamina durante a lactação não alterou o índice de extinção dos ratos jovens e adultos, ou seja, os ratos de todos os grupos foram capazes de extinguir o comportamento permanecendo menos tempo no quadrante alvo durante o segundo minuto do teste. O tempo de 120 segundos do teste comprobatório têm sido frequentemente adotado pelo nosso grupo de pesquisa (Pires *et al.*, 2005; Carvalho *et al.*, 2006; Oliveira-Silva *et al.*, 2007) e por outros autores (Bussey *et al.*, 1999; McKay *et al.*, 2002; Schutz *et al.*, 2004) para se avaliar a memória espacial (primeiro minuto) e o índice de extinção (segundo/ primeiro minuto). Apesar de os ratos permanecerem na piscina o dobro do tempo (120 segundos) em relação às tentativas (60 segundos) durante o treino, os animais não mostraram nenhum sinal de fadiga ou imobilidade no segundo minuto do teste comprobatório. A ausência de diferença significativa entre a velocidade de nado no primeiro e segundo minutos corrobora esta afirmação.

Após o teste comprobatório os animais foram treinados durante cinco dias com a plataforma alternada diariamente. No sexto dia, a memória espacial de trabalho foi avaliada. A restrição de tiamina durante a lactação não afetou a latência, a distância total percorrida ou a velocidade de nado dos ratos jovens e adultos durante o teste da memória de trabalho. Em estudo prévio, Mumby e cols. (1999) observaram que a deficiência de tiamina realizada em animais adultos induz déficit na memória de trabalho. Deste modo, é possível que a mesma injúria - deficiência de tiamina – tenha efeitos diversos sobre a memória de trabalho quando é realizada em períodos distintos – fase adulta ou deficiência maternal.

Os níveis de glutamato e GABA do tálamo, hipocampo e córtex pré-frontal não foram alterados pela restrição de tiamina durante a lactação quando a avaliação foi realizada nos animais jovens. Entretanto, nos ratos adultos provenientes de mães restritas foi verificada redução significativa na concentração de glutamato em todas as regiões analisadas e de

GABA no tálamo. Ratos jovens apresentam prejuízo cognitivo e ausência de alteração nas concentrações de glutamato e GABA. Já os ratos adultos, surpreendentemente, apresentam o desempenho cognitivo intacto, porém redução na concentração de glutamato em todas as regiões analisadas e de GABA no tálamo. Desses resultados experimentais levantamos três hipóteses:

i) os níveis de glutamato e GABA nas regiões avaliadas provavelmente não estão diretamente envolvidos nos aspectos cognitivos espaciais estudados neste trabalho. A ausência de correlação linear significativa nas análises de regressão entre as concentrações de glutamato e GABA nas três regiões cerebrais analisadas e o desempenho nas sessões 2 e 3 do treino de ratos jovens corrobora esta hipótese;

ii) os papéis de glutamato e GABA podem ser modulatórios, ou seja, nos animais jovens, após um período de insulto (restrição de tiamina), o déficit cognitivo está presente, devido provavelmente a uma disfunção primária em outro circuito neuroquímico. No entanto, ao longo do processo de desenvolvimento, poderia ocorrer um re-equilíbrio da rede (neuroplasticidade) e os circuitos modulatórios se ajustariam de tal forma a re-estabelecer o funcionamento de outros circuitos básicos. Assim, nos animais adultos provenientes de mães restritas os sistemas glutamatérgico e GABAérgico teriam, ao longo do tempo, se ajustado e, o prejuízo cognitivo não seria mais detectável;

iii) os estímulos provenientes da manipulação dos animais jovens, durante os procedimentos de pesagem desde as primeiras semanas de vida desses animais, poderiam ter funcionado como um efeito positivo compensatório, contrapondo e impedindo as alterações nos níveis de glutamato e GABA induzidos pela restrição maternal de tiamina durante a lactação. Como os animais avaliados na fase adulta não foram submetidos a esses estímulos, não tiveram o fator compensatório e, portanto, apresentaram alterações significativas nas concentrações de glutamato e GABA.

Diversos sistemas de neurotransmissão além de GABA e glutamato estão envolvidos em aprendizado e memória espacial, entre eles acetilcolina, serotonina, noradrenalina e dopamina, sendo este último, considerado por Myhrer (2003), o mais crítico para a aquisição e manutenção do comportamento. Aferências glutamatérgicas do hipocampo, tálamo e córtex pré-frontal modulam o importante circuito dopaminérgico existente entre área tegumentar ventral (VTA) e núcleo accumbens (Nac) (Mora *et al.*, 2008; Del Arco & Mora, 2008). Além disso, aferências dopaminérgicas partindo do VTA projetam-se para essas áreas

anteriormente referidas – hipocampo, tálamo e córtex pré-frontal (Gurden *et al.*, 1999). A diminuição nos níveis de glutamato observada no presente estudo poderia estar associada a um déficit na atividade do sistema glutamatérgico nos animais adultos provenientes de mães submetidas à restrição de tiamina. Isto poderia ocasionar diminuição do *output* glutamatérgico para o circuito VTA e Nac, culminando no aumento da liberação de dopamina local e em consequência, um aumento do *output* dopaminérgico para tálamo, hipocampo e CPF. O aumento dos níveis de dopamina nestas áreas cerebrais pode ser pelo menos em parte, responsável pela ausência de déficit cognitivo observado nos animais adultos. O fato de o sistema dopaminérgico ser afetado pela deficiência de tiamina (Nakagawasai *et al.*, 2007b) e a utilização de antagonistas para receptores dopaminérgicos D1 e D2 localizados no CPF prejudicar o aprendizado espacial (Rinaldi *et al.*, 2007) corroboram o provável envolvimento da dopamina nas alterações comportamentais e glutamatérgicas detectadas no presente trabalho. Todavia, é importante ressaltar que outros neurotransmissores, além da dopamina, podem estar envolvidos e que provavelmente a interação coordenada dos diversos sistemas seja responsável pela manifestação das disfunções cognitivas observadas. Deste modo, investigações futuras são necessárias para esclarecer quais os sistemas de neurotransmissão modulados por glutamato e GABA são primariamente afetados pela restrição maternal de tiamina e associados aos prejuízos cognitivos observados.

Em síntese, na primeira parte do presente trabalho, verificou-se pela primeira vez que a restrição de tiamina durante a lactação induz déficit no aprendizado espacial e alteração nos níveis cerebrais de glutamato e GABA da prole. Surpreendentemente, o prejuízo cognitivo induzido pela restrição de tiamina é observado em fases iniciais da vida (juventude), porém não mais detectável nos ratos adultos. Por outro lado, os níveis de GABA no tálamo e de glutamato em todas as regiões cerebrais analisadas foram significativamente diminuídos nos ratos adultos, não sendo observada alteração nos ratos jovens. Além das hipóteses descritas acima, esses resultados sugerem que um ajuste neurobiológico, devido à plasticidade do SNC, possa ter ocorrido a fim de compensar os insultos recebidos durante fases iniciais do desenvolvimento (lactação).

Quando a restrição de tiamina foi realizada no período peri-natal, o peso corporal dos ratos jovens e adultos foi aferido semanalmente a partir do sétimo dia de vida, totalizando seis e doze medidas, respectivamente. Todos os animais ganharam peso e diferentemente do observado no delineamento da restrição durante a lactação que afetou o ganho de peso

corporal nas duas fases, jovens e adultos; a restrição perinatal teve efeito sobre esse parâmetro apenas na fase jovem. Os pesos encefálicos (exceto cerebelo) dos ratos jovens e adultos também não foram alterados pela restrição peri-natal de tiamina. Entretanto, quando o peso encefálico foi expresso em relação ao peso corporal observou-se efeito significativo da restrição somente nos ratos jovens. Como anteriormente mencionado, essa relação entre os pesos pode representar a forma mais adequada de expressão desses dados. E, nesse caso, uma vez que os ratos adultos tiveram um tempo de recuperação pós-tratamento maior que os ratos jovens, é possível que com o passar do tempo ajustes metabólicos no organismo, nos níveis corporal e encefálico, tenham ocorrido e os efeitos da restrição peri-natal não sejam detectados em fases posteriores da vida. Considerando os efeitos da restrição sobre esse aspecto, que expressa a relação entre os pesos, pode-se inferir que a restrição peri-natal parece ser mais prejudicial do que a restrição durante a lactação. Além disso, esses dados indicam que a mesma injúria – restrição maternal de tiamina – realizada em períodos distintos – lactação ou período peri-natal - pode provocar efeitos diferentes sobre aspectos do desenvolvimento do organismo.

Ao longo das sessões de treino no Labirinto Aquático de Morris, ratos jovens e adultos foram capazes de aprender a tarefa espacial, porém a aprendizagem dos primeiros foi significativamente afetada pela restrição peri-natal de tiamina. Ainda com relação ao treino, apesar da velocidade de nado diminuir significativamente ao longo das sessões para os ratos jovens e adultos, a restrição não afetou a velocidade de nado dos animais de nenhum dos grupos, indicando que o déficit observado nos ratos jovens deve-se a um prejuízo no aprendizado espacial e não a uma alteração motora.

A memória espacial de referência dos ratos jovens e adultos avaliada no primeiro minuto do teste comprobatório não foi afetada pela restrição peri-natal de tiamina. Entretanto, a velocidade de nado e consequentemente a distância total percorrida foram significativamente aumentadas pela restrição somente nos ratos jovens, sugerindo que esses animais apresentam maior atividade e/ou motivação quando comparados aos ratos adultos. Ainda com relação ao teste comprobatório, os animais de todos os grupos foram capazes de extinguir o comportamento, e a restrição de tiamina durante o período peri-natal não alterou o índice de extinção dos ratos jovens e adultos.

A memória espacial de trabalho avaliada após cinco sessões de treino com a plataforma alternada diariamente também não foi afetada pela restrição de tiamina no período peri-natal,

tanto nos ratos jovens quanto nos adultos. Desta forma, surpreendentemente, a restrição maternal de tiamina realizada no período peri-natal (Parte II) e na lactação (Parte I) afetou os aspectos dos processos de aprendizagem e memória espacial, dos ratos jovens e adultos, de maneira similar.

A restrição de tiamina no período peri-natal, diferentemente da restrição durante a lactação, não alterou os níveis de glutamato e GABA no tálamo, hipocampo e córtex pré-frontal dos ratos jovens e adultos. Corroborando a primeira hipótese levantada na parte I deste trabalho, é plausível propor que os níveis de glutamato e GABA das regiões estudadas não estejam diretamente envolvidos nos aspectos comportamentais avaliados. A ausência de correlação linear significativa entre glutamato ou GABA nas três regiões cerebrais analisadas e o desempenho dos ratos jovens durante o treino suporta esta proposição. No entanto, estudos futuros mais detalhados, como por exemplo, determinações das concentrações liberadas desses neurotransmissores em condições normais e despolarizadas, devem ser realizados para esclarecer melhor essa questão. Como os níveis de glutamato e GABA das regiões cerebrais estudadas não estão alterados nos ratos adultos é possível que ajustes neurobiológicos em outros sistemas de neurotransmissão como, por exemplo, acetilcolina, serotonina ou dopamina tenham acontecido para restaurar a função comportamental prejudicada nos ratos jovens. Assim, nos animais adultos, após a ocorrência de ajustes neurobiológicos ao longo do desenvolvimento, o prejuízo cognitivo não seria mais detectável.

Destacamos que foram observadas as seguintes correlações significativas, para os dados obtidos a partir dos estudos com os animais jovens ou adultos provenientes de mães controles e restritas em tiamina durante o período peri-natal, respectivamente: (i) entre as concentrações de glutamato (tálamo ou CPF) e desempenho dos animais no teste da memória de trabalho e, (ii) entre concentrações de GABA no tálamo e Índice de Extinção. Considerando que nesses grupos de animais os efeitos da restrição não foram significativos sobre os níveis desses aminoácidos, pode-se sugerir que as relações observadas indicam um possível envolvimento desses neurotransmissores, em condições fisiológicas, nos aspectos comportamentais avaliados. De acordo com essa proposição era de se esperar uma correlação significativa entre esses mesmos parâmetros comportamentais e bioquímicos obtidos nos estudos com os animais jovens, restritos em tiamina durante a lactação. No entanto, essas correlações não foram significativas. No presente momento, não somos capazes de explicar essa aparente discrepância. Uma possibilidade é que a hipótese acima levantada para explicar as correlações significativas encontradas não seja procedente.

Uma questão a ser levantada é: porque no caso da restrição durante a lactação um possível ajuste neuroquímico resultaria na alteração dos níveis de glutamato e GABA e na restrição peri-natal não? Uma possibilidade é que a restrição durante a lactação interfira na composição de outros componentes do leite relacionados à manutenção dos níveis normais de GABA e glutamato nessas regiões cerebrais. É importante ressaltar que as mudanças bioquímicas e comportamentais observadas no presente estudo foram ocasionadas pelo consumo de ração contendo 10% de tiamina em relação ao nível padrão. Quantidade semelhante de tiamina na ração foi anteriormente adotada por Trostler e Sklan (1977) para estudar a composição do leite e a transferência de B1 durante a amamentação. Neste trabalho observou-se que ratas alimentadas com ração contendo 10% de tiamina apresentaram redução significativa na transferência desta vitamina durante a lactação, além de alteração nas concentrações de lipídeos totais e lactose do leite.

Embora os estudos sobre os efeitos da restrição de tiamina durante a lactação ou durante o período peri-natal tenham sido independentes, uma observação preliminar dos resultados referentes aos efeitos desses tratamentos sobre os parâmetros bioquímicos permite supor que a restrição maternal de tiamina durante a lactação (Parte I) parece ocasionar efeitos mais pronunciados na prole, que a restrição no período peri-natal (Parte II). Um estudo fatorial considerando, em um mesmo experimento, essas duas variáveis independentes e um controle do período de recuperação deve ser realizado no futuro. Todavia, apenas com o objetivo de instigar questões a serem testadas posteriormente, alguns pontos podem ser considerados com relação a uma possível diferença entre os efeitos da restrição durante a lactação e o período peri-natal:

i) a duração do episódio de restrição maternal de tiamina foi diferente nos dois delineamentos experimentais. Quando a restrição foi realizada durante a lactação, as mães receberam ração restrita durante todo o período de lactação (30 dias). Porém, as mães submetidas à restrição de tiamina durante o período peri-natal foram alimentadas com ração restrita do 11º dia de gestação ao 5º de lactação totalizando 16 dias. A realização de experimentos cuja duração do episódio de restrição seja semelhante nas duas abordagens (lactação e período peri-natal) pode testar esta hipótese.

ii) o intervalo temporal entre o episódio de restrição de tiamina e as avaliações bioquímicas é diferente nas duas abordagens experimentais. Quando a restrição de tiamina foi feita durante a lactação, os ratos jovens e adultos foram sacrificados para obtenção das amostras - avaliações

das concentrações de glutamato e GABA - com 45 e 90 dias de idade, ou seja, após 15 e 60 dias de recuperação, respectivamente. Por outro lado, quando a restrição de tiamina foi feita no período peri-natal os ratos jovens e adultos foram submetidos às avaliações bioquímicas com a mesma idade, mas o período de recuperação foi de 41 e 86 dias, respectivamente. Desta forma é possível que as alterações causadas pelo tratamento no período peri-natal sejam menos graves devido ao maior período de recuperação. Por outro lado, considerando essa perspectiva, pode-se inferir que os efeitos da restrição peri-natal sobre o processo de aprendizagem espacial se manteve mesmo depois de um maior período de recuperação. Não sabemos se um período similar de recuperação poderia ser ou não suficiente para reverter os efeitos provocados pela restrição durante a lactação. Estudos futuros complementares serão necessários para responder essa questão.

iii) drástico efeito da lactação no metabolismo de carboidratos e lipídeos. Conforme mencionado acima, de acordo com Trostler e Sklan (1977) uma concentração de 10% de tiamina na ração restrita comparada à ração controle, o mesmo índice de restrição adotado no presente trabalho, foi capaz de reduzir significativamente a transferência de tiamina durante a lactação, além de alterar as concentrações de lipídeos totais e lactose do leite. Assim, quando a restrição de tiamina foi realizada no período peri-natal a reversão da dieta aconteceu no quinto dia de lactação e as mães continuaram com os filhotes até o trigésimo dia de vida. Deste modo, é provável que a prole submetida à restrição no período peri-natal tenha tido acesso ao leite com os níveis normais de tiamina, lipídeos e carboidratos. Por outro lado, quando a restrição de tiamina foi realizada na lactação, durante os 30 dias de amamentação os filhotes tiveram acesso ao leite alterado. Somente após o desmame os ratos ingeriram os níveis recomendados de tiamina ao consumirem ração padrão. Dosagens dos constituintes do leite, obtido nessas condições experimentais, serão necessárias para responder essa questão.

Considerações finais

O presente trabalho apresenta os dados sobre os efeitos da restrição maternal de tiamina durante a lactação ou período peri-natal sobre o aprendizado/memória espacial das proles. Em um trabalho do nosso grupo de pesquisa recentemente submetido à revista científica *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* (**Anexo cópia do manuscrito**), Ferreira-Vieira e cols. observaram que a restrição de tiamina durante o período peri-natal

também induz déficits motores detectáveis na fase adulta das proles. Ratos com aproximadamente 4 meses de idade e provenientes de mães controles e restritas foram submetidos aos testes de *rotarod* e impressão de patas para análise dos seguintes aspectos comportamentais motores: equilíbrio, largura e comprimento dos passos. A restrição de tiamina durante o período peri-natal reduziu significativamente o tempo de permanência dos animais no *rotarod*, além de aumentar a largura do passo. Esses dados indicam que o tratamento afetou o equilíbrio dos animais e, possivelmente, o alargamento dos passos ocorreu como um mecanismo compensatório para restabelecer a função prejudicada. A restrição de tiamina no período peri-natal também alterou a concentração de glutamato no cerebelo e de GABA no tálamo desses animais. É importante ressaltar que outros comportamentos podem ser afetados pela restrição maternal de tiamina e que, portanto, este modelo experimental poderá contribuir através da realização de estudos futuros, para o entendimento de mecanismos e possíveis correlações entre aspectos neurobiológicos e comportamentais.

O comportamento maternal representado principalmente por *licking/grooming* é a maior fonte de estimulação tátil para o desenvolvimento dos filhotes e pode ocasionar alterações comportamentais e bioquímicas na prole. Essas alterações incluem respostas neuroendócrinas ao estresse (Liu *et al.*, 1997), desenvolvimento hipocampal e sinaptogênese melhorando o aprendizado e a memória espacial (Liu *et al.*, 2000) e sobrevivência neuronal (Bredy *et al.*, 2003). Até onde se sabe nenhum estudo avaliou os efeitos da deficiência ou restrição de tiamina no cuidado maternal e a consequente interferência no comportamento e em funções de sistemas neurobiológicos da prole. Contudo, tendo em vista que a deficiência de B1 em ratos adultos ocasiona alterações comportamentais (Mumby *et al.*, 1999; Langlais & Savage, 1995; Pires *et al.*, 2005; Carvalho *et al.*, 2006), não se pode descartar a hipótese de que o cuidado com a prole esteja alterado nas mães submetidas à restrição de tiamina. No presente trabalho, observações clínicas do comportamento das mães não indicaram diferenças entre ratas controles e restritas. Entretanto, estudos futuros quantitativos são necessários para esclarecer se a restrição maternal de tiamina é capaz de alterar o cuidado das mães e contribuir para as alterações comportamentais e bioquímicas observadas na prole. Portanto, é importante ressaltar que estudos futuros devem ser delineados no sentido de responder uma relevante questão sobre os efeitos comportamentais e bioquímicos apresentados pelos animais da prole provenientes de mães restritas e descritos no presente estudo. Seriam as alterações no processo de aprendizagem e/ou níveis de glutamato e/ou

GABA devido: (i) a um efeito da restrição de tiamina na prole ou (ii) a um efeito de alteração do comportamento materno com a sua prole, ou (iii) ambos efeitos associados? A primeira possibilidade parece provável, pois, como já mencionado, outros autores verificaram que uma restrição de 90% de tiamina na ração de mães no período da lactação pode refletir nos níveis desta vitamina no leite (Trostler e Sklan, 1977). Projetos em andamento no LaNeC objetivam determinar os efeitos da restrição maternal de tiamina sobre as concentrações de constituintes do leite, incluindo tiamina. Outros dados da literatura apontam também em direção à primeira hipótese. Fournier & Butterworth, (1990) utilizando modelo de deficiência maternal de tiamina, durante a gestação, verificaram alterações na atividade de enzimas dependentes de tiamina no cérebro de animais da prole.

O fenômeno biológico denominado *programming* pode ser desencadeado quando um estímulo ou um insulto é provocado em um período crítico do desenvolvimento animal e ocasiona mudanças adaptativas anatômicas, fisiológicas, metabólicas e neuropsicológicas que podem persistir em períodos posteriores da vida (Godfrey & Barker, 2001). Dentre os mecanismos biológicos do *programming* podem-se destacar alterações na expressão gênica, na proliferação celular e na maquinaria epigenética.

Excesso de corticosterona (Nilsson *et al.*, 2002), estresse maternal (Lesage *et al.*, 2004; Matsumoto *et al.*, 2008), desnutrição maternal (Lesage *et al.*, 2002; Pérez *et al.*, 2010) e administração de álcool (Zhang *et al.*, 2005; Weinberg *et al.*, 2008; Kaminen-Ahola *et al.*, 2010) são algumas das condições que podem induzir o *programming*. As mudanças adaptativas ocasionadas por insultos durante diferentes fases do desenvolvimento já foram amplamente descritas em humanos (Godfrey & Barker, 2001; Bellingham-Young & Adamson-Macedo, 2003) e também em modelos experimentais (Nilsson *et al.*, 2002; Lesage *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2005; Weinberg *et al.*, 2008). Em trabalhos anteriores foi observado que a deficiência de tiamina durante fases precoces do desenvolvimento pode causar insultos cerebrais que culminam em alterações bioquímicas (Fournier & Butterworth, 1990) e histológicas (Bâ *et al.*, 1999; Bâ *et al.*, 2005) persistentes em épocas posteriores da vida.

No presente trabalho, a restrição maternal de tiamina realizada durante dois períodos distintos do desenvolvimento - lactação ou período peri-natal - foi capaz de induzir alterações comportamentais que persistem em épocas posteriores da vida da prole. Além disso, alterações bioquímicas induzidas pela restrição de tiamina durante a lactação são

diferencialmente detectadas quando as avaliações são realizadas nas fases jovem e adulta. Esses achados acumulam mais uma evidência de que a carência de tiamina durante fases iniciais do desenvolvimento possa ser um agente indutor de *programming*.

Os efeitos da restrição de tiamina durante a lactação e o período peri-natal corroboram o importante papel desta vitamina no desenvolvimento do cérebro e instigam a realização de uma série de experimentos futuros que possam contribuir para esclarecer o papel da tiamina no funcionamento cerebral e os ajustes que ocorrem durante a vida para compensar um insulto de deficiência maternal dessa vitamina.

Perspectivas

Durante o desenvolvimento do presente trabalho, além dos objetivos propostos no projeto inicial, levantamos outras questões baseadas nos resultados que foram sendo obtidos ao longo da execução do mesmo. Algumas dessas questões são apresentadas a seguir como perspectivas:

1. Avaliar parâmetros comportamentais (p.ex. cuidado com a prole e estado emocional) e neuroquímicos nas mães deficientes/restritas em tiamina durante a lactação e o período peri-natal;
2. Estudar os efeitos do período de recuperação nas alterações induzidas pela restrição de tiamina durante a lactação ou período peri-natal;
3. Avaliar os efeitos da deficiência/restrrição de tiamina, durante a lactação ou o período peri-natal sobre os constituintes do leite;
4. Avaliar nas proles os efeitos comportamentais e neuroquímicos de um episódio de deficiência total de tiamina durante a lactação ou o período peri-natal;
5. Avaliar outros parâmetros comportamentais nas proles submetidas à restrição maternal de tiamina, como por exemplo, estresse, ansiedade e medo;
6. Estudar com mais detalhes os circuitos glutamatérgico e GABAérgico para identificar quais etapas (por exemplo: síntese, recaptção ou liberação de neurotransmissores) estariam sendo alteradas pela restrição maternal de tiamina;
7. Determinar em regiões cerebrais das proles as concentrações de outros neurotransmissores (p.ex. dopamina), assim como as atividades dos processos de liberação desses neurotransmissores, que poderiam estar afetados pela deficiência/restrrição maternal de tiamina;
8. Realizar estudos morfométricos em regiões do cérebro das proles para verificar se existe lesões induzidas pela deficiência/restrrição maternal de tiamina.

Referências Bibliográficas

- Abel T, Lattal MK. Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. *Curr Opin Neurobiol*, 2001; 11: 180-187.
- Aberle NSII, Burd L, Zhao BH, Ren J. Acetaldehyde-induced cardiac contractile dysfunction may be alleviated by vitamin B1 but not vitamins B6 or B12. *Alcohol Alcohol*, 2004; 39: 450-454.
- Alcaide ML, Jayaweera D, Espinoza L, Kolber M. Wernicke's encephalopathy in AIDS: a preventable cause of fatal neurological deficit. *Int J STD AIDS*, 2003; 14(10): 712-713.
- Antzoulatos EG, Byrne JH. Learning insights transmitted by glutamate. *Trends Neurosci*, 2004; 27: 555-560.
- Arolfo MP, Brioni JD. Diazepam impairs place learning in the Morris water maze. *Behav Neural Biol*, 1991; 55: 131-136.
- Bâ A, N'Douba V, D'Almeida MA, Seri BV. Effects of the maternal thiamine deficiencies on the pyramidal and granule cells of the hippocampus of rat pups. *Acta Neurobiol Exp*, 2005; 65: 387-398.
- Bâ A, Seri BV, Aka KJ, Glin L, Tako A. Comparative effects of developmental thiamine deficiencies and ethanol exposure on the morphometry of the CA3 pyramidal cells. *Neurotoxicol Teratol*, 1999; 21: 579-586.
- Bâ A, Seri BV, Han SH. Thiamine administration during chronic alcohol intake in pregnant and lactating rats: effects on the offspring neurobehavioral development. *Alcohol Alcohol*, 1996; 31: 27-40.
- Bâ A. Metabolic and Structural Role of Thiamine in Nervous Tissues. *Cell Mol Neurobiol*, 2008; 28: 923-931.
- Baker H, DeAngelis B, Holland B, Gittens-Williams L, Barret T. Vitamin profile of 563 gravidas during trimesters of pregnancy. *J Am Coll Nutrition*, 2002; 21(1): 33-37.
- Batifoulier F, Verny MA, Chanliaud E, Rémésy C, Demigné C. Variability of B vitamin concentrations in wheat grain, milling fractions and bread products. *Eur J Agron*, 2006; 25: 163-169.
- Baydas G, Koz ST, Tuzcu M, Nedzvetsky VS, Etem E. Effects of maternal hyperhomocysteinemia induced by high methionine diet on the learning and memory performance in offspring. *Int J Dev Neurosci*, 2007; 25(3): 133-139.
- Bayer SA, Altman J. Neurogenesis and neuronal migration. In: Paxinos G, editor. The rat nervous system, 2rd edition. Academic Press, Sidney, 1995.
- Bellingham-Young DA, Adamson-Macedo EN. Foetal origins theory: links with adult depression and general self-efficacy. *Neuroendocrinol Lett*, 2003; 24(6): 412-416.
- Ben-Ari Y, Gaiarsa JL, Tyzio R, Khazipov R. GABA: A pioneer transmitter that excites immature neurons and generates primitive oscillations. *Physiol Rev*, 2007; 87: 1215-1284.

- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L Biochemistry 5rd edition, W. H. Freeman and Company: New York, 2004.
- Bikbaev A, Neyman S, Ngomba RT, Conn J, Nicoletti F, Manahan-Vaughan D. MGluR5 mediates the interaction between late-LTP, network activity and learning. *PLoS ONE*, 2008; 3(5): e2155.
- Boast C, Bartolomeo AC, Morris H, Moyer JA. 5HT antagonists attenuate MK801-impaired radial arm maze performance in rats. *Neurobiol Learn Mem*, 1999; 71: 259-271.
- Brambilla P, Perez J, Barale F, Schettini G, Soares JC. GABAergic dysfunction in mood disorders. *Mol Psychiatr*, 2003; 8: 721-737.
- Bredy TW, Grant RJ, Champagne DL, Meaney MJ. Maternal care influences neuronal survival in the hippocampus of the rat. *Eur J Neurosci*, 2003; 18(10): 2903-2909.
- Bussey TJ, Muir JL, Aggleton JP. Functionally dissociating aspects of event memory: the effects of combined perirhinal and postrhinal cortex lesions on object and place memory in the rat. *J Neurosci*, 1999; 19(1): 495-502.
- Buszaki G, Chrobak JJ. Temporal structure in spatially organized neuronal assemblies: a role for interneuronal networks. *Curr Opin Neurobiol*, 1995; 5: 504- 510.
- Butterworth RF, Hamel E, Landreville F, Barbeau A. Amino acid changes in thiamine-deficient encephalopathy: some implications for the pathogenesis of Friedreich's ataxia. *Can J Neurol Sci*, 1979; 6(2): 217-222.
- Butterworth RF. Effects of thiamine deficiency on brain metabolism: implications for the pathogenesis of the Wernicke-Korsakoff syndrome. *Alcohol Alcohol*, 1989; 24(4): 271-279.
- Butterworth RF. Thiamin deficiency and brain disorders. *Nutr Res Rev*, 2003; 16: 277-283
- Butterworth RF. Thiamin malnutrition and brain development. In: Basis and Clinical Aspects of Nutrition and Brain Development. *Curr Top Nutr Dis*, Alan R. Liss Inc, New York. 1987; 16: 287-304.
- Butterworth RF. Thiamine deficiency-related brain dysfunction in chronic liver failure. *Metab Brain Dis*, 2009; 24(1): 189-196.
- Calingasan NY, Park LC, Calo LL, Trifiletti RR, Gandy SE, Gibson GE. Induction of nitric oxide synthase and microglial responses precede selective cell death induced by chronic impairment of oxidative metabolism. *Am J Pathol*, 1998; 153 (2): 599-610.
- Carlson BB, Behrstock S, Tobin AJ, Salamone JD. Brain implantations of engineered GABA-releasing cells suppress tremor in an animal model of Parkinsonism. *Neuroscience*, 2003; 119: 927-932.
- Carvalho FM, Pereira SR, Pires RG, Ferraz VP, Romano-Silva MA, Oliveira-Silva IF, Ribeiro AM. Thiamine deficiency decreases glutamate uptake in the prefrontal cortex and

impairs spatial memory performance in a water maze test. *Pharmacol Biochem Behav*, 2006; 83: 481-489.

Chapillon P, Patin V, Roy V, Vincent A, Caston J. Effects of pre- and Postnatal stimulation on developmental, emotional, and cognitive aspects in rodents: a review. *Dev Psychobiol*, 2002; 41: 373-87.

Ciccia RM, Langlais PJ. 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*, 2000; 24: 622-634.

Clarke G, O'Mahony S, Malone G, Dinan TG. An isocratic high performance liquid chromatography method for the determination of GABA and glutamate in discrete regions of the rodent brain. *J Neurosci Meth*, 2007; 160(2): 223-230.

Cohen NJ. Preserved learning capacity in amnesia: evidence for multiple memory systems. In: Squire, L.R. E Butters, N. (Eds.) 1984. The neuropsychology of memory. New York, Guilford Press, p. 83-103.

Cooper RL, Goldman JM, Vanderbergh JG. Monitoring of the estrus cycle in the laboratory rodent by vaginal lavage. *Female Reprod Toxicol*, 1993; 3: 45-56.

Czerniecki J, Chanas G, Verlaet M, Bettendorff L, Makarchikov AF, Leprince P, Wins P, Grisar T, Lakaye B. Neuronal localization of the 25-kDa specific thiamine triphosphatase in rodent brain. *Neuroscience*, 2004; 125(4): 833-840.

Dawson LA, Organ AJ, Winter P, Lacroix LP, Shilliam CS, Heidbreder C, Shah AJ. Rapid high-throughput assay for the measurement of amino acids from microdialysates and brain tissue using monolithic C18-bonded reversed-phase columns. *J Chrom B*, 2004; 807(2): 235-241.

Del Arco A, Mora F. Prefrontal cortex–nucleus accumbens interaction: In vivo modulation by dopamine and glutamate in the prefrontal cortex. *Pharmacol Biochem Behav*, 2008; 90: 226-235.

Devall AJ, Blake R, Langman CGS, Richards DA, Whitehead KJ. Monolithic column-based reversed-phase liquid chromatography separation for amino acid assay in microdialysates and cerebral spinal fluid. *J Chrom B*, 2007; 848: 323-328.

Eichenbaum H, Cohen NJ. From conditioning to conscious recollection: Memory systems of the brain. Oxford Univ. Press, London; 2001.

Ferreira-Vieira TH, Freitas-Silva DM, Pereira SR, Ribeiro AM. Maternal thiamine restriction affects central GABA and glutamate concentrations and motor performances in adult rat offspring. Submitted to: Pharmacology, Biochemistry and Behavior.

Fitzgerald A, Aditya H, Prior A, McNeill E, Pentland B. Anoxic brain injury: Clinical patterns and functional outcomes. A study of 93 cases. *Brain Inj*, 2010 (Article in press).

- Floresco SB, Seamans JK, Phillips AG. Selective roles for hippocampal, prefrontal cortical and ventral striatal circuits in radial arm maze with or without a delay. *J Neurosci*, 1997; 17: 1880-1890.
- Foster AC, Kemp JA. Glutamate- and GABA-based CNS therapeutics. *Curr Opin Pharmacol*, 2006; 6: 7-17.
- Fournier H, Butterworth RF. Effects of thiamine deficiency on thiamine-dependent enzymes in regions of the brain of pregnant rats and their offspring. *Metab Brain Dis*, 1990; 5(2): 77-84.
- Freitas-Silva DM, Ferraz VP, Ribeiro AM. Improved high-performance liquid chromatographic method for GABA and glutamate determination in regions of the rodent brain. *J Neurosci Meth*, 2009; 177: 289-293.
- Freitas-Silva DM, Resende LS, Pereira SR, Franco GC, Ribeiro AM. Maternal thiamine restriction during lactation induces cognitive impairments and changes in glutamate and GABA concentrations in brain of rat offspring. *Behav Brain Res*, 2010; 211(1): 33-40.
- Freund TF, Buzsáki G. Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus*, 1996; 6: 347-470.
- Fuster JM. Frontal lobe and cognitive development. *J Neurocytol*, 2002; 31: 373-385.
- Getova DP, Dimitrova DD. Effects of GABAB receptor antagonists CGP63360, CGP76290A and CGP76291A on learning and memory processes in rodents. *C E J Med*, 2007; 2(3): 280-293.
- Gibson GE, Zhang H. Interactions of oxidative stress with thiamine homeostasis promote neurodegeneration. *Neurochem Int*, 2002; 40: 493-504.
- Godfrey KM, Barker DJP. Fetal programming and adult health. *Public Health Nutr*, 2001; 4(2B): 611-624.
- Goldberg DJ, Begenisich TB, Cooper JR. Effects of thiamine antagonists on nerve conduction. II. Voltage clamp experiments with antimetabolites. *J Neurobiol*, 2004; 6: 453-462.
- Gorji HM, Rashid-Pour A, Fathollahi Y. Effects of morphine dependence on the performance of rats in reference and working versions of the water maze. *Physiol Behav*, 2008; 93(3): 622-627.
- Gravius A, Pietraszek M, Dekundy A, Danysz W. Metabotropic glutamate receptors as therapeutic targets for cognitive disorders. *Curr Top Med Chem*, 2010; 10(2): 187-206.
- Greenwood C, Craig R. Dietary influences on brain function: Implications during periods of neuronal maturation. In: Basic and Clinical Aspects of Nutrition and Brain Development. *Curr Top Nutr Dis*, Alan R. Liss Inc, New York. 1987; 16: 159-216.
- Greenwood J, Pratt OE, Thomson AD. Thiamine, malnutrition and alcohol related damage to the central nervous system. In: Alcohol Nutrition and the Nervous System (Parvez S.; Burov,

Y.; Parvez, H.; Burns, E.; eds.). Progress in Alcohol Research, vol.1. VNU Science Press, Utrecht. 1985; 287-310.

Gurden H, Tassin JP, Jay TM. Integrity of the mesocortical dopaminergic system is necessary for complete expression of *in vivo* hippocampal–prefrontal cortex long-term potentiation. *Neuroscience*, 1999; 94(4): 1019-1027.

Haas RH. Thiamin and the brain. *Ann Ver Nutr*, 1988; 8: 483-515.

Hakim AM. The induction and reversibility of cerebral acidosis in thiamine deficiency. *Ann Neurol*, 1984; 16: 673-679.

Han ZS, Buhl EH, Lőrinczi Z, Somogyi P. A high degree of spatial selectivity in the axonal and dendritic domains of physiologically identified local-circuit neurons in the dentate gyrus of the rat hippocampus. *Eur J Neurosci*, 1993; 5: 395-410.

Harper C. The neuropathology of alcohol-related brain damage. *Alcohol Alcohol*, 2009; 44(2): 136-40.

Hazell AS, Butterworth RF, Hakim AM. Cerebral vulnerability is associated with selective increase in extracellular glutamate concentration in experimental thiamine deficiency. *J Neurochem*, 1993; 61: 1155-1158.

Hazell AS, Butterworth RF. Update of Cell Damage Mechanisms in Thiamine Deficiency: Focus on Oxidative Stress, Excitotoxicity and Inflammation. *Alcohol Alcohol*, 2009; 44(2): 141-147.

Hazell AS, McGahan L, Tetzlaff W, Bedard AM, Robertson GS, Nakabeppu Y, Hakim AM. Immediate-early gene expression in the brain of the thiamine-deficient rat. *J Neurosci Res*, 1998; 52: 742-749.

Honig WK. Studies of working memory in the pigeon. In: Cognitive processes in animal behavior. S. H. Hulse, H. Fowler, W. K. Honig (eds), Lawrence Erlbaum, Hillsdale, NJ. 1978.

Irle E, Markowitsch HJ. Widespread neuroanatomical damage and learning deficits following chronic alcohol consumption or vitamin B1 (thiamine) deficiency in rats. *Behav Brain Res*, 1983; 9: 277-294.

Jin CL, Yang LX, Wu XH, Li Q, Ding MP, Fan YY, Zhang WP, Luo JH, Chen Z. Effects of carnosine on amygdaloid-kindled seizures in Sprague-Dawley rats. *Neuroscience*, 2005; 135(3): 939-947.

Johnson D, Quarles RH. Deposition of the myelin-associated glycoprotein in specific regions of the developing rat central nervous system. *Dev Brain Res*, 1986; 28: 263-266.

Jones EG. GABAergic neurons and their role in cortical plasticity. *Cereb Cortex*, 1993; 3: 361-372.

- Kaminen-Ahola N, Ahola A, Maga M, Mallitt KA, Fahey P, Cox TC, Whitelaw E, Chong S. Maternal ethanol consumption alters the epigenotype and the phenotype of offspring in a mouse model. *PLoS Genet*, 2010; 6(1): e1000811, 1-10.
- Kandel RE, Schwartz JH, Jessel TM. Princípios de Neurociência. 4rd edição. Editora Manole, 2003.
- Kawakami Z, Ikarashi Y, Kase Y. Glycyrrhizin and its metabolite 18 beta-glycyrrhetic acid in glycyrrhiza, a constituent herb of yokukansan, ameliorate thiamine deficiency-induced dysfunction of glutamate transport in cultured rat cortical astrocytes. *Eur J Pharmacol*, 2010; 626(2-3): 154-158.
- Kesner RP, Hunt ME, Williams JM, Long JM. Prefrontal cortex and working memory for spatial response, spatial location and visual object information in the rat. *Cereb Cortex*, 1996; 6: 310-318.
- Kopelman MD, Thomson AD, Guerrini I, Marshall EJ. The Korsakoff syndrome: clinical aspects, psychology and treatment. *Alcohol Alcohol*, 2009; 44(2): 148-154.
- Krnjevic, K. Role of GABA in cerebral cortex. *Can J Physiol Pharm*, 1997; 75: 439-451.
- 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.
- Langlais PJ, Mandel RJ, Mair RG. Diencephalic lesions, learning impairments and intact retrograde memory following acute thiamine deficiency in the rat. *Behav Brain Res*, 1992; 48: 177-185.
- Langlais PJ, Savage LM. Thiamine deficiency in rats produces cognitive and memory deficits on spatial tasks that correlate with tissue loss in diencephalon, cortex and white matter. *Behav Brain Res*, 1995; 68: 75-89.
- Langlais PJ, Zhang SX, Savage LM. Neuropathology of thiamine deficiency: an update on the comparative analysis of human disorders and experimental models. *Metab Brain Dis*, 1996; 11: 19-37.
- Langlais PJ, Zhang SX. Cortical and subcortical white matter damage without Wernicke's encephalopathy after recovery from thiamine deficiency in the rat. *Alcohol Clin Exp Res*, 1997; 21: 434-443.
- Lee I, Kesner RP. Time-dependent relationship between the dorsal hippocampus and the prefrontal cortex in spatial memory. *J Neurosci*, 2003; 23: 1517-1523.
- Lesage J, Del-Favero F, Leonhardt M, Louvart H, Maccari S, Vieau D, Darnaudery M. Prenatal stress induces intrauterine growth restriction and programmes glucose intolerance and feeding behaviour disturbances in the aged rat. *J Endocrinol*, 2004; 181: 291-296.
- Lesage J, Hahn D, Leéonhardt M, Blondeau B, Dupouy JP. Maternal undernutrition during late gestation-induced intrauterine growth restriction in the rat is associated with impaired

placental GLUT3 expression, but does not correlate with endogenous corticosterone levels. *J Endocrinol*, 2002; 174: 37-43.

Liu D, Diorio J, Day JC, Francis DD, Meaney MJ. Maternal care, hippocampal synaptogenesis and cognitive development in rats. *Nat Neurosci*, 2000; 3(8): 799-806.

Liu D, Diorio J, Tannenbaum B, Caldji C, Francis D, Freedman A, Sharma S, Pearson D, Plotsky PM, Meaney MJ. Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science*, 1997; 277(5332): 1659-1662.

Liu Y, He HR, Ding JH, Gu B, Wang H, Hu G. Iptkalim inhibits cocaine challenge induced enhancement of dopamine levels in nucleus accumbens and striatum of rats by up-regulating Kir6.1 and Kir6.2 mRNA expression. *Acta Pharmacol Sin*, 2003; 24(6): 527-533.

Losa R, Sierra MI, Fernández A, Blanco D, Buesa JM. Determination of thiamine and its phosphorylated forms in human plasma, erythrocytes and urine by HPLC and fluorescence detection: a preliminary study on cancer patients. *J Pharmaceut Biomed*, 2005; 37: 1025-1029.

Lundqvist A, Grundström K, Samuelsson K, Rönnerberg J. Computerized training of working memory in a group of patients suffering from acquired brain injury. *Brain Inj*, 2010; 24(10): 1173-1183.

Lynch PLM, Young IS. Determination of thiamine by high-performance liquid chromatography. *J Chrom A*, 2000; 881: 267-284.

Mair RG, Otto TA, Knoth RL, Rabchenuk AS, Langlais PJ. Analysis of aversively conditioned learning and memory in rats recovered from pyriithiamine-induced thiamine deficiency. *Behav Neurosci*, 1991; 105: 351-359.

Makkar SR, Zhang SQ, Cranney J. Behavioral and neural analysis of GABA in the acquisition, consolidation, reconsolidation, and extinction of fear memory. *Neuropsychopharmacol*, 2010; 35(8): 1625-1652.

Martin PR, Singleton CK, Hiller-Sturmhöfel S. The Role of Thiamine Deficiency in Alcoholic Brain Disease. *Alcohol Res Health*, 2003; 27(2): 134-142.

Maruki K, Izaki Y, Hori K, Nomura M, Yamauchi T. Effects of rat ventral and dorsal hippocampus temporal inactivation on delayed alternation task. *Brain Res*, 2001; 895: 273-276.

Matsuhima, K.; Macmanus, P.; Hakim, A. M. Apoptosis is restricted to the thalamus in thiamine-deficient rats. *NeuroReport*. 1997; 8: 867-870.

Matsumoto M, Togashi H, Konno K, Koseki H, Hirata R, Izumi T, Yamaguchi T, Yoshioda M. Early postnatal stress alters the extinction of context-dependent conditioned fear in adult rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 2008; 89(3): 247-252.

McCormick DA, Wang Z, Huguenard J. Neurotransmitter control of neocortical neuronal activity and excitability. *Cereb Cortex*, 1993; 3: 387-398.

- McEown K, Treit D. Inactivation of the dorsal or ventral hippocampus with muscimol differentially affects fear and memory. *Brain Res*, 2010 (Article in press).
- McGee AW, Bredt DS. Assembly and plasticity of glutamatergic postsynaptic specialization. *Curr Opin Neurobiol*, 2003; 13: 111-118.
- McKay BE, Lado WE, Martin LJ, Galic MA, Fournier NM. Learning and memory in agmatine-treated rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 2002; 72(3): 551-557.
- McNally GP, Augustyn KA, Richardson R. GABA(A) receptors determine the temporal dynamics of memory retention. *Learn Memory*, 2008; 15(3): 106-111.
- McNamara RK, dePape GE, Skelton RW. Differential effects of benzodiazepine receptor agonists on hippocampal long-term potentiation and spatial learning in the Morris water maze. *Brain Res*, 1993; 62: 63-70.
- Mengerink Y, Kutlán D, Tóth F, Csámpai A, Molnár-Perl I. Advances in the evaluation of the stability and characteristics of the amino acid and amine derivatives obtained with the *o*-phthaldialdehyde / 3-mercaptopropionic acid and *o*-phthaldialdehyde / *N*-acetyl-L-cysteine reagents high-performance liquid chromatography-mass spectrometry study. *J Chrom A*, 2002; 949: 99-124.
- Miller MW. Maturation of rat visual cortex III. Postnatal morphogenesis and synaptogenesis of local circuit neurons. *Dev Brain Res*, 1986; 25: 271-285.
- Mora F, Segovia G, Del Arco A. Glutamate–dopamine–GABA interactions in the aging basal ganglia. *Brain Res Rev*, 2008; 58(2): 340-353.
- Morris RGM. Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learn Motiv*, 1981; 12(2): 239-260.
- Mott DD, Lewis DV. Facilitation of the induction of long-term potentiation by GABA receptors. *Science*, 1991; 252: 1718-1720.
- Mousseau DD, Rao VL, Butterworth RF. Alterations in serotonin parameters in brain on thiamine-deficient rats are evident prior to the appearance of neurological symptoms. *J Neurochem*, 1996; 67: 1113-1123.
- Mulholland P. Susceptibility of the cerebellum to thiamine deficiency. *Cerebellum*, 2006; 5:55-63.
- Mumby DG, Cameli L, Glenn MJ. Impaired allocentric spatial working memory and intact retrograde memory after thalamic damage caused by thiamine deficiency in rats. *Behav Neurosci*, 1999; 113: 42-50.
- Munujos P, Vendrell M, Ferrer I. Proto-oncogene *c-fos* induction in thiamine deficiency encephalopathy: Protective effects of nifedipine on pyriethamine induced lesions. *J Neurol Sci*, 1993; 118: 175-180.
- Myhrer T. Neurotransmitter systems involved in learning and memory in the rat: a meta-analysis based on studies of four behavioral tasks. *Brain Res Rev*, 2003; 41: 268-287.

Nacher J, Alonso-Llosa G, Rosell D, McEwen BS. NMDA receptor antagonist treatment increases the production of new neurons in the aged rat hippocampus. *Neurobiol Aging*, 2002; 5759: 1-12.

Nagahara AH, McGaugh JL. Muscimol infused into the medial septal area impairs long-term memory but not short-term memory in inhibitory avoidance, water maze place learning and rewarded alternation tasks. *Brain Res*, 1992; 591: 54-61.

Nakagawasai O, Murata A, Arai A, Ohbal A, Wakul K, Mitazakil S, Nijjima F, Tan-No K, Tadano T. Enhanced head-twitch response to 5-HT related agonists in thiamine deficient mice. *J Neural Transm*, 2007a; 114: 1003-1010.

Nakagawasai O, Yamadera F, Iwasaki K, Asao T, Tan-No K, Nijjima F, Arai H, Tadano T. Preventive effect of kami-untan-to on performance in the forced swimming test in thiamine-deficient mice: Relationship to functions of catecholaminergic neurons. *Behav Brain Res*, 2007b; 177(2): 315-321.

National Research Council, guide for the care and use of laboratory animals: a report of the institute of laboratory animal resources committee on care and use of laboratory animals. 1985.

Navarro D, Zwingmann C, Butterworth RF. Impaired oxidation of branched-chain amino acids in the medial thalamus of thiamine-deficient rats. *Metab Brain Dis*, 2008; 23: 445-455.

Neyman S, Manahan-Vaughan D. Metabotropic glutamate receptor 1 (mGluR1) and 5 (mGluR5) regulate late phases of LTP and LTD in the hippocampal CA1 region in vitro. *Eur J Neurosci*, 2008; 27(6): 1345-1352.

Nilsson C, Jennische E, Ho HP, Eriksson E, Björntorp P, Holmäng A. Increased insulin sensitivity and decreased body weight in female rats after postnatal corticosterone exposure. *Eur J Endocrinol*, 2002; 146: 847-854.

Nunez JF, Ferre P, Garcia E, Escorihuela RM, Fernandez-Teruel A, Tobena A. Postnatal handling reduces emotionality ratings and accelerates two-way active avoidance in female rats. *Physiol Behav*, 1995; 57: 831-835.

Nussbaum MA, Przedwiecki JE, Staerk DU, Lunte SM, Riley CM. Electrochemical characteristics of amino acids and peptides derivatized with naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde: pH effects and differences in oxidation potentials. *Anal Chem*, 1992; 64(11): 1259-1263.

Nutt DJ, Malizia AL. New insights into the role of the GABA (A)-benzodiazepine receptor in psychiatric disorder. *Br J Psychiatry*, 2001; 179: 390-396.

O'Keefe J, Nadel L. The hippocampus as a cognitive map. Oxford Univ. Press, London; 1978.

Ochalski PG, Fellows-Mayle W, Hsieh LB, Srinivas R, Okonkwo DO, Dixon CE, Adelson PD. Flumazenil administration attenuates cognitive impairment in immature rats after controlled cortical impact. *J Neurotraum*, 2010; 27(3): 647-651.

Oliveira FA, Galan DT, Ribeiro AM, Santos Cruz J. Thiamine deficiency during pregnancy leads to cerebellar neuronal death in rat offspring: Role of voltage-dependent K⁺ channels. *Brain Res*, 2007; 1134(1): 79-86.

Oliveira L, Graeff FG, Pereira SR, Oliveira-Silva IF, Franco GC, Ribeiro AM. Correlations among central serotonergic parameters and age-related emotional and cognitive changes assessed through the elevated T-maze and the Morris water maze. *Age*, 2010; 32 (2):187-196.

Oliveira-Silva IF, Pinto L, Pereira SRC, Ferraz VP, Barbosa AJA, Coelho VAA, Gualberto FFAS, Souza VF, Faleiro RRM, Franco GC, Ribeiro AM. Age-related deficit in behavioural extinction is counteracted by long-term ethanol consumption: Correlation between 5-HIAA/5HT ratio in dorsal raphe nucleus and cognitive parameters. *Behav Brain Res*, 2007; 180: 226-234.

Olton DS. Mazes, maps and memory. *Am Psychol*, 1979; 34: 583-596.

Olton DS, Becker JT, Handelmann GE. Hippocampus, space and memory. *Behav Brain Sci*, 1979; 2: 313-365.

Pannunzio P, Hazell AS, Pannunzio M, Rao KV, Butterworth RF. 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's encephalopathy. *J Neurosci Res*, 2000; 62: 286-292.

Park LCH, Calingasan KU, Zhang H, Gibson GE. Metabolic impairment elicits brain cell type-selective changes in oxidative stress and cell death in culture. *J Neurochem*, 2000; 74: 114-124.

Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 5th edition. London: Academy Press; 2004.

Pérez H, Soto-Moyano R, Ruiz S, Hernández A, Sierralta W, Olivares R, Núñez H, Flores O, Morgan C, Valladares L, Gatica A, Flores FJ. A putative role for hypothalamic glucocorticoid receptors in hypertension induced by prenatal undernutrition in the rat. *Neurosci Lett*, 2010 (Article in press).

Peterson LR, Peterson M. J. Short-term retention of individual verbal items. *J Exp Psychol*, 1959; 58: 193-198.

Pinto LSNM, Gualberto FAS, Pereira SRC, Barros PA, Franco GC, Ribeiro AM. Dietary restriction protects against chronic-ethanol-induced changes in exploratory behavior in Wistar rats. *Brain Res*, 2006; 1078: 171-181.

Pires RG, Pereira SR, Oliveira-Silva IF, Franco GC, Ribeiro AM. Cholinergic parameters and the retrieval of learned and re-learned spatial information: a study using a model of Wernicke-Korsakoff syndrome. *Behav Brain Res*, 2005; 162 (1): 11-21.

Pires RGW, Pereira SRC, Pittella JEH, Franco GC, Ferreira CLM, Fernandez PA, Ribeiro A M. The contribution of mild thiamine deficiency and ethanol consumption to central cholinergic parameter dysfunction and rat's open-field performance impairment. *Pharmacol Biochem Behav*, 2001; 70: 227-235.

Pitkin S, Savage LM. Age-related vulnerability to diencephalic amnesia produced by thiamine deficiency: the role of time of insult. *Behav Brain Res*, 2004; 148: 93-105.

Ramakrishna T. Vitamins and brain development. *Physiol Res*, 1999; 48: 175-187.

Ramakrishnan U, Manjrekar R, Rivera J, Gonzales-Cassio T, Martorell R. Micronutrients and pregnancy outcome: A review of the literature. *Nutr Res*, 1999; 19: 103-159.

Ramirez DR, Buzzetti RA, Savage LM. The role of the GABA (A) agonist muscimol on memory performance: reward contingencies determine the nature of the deficit. *Neurobiol Learn Mem*, 2005; 84(3): 184-191.

Ribeiro AM, Pereira SRC. Animal models for evaluation of behavioral and molecular neurobiological changes with emphasis on spatial memory and cholinergic system impairments in chronic alcohol abuse. *Ciência e Cultura. J Braz Ass Advance Science*, 1998; 50(2/3): 183-195.

Riedel G, Platt B, Micheau J. Glutamate receptor function in learning and memory. *Behav Brain Res*, 2003; 140: 1-47.

Riedel G, Wetzel W, Reymann KG. Comparing the role of metabotropic glutamate receptors in long-term potentiation and in learning and memory. *Progr Neuropsychoph*, 1996; 20: 761-789.

Rinaldi A, Mandillo S, Oliverio A, Mele A. D1 and D2 receptor antagonist injections in the prefrontal cortex selectively impair spatial learning in mice. *Neuropsychopharmacol*, 2007; 32(2): 309-319.

Roecklein B, Levin SW, Comly M, Mukherjee AB. Intrauterine growth retardation induced by thiamine deficiency and pyriethamine during pregnancy in the rat. *Am J Obstet Gynecol*, 1985; 151: 455-460.

Roland JJ, Levinson M, Vetreno RP, Savage LM. Differential effects of systemic and intraseptal administration of the acetylcholinesterase inhibitor tacrine on the recovery of spatial behavior in an animal model of diencephalic amnesia. *Eur J Pharmacol*, 2010; 629(1-3): 31-39.

Roland JJ, Savage LM. The role of cholinergic and GABAergic medial septal/diagonal band cell populations in the emergence of diencephalic amnesia. *Neuroscience*, 2009; 160(1): 32-41.

- Rowley HL, Martin KF, Marsden CA. Determination of in vivo amino acid neurotransmitters by high-performance liquid chromatography with *o*-phthalaldehyde-sulphite derivatisation. *J Neurosci Meth*, 1995; 57(1):93-99.
- Salinska E, Stafiej A. Metabotropic glutamate receptors (mGluRs) are involved in early phase of memory formation: possible role of modulation of glutamate release. *Neurochem Int*, 2003; 43: 469-474.
- Santini E, Muller RU, Quirk GJ. Consolidation of extinction learning involves transfer from NMDA-independent to NMDA-dependent memory. *J Neurosci*, 2001; 21(22): 9009-9017.
- Savage LM, Chang Q, Gold PE. Diencephalic damage decreases hippocampal acetylcholine release during spontaneous alternation testing. *Learn Memory*, 2003; 10: 242-246.
- Savage LM, Pitkin SR, Knitowski, KM. Rats exposed to acute pyridoxamine-induced thiamine deficiency are more sensitive to the amnesic effects of scopolamine and MK-801: examination of working memory, response selection and reinforcement contingencies. *Behav Brain Res*, 1999; 104(1-2): 13-26.
- Savage LM, Roland J, Klintsova A. Selective septohippocampal- but not forebrain amygdalar-cholinergic dysfunction in diencephalic amnesia. *Brain Res*, 2007; 1139: 210-219.
- Schneider M, Koch M. Behavioral and morphological alterations following neonatal excitotoxic lesions of the medial prefrontal cortex in rats. *Exp Neurol*, 2005; 195(1): 185-198.
- Schulz D, Topic B, De Souza Silva MA, Huston JP. Extinction-induced immobility in the water maze and its neurochemical concomitants in aged and adult rats: a possible model for depression? *Neurobiol Learn Mem*, 2004; 82(2): 128-141.
- Shahidi S, Komaki A, Mahmoodi M, Lashgari R. The role of GABAergic transmission in the dentate gyrus on acquisition, consolidation and retrieval of an inhibitory avoidance learning and memory task in the rat. *Brain Res*, 2008; 1204: 87-93.
- Shah AJ, Crespi F, Heidbreder C. Amino acid neurotransmitters: separation approaches and diagnostic value. *J Chrom B*, 2002; 781(1-2): 151-163.
- Shah AJ, de Biasi V, Taylor SG, Roberts C, Hemmati P, Munton R, West A, Routledge C, Camilleri P. Development of a protocol for the automated analysis of amino acids in brain tissue samples and microdialysates. *J Chrom B Biomed Sci Appl* 1999; 735(2): 133140.
- Sheng W, Hang HW, Ruan DY. In vivo microdialysis study of the relationship between lead-induced impairment of learning and neurotransmitter changes in the hippocampus. *Eur J Pharm Environ*, 2005; 20: 233-240.
- Spanis CW, Bianchin MM, Izquierdo I, McGaugh JL. Excitotoxic basolateral amygdala lesions potentiate the memory impairment effect of muscimol injected into the medial septal area. *Brain Res*, 1999; 816: 329-336.
- Squire LR. Memory and the Hippocampus: A Synthesis from findings with Rats, Monkeys, and Humans. *Psychol Rev*, 1992b; 99 (2): 195-231.

- Squire LR. Declarative and nondeclarative memory: Multiple brain systems supporting learning and memory. *J Cognitive Neurosc*, 1992a; 99: 195-231.
- Squire LR, Zola-Morgan S. The medial temporal lobe memory system. *Science*, 1991; 253 (5026): 1380-1386.
- Squire LR, Zola-Morgan S. Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996; 93: 13515-13522.
- Steckler T, Oliveira AFM, Van Dyck C, Van Craenendonck H, Mateus AM, Langlois X, Lesage AS, Prickaerts J. Metabotropic glutamate receptor 1 blockade impairs acquisition and retention in a spatial Water maze task. *Behav Brain Res*, 2005; 164 (14): 52-60.
- Tang X, Cronin DA, Brunton NP. A simplified approach to the determination of thiamine and riboflavin in meats using reverse phase HPLC. *J Food Compos Anal*, 2006; 19: 831-837.
- Todd KG, Butterworth RF. Evaluation of the role of NMDA-mediated excitotoxicity in the selective neuronal loss in experimental Wernicke encephalopathy. *Exp Neurol*, 1998; 149(1): 130-138.
- Todd KG, Butterworth RF. Mechanisms of selective neuronal cell death due to thiamine deficiency. *Ann N Y Acad Sci*, 1999; 893: 404-411.
- Toso L, Johnson A, Bissell S, Roberson R, Abebe D, Spong CY. Understanding the mechanism of learning enhancement: NMDA and GABA receptor expression. *Am J Obstet Gynecol*, 2007; 197(3): 267 e1-4.
- Trostler N, Guggenheim K, Havivi E, Sklan D. Effect of thiamine deficiency in pregnant and lactating rats on the brain of their offspring. *Nutr Metab*, 1977; 21(5):294-304.
- Trostler N, Sklan D. Milk composition and thiamine transfer in thiamine deficient rats. *Am J Clin Nutr*, 1977; 30(5): 681-685.
- Valls F, Checa MA, Fernández-Muinõ A, Sancho T. Determination of Thiamin in Cooked Sausages. *J Agr Food Chem*, 1999; 47(1): 170- 173.
- Van de Weerd HA, Van Loo PL, Van Zutphen LF, Koolhaas JM, Baumans V. Nesting material as environmental enrichment has no adverse effects on behavior and physiology of laboratory mice. *Physiol Behav*, 1997; 62: 1019-1028.
- Vetreno RP, Anzalone SJ, Savage LM. Impaired, spared and enhanced ACh efflux across the hippocampus and striatum in diencephalic amnesia is dependent on task demands. *Neurobiol Learn Mem*, 2008; 90(1): 237-244.
- Vickery RR, Morris SH, Bindman LJ. Metabotropic glutamate receptors are involved in long-term potentiation in isolated slices of rat medial frontal cortex. *J Neurophysiol*, 1997; 78: 3039-3046.

- 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.
- Vortmeyer AO, Colmant HJ. Differentiation between brain lesions in experimental thiamine deficiency. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*, 1988; 414: 61-67.
- Weinberg J, Sliwowska JH, Lan N, Hellemans KG. Prenatal alcohol exposure: foetal programming the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and sex differences in outcome. *J Neuroendocrinol*, 2008; 20(4): 470-488.
- Whitlock JR, Heynen AJ, Shuler MG, Bear MF. Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science*, 2006; 313(5790): 1093-1097.
- WHO, World Health Organization. Thiamine deficiency and its prevention and control in major emergencies; 1999.
- Winer BJ. Statistical principles in experimental design. New York: McGraw-Hill; 1962.
- Winocur G, Moscovitch M. Anterograde and retrograde amnesia after lesions to frontal cortex in rats. *J Neurosci*, 1999; 19: 9611-9617.
- Wurtman JR, Wurtman JJ. In: Nutrition and the brain, 1975. Raven Press. New York.
- Zarrindast MR, Shamsi T, Azarmina P, Rostami P, Shafaghi B. GABAergic system and imipramine-induced impairment of memory retention in rats. *Eur Neuropsychopharm*, 2004; 14(1): 59-64.
- Zhang S, Takeda Y, Hagioka S, Takata K, Aoe H, Nakatsuka H, Yokoyama M, Morita K. Measurement of GABA and glutamate in vivo levels with high sensitivity and frequency. *Brain Res Protocol*, 2005; 14: 61-66.
- Zhang X, Sliwowska JH, Weinberg J. Prenatal alcohol exposure and fetal programming: effects on neuroendocrine and immune function. *Exp Biol Med*, 2005; 230: 376-388.
- Zhao N, Zhong C, Wang Y, Zhao Y, Gong N, Zhou G, Xu T, Hong Z. Impaired hippocampal neurogenesis is involved in cognitive dysfunction induced by thiamine deficiency at early pre-pathological lesion stage. *Neurobiol Dis*, 2008; 29(2): 176-185.
- Zubaran C, Fernandes JG, Rodnight R. Wernicke-Korsakoff syndrome. *Postgrad Med J*, 1997; 73: 27-31.

Anexos

		Ganho Peso Corporal (Semanas)											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Ratos Jovens	JMC (n=11)	19,73 ± 0,74	32,54 ± 0,85	50,27 ± 0,57	95,00 ± 2,33	140,45 ± 2,57	181,64 ± 2,75	-	-	-	-	-	-
	JMR (n=18)	21,00 ± 0,48	26,61 ± 0,30	40,06 ± 0,33	78,33 ± 2,51	126,17 ± 2,20	167,67 ± 4,28	-	-	-	-	-	-
Ratos Adultos	AMC (n=11)	-	-	-	92,36 ± 4,42	123,82 ± 4,74	171,18 ± 6,33	224,36 ± 10,74	251,55 ± 9,38	300,82 ± 9,62	324,27 ± 10,51	352,82 ± 10,39	367,64 ± 12,37
	AMR (n=17)	-	-	-	30,59 ± 1,72	75,82 ± 3,42	126,24 ± 5,10	157,65 ± 5,80	173,12 ± 7,16	229,00 ± 8,09	254,24 ± 8,96	285,59 ± 9,97	306,00 ± 10,99

Valores representam a média (g) ± erro padrão (S.E.M.).

Tabela 1: Ganho de peso corporal de ratos jovens (J) e adultos (A) submetidos à restrição de tiamina durante a lactação. MC e MR: ratos provenientes de mães controles e restritas, respectivamente.

		Tálamo		Hipocampo		Córtex Pré-frontal	
		Glutamato	GABA	Glutamato	GABA	Glutamato	GABA
Ratos Jovens	JMC (n=11)	5038,20 ± 153,59	382,40 ± 16,47	7286,46 ± 166,96	381,53 ± 11,24	6874,29 ± 191,87	317,93 ± 14,56
	JMR (n=18)	5353,51 ± 190,34	418,36 ± 18,19	6941,77 ± 132,52	430,76 ± 22,76	6608,82 ± 108,18	316,36 ± 6,35
Ratos Adultos	AMC (n=11)	7033,46 ± 370,71	365,43 ± 23,45	8579,31 ± 356,23	315,29 ± 20,09	8747,15 ± 387,79	270,16 ± 12,79
	AMR (n=17)	5091,79 ± 88,32 *	278,44 ± 14,21**	7142,61 ± 217,75 †	283,96 ± 18,37	7423,18 ± 164,43 †	252,99 ± 26,52

Valores representam a média (µg/g tecido) ± erro padrão (S.E.M.).

*p = 0,0001; **p = 0,002; † p = 0,001

Tabela 2: Concentrações de glutamato e GABA em regiões cerebrais de ratos jovens (J) e adultos (A) submetidos à restrição de tiamina durante a lactação. MC e MR: ratos provenientes de mães controles e restritas, respectivamente.

Ratos Jovens						
Parâmetros analisados	Região Cerebral	Análise de Regressão				
		F(1,27)	p	R Múltiplo		
Glutamato versus	Sessão 2 do treino	tálamo	0,03	0,87	0,03	
		hipocampo	0,66	0,42	0,15	
		CPF	1,80	0,19	0,25	
	Sessão 3 do treino	tálamo	0,05	0,83	0,04	
		hipocampo	0,15	0,70	0,08	
		CPF	0,04	0,84	0,04	
	Distância ao alvo	tálamo	0,54	0,47	0,14	
		hipocampo	1,15	0,29	0,20	
		CPF	0,46	0,50	0,13	
	Índice de Extinção	tálamo	2,21	0,15	0,27	
		hipocampo	0,72	0,40	0,16	
		CPF	0,27	0,60	0,10	
	Teste Memória de Trabalho	tálamo	1,14	0,29	0,20	
		hipocampo	0,54	0,47	0,14	
		CPF	0,00	0,97	0,01	
	GABA versus	Sessão 2 do treino	tálamo	0,54	0,47	0,14
			hipocampo	0,14	0,70	0,07
			CPF	0,12	0,73	0,07
Sessão 3 do treino		tálamo	0,47	0,49	0,13	
		hipocampo	0,29	0,59	0,10	
		CPF	0,99	0,33	0,19	
Distância ao alvo		tálamo	0,30	0,58	0,10	
		hipocampo	2,05	0,16	0,26	
		CPF	0,34	0,56	0,11	
Índice de Extinção		tálamo	3,55	0,07	0,34	
		hipocampo	0,02	0,88	0,03	
		CPF	0,10	0,75	0,06	
Teste Memória de Trabalho		tálamo	2,20	0,15	0,27	
		hipocampo	0,69	0,41	0,16	
		CPF	0,01	0,91	0,02	

Tabela 3: Análises de regressão linear dos parâmetros comportamentais e bioquímicos de ratos jovens e adultos submetidos à restrição de tiamina durante a lactação.

Ratos Adultos					
Parâmetros analisados	Região Cerebral	Análise de Regressão			
		F(1,26)	p	R Múltiplo	
Glutamato <i>versus</i>	Distância ao alvo	tálamo	0,10	0,76	0,06
		hipocampo	0,22	0,64	0,09
		CPF	0,10	0,74	0,06
	Índice de Extinção	tálamo	0,37	0,55	0,12
		hipocampo	0,70	0,41	0,16
		CPF	0,32	0,58	0,11
	Teste Memória de Trabalho	tálamo	2,49	0,13	0,29
		hipocampo	0,51	0,48	0,14
		CPF	0,55	0,46	0,14
GABA <i>versus</i>	Distância ao alvo	tálamo	2,23	0,15	0,28
		hipocampo	0,04	0,85	0,04
		CPF	2,64	0,12	0,30
	Índice de Extinção	tálamo	2,17	0,15	0,28
		hipocampo	0,01	0,92	0,02
		CPF	0,73	0,40	0,16
	Teste Memória de Trabalho	tálamo	0,09	0,76	0,06
		hipocampo	0,70	0,41	0,16
		CPF	0,53	0,47	0,14

Continuação da Tabela 3: Análises de regressão linear dos parâmetros comportamentais e bioquímicos de ratos jovens e adultos submetidos à restrição de tiamina durante a lactação.

	Ganho Peso Corporal (Semanas)												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Ratos Jovens	JMC (n=7)	15,14 ± 0,77	32,57 ± 0,53	42,00 ± 1,84	78,86 ± 3,67	110,14 ± 4,54	164,57 ± 5,70	-	-	-	-	-	
	JMR (n=10)	9,60 ± 0,88	22,60 ± 2,28	43,00 ± 2,74	76,10 ± 3,70	110,30 ± 1,92	141,60 ± 4,30	-	-	-	-	-	
Ratos Adultos	AMC (n=11)	18,33 ± 3,31	34,00 ± 2,27	48,27 ± 3,15	79,18 ± 4,23	134,82 ± 8,31	182,82 ± 10,11	229,82 ± 11,02	293,00 ± 9,81	338,36 ± 10,63	355,27 ± 12,60	378,45 ± 15,51	388,09 ± 15,35
	AMR (n=11)	14,91 ± 2,07	32,09 ± 1,76	58,18 ± 4,43	80,27 ± 3,40	139,09 ± 8,33	182,64 ± 9,17	229,09 ± 10,46	281,00 ± 9,89	320,45 ± 8,70	345,27 ± 11,60	365,36 ± 8,08	373,64 ± 9,27

Valores representam a média (g) ± erro padrão (S.E.M.).

Tabela 4: Ganho de peso corporal de ratos jovens (J) e adultos (A) submetidos à restrição de tiamina durante o período peri-natal. MC e MR: ratos provenientes de mães controles e restritas, respectivamente.

		Tálamo		Hipocampo		Córtex Pré-frontal	
		Glutamato	GABA	Glutamato	GABA	Glutamato	GABA
Ratos Jovens	JMC (n=07)	5504,97 ± 141,44	250,88 ± 19,04	7892,53 ± 214,12	310,19 ± 24,46	7266,08 ± 394,04	230,53 ± 26,29
	JMR (n=10)	5181,34 ± 184,54	253,64 ± 12,58	7596,84 ± 201,63	320,85 ± 20,89	7121,75 ± 223,86	283,49 ± 22,45
Ratos Adultos	AMC (n=11)	5528,45 ± 191,14	467,06 ± 29,18	8237,02 ± 204,76	470,64 ± 12,33	8588,31 ± 227,45	405,46 ± 9,15
	AMR (n=11)	5563,23 ± 191,07	463,44 ± 24,43	7985,36 ± 155,12	466,88 ± 8,79	8520,33 ± 125,17	405,00 ± 13,54

Valores representam a média ($\mu\text{g/g}$ tecido) ± erro padrão (S.E.M.).

Tabela 5: Concentrações de glutamato e GABA em regiões cerebrais de ratos jovens (J) e adultos (A) submetidos à restrição de tiamina durante o período peri-natal. MC e MR: ratos provenientes de mães controles e restritas, respectivamente.

Ratos Jovens					
Parâmetros analisados	Região Cerebral	Análise de Regressão			
		F(1,15)	p	R Múltiplo	
Glutamato <i>versus</i>	Sessão 2 do treino	tálamo	2,51	0,13	0,38
		hipocampo	0,95	0,34	0,24
		CPF	2,59	0,13	0,38
	Distância ao alvo	tálamo	2,10	0,17	0,35
		hipocampo	1,94	0,18	0,34
		CPF	2,09	0,17	0,35
	Índice de Extinção	tálamo	0,44	0,52	0,17
		hipocampo	0,64	0,44	0,20
		CPF	0,80	0,39	0,23
	Teste Memória de Trabalho	tálamo	11,92	0,00	0,66
		hipocampo	0,28	0,60	0,13
		CPF	5,30	0,04	0,51
GABA <i>versus</i>	Sessão 2 do treino	tálamo	0,24	0,63	0,13
		hipocampo	0,02	0,89	0,04
		CPF	0,48	0,50	0,18
	Distância ao alvo	tálamo	3,51	0,08	0,44
		hipocampo	0,35	0,56	0,15
		CPF	3,32	0,09	0,43
	Índice de Extinção	tálamo	0,00	0,95	0,02
		hipocampo	0,47	0,50	0,17
		CPF	3,81	0,07	0,45
	Teste Memória de Trabalho	tálamo	3,77	0,07	0,45
		hipocampo	0,01	0,94	0,02
		CPF	0,01	0,94	0,02

Tabela 6: Análises de regressão linear dos parâmetros comportamentais e bioquímicos de ratos jovens e adultos submetidos à restrição de tiamina durante o período peri-natal.

Ratos Adultos					
Parâmetros analisados	Região Cerebral	Análise de Regressão			
		F(1,20)	p	R Múltiplo	
<i>Glutamato versus</i>	Distância ao alvo	tálamo	1,58	0,22	0,27
		hipocampo	0,49	0,49	0,15
		CPF	0,12	0,73	0,08
	Índice de Extinção	tálamo	0,76	0,39	0,19
		hipocampo	0,54	0,47	0,16
		CPF	0,38	0,54	0,14
	Teste Memória de Trabalho	tálamo	0,63	0,43	0,17
		hipocampo	0,00	0,99	0,00
		CPF	2,18	0,15	0,31
<i>GABA versus</i>	Distância ao alvo	tálamo	2,05	0,17	0,31
		hipocampo	0,78	0,39	0,19
		CPF	0,03	0,87	0,04
	Índice de Extinção	tálamo	6,05	0,02	0,48
		hipocampo	0,01	0,93	0,02
		CPF	0,39	0,54	0,14
	Teste Memória de Trabalho	tálamo	0,30	0,59	0,12
		hipocampo	1,94	0,18	0,30
		CPF	0,12	0,74	0,08

Continuação da Tabela 6: Análises de regressão linear dos parâmetros comportamentais e bioquímicos de ratos jovens e adultos submetidos à restrição de tiamina durante o período peri-natal.

Cópia dos artigos científicos:

1.Freitas-Silva DM, Ferraz VP, Ribeiro AM. Improved high-performance liquid chromatographic method for GABA and glutamate determination in regions of the rodent brain. *Journal of Neuroscience Methods*, 2009; 177: 289-293.

2.Freitas-Silva DM, Resende LS, Pereira SR, Franco GC, Ribeiro AM. Maternal thiamine restriction during lactation induces cognitive impairments and changes in glutamate and GABA concentrations in brain of rat offspring. *Behavioral Brain Research*, 2010; 211(1): 33-40.

Cópia dos manuscritos:

1.Ferreira-Vieira TH, **Freitas-Silva DM**, Pereira SR, Ribeiro AM. Maternal thiamine restriction affects central GABA and glutamate concentrations and motor performances in adult rat offspring (submetido à revista *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*).

2.Freitas-Silva DM, Pereira SR, Ribeiro AM. Maternal thiamine restriction, during perinatal period, induces cognitive impairments in rat offspring with no change in central levels of GABA and glutamate (submetido à revista *Behavioral Brain Research*).