

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

Restrição de tiamina no período perinatal, induz, em animais na idade adulta, déficits motores e alterações em parâmetros centrais GABAérgicos e glutamatérgicos

Talita Hélen Ferreira e Vieira

BELO HORIZONTE

2009

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

Restrição de tiamina no período perinatal, induz, em animais na idade adulta, déficits motores e alterações em parâmetros centrais GABAérgicos e glutamatérgicos

Talita Hélen Ferreira e Vieira

Orientadora: Prof^a Angela Maria Ribeiro

Co-Orientadora: Prof^a Sílvia Rejane Castanheira Pereira

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

BELO HORIZONTE

2009

REITOR

Profº Ronaldo Tadêu Pena

PRÓ-REITORA DE PÓS-GRADUAÇÃO

Profª Elizabeth Ribeiro da Silva

DIRETORA DO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Profª Maria Cristina Lima de Castro

COORDENADORA DA PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

Profª Angela Maria Ribeiro

COLEGIADO DA PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

Profº Antônio Lúcio Teixeira Júnir (Subcoordenador)

Profº Helton José dos Reis

Profº Leandro Malloy Diniz

Profª Miriam Martins Chaves

Profº Fabrício de Araújo Moreira

Luciana Nocetti Croito (Representante discente)

Dedico este trabalho aos meus pais, Leandro Vieira e Vânia Ferreira e aos meus irmãos Túlio e Tássio pelo incentivo, confiança e amor incondicional durante essa caminhada.

AGRADECIMENTOS

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

Aos meus pais, irmãos e familiares pelo amor, incentivo e confiança depositados.

Às professoras Angela Ribeiro e Sílvia Pereira pelos ensinamentos e imensa contribuição para minha formação pessoal e profissional.

À amiga Rosária, pelo apoio sincero e ombro amigo nas horas difíceis.

Às amigas Bárbara, Gabriela (s) e Madalena, que mesmo de longe nunca deixaram de me incentivar.

À Ana Raquel, Letícia, Danielle e Iêda pelos bons e inesquecíveis momentos vividos.

À todos do Laboratório de Neurociência Comportamental e Molecular (LaNeC), pela receptividade, paciência e conhecimentos partilhados.

Enfim, obrigada a todos que de alguma forma fizeram parte desta história e tornaram possível este sonho.

“Há homens que lutam um dia e são bons.
Há outros que lutam um ano e são melhores.
Há os que lutam muitos anos e são muito bons.
Porém, há os que lutam toda a vida.
Esses são os imprescindíveis.”

Bertolt Brecht

Lista de Figuras e Tabelas	x
Abreviaturas e Símbolos	xiii
Resumo	xv
Abstract	xvii
Introdução	01
1. Considerações Gerais	01
2. Aspectos Neuroanatomicos e Funcionais do Controle Motor	02
3. Aspectos Gerais da Deficiência de Tiamina e Disfunções Encefálicas	04
4. Alterações Motoras e Deficiência de Tiamina	07
5. Alterações Neuroquímicas e Deficiência de Tiamina	09
6. Circuito Glutamatérgico e Controle Motor	11
7. Circuito GABAérgico e Controle Motor	13
8. Interação entre Circuitos Neuroquímicos e Controle Motor	15
9. Deficiência Maternal de Tiamina	18
Justificativa	21
Objetivos	24

Materiais e Métodos	25
1. Estabelecimento do Modelo e Delineamento Experimental.....	25
2. Estudos Comportamentais.....	28
3. Dissecção do Cérebro e Medula Espinhal.....	32
4. Estudos Bioquímicos.....	33
5. Análise Estatística.....	37
Resultados	38
1. Estudos Comportamentais.....	39
2. Estudos Bioquímicos.....	45
3. Estudos de Correlação.....	47
Discussão	52
Considerações Finais e Perspectivas	59
Anexos	62
Referências Bibliográficas	85

Figuras

Figura 1	Esquema de um terminal sináptico glutamatérgico.....	13
Figura 2	Esquema de um terminal sináptico GABAérgico.....	15
Figura 3	Representação esquemática dos circuitos neuroquímicos dos núcleos da base, tálamo e córtex cerebral.....	17
Figura 4	Representação esquemática do delineamento experimental.....	26
Figura 5	Fotografia do equipamento utilizado para o teste de equilíbrio e coordenação motora (<i>Rotarod</i>).....	30
Figura 6	Fotografia do equipamento utilizado para o teste de impressão das patas.....	31
Figura 7	Representação esquemática dos componentes de um aparelho de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (<i>HPLC</i>).....	35
Figura 8	Representação esquemática de um cromatograma indicando o tempo de eluição dos neurotransmissores.....	36
Figura 9	Gráfico com dados do desempenho dos animais no <i>Rotarod</i>	40
Figura 10	Representação das pegadas dos animais e gráfico com os dados quantitativos do desempenho no teste de impressão das patas.....	43
Figura 11	Gráfico com os dados das concentrações médias dos neurotransmissores, glutamato e GABA, no tálamo, cerebelo e medula espinhal dos animais.....	46
Figura 12	Gráfico de Dispersão: correlação entre as concentrações de GABA no tálamo e o desempenho dos animais no <i>Rotarod</i>	49
Figura 13	Gráfico de Dispersão: correlação entre as concentrações de GABA no tálamo e cerebelo e a largura do passo dos animais.....	50
Figura 14	Gráfico de Dispersão: correlação entre o comprimento do passo e a concentrações de GABA no cerebelo dos animais.....	51

Tabelas

Tabela 1	Composição da ração produzida no laboratório.....	27
Tabela 2	Composição da mistura de sais.....	27
Tabela 3	Composição da mistura de vitaminas.....	28
Tabela 4	Dados referentes ao desempenho dos animais do grupo controle no <i>rotarod</i>	41
Tabela 5	Dados referentes ao desempenho dos animais do grupo restrito no <i>rotarod</i>	41
Tabela 6	Dados referentes ao desempenho dos animais do grupo controle no teste de impressão das patas.....	44
Tabela 7	Dados referentes ao desempenho dos animais do grupo restrito no teste de impressão das patas.....	44

Anexos

Tabela 8 (anexo)	Dados da Análise de Regressão Linear: concentração de glutamato no tálamo <i>versus</i> desempenho dos animais do grupo controle no teste do <i>rotarod</i>	63
Tabela 9 (anexo)	Dados da Análise de Regressão Linear: concentração de glutamato no tálamo <i>versus</i> desempenho dos animais do grupo restrito no teste do <i>rotarod</i>	64
Tabela 10 (anexo)	Dados da Análise de Regressão Linear: concentração de glutamato no tálamo <i>versus</i> largura do passo dos animais do grupo controle.....	65
Tabela 11 (anexo)	Dados da Análise de Regressão Linear: concentração de glutamato no tálamo <i>versus</i> largura do passo dos animais do grupo restrito.....	66
Tabela 12 (anexo)	Dados da Análise de Regressão Linear: concentração de glutamato no tálamo <i>versus</i> comprimento do passo dos animais do grupo controle.....	67
Tabela 13 (anexo)	Dados da Análise de Regressão Linear: concentração de glutamato no tálamo <i>versus</i> comprimento do passo dos animais do grupo restrito.....	68
Tabela 14 (anexo)	Dados da Análise de Regressão Linear: concentração de glutamato no cerebelo <i>versus</i> desempenho dos animais do grupo controle no teste do <i>rotarod</i>	69

Tabela 15 (anexo)	Dados da Análise de Regressão Linear: concentração de glutamato no cerebelo <i>versus</i> desempenho dos animais do grupo restrito no teste do <i>rotarod</i>	70
Tabela 16 (anexo)	Dados da Análise de Regressão Linear: concentração de glutamato no cerebelo <i>versus</i> largura do passo dos animais do grupo controle.....	71
Tabela 17 (anexo)	Dados da Análise de Regressão Linear: concentração de glutamato no cerebelo <i>versus</i> largura do passo dos animais do grupo restrito.....	72
Tabela 18 (anexo)	Dados da Análise de Regressão Linear: concentração de glutamato no cerebelo <i>versus</i> comprimento do passo dos animais do grupo controle.....	73
Tabela 19 (anexo)	Dados da Análise de Regressão Linear: concentração de glutamato no cerebelo <i>versus</i> comprimento do passo dos animais do grupo restrito.....	74
Tabela 20 (anexo)	Dados da Análise de Regressão Linear: concentração de glutamato na medula espinhal <i>versus</i> desempenho dos animais do grupo controle no teste do <i>rotarod</i>	75
Tabela 21 (anexo)	Dados da Análise de Regressão Linear: concentração de glutamato na medula espinhal <i>versus</i> desempenho dos animais do grupo restrito no teste do <i>rotarod</i>	76
Tabela 22 (anexo)	Dados da Análise de Regressão Linear: concentração de glutamato na medula espinhal <i>versus</i> largura do passo dos animais do grupo controle.....	77
Tabela 23 (anexo)	Dados da Análise de Regressão Linear: concentração de glutamato na medula espinhal <i>versus</i> largura do passo dos animais do grupo restrito.....	78
Tabela 24 (anexo)	Dados da Análise de Regressão Linear: concentração de glutamato na medula espinhal <i>versus</i> comprimento do passo dos animais do grupo controle.....	79
Tabela 25 (anexo)	Dados da Análise de Regressão Linear: concentração de glutamato na medula espinhal <i>versus</i> comprimento do passo dos animais do grupo restrito.....	80
Tabela 26 (anexo)	Dados da Análise de Regressão Linear: concentração de GABA no cerebelo <i>versus</i> desempenho dos animais do grupo controle no teste do <i>rotarod</i>	81
Tabela 27 (anexo)	Dados da Análise de Regressão Linear: concentração de GABA no cerebelo <i>versus</i> desempenho dos animais do grupo restrito no teste do <i>rotarod</i>	82
Tabela 28 (anexo)	Dados da Análise de Regressão Linear: concentração de GABA na medula espinhal <i>versus</i> desempenho dos animais do grupo controle no teste do <i>rotarod</i>	83
Tabela 29 (anexo)	Dados da Análise de Regressão Linear: concentração de GABA na medula espinhal <i>versus</i> desempenho dos animais do grupo restrito no teste do <i>rotarod</i>	84

γ - gama

μ - Micro

α KGDH- Alfa-cetogluturato desidrogenase

5-HIAA- Ácido 5-hidroxi-indolacético

AIDS- Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

Da- Dopamina

ERO- Espécie Reativa de Oxigênio

EW- Encefalopatia de Wernicke

GABA- Ácido γ -aminobutírico

GABA-T- GABA transaminase

GAD- *Glutamic Acid Decarboxylase*= Ácido glutâmico descarboxilase (glutamato descarboxilase);

GAT-*Transporters GABA*= Proteínas de membrana transportadoras de GABA

Glu- Glutamato

GP- Globo pálido

GPm- Globo pálido interno (medial)

HIV- Vírus da Imunodeficiência Humana

HPLC- *High Performance Liquid Chromatography*=Cromatografia Líquida de Alta Eficiências

IL- Interleucina

m- Mili

M- Molar

nm- Nanômetro

NMDA- N-metil-D-aspartato

OPA- Orto-oftaldeído

PDH- Piruvato desidrogenase

SNC- Sistema Nervoso Central

SNr- Substância negra porção reticular

STN- Núcleo subtalâmico

TDP- Tiamina difosfato

TNF α - Fator de Necrose Tumoral Alfa

TPP- Tiamina Pirofosfato

v/v- Volume por volume

WHO – *World Health Organization*= Organização Mundial de Saúde

A tiamina, vitamina B₁, é um nutriente essencial para o tecido nervoso. Em estudos prévios, nosso grupo de pesquisa demonstrou que a deficiência materna de tiamina pode levar a diminuição do peso cerebral e provocar alterações neuroquímicas no Sistema Nervoso Central (SNC) da prole. Considerando a importância da tiamina para o desenvolvimento cerebral e funções motoras o objetivo do presente estudo foi investigar os efeitos de uma deficiência parcial de tiamina, durante o período perinatal, na motricidade e em parâmetros neuroquímicos da prole na idade adulta. Vinte ratos *Wistar* (peso = 437±41 gramas) foram utilizados: dez provenientes de mães alimentadas *ad libitum* (Mães Controle - grupo MC) e outros dez de mães alimentadas com dieta restrita em tiamina (Mães Restritas – grupo MR) durante o período perinatal. Todos os animais foram submetidos a testes comportamentais (*rotarod* e impressão das patas) para análise de aspectos do comportamento motor (equilíbrio, largura e comprimento dos passos). Após os testes comportamentais os animais foram mortos por decapitação e o cerebelo, tálamos e medula espinhal foram retirados para análise da concentração de GABA e glutamato através do método de cromatografia líquida de alta eficiência (*HPLC: High Performance Liquid Chromatography*). Observamos que a restrição de tiamina reduziu significativamente o tempo de permanência dos animais no *rotarod* [*Mann-Whitney U* = 12,50; p = 0,01] e teve um efeito significativo, um aumento em relação ao controle, sobre a largura do passo [MC = 4,30±0,51; MR = 4,94±0,63; $F_{(1,16)} = 5,40$; p = 0,03]. Esse tratamento também afetou de forma significativa as concentrações de glutamato no cerebelo [MC = 5219,30±1071,13; MR = 3999,24±421,40; $F_{(1,16)} = 11,01$; p = 0,00] e GABA no tálamo [MC = 192,11±33,00; MR = 250,64±65,53; $F_{(1,16)} = 5,26$; p = 0,04]. Observamos correlação significativa entre o desempenho no *rotarod* e a concentração de GABA no tálamo [r = -0,73; p = 0,04] assim como, entre a média da largura do passo e ambos, a concentração de GABA no tálamo [r = -0,86; p = 0,006] e cerebelo [r = 0,73; p = 0,04] para os animais do grupo controle. Para os animais do grupo MR houve correlação

significativa entre o comprimento do passo e a concentração de GABA no cerebelo [$r = -0,71$; $p = 0,02$]. Os resultados obtidos indicam que os circuitos GABAérgicos no tálamo são importantes em aspectos relacionados à função motora e que a restrição maternal de tiamina durante estágio precoce do desenvolvimento pode induzir déficits motores e alterações neuroquímicas na prole, que persistem em períodos posteriores da vida.

PALAVRAS-CHAVES: deficiência de tiamina – equilíbrio – marcha – tálamo – cerebelo – medula espinhal – ácido γ -aminobutírico (GABA) – glutamato.

Thiamine, also known as vitamin B₁, is an essential nutrient required by all tissues including the nervous system. In a previous study our group has shown that the maternal thiamine deficiency can lead to decrease in brain weight and changes in central neurochemical parameters assessed in the offspring. Considering the importance of thiamine to brain development, including motor systems the purpose of the present study was to investigate the effects of partial thiamine deficiency, during the perinatal period, on the motricity and neurochemical parameters in adult rats. Twenty male Wistar rats (weight = 437±41g) were used (ten of them born from normally-fed control mothers: *CM* and the other ten from mothers fed with thiamine-restrict diet *RM*). All the animals were submitted to motor tests (rotarod and paw print). After behavioral tests the rats were killed and their brain areas (thalamus, cerebellum and spinal cord) separated for glutamate and GABA analysis by HPLC. Observed that animals from *RM* group showed significant reduction of time spent on the rotarod [*Mann-Whitney* $U = 12,50$; $p = 0,01$] and increase in hind-base width [MC = 4,30±0,18; MR = 4,94±0,20; $F_{(1,16)} = 5,40$; $p = 0,03$]. The treatment also affected significantly the concentrations of glutamate in cerebellum [MC = 5219,31±1071,13; MR = 3999,24±421,39; $F_{(1,16)} = 11,01$; $p = 0,00$] and GABA in thalamus [MC = 192,11±33,00; MR = 250,64±65,54; $F_{(1,16)} = 5,26$; $p = 0,04$]. For animals from *CM* group there was significant correlation between the performance on the rotarod and thalamus GABA concentration [$r = -0,73$; $p = 0,04$] and between the average hind-base width and both thalamus [$r = -0,86$; $p = 0,006$] and cerebellum [$r = 0,73$; $p = 0,04$] GABA concentration. For animals from the *RM* group there was significant correlation between the stride length and the cerebellum GABA concentration [$r = -0,71$; $p = 0,02$]. These results indicates that thalamus GABAergic circuits are important for aspects of motor function and that the maternal thiamine restriction during the early stages of development can induce motor deficits and neurochemical changes in offspring that persist in later periods of life.

KEYWORDS: thiamine deficiency – balance – gait – thalamus – cerebellum – spinal cord – γ -aminobutyric acid (GABA) – glutamate.

1. Considerações Gerais

A tiamina, também conhecida como vitamina B₁, é um nutriente essencial encontrado em altas concentrações em músculos, órgãos e tecido cerebral. Esta vitamina participa de funções cerebrais metabólicas e celulares, incluindo o metabolismo de carboidratos e produção de neurotransmissores (Mulholland, 2006). A ausência da tiamina no organismo de seres humanos tem sido associada a uma série de distúrbios neurológicos caracterizados por alterações que vão desde comprometimentos no sistema nervoso periférico (SNP), (Butterworth, 2003) até importantes e irreversíveis alterações no sistema nervoso central (SNC) do indivíduo (Langlais & Savage, 1995; Butterworth, 2003).

O estudo das disfunções associadas à deficiência da tiamina tem sido possível através da utilização de modelos experimentais, principalmente roedores. A deficiência da vitamina B₁ pode ser induzida diretamente nestes animais através da administração de uma dieta alimentar deficiente desta vitamina associada ou não (Pires *et al.*, 2001) à inibidores de enzimas responsáveis pela produção da forma ativa da tiamina (Langlais & Savage, 1995). A deficiência também pode ser indireta através da utilização desse tratamento durante o período gestacional (Bâ *et al.*, 2005), com a finalidade de induzir, na prole, o fenômeno *programming*. Conforme Lucas (1991), esse fenômeno é desencadeado quando um estímulo ou um insulto é provocado em um período crítico do desenvolvimento animal e é capaz de ocasionar mudanças adaptativas anatômicas, fisiológicas, metabólicas e comportamentais que podem persistir em períodos posteriores da vida do indivíduo (Godfrey & Barker, 2001).

Nesse contexto, algumas pesquisas têm sido realizadas objetivando avaliar os efeitos da deficiência de tiamina, durante o período gestacional, sobre aspectos relacionados à histologia

(Bâ *et al.*, 2005), morfologia (Roeklein *et al.*, 1985), neuroquímica (Fournier & Butterworth, 1990; Freitas-Silva *et al.*, 2008) e desempenho do animal em tarefas cognitivas (Freitas-Silva *et al.*, 2008), em fases posteriores do desenvolvimento. Por outro lado, apesar de estar bem documentado (Butterworth, 1982; Butterworth, 2003; Mulholland, 2006) que a deficiência de tiamina afeta estruturas encefálicas relacionadas à modulação do controle motor, poucos são os trabalhos que abordam os efeitos sobre aspectos de funções motoras específicas.

Pesquisas que objetivam esclarecer os mecanismos moleculares afetados pela deficiência da vitamina B₁ relacionados com aspectos comportamentais específicos, como por exemplo, motores, podem contribuir para a descoberta dos substratos neurofisiológicos envolvidos com essas funções comportamentais. Além disto, estudos sobre os efeitos da deficiência em períodos precoces do desenvolvimento podem contribuir para o conhecimento dos distúrbios motores mais afetados nestas fases e as conseqüências em períodos posteriores do desenvolvimento.

2. Aspectos Neuroanatomicos e Funcionais do Controle Motor

Resultados obtidos em estudos neuroanatomicos e funcionais sugerem a presença de quatro áreas encefálicas relacionadas à organização e ao controle do movimento: motora primária, motora suplementar, pré-motora e motora cingular (He *et al.*, 1993; Kurata, 1994; Godschalk *et al.*, 1995; Wise, 1996). Segundo Grillner & Wallen, (1985) essas áreas influenciam vias descendentes e interneurônios medulares através de suas conexões com o tronco encefálico, núcleos da base e cerebelo (Nair *et al.*, 2003) para possibilitar a ocorrência do movimento.

O cerebelo, juntamente com o estriado, é um componente de circuitos cortical-subcortical envolvidos em aspectos distintos do aprendizado e controle motor (Friston *et al.*, 1992; Grafton, 1994; Jenkins *et al.*, 1994; Seitz *et al.*, 1994; Toni *et al.*, 1998; Middleton & Strick, 2002). Ele recebe aferências de quase todo sistema sensorial e regula grande parte das eferências dos circuitos motores (Nair *et al.*, 2003). De acordo com Jenkins *et al.* (1994) o cerebelo é mais ativado em fases iniciais do processo de aprendizagem motora, ao passo que o estriado é significativamente mais ativo durante a execução de tarefas já aprendidas (Grafton, 1994). Até pouco tempo atrás, conforme Centonze *et al.* (2008), considerava-se que o cerebelo e os núcleos da base não eram interconectados, entretanto, achados recentes contradizem essa visão e outros autores propõem uma importante interconexão entre essas estruturas (Ichinohe *et al.*, 2000; Hoshi *et al.*, 2005).

Grande parte do conhecimento sobre aspectos envolvidos no controle motor tem sido possível através de trabalhos realizados em modelos experimentais, gatos e macacos, principalmente no que diz respeito ao estudo da postura (Grillner & Wallen, 1985) e marcha (Eidelberg *et al.*, 1981; Morie *et al.*, 1999). Segundo Grillner & Wallen, (1985) a postura e a marcha são fundamentados em programas motores espinhais automatizados que são iniciados e regulados por circuitos supra-espinhais. Vários desses circuitos, no tronco encefálico e cerebelo, têm sido identificados através de estimulações químicas e elétricas pontuais nestas regiões (Shik & Orlovsky, 1976; Whelan, 1996; Mori *et al.*, 2001). Por exemplo, em trabalhos de Eidelberg *et al.* (1981) macacos apresentaram alterações no comportamento motor, iniciação da marcha, após terem recebido estímulo elétrico no tegmento mesencefálico. Ainda, conforme estes mesmos autores, regiões mesencefálicas específicas, juntamente com suas projeções para formação reticular ponte-medular, regiões subtalâmicas e cerebelo compõem as principais regiões e vias responsáveis pela marcha (locomoção).

De acordo com vários autores (Chambers & Sprague, 1955a, b; Dichgans & Diener, 1984; Thach *et al.*, 1992; Thach & Bastian, 2004; Morton & Bastian, 2004), o cerebelo, mais especificamente a região medial (*vérmis*), merece atenção especial quando se analisa a marcha, uma vez que fica sob o seu comando a adequação da postura e a manutenção do equilíbrio durante a caminhada. Alguns achados apresentados por Udo *et al.* (1980) e Yu & Eidelberg, (1983) demonstraram que lesões ocorridas no cerebelo de gatos são capazes de induzir alterações na marcha desses animais (hipermetria), corroborando o envolvimento do cerebelo durante a locomoção (Ito, 1984; Orlovsky *et al.*, 1999; Morton & Bastian, 2004). Jahn *et al.* (2004), utilizando imagens de ressonância magnética funcional em humanos, também demonstrou a participação do cerebelo, juntamente com tálamo e núcleos da base quando os indivíduos mentalizavam diferentes situações que envolviam aspectos relacionados à postura e marcha (ficar de pé, caminhar e correr), demonstrando a complexidade na organização dos circuitos neurais que exercem o controle do movimento e a importância desses para a ocorrência do mesmo.

3. Aspectos Gerais da Deficiência de Tiamina e Disfunções Encefálicas

A tiamina é uma vitamina (B₁) utilizada por todos os tecidos do organismo, incluindo o tecido nervoso (Martin *et al.*, 2003). A maioria das descrições sobre suas ações no sistema nervoso se relaciona com aspectos metabólicos, nos quais, em sua forma difosfatada (tiamina difosfato- TDP ou tiamina pirofostato-TPP) ela atua como cofator de enzimas envolvidas no metabolismo da glicose (Bâ, 2008; Navarro *et al.*, 2008) como, a piruvato desidrogenase (PDH), o complexo α -cetoglutarato desidrogenase (α -KGDH) e a transcetolase citosólica (Martin *et al.*, 2003; Butterworth, 2003; Bubber *et al.*, 2004; Navarro *et al.*, 2008). O funcionamento adequado destes sistemas enzimáticos é necessário para a ocorrência de

numerosas reações bioquímicas no organismo, incluindo a síntese de neurotransmissores, produção de ácidos nucleicos, ácidos graxos, esteróides e certos complexos de açúcar (Martin *et al.*, 2003). Além do papel da tiamina como coenzima, evidências obtidas em estudos com cultura primária de neurônios têm indicado uma possível função dessa vitamina na modulação de canais iônicos (Oliveira *et al.*, 2007).

Segundo Martin *et al.* (2003), dada a importância da vitamina B₁ no organismo, uma possível redução na concentração dos seus níveis teciduais pode interferir em numerosos mecanismos celulares e desencadear processos neurodegenerativos e disfunções cerebrais, podendo resultar em um importante distúrbio denominado Encefalopatia de Wernicke (EW) (Butterworth, 2003). A EW é caracterizada por oftalmoplegia, ataxia, perda de memória, confusão mental (Butterworth *et al.*, 2008) e hipoatividade da marcha e postura (Zubaran *et al.*, 1997). Além da EW, em humanos a deficiência de tiamina é também encontrada em estados graves de desnutrição associada ao alcoolismo, na Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (HIV-AIDS) e em doenças gastrointestinais (Butterworth, 2009).

Butterworth, (2003) utilizando exames por imagem de pacientes que apresentavam deficiência de tiamina observou que algumas estruturas encefálicas apresentam certa seletividade e uma maior susceptibilidade à essa deficiência. Destacando-se o tálamo, corpos mamilares, região periventricular e cerebelo.

De acordo com Langlais & Savage, (1995) lesões cerebrais similares às lesões encontradas em indivíduos com a EW podem ser induzidas experimentalmente em ratos através da utilização de dieta deficiente em tiamina, conforme descrito em estudo realizado por nosso

grupo (Pires *et al.*, 2001) ou através da combinação da administração parenteral de pirritiamina - inibidor da pirofosfoquinase - e utilização de dieta deficiente de tiamina (Hakim & Pappius, 1983; Vortmeyer & Colmant, 1988; Langlais & Savage, 1995) também utilizado por nosso grupo (Pires *et al.*, 2005, Carvalho *et al.*, 2006). Neste mesmo contexto, há ainda o modelo de deficiência maternal, no qual a deficiência de tiamina é induzida no período gestacional e/ou de amamentação (Bâ *et al.*, 2005).

Em animais experimentais, há relatos de que 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). Os sinais clínicos, geralmente apresentados pelos animais são queda de pêlo, hiperatividade a estímulos, postura hipotônica, ataxia, anorexia, perda do reflexo de endireitamento e convulsões podendo, em situações de desnutrição grave, evoluir para a morte (Mosseau *et al.*, 1996; Ciccia & Langlais, 2000).

Os mecanismos fisiopatológicos responsáveis pelas lesões encefálicas ocorridas na deficiência de tiamina e a vulnerabilidade seletiva de certas estruturas do SNC a essas lesões não são bem conhecidos (Butterworth *et al.*, 2008). Entretanto, alguns mecanismos têm sido propostos como responsáveis por disfunções celulares na deficiência da vitamina B₁ (Butterworth *et al.*, 2008). Por exemplo, aumentos nos níveis cerebrais de espécies reativas de oxigênio, conhecidas como ROS que são as siglas do termo em inglês *Reactive Oxygen Species*, têm sido relatados (Langlais *et al.* 1997) em ratos com deficiência de tiamina juntamente com evidências de aumentos na expressão da óxido nítrico sintase (Kruse *et al.*, 2004) e de citocinas proinflamatórias (Fator de Necrose Tumoral Alfa - TNF α ; Interleucinas (IL) 1B e 6) (Todd & Butterworth, 1999). Por outro lado, outros autores têm sugerido que a morte celular

observada na deficiência de tiamina pode estar relacionada com uma redução dos níveis de TDP e conseqüente diminuição na atividade das enzimas que a utilizam como cofator, como a α -cetoglutarato desidrogenase, piruvato desidrogenase e a transcetolase citosólica (Butterworth *et al.*, 1993).

Seja qual for o mecanismo biológico envolvido na deficiência da vitamina B₁, o que se tem em comum é que esta deficiência pode acarretar danos importantes para o indivíduo (Bâ *et al.*, 1999; Bâ *et al.*, 2005; Pires *et al.*, 2005; Carvalho *et al.*, 2006). Dessa forma, trabalhos nos quais os objetivos são analisar os efeitos dessa deficiência em aspectos comportamentais específicos podem contribuir para a identificação precoce daqueles indivíduos acometidos pela carência de tal vitamina, haja vista que, conforme dados apresentados pela Organização Mundial de Saúde, (1999) a deficiência da vitamina B₁ ainda tem sido, frequentemente, subdiagnosticada em muitos segmentos da população mundial. Dados clínicos que sejam capazes de identificar possíveis sinais de tal condição podem auxiliar na abordagem dos indivíduos acometidos pela deficiência da tiamina.

4. Alterações Motoras e Deficiência de Tiamina

Vários estudos, utilizando modelos experimentais, indicam que as lesões cerebrais observadas em roedores são semelhantes às encontradas em indivíduos com a EW (Hakim & Pappius, 1983; Langlais & Savage, 1995), viabilizando, cada vez mais, o estudo a cerca dos mecanismos envolvidos na deficiência de tiamina e dos possíveis impactos desta deficiência em diversos aspectos do comportamento do indivíduo.

Dados obtidos por diferentes autores têm demonstrado que importantes estruturas encefálicas envolvidas na modulação e integração das respostas motoras (Lalonde & Strazielle, 2007) são seletivamente comprometidas na deficiência de tiamina, destacando-se o tálamo, cerebelo (Butterworth, 2003, Martin *et al.*, 2003) e medula espinhal (Butterworth, 1982), tornando possível que os indivíduos com deficiência de B₁ apresentem distúrbios relacionados à motricidade.

Freeman *et al.* (1987) utilizando o teste do “campo aberto”, em um de seus trabalhos com camundongos como modelo experimental de deficiência de tiamina, relataram diminuição do comportamento motor exploratório dos animais deficientes de tiamina, tanto no que diz respeito à distância percorrida quanto ao número de levantamentos sob as patas traseiras, o que segundo Whishaw & Kolb, (2005) poderia traduzir alterações no comportamento motor dos animais. Os efeitos da deficiência de tiamina no desenvolvimento motor de animais experimentais também foram avaliados nas proles de mães submetidas à deficiência de B₁ durante a lactação e a gestação (Bâ & Seri, 1993, 1995; Bâ, 2008). Conforme resultados apresentados por esses autores, a deficiência de tiamina se relaciona com níveis mais baixos de desenvolvimento funcional para algumas habilidades relacionadas ao desenvolvimento motor dos animais (Bâ, 2008), corroborando a hipótese de que a deficiência de tiamina pode interferir em circuitos neurais relacionados ao comportamento motor do indivíduo.

Além dos trabalhos nos quais os autores analisam o impacto desta deficiência no desenvolvimento motor (Bâ & Seri, 1993, 1995; Bâ, 2008), existem outros nos quais é discutido este impacto em aspectos mais específicos, como por exemplo, na mielinogênese. Trostler *et al.* (1977) observaram que animais cujas mães foram submetidas à privação de

tiamina, durante o período gestacional, apresentaram redução no diâmetro das camadas de mielina, sugerindo um papel para esta vitamina na mielinização da fibra nervosa. Embora os autores não tenham realizado testes comportamentais específicos, para avaliar aspectos relacionados à motricidade, é possível supor que esses animais poderiam apresentar déficits motores, dada a importante relação entre a mielinização da fibra nervosa e a motricidade (Ure & Rodriguez, 2002).

Sendo assim, é provável que os mecanismos responsáveis pelas lesões neuropatológicas induzidas pela deficiência de tiamina, que resultam em interferências motoras, sejam múltiplos e necessitem de estudos mais detalhados para melhor entendê-los.

5. Alterações Neuroquímicas e Deficiência de Tiamina

Importantes evidências têm sido obtidas a cerca das disfunções neurológicas apresentadas por indivíduos e/ou animais experimentais acometidos ou submetidos à deficiência de tiamina (Mosseau *et al.*, 1996; Zubaran *et al.*, 1997; Ciccia & Langlais, 2000; Butterworth *et al.*, 2008). Grande parte dos trabalhos aponta em direção ao acometimento seletivo de algumas estruturas encefálicas conseqüentes a esta deficiência (Irle & Markowitsch, 1983; Vortmeyer & Colmant, 1988; Butterworth, 2003). Essas estruturas, através de análises histológicas, apresentam sinais de lesões caracterizadas por gliose e perda celular localizada (Langlais & Savage, 1995). De acordo com alguns autores (Langlais & Zhang, 1997; Calingasan *et al.* 1998, Todd & Butterworth, 1999 e Gibson & Zhang, 2002) a ocorrência da lesão é geralmente precedida de importantes alterações bioquímicas celulares.

Em estudos prévios, vários pesquisadores observaram que a deficiência de tiamina afeta diferentes circuitos neuroquímicos e interfere em importantes aspectos comportamentais do indivíduo (Pires *et al.*, 2005; Carvalho *et al.*, 2006; Nakagawasai *et al.*, 2007). Por exemplo, dados obtidos por nosso grupo demonstraram o comprometimento do neocórtex e do hipocampo de ratos submetidos a episódios de deficiência de tiamina. Os animais, além de apresentarem disfunções no sistema colinérgico (alteração na liberação de acetilcolina e na atividade da acetilcolinesterase), apresentaram alteração na memória espacial quando avaliados no Labirinto Aquático de Morris (LAM) (Pires *et al.*, 2005). Além das disfunções colinérgicas, nosso grupo (Carvalho *et al.* 2006) observou que a deficiência da vitamina B₁ afeta a recaptação de glutamato no córtex pré-frontal e altera a memória espacial de ratos. Achados recentes, obtidos em nosso laboratório (Vigil *et al.*, 2008), também apontam em direção ao comprometimento de circuitos serotoninérgicos no tálamo de animais que receberam dieta deficiente em tiamina, haja vista que foi observado, nessa estrutura, elevação nos níveis de 5-HIAA (ácido 5-hidroxi-indolacético), metabólito da serotonina. Conforme resultados apresentados por Nakagawasai *et al.* (2007) 20 dias de dieta deficiente em tiamina é suficiente para causar degeneração em neurônios noradrenérgicos e, possivelmente, em neurônios dopaminérgicos no *locus ceruleus* de camundongos adultos.

Há um corpo crescente de evidências que demonstram também que a deficiência de tiamina pode causar alterações nos circuitos glutamatérgico (Todd & Butterworth, 1999; Savage *et al.*, 1999) e GABAérgico (Butterworth *et al.*, 1979; Butterworth, 1989). Sabe-se que esses circuitos podem estar envolvidos em funções motoras (Mora *et al.*, 2007). Como a deficiência de tiamina pode comprometer estruturas, como cerebelo e tálamo (Butterworth, 2003), que processam e integram respostas motoras (Lalonde & Strazielle, 2007), questões importantes a

serem abordadas são aquelas que se referem aos efeitos da deficiência desta vitamina sobre aspectos motores e aos mecanismos neuroquímicos envolvidos nesses processos.

Uma vez que a deficiência de tiamina tem a capacidade de interferir nas funções GABAérgicas e glutamatéricas, é plausível supor que as alterações motoras apresentadas pelos indivíduos comprometidos pela carência de B₁ deva-se, pelo menos em parte, a distúrbios relacionados à esses circuitos, haja vista que segundo Foster & Kemp, (2006) a interação coordenada, respectivamente, entre os estímulos inibitórios e excitatórios originados nestes circuitos é fundamental para o desenvolvimento e manutenção de complexas funções no organismo do indivíduo.

6. Circuito Glutamatérgico e Controle Motor

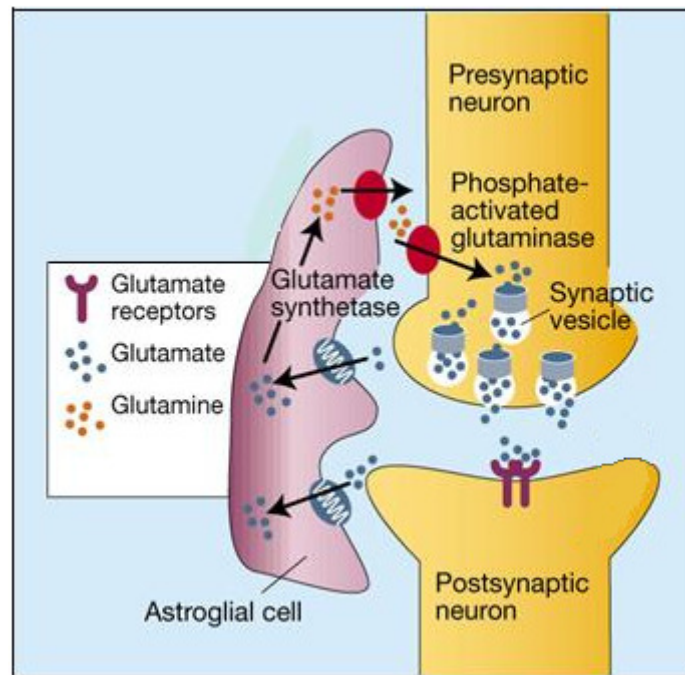
De acordo com Salinska & Stafiej (2003), o glutamato é o principal aminoácido envolvido em respostas sinápticas excitatórias no sistema nervoso central, local onde se encontra distribuído de maneira ampla e uniforme. Conforme Watkins & Jane (2006), a participação desse aminoácido em respostas excitatórias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

Diversos autores descrevem a participação do glutamato em vários processos fisiológicos como a neurogênese, migração celular, plasticidade neuronal e processos de aprendizagem e memória (Nacher *et al.*, 2002; McGee & Brecht, 2003). Além disto, dados apresentados por

Ozawa *et al.* (1998) também tem sugerido a participação deste neurotransmissor em atividades relacionadas à funções motoras.

Wardas *et al.* (1997) utilizando ligantes radioativos, em estudos com ratos jovens e idosos, mostraram evidências da participação do sistema glutamatérgico em processos relacionados à motricidade, sugerindo que distúrbios motores encontrados em ratos idosos podem ser conseqüentes à alterações em subunidades de receptores glutamatérgicos centrais. Sanchez-Perez *et al.* (2005) também demonstraram que os receptores de glutamato cerebelares do tipo N-Metil D-Aspartato (NMDA) são essenciais para a aquisição do aprendizado motor e para a execução de atividades relacionadas à coordenação motora, corroborando a participação deste circuito neuroquímico no controle motor.

A figura 1 apresenta de maneira esquemática o ciclo de liberação e recaptção do glutamato na fenda sináptica pelo astrócito. O glutamato liberado na fenda sináptica, após um evento excitatório pré-sináptico, difunde-se para o terminal pós-sináptico onde se liga aos receptores específicos desencadeando uma cascata de reações celulares. Um dos mecanismos de inativação do processo é a recaptção do neurotransmissor, via transportadores específicos, para o neurônio pré-sináptico e/ou astrócito (Rothstein, 2000).



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

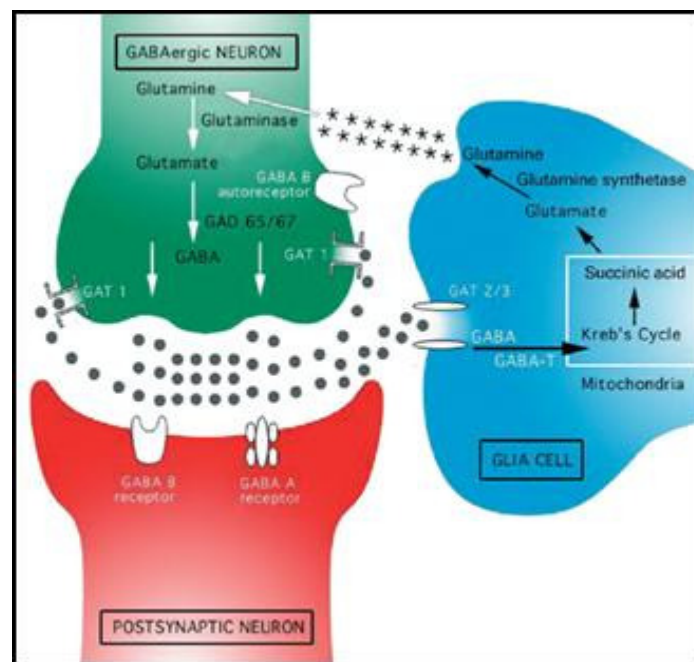
Figura 1: Representação esquemática de um terminal glutamatérgico mostrando o ciclo de liberação e recaptção do neurotransmissor na fenda sináptica pelo astrócito. *Glutamate receptors*= Receptores de glutamato; *Glutamate*= Glutamato; *Glutamine*= Glutamina. *Presynaptic neuron*= Neurônio Pré-sináptico; *Postsynaptic neuron*= Neurônio Pós-sináptico; *Astroglial cell*= Astrócito; *Phosphate activated glutaminase*= Glutaminase ativada por fosfato; *Synaptic vesicle*= Vesícula sináptica; *Glutamate synthetase*= Glutamato sintetase; *Glutamate receptors*= Receptores de glutamato; *Glutamine*= Glutamina.

7. Circuito GABAérgico e controle motor

O aminoácido γ -aminobutírico (GABA) é um neurotransmissor inibitório presente nos sistemas nervoso central e periférico. Ele é sintetizado a partir do glutamato e promove a redução da excitabilidade neuronal ao se ligar em receptores ionotrópicos (GABA A e GABA C) que são canais iônicos permeáveis ao íon cloreto e a receptores metabotrópicos (GABA B) acoplados a proteína G que regulam a condutância de canais de potássio e cálcio (Bambrilla *et al.*, 2003; Ben-Ari *et al.*, 2007) (figura 2).

Apesar da evidente propriedade inibitória do GABA, diversos trabalhos sugerem um conjunto de funções sinalizatórias GABAérgicas (Parra *et al.*, 1998; Dumitriu *et al.*, 2007). No córtex cerebral 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).

De acordo com Chevalier & Deniau, (1990) é possível também que o GABA atue na modulação de circuitos motores, uma vez que já foi constatado a presença de importantes vias GABAérgicas nos núcleos da base, os quais, dentre outras funções, conforme Chen & Yung, (2004) auxiliam no controle motor. Dados obtidos por Bianchi *et al.* (2003) estão de acordo com a participação do GABA na execução da atividade motora. Segundo esses autores um desequilíbrio na liberação de GABA em vias estriato-palidais e estriato-nigrais pode estar relacionado, pelo menos em parte, com alterações motoras observadas em modelos animais da doença de Parkinson.



Fonte: Brambilla, P.; Perez, J.; Barale, F.; Schettini, G. & Soares, J.C. GABAergic dysfunction in mood disorders. *Molecular Psychiatry*. 2003; 8: 721-737.

Figura 2: Representação esquemática de um terminal sináptico. O GABA é sintetizado a partir do glutamato. Após liberado na fenda sináptica ele pode se ligar a receptores específicos nos neurônios pós-sinápticos ou ser recaptado por transportadores localizados nas células gliais e neurônios pré-sinápticos. *GABAergic neuron*= neurônio GABAérgico; *Glutamine*= Glutamina; *Glutamate*= Glutamato; *Glutaminase*=Glutaminase; *Autoreceptor GABA B*= auto-receptor (receptor pré-sináptico) *GABA B*; *GAT*= Proteínas de membrana transportadoras de GABA: tipos 1, 2 e 3; *GAD*= ácido glutâmico descarboxilase; *Postsynaptic neuron*= neurônio pós-sináptico; *GABA A*= receptor GABA A; *GABA B*= receptor GABA B; *Glial cell*= célula da glia; *GABA-T*= GABA transaminase; *Mitochondria*= mitocôndria; *Kreb's Cycle*= ciclo de Krebs; *Succinic acid*= ácido succínico; *glutamina sinthetase*= glutamina sintetase.

8. Interação entre Circuitos Neuroquímicos e Controle Motor

A interação entre o glutamato, o GABA e a dopamina nos núcleos da base tem sido sugerida como importante substrato neuronal para a organização de diversas funções relacionadas a atividade motora (Mora *et al.*, 2007). Embora a natureza destas interações seja ainda pouco entendida, as diversas disfunções envolvendo estes sistemas neurotransmissores têm sido

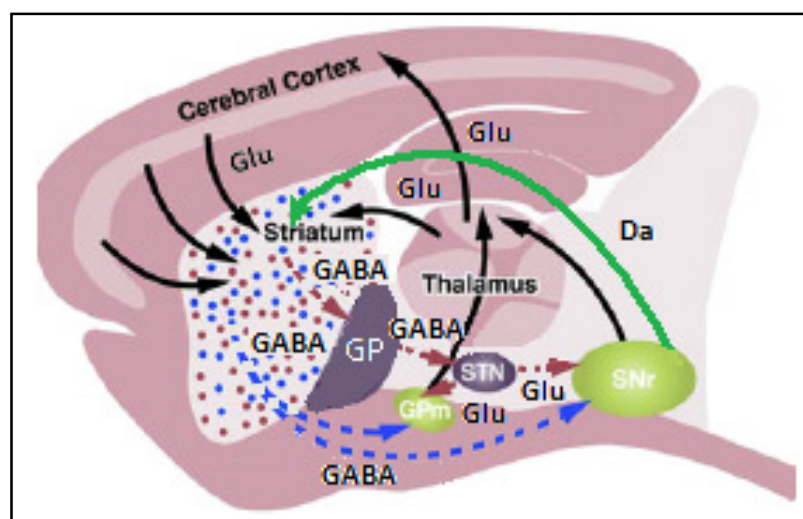
estudadas (Mora *et al.*, 2007; Cauli *et al.*, 2009). Na doença de Parkinson, por exemplo, fica evidente a interdependência das interações entre esses sistemas de neurotransmissores para a geração de respostas motoras, haja vista que, conforme Kickler *et al.* (2009) nesta patologia o distúrbio inicial provém de alterações na transmissão dopaminérgica na substância negra e, conseqüentemente, em disfunções nas transmissões GABAérgicas e glutamatérgicas capazes de promover importantes alterações na motricidade do indivíduo.

Alguns pesquisadores, utilizando modelo experimental, têm demonstrado a relação entre esses três sistemas de neurotransmissores. Segundo Cauli *et al.* (2009) a ativação de receptores glutamatérgicos no núcleo *accumbens* é capaz de melhorar respostas motoras, em modelos de encefalopatia hepática, através da ativação de mecanismos envolvendo o GABA e o glutamato no córtex cerebral. Kalivas & Duffy, (1997) utilizando modelos experimentais também observaram que aferências dopaminérgicas no estriado e núcleo *accumbens* são capazes de regular a neurotransmissão GABAérgica e glutamatérgica em circuitos corticoestriatais (Cepeda *et al.*, 1993; West *et al.*, 2003; Bamford *et al.*, 2004; Surmeier *et al.*, 2007) corroborando o papel destes neurotransmissores na execução de respostas motoras.

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

motoras adaptativas e compensar os déficits cerebelares apresentados por animais experimentais em consequência de uma hemicerebelectomia.

Além disto, através das vias motoras direta e indireta, envolvidas no controle do movimento, o estriado com suas aferências dopaminérgica e glutamatérgica e suas eferências GABAérgicas é capaz de influenciar neurônios nigrais, palidais e talâmicos e modular as respostas motoras (Mora *et al.*, 2007; Dostrovsky *et al.*, 2002; Kreitzer *et al.*, 2008) como um todo. A organização desses sistemas, conforme apresentado na figura 3, está de acordo com a participação dos neurotransmissores GABA e glutamato no controle dessas respostas.



Fonte: Adaptado a partir de Kreitzer, A.C. & Malenka, R.C. *Striatal Plasticity and Basal Ganglia Circuit Function. Neuron.* 2008; 60: 543-545.

Figura 3: Representação esquemática dos circuitos neuroquímicos dos núcleos da base, tálamo e córtex cerebral envolvidos no controle de respostas motoras. Em destaque (pontilhado) as vias motoras direta e indireta. *Cerebral cortex*= córtex cerebral; *Thalamus*= tálamo; *Striatum*= estriado; *GP*= globo pálido; *GPM*= globo pálido interno(medial); *STN*= núcleo subtalâmico; *SNr*= substância negra reticular; *Glu*= glutamato; *GABA*= ácido γ aminobutírico; *Da*= dopamina. As linhas pontilhadas representam, a via motora direta (estriado \rightarrow GPM e SNr \rightarrow tálamo \rightarrow córtex cerebral) e indireta (estriado \rightarrow GP \rightarrow STN \rightarrow GPM e SNr \rightarrow tálamo \rightarrow córtex cerebral).

9. Deficiência Maternal de Tiamina

A desnutrição neonatal constitui um dos maiores problemas sociais do mundo, ocorrendo com frequência, principalmente, em países subdesenvolvidos (Wurtmam & Wurtmam, 1975). A gravidade da desnutrição decorre do fato dos principais sistemas biológicos se desenvolverem na idade fetal e na infância, ocorrendo, o principal período de proliferação neuronal, antes do nascimento, e os processos de desenvolvimento das células gliais, mielinização e maturação bioquímica, no período pós-natal. Dessa forma, alterações nessas etapas do desenvolvimento têm potencial para provocar danos permanentes nos indivíduos (Wurtmam & Wurtmam, 1975).

Segundo Ramakrishnan *et al.* (1999), em média, 20 a 30% das mulheres grávidas sofrem de deficiência de vitaminas, uma vez que com a evolução da gravidez há um aumento das demandas nutricionais exigidas pelo organismo (Baker *et al.*, 1975). Estima-se que cerca de 75% das mulheres grávidas, sem suplementação alimentar, apresentariam déficits de pelo menos um tipo de vitamina (Ramakrishnan *et al.*, 1999). Neste contexto, a deficiência da vitamina B₁ merece destaque. Em estudos prévios, nosso grupo (Pires *et al.*, 2001; Pires *et al.*, 2005; Carvalho *et al.*, 2006) e outros autores (Butterworth, 2003; Butterworth *et al.*, 2008) mostraram que a deficiência da vitamina B₁ em indivíduos adultos, afeta diferentes aspectos neuroquímicos, morfológicos e cognitivos. Contudo, pouco se sabe a respeito dos efeitos desta deficiência nutricional em períodos pré e perinatal e suas possíveis consequências em fases posteriores do desenvolvimento do indivíduo (Butterworth, 1987).

Bâ *et al.* (1999, 2005) mostraram que a deficiência maternal de tiamina durante o período gestacional e/ou de amamentação pode acarretar, para a prole, uma série de distúrbios que vão

desde alterações histológicas em diferentes regiões encefálicas (Bâ *et al.*, 1999, 2005) até importantes alterações bioquímicas (Fournier & Butterworth, 1990) e morfoanatômicas (Roecklein *et al.*, 1985). Em estudos histológicos realizados no hipocampo de ratos que sofreram deficiência maternal de tiamina nos períodos pré, peri e pós-natal foi observado atrofia e diminuição da densidade de células piramidais e granulares nas regiões de CA1, CA2 e CA3 (Bâ *et al.*, 1999, 2005). Utilizando também modelos experimentais de deficiência de tiamina no período gestacional, Fournier & Butterworth, (1990) observaram redução na atividade de enzimas dependentes de tiamina relacionadas ao metabolismo energético, tais como a transcetolase citosólica, a piruvato desidrogenase e o complexo α -cetoglutarato desidrogenase. Roecklein *et al.* (1985) também observaram que uma dieta deficiente em tiamina durante a gestação associada ou não a injeções de piritiamina (inibidor da pirofosfoquinase) foi capaz de provocar retardo no desenvolvimento do feto. Em estudos mais recentes, utilizando cultura de neurônios granulares do cerebelo, nosso grupo (Oliveira *et al.*, 2007) mostrou que a deficiência da vitamina B₁ durante a gestação pode aumentar a susceptibilidade de grupos celulares encefálicos específicos à morte celular devido a uma redução na condutância dos canais de potássio dependentes de voltagem.

Considerando que o desenvolvimento cerebral se inicia no período pré-natal (Miller, 1995) é possível que uma restrição nutricional durante este período também seja capaz de alterar substratos biológicos necessários para o pleno funcionamento celular, principalmente, relacionados à formação do SNC (Davison & Dobbing, 1966). Trabalhos de Trostler *et al.* (1977) sustentam esta suposição. Segundo esses autores a deficiência maternal de tiamina pode provocar na prole, diminuição do peso cerebral e alterações neuroquímicas e metabólicas no SNC potencialmente capazes de interferir no processo de mielinização de neurônios.

Conforme apresentado, grande parte dos trabalhos realizados utilizando modelo de deficiência de tiamina, apresentam resultados de experimentos realizados de forma independente indicando alterações relacionadas a aspectos morfológicos celulares (Roeklein *et al.*, 1985; Bâ *et al.*, 1999, 2005), histológicos (Bâ *et al.*, 1999, 2005) bioquímicos (Fournier & Butterworth, 1990) e metabólicos (Trostler *et al.*, 1977) não se preocupando em analisar a relação dessas alterações com aspectos comportamentais específicos.

Dada a importância da tiamina na ontogênese (Greenwood *et al.*, 1985; Greenwood & Craig, 1987) e do seu importante papel em diferentes aspectos da fisiologia celular, estudos que objetivam esclarecer os mecanismos neuroquímicos afetados pela restrição ou deficiência dessa vitamina, durante o desenvolvimento, são importantes para se compreender a relação entre disfunções neurais e aspectos comportamentais específicos, como por exemplo, motores. Estes estudos podem elucidar mecanismos neurofisiológicos que atuam como substratos biológicos dessas funções comportamentais e, além disto, podem contribuir para o conhecimento dos distúrbios causados pela deficiência, em etapas precoces do desenvolvimento, que repercutem na prole e refletem na vida adulta.

Justificativa

De acordo com dados apresentados pela Organização Mundial de Saúde – WHO, (1999), apesar do número de pessoas mal nutridas no mundo ter diminuído nas últimas décadas, a deficiência de tiamina ainda é um fator preocupante em países em desenvolvimento. Segundo Rolfe *et al.* (1993) em regiões urbanas da África e Ásia ela é apontada como importante causa de complicações durante a gravidez e uma potencial causa, evitável, de morte materna. Embora a Organização Mundial de Saúde recomende uma suplementação de 0,4 e 0,5 mg/dia de tiamina durante a gestação e lactação, respectivamente, há evidências de que essa prática ainda não é muito habitual (Baker *et al.*, 2002). De acordo com dados apresentados por Baker *et al.* (2002) em um estudo que buscou analisar a concentração sanguínea de 10 diferentes tipos de vitaminas em 563 mulheres grávidas, a tiamina foi frequentemente encontrada em níveis abaixo do recomendado durante todos os trimestres da gravidez.

Conforme Wurtmam & Wurtmam, (1975) a gravidade da desnutrição durante a gravidez decorre do fato dos principais sistemas biológicos se desenvolverem na idade fetal e na infância, ou seja, alterações nessas etapas do desenvolvimento podem provocar danos permanentes nos indivíduos. Embora seja bem documentada a importância da tiamina durante o período gestacional (WHO, 1999; Bâ *et al.*, 1999, 2005) poucos são os trabalhos realizados com o propósito de se entender as consequências, biológicas e comportamentais, dessa deficiência nutricional durante esse período do desenvolvimento.

Alguns trabalhos nos quais foi realizada a indução da deficiência de tiamina no período gestacional de ratos têm apresentado dados que demonstram ampla variedade de prejuízos na prole, relacionados à aspectos morfológicos (Bâ *et al.*, 1999, 2005) e bioquímicos celulares

(Fournier & Butterworth, 1990). Apesar da vulnerabilidade seletiva de estruturas corticais à deficiência de tiamina (Butterworth, 1982; Butterworth, 2003) e do conhecimento de que essas estruturas estão relacionadas ao comportamento motor (Lalonde & Strazielle, 2007), não existem na literatura estudos delineados no sentido de se entender os efeitos desta deficiência, durante o período de ontogênese, na motricidade da prole na idade adulta. Um dos poucos trabalhos realizados neste contexto foi executado por Trostler *et al.* (1977) que, embora não tenham analisado o impacto da deficiência em aspectos motores específicos, observaram que animais que tiveram suas mães privadas de tiamina durante o período gestacional, apresentaram redução no diâmetro das camadas de mielina. Conforme Ure & Rodrigues, (2002) a mielinização pode traduzir informações sobre o funcionamento motor.

Considerando que os resultados obtidos por Bâ & Seri (1993, 1995) e Bâ (2008) estão de acordo com a hipótese que a deficiência de tiamina poderia interferir em circuitos neurais relacionados ao comportamento motor e, conhecendo as evidências sobre a importância da tiamina no desenvolvimento cerebral, levantamos as seguintes questões: a deficiência de tiamina maternal, durante o período de formação (perinatal) do sistema nervoso central, poderia afetar a motricidade de indivíduos da prole? Esses efeitos poderiam persistir por períodos posteriores da vida? Quais aspectos da atividade motora seriam afetados? Quais seriam os substratos biológicos relacionados às disfunções motoras específicas detectadas? Estudos delineados com o objetivo de contribuir para responder essas questões podem representar uma importante forma de se conhecer, não apenas componentes do mecanismo desses processos neurodegenerativos, como também a relação fisiológica entre funções motoras específicas e atividades neuroquímicas centrais. Além disto, o conhecimento dos substratos fisiológicos relacionados a esses aspectos motores podem ajudar no esclarecimento

dos mecanismos associados à outros distúrbios neurodegenerativos que também envolvem disfunções em aspectos motores, além daquele causado pela deficiência de tiamina.

1. Geral

Estudar, em modelo experimental, os efeitos da deficiência parcial de tiamina (restrição) durante o período perinatal sobre parâmetros bioquímicos e comportamentais de ratos adultos e a correlação entre esses diferentes parâmetros.

2. Específicos

2.1. Estabelecer o modelo de restrição de tiamina durante o período perinatal em ratos da linhagem *Wistar*;

2.2. Estabelecer as condições para aplicação dos métodos para avaliações das variáveis comportamentais (equilíbrio, coordenação motora e marcha) através dos testes *Rotarod* e Impressão das patas;

Em animais adultos provenientes de mães restritas e controles:

2.3. Avaliar o desempenho dos animais nos testes comportamentais, mencionados no item 2.2.;

2.4. Determinar as concentrações de GABA e glutamato no cerebelo, tálamo e medula espinhal;

2.5. Avaliar as correlações entre os parâmetros neuroquímicos e entre esses e os comportamentais.

1. Estabelecimento do Modelo e Delineamento Experimental

No presente estudo foram utilizados ratos machos e fêmeas da linhagem *Wistar* fornecidos pelo Centro de Bioterismo (CEBIO) da Universidade Federal de Minas Gerais. Durante os experimentos, todos os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Neurociência Comportamental e Molecular (LaNeC) desta mesma Instituição. Os animais foram mantidos em condições adequadas de umidade e temperatura, em ciclos de 12 horas claro/escuro, recebendo água e ração *ad libitum*. Todos os procedimentos experimentais foram registrados e submetidos ao Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA), com o número de protocolo 153/09.

Durante, aproximadamente, 12 dias, amostras de secreção vaginal das fêmeas foram coletadas e analisadas através do microscópio óptico para a detecção do melhor dia para a ocorrência do acasalamento. Quando as fêmeas se encontravam no período proestro um rato *Wistar* macho foi colocado dentro da gaiola (caixa plástica forradas com maravalha) na proporção de 1:2 fêmeas. A ocorrência do acasalamento foi confirmada pela presença de espermatozóide no esfregaço vaginal das fêmeas, indicando o primeiro dia de gestação.

Fêmeas grávidas foram, aleatoriamente, selecionadas e mantidas individualmente em caixas plásticas forradas com maravalha, por todo o período gestacional (cerca de 21 dias), recebendo ração padrão (Mães Controle) ou ração restrita em tiamina (Mães Restritas). O tratamento foi do décimo primeiro dia de gestação até o quinto dia de amamentação da prole. A dieta restrita em tiamina correspondeu a 90% de restrição em tiamina com relação à dieta controle. As concentrações de todos os demais constituintes

da ração foram iguais àsquelas da ração padrão. A composição da ração está apresentada nas tabelas 1, 2 e 3.

No primeiro dia após o parto a prole, proveniente de pelo menos três mães de cada grupo, foi inspecionada e somente os machos permaneceram com as mães em uma proporção de cinco a oito filhotes por fêmea. Após o desmame, todos os filhotes foram alimentados com ração comercial, contendo concentrações padrões de todos os constituintes, por todo o período restante do experimento. Dez animais provenientes de mães restritas e 10 provenientes de mães controle foram, aleatoriamente, selecionados para serem avaliados na idade adulta (~ 3 meses de idade), quanto a aspectos motores e neuroquímicos, conforme descrito a abaixo. A figura 4 mostra de forma esquemática, o delineamento do estudo, ao longo do tempo, a partir do nascimento da prole.

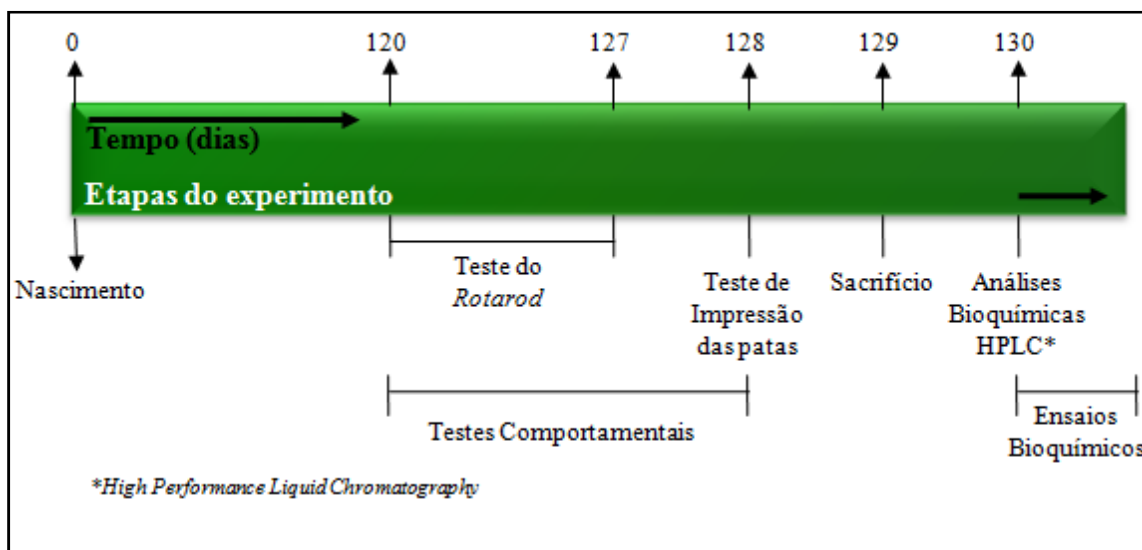


Figura 4: Representação esquemática do delineamento experimental, a partir do nascimento da prole. A parte superior da barra representa a escala do tempo (em dias) e a parte inferior indica as etapas do experimento.

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

Tabela 1: Composição da ração produzida no laboratório (padrão)

* 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

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

Tabela 2: Composição da mistura de sais

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

Tabela 3: Composição da mistura de vitaminas

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

2. Estudos Comportamentais

Os testes comportamentais foram executados com os animais (da prole) na fase adulta, quando esses estavam com aproximadamente 3 meses de idade.

2.1. Teste do *Rotarod*

2.1.1. Equipamento

O *rotarod* consiste em um aparelho composto por um cilindro giratório de 5 cm de diâmetro e 28 cm de comprimento posicionado horizontalmente a 40 cm de uma plataforma e conectado a um motor elétrico que funciona em diferentes velocidades

(figura 5). O animal é colocado sobre o cilindro em rotação ajustada e deve tentar manter o corpo em equilíbrio, realizando todos os ajustes posturais necessários, através da coordenação dos movimentos de suas quatro patas (Wang *et al.*, 2006).

2.1.2. Avaliação do equilíbrio e coordenação motora

O teste do *rotarod* foi utilizado para avaliar o equilíbrio e a coordenação motora dos ratos (Shi *et al.*, 2007; Simola *et al.* 2008). O protocolo utilizado foi adaptado a partir do descrito por Simola *et al.* (2008) e consistiu de uma sessão de aclimação, uma de treinamento e uma sessão de teste.

Durante a sessão de *aclimação*, que foi realizada por três dias consecutivos, os ratos foram colocados sobre o cilindro giratório com o aparelho desligado (zero rotação por minuto – 0 rpm) durante 5 minutos em três tentativas consecutivas, sendo o intervalo intertentativa de 30 minutos.

Posteriormente, foi realizada a sessão de *treinamento*, na qual os animais, por três dias consecutivos, foram treinados a permanecerem sobre o cilindro giratório a uma velocidade constante de 5 rpm. A sessão de treinamento constituiu-se de duas oportunidades para cada rato (duas tentativas) por dia, durante 5 minutos e também com um intervalo de 30 minutos entre as tentativas. Durante o treino, se o animal caísse, esse era reconduzido à barra pelo experimentador.

As últimas sessões, correspondentes aos *testes*, foram realizadas 24 e 48 horas após o final do último dia de treinamento. Nos testes os animais foram submetidos a um procedimento semelhante a um dia de treinamento, entretanto foi dado para cada rato 3 oportunidades (três tentativas) em cada um dos dias de teste. Quando o animal sofria uma queda o mesmo era retirado do aparelho e o tempo de permanência sobre o cilindro, sem cair (latência), registrado. Os dados foram expressos como a média \pm erro padrão de 3 tentativas. Para o teste realizado vinte e quatro horas após o último dia de treinamento, a velocidade constante do aparelho foi de 5 rpm (Simola *et al.*, 2008) e para quarenta e oito horas, 25 rpm (Dhir *et al.*, 2008). Em todas as tentativas da aclimação, treino e testes, os animais foram colocados perpendicularmente ao eixo do cilindro com a cabeça voltada em direção oposta ao sentido da rotação.



Figura 5: Fotografia do equipamento utilizado para a avaliação do equilíbrio e coordenação motora dos animais (*Rotarod*).

2.2. Teste de Impressão das Patas

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

2.2.1. Equipamento e procedimento

O aparelho é colocado em uma sala iluminada e consiste em um “corredor” de madeira (10x10x70cm), forrado com papel branco, o qual apresenta em uma de suas extremidades uma caixa escura (figura 6). Os roedores naturalmente procuram se alojar em ambientes mais seguros e pouco iluminados, assim, quando o animal é colocado na extremidade do corredor oposta à caixa, ele caminha em direção à mesma. As patas traseiras dos animais são previamente pintadas com tinta preta não tóxica, para que ao caminhar sobre o papel, as pegadas de suas patas sejam registradas. Este procedimento é repetido pelo menos três vezes (três tentativas) para cada animal.



Figura 6: Fotografia do equipamento utilizado para a avaliação dos componentes da marcha, comprimento e largura dos passos, dos animais.

2.2.2. Avaliação do padrão da marcha

O padrão da marcha foi avaliado em um mínimo de cinco ciclos de marcha para cada tentativa e os dados expressos como a média de pelo menos três tentativas, conforme mencionado acima. Um ciclo completo de marcha foi definido, conforme Lagrán *et al.* (2004), como a distância de um par de patas traseiras para o próximo par de patas traseiras. Dois parâmetros foram avaliados: o comprimento e a largura do passo. O comprimento do passo foi medido como a distância média de locomoção entre uma pata e a próxima imediatamente à frente. Já a largura, foi medida como a distância média entre as patas traseiras, direita e esquerda.

3. Dissecção do cérebro e medula espinhal

No dia seguinte à última avaliação comportamental, os animais foram mortos por decapitação. O cérebro, juntamente com o cerebelo foi rapidamente retirado da cavidade craniana e dissecado de acordo com as coordenadas estereotáticas apresentadas por Paxinos & Watson, (1986). O encéfalo foi colocado ventralmente sobre uma superfície plana e o cerebelo foi separado do cérebro e do tronco encefálico. Em seguida foi realizado um corte sagital no cérebro, separando os dois hemisférios, para possibilitar a visualização da região medial diencefálica e permitir a retirada dos tálamos. Todos os procedimentos para a separação das regiões encefálicas foram executados sobre uma *Placa de Petri* invertida sobre pedaços de gelo.

Para a retirada dos segmentos medulares de T₁ e T₂ foi realizado um corte transversal imediatamente acima do processo espinhoso da primeira vértebra torácica (T₁) e

imediatamente abaixo da segunda vértebra torácica (T₂). Em seguida foi realizado laminectomia e retirado o fragmento medular. Todas as amostras teciduais foram acondicionadas em tubos plásticos tipo *Eppendorf* e armazenadas a -80°C. Os ensaios bioquímicos, descritos abaixo, foram executados dentro de no máximo 15 dias.

4. Estudos Bioquímicos

4.1 Determinação da concentração de GABA e glutamato

Todos os procedimentos realizados para a dosagem dos neurotransmissores GABA e glutamato foram executados através da técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC= *High Performance Liquid Chromatography*) através do método desenvolvido por nosso grupo (Freitas-Silva *et al.*,2009), conforme descrito abaixo.

4.2. Processamento das amostras

As amostras de cerebelo, tálamo e medula espinhal foram pesadas (aproximadamente 10 mg de cada estrutura) e homogeneizadas em 15 volumes de solução constituída por metanol e água (85:15 v/v). Em seguida, a suspensão foi centrifugada, a 4°C, durante 15 minutos, em uma força centrífuga relativa de 7.800 x g (Sorvall RC-5B). O sobrenadante obtido foi coletado e mantido no gelo até ser submetido à derivatização.

4.3. Procedimento de Derivatização

O objetivo da derivatização é aumentar a sensibilidade de detecção e a seletividade da separação cromatográfica. A derivatização pré-coluna das amostras foi realizada conforme descrito previamente por Mengerink *et al.* (2002) e Kutlán & Molnár-Perl,

(2003). A reação de derivatização foi feita misturando-se 200 μL de amostra, 40 μL de orto-oftaldeído (OPA) metanólico (5 mg/mL) preparado diariamente, 150 μL de tampão borato (pH 9,9) e 10 μL de ácido 3-mercaptopropiônico (MPA). A solução resultante foi agitada e injetada no sistema cromatográfico após 1 minuto, à temperatura ambiente. Abaixo seguem as descrições detalhadas sobre o sistema cromatográfico e método utilizado para separação, detecção e análise dos neurotransmissores.

4.4. Equipamento e princípios de funcionamento

Conforme esquema apresentado na figura 7, o equipamento de cromatografia líquida, HPLC, é composto de um reservatório para o tampão de separação (fase móvel), bomba, válvula de injeção, pré-coluna, coluna (fase estacionária), detector (fluorescência) e integrador. A seguir uma descrição simplificada dos componentes e do princípio de funcionamento: a bomba impulsiona a fase móvel pelo sistema até a coluna e, nesse trajeto a fase móvel arrasta a amostra até a coluna, local onde ocorrerá a separação dos compostos de acordo com o grau de polaridade dos componentes da mistura. Após a separação, os componentes da amostra passam pelo detector, neste caso um fluorímetro, o qual através de um determinado comprimento de onda permite a detecção dos componentes de interesse que eluem da coluna em tempos diferentes. O integrador, então capta a intensidade de fluorescência emitida pelo detector e a transforma em dados digitais. Os picos gerados pela fluorescência de cada composto podem ser visualizados, no formato digital ou impresso, e constituem o perfil cromatográfico de uma determinada amostra. Com a utilização de uma curva padrão, onde concentrações conhecidas dos compostos de interesse são aplicadas no sistema, análises quantitativas podem ser obtidas a partir do programa associado ao integrador. O resultado é expresso

em concentrações dos neurotransmissores ($\mu\text{g/g}$ de tecido) calculada através da área dos picos de cada componente separado e detectado.

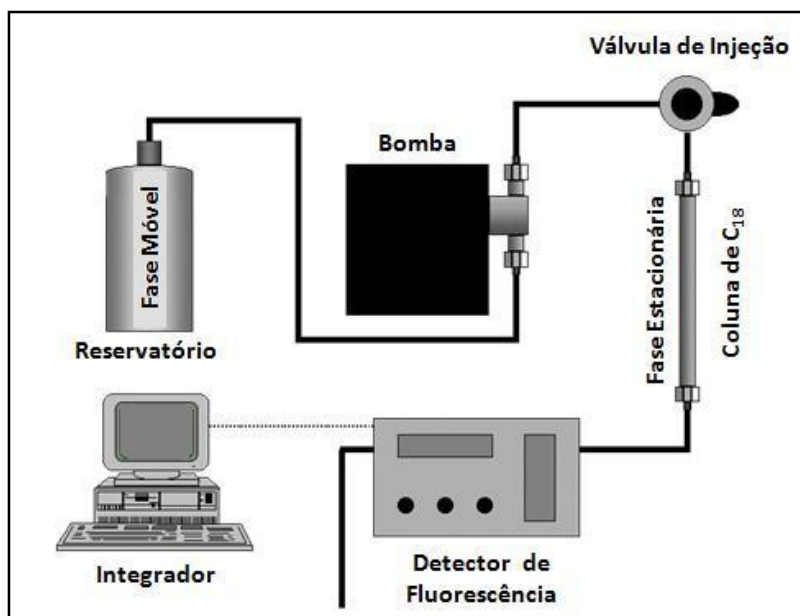


Figura 7: Representação esquemática dos componentes de um aparelho de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).

4.5. Condições Cromatográficas

O sistema cromatográfico utilizado é um cromatógrafo Shimadzu (LC-10AD, Tokyo, Japan) com válvula injetora de 200 μL (Rheodyne 7725-I, California, USA) e detector fluorescente (FLD - Shimadzu spectrofluorometric detector RF-551, Tokyo, Japan) acoplado a uma bomba modelo LC-10. Os comprimentos de onda, de excitação e emissão, utilizados foram de 337 e 454 nm, respectivamente. Uma coluna cromatográfica analítica de fase reversa C18 (150 mm \times 4,6 mm, ID) e uma pré-coluna (RT 250-4 E. Merck, Darmstadt E.R., Germany) foram utilizadas nas análises. O

integrador (Shimadzu C-R7Ae plus) acoplado ao sistema cromatográfico forneceu a área dos picos dos cromatogramas a partir da intensidade de fluorescência obtida nas análises. A fase móvel isocrática consistiu de uma solução 0,05M de acetato de sódio, tetrahydrofurano e metanol (50:1:49 v/v), pH 4,0. O tempo médio de eluição do glutamato e GABA foi de aproximadamente $2,74 \pm 0,35$ e $7,82 \pm 0,51$ minutos, respectivamente e as concentrações em $\mu\text{g/g}$ de tecido foram calculadas de acordo com as áreas dos picos e respectivas curvas padrões. Para ilustrar, um perfil cromatográfico está apresentado na figura 8.

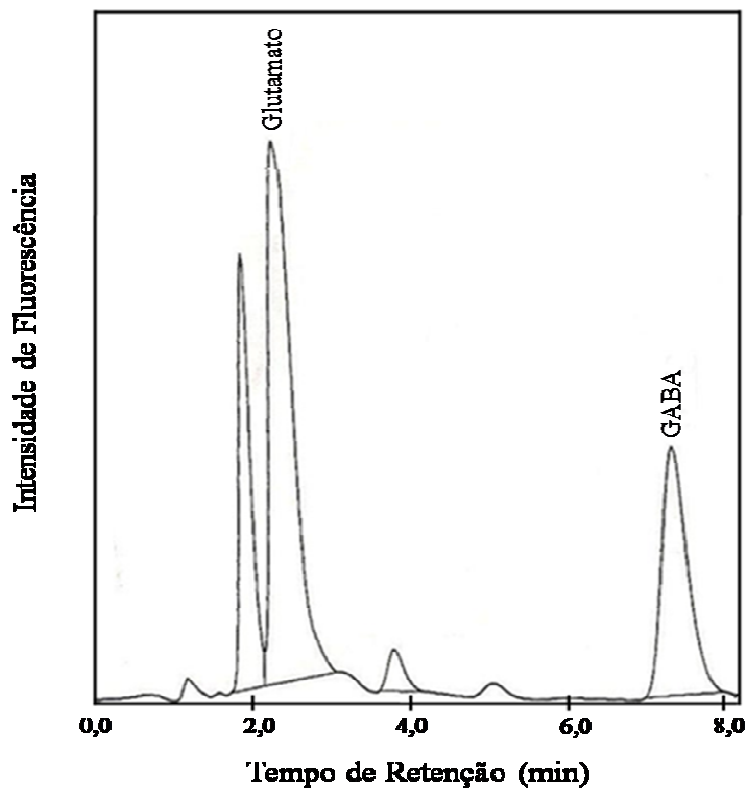


Figura 8: Cromatograma representativo da análise da concentração de Glutamato e GABA no tálamo dos animais do grupo controle. O tempo médio de retenção \pm dpa para Glutamato e GABA foi de $2,74 \pm 0,35$ e $7,82 \pm 0,51$ minutos, respectivamente.

5. Análise Estatística

Todos os dados obtidos foram analisados através do programa *Statistical Package for the Social Sciences (SPSS)*, versão 12.0. Os dados obtidos nos testes comportamentais e bioquímicos foram tratados por *One-Way ANOVA* de forma independente, sendo os valores expressos como média e erro padrão. Os dados relativos ao desempenho dos animais no *rotarod* foram analisados pelo *Mann–Whitney U* uma vez que os dados tratados através do teste *Kolmogorov-Smirnov* não apresentaram distribuição normal. As seguintes análises de regressão linear (Winer, 1962) foram realizadas: i) *entre GABA e glutamato* nas três regiões, tálamo, cerebelo e medula espinhal; ii) *entre GABA ou glutamato nas três regiões e desempenho no rotarod*; iii) *entre GABA ou glutamato nas três regiões analisadas e largura do passo* e vi) *entre GABA ou glutamato nas três regiões analisadas e comprimento do passo*. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas no nível de 5 % ($p < 0,05$).

Consideração Sobre o Tamanho da Amostra Utilizada nas Análises Estatísticas

Embora o estudo tenha iniciado com uma amostra total de 20 animais (n=10 em cada grupo), todos os resultados apresentados são referentes a uma amostra de 18 animais, pois 2 animais do grupo controle ficaram doentes e foram excluídos das análises.

Apresentação dos Resultados na Forma Gráfica

Para efeito de simplificação, nas representações gráficas, os grupos são denominados pela associação de caracteres: MC = grupos de animais provenientes de mães que receberam dieta padrão durante o período perinatal (controle) e MR = grupos de animais provenientes de mães que receberam dieta restrita de tiamina durante o mesmo período.

1. Estudos Comportamentais

1.1. Rotarod test

O teste de *Mann-Whitney U* mostrou que o desempenho dos animais no *rotarod* foi significativamente afetado pela restrição de tiamina durante o período perinatal. Animais nascidos de mães restritas (grupo MR) apresentaram significativa redução da média dos tempos (latência) que permaneceram sobre a barra do *rotarod* na velocidade constante de 25 rpm, teste realizado 48 horas após o treino, quando comparados aos animais provenientes de mães controle (grupo MC) [*Mann Whitney U*=12,500; $p = 0,01$] (Figura 9). Entretanto, para a velocidade de 5 rpm, teste realizado 24 horas após o treino, não foi observado diferença significativa entre os grupos [$F_{(1,16)} = 0,79$; $p = 0,39$] (Figura 9, Tabelas 4 e 5).

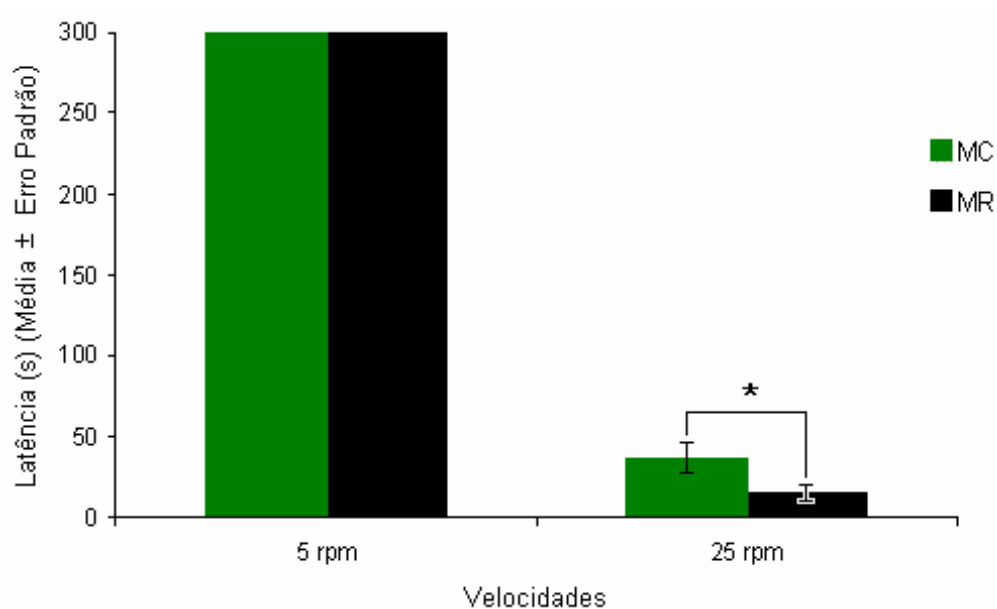


Figura 9: Dados do desempenho no teste do *Rotarod* dos animais provenientes de mães controles (MC), barras verdes, e restritas em tiamina (MR), barras pretas. Média de três tentativas \pm erro padrão, do tempo (segundos) de permanência sobre a barra giratória do *Rotarod* nas velocidades de 5 e 25 rpm. * $p < 0,05$, MC (n=8) versus MR (n=10).

Animais Grupo MC (controle)	Média das latências de três tentativas	
	5 rpm (segundos)	25 rpm (segundos)
1	300	15,0
2	300	36,7
3	300	14,3
4	300	10,0
5	300	47,0
6	300	100,0
8	300	26,0
10	300	43,3
Média ± Erro Padrão	300 ± 0	36,5 ± 9,2

Tabela 4: Dados referentes ao desempenho dos animais do grupo CONTROLE (MC) no teste do *Rotarod* nas velocidades de 5 e 25 rpm. Os resultados representam a média de três tentativas para cada rato, em cada uma das velocidades. As médias ± erro padrão, para cada grupo, são apresentadas na última linha.

Animais Grupo MR (restrito)	Média das latências de três tentativas	
	5 rpm (segundos)	25 rpm (segundos)
1	300	22,0
2	300	2,7
3	300	4,7
4	300	8,3
5	300	8,3
6	300	14,3
7	298	12,3
8	300	59,7
9	300	9,7
10	300	3,7
Média ± Erro Padrão	299,8 ± 0,2	14,6 ± 5,3

Tabela 5: Dados referentes ao desempenho dos animais do grupo RESTRITO (MR) no teste do *Rotarod* nas velocidades de 5 e 25 rpm. Os resultados representam a média de três tentativas para cada rato, em cada uma das velocidades. As médias ± erro padrão, para cada grupo, são apresentadas na última linha.

1.2. Teste de Impressão das Patas

Conforme mencionado na sessão “Material e Métodos”, através deste teste foram analisadas duas variáveis: o comprimento e a largura do passo das patas traseiras dos animais, conforme apresentado na figura 10, painel A. Não houve diferença significativa entre a média do comprimento dos passos dos grupos MC e MR [$F_{(1,16)} = 1,39$; $p = 0,26$] (Figura 10, painel B). Entretanto, foi observado um aumento significativo na média da largura do passo dos animais do grupo MR [$F_{(1,16)} = 5,40$; $p = 0,03$] (Figura 10, painel B). As tabelas 6 e 7 apresentam os dados referentes à largura e o comprimento do passo dos animais.

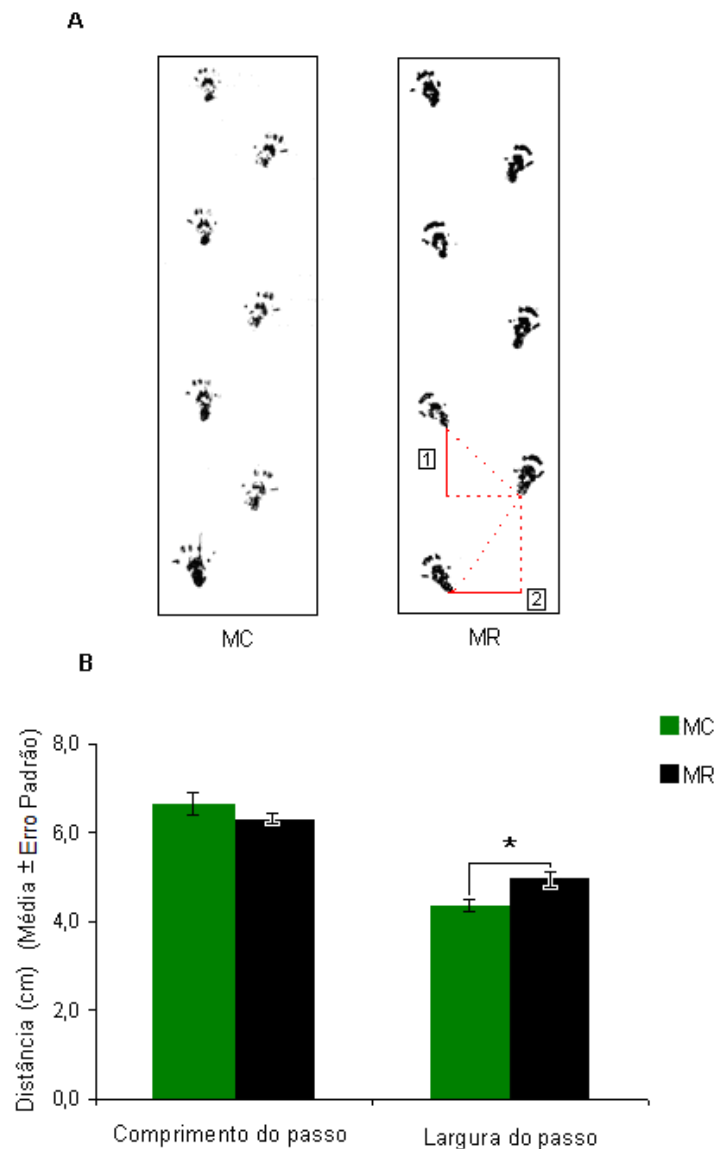


Figura 10: Dados do desempenho dos animais no teste de impressão das patas. **Painel A:** Representação das pegadas dos animais dos grupos MC (esquerda) e MR (direita). As linhas contínuas, em vermelho, com as marcações 1 (vertical) e 2 (horizontal) representam, respectivamente, o comprimento e a largura do passo. **Painel B:** Dados quantitativos, Média \pm Erro Padrão do comprimento e largura dos passos, em cm, dos animais durante a marcha. O padrão da marcha foi analisado utilizando-se um mínimo de 5 ciclos de marcha para cada tentativa, e a média de pelo menos três tentativas. Os grupos são denominados pela associação de caracteres: MC = animais provenientes de mães controle (coluna verde) e MR = animais provenientes de mães restritas (coluna preta). * $p < 0,05$ MC (n=8) versus MR (n=10).

Animais Grupo MC (controle)	Distâncias referentes às pegadas dos animais	
	Largura do passo (cm)	Comprimento do passo (cm)
1	4,13	5,70
2	5,13	6,37
3	3,61	6,68
4	4,04	6,60
5	4,11	7,07
6	4,84	6,79
8	3,92	5,64
10	4,62	8,15
Média ± Erro Padrão	4,30 ± 0,18	6,63 ± 0,28

Tabela 6: Dados do teste de impressão das patas referente à largura e ao comprimento do passo dos animais do grupo CONTROLE (MC). Os resultados apresentados representam, para cada animal, a média de três tentativas e pelo menos cinco ciclos de marcha. As médias \pm erro padrão, para cada grupo, são apresentadas na última linha.

Animais Grupo MR (restrito)	Distâncias referentes às pegadas dos animais	
	Largura do passo (cm)	Comprimento do passo (cm)
1	5,55	6,10
2	4,35	7,10
3	6,12	6,24
4	4,21	5,87
5	5,50	6,51
6	4,93	6,42
7	5,03	6,33
8	4,33	6,52
9	4,45	6,07
10	4,94	5,72
Média ± Erro Padrão	4,94 ± 0,20	6,29 ± 0,12

Tabela 7: Dados do teste de impressão das patas referente à largura e ao comprimento do passo dos animais do grupo RESTRITO (MR). Os resultados apresentados representam, para cada animal, a média de três tentativas e pelo menos cinco ciclos de marcha. As médias \pm erro padrão, para cada grupo, são apresentadas na última linha.

2. Estudos Bioquímicos

2.1. Determinações das concentrações de glutamato e GABA

As concentrações médias de cada um dos neurotransmissores, glutamato e GABA, encontradas no tálamo, cerebelo e medula espinhal dos animais dos grupos MC e MR estão apresentadas na figura 11.

Glutamato: *One-Way ANOVA* não mostrou efeito significativo da restrição maternal de tiamina na concentração média de glutamato no tálamo [MC = $4132,60 \pm 860,19$; MR = $4115,88 \pm 674,29$; $F_{(1,16)} = 0,00$; $p = 0,96$] e medula espinhal [MC = $2193,36 \pm 422,18$; MR = $2035,93 \pm 223,18$; $F_{(1,16)} = 1,04$; $p = 0,32$] da prole. Entretanto, a concentração média de glutamato no cerebelo [MC = $5219,31 \pm 1071,13$; MR = $3999,24 \pm 421,39$; $F_{(1,16)} = 11,01$; $p = 0,00$] dos animais do grupo MR foi significativamente menor que a dos animais do grupo MC (painel A, figura 11).

GABA: Em relação ao GABA, não foi observado diferença significativa entre as concentrações médias desse neurotransmissor, quando se compara os animais do grupo MC com os animais do grupo MR, no cerebelo [MC = $221,07 \pm 77,61$; MR = $199,37 \pm 78,37$; $F_{(1,16)} = 0,344$; $p = 0,57$] e medula espinhal [MC = $82,37 \pm 32,35$; MR = $85,73 \pm 33,53$; $F_{(1,16)} = 0,05$; $p = 0,83$]. No entanto, foi observado aumento significativo de sua concentração no tálamo [MC = $192,11 \pm 33,00$; MR = $250,64 \pm 65,54$; $F_{(1,16)} = 5,26$; $p = 0,04$] nos animais nascidos de mães restritas (MR), conforme apresentado na figura 11, painel B.

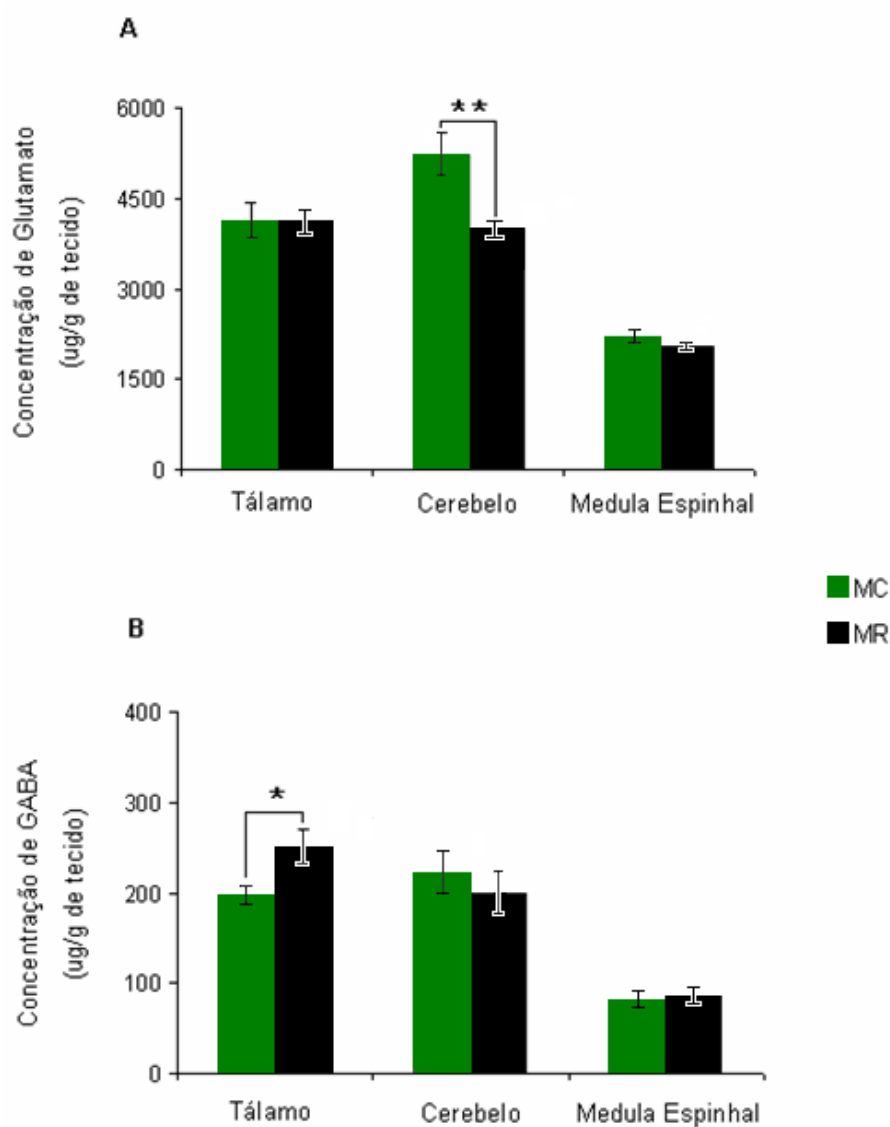


Figura 11: Concentrações em $\mu\text{g/g}$ de tecido (média \pm erro padrão) de glutamato (Painel A) e GABA (Painel B) no tálamo, cerebelo e medula espinhal dos animais dos grupos MC, barras verdes, e MR, barras pretas. Os grupos são denominados pela associação de caracteres: MC: animais provenientes de mães controle e MR: animais provenientes de mães restritas. * $p < 0.05$. ** $p < 0.01$, MC (n=8) *versus* MR (n=10).

3. Estudos de Correlação

De posse dos dados bioquímicos e comportamentais, *Análises de Regressão Linear* foram realizadas para avaliar possíveis correlações entre os diversos parâmetros determinados.

Não foi verificada correlação significativa entre as concentrações de glutamato (em qualquer uma das três regiões analisadas) e as variáveis comportamentais (latência no *Rotarod* ou comprimento do passo ou largura do passo), para os grupos MC e/ou MR (dados em anexo, tabelas 8 a 25). Por outro lado, a análise de regressão linear mostrou correlação significativa entre o desempenho no teste do *Rotarod* (latência) dos animais nascidos de mães controle e a concentração de GABA no tálamo [$r = -0,73$; $p = 0,04$] (Figura 12). Entretanto, não foi observada correlação significativa entre esses dois parâmetros determinados nos animais nascidos de mães restritas [$r = 0,01$; $p = 0,97$] (Figura 12). Não foram observadas também correlações significativas entre as concentrações de GABA, no cerebelo ou medula espinhal, e o desempenho no teste do *Rotarod* para os animais de nenhum um dos grupos (dados em anexo, tabelas 26 a 29).

Foram observadas correlações significativas entre a média da largura do passo dos animais do grupo MC e a concentração de GABA no tálamo [$r = -0,86$; $p = 0,006$] e cerebelo [$r = 0,73$; $p = 0,04$], conforme apresentado na figura 13, painel A e B, respectivamente, entretanto não foi encontrada correlação entre essas variáveis para os animais do grupo MR (Figura 13, painel A e B).

A figura 14 apresenta os dados referentes ao comprimento do passo e a concentração de GABA no tálamo (painel A) e cerebelo (painel B) dos animais dos grupos MC e MR. Não houve correlação significativa entre esses parâmetros no tálamo para ambos os grupos, MC [$r = -0,59$; $p = 0,12$], MR [$r = -0,07$; $p = 0,83$], nem no cerebelo para os animais do grupo MC [$r = -0,02$; $p = 0,95$]. Entretanto houve correlação significativa entre o comprimento do passo e a concentração de GABA no cerebelo no grupo MR [$r = -0,71$; $p = 0,02$].

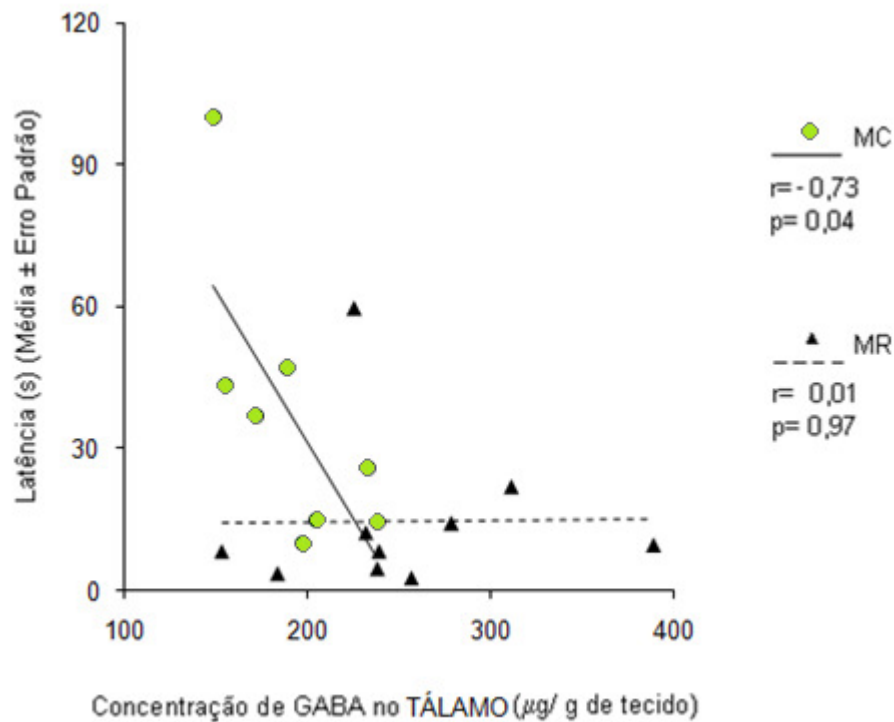


Figura 12: Gráfico de Dispersão, mostrando a correlação entre a latência (segundos) de permanência dos animais na barra giratória do *Rotarod* e a concentração de GABA ($\mu\text{g/g}$ tecido) no tálamo, para os animais dos grupos MC (linha contínua e círculos verdes cheios) e MR (linhas pontilhadas e triângulos pretos cheios). Velocidade constante da barra giratória: 25 rpm. Para cada animal, os dados comportamentais representam a média de três tentativas e a concentração de GABA a média da determinação em três amostras. Os grupos são denominados pela associação de caracteres: MC - animais provenientes de mães controle e MR – animais provenientes de mães restritas. * $p < 0.05$, MC (n=8) *versus* MR (n=10).

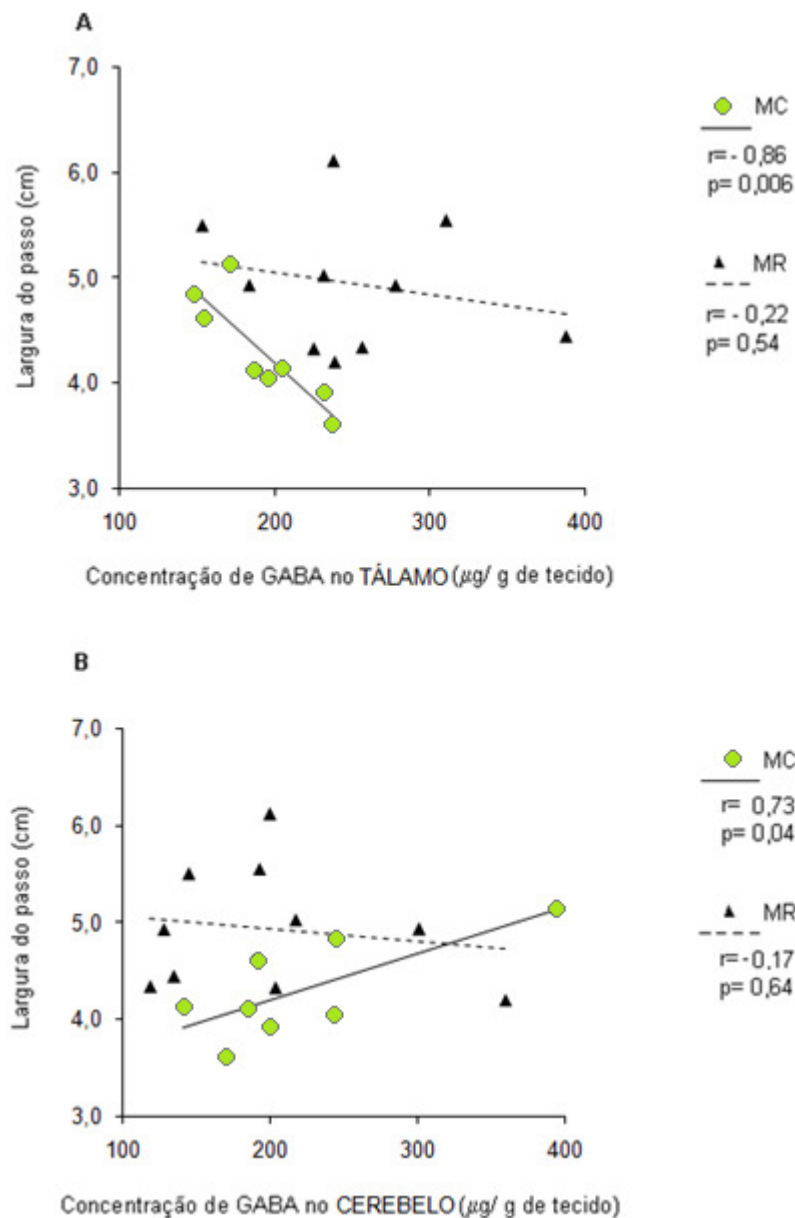


Figura 13: Gráfico de Dispersão, mostrando a correlação entre a largura do passo e a concentração de GABA ($\mu\text{g/g}$ tecido) no TÁLAMO (Painel A) e CEREBELO (Painel B) para os animais dos grupos MC (linha contínua e círculos verde cheios) e MR (linhas pontilhadas e triângulos pretos cheios). Para cada animal, a largura do passo foi avaliada através da média de três tentativas para um mínimo de 5 ciclos de marcha e a concentração de GABA no tálamo e cerebelo pela média de triplicatas para cada estrutura. Os grupos são denominados pela associação de caracteres: MC - animais provenientes de mães controle e MR – animais provenientes de mães restritas. * $p < 0.01$, MC (n=8) versus MR (n=10).

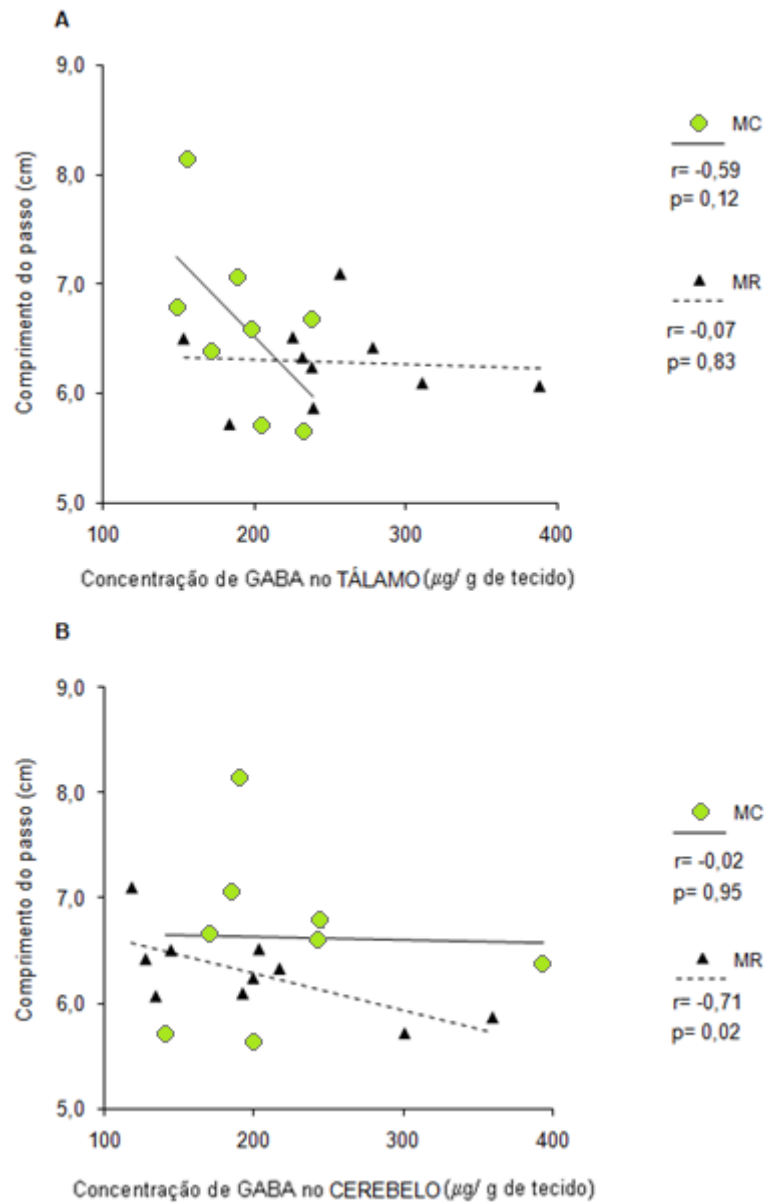


Figura 14: Gráficos de Dispersão mostrando a correlação entre o comprimento do passo e a concentração de GABA ($\mu\text{g/g}$ tecido) no TÁLAMO (Painel A) e CEREBELO (Painel B) para os animais dos grupos MC (linha contínua e círculos verdes cheios) e MR (linhas pontilhadas e triângulos pretos cheios). Para cada animal os dados representam: para o comprimento do passo a média de três tentativas para um mínimo de 5 ciclos de marcha e, para a concentração de GABA a média de determinações realizadas em triplicatas. Os grupos são denominados pela associação de caracteres: MC - animais provenientes de mães controle e MR – animais provenientes de mães restritas. * $p < 0,05$, MC (n=8) versus MR (n=10).

No presente estudo foram avaliados os efeitos de uma dieta restrita (deficiente) em tiamina, durante o período perinatal, sobre parâmetros motores e neuroquímicos da prole na idade adulta. Apresentamos, pela primeira vez, dados indicando que a restrição de tiamina durante esse período afeta a prole quanto ao: (a) equilíbrio e a coordenação motora; (b) padrão da marcha e; (c) níveis de glutamato e GABA, em regiões específicas do sistema nervoso central. Além disto, foi observado que níveis do neurotransmissor inibitório, GABA, correlacionam-se com aspectos específicos do comportamento, sugerindo a importância desse sistema nos ajustes relacionados à atividade motora.

Natureza das Alterações Comportamentais e Bioquímicas

A deficiência de tiamina provoca uma série de anormalidades comportamentais em animais experimentais (Gibson *et al.*, 1982), as quais, através de testes e tarefas específicas, podem ser avaliadas e detectadas (Whishaw & Kolb, 2005). No presente estudo, através da utilização de um teste específico, *rotarod*, para avaliação do equilíbrio e coordenação motora, (Shi *et al.*, 2007; Simola *et al.* 2008) foi observado que animais provenientes de mães alimentadas com dieta restrita em tiamina, durante o período perinatal, apresentaram pior desempenho quando comparados com os animais provenientes de mães alimentadas com dieta padrão. Shi *et al.* (2007) embora não tenham analisado especificamente a prole de mães submetidas à deficiência de tiamina observou que animais adultos submetidos diretamente a esta deficiência apresentaram redução em até 97% no desempenho nesta mesma tarefa, o que está de acordo com os resultados encontrados, no presente estudo, para os animais submetidos à restrição indireta, ou seja, através da mãe em período importante do desenvolvimento e avaliados, posteriormente, na fase adulta. O baixo desempenho no *rotarod*, de animais

expostos direta ou indiretamente a episódios de deficiência de tiamina pode ser explicado, pelo menos em parte, pela vulnerabilidade seletiva, à deficiência de tiamina, de algumas estruturas encefálicas (Lavoie & Butterworth, 1995) especializadas em integrar e modular respostas relacionadas ao equilíbrio e coordenação motora do indivíduo (Lalonde & Strazielle, 2007). Conforme Martin *et al.* (2003), o cerebelo, estrutura a qual é atribuída estes papéis (Lalonde & Strazielle, 2007), apresenta-se seletivamente comprometido na deficiência de tiamina, principalmente a região do *vérmis* cerebelar (Lavoie & Butterworth, 1995; Baker *et al.*, 1999) a qual é vista histologicamente, sob estas condições, com significativa redução no número e tamanho das células de Purkinje (Philips *et al.*, 1987). De acordo com Jahn *et al.* (2008) lesão na região do *vérmis* cerebelar é condizente com quadro clínico de perda de equilíbrio e coordenação motora.

Outra hipótese para a ocorrência dos déficits de equilíbrio e coordenação motora observada nos animais seria em relação à perda ou redução na comunicação excitatória do cerebelo com outras estruturas encefálicas relacionadas com a motricidade, especialmente, o estriado. Devido à existência de conexões do cerebelo com esta estrutura, via núcleos talâmicos, (Ichinohe *et al.*, 2000; Hoshi *et al.*, 2005) também é plausível que danos na estrutura cerebelar provoque interrupção da comunicação excitatória glutamatérgica (Uusisaari *et al.*, 2007) ao tálamo e, conseqüentemente, diminuição de sua modulação (Dostrovsky *et al.*, 2002) sobre células nigroestriatais dopaminérgicas, interferindo, portanto, na organização dos circuitos motores subcorticais e possibilitando o surgimento dos sinais clínicos apresentados pelos animais. Esta hipótese está de acordo com os resultados obtidos no presente estudo que mostram uma diminuição significativa na concentração de glutamato no cerebelo desses

animais e também são compatíveis com as evidências obtidas por Kirik *et al.* (1998); Barneoud *et al.* (2000); Deumens *et al.* (2002), que demonstraram que tanto déficits moderados quanto mínimos, no tônus dopaminérgico, são capazes de afetar a coordenação motora de animais submetidos à depleção de dopamina nos núcleos da base. O fato do sistema dopaminérgico também ser afetado pela deficiência de tiamina (Nakagawasai *et al.*, 2007) torna possível, conforme mencionado acima, que os déficits motores apresentados pelos animais do grupo MR sejam também devidos à bloqueios na transmissão sináptica dopaminérgica devido às alterações em vias motoras neuromodulatórias de origem cerebelar.

Conforme Stolze *et al.* (2003), neste contexto, também seria esperado que os animais apresentassem, além de déficits no equilíbrio, um padrão de marcha alterado, caracterizado por alargamento da base de apoio (marcha atáxica), refletindo um efeito compensatório para minimizar o distúrbio no equilíbrio. Nossos dados estão de acordo com Stolze *et al.* (2003) e com os achados apresentados por Hudson & Krebs, (2002) para indivíduos que apresentavam distúrbio cerebelar e déficits de equilíbrio. Os animais do grupo MR apresentaram aumento da base de apoio (largura do passo).

Conforme Walberg, (1972) a ocorrência da marcha atáxica pode ser atribuída a uma perda de conexão entre vias neurais cerebelares e vias vestibulares levando a uma perda de controle postural e conseqüentemente, como mecanismo compensatório, a realização da marcha com o alargamento da base de apoio. Em um estudo em que foram analisados cerebelos de humanos que sofreram deficiência de tiamina, Baker *et al.* (1999) relataram perda da conexão entre vias vestibulo-cerebelares além de significativa

diminuição na densidade celular e atrofia da camada molecular do *vérmis* cerebelar, dando suporte aos achados do nosso estudo, haja vista que, conforme mencionado acima, esta região cerebelar é a mais vulnerável à deficiência de tiamina (Lavoie & Butterworth 1995; Baker *et al.*, 1999). De acordo com Jahn *et al.* (2008), indivíduos com lesão e/ou atrofia nessa região cerebelar podem apresentar ataxia. A perda da conexão entre vias cerebelares e vestibulares, possivelmente, conseqüente a lesão do cerebelo e/ou a diminuição do tônus glutamatérgico cerebelar sobre estruturas do sistema vestibular pode ter contribuído para induzir alterações neuroquímicas e ativar mecanismos compensatórios em outras estruturas corticais e/ou subcorticas, como por exemplo, o estriado e provocar o surgimento da marcha atáxica. Embora no presente estudo não tenha sido realizado uma avaliação específica sobre aspectos neuroquímicos no estriado dos animais, nossa hipótese está de acordo com os resultados apresentados por Centonze *et al.* (2008) os quais sugerem que mudanças adaptativas em sinapses glutamatérgicas e GABAérgicas estriatais são capazes de mediar a recuperação espontânea e a manutenção de estados compensatórios de origem cerebelar.

O acometimento de neurônios glutamatérgicos no cerebelo dos animais do grupo MR poderia influenciar diretamente as sinapses GABAérgicas do tálamo, por exemplo, através da via córtico-cerebelo-tálamo-cortical (Centonze *et al.*, 2008) e contribuir para o aumento do GABA, conforme observado em nosso estudo. Uma possível resposta talâmica ao déficit na aferência glutamatérgica (proveniente do cerebelo) poderia ocorrer na tentativa de reajustar o sistema para manter um equilíbrio entre as modulações excitatórias e inibitórias. De acordo com essa lógica seria esperado uma diminuição na liberação de GABA no tálamo e uma conseqüente resposta dos neurônios

GABAérgicos no sentido de aumentar a sua síntese no tálamo e, portanto, sua concentração, corroborando os achados do nosso estudo.

Outra possível explicação seria a existência de mecanismos de desinibição capazes de potencializar a transmissão GABAérgica no tálamo. Uma redução no número de neurônios glutamatérgicos no cerebelo dos animais do grupo MR, induziria uma diminuição do tônus excitatório glutamatérgico sobre os neurônios GABAérgicos das células de Purkinje cerebelar. Estas células, por sua vez, apresentariam uma tonicidade diminuída sobre os neurônios glutamatérgicos dos núcleos profundos do cerebelo (Uusisaari *et al.*, 2007), os quais exerceriam sua modulação excitatória sobre os neurônios GABAérgicos do tálamo, permitindo assim o aumento da concentração do neurotransmissor GABA nesta estrutura e facilitando sua modulação inibitória sobre as demais estruturas do SNC. O trabalho de Celada *et al.* (1999) está de acordo com a ocorrência de mecanismos de desinibição em vias neurais GABAérgicas em estruturas subcorticais, dando suporte a nossa hipótese. O resultado encontrado no presente estudo, em relação ao nível de GABA no tálamo está de acordo com qualquer uma das duas hipóteses descritas acima.

Seja qual for o mecanismo que fundamenta as alterações observadas, é importante destacar que a deficiência de tiamina no período perinatal pode repercutir na vida adulta, na forma de distúrbios no equilíbrio, na coordenação motora e na marcha. Apontando nessa direção, nossos resultados mostram que a deficiência provoca uma perda da correlação, entre a concentração de GABA no tálamo e o desempenho no *rotarod* e, entre a largura do passo e a concentração de GABA no tálamo e cerebelo

sugerindo a importância do sistema GABAérgico como substrato biológico dos ajustes relacionados à atividade motora.

Um dado interessante, mas ainda pouco claro é o fato da restrição induzir alterações que culminam com o aparecimento de uma correlação significativa, não observada nos animais controles, entre o comprimento do passo e os níveis de GABA no cerebelo. Possivelmente, a necessidade de alargamento do passo, para compensar um distúrbio no equilíbrio, acarretaria também em ajustes neurobiológicos relacionados ao comprimento do passo, o qual, dentre outros processos e aspectos comportamentais, passaria a ser modulado pelo sistema GABAérgico cerebelar.

A partir dos dados obtidos no presente estudo, levantamos a seguinte hipótese: ajustes neuroquímicos compensatórios devem acontecer ao longo do desenvolvimento, na tentativa de compensar de forma adaptativa, ou seja, de acordo com a relevância do aspecto comportamental afetado, os prejuízos causados pela deficiência de tiamina, de modo a alterar a atividade de circuitos neuroquímicos para assegurar aspectos comportamentais relevantes para a sobrevivência do animal. Dessa forma, através da observação clínica, na ausência da aplicação de testes específicos, poderia não ser possível visualizar diferenças no comprimento, largura do passo, equilíbrio e coordenação motora de indivíduos que sofreram deficiência de tiamina durante fases precoces do desenvolvimento. Entretanto atividades que requerem uma maior demanda de coordenação e controle preciso de movimentos podem ser prejudicadas. Esta idéia está de acordo com os resultados observados no *Rotarod*, onde foram observados efeitos da deficiência apenas quando a demanda foi aumentada (25rpm). Os dados obtidos no

presente trabalho sugerem que avaliações quantitativas, com diferentes níveis de complexidade, de aspectos motores específicos podem ser relevantes para detecção de possíveis distúrbios decorrentes da deficiência de tiamina.

Considerando a definição proposta por Lucas, (1991) para o conceito de *Programming*, a deficiência de tiamina poderia ser um agente capaz de desencadear esse tipo de fenômeno. Essa hipótese é corroborada pelos dados apresentados no presente trabalho indicando que a deficiência desta vitamina durante o período perinatal é capaz de induzir na prole, alterações que persistem em períodos posteriores da vida.

A deficiência de tiamina durante o período de ontogênese afeta o circuito GABAérgico talâmico e o glutamatérgico cerebelar, isto é, ela induz um aumento na concentração de GABA no tálamo e uma diminuição na concentração de glutamato no cerebelo. Além disso, esta deficiência afeta a motricidade dos animais o que clinicamente é manifestado sob a forma de distúrbios no equilíbrio e coordenação motora e por modificações no padrão da marcha (aumento da largura do passo).

De acordo com os dados obtidos no presente trabalho, é provável que o substrato biológico envolvido nas alterações motoras apresentadas pelos animais que sofreram a deficiência de tiamina no período perinatal esteja relacionado ao distúrbio observado no sistema GABAérgico talâmico desses animais, haja vista que em animais controle há uma correlação entre a concentração do neurotransmissor GABA no tálamo e respostas fisiológicas de equilíbrio, coordenação motora e marcha, situação essa não observada para os animais do grupo MR.

Considerando a correlação encontrada entre a concentração de GABA no cerebelo e o comprimento do passo dos animais do grupo MR, não observada para os animais

controle, é possível concluir também que o GABA cerebelar, para esses animais assume a função de facilitar (possibilitar) a ocorrência de mecanismos compensatórios em resposta ao déficit de equilíbrio apresentado por eles, ou seja, o circuito GABAérgico do cerebelo deve se tornar responsável pela regulação do comprimento do passo para permitir então que outros circuitos se encarreguem de regular a largura e tornar possível a realização de uma marcha funcional. Até aonde sabemos os dados observados nesse estudo sugerem pela primeira vez a importância de circuitos inibitórios talâmicos e cerebelares em respostas motoras adaptativas conseqüentes a um processo de possível disfunção em regiões do SNC decorrente da deficiência de tiamina.

Conforme mencionado anteriormente, a partir dos dados apresentados, levantamos a hipótese de que ajustes neuroquímicos compensatórios devem acontecer ao longo do desenvolvimento, na tentativa de compensar os prejuízos causados pela deficiência de tiamina, de modo a alterar a atividade de circuitos neuroquímicos com a finalidade de assegurar aspectos comportamentais relevantes para a sobrevivência do animal.

Partindo desse pressuposto seria interessante que fossem realizados, sob essa mesma ótica, trabalhos com animais de diferentes faixas etárias (jovens e idosos) objetivando analisar, ao longo do tempo, as modificações ocorridas em circuitos neuroquímicos inibitórios e excitatórios e suas possíveis relações com as respostas comportamentais observadas nesses animais. Pesquisas delineadas neste sentido podem contribuir para a compreensão dos mecanismos envolvidos na organização dos circuitos neuroquímicos no sentido de contemplar respostas motoras adaptativas.

Considerando que a deficiência de tiamina altera a motricidade dos animais e interfere em circuitos neuroquímicos relacionados ao comportamento motor, seria interessante que em pesquisas futuras fosse incluído, além do tálamo e cerebelo, avaliações no estriado, dada sua íntima relação com o circuito dopaminérgico nos núcleos da base e sua importante participação na execução de respostas motoras. Além disto, como existem evidências de que a deficiência provoca alterações estruturais em diferentes regiões corticais, seria também interessante realizar análises morfométricas nas referidas estruturas, acompanhadas de determinações de parâmetros neuroquímicos de outros sistemas. Desta forma seria possível ampliar os estudos de correlações entre esses parâmetros e os déficits motores observados e compreender melhor os substratos biológicos subjacentes a essas funções motoras.

ANEXOS

RESUMO DOS RESULTADOS

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,56211311
R-Quadrado	0,315971148
R-quadrado ajustado	0,201966339
Erro padrão	26,05865575
Observações	8

ANOVA

	<i>Gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	1882,037513	1882,037513	2,77155983	0,14700728
Resíduo	6	4074,321237	679,0535396		
Total	7	5956,35875			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Interseção	115,3134195	48,20711651	2,392041421	0,053876091	-2,645145002	233,271984	2,645145002	233,271984
Variável X 1	0,019062098	0,011450081	1,664800237	0,14700728	-0,047079438	0,008955241	0,047079438	0,008955241

TABELA 8: Planilha de dados apresentando os resultados obtidos através da Análise de Regressão Linear entre a concentração de GLUTAMATO no TÁLAMO e o desempenho dos animais do grupo CONTROLE no teste do ROTAROD.

RESUMO DOS RESULTADOS

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,187042955
R-Quadrado	0,034985067
R-quadrado ajustado	-0,0856418
Erro padrão	17,55897396
Observações	10

ANOVA

	<i>Gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	89,42046683	89,42046683	0,290027155	0,604859932
Resíduo	8	2466,540533	308,3175666		
Total	9	2555,961			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Interseção	33,81047185	36,15590307	0,935130061	0,377085031	-49,56519008	117,1861338	49,56519008	117,1861338
Variável X 1	0,004674695	0,008680284	0,538541693	0,604859932	-0,024691465	0,015342075	0,024691465	0,015342075

TABELA 9: Planilha de dados apresentando os resultados obtidos através da Análise de Regressão Linear entre a concentração de GLUTAMATO no TÁLAMO e o desempenho dos animais do grupo RESTRITO no teste do *ROTAROD*.

RESUMO DOS RESULTADOS

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,411455292
R-Quadrado	0,169295458
R-quadrado ajustado	0,030844701
Erro padrão	846,8200002
Observações	8

ANOVA

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	876863,8868	876863,8868	1,222784629	0,311170954
Resíduo	6	4302624,677	717104,1128		
Total	7	5179488,563			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Interseção	7102,38159	2702,292519	2,628280077	0,039149653	490,1100126	13714,65317	490,1100126	13714,65317
Variável X 1	690,8322727	624,7375819	1,105795926	0,311170954	-2219,510063	837,8455173	-2219,510063	837,8455173

TABELA 10: Planilha de dados apresentando os resultados obtidos através da Análise de Regressão Linear entre a concentração de GLUTAMATO no TÁLAMO e a LARGURA DO PASSO dos animais do grupo CONTROLE.

RESUMO DOS RESULTADOS

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,333623242
R-Quadrado	0,111304468
R-quadrado ajustado	0,000217526
Erro padrão	674,212379
Observações	10

ANOVA

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	455452,4391	455452,4391	1,001958163	0,34614825
Resíduo	8	3636498,656	454562,332		
Total	9	4091951,095			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Interseção	2353,661988	1773,356056	1,327235994	0,221056994	-1735,704408	6443,028384	-	6443,028384
Variável X 1	356,6757088	356,3270062	1,000978603	0,34614825	-465,0158404	1178,367258	-	1178,367258

TABELA 11: Planilha de dados apresentando os resultados obtidos através da Análise de Regressão Linear entre a concentração de GLUTAMATO no TÁLAMO e a LARGURA DO PASSO dos animais do grupo RESTRITO.

RESUMO DOS RESULTADOS

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,343029347
R-Quadrado	0,117669133
R-quadrado ajustado	-0,029386012
Erro padrão	872,7373256
Observações	8

ANOVA

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	609465,9264	609465,9264	0,800170119	0,405493835
Resíduo	6	4570022,637	761670,4395		
Total	7	5179488,563			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Interseção	6588,736276	2763,041218	2,384595725	0,054425865	-172,1820122	13349,65456	172,1820122	13349,65456
Variável X 1	-370,6917691	414,4019384	0,894522286	0,405493835	-1384,696781	643,3132432	1384,696781	643,3132432

TABELA 12: Planilha de dados apresentando os resultados obtidos através da Análise de Regressão Linear entre a concentração de GLUTAMATO no TÁLAMO e o COMPRIMENTO DO PASSO dos animais do grupo CONTROLE.

RESUMO DOS RESULTADOS

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,112864593
R-Quadrado	0,012738416
R-quadrado ajustado	-
Erro padrão	710,6182271
Observações	10

ANOVA

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	52124,97695	52124,97695	0,103222219	0,756229742
Resíduo	8	4039826,118	504978,2647		
Total	9	4091951,095			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Interseção	5349,878364	3847,430755	1,390506732	0,201834641	-3522,312859	14222,06959	3522,312859	14222,06959
Variável X 1	196,2053091	610,6947121	0,321282148	0,756229742	-1604,469839	1212,059221	1604,469839	1212,059221

TABELA 13: Planilha de dados apresentando os resultados obtidos através da Análise de Regressão Linear entre a concentração de GLUTAMATO no TÁLAMO e o COMPRIMENTO DO PASSO dos animais do grupo RESTRITO.

RESUMO DOS RESULTADOS

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,053753869
R-Quadrado	0,002889478
R-quadrado ajustado	-0,163295609
Erro padrão	1154,197446
Observações	8

ANOVA

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	23162,61659	23162,61659	0,01738711	0,899405479
Resíduo	6	7993030,461	1332171,744		
Total	7	8016193,078			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Interseção	5147,256482	681,9816225	7,547500274	0,000280657	3478,507571	6816,005393	3478,507571	6816,005393
Variável X 1	1,971983994	14,95511253	0,131860191	0,899405479	-34,62185802	38,565826	34,62185802	38,565826

TABELA 14: Planilha de dados apresentando os resultados obtidos através da Análise de Regressão Linear entre a concentração de GLUTAMATO no CEREBELO e o desempenho dos animais do grupo CONTROLE no teste do *ROTAROD*.

RESUMO DOS RESULTADOS

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,023120503
R-Quadrado	0,000534558
R-quadrado ajustado	-
Erro padrão	446,8308135
Observações	10

ANOVA

	<i>Gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	854,2854344	854,2854344	0,004278749	0,949450926
Resíduo	8	1597262,207	199657,7759		
Total	9	1598116,492			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Interseção	4007,664276	191,1761484	20,96320231	2,81415E-08	3566,811288	4448,517265	3566,811288	4448,517265
Variável X 1	0,578128513	8,838244324	-0,06541214	0,949450926	-20,95915645	19,80289943	20,95915645	19,80289943

TABELA 15: Planilha de dados apresentando os resultados obtidos através da Análise de Regressão Linear entre a concentração de GLUTAMATO no CEREBELO e o desempenho dos animais do grupo RESTRITO no teste do *ROTAROD*.

RESUMO DOS RESULTADOS

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,231452531
R-Quadrado	0,053570274
R-quadrado ajustado	-0,104168013
Erro padrão	1124,482356
Observações	8

ANOVA

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	429429,6618	429429,6618	0,339614909	0,581276142
Resíduo	6	7586763,416	1264460,569		
Total	7	8016193,078			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Interseção	3141,022108	3588,342574	0,875340647	0,415051271	-5639,335844	11921,38006	-	11921,38006
Variável X 1	483,4510915	829,581715	0,582764884	0,581276142	-1546,462234	2513,364417	-	2513,364417

TABELA 16: Planilha de dados apresentando os resultados obtidos através da Análise de Regressão Linear entre a concentração de GLUTAMATO no CEREBELO e a LARGURA DO PASSO dos animais do grupo CONTROLE.

RESUMO DOS RESULTADOS

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,308885703
R-Quadrado	0,095410378
	-
R-quadrado ajustado	0,017663325
Erro padrão	425,0940475
Observações	10

ANOVA

	<i>Gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	152476,8983	152476,8983	0,843789276	0,385173431
Resíduo	8	1445639,594	180704,9492		
Total	9	1598116,492			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Interseção	2979,61801	1118,109259	2,664871956	0,028588659	401,2534359	5557,982583	401,2534359	5557,982583
Variável X 1	206,3735531	224,6658383	0,918580033	0,385173431	-311,7067987	724,4539048	311,7067987	724,4539048

TABELA 17: Planilha de dados apresentando os resultados obtidos através da Análise de Regressão Linear entre a concentração de GLUTAMATO no CEREBELO e a LARGURA DO PASSO dos animais do grupo RESTRITO.

RESUMO DOS RESULTADOS

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,684129599
R-Quadrado	0,468033308
R-quadrado ajustado	0,379372193
Erro padrão	843,04485
Observações	8

ANOVA

	<i>Gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	3751845,363	3751845	5,278901648	0,061303002
Resíduo	6	4264347,715	710724,6		
Total	7	8016193,078			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Interseção	11313,29031	2669,036376	4,238717	0,005447471	4782,393584	17844,18704	4782,393584	17844,18704
Variável X 1	919,7307204	400,3030577	-2,29759	0,061303002	-1899,237014	59,77557369	1899,237014	59,77557369

TABELA 18: Planilha de dados apresentando os resultados obtidos através da Análise de Regressão Linear entre a concentração de GLUTAMATO no CEREBELO e a COMPRIMENTO DO PASSO dos animais do grupo CONTROLE.

RESUMO DOS RESULTADOS

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,512814919
R-Quadrado	0,262979141
R-quadrado ajustado	0,170851534
Erro padrão	383,7064616
Observações	10

ANOVA

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	420271,3028	420271,3	2,854509618	0,1295892
Resíduo	8	1177845,189	147230,6		
Total	9	1598116,492			

	<i>Coeficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Interseção	7503,186082	2077,464361	3,611704	0,006864685	2712,544679	12293,82749	2712,544679	12293,82749
Variável X 1	557,1250485	329,7516137	-1,68953	0,1295892	-1317,533633	203,2835357	1317,533633	203,2835357

TABELA 19: Planilha de dados apresentando os resultados obtidos através da Análise de Regressão Linear entre a concentração de GLUTAMATO no CEREBELO e a COMPRIMENTO DO PASSO dos animais do grupo RESTRITO.

RESUMO DOS RESULTADOS

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,153799616
R-Quadrado	0,023654322
R-quadrado ajustado	-0,139069958
Erro padrão	450,5858175
Observações	8

ANOVA

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	29512,98808	29512,98808	0,145364429	0,716140981
Resíduo	6	1218165,474	203027,5789		
Total	7	1247678,462			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Interseção	2274,688028	266,2380237	8,543813527	0,00014101	1623,227054	2926,149002	1623,227054	2926,149002
Variável X 1	-2,225953909	5,838309233	0,381266874	0,716140981	-16,51178194	12,05987412	16,51178194	12,05987412

TABELA 20: Planilha de dados apresentando os resultados obtidos através da Análise de Regressão Linear entre a concentração de GLUTAMATO na MEDULA ESPINHAL e o desempenho dos animais do grupo CONTROLE no teste do *ROTAROD*.

RESUMO DOS RESULTADOS

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,121647906
R-Quadrado	0,014798213
R-quadrado ajustado	-0,10835201
Erro padrão	234,9625689
Observações	10

ANOVA

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	6633,938404	6633,938404	0,120163915	0,73779824
Resíduo	8	441659,2703	55207,40879		
Total	9	448293,2087			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Interseção	2012,456356	100,5285168	20,01876104	4,04401E-08	1780,637181	2244,275531	1780,637181	2244,275531
Variável X 1	1,611048467	4,647523242	0,346646672	0,73779824	-9,10615934	12,32825627	-9,10615934	12,32825627

TABELA 21: Planilha de dados apresentando os resultados obtidos através da Análise de Regressão Linear entre a concentração de GLUTAMATO na MEDULA ESPINHAL e o desempenho dos animais do grupo RESTRITO no teste do *ROTAROD*.

RESUMO DOS RESULTADOS

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,151320416
R-Quadrado	0,022897868
R-quadrado ajustado	-0,139952487
Erro padrão	450,7603363
Observações	8

ANOVA

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	28569,17706	28569,17706	0,140606806	0,720575612
Resíduo	6	1219109,285	203184,8808		
Total	7	1247678,462			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Interseção	2729,410697	1438,424086	1,897500691	0,106538374	-790,2862387	6249,107633	790,2862387	6249,107633
Variável X 1	124,6968236	332,5463763	-0,37497574	0,720575612	-938,4084914	689,0148441	938,4084914	689,0148441

TABELA 22: Planilha de dados apresentando os resultados obtidos através da Análise de Regressão Linear entre a concentração de GLUTAMATO na MEDULA ESPINHAL e a LARGURA DO PASSO dos animais do grupo CONTROLE.

RESUMO DOS RESULTADOS

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,142309898
R-Quadrado	0,020252107
R-quadrado ajustado	-0,102216379
Erro padrão	234,3113118
Observações	10

ANOVA

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	9078,882092	9078,882092	0,165365864	0,694925399
Resíduo	8	439214,3266	54901,79083		
Total	9	448293,2087			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Interseção	1787,127394	616,3004371	2,899766553	0,019898825	365,9360388	3208,318749	365,9360388	3208,318749
Variável X 1	50,35796884	123,8355314	0,406652019	0,694925399	-235,2072785	335,9232162	235,2072785	335,9232162

TABELA 23: Planilha de dados apresentando os resultados obtidos através da Análise de Regressão Linear entre a concentração de GLUTAMATO na MEDULA ESPINHAL e a LARGURA DO PASSO dos animais do grupo RESTRITO.

RESUMO DOS RESULTADOS

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,602574911
R-Quadrado	0,363096524
R-quadrado ajustado	0,256945944
Erro padrão	363,9255303
Observações	8

ANOVA

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	453027,7121	453027,7121	3,420579763	0,113872012
Resíduo	6	794650,7496	132441,7916		
Total	7	1247678,462			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Interseção	4310,943542	1152,1694	3,741588298	0,009604476	1491,686589	7130,200495	1491,686589	7130,200495
Variável X 1	-319,595468	172,8027905	1,849480944	0,113872012	-742,4286631	103,237727	742,4286631	103,237727

TABELA 24: Planilha de dados apresentando os resultados obtidos através da Análise de Regressão Linear entre a concentração de GLUTAMATO na MEDULA ESPINHAL e o COMPRIMENTO DO PASSO dos animais do grupo CONTROLE.

RESUMO DOS RESULTADOS

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,153520855
R-Quadrado	0,023568653
R-quadrado ajustado	-0,098485265
Erro padrão	233,9143918
Observações	10

ANOVA

	<i>Gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	10565,66705	10565,66705	0,193100338	0,671976817
Resíduo	8	437727,5417	54715,94271		
Total	9	448293,2087			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Interseção	2591,502023	1266,45981	2,046256819	0,074942439	-328,9595341	5511,96358	328,9595341	5511,96358
Variável X 1	88,33570452	201,0225417	0,439431836	0,671976817	-551,8945165	375,2231075	551,8945165	375,2231075

TABELA 25: Planilha de dados apresentando os resultados obtidos através da Análise de Regressão Linear entre a concentração de GLUTAMATO na MEDULA ESPINHAL e o COMPRIMENTO DO PASSO dos animais do grupo RESTRITO.

RESUMO DOS RESULTADOS

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,213323263
R-Quadrado	0,045506815
R-quadrado ajustado	-0,113575383
Erro padrão	81,90130801
Observações	8

ANOVA

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	1918,830132	1918,830132	0,286058498	0,611987798
Resíduo	6	40246,94552	6707,824253		
Total	7	42165,77565			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Interseção	200,3272345	48,39309524	4,139583003	0,006081454	81,9135965	318,7408726	81,9135965	318,7408726
Variável X 1	0,56758099	1,061207753	0,534844368	0,611987798	-2,029100832	3,164262812	2,029100832	3,164262812

TABELA 26: Planilha de dados apresentando os resultados obtidos através da Análise de Regressão Linear entre a concentração de GABA no CEREBELO e o desempenho dos animais do grupo CONTROLE no teste do *ROTAROD*.

RESUMO DOS RESULTADOS

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,031624614
R-Quadrado	0,001000116
R-quadrado ajustado	-0,123874869
Erro padrão	83,07824535
Observações	10

ANOVA

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	55,27765787	55,27765787	0,008008939	0,930890303
Resíduo	8	55215,9588	6901,99485		
Total	9	55271,23646			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Interseção	201,511227	35,54495009	5,66919426	0,000470838	119,5444252	283,4780288	119,5444252	283,4780288
Variável X 1	-0,147061065	1,643274833	0,08949268	0,930890303	-3,936459622	3,642337493	3,936459622	3,642337493

TABELA 27: Planilha de dados apresentando os resultados obtidos através da Análise de Regressão Linear entre a concentração de GABA no CEREBELO e o desempenho dos animais do grupo RESTRITO no teste do *ROTAROD*.

RESUMO DOS RESULTADOS

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,20614404
R-Quadrado	0,042495365
R-quadrado ajustado	-0,117088741
Erro padrão	34,19192763
Observações	8

ANOVA

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	311,3143237	311,3143237	0,266288206	0,624290533
Resíduo	6	7014,527489	1169,087915		
Total	7	7325,841813			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Interseção	90,72470618	20,20301324	4,490652216	0,004145016	41,28971375	140,1596986	41,28971375	140,1596986
Variável X 1	-0,228617319	0,443030027	0,516031207	0,624290533	-1,31267274	0,855438102	-1,31267274	0,855438102

TABELA 28: Planilha de dados apresentando os resultados obtidos através da Análise de Regressão Linear entre a concentração de GABA na MEDULA ESPINHAL e o desempenho dos animais do grupo CONTROLE no teste do *ROTAROD*.

RESUMO DOS RESULTADOS

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,100001536
R-Quadrado	0,010000307
R-quadrado ajustado	-0,113749654
Erro padrão	35,38940768
Observações	10

ANOVA

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	101,2080036	101,2080036	0,080810589	0,783421146
Resíduo	8	10019,28141	1252,410176		
Total	9	10120,48941			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Interseção	82,83019902	15,1413252	5,47047223	0,000594116	47,91424053	117,7461575	47,91424053	117,7461575
Variável X 1	0,198989572	0,699997006	0,284272033	0,783421146	-1,415206417	1,813185561	1,415206417	1,813185561

TABELA 29: Planilha de dados apresentando os resultados obtidos através da Análise de Regressão Linear entre a concentração de GABA na MEDULA ESPINHAL e o desempenho dos animais do grupo RESTRITO no teste do ROTAROD.

- Bâ, A. & Seri, B.V. Functional development of central nervous system in the rat: ontogeny of nociceptive thresholds. *Physiol Behav.* 1993; 54: 403–405.
- Bâ, A. & Seri, B.V. Psychomotor functions in developing rats: ontogenetic approach to structure-function relationships. *Neurosci Biobehav Rev.* 1995; 19: 413–425.
- Bâ, A. Metabolic and Structural Role of Thiamine in Nervous Tissues. *Cell Mol Neurobiol.* 2008; 28: 923–931.
- Bâ, A.; N'Douba, V.; D'Almeida, M.A. & Seri, B.V. 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, B.V.; Aka, K.J.; 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.
- Baker, H.; DeAngelis, B.; Holland, B.; Gittens-Williams, L. & Barret, T. Vitamin profile of 563 gravidas during trimesters of pregnancy. *J. American College Nutrition.* 2002; 21(1): 33-37.
- Baker, K.G.; Harding, A.J.; Halliday, G.M.; Kril, J.J. & Harper, C.G. Neuronal loss in functional zones of the cerebellum of chronic alcoholics with and without Wernicke's encephalopathy. *Neuroscience.* 1999; 91(2): 429-438.
- Bamford, N.S.; Zhang, H.; Schmitz, Y.; Wu, N.P.; Cepeda, C.; Levine, M.S.; Schmauss, C.; Zakharenko, S.S.; Zablow, L. & Sulzer, D. Heterosynaptic dopamine neurotransmission selects sets of corticostriatal terminals. *Neuron.* 2004; 42: 653–663.
- Barneoud, P.; Descombris, E.; Aubin, N.; Abrous, D.N. Evaluation of simple and complex sensorimotor behaviours in rats with a partial lesion of the dopaminergic nigrostriatal system. *Eur J Neurosci.* 2000;12:322–336
- Ben-Ari, Y.; Gaiarsa, J.L; Tyzio, R. & Khazipov, R. GABA: A pioneer transmitter that excites immature neurons and generates primitive oscillations. *Physiol. Rev.* 2007; 87: 1215-1284.
- Bianchi, L. Galletti, F. Bolam, J.P & Della Corte, L. The effect of 6-hydroxydopamine lesions on the release of amino acids in the direct and indirect pathways of the basal

ganglia: a dual microdialysis probe analysis. *European Journal of Neuroscience*. 2003; 18: 856-868.

Brambilla, P.; Perez, J.; Barale, F.; Schettini, G. & Soares, J.C. GABAergic dysfunction in mood disorders. *Molecular Psychiatry*. 2003; 8: 721-737.

Bubber, P.; Ke, Z. & Gibson, G.E. Tricarboxylic acid cycle enzymes following thiamine deficiency. *Neurochemistry International*. 2004; 45: 1021–1028.

Buszaki, G. & Chrobak, J.J. Temporal structure in spatially organized neuronal assemblies: a role for interneuronal networks. *Curr. Opin. Neurobiol.* 1995; 5: 504-510.

Butterworth, R. F. Thiamin malnutrition and brain development. In: Basis and Clinical Aspects of Nutrition and Brain Development. *Current Topics in Nutrition and Disease*. Alan R. Liss Inc, New York. 1987; 16: 287-304.

Butterworth, R. F.; 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, R.F. Effects of thiamine deficiency on brain metabolism: implications for the pathogenesis of the Wernicke-Korsakoff syndrome. *Alcohol and Alcoholism*. 1989; 24(4): 271-279.

Butterworth, R.F. Neurotransmitter function in thiamine-deficiency encephalopathy. *Neurochemistry International*. 1982; 4: 449-464.

Butterworth, R.F. Thiamin deficiency and brain disorders. *Nutrition Research Reviews*. 2003;16: 277–283

Butterworth, R.F. Thiamine deficiency-related brain dysfunction in chronic liver failure. *Metab Brain Dis*. 2008. Article In Press.

Butterworth, R.F.; Krill, J.J. & Harper, C.G. Thiamine-dependent enzyme changes in the brains of alcoholics-relationship to the Wernicke-Korsakoff syndrome. *Alcohol Clin Exp Res*. 1993; 17(5): 1084-1088.

Butterworth. R.F. Thiamine deficiency-related brain dysfunction in chronic liver failure. *Metab Brain Dis.* 2009; 24(1): 189-96.

Calingasan, N.Y.; Park, L.C.; Calo, L.L.; Trifiletti, R.R.; Gandy, S.E. & Gibson, G.E. 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.

Carrillo-Reid, L.; Tecuapetla, F.; Tapia, D.; Hernandez-Cruz, A.; Galarraga, E.; Drucker-Colin, R. & Vargas, J. Encoding Network States by Striatal Cell Assemblies. *J Neurophysiol.* 2008; 99: 1435–1450.

Carvalho, F.M.; Pereira, S.R.; Pires, R.G.; Ferraz, V.P.; Romano-Silva, M.A.; Oliveira-Silva, I.F. & Ribeiro, A.M. 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.

Cauli, O.; Regina, R.; Llansola, M.; Montoliu, C.; Monfort, P.; Piedrafita, B.; Mlili, N.; Boix, J.; Agustí, A. & Felipo, V. Glutamatergic and gabaergic neurotransmission and neuronal circuits in hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis.* 2009; 24: 69–80.

Celada, P.; Paladini, C.A. and Tepper, J.M. GABAergic control of rat substantia nigra dopaminergic neurons: role of globus pallidus and substantia nigra pars reticulata. *Neuroscience.* 1999; 89: 813-825.

Centonze, D.; Rossi, S.; De Bartolo, P.; De Chiara, V.; Foti, F.; Musella, A.; Mataluni, G.; Rossi, S.; Bernardi, G.; Koch, G. & Petrosini, L. Adaptations of glutamatergic synapses in the striatum contribute to recovery from cerebellar damage. *European Journal of Neuroscience.* 2008; 27: 2188–2196.

Cepeda, C.; Buchwald, N.A. & Levine, M.S. Neuromodulatory actions of dopamine in the neostriatum are dependent upon the excitatory amino acid receptor subtypes activated. *Proc.Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1993; 90: 9576–9580.

Chambers, W.W. & Sprague, J.M. Functional localization in the cerebellum. I. Organization in longitudinal cortico-nuclear zones and their contribution to the control of posture, both extrapyramidal and pyramidal. *J Comp Neurol.* 1955a; 103: 105–29.

- Chambers, W.W. & Sprague, J.M. Functional localization in the cerebellum. II. Somatotopic organization in cortex and nuclei. *AMA Arch Neurol Psychiatry*. 1955b; 74: 653–80.
- Chen, L. & Yung, W.H. GABAergic neurotransmission in globus pallidus and its involvement in neurologic disorders. *Acta Physiologica Sinica*. 2004; 56(4): 427-435.
- Chevalier, G. & Deniau, J.M. Desinhibition as a basic process in the expression of striatal functions. *Trends Neurosci*. 1990; 13: 277-280.
- Ciccia, R.M. & Langlais, P.J. 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.
- Davison A. N. & Dobbing, KJ. Myelination as a vulnerable period in brain development. *Br. Med. Bull*. 1966; 22: 40-44.
- Deumens, R.; Blokland, A. & Prickaerts, J. Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. *Exp Neurol*. 2002;175:303–317.
- Dhir, A.; Akula, K.K. & Kulkarni, S.K. Tiagabine, a GABA uptake inhibitor, attenuates 3-nitropropionic acid-induced alterations in various behavioral and biochemical parameters in rats. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*. 2008; 32: 835–843.
- Dichgans, J. & Diener, H.C. Clinical evidence for functional compartmentalization of the cerebellum. In: Bloedel, J.R.; Dichgans, J.; Precht, W. editors. *Cerebellar functions*. Berlin: Springer Verlag; 1984. p. 126–47.
- Dostrovsky, J.O.; Hutchison, W.D & Lozano, A.M. The Globus Pallidus, Deep Brain Stimulation, and Parkinson's Disease. *Neuroscientist*. 2002; 8: 284-290.
- Dumitriu, D.; Cossart, R.; Huang, J. & Yuste, R. Correlation between axonal morphologies and synaptic input kinetics of interneurons from mouse visual cortex. *Cereb. Cortex*. 2007; 17: 81-91.
- Eidelberg, E.; Walden, J.G. & Nguyen, L.H. Locomotor control in Macaque monkeys. *Brain*. 1981; 104: 647–663.

Foster, A. C. & Kemp, J. A. Glutamate- and GABA-based CNS therapeutics. *Current Opinion in Pharmacology*. 2006; 6: 7-17.

Fournier, H. & Butterworth, R.F. 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.

Freeman, G.B.; Nielsen, P.E. & Gibson, G.E. Effect of age on behavioral and enzymatic changes during thiamin deficiency. *Neurobiol Aging*. 1987; 8(5): 429-434.

Freitas-Silva, D. M.; Resende, L. S.; Purri, V.; Pereira, S. R. C.; Ribeiro, A. M. Efeitos de um episódio de deficiência de tiamina durante a amamentação sobre o desempenho cognitivo espacial e parâmetros GABAérgicos e glutamatérgicos em ratos jovens. *I Congresso IBRO/LARC de Neurociências da América Latina, Caribe e Península Ibérica (Neurolatam)*. Búzios, 2008.

Freitas-Silva, D.M.; Ferraz, V. P. & Ribeiro, A.M. Improved high-performance liquid chromatographic method for GABA and glutamate determination in regions of the rodent brain. *Journal of Neuroscience Methods*. 2009; 177(2): 289-293.

Friston, K.J.; Frith, C.D.; Passingham, R.E.; Liddle, P.F. & Frackowiak, R.S. Motor practice and neurophysiological adaptation in the cerebellum: a positron tomography study. *Proc. Biol. Sci.* 1992; 248: 223–228.

Gibson, G.; Barclay, L. & Blass, J. 1982. The role of the cholinergic system in thiamin deficiency. In: Sable, H.Z., Gubler, C.J. (Eds.), Thiamin. New York Academy of Science, New York, pp. 382–403.

Gibson, G.E. & Zhang, H. Interactions of oxidative stress with thiamine homeostasis promote neurodegeneration. *Neurochem Int*. 2002; 40:493–504.

Godfrey, K. M. & Barker, D. J. P. Fetal programming and adult health. *Public Health Nutrition*. 2001; 4(2B): 611-624.

Godschalk, M.; Mitz, A.R.; Van Duin, B. & Van Der Burg, H. Somatotopy of monkey premotor cortex examined with microstimulation. *Neurosci Res*. 1995; 23: 269-279.

Grafton, S.T. Cortical control of movement. *Ann. Neurol*. 1994; 36: 3–4.

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. *Current Topics in Nutrition and Disease*. Alan R. Liss Inc, New York. 1987; 16: 159-216.

Greenwood, J.; Pratt, O.E.; Thomson, A.D. 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.

Grillner, S. & Wallen, P. Central pattern generators for locomotion, with special reference to vertebrates. *Annu. Rev. Neurosci.* 1985; 233–261.

Hakim, A.M. & Pappius, H.M. Sequence of metabolic, clinical and histological events in experimental thiamine deficiency. *Ann. Neurol.* 1983;13: 365-375.

He, S.Q.; Dum, R.P. & Strick, P.L. Topographic organization of corticospinal projections from the frontal lobe: motor areas on the lateral surface of the hemisphere. *J Neurosci.* 1993; 13: 952-980.

Hoshi, E.; Tremblay, L.; Feger, J.; Carras, P.L. & Strick, P.L. The cerebellum communicates with the basal ganglia. *Nat. Neurosci.* 2005; 8: 1491–1493.

Hudson, C.C. & Krebs, D.E. Frontal plane dynamic stability and coordination in subjects with cerebellar degeneration. *Exp Brain Res.* 2000; 132: 103–13.

Ichinohe, N.; Mori, F. & Shoumura, K. A di-synaptic projection from the lateral cerebellar nucleus to the laterodorsal part of the striatum via the central lateral nucleus of the thalamus in the rat. *Brain Res.* 2000; 880: 191–197.

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

Ito, M. The cerebellum and neural control. New York: Raven Press, 1984.

Jahn, K.; Deutschländer, A.; Stephan, T.; Kalla, R.; Wiesmann, M.; Strupp, M. & Brandt, T. Imaging human supraspinal locomotor centers in brainstem and cerebellum. *NeuroImage.* 2008; 39: 786–792.

Jenkins, I.H.; Brooks, D.J.; Nixon, P.D.; Frackowiak, R.S. & Passingham, R.E. Motor sequence learning: a study with positron emission tomography. *J. Neurosci.* 1994;14:3775–3790.

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

Kalivas, P.W. & Duffy, P. Dopamine regulation of extracellular glutamate in the nucleus accumbens. *Brain Res.* 1997; 761: 173–177.

Kickler, N.; Lacombe, E.; Chassain, C.; Durif, F.; Krainik, A.; Farion, R.; Provent, P.; Segebarth, C.; Re´my, C & Savasta, M. Assessment of metabolic changes in the striatum of a rat model of parkinsonism: an in vivo 1H MRS study. *NMR Biomed.* 2009;22:207–212.

Kirik, D.; Rosenblad, C. & Bjorklund, A. Characterization of behavioral and neurodegenerative changes following partial lesions of the nigrostriatal dopamine system induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine in the rat. *Exp Neurol.* 1998;152:259–277.

Kreitzer, A.C. & Malenka, R.C. Striatal Plasticity and Basal Ganglia Circuit Function. *Neuron.* 2008; 60: 543-545.

Krnjevic, K. Role of GABA in cerebral cortex. *Can. J. Physiol. Pharm.* 1997; 75: 439-451.

Kruse, M.; Navarro, D.; Desjardins, P. & Butterworth, R.F. Increased brain endothelial nitric oxide synthase expression in thiamine deficiency: relationship to selective vulnerability. *Neurochem Int.* 2004; 43:49–56.

Kurata, K. Information processing for motor control in primate premotor cortex. *Behav Brain Res.* 1994; 61: 135-142.

Kutlán, D. & Molnár-Perl, I. New aspects of the simultaneous analysis of amino acids and amines as their *o*-phthaldialdehyde derivatives by high-performance liquid chromatography. Analysis of wine, beer and vinegar. *J. Chrom. A.* 2003; 987: 311-322.

Lagrán, M.M.; Altafaj, X.; Gallego, X.; Martí, E.; Estivill, X.; Sahún, I.; Fillat, C. & Dierssen, M. Motor phenotypic alterations in TgDyrk1a transgenic mice implicate

DYRK1A in Down syndrome motor dysfunction. *Neurobiology of Disease*. 2004;15: 132–142.

Lalonde, R. & Strazielle, C. Brain regions and genes affecting postural control. *Progress in Neurobiology*. 2007; 81: 45–60.

Langlais, P.J. & Savage, L.M. 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, P.J. & Zhang S.X. 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.

Langlais, P.J.; Anderson, G.; Guo, S.X.; Bondy, S.C. Increased cerebral free radical production during thiamine deficiency. *Metabolic Brain Disease*. 1997; 12(2): 137-143.

Lavoie, J. & Butterworth, R.F. Reduced Activities of Thiamine-Dependent Enzymes in Brains of Alcoholics in the Absence of Wernicke's Encephalopathy. *Alcohol Clin Exp Res*. 1995; 19(4):1073-1077.

Lucas, A. Programming by early nutrition in man. In: *The Childhood Environment and Adult Disease*. 1991. CIBA Foundation Symposium. Wiley, Chichester, U.K.

Martin, P.R.; Singleton, C.K. & Hiller–Sturmhöfel, S. The Role of Thiamine Deficiency in Alcoholic Brain Disease. *Alcohol Res Health*. 2003; 27(2):134-42.

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

McGee, A. W. & Bredt, D. S. Assembly and plasticity of glutamatergic postsynaptic specialization. *Curr. Opin. Neurobiol*. 2003; 13: 111-118.

Meldrun, B.S. Glutamate as a Neurotransmitter in the Brain: Review of Physiology and Pathology. *J. Nutr*. 2000; 130: 1007–1015.

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*-phthalaldehyde / 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.

Middleton, F.A. & Strick, P.L. Basal-ganglia 'projections' to the prefrontal cortex of the primate. *Cereb. Cortex.* 2002; 12: 926–935.

Miller, M.W. Generation of neurons in the rat dentate gyrus and hippocampus: effects of prenatal and postnatal treatment with ethanol. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 1995; 19:1500-1509.

Mora, F.; Segovia, G. & Del Arco, A. Glutamate–dopamine–GABA interactions in the aging basal ganglia. *Brain Research Reviews.* 2007. Article in Press.

Mori, S.; Matsuyama, K.; Mori, F. & Nakajima, K. 2001. Supraspinal sites that induce locomotion in the vertebrate central nervous system. In: Ruzicka, E.; Hallet, M.; Jankovic, J. (Eds.), *Advances in Neurology. Gait Disorders*, vol. 87. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, pp. 25–39.

Morie, S.; Matsui, T.; Kuze, B.; Asanome, M.; Nakajima, K. & Matsuyama, K. Stimulation of a restricted region in the midline cerebellar white matter evokes coordinated quadrupedal locomotion in the decerebrate cat. *J. Neurophysiol.* 1999; 82:290–300.

Morton, S.M. & Bastian, A.J. Cerebellar control of balance and locomotion. *Neuroscientist.* 2004; 10: 247–59.

Mousseau, D.D.; Rao, V.L. & Butterworth, R.F. 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. *The Cerebellum.* 2006; 5:55-63.

Nacher, J.; Alonso-Llosa, G.; Rosell, D. & McEwen, B. S. NMDA receptor antagonist treatment increases the production of new neurons in the aged rat hippocampus. *Neurobiol. Aging.* 2002; 23: 1-12.

Nair, D.G.; Purcott, K.L.; Fuchs, A.; Steinberg, F. & Kelso, J.A. Cortical and cerebellar activity of the human brain during imagined and executed unimanual and bimanual action sequences: a functional MRI study. *Cogn Brain Res.* 2003; 15:250-260.

Nakagawasai, O.; Yamadera, F.; Iwasaki, K.; Asao, T.; Tan-No, K.; Niijima, 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. *Behavioural Brain Research.* 2007; 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. Washington (DC): U.S. Department of Health and Human Services, 1985.

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

Ogershok, P.R.; Rahman, A.; Nestor, S. & Brick, J. Wernicke encephalopathy in nonalcoholic patients. *Am J Med Sci.* 2002; 323: 107–11.

Oliveira, F.A.; Galan, D.T.; Ribeiro, A.M. & Cruz, J.S. Thiamine deficiency during pregnancy leads to cerebellar neuronal death in rat offspring: Role of voltage-dependent K⁺ channels. *Brain Research.* 2007; 1134:79-86.

Orlovsky, G.N.; Deliagna, T.G. & Grillner, S. Neural control of locomotion: from mollusc to man. Oxford University Press, 1999.

Ozawa, S.; Kamiya, H. & Tsuzuki, K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog. Neurobiol.* 1998; 54: 581-618.

Parra, P.; Gulyas, A.I. & Miles, R. How many subtypes of inhibitory cells in the hippocampus? *Neuron.* 1998; 20: 983-993.

Paxinos, G. & Watson, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 1986. 2nd ed., Academy Press, London.

Phillips, S.C.; Harper, C.G. & Kril, J. A quantitative histological study of the cerebellar vermis in alcoholic patients. *Brain.* 1987; 110(2):301-314.

Pires, R.G.; Pereira, S.R.; Oliveira-Silva, I.F.; Franco, G.C. & Ribeiro, A.M. 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, R.G.W.; Pereira, S.R.C.; Pittella, J.E.H.; Franco, G.C.; Ferreira, C.L.M.; Fernandez, P.A. & Ribeiro, A.M. The contribution of mild thiamine deficiency and ethanol consumption to central cholinergic parameter dysfunction and rat's open-field performance impairment. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior.* 2001; 70: 227-235.

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.

Roecklein, B.; Levin, S.W.; Comly, M. & Mukherjee, A.B. Intrauterine growth retardation induced by thiamine deficiency and pyriethamine during pregnancy in the rat. *American Journal of Obstetrics and Gynecology.* 1985; 151:455-460.

Rolfe, M.; Walker, R.W.; Samba, K.N. & Cham, K. Urban beri-beri in The Gambia, West Africa. *The Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* 1993;87:114-115.

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

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.

Sanchez-Perez, A.; Llansola, M.; Cauli, O. & Felipo, V. Modulation of NMDA receptors in the cerebellum. II. Signaling pathways and physiological modulators regulating NMDA receptor function. *Cerebellum.* 2005; 4(3): 162-70.

Savage, L.M.; Pitkin, S.R. & Knitowski, K.M. Rats exposed to acute pyriethamine-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: 13-26.

Seitz, R.J.; Canavan, A.G.; Yaguez, L.; Herzog, H.; Tellmann, L.; Knorr, U.; Huang, Y. & Homberg, V. Successive roles of the cerebellum and premotor cortices in trajectory learning. *Neuroreport*. 1994; 5: 2541–2544.

Shi, Q.; Karuppagounder, S.S.; Xu, H.; Pechman, D.; Chen, H. & Gibson, G.E. Responses of the mitochondrial alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex to thiamine deficiency may contribute to regional selective vulnerability. *Neurochemistry International*. 2007; 50: 921–931.

Shik, M.L. & Orlovsky, G.N. Neurophysiology of locomotor automatism. *Physiol. Rev.* 1976; 56: 465–501.

Simola, N.; Bustamante, D.; Pinna, A.; Pontis, S.; Morales, P.; Morelli, M. & Herrera-Marschitz, M. Acute perinatal asphyxia impairs non-spatial memory and alters motor coordination in adult male rats. *Exp Brain Res*. 2008; 185: 595–601.

Stolze, H.; Klebe, S.; Petersen, G.; Raethjen, J.; Wenzelburger, R.; Witt, K. & Deuschi, G. Typical features of cerebellar ataxic gait. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2002; 73: 310–12.

Surmeier, D.J.; Ding, J.; Day, M.; Wang, Z.; Shen, W. D1 and D2 dopamine-receptor modulation of striatal glutamatergic signaling in striatal medium spiny neurons. *Trends Neurosci*. 2007; 30:228–235.

Thach, W.T. & Bastian, A.J. Role of the cerebellum in the control and adaptation of gait in health and disease. *Prog Brain Res*. 2004; 143: 353–66.

Thach, W.T.; Goodkin, H.P. & Keating, J.G. The cerebellum and the adaptive coordination of movement. *Annu Rev Neurosci*. 1992; 15: 403–42.

The behavior of the laboratory: A handbook with tests. Whishaw, I.Q & Kolb, B. Oxford. 2005.

Todd, K.G. & Butterworth, R.F. Mechanisms of selective neuronal cell death due to thiamine deficiency. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1999; 893:404-411.

Toni, I.; Krams, M.; Turner, R. & Passingham, R.E. The time course of changes during motor sequence learning: a whole-brain fMRI study. *Neuroimage*. 1998;8:50–61.

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.

Udo, M.; Matsukawa, K.; Kamei, H. & Oda, Y. Cerebellar control of locomotion: effects of cooling cerebellar intermediate cortex in high decerebrate and awake walking cats. *J Neurophysiol.* 1980; 44: 119–34.

Ure, D.R. & Rodriguez, M. Preservation of neurologic function during inflammatory demyelination correlates with axon sparing in a mouse model of multiple sclerosis. *Neuroscience.* 2002; 111: 399-411.

Uusisaari, M.; Obata, K. & Knopfel, T. Morphological & electrophysiological properties of GABAergic and non-GABAergic cells in the deep cerebellar nuclei. *J. Neurophysiol.* 2007; 97: 901–911.

Vigil, F.A.B.; Oliveira-Silva, I.F.; Ferreira, L.F.; Graeff, F.G.; Pereira, S.R.C. & Ribeiro, A.M. Thiamine deficiency in rats induces memory deficits on spacial task that correlate with thalamic serotonergic parameters. *Work Shop Neuronal Communication: From Structural to Physiology.* Bahia Blanca, 2008; Vol 1: p-51.

Vortmeyer, A.O. & Colmant, H.J. Differentiation between brain lesions in experimental thiamine deficiency. *Virchows Arch. A. Pathol. Anat. Histopathol.* 1988; 414: 61-67.

Walberg, F. Cerebellovestibular relations: anatomy. *Prog. Brain. Res.* 1972; 37: 361-376.

Wang, X.; Gao, X.; Zhang, X.; Tu, Y.; Jim, M.; Zhao, G.; Yu, L.; Jing, N. & Li, B. The negative cell cycle regulator, Tob (transducer of ErbB-2), is involved in motor skill learning. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2006; 340: 1023–1027.

Wardas, J.; Pietraszek, M.; Schulze, G.; Ossowska, K. & Wolfarth, S. Age-related changes in glutamate receptors: An autoradiographic analysis. *Polish J. Pharmacol.* 1997; 49: 401-10.

Watkins, J.C & Jane, D.E. The glutamate story. *British Journal of Pharmacology.* 2006; 947(1): 122-30.

West, A.R.; Floresco, S.B.; Charara, A.; Rosenkranz, J.A. & Grace, A.A. Electrophysiological interaction between striatal glutamatergic and dopaminergic systems. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2003; 1003: 53–74.

Whelan, P.J. Control of locomotion in the decerebrate cat. *Prog. Neurobiol.* 1996; 49: 481–515.

Winer, B.J. Statistical principles in experimental design. New York: McGraw-Hill; 1962, 672 p.

Wise, S.P. In: Luders HO, editor. Evolutionary and comparative neurobiology of the supplementary sensorimotor area, Supplementary sensorimotor area, advances in neurology, vol. 70. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven; 1996. pp. 71-84.

World Health Organization. Thiamine deficiency and its prevention and control in major emergencies; 1999.

Wurtmam, J.R. & Wurtmam, J.J. In: Nutrition and the brain, 1975. Raven Press. New York.

Yu, J. & Eidelberg, E. Recovery of locomotor function in cats after localized cerebellar lesions. *Brain Res.* 1983; 273: 121–31.

Zubaran, C.; Fernandes, J.G. & Rodnight, R. Wernicke-Korsakoff syndrome. *Postgrad. Med. J.* 1997; 73: 27-31.